

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**DIVERSIDAD EN PALMAS NATIVAS (ARECACEAE): CITOGÉNÉTICA,
CONTENIDO DE ADN Y ANÁLISIS MOLECULARES POBLACIONALES**

por

Paola GAIERO GUADAGNA

**TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magister en Ciencias Agrarias
opción Ciencias Vegetales**

**Montevideo
URUGUAY
2010**

Tesis aprobada por:

GRACIELA GARCÍA

MERCEDES RIVAS

PABLO SPERANZA

Fecha: 9 de abril de 2010

Autor: -----
PAOLA GAIERO GUADAGNA

Director: -----
CRISTINA MAZZELLA

Co-tutor: -----
MARCELO ROSSATO

AGRADECIMIENTOS

A mi orientadora Cristina Mazzella por sus enseñanzas y su apoyo, por su comprensión y por siempre impulsarme, en todos mis proyectos.

A Marcelo Rossato por todos sus aportes en la parte experimental y de interpretación de los resultados y por el apoyo brindado por él y su familia.

A Graciela García, Mercedes Rivas y Pablo Speranza por sus valiosos aportes.

A Lucía Gutiérrez por su invaluable asistencia en el análisis estadístico.

Al Departamento de Biología Vegetal por haberme brindado la oportunidad de realizar esta tesis, y a sus integrantes por sus aportes a este trabajo.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Genética y de Biotecnología, por toda la asistencia brindada, en especial a Magdalena Vaio, quien a pesar de sus múltiples ocupaciones, siempre estuvo cerca (incluso a la distancia) para darme una mano.

A todos los integrantes del Laboratório de Citogenética Vegetal de la UFPE, en especial a Marcelo Guerra, Gustavo Rodríguez Souza y sobre todo a Ana Emilia Barros e Silva.

A todos los estudiantes del LOES, UCS, especialmente a Sabrina Bertolazzi y Jucimar Zacarías y a Gustavo Agostini de la UFRGS.

A Vania, por hacerme sentir en familia en Caxias.

A las empresas forestales FYMNSA, COFUSA y WEYERHAEUSER, especialmente a Daniela Malatés, Ramón Gómez, Juan Antonio Otegui, Leticia Rodríguez, Juan Pedro Posse, Juliana Ivanchenko y Gerardo Osorio, al Vivero KAIA SA y a la ONG Grupo Palmar por permitirme acceso a sus terrenos, asistirme en la búsqueda de poblaciones de palmas nativas y facilitarme la obtención de muestras para realizar este trabajo.

A Eduardo Marchesi y Julián Gago por compartir su amplio conocimiento sobre palmas nativas, acompañarme en la colecta y donar generosamente renuevos

para este trabajo. A Iván Grela por la información acerca de las palmas de Rivera.

A Julio Sburlatti y Gustavo Oliveras por el mantenimiento de las plantas.

A CSIC, ANII e INIA por el apoyo financiero.

A mi familia por su amor incondicional y todo lo que hicieron para que llegara hasta acá.

A mis amigas y amigos por hacerme sentir impulsada y por comprender mis ausencias.

A Pablo por su cariño y contención, por su paciencia ante mis nervios y por ser mi compañero en este proyecto de vida.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	VII
RESUMEN.....	IX
SUMMARY.....	X
1. <u>INTRODUCCIÓN GENERAL</u>	1
1.1. TAXONOMÍA Y FILOGENIA DE LAS PALMAS.....	2
1.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y ASPECTOS ECOLÓGICOS.....	4
2. <u>CITOGENÉTICA Y CONTENIDO DE ADN</u>	11
2.1. INTRODUCCIÓN.....	11
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
2.2.1. <u>Material Vegetal</u>	16
2.2.2. <u>Preparaciones citológicas</u>	17
2.2.2.1. Pretratamiento y fijación de raíces.....	17
2.2.2.2. Digestión del material y realización de preparados.....	17
2.2.3. <u>Conteos cromosómicos y cariotipos clásicos</u>	18
2.2.4. <u>Tinciones diferenciales</u>	19
2.2.4.1. Tinción con nitrato de plata para detectar NOR activas...	19
2.2.4.2. Bando C.....	20
2.2.4.3. Tinción secuencial con CMA/DAPI.....	21
2.2.5. <u>Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH)</u>	22
2.2.5.1. Sondas de ADN.....	23
2.2.5.2. Pretratamientos.....	23
2.2.5.3. Desnaturalizaciones e hibridación.....	24
2.2.5.4. Lavados post hibridación.....	25
2.2.5.5. Detección de la señal de hibridación.....	25
2.2.6. <u>Contenido de ADN</u>	26

2.2.6.1. Medición del contenido de ADN.....	26
2.2.6.2. Análisis estadísticos.....	28
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
2.3.1. <u>Conteos cromosómicos y cariotipos clásicos</u>	29
2.3.2. <u>Detección de patrones de diferenciación longitudinal en</u> <u>los cromosomas por tinciones diferencial</u>	34
2.3.2.1. Regiones organizadoras nucleolares (NOR) activas detectadas por tinción con nitrato de plata.....	34
2.3.2.2. Patrones heterocromáticos detectados por Bandeo C.....	37
2.3.2.3. Patrones heterocromáticos detectados por tinción con CMA/DAPI.....	40
2.3.3. <u>Detección de sitios de ADNr por hibridación <i>in situ</i></u> <u>fluorescente, FISH</u>	48
2.3.4. <u>Contenido de ADN</u>	54
3. <u>ANÁLISIS POBLACIONALES MEDIANTE</u> <u>MARCADORES ISSR</u>	61
3.1. INTRODUCCIÓN.....	61
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
3.2.1. <u>Extracción de ADN</u>	67
3.2.2. <u>Preparación de las muestras para las amplificaciones</u>	68
3.2.3. <u>Selección de cebadores y amplificaciones ISSR-PCR</u>	69
3.2.4. <u>Visualización y análisis de imágenes</u>	70
3.2.5. <u>Análisis estadísticos</u>	71
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	72
4. <u>CONCLUSIONES</u>	95
5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	96
6. <u>ANEXOS</u>	112

Genetic diversity among endangered Uruguayan populations of *Butia* (Becc.) species based on ISSR e Instrucciones a los autores- Plant Syst. Evol.

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro No.	Página
1. Colección de palmeras.....	16
2. Individuos utilizados en la medición de contenido de ADN.....	27
3. Longitudes promedio de los cromosomas de <i>Butia paraguayensis</i> y <i>B. lallemantii</i>	33
4. Contenido de ADN 2C promedio para todas las especies de palmas en estudio.....	56
5. Comparación de medias de la variable contenido de ADN para todas las especies y sus respectivas probabilidades.....	58
6. Coordenadas geográficas de todas las poblaciones incluidas en análisis poblacional por ISSR.....	66
7. Secuencia de los microsatélites probados como cebadores en las reacciones de amplificación ISSR-PCR.....	69
8. Número de bandas amplificadas, número y porcentaje de bandas polimórficas, rango de pesos moleculares e índice de Simpson para los cebadores utilizados.....	76
9. Índices de diferenciación genética entre poblaciones.....	79
10. Análisis molecular de varianza.....	83

Figura No.	Página
1. Relaciones filogenéticas entre las tribus de palmas.....	4
2. Mapa de ocurrencia de las especies del género <i>Butia</i> en los distintos municipios del Estado de Rio Grande do Sul.....	6
3. Mapa de distribución de las seis especies nativas de palmas en Uruguay.....	7
4. Cariogramas de <i>Butia paraguayensis</i> y <i>Butia lallemantii</i> y metafases a partir de las que fueron construidos.....	31
5. Metafases y prometafases de especies de <i>Butia</i> teñidas con nitrato de plata.....	35
6. Metafase de <i>Syagrus romanzoffiana</i> teñida con nitrato de plata.....	36
7. Metafases e interfases de <i>Trithrinax campestris</i> teñidas con nitrato de plata.....	36
8. Bando C en metafases, prometafases e interfases de especies del género <i>Butia</i>	38
9. Bando C en metafases prometafases e interfases de <i>Syagrus romanzoffiana</i> y <i>Trithrinax campestris</i>	39
10. Tinción con fluorocromos CMA/DAPI e hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH) en metafases de <i>Butia capitata</i>	42
11. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH) y tinción con fluorocromos CMA/DAPI en metafases de <i>Butia yatay</i>	43
12. Tinción con fluorocromos CMA/DAPI en metafases de <i>Butia paraguayensis</i> y <i>B. lallemantii</i>	44
13. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH) y tinción con fluorocromos CMA/DAPI en metafases de <i>Syagrus romanzoffiana</i>	45
14. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH) y tinción con fluorocromos CMA/DAPI en metafases de <i>Trithrinax campestris</i>	46
15. Idiograma representando los cromosomas de <i>T. campestris</i>	49
16. Histogramas representativos de los contenidos de ADN de las seis especies de palmas nativas.....	55
17. Poblaciones de <i>Butia yatay</i> , <i>B. paraguayensis</i> y <i>B. lallemantii</i> analizadas mediante marcadores ISSR.....	66
18. Electroforesis en gel de agarosa del ADN genómico de cada muestra.....	73
19. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación ISSR- PCR a partir del cebador (CTC) ₄ RT.....	74
20. Gráficos de repartición de los componentes de varianza obtenidos a partir del análisis de varianza molecular (AMOVA).....	80
21. Dendrograma obtenido a partir del análisis de conglomerados por el algoritmo UPGMA.....	89
22. Análisis de coordenadas principales.....	91

RESUMEN: Diversidad en palmas nativas (Arecaceae): citogenética, contenido de ADN y análisis moleculares poblacionales.

En Uruguay se distribuyen seis especies de palmas nativas, *Butia capitata*, *B. yatay*, *B. paraguayensis*, *B. lallemantii*, *Syagrus romanzoffiana* y *Trithrinax campestris*. Su estado de conservación es comprometido, cuentan con poblaciones envejecidas de escasa regeneración. Este trabajo buscó obtener información de su diversidad genética, para aportar a la gestión de su conservación. Las relaciones taxonómicas de *Butia* y *Syagrus* (subtribu Attaleinae) son complejas, con problemas de definición, entre ellos la ubicación taxonómica de *B. paraguayensis* respecto de *B. yatay*, y la definición reciente de *B. lallemantii* como entidad específica, considerada un ecotipo acaule de *B. paraguayensis*. De estas dos subsisten pocas poblaciones aisladas y reducidas debido a acciones antrópicas. Los objetivos específicos fueron caracterizar la variabilidad en la organización genómica estructural de las seis especies de palmas nativas, usando técnicas de citogenética clásica y molecular y determinar su contenido de ADN 2C por citometría de flujo. Además se propuso analizar en las tres especies de taxonomía compleja: *B. yatay*, *B. paraguayensis* y *B. lallemantii* la variación genética a nivel intra e interpoblacional detectada por medio de marcadores ISSR y establecer las distancias genéticas interpoblacionales e interespecíficas. En cuanto a la **organización genómica estructural**, los conteos cromosómicos ($2n = 32$) y cariotipos en *B. paraguayensis* y *B. lallemantii*, son el primer registro. Se aplicaron bandeos diferenciales (tinción con plata, bandeo C y CMA/DAPI) y detección de sitios de ADN ribosomales (FISH). Las especies de *Butia* y *S. romanzoffiana* presentan un par de bandas CMA+/DAPI-, coincidentes con el NOR y las bandas C, de localización terminal en el brazo corto de un par acrocéntrico menor. Allí también se localiza el ADNr 45S, mientras que la señal del 5S es pericentromérica en un par mediano metacéntrico. En *T. campestris* se observan 4 pares de bandas CMA+/DAPI-, colocalizados con las bandas C y correspondientes al ADNr 45S. El ADNr 5S es pericentromérico y mapea en un par largo. Esta especie presenta un patrón complejo de bandas DAPI+. Las especies de *Butia* tienen **contenidos de ADN** promedio 2C entre 4.07 y 4.18 pg, *Syagrus* tiene 2C de 4.44 pg, significativamente diferente de *Butia*, y ambas se diferencian de *Trithrinax* (2C = 17.15 pg). En el estudio de **marcadores moleculares ISSR**, con *S. romanzoffiana* como grupo externo, se calcularon índices de polimorfismo y de diversidad e índices de diferenciación genética por AMOVA. Se realizó un agrupamiento por el algoritmo UPGMA y un PCoA. Se encontró alta variabilidad intrapoblacional y baja interpoblacional e interespecífica. El análisis de conglomerados y el PCoA no logran separar inequívocamente las tres especies. La variabilidad encontrada representa un gran potencial para su recuperación, si se toman medidas para su manejo sustentable. Palabras clave: *Butia*, *Syagrus*, *Trithrinax*, FISH, citometría de flujo, marcadores ISSR.

SUMMARY: Diversity in native palms (Arecaceae): Cytogenetics, DNA content and molecular population analyses.

There are six palm species in Uruguay: *Butia capitata*, *B. yatay*, *B. paraguayensis*, *B. lallemantii*, *Syagrus romanzoffiana* and *Trithrinax campestris*. Lack of regeneration and aging of their populations are problems which jeopardize their continuity in the short-term future. Information about their genetic diversity was gathered in order to assist the decision-making process related to the implementation of conservation plans. Taxonomic relations among *Butia* and *Syagrus* (subtribe Attaleinae) are complex, with some definition problems. *B. paraguayensis*' taxonomic relation with *B. yatay* is dubious, as is *B. lallemantii*'s description as a species, previously considered a stemless ecotype within *B. paraguayensis*. The populations of these two are scarce, reduced and isolated due to human activity. The specific aims were to characterise variability in the structural genomic organisation of all six native palm species through classic and molecular cytogenetics, as well as to estimate their 2C DNA content using flow cytometry. In addition, to analyse genetic variability within and among populations and species in *B. yatay*, *B. paraguayensis* and *B. lallemantii* by means of ISSR markers, and to establish genetic distances among populations and species. As regards **structural genomic organisation**, chromosome counts and classic karyotypes were obtained for *B. paraguayensis* and *B. lallemantii* ($2n = 32$), for the first time. Differential banding techniques (Ag-NOR, C-banding, CMA/DAPI) and Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) were applied to all species. *Butia* species and *S. romanzoffiana* possess a single pair of CMA+/DAPI- bands, which coincides with NOR and C bands, located terminally on the short arm of a short acrocentric pair, where 45S rDNA is also located, whereas the 5S rDNA site is pericentromeric on a metacentric pair. In *T. campestris* 4 pairs of CMA+/DAPI- bands were observed, which coincide with the C bands and correspond to the 45S rDNA. The 5S rDNA site is located on the pericentromeric region of a long pair. This species displays a complex DAPI+ banding pattern. *Butia* species have average **DNA contents** ranging from 4.07 to 4.18 pg, while *Syagrus* is significantly different, with 4.44 pg, and both genera from *Trithrinax*, with $2C = 17.15$ pg. **ISSR molecular markers** were employed, with *S. romanzoffiana* as outgroup. Diversity and polymorphism indexes were calculated and genetic divergence indexes were determined through AMOVA, using GenAlEx. A cluster analysis and a Principal Coordinates Analysis (PCoA) were performed using FAMD. High levels of variability were found within populations, while that among populations and species was low. The cluster analysis and the PCoA were unable to unequivocally discriminate the three species. The high variability found poses great potential for their recovery, if measures are taken concerning their sustainable development.

Key words: *Butia*, *Syagrus*, *Trithrinax*, FISH, flow cytometry, ISSR markers.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La familia Arecaceae Schultz-Schultzenstein (1832) (=Palmae) a la que pertenecen las palmeras es uno de los grupos más antiguos reconocidos en el registro fósil dentro de las monocotiledóneas (Moore y Uhl 1982, Jones 1995). Se originó a fines del Jurásico o principios del Cretácico en América del Sur y África (oeste de Gondwana), dispersándose luego hacia otros continentes (Moore y Uhl 1982). Actualmente tiene una distribución tropical y subtropical, encontrándose con menos frecuencia en regiones templadas, las que podrían ser relictos de climas más benignos (Dahlgren *et al.* 1985). La familia, que es extremadamente diversa, está integrada por 189 géneros y más de 3000 especies. Se reconocen cinco subfamilias, Arecoideae, Coryphoideae, Ceroxyloideae, Calamoideae y Nypoideae (Dransfield *et al.* 2005), siendo Arecoideae la más numerosa. Está integrada por varias tribus, de las cuales Cocoseae se encuentra representada en nuestro país, a través de los géneros *Butia* y *Syagrus* que pertenecen a la subtribu Attaleinae de dicha tribu. El otro género con representante nativo es *Trithrinax*, subfamilia Coryphoideae, tribu Thrinaceae (Dransfield *et al.* 2005).

Luego de las gramíneas, las palmas son la familia de monocotiledóneas más importante por su utilidad para el hombre. Aportan alimento, material para construcción, combustible, fibras, papel, azúcar, aceite, cera (Dransfield y Uhl 1998), así como derivados químicos (jabones, perfumes, colorantes) (Chebataroff 1974). La especie más ampliamente reconocida por su utilidad al hombre es sin dudas el cocotero (*Cocos nucifera*). De gran y diverso uso es también la palma datilera (*Phoenix dactylifera*), la cual constituye la fuente de alimento básico en los oasis de Medio Oriente y el Norte de África. Su fruto es rico en carbohidratos y, junto con la leche, constituye la base de la dieta estándar de los pobladores del desierto desde hace más de quinientos

años. Otras muchas otras palmeras proporcionan alimentos, como el palmito (*Euterpe edulis*) cuya yema terminal es ampliamente comercializada en conserva; otras aportan frutos comestibles, azúcares o vinos (Chebataroff 1974). *Elaeis guineensis* provee el segundo aceite vegetal para el consumo humano más producido en el mundo luego del de soja (Jourdan y Rey 1997). En Uruguay, Cardoso (1996) menciona una gran variedad de usos de la palma butiá, para consumo familiar, actividad ganadera y producción artesanal. Ya los pobladores más primitivos de nuestro país consumían frecuentemente los frutos de nuestras palmas, habiéndose encontrado endocarpos (cocos) de *Butia capitata* asociados a asentamientos primitivos que pudieron ser datados en más de 9000 años de antigüedad (Carusso com. pers.¹). Las palmas son además muy apreciadas a nivel mundial por su valor ornamental, existiendo asociaciones internacionales dedicadas a su cultivo (por ejemplo: The International Palm Society; www.palms.org); además se usan con fines de protección y de sombra. En nuestro país se plantan palmas a lo largo de carreteras y otras vías públicas, al igual que en plazas, parques y jardines. En muchos casos se trata de especies nativas (Chebataroff 1974). *B. capitata* y *B. yatay* forman palmares de gran valor paisajístico y turístico.

1.1 TAXONOMÍA Y FILOGENIA DE LA FAMILIA ARECACEAE (= PALMAE)

La familia **Arecaceae** integra el orden **Arecales**, el único comprendido dentro del superorden **Areciflorae** y su condición monofilética ha sido sustentada por estudios que la resuelven como un grupo con fuerte apoyo de evidencia molecular (Chase *et al.* 2000, Lewis y Doyle 2001). Sin embargo, las posiciones relativas de las distintas subfamilias, las relaciones a niveles

¹ Luciana Carusso 2009

taxonómicos más bajos y la posición de la raíz dentro de la familia no fueron resueltas de manera concluyente. Se han logrado grandes avances en los trabajos más recientes de reevaluación de la clasificación filogenética de toda la familia y de las subfamilias, realizados por Dransfield *et al.* (2005, 2008) y Asmussen *et al.* (2006). Estudios previos, no concluyentes, se basaron en distintas fuentes de información: estudios morfológicos y de RFLPs en ADNcp (Uhl *et al.* 1995), estudios moleculares de secuencias nucleares y cloroplásticas (Hahn *et al.* 1995, Lewis y Doyle 2001, Hahn 2002). La información generada en dichos estudios ha sido recogida en el trabajo de Dransfield *et al.* (2008), de donde se adaptó el árbol de las relaciones filogenéticas entre las subfamilias que se puede apreciar en la Figura 1.

La subfamilia Arecoideae sólo recientemente ha podido resolverse como una subfamilia monofilética (Asmussen *et al.* 2006) y estudios moleculares han llevado a su división en clados (Baker *et al.* 1999, Asmussen *et al.* 2000). El origen mono o polifilético de la subfamilia Coryphoideae sigue aún en discusión. Son varios los autores que la consideran monofilética (Baker *et al.* 1999, Asmussen *et al.* 2000, Asmussen y Chase 2001, Hahn *et al.* 1995) y sin embargo más recientes estudios de Lewis y Doyle (2001), basado en secuencias de ADN del gen nuclear malato sintasa y de Hahn (2002) concluyen lo contrario.

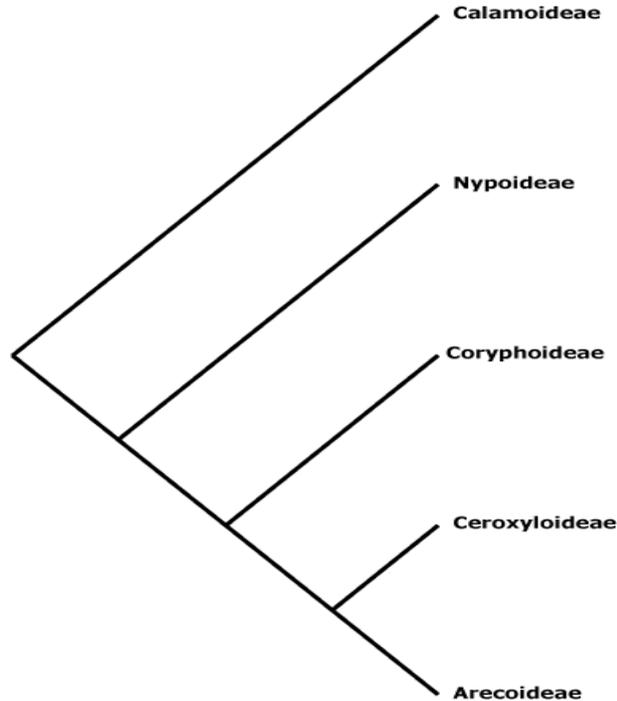


Figura 1- Relaciones filogenéticas entre las subfamilias de la familia Arecaceae. El árbol está basado en los estudios de Dransfield *et al.* (2008) y fue tomado del Missouri Botanical Garden. www.mobot.org.

De las seis especies de palmeras presentes en Uruguay, cuatro pertenecen al género *Butia* (Becc.): *Butia capitata* (Mart.) Becc., *B. yatay* (Mart.) Becc., *B. paraguayensis* (Barb. Rodr.) L. H. Bailey y *B. lallemantii* Deble y Marchiori. Los géneros *Butia* y *Syagrus* pertenecen a la subfamilia Arecoideae, cuyos taxa inferiores sufrieron modificaciones. Esto implica que anteriormente pertenecían a la tribu Cocoeae y subtribu Butiinae (Uhl y Dransfield 1987), siendo que Dransfield *et al.* (2005) las reclasificaron como tribu Cocoseae, subtribu Attaleineae.

1.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y ASPECTOS ECOLÓGICOS

La subfamilia Arecoideae presenta una distribución tropical y subtropical. Incluye 13 géneros, entre ellos *Butia* y *Syagrus* con representantes nativos de Uruguay y la región. La subfamilia es considerada la más amplia y diversa

dentro de la familia Arecaceae, y es en la que se registra un mayor número de especies con utilidad para el hombre (*Cocos nucifera*, *Elaeis guineensis* y *E. oleifera*, *Bactris gasipaes*, *Euterpe edulis*, entre otras) (Dransfield *et al.* 1998). Los géneros *Butia* y *Syagrus* tienen distribución neotropical, exclusivamente sudamericana. *Butia* se encuentra en Brasil, Paraguay, Argentina y Uruguay. Este último representa el límite sur de su distribución. Las 11 especies que integran el género *Butia* a nivel regional presentan marcada adaptación a sus ambientes específicos. La mayoría se encuentra en áreas que sufren fuerte presión antrópica, con gran necesidad de medidas para su conservación. Por otra parte, las especies de *Syagrus* están ampliamente distribuidas en todo el continente. Las poblaciones uruguayas se encuentran también en el extremo sur de su distribución, que incluye Argentina y Brasil (Marcato 2004). La palma yatay forma en la Mesopotamia Argentina y en Brasil palmares de gran extensión. Se encuentran vastas extensiones de palmares de *B. paraguayensis* y *B. lallemantii* en el estado de Rio Grande do Sul (Deble & Marchiori 2006, Rossato com. pers.²), cuya localización, junto con la del resto de las especies de *Butia* de Rio Grande do Sul, puede visualizarse en el mapa de la figura 2 (Rossato 2007). *B. paraguayensis* es la especie que presenta más amplia distribución a nivel regional (Marcato 2004).

² Marcelo Rossato 2009

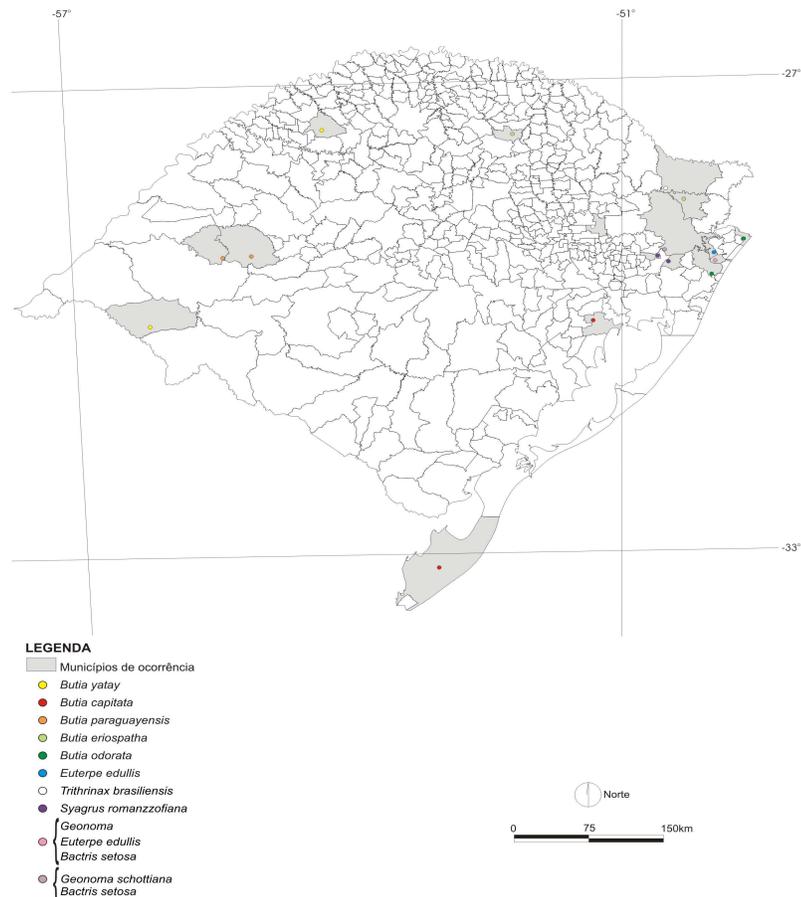


Figura 2. Mapa de ocorrência de las especies del género *Butia* en los distintos municipios del Estado de Rio Grande do Sul, Brasil. Tomado de Rossato (2007)

En Uruguay *B. capitata* y *B. yatay* forman extensas asociaciones de bosques básicamente monoespecíficos, denominados palmares. La primera, denominada palma butiá, forma palmares de gran extensión, cubriendo 70000 hectáreas en el este, en el departamento de Rocha (Cardoso 1996), mientras que la segunda, palma yatay, forma palmares en Paysandú (palmares de Quebracho y Guichón) y en Río Negro (palmares de Porrúa y de Mujica) (Chebataroff 1974). *B. paraguayensis*, palma enana, está restringida a cimas y laderas de cerros de arenisca del norte, en Rivera, en ambientes muy similares a los que habita *B. lallemantii*, palma rastrera, en el mismo departamento. *S. romanzoffiana*, pindó, vive asociada con mucha

frecuencia a nuestros bosques fluviales y de quebrada (ejemplares aislados o en pequeños grupos) con una amplia distribución. *T. campestris*, caranday, es escasa y vive en el litoral oeste de Uruguay, en blanqueales al borde de bosques fluviales (Chebataroff 1974). Existen híbridos intergenéricos naturales entre *B. capitata* y *S. romanzoffiana* (*X Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster) (Chebataroff 1974, Jones 1995). La distribución de las poblaciones nativas de dichas especies se puede observar en el mapa de la figura 3, adaptado de Chebataroff (1974).

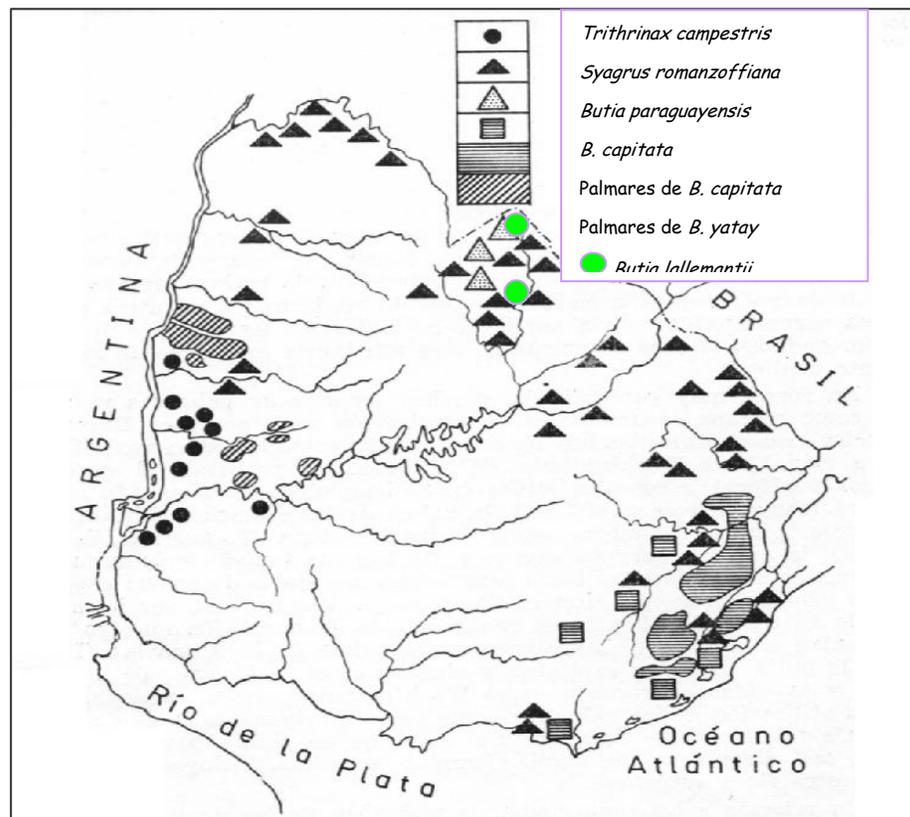


Figura 3. Mapa de distribución de las seis especies nativas de palmas en Uruguay. Adaptado de Chebataroff (1974).

A pesar de la importancia de esta familia, de su gran diversidad, de encontrarse muchas de sus especies en riesgo de extinción y de la variedad de estudios que existen a nivel internacional, en nuestro país son escasos los

estudios de las especies nativas. En los últimos años se han realizado trabajos que buscan determinar estrategias para la conservación *in situ* de los palmares de butiá, los cuales integran la Reserva de Biósfera Bañados del Este. Una de ellas es el establecimiento de áreas protegidas y el incentivo del desarrollo sustentable de la producción, implementando producciones compatibles con la regeneración del palmar y la revalorización de la palma a nivel nacional (Zaffaroni 2004, Jaurena y Rivas 2005, Rivas 2005). En este marco, el conocimiento de la biología de la especie es imprescindible para la toma de decisiones en su gestión. Además de *Butia capitata*, se considera que todas nuestras especies de palmas se encuentran, en diferentes grados, en peligro de extinción, sufriendo amenazas por parte de la acción humana, con falta de regeneración y números muy reducidos de individuos en algunos casos. *Syagrus romanzoffiana* y *T. campestris* parecen ser las menos amenazadas.

Las especies de *Butia* y *Syagrus* pertenecen a la subtribu Attaleinae. Las relaciones entre las especies de esta subtribu son complejas y la taxonomía de dicho grupo aún no está resuelta a pesar de existir estudios tendientes a abordar esta problemática desde el punto de vista biogeográfico, morfológico, de biología reproductiva, y filogenias basadas en ADN cloroplástico de toda la familia, incluyendo algunas especies de esta subtribu. Ejemplo de ello es que los géneros *Butia* y *Syagrus* han sido reevaluados en varias oportunidades, y las distintas especies de Uruguay como hoy las conocemos, en varias ocasiones pertenecieron a un mismo género (Glassman 1979). A su vez existen dudas acerca de la ubicación taxonómica de *Butia paraguayensis* situada como subespecie dentro de *B. yatay* (Xifreda y Sanso 1996), en base a sus características vegetativas y reproductivas. Más recientemente Marcato (2004) realizó una revisión taxonómica y una filogenia de la subtribu encontrando que aunque el género *Butia* es monofilético con fuerte apoyo,

incluso utilizando una enorme cantidad de datos morfológicos y moleculares (ADNcp), no le fue posible definir las relaciones entre especies ni dilucidar las relaciones filogenéticas a nivel de la subtribu Attaleinae. Según un estudio aún más reciente trata de una subtribu monofilética con gran apoyo de evidencia molecular (genes nucleares WRKY). Este trabajo llegó a una filogenia bien resuelta a nivel de géneros, que sitúa a *Syagrus* como género hermano de *Cocos*, mientras que *Butia* se ubica distante de estos dos dentro de la subfamilia y como hermano del género chileno *Jubaea*. La divergencia entre estos últimos dos géneros coincidiría con el levantamiento de la cordillera de los Andes. La divergencia a nivel de especies se habría dado en los últimos 10 millones de años (Meerow *et al.* 2009), pero no fue posible resolver las relaciones internas del género.

Es controversial la descripción de *Butia lallemantii* como entidad específica, ya que hasta el 2006 (Deble y Marchiori) era considerada un ecotipo acaule de *B. paraguayensis* (Brussa y Grela 2007). Estos últimos autores (2007) afirman que *B. lallemantii* se encuentra a nivel regional en poblaciones más o menos aisladas al sur de Brasil y noreste de Uruguay, y que probablemente en el pasado presentase una distribución continua entre estas zonas. La consideran una especie con alto riesgo de extinción en Uruguay, donde se la puede encontrar formando palmares muy pequeños o creciendo de manera aislada. Se conocen muy pocas poblaciones de esta especie, la mayoría en terrenos forestales de Rivera, las que están integradas por números reducidos de individuos (Gaiero, Mazzella, Gago com. pers.³). Por su parte *B. paraguayensis* sólo se encuentra citada en una población de 175 individuos en el Cerro del Miriñaque, ya que según plantean Brussa y Grela (2007) los otros ejemplares anteriormente considerados integrantes de esta especie en referencias para Uruguay, pertenecerían a *B. lallemantii*. Las

³ Paola Gaiero, Cristina Mazzella, Julian Gago 2008

reducidas poblaciones de ambas especies deberían ser motivo de estudio y gestión a corto plazo. De acuerdo con todo lo anteriormente enumerado, estas dos especies presentan, además de problemas particulares en su definición como entidades específicas, problemáticas de conservación compartidas con el resto de las especies nativas de palmas. Estas dos temáticas serán el eje de este trabajo, que intentará aportar conocimiento que asista a su resolución.

Con la finalidad de conocer los recursos genéticos de palmas que presenta nuestro país, se requiere de estudios específicos que ayuden a comprender la taxonomía de nuestras especies y la variabilidad presente. En particular se presenta la urgencia de definir el estatus taxonómico de *B. yatay*, *B. lallemantii* y *B. paraguayensis*, al igual que determinar cuáles son los niveles de variabilidad a nivel molecular presentes en las reducidas poblaciones de las dos últimas. Además resulta importante conocer la variabilidad genética detectada a otros niveles en el resto de las especies nativas de palmas. Existen varias herramientas genéticas que se pueden utilizar para acceder a información que aporte a la resolución de estos problemas.

El objetivo general del presente trabajo fue caracterizar genéticamente las especies de palmas nativas de Uruguay: *Butia capitata*, *B. yatay*, *B. paraguayensis*, *B. lallemantii*, *Syagrus romanzoffiana* y *Trithrinax campestris*, con fines taxonómicos y como herramienta para planes de conservación. En el Capítulo 2 se estudia la organización genómica estructural de todas esas especies considerando aspectos citogenéticos y de contenido de ADN nuclear. En el tercer capítulo se evalúan por medio de marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) tres de las especies: *Butia yatay*, *B. paraguayensis* y *B. lallemantii*, analizando su variabilidad

genética intra e interpoblacional, junto con la variabilidad entre especies. A su vez se consideran distancias entre poblaciones y especies para aportar a su definición taxonómica.

2. CITOGENÉTICA Y CONTENIDO DE ADN

2.1 INTRODUCCIÓN

Para definir la taxonomía y las relaciones filogenéticas de especies vegetales un dato valioso es conocer su organización genómica estructural. En palmas particularmente, la información en aspectos cariológicos es de gran interés por tratarse de un grupo altamente variable en tamaños cromosómicos, estructura de núcleos interfásicos y tipos y disposición de heterocromatina, presentando en contraste pequeña variación en cuanto a números cromosómicos cuyo rango va de $2n = 36$ a $2n = 26$ (Röser 1994, Röser *et al.* 1997). Al respecto los mismos autores proponen que evolutivamente los reordenamientos dieron lugar a una disminución en el número de cromosomas, generando una serie disploide. La misma consiste en un cambio numérico paso a paso, que indica cambios de a pares (Ehrendorfer 1964) y tendría una gran importancia en la evolución de los genomas de palmas y en el aislamiento reproductivo (Röser 1994, 1999). A nivel de subfamilias, los números cromosómicos son bastante constantes, siendo para Arecoideae $2n = 36$ a $2n = 28$ y en particular para la subtribu Attaleinae a la cual pertenecen *Butia* y *Syagrus*, $2n = 32$ y para la tribu Thrinaceae a la cual pertenece *T. campestris*, $2n = 36$ (Röser 1994). Los primeros conteos cromosómicos para poblaciones de Uruguay fueron realizados por Gaiero (2005), que encontró para *Butia capitata*, *B. yatay* y *S. romanzoffiana* $2n = 32$ y para *T. campestris* $2n = 36$. Posteriormente Corrêa *et al.* (2009) realizaron un estudio para especies del género *Butia* (*B.*

capitata, *B. yatay*, *B. paraguayensis*, *B. odorata* y *B. eriospatha*) analizando poblaciones del estado de Río Grande do Sul, Brasil. Algunas de estas especies coincidían con las estudiadas por Gaiero (2005), con la incorporación de especies no analizadas anteriormente (*B. odorata* y *B. eriospatha*). También encontraron complementos cromosómicos de $2n = 32$ en todas las especies, lo que estaría confirmando que para el género *Butia* el número cromosómico es constante ($2n = 32$). Hay pocas descripciones de cariogramas de las especies uruguayas de palmas, siendo el trabajo de Röser (1994) el único previo al de Gaiero (2005) en incluir representantes de dichas especies. Existen descripciones de cariotipos de las especies de *Butia* presentes en Rio Grande do Sul, en las cuales se detallan medidas descriptivas de los cariotipos, (Corrêa *et al.* 2009).

Es posible además describir aspectos de organización genómica estructural de los cariotipos de plantas, en este caso de las palmas nativas. Se cuenta con técnicas especiales, tales como la tinción argéntica para localizar regiones organizadoras nucleolares (NOR), que permite ubicar las NOR que estuvieron activas en el ciclo celular anterior (Hizume *et al.* 1980). Las NOR en palmas se encuentran generalmente en los brazos cortos de los cromosomas, sobre todo en cromosomas acrocéntricos, y muchas veces contiguas a los telómeros. Las situadas en los brazos cromosómicos largos son poco frecuentes. Es común dentro de la familia encontrar dos o cuatro cromosomas con NOR (Röser 1994, 1995). Sin embargo, la tinción argéntica no permite detectar aquellas NOR muy pequeñas o que no estuvieron activas en el ciclo celular anterior, las que pueden ser evidenciados mediante el uso de los fluorocromos CMA (Cromomicina A3) y DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol), ya que las bandas CMA⁺/DAPI⁻ suelen coincidir con las NOR, sin importar su actividad previa (Miller 1981, Guerra 2000). También se pueden detectar por hibridación *in situ* fluorescente FISH (Guerra 2004). La

técnica de FISH, muy utilizada para estudios de genómica estructural y en citotaxonomía, consiste en el apareamiento por homología de determinado segmento de ADN (sonda), marcado con un fluorocromo, con una secuencia complementaria dentro de la célula (secuencia blanco), lo que permite visualizar su localización (Guerra 2004). Los genes que codifican para el ARN ribosomal son muy utilizados como sondas para identificar cromosomas y describir genomios, debido a tratarse de secuencias repetidas y a su localización específica (Leitch y Heslop-Harrison 1993). Estos genes están organizados en largos tándems de repetidos de las unidades 45S por un lado y 5S generalmente por otro, lo que facilita su detección (Guerra 2004). Su número y localización a menudo varían entre especies, por lo que han permitido estudiar homologías cromosómicas y carioevolución en varios géneros de plantas (Jiang y Gill 1994, Castilho y Heslop-Harrison 1995, Ansari *et al.* 1999, Heslop-Harrison 2000 Pedrosa *et al.* 2002, Vaio *et al.* 2005, entre otros). En palmas se han realizado estudios con FISH en la palma aceitera, *Elaeis guineensis*, usando sondas de ADN ribosomal (ADNr), microsatélites y secuencias repetitivas. Esto permitió individualizar sus cromosomas, al igual que examinar la organización, localización y secuencia del ADN repetitivo en su genoma (Castilho *et al.* 2000). En la misma especie se utilizó la técnica de FISH combinando las dos sondas de ADNr (5S y 45S) para realizar un mapeo físico de estas secuencias en sus cromosomas. La técnica se continúa utilizando para localizar otras secuencias, de interés para el mejoramiento genético (Madon *et al.* 2001).

Los bandeos diferenciales, como el Bando C, permiten conocer la distribución de la heterocromatina constitutiva en el genoma de una especie, también aportando entonces al conocimiento de la organización genómica estructural de las especies vegetales. Existen para ellos antecedentes en la familia Arecaceae (Röser 1994, 1995). No es sencillo aplicar la técnica de

Bandeo C a cromosomas de palmas, por lo que puede resultar difícil evidenciar la presencia y localización de bandas heterocromáticas (Röser 1994). Sin embargo, esas bandas pueden ser evidenciadas por técnicas de tinción con fluorocromos. Una de las técnicas de tinción por fluorocromos más utilizada es la de doble tinción con CMA/DAPI, los que permiten diferenciar las regiones heterocromáticas ricas en A-T y G-C, respectivamente. Se conoce que las bandas de heterocromatina DAPI positivas localizadas en la región proximal de los cromosomas, son comunes en palmas, mientras que no fueron encontradas bandas intercalares (Röser 1994). Se encuentran también bandas CMA+ generalmente asociadas a las NOR. En *Trithrinax brasiliensis* (tribu Thrinaceae), especie muy cercana a *T. campestris*, Röser (1994) encontró un patrón simple de bandeo CMA/DAPI. Dicho autor indica además que la tribu en su conjunto posee propiedades de tinción con fluorocromos diferentes en los géneros del Viejo y el Nuevo Mundo, además se trata de la única tribu con dos tipos de bandas proximales citoquímicamente distintas (uno rico en A-T y otro rico en G-C). Röser (1994) también afirma que esta tribu presenta características cariológicas que habitualmente se consideran típicas únicamente de monocotiledóneas herbáceas (núcleos interfásicos reticulados, distribución de los distintos tipos de heterocromatina, entre otras), con lo que podrían tratarse de caracteres ancestrales compartidos.

Considerando la alta variabilidad a nivel de estructura nuclear en la familia, relacionada con una moderada variación en números cromosómicos, resulta importante estudiar el contenido de ADN nuclear en palmas, para obtener información cuantitativa sobre este fenómeno. Röser *et al.* (1997) encontraron una amplia variación en los tamaños genómicos, a pesar de la limitada variación en los números cromosómicos, lo que constituye una de las características más sobresalientes de los genomas diploides de palmas.

En este trabajo se cuantificará el parámetro contenido de ADN para todas las especies nativas.

Existen en plantas procesos de aumento y reducción del tamaño genómico, pero es poco lo que se conoce acerca de ellos, aunque la investigación en cuanto a contenidos de ADN nuclear muestra que la mayoría de la variabilidad encontrada en plantas se debe a diferencias en contenido de ADN repetitivo, en particular los retroelementos (Bennetzen *et al.* 2005). Estos autores plantean para el caso de la reducción en tamaño genómico mecanismos de remoción de estos retroelementos, tales como la recombinación homóloga desigual o la recombinación ilegítima como posibles explicaciones y evalúan si estos mecanismos compiten de manera eficiente con la amplificación de dichos elementos móviles en los genomas de arroz y *Arabidopsis thaliana*.

La técnica más utilizada para determinar el contenido de ADN nuclear en plantas es la de citometría de flujo, y por su precisión y rapidez ha sido utilizada en un alto número de especies vegetales (Bennett y Leitch 2005).

Dado que es necesario conocer la organización genómica estructural de estas especies para aportar a su definición taxonómica y dilucidar sus relaciones, de manera de orientar a la toma de medidas de conservación de nuestras palmeras nativas, este capítulo tiene como objetivos describir por primera vez la organización genómica estructural de todas las especies de palmas nativas: *Butia yatay*, *B. capitata*, *B. paraguayensis*, *B. lallemantii*, *Syagrus romanzoffiana* y *Trithrinax campestris*, usando técnicas de citogenética clásica y molecular y determinar el contenido de ADN 2C de todas las especies mencionadas mediante citometría de flujo.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material Vegetal

Las especies de palmas nativas incluidas en este estudio fueron *Butia capitata*, *B. yatay*, *B. paraguayensis*, *B. lallemantii*, *Syagrus romanzoffiana* y *Trithrinax campestris*. En la Cuadro 1 se detallan los orígenes y números de acceso del conjunto de individuos usados y mantenidos en el invernáculo del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Agronomía en Montevideo (Universidad de la República).

Cuadro 1. Colección de palmeras nativas mantenida en el invernáculo del Depto de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía. Se indica especie, origen de cada material y código de identificación de cada maceta: *Trithrinax campestris* TC, T y TB, *Butia paraguayensis* BP, *B. lallemantii* BL, *B. capitata* BC, *B. yatay* BY y *Syagrus romanzoffiana* SR.

Especie	ORIGEN	Identific.	Especie	ORIGEN	Identific.
<i>Trithrinax campestris</i>	Paysandú, Arroyo Rabón Ruta 24 km 90	TC1	<i>Butia capitata</i>	Canelones, El Pinar, parada 21	BC17
	Río Negro, Arroyo Coladeras Ruta 20 km 26	TC2 y TC3		Rocha, R9 Km 271.5, cultivadas en Vivero de Grupo Palmar	BC18-BC22
	Canelones, Santa Lucía R 63 km 2.8- Vivero Ka S.A.	T2 – T7		Rocha, Aguas Dulces	BC23 y BC24
	Canelones, Toledo- Vivero Ministerio de Agricultura y Pesca	TB1-TB5		Rocha, Palmar de Castillos, Ruta 16 Km 2	BC25 y BC26
<i>Butia paraguayensis</i>	Rivera, Cerro del Miriñaque	BP1-3	<i>Butia yatay</i>	Paysandú, Palmar de Quebracho	BY1 y BY2
	Rivera, Cerro del Galgo	BL1		Paysandú, R3 km 90	BY3-BY4 y BY6
<i>Butia lallemantii</i>	Rivera, Cerro de los Moros	BL2-BL4		Paysandú, Palmar de Quebracho	BY5 y BY7
	Rivera, Cerro de los Ministros	BL5		Canelones, Santa Lucía Ruta 63 km 2.8- Vivero Kaia S.A.	BY8
<i>Butia capitata</i>	Montevideo, Facultad de Agronomía	BC1 y BC2		Paysandú, Cañada del Campamento R90	BY9 y BY10
	Rocha, Palmar de Castillos	BC3-BC8		Paysandú, Estancia El Ombú, R90	BY11- BY13
	Montevideo, Facultad de Agronomía	BC9 y BC10		Paysandú, Palmar de Guichón	BY14 y BY15
	Rocha, R9 Km 273.5, borde de carretera	BC11 y BC12	<i>Syagrus romanzoffiana</i>	Montevideo, Facultad de Agronomía	SR1 y SR2
	Rocha, Palmar de Castillos-germinada	BC13		Treinta y Tres, Quebrada de los Cuervos	SR3
	Canelones, El Pinar, entre parada 22 y 23	BC14		Montevideo, Facultad de Agronomía	SR4-SR9
Canelones, Toledo- Vivero Ministerio de G. Agricultura y Pesca	BC15 y BC16	Tacuarembó, R5, Arroyo Tres Cruces	SR10		
			Canelones, Toledo-Vivero M.G.A.P:	SR11-SR15	

2.2.2 Preparaciones citológicas

2.2.2.1 Pretratamiento y fijación de las raíces

Para los estudios cariológicos se obtuvieron células en división de meristemos de punta de raíz de plántulas jóvenes (hojas aún enteras y de no más de 20 cm). Las raíces fueron colectadas preferentemente entre los meses de noviembre y febrero, entre las 11 y las 12 AM, ya que se observó que ambas condiciones resultaban óptimas para la máxima actividad meristemática en estas especies, lo que permite un mayor número de células en división mitótica. Las raíces se pretrataron con 8-hidroxiquinolina 0,002 M por 24 h a 4° C para inhibir el ciclo mitótico en metafase de modo de conseguir la mayor proporción posible de células en esa etapa de la división. Luego se transfirieron las raíces a una solución fijadora (3:1) etanol absoluto: ácido acético a temperatura ambiente en un volumen de al menos 20 mL durante 30 min con agitación, de manera de lograr una fijación efectiva, para obtener preparados libres de citoplasma. Las raíces así fijadas fueron mantenidas en heladera a 4° C para ser utilizadas dentro de un plazo máximo de 6 meses (Pedrosa *et al.* 2002).

2.2.2.2. Digestión del material y realización de preparados

Con el fin de obtener preparaciones citológicas de calidad satisfactoria para los objetivos buscados se siguió el protocolo de Pedrosa *et al.* (2002), con el que se obtuvieron los mejores resultados, particularmente teniendo en cuenta la dificultad que presentan para ello las raíces de palmeras, debido a su pronta suberificación y la presencia de alto contenido de fibras y de inclusiones minerales (ráfides de oxalato de calcio y silicofitolitos). El ablandamiento de las raíces se realizó en cámara húmeda, depositando el meristema radicular sobre el portaobjetos en una gota de solución mezcla de enzimas (3% celulasa - 30% pectinasa), ajustando los tiempos de digestión

enzimática según el estado de la raíz, pero siempre con al menos 4 h de digestión en estufa a 37° C. Luego de comprobar el adecuado ablandamiento de las raíces, se absorbió con papel de filtro el restante de la mezcla de enzimas y se agregó una gota de 10 µL de ácido acético 60% o 45% (dependiendo del estado de la raíz) durante 30 min en cámara húmeda para eliminar el citoplasma. Se absorbió con papel de filtro el ácido acético y se volvió a agregar una nueva gota de 8 µL de ácido acético en la cual el tejido meristemático fue disgregado con agujas bajo lupa. Cuando el estado fue satisfactorio, asegurando la dispersión de las células y la remoción de restos sólidos que pudieran dificultar el aplastado, se colocó sobre el material un cubreobjetos de 18 cm x 18 cm. Se sometieron las preparaciones a la llama de mechero con el objetivo de calentar el ácido acético y aumentar su capacidad de retirar el citoplasma. Se dispersó el material golpeando el cubreobjetos levemente con aguja. Los resultados de estos procedimientos se fueron comprobando periódicamente en microscopio con contraste de fases hasta alcanzar la calidad deseada. Se aplastó el preparado y se removió el cubreobjetos con N₂ líquido. Los preparados fueron secados al aire. Se comprobó la calidad de las preparaciones en microscopio con contraste de fases y/o por tinción con DAPI (2 µg/mL): glicerol 1.1 (v/v) y observación en microscopio de fluorescencia. Los preparados con por lo menos 10 metafases o prometafases completas y la menor cantidad de citoplasma fueron seleccionados y luego desteñidos en solución Carnoy 3:1 durante 30 min y deshidratados en etanol absoluto por al menos 2 h. Estos preparados fueron conservados en freezer a -20° C hasta su utilización.

2.2.3 Conteos cromosómicos y cariotipos clásicos

En el caso de *Butia paraguayensis* y *B. lallemantii*, especies en las cuales no existían conteos cromosómicos ni cariotipos clásicos, se tiñeron

preparados con coloración Giemsa (Gurr) al 2%. Las preparaciones obtenidas fueron observadas en microscopio Olympus New Vanox AH-3 y se seleccionaron las mejores metafases para fotografiar. Las imágenes fueron digitalizadas usando una cámara Olympus DP71. Se utilizaron tres metafases para elaborar los cariogramas, usando los programas Corel PHOTO-PAINT, Corel DRAW 13 y para realizar las mediciones el programa Image-j. Se realizaron ajustes que afectaron de forma homogénea a todos los píxeles de la imagen.

2.2.4 Tinciones diferenciales

2.2.4.1 Tinción con Nitrato de Plata para detectar NOR activas

Se ajustó la técnica de tinción argéntica, añadiendo al protocolo de Hizume *et al.* (1980) las modificaciones sugeridas por Martin Röser (Martin Luther-Universität, Alemania, com. pers.⁴). Los preparados fueron preincubados en un frasco de coplin de 80 mL con el tampón salino 2 X SSC (Citrato de Sodio Salino 1x: 0.15 M NaCl, 0.015 M citrato de sodio) pH 7.0 en baño húmedo a 40° C durante un tiempo optimizado de 30 min. Se secaron con pera de goma sin enjuague previo y se dejó que se terminaran de secar al aire. Simultáneamente se precalentó en estufa a 80° C una cámara húmeda que estaría pronta para realizar la tinción de los preparados. Se preparó en el momento de usarla una solución 1:1 de AgNO₃: Ácido fórmico 1% pH 3.5. Fue mezclada enérgicamente y guardada en tubo *ependorf* nuevo cubierto con papel aluminio para evitar el pasaje de luz. Cada preparado fue teñido con una gota de 8 µL de esta solución aplicada con micropipeta usando una punta nueva cada vez para evitar la precipitación de cristales de plata. Se controló antes de teñir cada preparado que la solución no hubiese precipitado, en cuyo caso fue descartada y preparada

⁴ Martin Röser 2008

nuevamente. El material fue cubierto con un cubreobjetos limpio de 22 cm x 22 cm y luego el preparado fue colocado en la cámara húmeda a 80° C e incubado por 30 s a 3 min según el preparado, controlando que no se excediese la tinción e intentando visualizar en el microscopio óptico el precipitado de cristales de plata en la región organizadora nucleolar. Cuando se alcanzó la tinción deseada se enjuagó con agua destilada corriente usando piseta, durante 1 min de manera de retirar el cubreobjeto y el exceso de solución. Se secó con pera de goma y se montó definitivamente con una gota de Bálsamo de Canadá (Biopack). Las imágenes fueron adquiridas y procesadas como se detalla en “Conteos cromosómicos y cariotipos clásicos”.

2.2.4.2 Bando C

Se utilizó el protocolo de Schwarzacher *et al.* (1980) con algunas modificaciones introducidas en el Laboratorio de Citogenética Vegetal de la Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil, donde parte de la técnica fue desarrollada bajo la orientación de la Dra. Ana Emilia Barros e Silva y del Dr. Marcelo Guerra. Se utilizaron preparados libres de citoplasma y con un envejecimiento de un máximo de 3 días para obtener mejores bandeos. El protocolo consiste en tratamientos secuenciales de los preparados con distintas soluciones, que deben estar precalentadas al comenzar la técnica y luego ser mantenidas en baño maría. Se sumergieron en primer lugar los preparados en una solución de ácido acético 45% a 60° C durante 10 min en un frasco de *coplin* para hidrolizar el ADN. Se retiró la solución de ácido acético y se reservó para su posterior uso. Se enjuagaron los preparados con agua corriente durante 1 min y se terminó el enjuague cubriéndolos con agua destilada. Se secaron con pera de goma y se transfirieron a una solución saturada de hidróxido de bario a 60° C también durante 10 min con el fin de desnaturalizar el ADN menos condensado de la muestra. Al colocar los preparados se cuidó

de retirar los cristales sobrenadantes, para que el Hidróxido de bario no quedara adherido a los preparados. Se enjuagó con agua corriente, dejando desbordar el frasco de coplin hasta asegurarse que los cristales sobrenadantes fueran eliminados. Se vació el frasco y se lo llenó con la solución de ácido acético 45% que había sido utilizada en el paso anterior, también con el mismo objetivo. Se retiró rápidamente la solución y se llenó el frasco con agua destilada. Los preparados fueron secados nuevamente y se los incubó en tampón 2 X SSC a 60° C durante 80 min para realizar la renaturalización. En el caso de preparados que mantenían algo de citoplasma, se controló la incubación cada 10 min en microscopio óptico, buscando evitar la pérdida de material por arrastre. Se retiró el 2 X SSC, se lavaron los preparados con agua destilada y se secaron con pera de goma. Una vez secos fueron teñidos individualmente siendo sumergidos en una solución de Giemsa al 2% en agua destilada durante 30 s a 2 min dependiendo del preparado y controlando la tinción en microscopio óptico. Se secaron y montaron definitivamente con las resinas Entellan (Merck) o Bálsamo de Canadá (Biopack). Las imágenes fueron capturadas y procesadas como se detalla en la sección “Conteos cromosómicos y cariotipos clásicos”.

2.2.4.3 Tinción secuencial con CMA/DAPI

Se utilizó la doble tinción secuencial con los fluorocromos Cromomicina A3 (CMA) y 4',6-diamidino-2-phenilindol (DAPI) (Cabral *et al.* 2006) Esta técnica fue desarrollada en el Laboratorio de Citogenética Vegetal de la UFPE. Los mejores resultados fueron obtenidos en las preparaciones libres de citoplasma. Se las dejó envejecer a temperatura ambiente por tres días antes de exponerlas a los fluorocromos CMA/ DAPI, los cuales tienen mayor afinidad por ADN rico en bases G-C y A-T, respectivamente. Se aplicaron 10 µL de CMA, a una concentración optimizada de 0.5 mg/mL a temperatura

ambiente, se cubrió el material con un cubreobjetos de 22 cm x 22 cm, se incubaron los preparados en una cámara húmeda y se guardaron en oscuridad durante 1 h. Se lavaron los preparados con agua destilada, retirando el cubreobjetos por arrastre y se secaron con una pera de goma. Para la contratinción se colocaron 10 μ L de DAPI a una concentración de 1 μ g/mL, luego siguiendo el mismo procedimiento que para el CMA pero incubando durante 30 min. Luego del lavado y secado los preparados se montaron en tampón McIlvaine (pH 7)/ glicerol (v/v 1:1). Antes de observarlos, se dejaron tres días en oscuridad ya que el CMA presenta inestabilidad si se expone a la luz antes de ese período.

Se registraron al menos 10 divisiones por preparado. Las imágenes se adquirieron utilizando una cámara de video Cohu-CCD acoplada a un fotomicroscopio Leica DMLB y se combinaron utilizando el software Leica Qfish. El procesamiento final se realizó con los programas Paint Shop Pro, Corel PHOTO-PAINT 13 y Corel Draw 13. Posteriormente se removió el cubreobjeto y se destiñeron los preparados siguiendo el mismo procedimiento que para el DAPI/glicerol (ver “Digestión del material y realización de preparados”). Se almacenaron a -20° C hasta su tratamiento de hibridación *in situ*.

2.2.5 Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

En preparados de excelente calidad se analizó el número de sitios y localización del ADN ribosomal (ADNr) 45S y 5S mediante la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) utilizándose el protocolo descrito en Pedrosa *et al.* (2002) con modificaciones. Este trabajo fue realizado como una Pasantía de Investigación en el Laboratorio de Citogenética Vegetal de la Universidade Federal de Pernambuco, como entrenamiento en la técnica de FISH y en particular en su aplicación a especies nativas de palmas.

2.2.5.1 Sondas de ADN

Se utilizaron las sondas R2 y D2. La sonda R2 es un fragmento de aproximadamente 6.5 Kb conteniendo una unidad de repetición de los ADN ribosomales 18S-5.8S-25S (45S) de *Arabidopsis thaliana* (Wanzenböck *et al.* 1997), con las secuencias espaciadoras transcritas internas ITS1 e ITS2 y un pequeño segmento de la región intergénica 5' (IGR) incluidos. La sonda D2 es un dímero del ADN ribosomal 5S de *Lotus japonicus* (Pedrosa *et al.* 2002) de 500 pb de longitud aproximadamente. Ambas sondas fueron marcadas mediante el método enzimático "nick translation" (Invitrogen). La sonda R2 fue marcada indirectamente con biotina-11-dUTP (Roche) y la sonda D2 directamente con el fluorocromo Cy3 (Amersham).

2.2.5.2 Pretratamientos

Los preparados fueron pretratados con 50 µL de ARNasa (USB, 1:200 en 2 x SSC) cubiertos con cubreobjetos plásticos (Parafilm, Sigma) durante 1 h en cámara húmeda a 37° C. Luego se incubaron en 50 µL de pepsina (Sigma, 1 mg/mL, 2 µL y completar a 200 µL con HCl 0, 01 N) por 40 min en cámara húmeda a 37° C. Estos pretratamientos se efectuaron para evitar reacciones cruzadas. Posteriormente las preparaciones fueron fijadas por inmersión en paraformaldehído 3.7% en tampón PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Los preparados se lavaron dos veces en 2xSSC durante 5 min después de cada tratamiento, manteniéndolos húmedos entre tratamientos. Al finalizar fueron sometidos a una deshidratación en una serie alcohólica (3 min en etanol 70%; 3 min en etanol 100% ambos a 20° C) y se dejaron secar al aire por un mínimo de 1 h.

2.2.5.3 Desnaturalizaciones e hibridación

Para lograr buena hibridación sobre los cromosomas de las especies incluidas en este trabajo fue necesario realizar una desnaturalización de los preparados previa a la desnaturalización convencional, con el fin de asegurar que posteriormente ocurriera la hibridación con la sonda. Para ello se colocaron 50 μ L de formamida deionizada al 50% en 2 x SSC en cada preparado, cubriéndolo con cubreobjetos plástico de 22 cm x 22 cm. Se dejó desnaturalizar durante 7 min a 75° C en un termociclador. Al terminar el cubreobjetos fue retirado con pinza y los preparados fueron sumergidos rápidamente en etanol 70% a -20° C por 5 min y luego transferidos a etanol 100% a -20° C por otros 5 min. Se los dejó secar al aire durante 1 h.

Se preparó una mezcla de hibridación compuesta por 50% (v/v) formamida deionizada, 10% (p/v) sulfato de dextrano, 0.2% (p/v) SDS (dodecil sulfato de sodio), 2 X SSC y 1 mg/ μ L de cada sonda, mezcla con la cual se logra un 76% de astringencia. Se homogeneizó cuidadosamente en vortex y se desnaturalizaron las sondas sometiendo la mezcla a 75° C durante 10 min. Fue inmediatamente transferida a hielo durante al menos 5 min para asegurar que las sondas se mantuviesen desnaturalizadas hasta el momento de la hibridación. Se aplicaron 10 μ L de la mezcla bien homogeneizada a cada preparado, se los cubrió con cubreobjetos de vidrio de 20 cm x 20 cm y se los dejó desnaturalizar a 85° C durante 10 min. Al completarse la desnaturalización, los preparados fueron sellados con pegamento plástico y se los dejó hibridar a 37° C durante 20 h (overnight), siempre evitando la exposición a la luz para mantener la fluorescencia del fluorocromo Cy3 de la sonda D2.

2.2.5.4 Lavados post hibridación

Se retiró el pegamento con pinza y se sumergieron los preparados en 2 X SSC por al menos 5 min con el fin de retirar los cubreobjetos. Luego fueron incubados dos veces en 2 X SSC a 42° C durante 5 min. Se comenzaron los lavados de astringencia, fijada en 72%. Para ello los preparados se incubaron otras dos veces en 0,1 X SSC también durante 5 min a 42° C. Se incubaron una vez más en 2 X SSC por 5 min a 42° C y fueron luego transferidos a 2 X SSC a temperatura ambiente durante 10 min, también en todo momento evitando la exposición a la luz.

2.2.5.5 Detección de la señal de hibridación

Previo a la detección de las señales de hibridación los preparados se sumergieron en 1 X PBS conteniendo 0.1% de Tween 20 por 5 min a temperatura ambiente. A continuación se aplicaron sobre cada preparado 50 µL de solución bloqueadora que consistió en 3% de seroalbúmina bovina en 1 X PBS, se cubrió el material con cubreobjetos plástico y se incubaron en una cámara húmeda a 37° C por 30 min, con el fin de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos. La sonda R2 (ADNr 45S) marcada con digoxigenina fue detectada empleando dos juegos de anticuerpos. El anticuerpo primario utilizado fue anti-digoxigenina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC; Boehringer Mannheim) y se colocaron 0.4 µL de este anticuerpo en 19.6 µL de la solución bloqueadora 3% BSA en 1 X PBS. Se colocaron 20 µL por preparado y luego de aplicado un cubreobjeto de plástico se incubaron en cámara húmeda a 37°C durante 1 h. Luego los preparados fueron lavados tres veces en 1 X PBS a temperatura ambiente durante 2 min. El anticuerpo secundario, que se unió al primario para amplificar la señal, fue preparado en una solución de 0.7 µL de anti-FITC de oveja conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC; Star88F,

Serotec) en 19.3 μ L de la misma solución bloqueadora 3% BSA en 1 X PBS. Al igual que para el anticuerpo primario se colocaron 20 μ L y se incubaron durante otra hora (Moscone *et al.*, 1996). Luego de repetir los lavados, los preparados se montaron en 8 μ L de DAPI (2 μ L/mg) en Vectashield (Vector) sellándolos con esmalte de uñas comercial (Pedrosa *et al.*, 2002). Las imágenes se adquirieron y se procesaron utilizando el mismo procedimiento descrito para la tinción con fluorocromos detallado en la sección “Tinción secuencial con CMA/DAPI”.

2.2.6 Contenido de ADN

2.2.6.1 Medición del contenido de ADN

Se determinó el contenido de ADN nuclear (valor 2C) de todas las especies de palmas nativas en el Servicio de Clasificación Celular y Citometría de Flujo (SECIF-IIBCE) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, bajo la orientación del Dr. Gustavo Folle y con la colaboración de la Lic. (MSc) Magdalena Vaio, la Ing. Agr. Beatriz López y el Lic. Federico Santiñaque. Se efectuaron mediciones de al menos tres plantas de distinto origen para cada especie, cada uno de una población nativa diferente, a excepción de *B. lallemantii* en la cual se utilizaron cinco individuos ya que tres de ellos pertenecían a una misma población. Se realizaron por lo menos tres repeticiones de cada planta (Cuadro 2). Algunas son mantenidas en el invernáculo del Depto. de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía y de otras se tomaron muestras a campo. Se utilizaron como estándares internos las especies *Pisum sativum* (2C=9.09 pg) para los materiales del género *Butia* y *Syagrus*, y *Vicia faba* (2C=26.4 pg) para medir el contenido de ADN 2C de *Trithrinax campestris*.

Se siguió el protocolo de Doležel y Gødhe (1995) con las modificaciones introducidas en Vaio *et al.* (2007). Se colocaron muestras de 5 cm de hojas jóvenes de la planta a analizar y del estándar interno en una placa de Petri. Se agregaron 0.5 mL de tampón Otto I (0.1 M ácido cítrico+ 0.5% Tween 20) que estaba conservado en hielo y se fraccionaron simultáneamente las hojas con una hoja de afeitar bien afilada. Se filtró inmediatamente el machacado de hojas a través de una membrana de nylon de 45 µm de poro a un tubo de citómetro de 5 mL y se lo incubó a temperatura ambiente por un mínimo de 10 min y hasta 1 h dependiendo del material analizado. Posteriormente fueron adicionados 0.5 mL del buffer Otto II (0.4 M Na₂HPO₄.12H₂O), ARNasa (50 µg/mL) e ioduro de propidio (50 µg/mL) procediéndose inmediatamente al análisis de la muestra en citómetro de flujo.

Cuadro 2. Individuos utilizados en la medición de contenido de ADN por citometría de flujo.

Especie	Identificación	Origen	Repeticiones
<i>Butia capitata</i>	BC5	Castillos, Rocha	5
	BC11	R9 Km 273.500, borde de carretera, Rocha	3
	BC15	Vivero Ministerio GAP - Toledo, Canelones	4
<i>B. yatay</i>	BY2	Quebracho, Paysandú	6
	BY5	Quebracho, Paysandú	5
	BY12	Estancia El Ombú, Ruta 90, Paysandú	4
<i>B. paraguayensis</i>	BP1	Cerro del Miriñaque, Rivera	4
	B.par 1 (Miriñaque 2008)	Cerro del Miriñaque, Rivera	3
	B. par 2 (Miriñaque 2008)	Cerro del Miriñaque, Rivera	4
<i>B. lallemantii</i>	BL1	Cerro del Galgo, Rivera	9
	B. lal 1 (Weyerhaeuser)	Cerro de los Moros, Rivera	3
	B. lal 2 (Weyerhaeuser)	Cerro de los Moros, Rivera	3
	B. lal 3 (Weyerhaeuser)	Cerro de los Moros, Rivera	4
	BL5	Cerro de los Ministros, Rivera	5
<i>Syagrus romanzoffiana</i>	SR3	Quebrada de los Cuervos, Treinta y Tres	8
	SR6	Parque de Fac. de Agronomía, Montevideo	7
	SR10	Arroyo Tres Cruces, Tacuarembó	5
<i>Trithrinax campestris</i>	TC1	Arroyo Rabón Ruta 24 km 90, Paysandú	4
	TC2	Arroyo Coladeras Ruta 20 km 26, Río Negro	5
	TC 6	Vivero Kaia, Santa Lucía, Canelones	6

La determinación del contenido de ADN se realizó en un citómetro de flujo Facs Vantage (Becton Dickinson) equipado con un láser Innova 330 el cual opera a una longitud de onda de 488 nm. Se estimaron parámetros fotométricos tales como dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SC) de la luz láser así como FL2 (fluorescencia de IP). Se utilizó filtro de banda 575/26 para seleccionar la fluorescencia emitida por los núcleos teñidos con IP y un fotomultiplicador para su amplificación. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa CELLQuest. Se analizaron entre 5000 y 10000 núcleos por muestra. El contenido de ADN absoluto (contenido de ADN nuclear o 2C) se calculó mediante la fórmula detallada a continuación:

$$\text{Contenido de ADN nuclear } 2C = \left(\frac{\text{media del pico G1 muestra}}{\text{media del pico G1 estándar}} \right) \times \text{contenido de ADN } 2C \text{ del estándar.}$$

Se calcularon además el desvío estándar, el error estándar y el coeficiente de variación. Todos los valores fueron expresados en picogramos (pg) y además transformados a Mega pares de bases (Mpb) utilizando la relación 1 pg = 978 Mpb de Doležel *et al.* (2003).

2.2.6.2 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SAS® (SAS Institute Inc., 2002) con la asistencia de la Ing. Agr. (PhD) Lucía Gutiérrez. Algunos de los datos fueron descartados para este análisis debido a falta de precisión en la medición. Los datos fueron analizados en principio con el Univariate Procedure del programa SAS para comprobar la normalidad de la distribución. Para el análisis de varianza se utilizó el Proc GLM (General Lineal Model) teniendo en cuenta que los datos se ajustan a un modelo lineal generalizado del tipo:

$$Y = \alpha + \beta_i + \gamma_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

donde Y es la medición de contenido de ADN, α representa la media de la especie, β_i el efecto fijo de la especie, γ_{ij} el efecto aleatorio de la planta dentro de la especie y ϵ_{ijk} el error aleatorio.

Para la comparación de las medias se utilizó el GLM con el test *a posteriori* de Bonferroni para comparaciones múltiples, tomando en cuenta el desbalance de los datos. Además se realizaron contrastes ortogonales entre los géneros *Butia*, *Syagrus* y *Trithrinax*.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

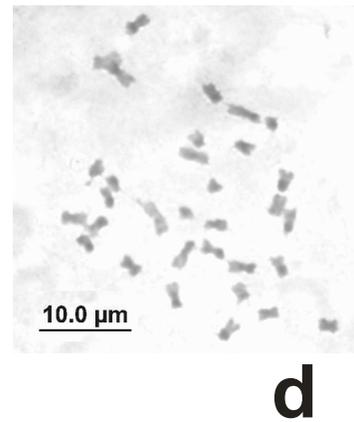
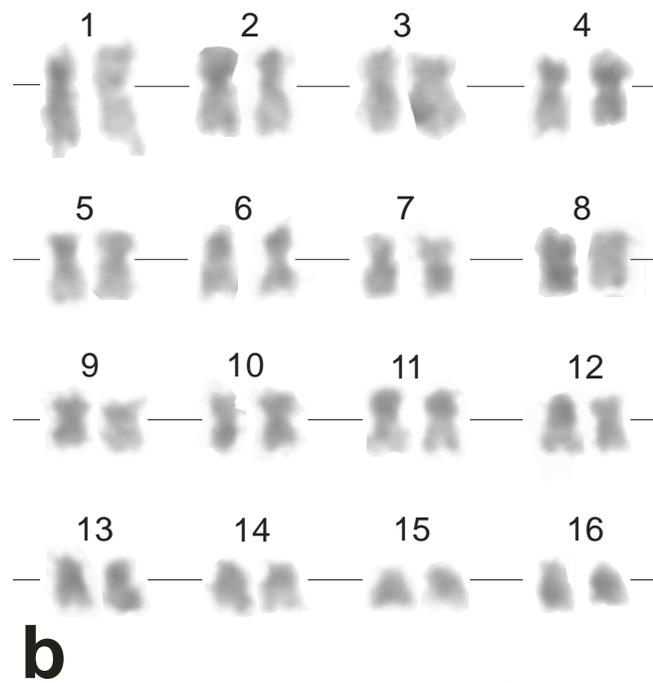
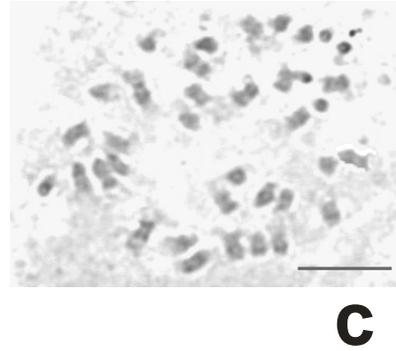
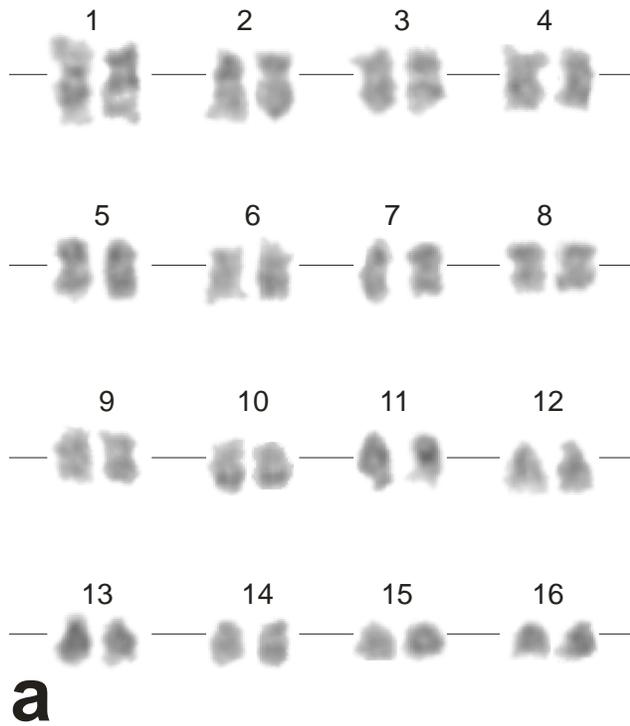
2.3.1 Conteos cromosómicos y cariotipos clásicos

Para determinar los números cromosómicos somáticos de *Butia paraguayensis* y *B. lallemantii* se realizaron conteos a partir de 10 metafases y prometafases bien dispersas, teñidas con Giemsa al 2%. A los efectos de armar los cariotipos de estas dos especies, se formaron los pares de cromosomas homólogos considerando su tamaño relativo y los patrones heteropicnóticos. Para alinearlos en el cariograma se tomaron en cuenta, como es clásico, también la posición del centrómero y el tamaño relativo de los brazos.

Se obtuvieron tres cariogramas de calidad satisfactoria de *Butia paraguayensis* (uno de ellos en Fig. 4a) y tres de *B. lallemantii* (uno de ellos en Fig. 4b) a partir de tres metafases o prometafases, seleccionadas entre aquellas en que se realizaron los conteos cromosómicos. Ambas especies presentaron complementos cromosómicos somáticos de $2n = 32$ cromosomas, agrupados en 16 pares. Estas determinaciones coinciden con las ya realizadas en la tesis de grado de Gaiero (2005) para poblaciones de las otras especies nativas de *Butia* (*B. capitata* y *B. yatay*) así como para *Syagrus romanzoffiana*. Diferente fue el caso de *Trithrinax campestris* donde

en el mismo trabajo de tesis se determinó un número $2n = 36$, con 18 pares cromosómicos. El complemento cromosómico hallado en *B. paraguayensis* y *B. lallemantii* coincide con el presentado por Corrêa *et al.* (2009). En dicho trabajo sólo se analizó la primera de las dos especies, pero es posible que algunos de los individuos analizados pertenezcan a la segunda y hayan sido erróneamente clasificados debido a la similitud morfológica entre ambas y a la dificultad de diferenciarlas en la etapa de renuevos (Rossato com. pers.⁵). Con respecto a *B. paraguayensis*, existe un único trabajo previo (Cocucci, 1964), en el cual a partir de metafases I meióticas en la microsporogénesis obtenidas por medio de secciones microtómicas seriadas, se observó un número haploide $n = 8$. En el presente trabajo se reevalúa dicha determinación, descartando el número haploide obtenido anteriormente y el número cromosómico diploide de 16 que se infiere (número incluso no presente en la familia, cuyo mínimo es 26), seguramente deducido por error por la técnica utilizada. Por otra parte, los números cromosómicos encontrados en este trabajo coinciden con los hallados a nivel regional para otras especies de *Butia*: *B. capitata* (Read 1966, Corrêa *et al.* 2009), *B. yatay*, *B. eriospatha* y *B. odorata* (Corrêa *et al.* 2009) y para *Syagrus romanzoffiana* (Röser 1994, Moro 1999). Para la subtribu Attaleinae (ex Butiinae) a la que pertenecen ambos géneros, se han determinado como los más comunes los complementos cromosómicos $2n = 32$ y $2n = 34$. Comparando a nivel de la subfamilia Arecoideae a la que pertenece la subtribu Attaleinae, los valores aquí encontrados o confirmados quedan comprendidos entre $2n = 28$ y $2n = 34$ que posee toda la subfamilia, siendo nuevamente los más frecuentes $2n = 32$ y $2n = 34$ (Röser 1994). La determinación de los complementos cromosómicos de *B. paraguayensis* y *B.*

⁵Marcelo Rossato 2009



10.0 μm

Figura 4. Cariogramas de (a) *Butia paraguayensis* y (b) *B. lallemantii* y metafases (c y d) a partir de las que fueron construidos. La barra representa 10 micras.

lallebantii, junto con los datos aportados por Gaiero (2005) y Corrêa *et al.* (2009) para otras *Butia*, están de acuerdo con la observación de Röser (1994, 1999) que afirma que en la familia Arecaceae los números cromosómicos son generalmente constantes dentro de un mismo género

En la figura 4 (a y b) se observa uno de los cariogramas para cada especie, construidos a partir de las metafases presentada en la figura 4 (c y d), respectivamente. Todos los cromosomas son bibráquiados, siendo seis de los pares metacéntricos, siete submetacéntricos y los tres pares menores acrocéntricos, siguiendo a Levan *et al.* (1964). Esto coincide con lo encontrado para *Butia capitata* y *B. yatay* en Uruguay (Gaiero 2005) y *B. paraguayensis* (posiblemente confundida con *B. lallebantii*), *B. eriospatha* y *B. odorata* en Rio Grande do Sul (Corrêa *et al.* 2009). Es coherente con lo encontrado a nivel de la subfamilia Arecoideae, donde los cromosomas son predominantemente metacéntricos a submetacéntricos, con unos pocos acrocéntricos y raramente telocéntricos (Röser 1994). En los dos casos se trata de cariotipos simétricos, ya que las longitudes de los cromosomas disminuyen gradualmente, al igual que en las demás especies del género (Gaiero 2005, Corrêa *et al.* 2009). Según el criterio de Guerra (2000) se trata de cromosomas pequeños en promedio ($< 3 \mu\text{m}$). En *B. paraguayensis* presentan un largo promedio de $2,85 \mu\text{m}$, con un rango entre $4,32$ y $1,92 \mu\text{m}$ mientras que en *B. lallebantii* la longitud promedio es de $2,55 \mu\text{m}$, con un rango que va de $3,76$ a $1,38 \mu\text{m}$. En el Cuadro 3 se detallan las longitudes promedio de todos los pares cromosómicos.

Cuadro 3. Longitudes promedio en μm de todos los pares cromosómicos de *Butia paraguayensis* y *B. lallemantii* a partir de las mediciones realizadas en tres metafases de cada especie.

Longitud promedio en μm		
Par	<i>Butia paraguayensis</i>	<i>Butia lallemantii</i>
1	4.32	3.76
2	3.68	3.45
3	3.46	3.30
4	3.36	2.88
5	3.34	2.63
6	3.03	2.59
7	2.81	2.56
8	2.79	2.54
9	2.77	2.36
10	2.74	2.27
11	2.54	2.26
12	2.47	2.19
13	2.21	2.13
14	2.15	1.83
15	1.99	1.65
16	1.92	1.38

Las mediciones para las otras especies de palmas nativas fueron realizadas en Gaiero (2005), siendo el promedio para *B. capitata* ligeramente menor ($2.3 \mu\text{m}$) y el de *B. yatay* apenas mayor ($2.9 \mu\text{m}$). En cambio en el trabajo de Corrêa *et al.* (2009) la longitud promedio de los cromosomas de *B. paraguayensis* es notoriamente menor ($2.01 \mu\text{m}$) a la encontrada aquí, siendo las determinaciones realizadas por dichos autores para el resto de las especies de *Butia* también claramente menores que las halladas para *B. paraguayensis* y *B. lallemantii* en este trabajo. Esto puede deberse al grado de condensación de las divisiones elegidas para efectuar las mediciones, ya que en el trabajo de Corrêa *et al.* (2009) se observan metafases muy condensadas. Si analizamos los rangos de las longitudes de los cariotipos, los hallados en este trabajo coinciden en términos generales con los encontrados por Gaiero (2005) para las demás *Butia* nativas de Uruguay, siendo la longitud del par más largo

ligeramente mayor aquí que en Gaiero (2005), 3.8 μm , y en Corrêa *et al.* (2009), 3.44 μm . Nuevamente esto puede deberse al estado de condensación de los cromosomas en las divisiones analizadas. Sin embargo, los tres trabajos coinciden en los límites inferiores de los rangos. Para la subfamilia Arecoideae el estudio de la longitud del cromosoma más largo en 23 géneros arroja valores de 2.3 a 4.1 μm , quedando los valores hallados en este trabajo comprendidos dentro de este rango (Röser 1994). Con la tinción clásica de Giemsa se detectan a lo largo de los cromosomas distintos patrones heteropicnóticos, similares a los hallados en las otras dos especies de *Butia* al teñir con orceína (Gaiero 2005). Estos patrones de picnosis asociados a la condensación son comunes en la subfamilia Arecoideae (Röser 1994). En suma, la tinción convencional en estas especies no permite evidenciar diferencias entre ellas, lo que indica que son muy similares en cuanto a las características cariotípicas observadas por esta técnica.

2.3.2 Detección de patrones de diferenciación longitudinal en los cromosomas por tinciones diferenciales.

2.3.2.1 Regiones organizadoras nucleolares (NOR) activas detectadas por tinción con Nitrato de Plata.

Con el fin de detectar regiones organizadoras nucleolares (NOR) activas en todas las especies, metafases y prometafases de buena calidad fueron sometidas a tinción con nitrato de plata. En las figuras 5 a 7 se presentan metafases y núcleos interfásicos de todas las especies en estudio. Tanto en las del género *Butia* (Fig. 5) como en *Syagrus romanzoffiana* (Fig. 6) se observó un único par de sitios activos localizado en la región subteloamérica del brazo corto del par 14. Esto coincide con lo que se encuentra generalmente en la subfamilia Arecoideae, en la cual es común identificar 2 o 4 NOR, habitualmente en los brazos cortos de cromosomas de tamaño intermedio, en ocasiones cerca de los telómeros

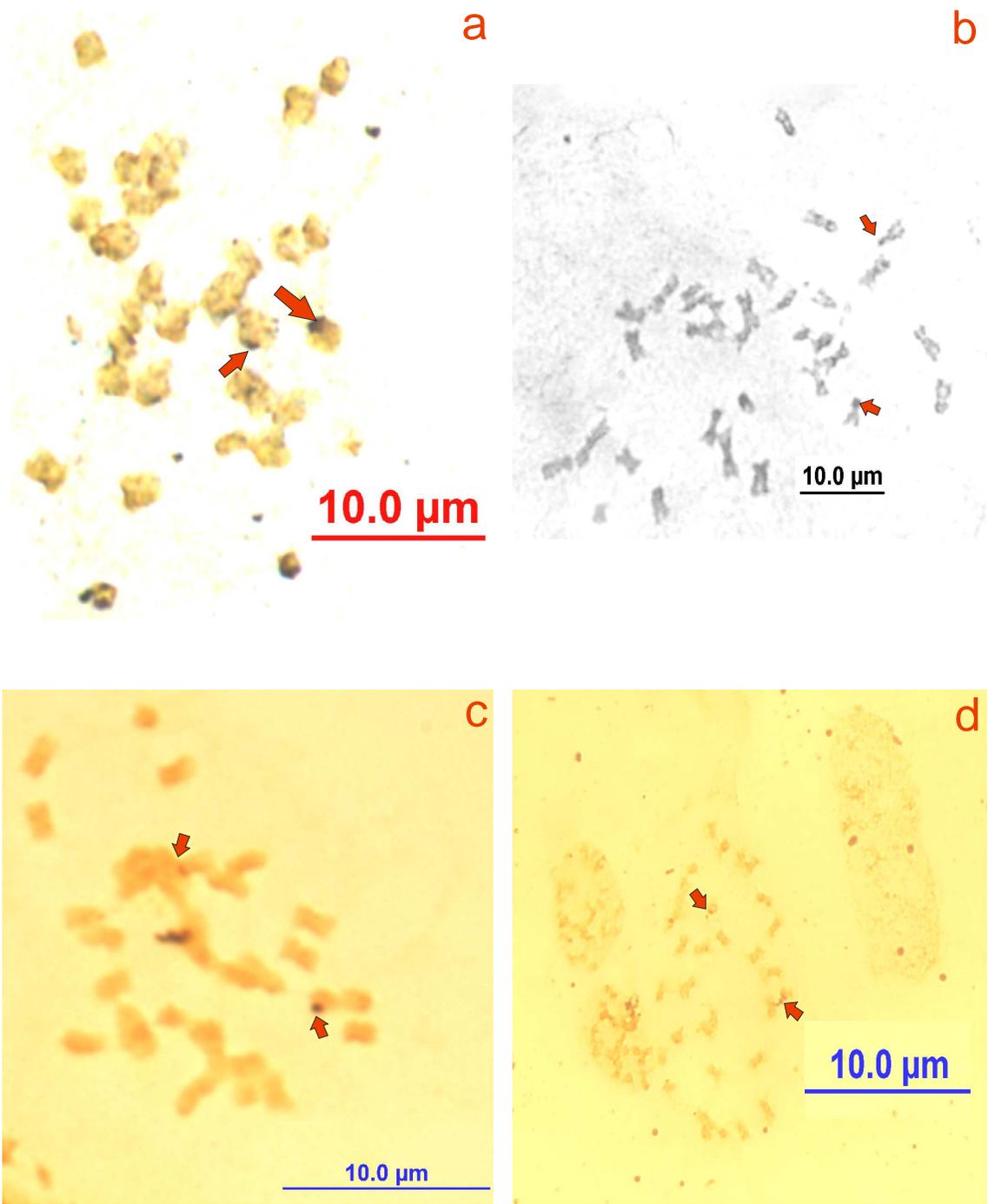


Figura 5. Metafasas, prometafases e interfases de (a) *Butia capitata* (b) *B. yatay* (c) *B. paraguayensis* y (d) *B. lallemantii* teñidas con Nitrato de Plata. Las flechas rojas indican las NOR. La barra representa 10 micras.

Figura 6. Metafase de *Syagrus romanzoffiana* teñida con Nitrato de Plata. Las flechas rojas indican las NOR. La barra representa 10 micras.

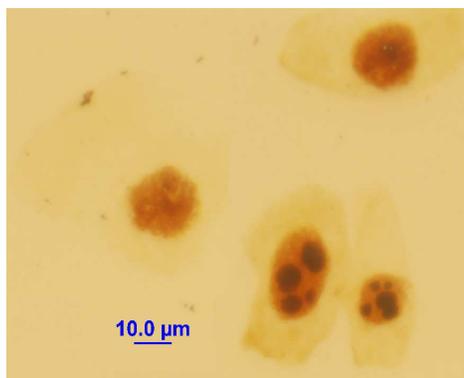
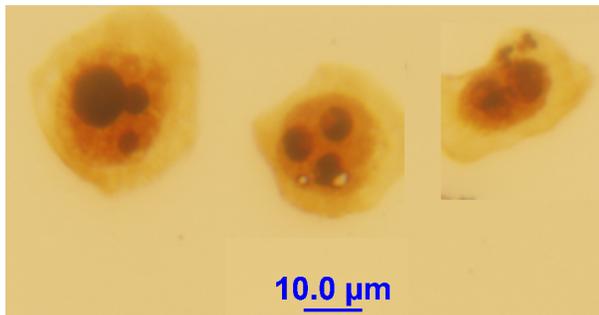
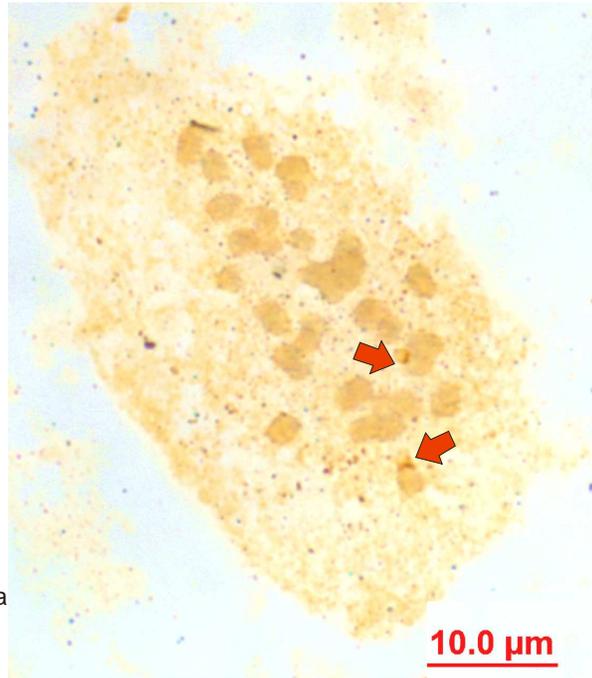
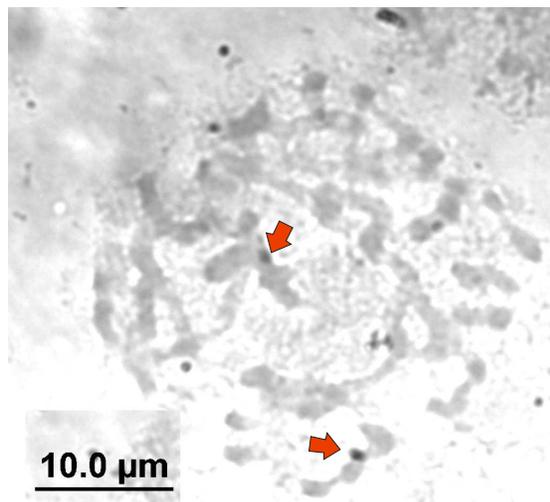


Figura 7. Metafase e interfases de *Trithrinax campestris* teñidas con Nitrato de Plata. Las flechas rojas indican las NOR. La barra representa 10 micras.



(Röser 1994). En particular esto fue lo hallado por este autor en *Jubaea chilensis*, especie muy cercana a *Butia* y *Syagrus*. *Butia* y *Jubaea* son géneros hermanos cuyo origen probablemente esté relacionado con el surgimiento de la Cordillera de los Andes (Marcato 2004, Meerow 2009). Además según Guerra (2000), los sitios de NOR-heterocromatina (NOR-HC, heterocromatina asociada a las regiones organizadoras nucleolares) tienden a distribuirse cerca de los telómeros, a ambos lados de la constricción secundaria. Estos sitios no habían sido identificados anteriormente al realizar los cariogramas clásicos (Gaiero 2005) y tampoco se logró identificar constricciones secundarias en los cariogramas clásicos realizados en este trabajo para *Butia paraguayensis* y *B. lallemantii*. Las constricciones secundarias son generalmente difíciles de visualizar cuando se encuentran cercanas a los telómeros o en cromosomas pequeños (Guerra *et al.* 1997) como en este caso.

En el caso de *T. campestris*, a pesar de las múltiples repeticiones de la técnica los resultados no fueron concluyentes. Cuando se analizaron metafases y prometafases, se observaron teñidos con nitrato de plata sólo las regiones teloméricas de un par de cromosomas, el par 18 (Fig. 7). Sin embargo, en los núcleos interfásicos se observaron teñidos, tres y hasta cuatro nucleolos, lo que permite suponer que habría al menos cuatro regiones NOR. Para la tribu Thrinaceae lo común es hallar uno o dos pares de NOR activos, raramente tres (Röser 1994), lo cual coincide con lo encontrado en este trabajo en las interfases.

2.3.2.2 Patrones heterocromáticos detectados por Bando C.

Para detectar regiones heterocromáticas en los cromosomas de las especies en estudio se aplicó la técnica de Bando C en metafases, prometafases y núcleos interfásicos de las seis especies, las cuales se muestran en las figuras 8 y 9. En el género *Butia* (Fig. 8) y en *Syagrus romanzoffiana* (Fig. 9a) se halló un par de bandas C en la región terminal del

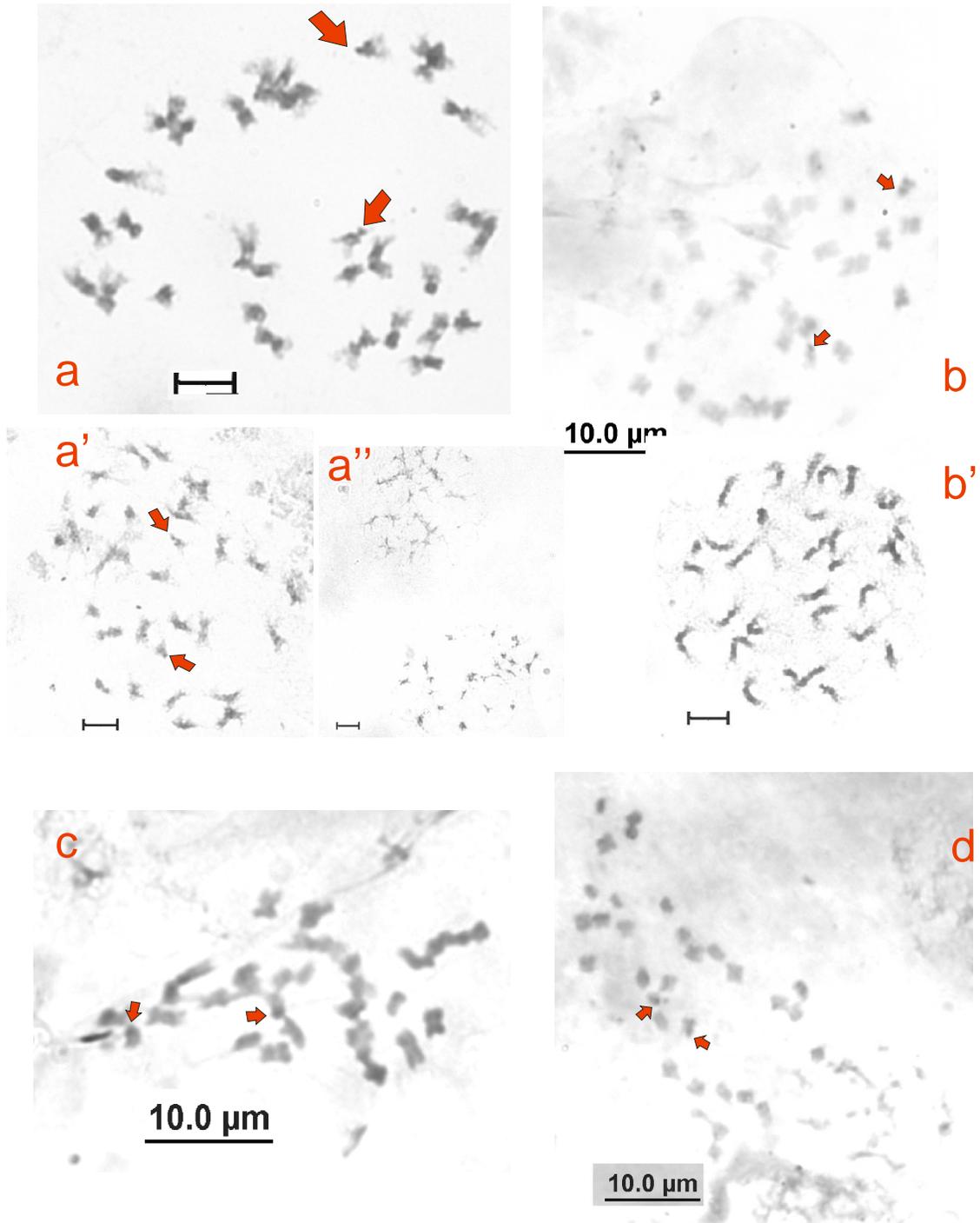


Figura 8. Bando C en metafases y prometafases de (a) *Butia capitata*, (b) *B. yatay*, (c) *B. paraguayensis* y (d) *B. lallemantii*. Las flechas rojas indican las bandas C. Se observan además patrones de condensación en (a') *Butia capitata* y (b') *B. yatay* y núcleos interfásicos de (a'') *B. capitata*. La barra representa 10 micras.

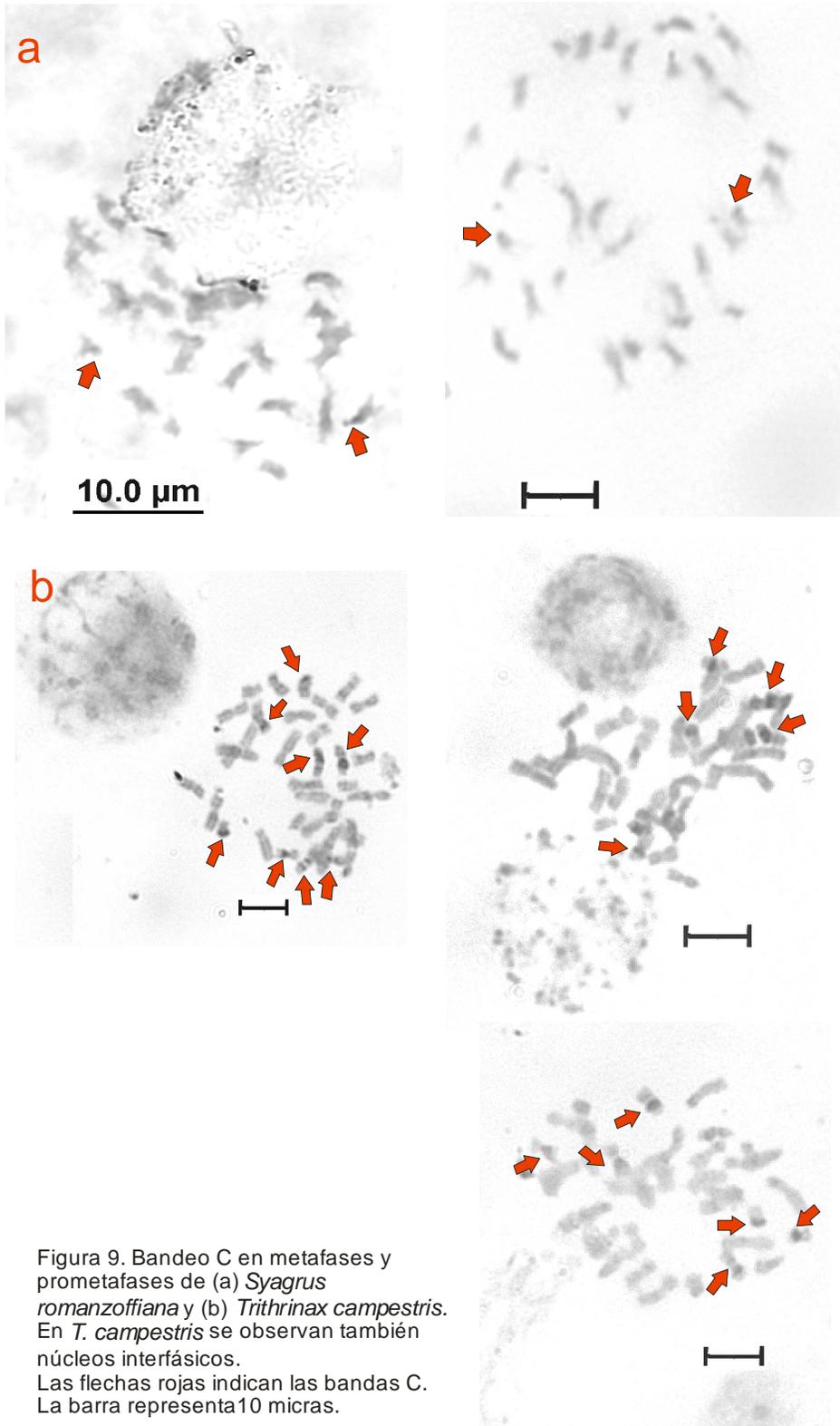


Figura 9. Bando C en metafases y prometafases de (a) *Syagrus romanzoffiana* y (b) *Trithrinax campestris*. En *T. campestris* se observan también núcleos interfásicos. Las flechas rojas indican las bandas C. La barra representa 10 micras.

brazo corto del par 14, coincidente con las NOR activas, por lo que se trata de NOR-heterocromatina (Guerra 2000). Para *T. campestris* (Fig. 9b) los pares de bandas hallados fueron cuatro, uno de ellos de posición telomérica en el par 18, coincidente con las NOR detectadas y otros tres en posición pericentromérica en los pares 7, 9 y 13. En otra especie del género, *Trithrinax brasiliensis*, Röser (1994) encontró sólo tres pares de bandas C coincidentes con bandas CMA+, por lo que el presente sería el registro del número más alto para la subfamilia y de los más altos de la familia, junto con los cinco pares observados en la especie diploide *Pseudophoenix vinifera* ($2n = 34$; subfamilia Ceroxyloideae subtribu Cyclospatheae). Röser (1994) afirma que en la subfamilia Coryphoideae tribu Thrinaceae no se encuentran bloques heterocromáticos a nivel telomérico, por lo que lo observado en este trabajo es la primera determinación para uno de los pares de bandas C. Por otra parte, se logra distinguir otro patrón de bandeo de menor intensidad que parece coincidir con el observado al teñir con DAPI. En los núcleos interfásicos se encontraron grandes diferencias en la estructura de la cromatina en *T. campestris* (Fig. 9b) con respecto a las especies de *Butia* (Fig. 8) y la de *Syagrus* (datos no presentados). Los núcleos de estas últimas son arreticulados mientras que los de *T. campestris* son reticulados según el criterio de Guerra (1987). Posiblemente esta diferencia esté relacionada con el mayor número y tamaño cromosómico, así como con el mayor contenido de ADN (Guerra 1987, Röser 1994) de *Trithrinax*.

2.3.2.3 Patrones heterocromáticos detectados por tinción secuencial con CMA/DAPI

Paralelamente se buscó detectar las regiones heterocromáticas en los cariotipos de las seis especies en estudio en base a su tinción diferencial con los fluorocromos cromomicina A3 (CMA) y 4, 6 diamidino fenilindol (DAPI). Una selección de las mejores metafases teñidas con ambos fluorocromos en todas

las especies, se muestran en las figuras 10 a 14. Se llegó a un excelente nivel de fotografías, comparándolo con trabajos publicados en palmas y en plantas en general. Probablemente esto se deba a la optimización en el momento de colecta de las raíces, a su selección y a los procedimientos llevados a cabo para la remoción del citoplasma, tal como se detalla en la sección “Digestión del material y realización de los preparados”. En todas las especies del género *Butia* estudiadas (Fig. 10 a 12) y en *Syagrus romanzoffiana* (Fig. 13) se obtuvieron los mismos resultados, por tanto estas especies son altamente similares en cuanto a las características evaluadas a través de estas técnicas: se encontró un único par que presenta una banda CMA+/DAPI-, coincidente con las NOR y las bandas C, lo que es habitual para la NOR-heterocromatina (Guerra 2000). La señal es más intensa y de mayor tamaño en uno de los cromosomas del par en *Syagrus romanzoffiana*. Este heteromorfismo también se ha observado en algunas metafases de *Butia yatay*, no registrándose en el resto de las especies del género. Existen varios ejemplos en plantas y animales de heteromorfismo en las bandas CMA+, en general en las que corresponden a la NOR- heterocromatina y por tanto coinciden con sitios 45S (Guerra 2000, Besendorfer *et al.* 2002, Caperta *et al.* 2002, Hajdera *et al.* 2003, Cabral *et al.* 2006, de Carvalho y Dias 2007) aunque en el caso de especies del género *Quercus* este heteromorfismo se da en bandas CMA+ coincidentes tanto con los sitios 45S como con los 5S (Zoldos *et al.* 1999). Sin embargo, no hay registros de heteromorfismo en la Fam. Arecaceae. A esto se agrega el hecho que en *Syagrus romanzoffiana* el tamaño y la intensidad de ambas señales es comparativamente mayor a las correspondientes en las especies de *Butia*. En algunas metafases se observó constricción secundaria y satélite, presentándose muchas veces la constricción distendida, señalando actividad en el ciclo anterior.

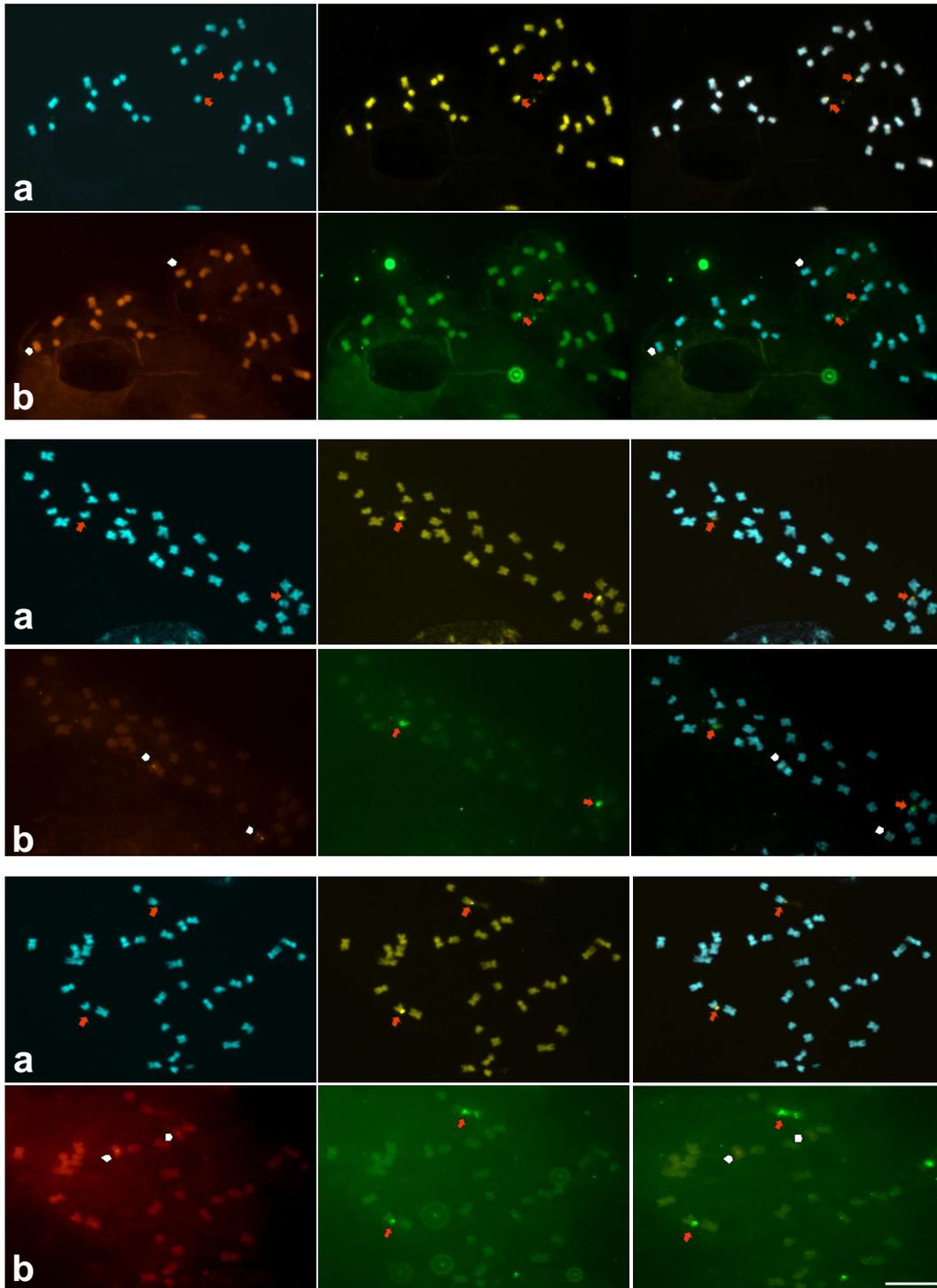


Figura 10. (a) Tinción con fluorocromos CMA (amarillo)/DAPI (azul) y (b) Hibridación *in situ* fluorescente FISH con sondas de ADNr 5S (rojo) y 45S (verde) en tres metafases de *Butia capitata*. La tercer imagen en cada fila es la superposición de las dos anteriores, en el FISH los cromosomas fueron contrateñidos con DAPI. Las flechas rojas marcan las bandas CMA+/DAPI- y la señal de ADNr 45S. Las puntas de flecha blancas indican la señal de ADNr 5S. La barra representa 10 micras.

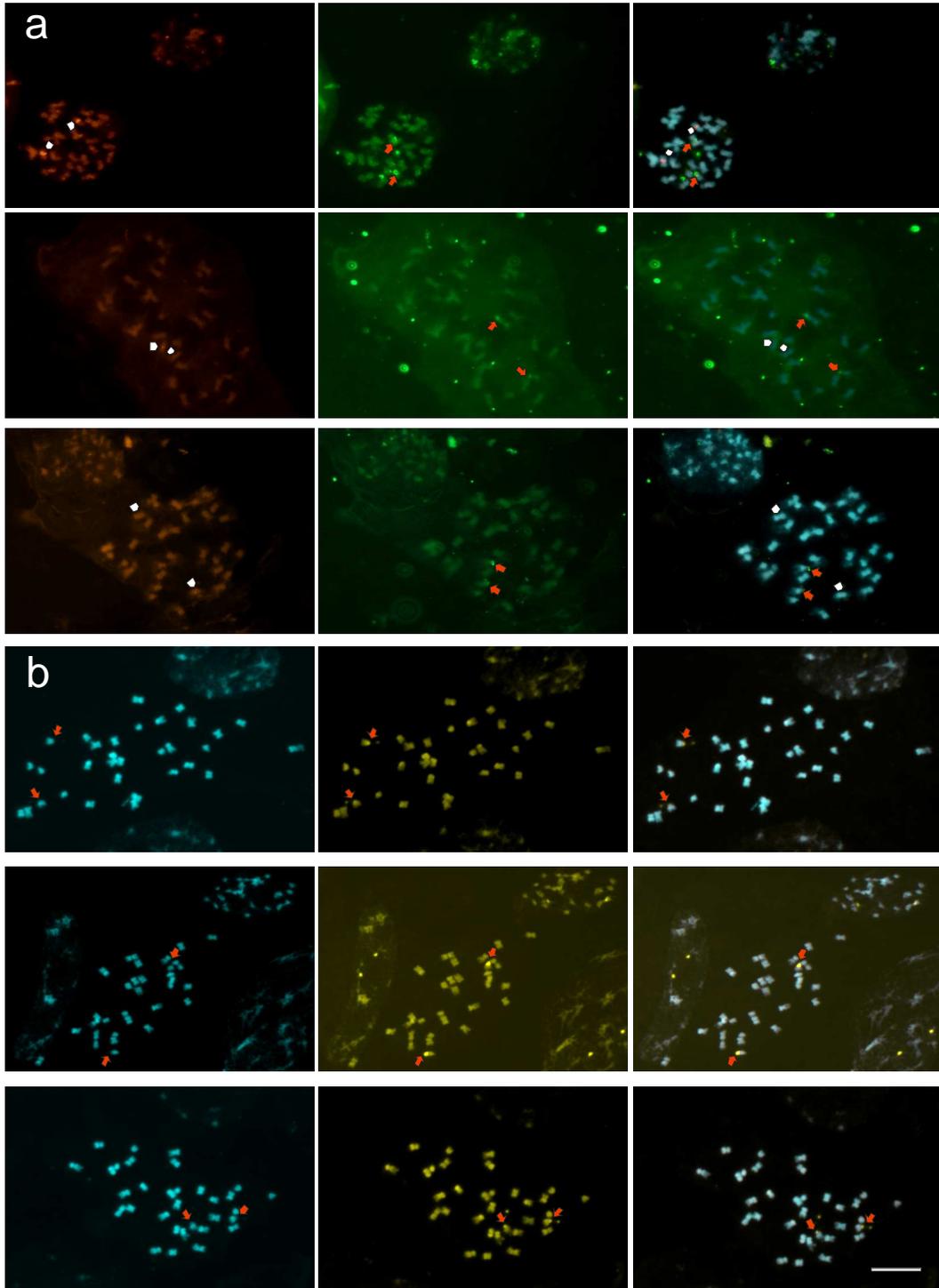


Figura 11. (a) Hibridación *in situ* fluorescente FISH con sondas de ADNr 5S (rojo) y 45S (verde) y (b) tinción con fluorocromos CMA (amarillo)/DAPI (azul) en seis metafases de *Butia yatay*. La tercer imagen en cada fila es la superposición de las dos anteriores, en el FISH los cromosomas fueron contrateñidos con DAPI. Las flechas rojas marcan las bandas CMA+/DAPI- y la señal de ADNr 45S. Las puntas de flecha blancas indican la señal de ADNr 5S. La barra representa 10 micras.

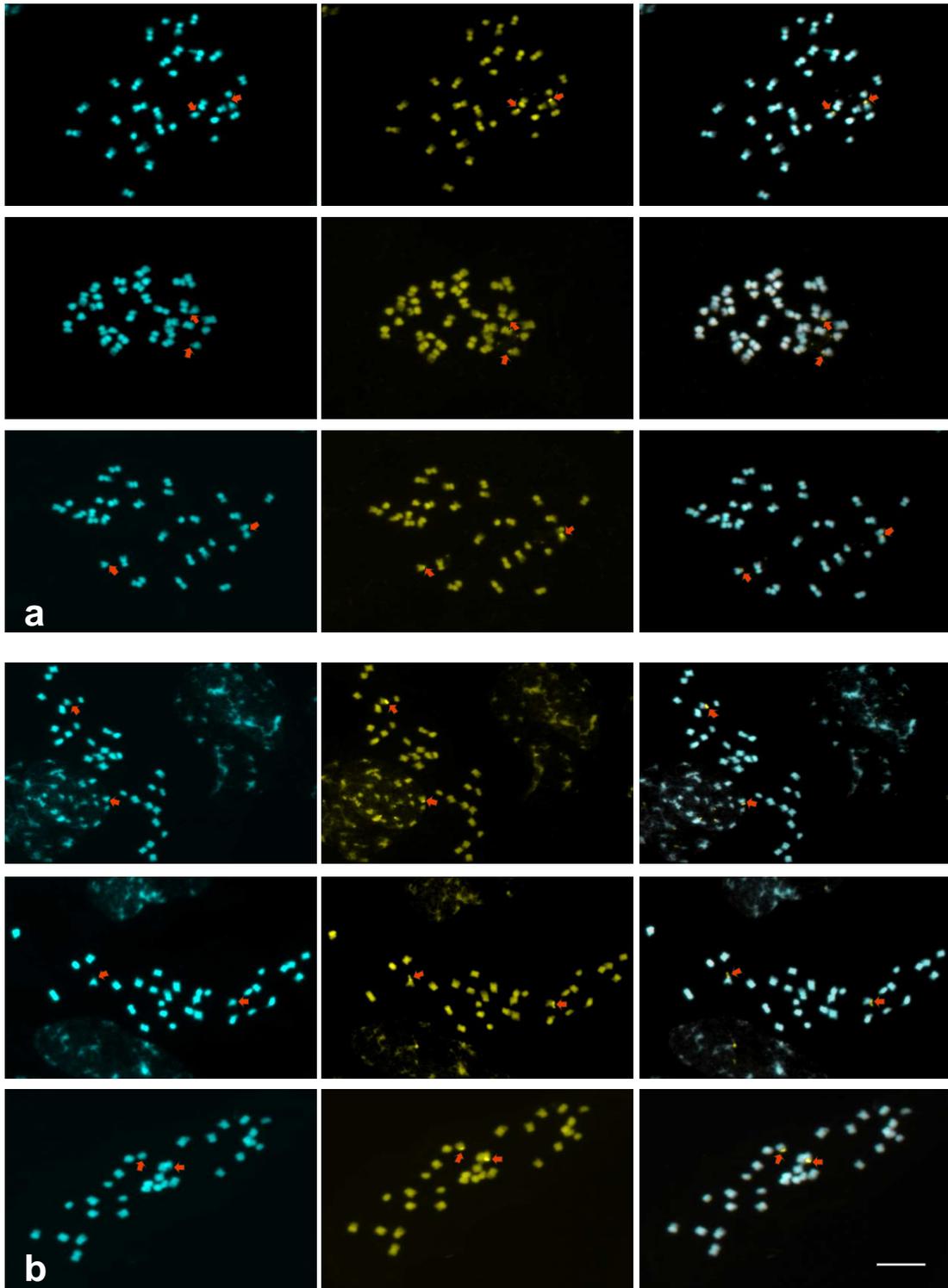


Figura 12. Tinción con fluorocromos CMA (amarillo)/DAPI (azul) en tres metafases de (a) *Butia paraguayensis* y (b) *Butia lallemantii*. La tercer imagen en cada fila es la superposición de las dos anteriores. Las flechas rojas marcan las bandas CMA+/DAPI-. La barra representa 10 micras.

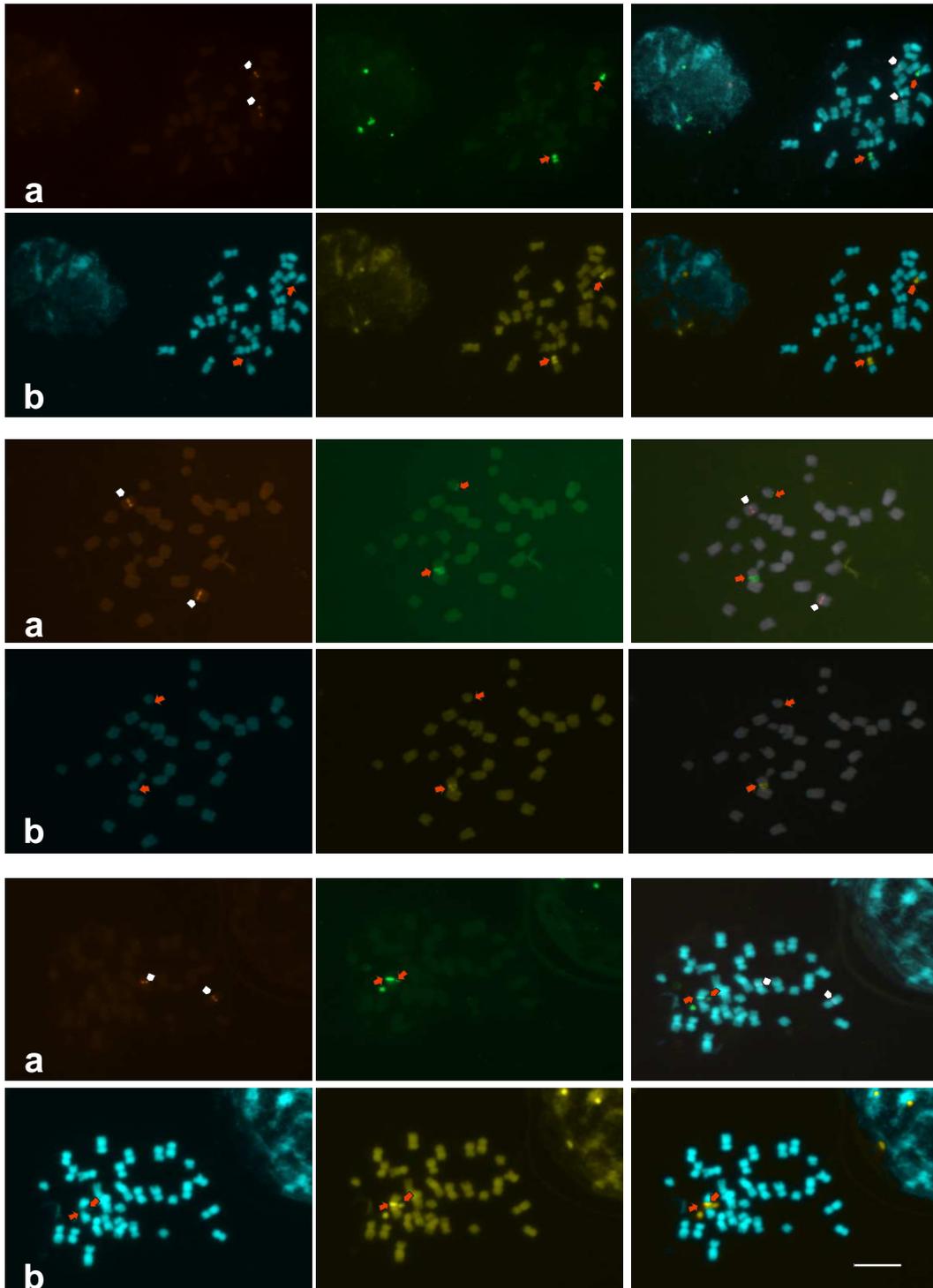


Figura 13. (a) Hibridación *in situ* fluorescente FISH con sondas de ADNr 5S (rojo) y 45S (verde) y (b) Tinción con fluorocromos CMA (amarillo)/DAPI (azul) en tres metafases de *Syagrus romanzoffiana*. La tercer imagen en cada fila es la superposición de las dos anteriores, en el FISH los cromosomas fueron contrateñidos con DAPI. Las flechas rojas marcan las bandas CMA+/DAPI- y la señal de ADNr 45S. Las puntas de flecha blancas indican la señal de ADNr 5S. La barra representa 10 micras.

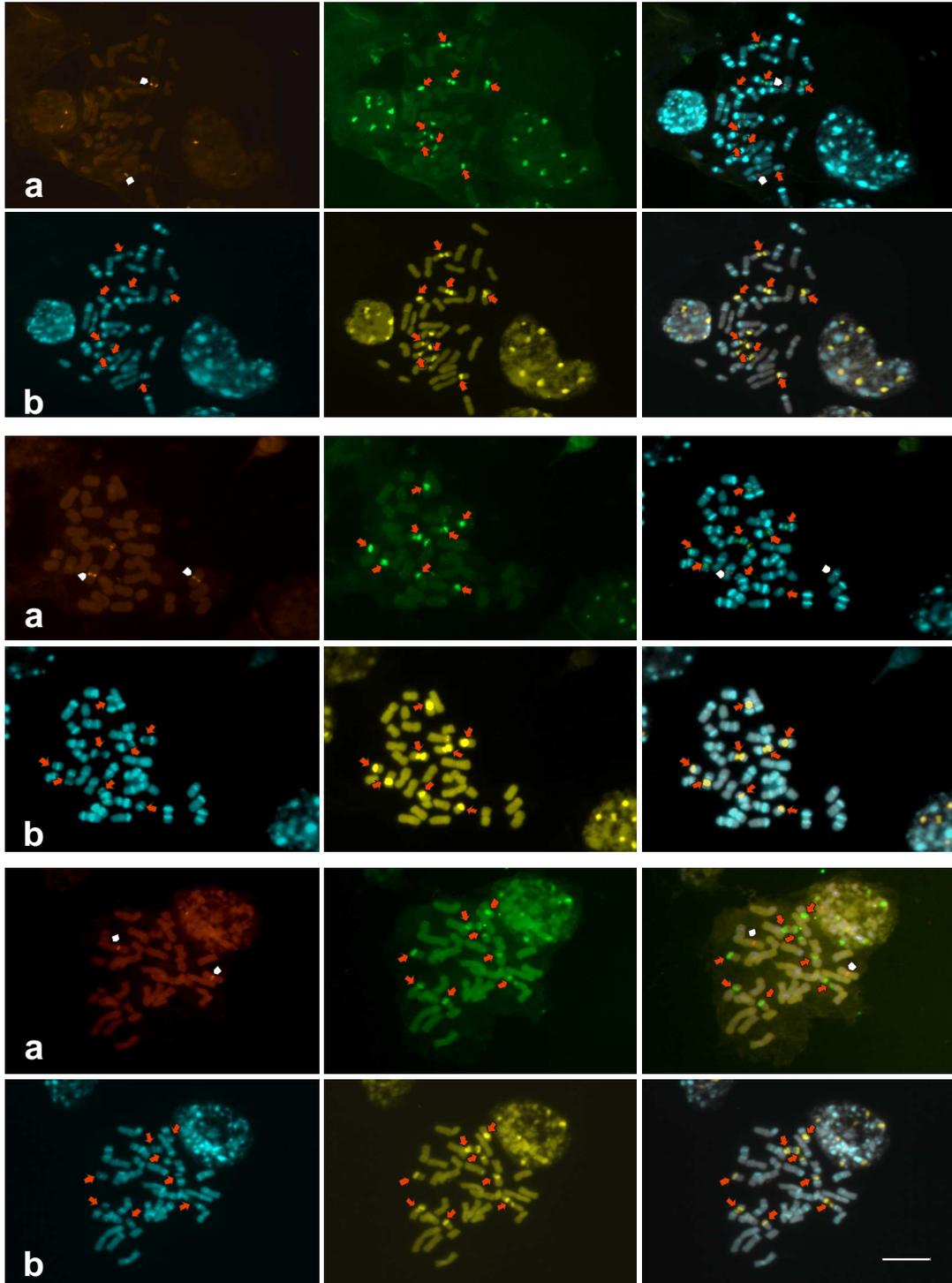


Figura 14. (a) Hibridación *in situ* fluorescente FISH con sondas de ADNr 5S (rojo) y 45S (verde) y (b) Tinción con fluorocromos CMA (amarillo)/DAPI (azul) en tres metafases de *Trithrinax campestris*. La tercer imagen en cada fila es la superposición de las dos anteriores, en el FISH los cromosomas fueron contrateñidos con DAPI. Las flechas rojas marcan las bandas CMA+/DAPI- y las señales de ADNr 45S. Las puntas de flecha blancas indican la señal de ADNr 5S. La barra representa 10 micras.

Las especies de *Butia* y *Syagrus* analizadas no presentan bandeo positivo con DAPI. En las palmas aceiteras africana y americana *Elaeis guineensis* y *Elaeis oleifera* ($2n = 32$, Madon *et al.* 1995, 1998), especies de gran importancia económica y cercanas a *Butia* y *Syagrus* (subfamilia Arecoideae, tribu Cocoseae), Castilho *et al.* (2000) y Madon *et al.* (1996, 2001) tampoco encontraron bandas positivas al teñir sus cromosomas con DAPI. Se ha encontrado una gran uniformidad en cuanto al número y la distribución de bloques heterocromáticos entre las especies de *Butia* –o sea a nivel genérico- y entre estas con respecto a *Syagrus*, que integra la misma subtribu. Esto confirma la cercanía entre las especies de *Butia* y de estas con *Syagrus romanzoffiana*. Las observaciones estarían de acuerdo con Guerra (2000) quien afirma que a pesar de ser los patrones de distribución de la heterocromatina sumamente variables a nivel de plantas superiores, los cambios drásticos y discontinuos dentro de grupos cercanos de especies no son frecuentes.

En cambio en *Trithrinax campestris* (Fig. 14) se observan cuatro pares de cromosomas que presentan bandas CMA+/DAPI-, que coinciden con las bandas C, por lo que se trata de NOR-HC (Guerra 2000). Tres pares de bandas presentan localización pericentromérica en los pares cromosómicos 7, 9 y 13 y uno tiene ubicación telomérica en el par 18. En algunos casos las bandas pericentroméricas se observan distendidas, lo que estaría indicando actividad en el ciclo anterior. Sin embargo no aparecieron teñidas con nitrato de plata. Esta ausencia de impregnación con plata puede deberse entonces a una falla en esta técnica y no a que dichos sitios no estén en actividad, sobre todo teniendo en cuenta el número de nucleolos observados. Por otra parte se registró un muy marcado bandeo DAPI+ sobre los cromosomas. En *Trithrinax brasiliensis*, Röser (1994) encontró bandas de heterocromatina DAPI+ proximales, pero afirma que a nivel de la tribu Thrinaceae los cariotipos están formados normalmente por cromosomas con patrones de bandeo simples, con

reducido número de bandas, contrario a lo hallado aquí para *T. campestris*. Estas bandas DAPI+ intersticiales son características de las Thrinaceae del Nuevo Mundo (Röser 1994, 1995) y además esta localización es más frecuente en especies con cromosomas medianos y largos (Guerra 2000), como es el caso de *T. campestris*. Los patrones de los dos fluorocromos combinados permiten la identificación de cada uno de los 18 pares cromosómicos de esta especie (Fig. 15). Röser (1995) sugiere que la subtribu Thrinaceae debe ser sujeto de estudios más profundos, dado que es en la única dentro de las palmas en la que se encuentran bandas proximales de dos tipos citoquímicos diferentes (afines a CMA o a DAPI). Además en algunos cromosomas de esta especie se encuentran bandas DAPI+ muy cercanas a las bandas CMA+. Esto también se observó en otras especies vegetales como *Gibasis karwinskyana* (Commelinaceae) (Kenton 1991) y *Dasypyrum villosum* (Poaceae) (Cremonini *et al.* 1994).

2.3.3 Detección de sitios de ADNr por Hibridación *in situ* fluorescente, FISH.

Con el objetivo de caracterizar la localización de los sitios de ADN ribosomal 45S y 5S en las seis especies de palmas nativas, las mismas células estudiadas con la doble tinción CMA/DAPI fueron analizadas mediante hibridación *in situ* fluorescente utilizando sondas de ADNr 5S y 45S sobre los cromosomas. Esta técnica fue aplicada a todas las especies en estudio, pero los resultados en algunas de ellas no fueron adecuados para un análisis concluyente. Son muy escasos los trabajos en los que se ha aplicado esta técnica en la familia Arecaceae (Castilho *et al.* 2000, Madon *et al.* 1996, 2001), y se han restringido exclusivamente a especies de gran importancia económica (*Elaeis guineensis* y *E. oleifera*).

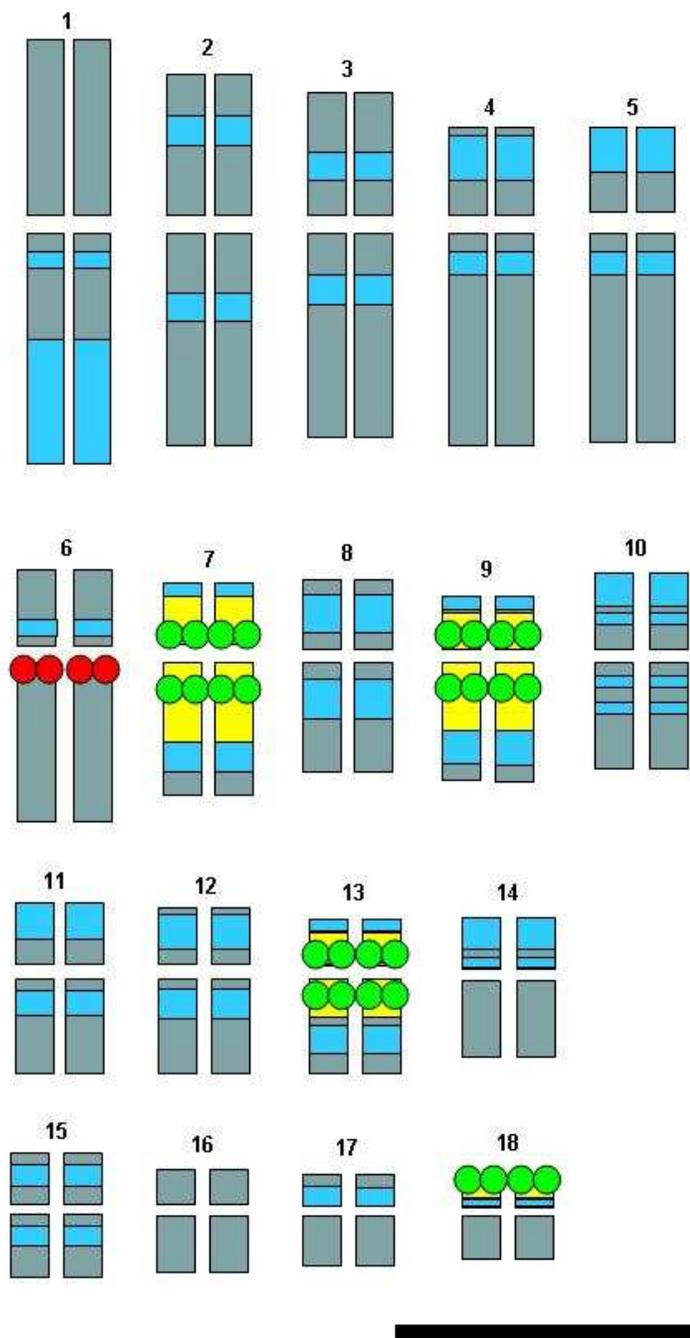


Figura 15. Idiograma de *Trithrinax campestris*. Las bandas amarillas corresponden a bandas CMA+ y las celestes bandas DAPI+. Los puntos verdes representan señales de ADNr 5S y los rojos de ADNr 45S. La barra representa 10 micras.

El presente estudio es el primero en el que se utiliza esta técnica en palmas nativas. Para las cuatro especies de *Butia* y en las especie de *Syagrus* y de *Trithrinax*, se muestran los resultados de la técnica de FISH en las imágenes de las figuras 10, 11, 13 y 14, junto con las correspondientes fotografías para CMA/DAPI. En *Butia capitata* (Fig. 10), *B. yatay* (Fig. 11) y en *S. romanzoffiana* (Fig. 13) las señales 45S (verde) se encontraron en la región telomérica del brazo corto del par cromosómico 14, coincidiendo con las NOR activas, las bandas C y las bandas CMA+/DAPI-. Se conoce que los sitios para el ADNr 45S son regiones heterocromáticas con mayor riqueza en nucleótidos G-C (Miller 1981) por lo que era de esperar esta coincidencia. En las especies del género *Butia* y *Syagrus* aquí estudiadas, se trata de los únicos bloques de heterocromatina ricos en G-C encontrados. Esto sucede en otros géneros de plantas como en especies de *Paspalum* (Vaio *et al.* 2005), *Lupinus* (Hajdera *et al.* 2003), *Cucumis* (Hoshi *et al.* 1999), *Solanum* (Srebniak *et al.* 2002) y *Brassica* (Hasterok y Maluszynska 2000).

Esta localización distal del ADNr 45S no sólo es la más frecuente en palmas (Röser 1994) sino que además es típica en las plantas superiores y en otros organismos estudiados (Lima-de-Faria 1976, Leitch 2000). En el 86.6% de los casos revisados por Lima-de-Faria (1976), los cistrones ribosomales se ubicaban en los brazos cortos, y generalmente tendiendo a localizarse próximos a los extremos, sin llegar a los telómeros. En particular en Arecaceae existen antecedentes de un único sitio de ADNr 45S en *Elaeis guineensis* y *Elaeis oleifera* (Castilho *et al.*, 2000, Madon *et al.* 1996, 2001), en la misma ubicación encontrada aquí, o sea en la región subtelomérica de un par acrocéntrico menor (en los casos citados en el par 16). En *Syagrus romanzoffiana* las señales son de mayor intensidad, al igual que fue observado para las bandas CMA/DAPI, por lo que podría tratarse de un caso en el que hay mayor número de copias de ADNr, ya que la intensidad de la señal es directamente proporcional al número

de copias de ADNr presentes en el sitio, por lo tanto, a mayor intensidad mayor número de copias (Jiang y Gill 1994). También podría deberse a una mejor exposición o mayor hibridación. En las especies de *Butia* (Fig. 10 y 11) y en *S. romanzoffiana* (Fig. 13) la señal 5S (roja) se encuentra en la región pericentromérica de los cromosomas del par 8. Para las especies *B. paraguayensis* y *B. lallemantii* no se obtuvo señal consistente para las dos sondas sobre los cromosomas, a pesar que se aplicó la técnica sobre dos preparados diferentes de cada especie y que además ambos preparados fueron rehibridados. En *B. yatay* no fue posible conseguir hibridación *in situ* en las mismas células que habían sido teñidas con CMA/DAPI, por tanto se muestran imágenes de metafases diferentes.

Trithrinax campestris (Fig. 14) presentó un patrón de hibridación para la sonda de ADNr 45S diferente al observado en las otras especies de palmas nativas. Se detectaron cuatro señales del ADNr 45S (verde), tres de ellas localizadas en las regiones pericentroméricas de los pares 7, 9 y 13 y una en la región telomérica del par 18, todas coincidiendo con las bandas CMA+/DAPI-. Sin embargo, lo encontrado en la mayoría de las palmas (Röser 1994) y en los organismos eucariotas (Lima-de-Faria 1976, Leitch 2000) es que las NOR se ubican en los brazos cortos, cerca de los extremos (como en uno de los cuatro sitios), según este último autor debido a mecanismos de evolución cromosómica que residen en las propiedades físicas y estéricas de sus moléculas constituyentes. Por tanto, los genes de ADNr tendrían una localización efectiva, en la cual estarían interactuando en equilibrio con las demás partes del cromosoma. Es posible que debido a esto sólo la NOR que se encuentra cerca del extremo del brazo corto del par 18 presente actividad, aunque debido a la dificultad de la técnica de tinción argéntica en esta especie, no es posible sacar conclusiones al respecto. En general se asocia el número de nucleolos encontrados en una especie con su nivel de ploidía (Vilhar *et al.* 2002, Wagih *et al.*

2007). Sin embargo, en este caso no es de esperar que se trate de una especie poliploide, ya que su complemento cromosómico ($2n = 36$) coincide con el número básico ancestral propuesto para la Familia Arecaceae ($x = 18$; Röser 1994). Dado que el mecanismo propuesto por este autor para el cambio cromosómico dentro de la Familia es la disploidía, se podría suponer que las especies más basales de Arecaceae poseían un mayor número de cromosomas con NOR (como es el caso de *T. campestris* y otras especies dentro de la subfamilia Coryphoideae) y que estos cromosomas con NOR se fueron perdiendo en la serie disploide descendiente, hasta llegar a un único par de NOR, como es común en subfamilias que divergieron posteriormente como Arecoideae, a la cual pertenecen *Butia* y *Syagrus*. También es posible que debido a un proceso de fusión nucleolar, el número de nucleolos por núcleo varíe desde uno a cuatro. Cada NOR puede formar su propio nucleolo, o diferentes NORs pueden asociarse para formar un nucleolo en común (Ghosh 1976). En *T. campestris* la señal 5S (roja) se encuentra en la región pericentromérica de los cromosomas del par 6 (Fig. 14).

La constancia del número y localización del sitio para el ADNr 5S en todas las palmas incluidas en este estudio es de esperar teniendo en cuenta que se trata de una región altamente conservada, especialmente en taxa que presentan características cariotípicas muy constantes (Adams *et al.* 2000), como es el caso de las especies de *Butia* y *Syagrus* estudiadas. Es común en plantas diploides (como las especies estudiadas en este trabajo) encontrar un único sitio 5S ya sea en monocotiledóneas o en dicotiledóneas (Ansari *et al.* 1999; De Melo y Guerra 2003; Seijo *et al.* 2004; Vaio *et al.* 2005; Moraes *et al.*, 2007). En la Familia Arecaceae, en *Elaeis guineensis* y *E. oleifera*, género de la misma tribu Cocoseae que *Butia* y *Syagrus*, también se encontró un único sitio 5S, aunque de localización distal en el cromosoma más largo (Castilho *et al.* 2000, Madon *et al.* 1996, 2001). Es interesante destacar que entre estos tres géneros tan cercanos (*Elaeis*, *Butia* y *Syagrus*) existe conservación en cuanto a

la posición del sitio de ADNr 45S pero no en la localización del sitio 5S, contrario a lo generalmente observado en plantas superiores (Adams *et al.* 2000). Cuando se amplíe la investigación a más especies de la misma tribu, se podrá concluir si efectivamente la localización aquí detectada del cistrón ribosomal 45S se trata de un plesiomorfismo (carácter de origen ancestral) para la tribu. Es importante subrayar la uniformidad encontrada a nivel de la organización genómica estructural en el género *Butia*, la cual es coherente con la condición monofilética del género hallada por Marcato (2004).

En cambio el número y localización de los sitios para el ADNr 45S en *T. campestris* son claramente diferentes de lo encontrado en las especies de *Butia* y en *Syagrus romanzoffiana*. La tribu a la que pertenece *T. campestris* presenta características cariológicas consideradas ancestrales (Röser 1994). En ese sentido, si lo observado en *Butia* y *Syagrus* fueran caracteres derivados, podría deberse a una pérdida de cromosomas con sitios 45S dentro de la serie disploide planteada para explicar la evolución cariotípica de la Familia (Röser 1994). Este autor plantea la hipótesis de la carioevolución por disploidía, la reducción en los tamaños cromosómicos y la pérdida de heterocromatina, evidenciada por la simplificación en los patrones de bandeo en especies de la subfamilia Ceroxyloideae, que presenta caracteres derivados y es muy cercana a Arecoideae, la subfamilia a la que pertenecen *Butia* y *Syagrus*. Röser (1994) afirma que una gran proporción de las especies de la tribu Thrinaceae poseen altos porcentajes de heterocromatina, siendo en las especies del Nuevo Mundo más frecuentemente DAPI+, lo cual coincide con el complejo bandeo DAPI+ encontrado en *T. campestris*. Por otra parte, pueden haber ocurrido rearrreglos cromosómicos frecuentemente asociados a cambios en la posición de los sitios 45S (Hall y Parker 1995), aunque es poco probable dado que no se observa la presencia de los sitios de ADNr 45S pericentroméricos de *T. campestris* en

ninguna otra posición en los cariotipos de las especies de *Butia* o de *S. romanzoffiana*.

2.3.4 Contenido de ADN

Con el objetivo de aclarar la resolución de las relaciones taxonómicas entre las especies de palmas nativas se analizó su variabilidad en contenido de ADN nuclear mediante citometría de flujo. Se logró determinar el contenido de ADN de todos los materiales incluidos en este trabajo, poniendo a punto la técnica para las especies de palmas nativas, lo cual presentó una gran dificultad, debido a la dureza de las hojas (por su alto contenido de fibras y silicofitolitos) y a la presencia de compuestos químicos que interfieren con las mediciones.

En la Figura 16 se presentan histogramas representativos de los contenidos relativos de ADN de las seis especies de palmas nativas analizadas, mientras que en el cuadro 4 se muestra el contenido de ADN nuclear 2C calculado en picogramos. En este cuadro también se presenta cada contenido promedio de ADN 2C convertido a mega pares de bases (Mpb) y se detallan los promedios de los coeficientes de variación (CV) obtenidos para las muestras de cada especie y de los estándares internos, junto con sus correspondientes rangos.

En términos generales los coeficientes de variación fueron de 2,5 a 6,71 con una media de 4,25 y para los estándares internos de 1,75 a 5,71 con una media de 3,49, aceptables para permitir buena resolución según Doležel *et al.* (1998). El promedio de los contenidos de ADN totales (2C) para el conjunto de los materiales del género *Butia* analizados fue de 4.12 ± 0.22 pg y para *Syagrus romanzoffiana* de 4.44 ± 0.07 pg.

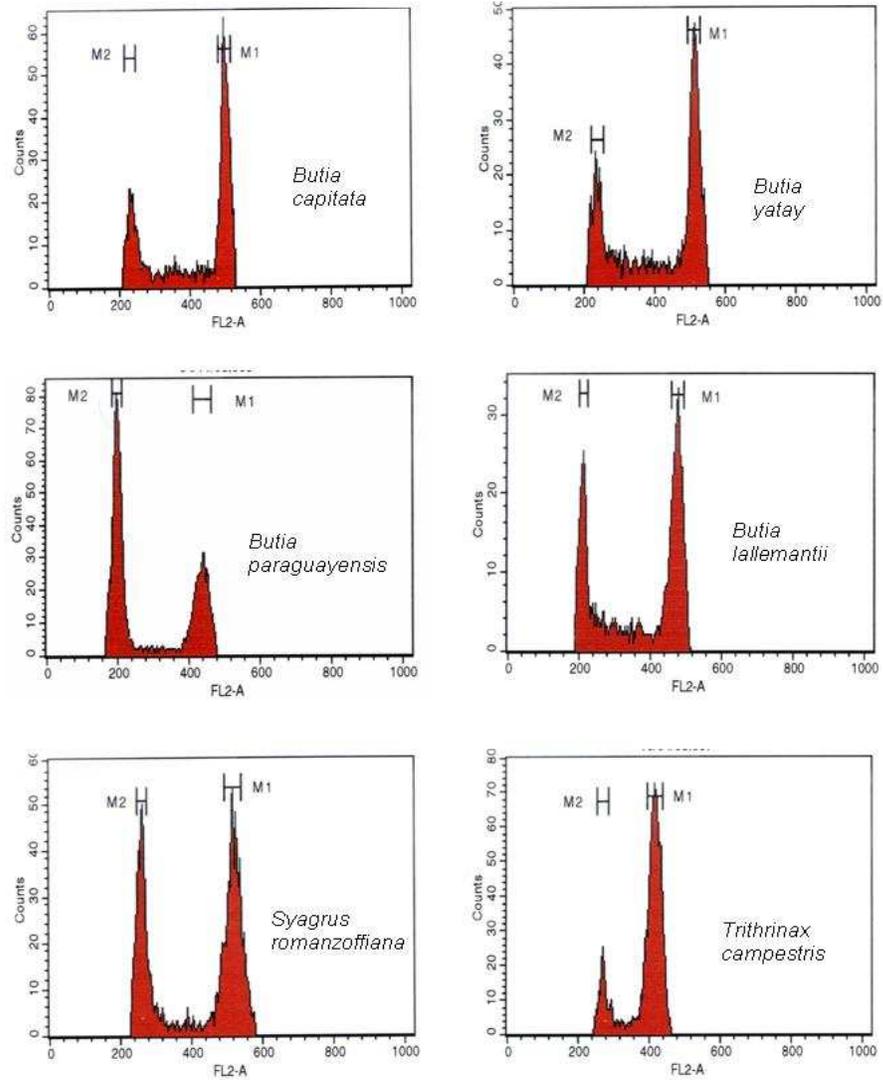


Figura 16. Histogramas representativos de los contenidos de ADN de las seis especies de palmas nativas (M2) con respecto al estándar interno (M1), *Pisum sativum* para las especies de *Butia* y *Syagrus* y *Vicia faba* para *Trithrinax*.

Cuadro 4. Contenido de ADN 2C promedio (pg y Mpb) y su correspondiente error estándar para todas las especies de palmas. Resultados del test de Bonferroni para comparación de las medias entre las especies y coeficientes de variación (CV) promedio y rango.

Especie	Contenido de ADN 2C promedio ± error estándar.		Test de Bonferroni	CV promedio	CV rango
	pg	Mpb			
<i>Butia capitata</i>	4.18 ± 0.07	4089 ± 67	a	3.83	3.17 – 5.41
<i>Butia yatay</i>	4.13 ± 0.07	4039 ± 66	a	4.59	2.95 – 6.71
<i>Butia paraguayensis</i>	4.11 ± 0.07	4021 ± 66	a	4.04	2.99 – 4.78
<i>Butia lallemantii</i>	4.07 ± 0.05	3983 ± 51	a	4.27	2.74 – 6.52
<i>Syagrus romanzoffiana</i>	4.44 ± 0.06	4344 ± 64	b	4.37	2.50-5.73
<i>Trithrinax campestris</i>	17.15 ± 0.07	16776 ± 66	c	4.39	2.90-5.11

Estos valores se encuentran dentro del amplio rango encontrado para la subfamilia Arecoideae por Röser *et al.* (1997), que va de 4C = 55.62 pg (2C estimado = 27.81 pg) para *Pinanga subintegra* a 4C = 7.21 pg (2C estimado = 3.6 pg) para *Beccariophoenix madagascariensis*. En el trabajo de Röser *et al.* (1997) se evaluaron ejemplares de *Syagrus romanzoffiana*, obteniendo un valor 4C = 12.2 ± 0.23 pg (2C estimado = 6.1 ± 0.11 pg), claramente superior al hallado en el presente trabajo. Esto puede deberse a la menor precisión de la técnica de microdensitometría con tinción Feulgen empleada (Michaelson *et al.* 1991, Doležel *et al.* 1998), entre otras razones debido a que por el tiempo que insume cada evaluación, sólo consiguieron evaluar 20 núcleos para dicha especie, mientras que aquí se evaluaron entre 5000 y 10000 núcleos. Los valores hallados por Röser *et al.* (1997) para la subtribu Butiinae (ahora Attaleinae) -excluyendo a la especie poliploide *Voanioala gerardii*- van de 4C = 14.19 pg (2C estimado = 7.1 pg) en *Cocos nucifera*, la palma cocotera, hasta 4C= 10.2 pg (2C estimado = 5.1 pg) en *Jubaea chilensis*, esta última cercana a *Butia* y *Syagrus*. Los valores aquí encontrados amplían por lo tanto el rango conocido para dicho taxón. No obstante, para la palma aceitera *Elaeis guineensis*, especie perteneciente a la misma tribu que *Butia* y *Syagrus*, las

estimaciones de contenido de ADN nuclear 2C por citometría de flujo fueron valores cercanos a los hallados en el presente estudio, con un promedio de 2C = 3.76 ± 0.09 pg (Rival *et al.* 1997).

Los análisis de la distribución de la variable “contenido de ADN” no presentaron una desviación significativa de la normalidad (datos no mostrados) por lo que se procedió con los análisis de varianza y comparación de medias basados en la normalidad de la distribución. El análisis de varianza de los datos promedio de contenido de ADN nuclear (2C), analizando las seis especies (cuadro 5), puso en evidencia la existencia de diferencias significativas entre algunas de ellas. En el cuadro 5 también se presentan los resultados de la comparación de las medias del contenido de ADN nuclear utilizando el test de Bonferroni. Estos análisis estadísticos arrojan tres grupos, uno que agrupa a todas las especies de *Butia*, otro que contiene a *S. romanzoffiana* y un tercer grupo que incluye únicamente a *T. campestris*. Esta última separación era de esperar, por tratarse de una especie perteneciente a una subfamilia muy alejada, y con grandes diferencias a nivel cariotípico. En cambio es de destacar la diferencia entre las especies de *Butia* y *Syagrus*, dada la cercanía entre los géneros y las similitudes encontradas entre sus cariotipos. Esta diferencia podría verse reflejada citogenéticamente en la diferencia encontrada en el tamaño de la señal del ADNr 45S, la cual era notoriamente mayor en *Syagrus romanzoffiana* que en las especies del género *Butia*. El único grupo formado por las especies del género *Butia* era de esperar dado que según Röser *et al.* (1997) en general en palmas los valores de contenido de ADN nuclear son uniformes dentro de un mismo género. Además el género *Butia* es un grupo monofilético con gran apoyo estadístico (Marcato 2004).

Todos estos resultados se ven apoyados por los análisis de mínimos cuadrados y contrastes ortogonales presentados en el cuadro 6. Las diferencias

en contenido de ADN entre las especies nativas de palmas permiten distinguirlas a nivel de género.

Cuadro 5. Comparación de medias de la variable contenido de ADN para todas las especies y sus respectivas probabilidades. Los números en cursiva y negrita denotan diferencias significativas.

	<i>B. yatay</i>	<i>B. capitata</i>	<i>B. paraguayensis</i>	<i>B. lallemantii</i>	<i>S. romanzoffiana</i>
<i>B. yatay</i>					
<i>B. capitata</i>	0,99461067				
<i>B. paraguayensis</i>	0,99875152	0,90611106			
<i>B. lallemantii</i>	0,97598141	0,75264132	0,99991113		
<i>S. romanzoffiana</i>	0,00014222	0,00080645	0,00013	0,00012434	
<i>T. campestris</i>	0,00012434	0,00012434	0,00012434	0,00012434	0,00012434

El mayor promedio en contenido de DNA encontrado para *S. romanzoffiana* respecto de las especies de *Butia* puede deberse a una amplificación en los cistrones ribosomales, aumentando la NOR-heterocromatina, como se evidenció a nivel citogenético. Esto ha sido descrito para otras especies vegetales, siendo habitual un aumento en el contenido de ADN de una especie debido a una amplificación en secuencias medianamente repetidas, transposones, retrotransposones, etc. (Bennetzen *et al.* 2005). Los contenidos de ADN nuclear relativamente bajos encontrados en las especies de *Butia* y *Syagrus* se corresponden con lo hallado en cuanto a sus características cariológicas, ya que presentan un número menor de cromosomas ($2n = 32$) con respecto al número básico de la Familia ($x = 18$; Röser 1994), cromosomas de tamaño pequeño ($< 3.0 \mu\text{m}$) según la clasificación de Guerra (2000) y con una proporción reducida de heterocromatina (evidenciada a partir de los bandeos diferenciales realizados en este trabajo).

Para *Trithrinax campestris* el promedio del contenido de ADN nuclear 2C fue considerablemente alto, de 17.15 ± 0.07 pg. Es coincidente con lo encontrado para la subfamilia Coryphoideae a la que pertenece, en la cual se dan los mayores tamaños genómicos de las palmas (Familia Arecaceae) (Röser *et al.* 1997). Estos altos tamaños diploides parecen además estar restringidos

dentro de dicha subfamilia a la tribu Thrinaceae, a la que pertenece (Röser *et al.* 1997). El alto contenido de ADN nuclear de *Trithrinax campestris* también se corresponde con sus características cariológicas, ya que posee el número diploide más alto registrado para la Familia ($2n = 36$; Röser 1994), cromosomas de gran tamaño ($> 5.0 \mu\text{m}$) según la clasificación de Guerra (2000) con un promedio de $5.4 \mu\text{m}$ (Gaiero 2005) y gran proporción de heterocromatina evidenciada a través de los bandeos diferenciales realizados en este estudio.

Si analizamos comparativamente las especies de las dos subfamilias estudiadas, el contenido de DNA promedio varió entre las especies desde 4.07 pg en *Butia lallemantii* hasta 17.15 pg en *Trithrinax campestris*. El promedio de las cuatro especies de *Butia* es de 4.12, lo que representa 4.15 veces más ADN nuclear en *T. campestris* que en *Butia*. Se trata de una gran variación, similar a la encontrada dentro de las Orchidaceae (4.5 veces), la mayor familia de monocotiledóneas (Bharathan *et al.* 1994), si bien menor a la encontrada por Röser *et al.* (1997) para toda la familia Arecaceae (14.3 veces). El valor 2C de la especie de *Trithrinax* encontrado es mayor que el promedio de todas las Angiospermas. Para éstas, de un total de 4427 especies presentes en la base de datos del Kew Botanical Garden (<http://data.kew.org/cvalues>) el valor promedio es de 13.03 pg, siendo 0.2 pg (*Fragaria viridis*, Fam. Rosaceae con $2n = 14$) la de menor tamaño genómico y 254.8 pg la de mayor (*Fritillaria assyriaca*, Fam. Lilliaceae con $2n = 48$).

Dentro de las palmas Röser (1994) considera que evolutivamente lo que habría ocurrido es una disminución gradual en el complemento cromosómico por una serie de dispoloides descendente, y a su vez ha tenido lugar una reducción del tamaño genómico total. Es poco lo que se conoce sobre los procesos de reducción del tamaño genómico, aunque se han planteado mecanismos de remoción de retroelementos en los genomas de arroz y *Arabidopsis thaliana*,

junto con pequeñas deleciones en las unidades de dichos elementos móviles, producto de recombinación desigual homóloga y recombinación ilegítima (Bennetzen *et al.* 2005). Al ser reducido el número de especies incluido en este estudio, no es posible sacar conclusiones acerca de la ocurrencia de estos procesos en palmas. Sería necesario ampliar estos análisis a una mayor cantidad de especies. Además, según Guerra (2008), la carioevolución de un taxón sólo puede interpretarse correctamente cuando se cuenta con información sobre las relaciones entre las especies con fuerte apoyo por parte de otras características, que empleadas en conjunto pueden ayudar a visualizar los mecanismos que operan la evolución cariotípica del grupo.

Las técnicas de citogenética clásica y molecular empleadas no permitieron a este nivel la discriminación de las especies de *Butia* analizadas, lo cual permite inferir una alta similitud a nivel de su organización genómica estructural, que estaría evidenciando una gran cercanía entre estas especies.

3. ANÁLISIS POBLACIONALES MEDIANTE MARCADORES

ISSR

3.1 INTRODUCCIÓN

La subtribu Butiinae (ahora Attaleinae, Dransfield *et al.* 2005), que pertenece a la subfamilia Arecoideae, está integrada por 12 géneros de los cuales dos (*Butia* y *Syagrus*) están representados en Uruguay. Presenta gran interés a nivel sistemático ya que las relaciones entre las especies son complejas, y la taxonomía de dicho grupo aún no está resuelta a pesar de los estudios tendientes a abordar esta problemática. Se han planteado dudas acerca de la ubicación taxonómica de *Butia paraguayensis* situada como variedad dentro de yatay (Beccari 1916) y luego como subespecie, en base a sus características vegetativas y reproductivas, definiéndola como *B. yatay* ssp. *paraguayensis* (Xifreda y Sanso 1996). La descripción de *Butia lallemantii* como entidad específica (Deble y Marchiori 2006) sigue siendo controversial por los pocas variables morfológicas que la describen, y es para algunos considerada aún un ecotipo acaule de *B. paraguayensis* (Brussa y Grela 2007).

Todas las especies del género *Butia* presentan distribuciones determinadas posiblemente por su gran especificidad en cuanto a las condiciones ecológicas, particularmente edáficas (Chebataroff 1974). De las 13 especies que integran el género *Butia*, cuatro especies del género *Butia* están presentes en Uruguay. De ellas, *Butia yatay* se encuentra cubriendo grandes extensiones en Rio Grande do Sul en Brasil y en la Mesopotamia Argentina (Provincias del Chaco, Corrientes, Entre Ríos, Misiones y Santa Fé). En Uruguay forma extensos palmares en Paysandú (palmares de Quebracho y Guichón) y de menor tamaño en Río Negro (Chebataroff 1974, Zuloaga *et al.* 2009). *Butia paraguayensis* se distribuye ampliamente en Paraguay, en algunas provincias de Argentina (Corrientes y Misiones) y algunos estados de Brasil

(Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Paraná y Rio Grande do Sul), mientras que en Uruguay se localiza en una única población en la cima y laderas del Cerro del Miriñaque, un cerro de arenisca del Departamento de Rivera (Chebataroff 1974, Marcato 2004, Brussa y Grela 2007). Por último *Butia lallemantii*, entidad recientemente reconocida como especie y descrita por Deble y Marchiori (2006) ha sido registrada en Rio Grande do Sul (Brasil) donde comparte su distribución en amplias extensiones con *B. paraguayensis* y en Rivera para Uruguay (Deble y Marchiori 2006, Brussa y Grela 2007), donde fue determinada por Noblick (com. pers.⁶). Tiene una distribución muy restringida y en poblaciones pequeñas, algunas localizadas en laderas bajas o cornisas de arenisca y otras a campo abierto o en bosques forestados con pinos (Gaiero, Mazzella, Gago, Grela, Profumo com. pers.⁷). Probablemente su ambiente ha recibido una intensa influencia antrópica.

Las especies en estudio presentan problemas serios de conservación compartidos con el resto de las palmeras nativas (envejecimiento de las poblaciones, falta de regeneración) y en el caso de *B. lallemantii* y *B. paraguayensis* problemas particulares de reducción y fragmentación de poblaciones, junto con el ataque a sus inflorescencias e infrutescencias por parte del ganado, que amenaza la regeneración en etapas más tempranas. Brussa y Grela (2007) afirman que probablemente *B. lallemantii*, hoy en riesgo de extinción en nuestro país, en el pasado tuviera una distribución continua entre Rio Grande do Sul y el noreste de Uruguay. Los lugares donde quizás formaron en otros tiempos poblaciones importantes han sufrido en las últimas décadas continuas quemadas para limpieza de campos de producción agrícola

⁶ Larry Noblick 2007

⁷ Paola Gaiero, Cristina Mazzella, Julian Gago 2008
Ivan Grela, 2009; Ludmila Profumo 2009.

(Mantero com. pers.⁸). Por su parte *B. paraguayensis* sólo cuenta con una población de 175 individuos. Las reducidas poblaciones de ambas especies en Uruguay y los palmares mayores de *B. yatay* presentan por un lado problemas particulares en su definición como entidades específicas y a su vez problemáticas de conservación que ponen en riesgo su continuidad. Estas dos temáticas serán el eje de este trabajo, que intentará generar conocimiento que asista a su resolución.

Sobre la biología reproductiva de estas palmas sólo existen estudios en nuestro país para *B. capitata* (Morel 2006), pero las características generales encontradas se pueden extender a todo el género (Jones 1995). Se trata de plantas monoicas, en las cuales la floración masculina se da con anterioridad a la femenina (*viz.* protandria) y separada de ésta por una interfase (Morel 2006). Estas características favorecen la fecundación cruzada, por lo que se pueden esperar niveles de variabilidad altos, propios de especies alógamas (Hamrick y Godt 1996), como los encontrados a nivel fenotípico por Rivas y Barilani (2004). La polinización podría ser entomófila, aunque no se descarta la existencia de polinización anemófila, bastante común en otros géneros de palmeras (Jones 1995). La dispersión de semillas en *B. capitata* es llevada a cabo por mamíferos frugívoros (San Martín *et al.* 1996), siendo particularmente estudiado el caso del zorro de monte (*Cerdocyon thous*), que puede llegar a dispersarlas entre 0.5 y 2 km, aumentando su tasa de germinación (Rodríguez-Mazzini y Molina 1990). En *B. yatay* hay evidencias de que es también realizada por este zorro y además por ñandúes (Olmedo Masat *et al.* 2008).

Una herramienta muy útil en comparaciones taxonómicas y para determinar niveles de variabilidad poblacional, que será utilizada en este trabajo, es la técnica de *fingerprinting* por marcadores moleculares ISSR (*Inter*

⁸ Carlos Mantero 2009

Simple Sequence Repeat) (Zietkiewicz *et al.* 1994), la cual permite detectar polimorfismo basado en la presencia de microsatélites a lo largo del genoma. Los marcadores ISSR son secuencias de ADN delimitadas por dos microsatélites (SSR) invertidos compuestos por las mismas unidades. Pueden ser amplificadas con una misma reacción de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) iniciada por cebadores complementarios a los SSR flanqueantes (Zietkiewicz *et al.* 1994). Son marcadores universales dominantes, producen patrones multilocus altamente reproducibles, abundantes y polimórficos. Además dichos patrones son complejos y especie-específicos. Permiten estudios sin necesidad de información previa acerca de la secuencia, e identifican niveles significativos de variación. Son muy útiles para realizar perfiles de ADN en especies estrechamente relacionadas. A pesar de ser marcadores dominantes, son altamente informativos y han sido ampliamente usados para determinar distancias genéticas entre especies y diferenciar variedades dentro de una especie (Zietkiewicz *et al.* 1994; Bernet y Branchard 2004, González-Guzmán *et al.* 2006). En palmas se han utilizado para distinguir variedades morfológicamente diferentes, simpátricas y supuestamente con aislamiento reproductivo, así como para calcular índices de diversidad y de diferenciación poblacional (Roncal *et al.* 2007). En especies de palmas del género *Butia*, incluyendo algunas cuya área de distribución comprende a Uruguay (*B. capitata*, *B. yatay*, *B. paraguayensis* y *X. Butyagrus nabonnandii*) han sido usados para caracterizar poblaciones nativas en Rio Grande do Sul (Brasil). Se puso a punto la técnica para dichas especies, se determinó el nivel de polimorfismo poblacional y se estimaron distancias interpoblacionales e interespecíficas (Rossato *et al.* 2007). Los marcadores ISSR son cada vez más utilizados para determinar niveles de variabilidad genética y estructura de poblaciones (Assefa *et al.* 2003, Ci *et al.* 2008).

El objetivo de este estudio fue analizar la variación genética a nivel intra e interpoblacional en *Butia yatay*, *B. paraguayensis* y *B. lallemantii* detectada por medio de marcadores ISSR y establecer las distancias genéticas interpoblacionales e interespecíficas entre ellas, con el fin de asistir a la resolución taxonómica de estas especies y evidenciar estructura genética en sus poblaciones. A pesar de los importantes problemas planteados a nivel sistemático y de conservación, en nuestro país no se cuenta con estudios de genética de poblaciones en el género *Butia*. La evaluación de la diversidad de las poblaciones de una determinada especie es una herramienta esencial para asistir en la toma de decisiones relativas a la implementación de planes de conservación. Los parámetros de diversidad genética obtenidos a partir del análisis por marcadores moleculares pueden informar sobre divergencia entre poblaciones y sobre reducciones en la variabilidad genética que pongan en peligro la continuidad de las poblaciones, o de lo contrario evidenciar potencial genético de recuperación ante la degradación demográfica y la fragmentación.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Laboratório de Óleos Essenciais e Extratos Vegetais de la Universidad de Caxias do Sul, Brasil, bajo la orientación del Dr. Marcelo Rossato. Se analizaron mediante marcadores ISSR tres poblaciones naturales de *Butia yatay*, una de *B. paraguayensis* –la única población conocida- y cuatro de *B. lallemantii*, todas de Uruguay. Su localización se muestra en la Figura 17 y las coordenadas geográficas están detalladas en la Cuadro 6. Se colectaron muestras de hoja fresca de un número variable de individuos según la población y se seleccionaron aleatoriamente 20 individuos (cuando fue posible contar con ese número) de cada población para la extracción de ADN. Se tomaron además como grupo externo muestras de 5

individuos de *Syagrus romanzoffiana* de distintos orígenes y mantenidos en el invernáculo del Departamento de Biología Vegetal (Facultad de Agronomía). Las muestras fueron secadas y mantenidas en silica gel para su conservación hasta la extracción de ADN.

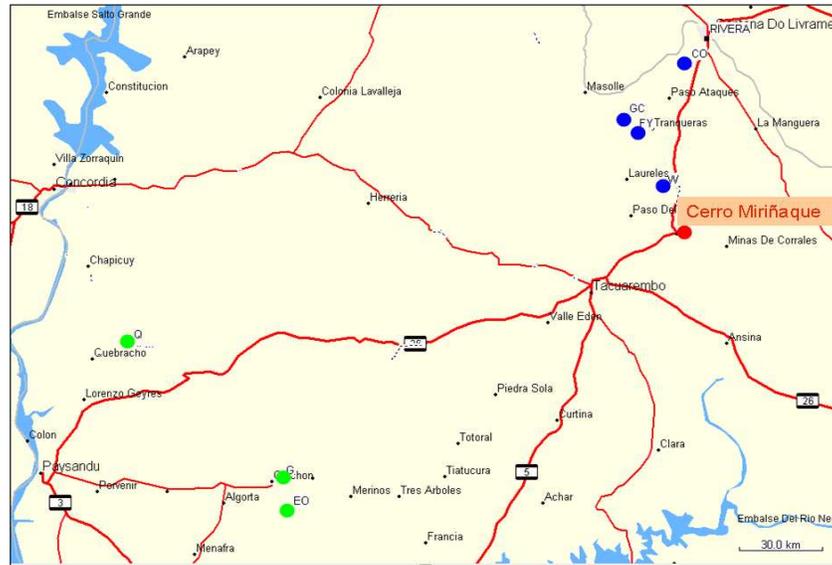


Figura 17. Poblaciones de *Butia yatay* (puntos verdes), *Butia paraguayensis* (punto rojo) y *Butia lallemantii* (puntos azules) analizadas mediante marcadores ISSR.

Cuadro 6. Coordenadas geográficas de todas las poblaciones incluidas en análisis poblacional por ISSR.

Especie	Población	Latitud	Longitud	Número de individuos
<i>Butia lallemantii</i>	FY	S 31° 12' 49.8"	W 55° 48' 50.0"	20
<i>Butia lallemantii</i>	GC	S 31° 10' 01.6"	W 55° 51' 07.9"	22
<i>Butia lallemantii</i>	W	S 31° 23' 50.8"	W 55° 42' 24.5"	14
<i>Butia lallemantii</i>	CO	S 30° 59' 15.3"	W 55° 36' 53.5"	17
<i>Butia paraguayensis</i>	CM Cerro del Miriñaque	S 31° 32' 00.8"	W 55° 37' 58.3"	20
<i>Butia yatay</i>	Q Quebracho	S 31° 54' 36.8"	W 57° 39' 32.4"	20
<i>Butia yatay</i>	GUI Guichón	S 32° 20' 35.8"	W 57° 09' 33.9"	20
<i>Butia yatay</i>	CC Cañada del Campamento	S 32° 23' 06.9"	W 57° 10' 58.7"	20

3.2.1 Extracción de ADN

El ADN genómico total de las muestras fue extraído por el método de extracción de ADN con tampón CTAB (Doyle y Doyle 1987) con modificaciones.

Se colocó en mortero un trozo de 1 g de hoja seca, previamente retirando la nervadura central y se trituroó con la asistencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se transfirieron 0.3 g de muestra molida a un tubo *ependorf* de 2 mL y se le agregaron 800 μ L de tampón CTAB 2% precalentado a 65° C y 8 μ L de β -mercaptoetanol para evitar el efecto oxidativo de los polifenoles sobre el ADN. Se agitó y se dejó incubar a 65° C por al menos 1 h en bloque seco (Tonegen Block, Tonegen), mezclando por inversión cada 5 min.

Al cabo de 1 h de incubación se dejaron enfriar las muestras y luego se les agregó 1 volumen (en este caso 800 μ L) de cloroformo: alcohol isoamílico 14: 1 a temperatura ambiente. Se agitaron por inmersión enérgicamente todos los tubos en simultáneo hasta lograr una mezcla completamente homogénea. Se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 min y luego se retiraron cuidadosamente 450 μ L de la fase acuosa superior, que contiene al ADN disuelto, evitando mezclar las fases o tomar de las fases inferiores, ya que estas contienen restos vegetales y proteínas en solución. Se transfirieron a un nuevo *ependorf* de 1.5 mL y se adicionó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico 14:1, repitiendo el ciclo de homogeneización y centrifugado. Este ciclo se puede repetir tantas veces como sea conveniente para asegurar la separación del ADN de las proteínas, evitando interferencias en las posteriores amplificaciones. Se transfirieron 300 μ L de la fase acuosa a otro tubo *ependorf* de 1.5 mL y se agregó 1 volumen de isopropanol a -20° C, que captura el ADN para hacerlo precipitar. Se mezcló delicadamente por inversión, observándose el “ovillo” de ADN que comienza a aparecer en suspensión. Se dejó precipitar a -20° C

durante 20 h (overnight). Posteriormente se centrifugaron las muestras a 13000 rpm por 10 min, se descartó cuidadosamente el sobrenadante y se dejaron escurrir las muestras por inversión de los tubos sobre papel absorbente. Para limpiar el *pellet* con el ADN se agregaron 200 μ L de etanol 75% a -20° C, que actuó durante 5 min, se retiró cuidadosamente con micropipeta, evitando despegar el pellet. Se repitió el procedimiento con etanol 100% y se dejó secar. Las muestras fueron resuspendidas en 100 μ L de tampón TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH = 8.0) que por el efecto quelante del EDTA inhibe la acción de endonucleasas que pudieran degradar el ADN. En estas condiciones fueron conservadas a -20° C.

3.2.2 Preparación de las muestras para las amplificaciones

Para verificar la integridad del ADN, 10 μ L de las muestras stock en 5 μ L de tampón de corrida 6x (0.09% azul de bromofenol, 0.09% cyanol xileno FF y 60% Glicerol) fueron corridas en geles de agarosa 0.8% en tampón TBE (50mM Tris, 50mM ácido bórico, 2.5 mM EDTA, pH 8.3). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio al 0.003% y para la corrida electroforética fueron sometidos a una diferencia de potencial de 40 V (3 V/cm) durante 2 h. Fueron visualizados en transiluminador UVI doc v 10.0 con cámara digital acoplada.

Las muestras que se presentaban íntegras fueron incubadas con 1 μ L de ARNasa Invitrogen a 37° C durante 1 h. A continuación la concentración de ADN de cada muestra fue estimada usando un espectrofotómetro Beckman DU 530 a una longitud de onda de 260 nm. La relación de absorbancia a 260 nm/absorbancia a 280 nm fue registrada para comprobar que las muestras no tuvieran una concentración excesiva de proteínas. En base a la estimación de la concentración de ADN se efectuaron las diluciones de las muestras, de modo de llegar a una concentración de ADN de uso de 5 ng/ μ L.

3.2.3 Selección de cebadores y amplificaciones ISSR-PCR

Se realizaron las reacciones de amplificación ISSR-PCR, ajustando el protocolo desarrollado por Rossato *et al.* (2007) para estas especies. En la Cuadro 7 se detallan los cebadores que se probaron para seleccionar los que se iban a utilizar. Dichos cebadores estuvieron entre los utilizados en Rossato *et al.* (2007) para especies de palmas cuya área de distribución comprende a Uruguay.

Cuadro 7. Secuencia de los microsatélites probados como cebadores en las reacciones de amplificación ISSR-PCR. Los cebadores sombreados fueron los seleccionados para este trabajo.

	Temperatura de renaturalización optimizada 50° C					Temperatura de renaturalización optimizada 48° C		
Secuencia	(AC)₈T	(AG)₈YT	(AG) ₈ T	(CA) ₈ T	(CT) ₈ A	(AG) ₈ ^a	(CA) ₈	(CA)₈G
	(CT) ₈ T	(GAC) ₅	(GA) ₈ A	(GA)₈T	(GT) ₈ A	(CTC)₄RT	(GAA) ₆	(GACA) ₄

Los cinco cebadores finalmente utilizados fueron seleccionados en base a la calidad de los perfiles de amplificación y el número de marcadores obtenidos usando seis muestras, dos de cada especie en estudio.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen total de 25 µL. La mezcla de reacción estaba compuesta por 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 0.2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), 1.15 mM MgCl₂, 0.1 µM de cebador, 1.5 unidades de Taq ADN polimerasa (Invitrogen), 2% DMSO y 50 ng de ADN genómico de la muestra. Las amplificaciones ISSR-PCR fueron realizadas en placas para termociclador con 96 pocillos, cada uno con un volumen total de 200 µL, en termociclador Tonegen Palm (Tonegen). Las condiciones de amplificación consistieron en una primera fase de desnaturalización a 92° C por 4 min 30 s, seguida de 40 ciclos térmicos de: 92° C (1 min), 48/50° C (según temperatura de renaturalización del cebador, 50 s) y

72° (2 min). Se completaron las reacciones con una etapa final de extensión a 72° C (5 min) y 5 min a 10° C.

En cada conjunto de amplificaciones se utilizaron muestras de individuos de todas las poblaciones y se incluyó un control negativo (blanco, sin ADN genómico). Para posibilitar las comparaciones entre amplificaciones distintas con un mismo cebador, se repitió en cada conjunto una muestra de cada especie, que actuó como estándar interno. Las muestras utilizadas como estándares internos fueron seleccionadas en base a la cantidad de material disponible y a la calidad del patrón de amplificación en la primera corrida electroforética de la primera reacción para cada cebador.

3.2.4 Visualización y análisis de imágenes

La separación de los productos de amplificación se llevó a cabo en geles de agarosa 1.5% en tampón TBE teñidos con bromuro de etidio al 0.003%, sometidos a una diferencia de potencial de 90 V (3 V/cm) durante 3 h. En todos los geles se aplicaron en un carril 5 µL de un marcador de peso molecular (10 Kb DNA Ladder, Real Biotech Corporation) y un control negativo. Todas las poblaciones en estudio se encontraban representadas en cada gel. Para comparar entre distintos geles de amplificaciones con un mismo cebador, se incluyó en cada gel una repetición de cada uno de los estándares internos de las especies. La visualización de los geles fue efectuada en transiluminador UVI doc v 10.0 con cámara digital acoplada. Las imágenes fueron procesadas usando el programa Adobe PhotoShop CS3 v 10.0, realizando ajustes que afectan de forma homogénea a todos los píxeles. Todas las bandas claras y consistentes fueron registradas con la asistencia del programa Lab Image Free Edition 2.7.0 (Kapelan Bio-Imaging 1999-2003). Se construyeron matrices de datos a partir de los geles, basadas en presencia (1) o ausencia (0) de bandas.

3.2.5 Análisis estadísticos

Se analizó la similitud entre los genotipos empleando el coeficiente de Jaccard (Jaccard 1908). Se realizaron análisis de agrupamiento mediante el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Average values) y un análisis de coordenadas principales, usando el software FAMD (Fingerprinting Analysis with Missing Data) v. 1.21 (Schlüter y Harris 2006). Se empleó a *Syagrus romanzoffiana* como grupo externo, o sea para darle una raíz al dendograma generado por el agrupamiento y así definir mejor los grupos.

Para analizar la variabilidad intra e interpoblacional se calcularon índices de polimorfismo y de diversidad y se llevaron a cabo AMOVA -Analysis of Molecular Variance -(Excoffier *et al*, 1992) por medio del programa GenAlEx (Peakall y Smouse 2006), por los cuales se calcularon índices de diferenciación genética (Φ_{ST}) utilizando el coeficiente de distancia de Nei- Li (1979) para evaluar la diferenciación genética entre las poblaciones y especies en estudio. Este coeficiente se define mediante la siguiente ecuación:

$$D_{N}^{ij} = 1 - \frac{2 N^{ij}}{N^i + N^j}$$

N^{ij} – número de bandas comunes entre genotipos i y j
 N^i o N^j – número de bandas para el genotipo i o j.

Varía entre 0 (mínima distancia) y 1 (máxima distancia).

La capacidad de discriminación de cada cebador utilizado fue expresada a través del coeficiente de Simpson ($h_j = \sum (1 - \sum p_i^2)/n$), donde p_i es la frecuencia del i-ésimo alelo y n corresponde al número de loci detectados por cada cebador (Hunter y Gaston 1988). Un coeficiente de 1.0 indica la capacidad del cebador de discriminar entre todas las muestras, mientras que un valor de 0 significa que todas las muestras son indistinguibles a través de este cebador.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis realizado en este trabajo para evaluar las distancias genéticas entre poblaciones y la variabilidad intra e interpoblacional e interespecífica entre *Butia yatay*, *B. paraguayensis* y *B. lallemantii* es el primero para especies de palmas nativas de nuestro país, ya que no existen estudios con abordaje poblacional mediante marcadores y también lo es para dos de las especies, ya que sólo *Butia yatay* ha sido anteriormente evaluada mediante marcadores ISSR en Brasil (Rossato et al. 2007).

El método de extracción utilizado (Doyle y Doyle (1987), con escasas modificaciones) resultó altamente eficiente, no fue necesario descartar ninguna muestra por no conseguir extracción y sólo fue preciso repetir la extracción en dos casos. Se obtuvieron muestras de ADN genómico de buena calidad y alta concentración. En la figura 18 se observa la fotografía de una electroforesis en gel de agarosa empleada para comprobar la integridad de las muestras.

De los 16 cebadores de ISSR probados se seleccionaron cinco - (CTC)₄RT, (AG)₈YT, (AC)₈T, (CA)₈G y (GA)₈T-, en base al número de bandas amplificadas y a su intensidad. Estos cebadores mostraron índices de Simpson entre 0.67 ((CA)₈G) y 0.90 ((AC)₈T), con un promedio de 0.77, con un poder de discriminación cercano a 1, por lo que el número de cebadores empleado es apropiado (Hunter y Gaston, 1988).

Se efectuó una selección de aquellas bandas que serían consideradas en el análisis. Para ello se fueron descartando aquellas que no eran nítidas, las que superaban el límite superior e inferior de peso molecular establecido para cada marcador y las que no presentaban buena repetibilidad entre amplificaciones y geles, evaluadas en base a su repetibilidad en los perfiles de los estándares internos para cada especie (Figura 19). Se descartaron además

individuos que presentaban perfiles de amplificación poco informativos (patrón de bandas pobre, de muy baja intensidad o con arrastre que no permitía distinguir las bandas).

Para cada cebador se evaluó el total de bandas amplificadas, el rango de tamaños (en pares de bases) y el porcentaje de bandas polimórficas. Se consideraron polimórficos aquellos *loci* en los que la frecuencia de la banda era menor al 95%. Los datos se muestran en la Cuadro 8. Los cebadores seleccionados generaron un total de 74 fragmentos amplificados que actuaron como marcadores, con un promedio de 14.8 fragmentos por cebador, presentando un rango entre 17 y 11 bandas. Los tamaños de los productos de amplificación tomados en cuenta variaron entre 911 pb ((AC)₈T) y 73 pb ((AG)₈YT).

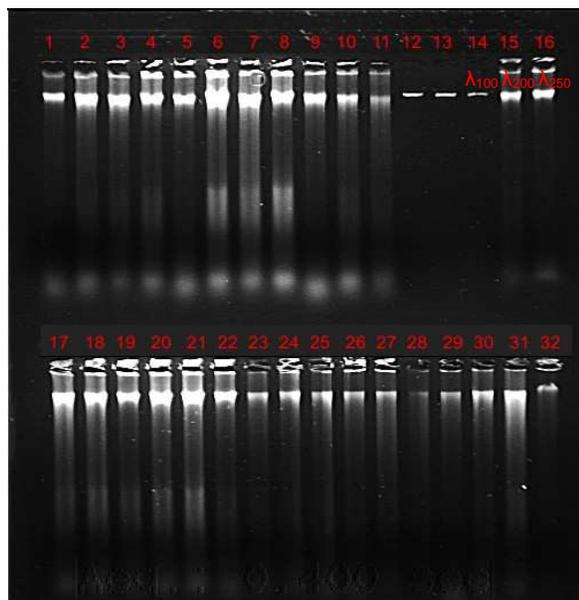


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % teñida con bromuro de etidio mostrando una banda por carril correspondiente al ADN genómico de cada muestra. Carriles 1 al 3 y 15 al 17: muestras de *B. paraguayensis*; 4 al 11, 18 al 27 y 32: muestras de *B. yatay*; 28 al 31: muestras de *B. lallemantii*. Carriles 12, 13 y 14: ADN genómico entero del virus λ a distintas concentraciones (100 ng/ μ L, 200 ng/ μ L y 250 ng/ μ L, respectivamente) empleado para estimar visualmente la concentración de ADN de las muestras.

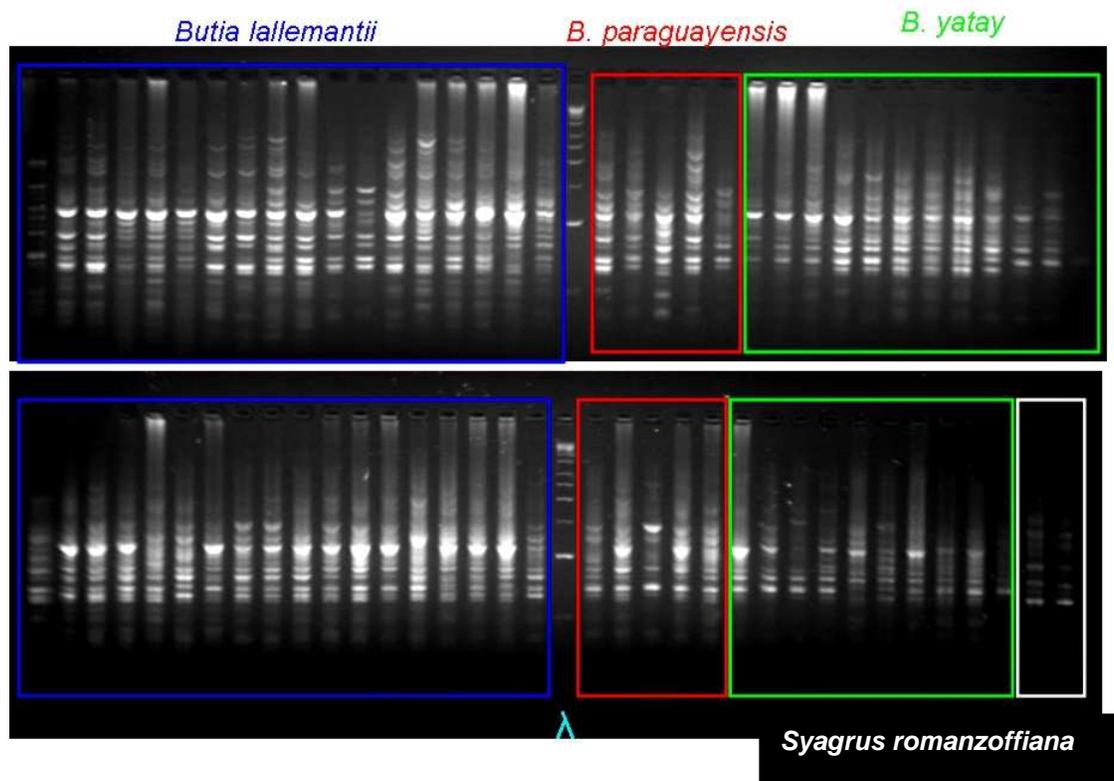


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio de los productos de amplificación ISSR-PCR a partir del cebador (CTC)₄RT. Se observan enmarcados en azul los carriles correspondientes a muestras de *B. lallemantii*, en rojo a *B. paraguayensis*, en verde a *B. yatay* y en blanco los correspondientes al grupo externo, *Syagrus romanzoffiana*. Se señala con λ a cada marcador de peso molecular usado como referencia en cada gel.

En términos generales las bandas suficientemente nítidas y repetibles como para ser consideradas en el análisis fueron fragmentos de peso molecular en pb bajo a medio. Un 96% (14.2) de las bandas fueron polimórficas, incluyendo a *Syagrus romanzoffiana* (grupo externo) en el análisis. Considerando sólo las tres especies de *Butia*, el porcentaje de bandas polimórficas fue de 91% (13.4). Los cebadores con mayor número de fragmentos amplificados fueron (CTC)₄RT, (AG)₈YT y (AC)₈T con 17 bandas cada uno, siendo los dos últimos los que presentaron mayor número de bandas polimórficas. Rossato *et al.* (2007) trabajando con palmas del género *Butia*

probaron también 16 cebadores de ISSR-PCR y seleccionaron nueve, de los cuales siete presentaron capacidad de discriminación entre las especies. De los cinco cebadores que en dicho trabajo fueron responsables de la mayor parte del polimorfismo registrado, tres fueron incluidos aquí – $(AC)_8T$, $(CTC)_4RT$ y $(CA)_8G$ –. Coincidentemente, en las dos investigaciones, el cebador $(AC)_8T$ fue el que presentó el mayor número de productos de amplificación y de bandas polimórficas. El número de bandas obtenidas por cebador presenta un límite superior menor en este trabajo que en el de Rossato *et al.* (2007), lo que podría deberse a que este autor utilizó *bulks* de muestras de cada población en vez de amplificar muestras individuales como en el presente trabajo. Además este autor incluyó mayor número de especies en su análisis. En otro estudio similar en palmas con variedades de *Geonoma macrostachys* (Geonomateae, subfamilia Arecoideae) (Roncal *et al.* 2007) se utilizó un número mucho mayor de cebadores de ISSR-PCR (27), pero el número de fragmentos obtenidos (99) no fue sustancialmente mayor al de este estudio, mientras que el porcentaje de bandas polimórficas fue notoriamente menor (51%). El análisis de Roncal *et al.* (2007) arrojó un promedio de fragmentos y de bandas polimórficas por cebador mucho menor al del presente trabajo (3.67 y 1.89 bandas, respectivamente).

En *Butia capitata* (Nunes *et al.* 2008) se usaron 21 cebadores de RAPD para evaluar 22 genotipos, obteniendo un total de bandas mucho mayor que en el presente trabajo (136) pero con un porcentaje de bandas polimórficas muy inferior (57%), siendo el rango y promedio de bandas obtenidas por cebador menor al de este estudio. También se utilizaron marcadores RAPD en *Syagrus romanzoffiana* (Iob *et al.* 2005) con números de cebadores ligeramente menores (ocho) pero obteniendo un total de bandas y un porcentaje de bandas polimórficas similares a los de este trabajo (85 bandas, 97% polimórficas) En especies de la subfamilia Arecoideae se han utilizado marcadores dominantes como AFLP en *Euterpe edulis* (Cardoso *et al.* 2000), y codominantes como

microsatélites (SSR) en *Bactris gasipaes* (Rodrigues *et al.* 2004). Para la primera se usaron cinco pares de cebadores, dando 429 marcadores (63 a 102 por cebador), número cinco veces mayor del obtenido en este estudio. Para la segunda especie y con 10 cebadores, se logró un número de marcadores similar al hallado en este trabajo, de 14.6 alelos por locus, siendo cada locus altamente polimórfico, con una heterocigosis esperada de 0.83.

Cuadro 8. Número de bandas amplificadas, número y porcentaje de bandas polimórficas (intergenéricas e interespecíficas), rango de pesos moleculares (pb) e índice de Simpson (h) para los cebadores utilizados.

Cebador	N	N _{intergen}	N _{interespec}	%P _{intergen}	%P _{interespec}	Rango (pb)	h
(CTC) ₄ RT	17	15	13	88	76.5	849 – 109	0.71
(AG) ₈ YT	17	17	16	100	94	708 – 73	0.85
(AC) ₈ T	17	17	16	100	94	911 – 391	0.90
(CA) ₈ G	11	10	10	91	91	648 – 100	0.67
(GA) ₈ T	12	12	12	100	100	600 – 127	0.77
Media	14.8	14.2	13.4	95.8	91.1	419	0.77
Total	74	71	67	96	90.5	911-73	

Se obtuvo un patrón único de bandas para el género *Butia* y otro para *Syagrus*, con unas pocas diferencias. Además, estos patrones de amplificación mostraron marcadores género-específicos. A modo de ejemplo, el cebador (CTC)₄RT amplificó un fragmento de 520 pb que caracterizaba a las tres especies de *Butia* en estudio y otro fragmento de 440 pb exclusivo de *Syagrus*. Estos patrones también fueron observados en el trabajo de Rossato *et al.* (2007).

En el cuadro 9 se presentan los índices de diferenciación genética (Φ_{ST}) entre todos los pares de especies de *Butia* (inferidos a partir del índice de distancia de Nei-Li). Esta diferenciación varió entre 0.053 (*B. lallemantii* y *B. paraguayensis*) y 0.157 (*B. lallemantii* y *B. yatay*) mientras que entre

poblaciones de una misma especie fue de 0.025 (*B. lallemantii* FY y *B. lallemantii* W, $p = 0.035$) a 0.202 (*B. yatay* Q y *B. yatay* CC, $p = 0.001$) y entre poblaciones de distintas especies de *Butia* fue de 0.047 (*B. lallemantii* GC y *B. paraguayensis* CM, $p = 0.002$) a 0.255 (*B. yatay* CC vs *B. lallemantii* FY y *B. paraguayensis* CM, $p = 0.001$). La distancia genética interespecífica entre especies de *Butia* fue considerablemente baja en promedio (0.12), y aún más lo fue la distancia promedio entre poblaciones de una misma especie (0.034 para *B. lallemantii*, 0.11 para *B. yatay*). Como ya fue mencionado, los valores de distancia más bajos fueron los encontrados entre *B. lallemantii* y *B. paraguayensis* a nivel interespecífico (0.053) y entre *B. lallemantii* FY y *B. lallemantii* W (0.025, $p = 0.035$) considerando poblaciones de una misma especie. Los valores de distancia genética más altos se registraron, como era de esperar, entre las especies de *Butia* y la especie usada como grupo externo, *Syagrus romanzoffiana*, que presentó una distancia promedio de 0.312 (Cuadro 9). Se registraron valores menores de diferenciación interpoblacional, llegando inclusive a 0, pero estos valores presentan probabilidades superiores al nivel crítico de $p = 0.05$, con lo cual estas poblaciones no son significativamente divergentes. Esto puede deberse a que se trata de poblaciones muy próximas geográficamente, (ver mapa en figura 17) por lo que el flujo génico entre ellas puede ser alto, evitando que ocurra diferenciación entre dichas poblaciones (Wright 1951, Slatkin 1987). Aunque los índices de diferenciación entre el resto de las poblaciones presentaron valores bajos, la gran mayoría tuvo fuerte apoyo estadístico que indica que las poblaciones y especies son significativamente divergentes. Rossato *et al.* (2007) encontraron, usando ISSR en especies de *Butia* y *Syagrus*, valores de similitud calculada a partir del coeficiente de Jaccard bajos en comparación con lo hallado en este trabajo, posiblemente por el uso de *bulks* que no permiten ver la variabilidad intrapoblacional. En *B. capitata*, con marcadores RAPD, se encontraron también distancias genéticas mayores que en el presente trabajo, entre 0.05 y 0.4 (Nunes *et al.* 2008),

diferencia que puede estar relacionada al tipo de marcador. En *S. romanzoffiana* utilizando también marcadores RAPD, se encontraron niveles bajos de diferenciación entre poblaciones (Rossato *et al.*, en redacción). En *Geonoma macrostachys*, en base a marcadores ISSR al igual que aquí, los índices de Nei-Li entre poblaciones variaron entre 0.028 y 0.55 (Roncal *et al.* 2007), por lo que en su límite superior fueron mucho mayores a los encontrados aquí. Aunque es difícil realizar comparaciones de valores entre especies diferentes, se podría pensar que estos valores más altos se deben a que las distancias geográficas entre las poblaciones estudiadas en el presente trabajo son mucho menores que entre las estudiadas por Roncal *et al.* (2007), lo que permitiría mayor flujo génico entre ellas y por tanto menor diferenciación (Wright 1951, Slatkin 1987). Las distancias encontradas en *Euterpe edulis* usando AFLP (Cardoso *et al.* 2000) fueron similares a las halladas en el presente trabajo.

Cuadro 9. Índices de diferenciación genética (Φ_{ST}) entre poblaciones, calculados a partir de la distancia de Nei-Li, (a) comparando todas las poblaciones incluidas en el estudio y considerando las especies separadamente (b) *Butia lallemantii* y (c) *B. yatay*. Por debajo de la diagonal se observan los Φ_{ST} y por encima los valores de probabilidad para cada índice, basados en 999 permutaciones. Las letras ns indican divergencia no significativa ($p > 0.05$).

a									
	<i>Butia lallemantii</i>				<i>Butia paraguayensis</i> CM	<i>Butia yatay</i>			<i>Syagrus romanzoffiana</i> SR
	FY	GC	W	CO		GUI	Q	CC	
FY	0,000	0,442 ns	0,035	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
GC	0,000	0,000	0,012	0,001	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001
W	0,025	0,033	0,000	0,089 ns	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
CO	0,046	0,047	0,017	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
CM	0,054	0,047	0,054	0,055	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001
GUI	0,114	0,091	0,125	0,083	0,089	0,000	0,069 ns	0,001	0,001
Q	0,150	0,131	0,137	0,109	0,109	0,016	0,000	0,001	0,001
CC	0,254	0,248	0,221	0,221	0,255	0,202	0,113	0,000	0,001
SR	0,324	0,337	0,280	0,324	0,332	0,262	0,297	0,338	0,000

b					
	<i>Butia lallemantii</i>				<i>Syagrus romanzoffiana</i>
	FY	GC	W	CO	
FY	0,000	0,458 ns	0,041	0,002	0,001
GC	0,000	0,000	0,012	0,001	0,001
W	0,025	0,033	0,000	0,094 ns	0,001
CO	0,046	0,047	0,017	0,000	0,001
SR	0,324	0,337	0,280	0,324	0,000

c				
	<i>Butia yatay</i>			<i>Syagrus romanzoffiana</i>
	Guichón	Quebracho	C Campamento	
GUI	0,000	0,062 ns		0,001
Q	0,016	0,000		0,001
CC	0,202	0,113		0,000
SR	0,262	0,297		0,338

Considerando todas las muestras simultáneamente, los resultados del AMOVA (Cuadro 10a y Fig. 20a) indican que estas especies presentan altos niveles de variabilidad intrapoblacional (84%), en tanto la variabilidad entre poblaciones y entre especies es comparativamente baja (6% y 10%, respectivamente).

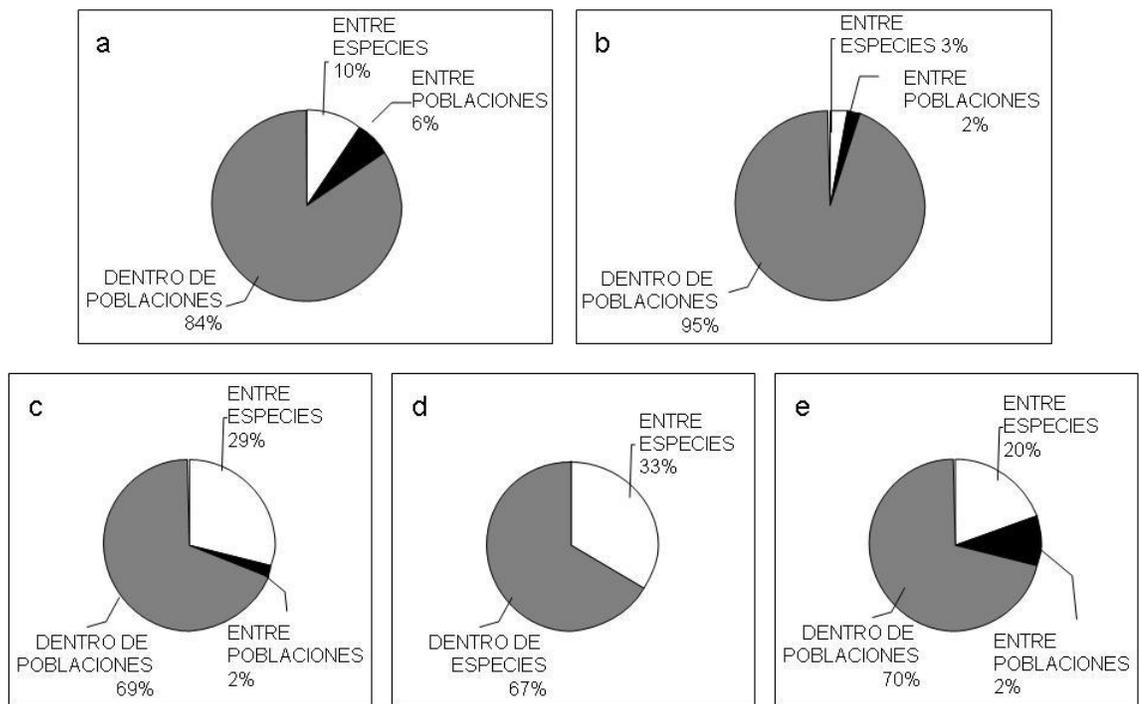


Figura 20. Gráficos de repartición de los componentes de varianza obtenidos a partir del análisis de varianza molecular (AMOVA) de todas las especies en conjunto (a) ,de *Butia paraguayensis* y *B. lallemantii* (b) y de cada especie por separado, comparadas con *Syagrus romanzoffiana*; (c) *B. lallemantii*, (d) *Butia paraguayensis*, y (e) *B. yatay*.

Teniendo en cuenta cada especie por separado (Cuadro 9b y c; Fig. 20c, d y e), el mayor porcentaje de variabilidad interespecífica encontrado fue entre *B. paraguayensis* y *Syagrus romanzoffiana* (33%) y el mayor porcentaje de variabilidad entre poblaciones de una misma especie fue hallado en *B. yatay* (10%). El mayor porcentaje de variabilidad intrapoblacional fue registrado también en *B. yatay* (71%), aunque el encontrado en *B. lallemantii* fue similarmente alto (69%). Los menores porcentajes fueron registrados a nivel interespecífico para *B. yatay* y *Syagrus romanzoffiana* (20%), a nivel interpoblacional en *B. lallemantii* (2%) y a nivel intrapoblacional fue ligeramente menor en *B. paraguayensis* (67%). No es posible realizar comparaciones de estos resultados con los de Rossato *et al.* (2007) para *Butia* o con los de Rossato *et al.* (en redacción) para *Syagrus*, ya que en estos trabajos se

utilizaron *bulks* de muestras para cada población, con lo cual no es posible detectar variabilidad intrapoblacional. En *Euterpe edulis* el porcentaje de variabilidad intrapoblacional fue menor (57%; Cardoso *et al*, 2000) mientras que en *Geonoma macrostachys* el 100% de la variabilidad registrada estuvo explicada por variabilidad intrapoblacional (Roncal *et al.* 2007). Por otra parte, al realizar la partición de los componentes de varianza entre *Butia paraguayensis* y *Butia lallemantii* (Fig. 20b) se observó una muy alta variabilidad dentro de las poblaciones (95%) y muy pequeña variabilidad interpoblacional (2%). La variabilidad entre estas especies resultó prácticamente del mismo valor que la evidenciada entre poblaciones, lo que permite afirmar que se trata de especies muy cercanas.

Estos elevados niveles de variabilidad intrapoblacional son de esperar en el caso de especies silvestres (no sometidas a presión de selección artificial) y particularmente en el caso de especies longevas, posiblemente con reproducción alógama y grandes distancias de dispersión de polen, lo que posibilita alto flujo génico dentro y entre poblaciones de una misma especie (Hamrick y Godt (1996). Lamentablemente no existen estudios sistemáticos de la biología reproductiva de estas especies que permitan inferir los niveles de flujo génico y variabilidad genética intra e interpoblacional esperados a partir de la morfología floral, la fenología de la floración, el sistema reproductivo y los mecanismos de polinización y dispersión de polen y semillas. Estudios de estas características, acompañados de un estudio de con marcadores moleculares codominantes como los microsatélites (SSR), podrían definir más claramente los niveles de flujo génico dentro y entre poblaciones de estas especies. Sólo se cuenta con información de la biología reproductiva de *Butia capitata* en Uruguay (Morel 2006) y en Brasil (Rosa *et al.* 1998), siendo esta especie monoica y con protandria, mecanismos que podrían estar garantizando fecundación cruzada. Observaciones no sistemáticas realizadas durante este trabajo permiten afirmar

que el resto de las especies de *Butia* presentes en Uruguay también son monoicas y presentan protandria, por lo que se puede suponer alogamia, la cual estaría explicando en parte los altos niveles de variabilidad intrapoblacional y la baja diferenciación entre poblaciones.

Al hallar tal variabilidad intrapoblacional se puede afirmar que las características reproductivas y de historia de vida de estas especies aseguran el mantenimiento del acervo génico de las poblaciones actuales a pesar de encontrarse reducidas, fragmentadas y en malas condiciones a nivel demográfico y sanitario. Por tanto, de garantizarse el reclutamiento y la continuidad de estas poblaciones se podría mantener la variabilidad original ya que la diversidad genética encontrada les permite tener potencial de recuperación. De todos modos se debe evitar la pérdida de hábitats estas especies, especialmente de *Butia lallemantii* y *B. paraguayensis*, porque por el pequeño tamaño de sus poblaciones, y por estar en el límite austral de su distribución, son más vulnerables a las alteraciones ambientales (Karron 1991). Otra posible explicación para la alta variabilidad intrapoblacional hallada en este estudio es que hayan ocurrido eventos de hibridación entre estas especies en un pasado reciente, lo que permitiría un gran aumento de la variabilidad dentro de sus poblaciones junto con una reducción en la variabilidad entre dichas especies (Rieseberg 1997, Chung *et al.* 2005, Lorenz-Lemke *et al.* 2006).

Cuadro 10. Análisis molecular de varianza para todas las especies y cada especie por separado comparada con *S. romanzoffiana*. Se detallan las fuentes de variación, los grados de libertad (g.l.) suma de cuadrados (SC), los cuadrados medios (CM), el valor de varianza estimada y su porcentaje.

Todas las especies					
Fuente	g.l.	SC	CM	Var. est.	%
Entre especies	3	199,113	66,371	1,302	10%
Entre poblaciones	5	128,691	25,738	0,763	6%
Dentro de pobl.	153	1679,193	10,975	10,975	84%
Total	161	2006,997		13,040	100%

<i>Butia lallemantii</i> vs <i>Syagrus romanzoffiana</i>					
Fuente	g.l.	SC	CM	Var. est.	%
Entre especies	1	58,232	58,232	4,813	29%
Entre poblaciones	3	50,571	16,857	0,298	2%
Dentro de pobl.	75	851,405	11,352	11,352	69%
Total	79	960,208		16,463	100%

<i>Butia paraguayensis</i> vs <i>Syagrus romanzoffiana</i>					
Fuente	g.l.	SC	CM	Var. est.	%
Entre especies	1	53,385	53,385	5,333	33%
Dentro de pobl.	23	246,663	10,724	10,724	67%
Total	24	300,049		16,057	100%

<i>Butia yatay</i> vs <i>Syagrus romanzoffiana</i>					
Fuente	g.l.	SC	CM	Var. est.	%
Entre especies	1	45,856	45,856	2,911	20%
Entre poblaciones	2	78,120	39,060	1,391	10%
Dentro de pobl.	63	650,991	10,333	10,333	71%
Total	66	774,967		14,635	100%

Además en este estudio sólo se incluyeron individuos adultos, que pueden estar reflejando una situación de variabilidad anterior a la acción antrópica, ya que son individuos muy longevos, que han sobrevivido dichas alteraciones antrópicas. Son las cohortes posteriores (semillas y plántulas) las que se ven más afectadas por la fragmentación de las poblaciones y la pérdida de hábitats. Dado que las alteraciones antrópicas sufridas por estas poblaciones son relativamente recientes, las palmas adultas pueden no haber tenido tiempo suficiente para responder a la fragmentación (en el caso de *B. paraguayensis* y *B. lallemantii*) reteniendo altos niveles de variabilidad genética. Esta demora en expresar los efectos de la fragmentación en palmas depende de la esperanza de vida de las especies y de su sensibilidad a las alteraciones (Scariot 1999).

En definitiva, el tiempo transcurrido desde el comienzo de la alteración antrópica es corto comparado con los tiempos generacionales y la esperanza de vida de estas especies (Feyissa *et al.* 2007). Los altos niveles de variabilidad genética intrapoblacional encontrados en este trabajo, junto con la baja diferenciación interpoblacional están acuerdo con lo establecido por Hamrick y Godt (1996) en su revisión de niveles de variabilidad en Angiospermas según sus historias de vida. Las especies de fecundación cruzada tienen niveles de diversidad entre poblaciones significativamente menores y mayores valores de variabilidad global. Además las plantas leñosas tienen menor diferenciación entre poblaciones, debido a su alta estatura y las bajas densidades poblacionales que presentan, lo que aumenta las distancias de dispersión de polen y semillas, posibilitando mayores niveles de flujo génico. Los valores de índices de diferenciación encontrados en el presente estudio se hallan en los rangos presentados por Hamrick y Godt (1996) para especies monocotiledóneas autógamas, perennes de vida larga y con dispersión de semilla por gravedad o por animales (entre 0.097 y 0.223). En cambio los niveles de polimorfismo hallados para las especies de *Butia* en este estudio son muy superiores a los rangos establecidos (50 a 65%) en dicho trabajo. Posiblemente se deba al hecho que la revisión realizada por esos autores fue basada en análisis con isoenzimas, marcadores no tan sensibles para detectar variabilidad como los marcadores ISSR (Zietkiewicz *et al.* 1994). Existen muchos casos de especies arbóreas de vida larga que presentan altos niveles de diversidad genética, incluso luego de sufrir fragmentaciones y alteraciones en sus ambientes (González-Astorga y Castillo-Campos 2004, Lowe *et al.* 2005, Feyissa *et al.* 2007, Cabrera-Toledo *et al.* 2008). Las poblaciones pueden presentar una respuesta adaptativa por aumento en su diversidad genética ante cambios bruscos en sus ambientes, sin la cual se extinguirían. Para ello es necesario que se trate de poblaciones de gran tamaño y/o que la alteración

afecte moderadamente su adaptación al ambiente (Gomulkiewicz y Holt 1995, Orr y Unckless 2008).

Con el objetivo de agrupar las distintas poblaciones y especies en estudio se realizó un análisis de conglomerados basado en los resultados de los marcadores ISSR. Para ello se tuvo que excluir algunos marcadores y algunos individuos por tener demasiados datos faltantes (falla en la amplificación o corrida con alguno de los cebadores), utilizando un total de 12 individuos por población y 61 marcadores. A partir de este análisis de conglomerados se construyó un dendrograma que se presenta en la Figura 21, mediante el algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average*) y usando la distancia de Jaccard (Jaccard 1908).

En este dendrograma *Syagrus romanzoffiana* muestra una clara separación de las especies del género *Butia*, actuando como grupo externo y enraizando el dendrograma. Esta separación se ha observado anteriormente no sólo a nivel de variabilidad genética detectada por marcadores ISSR (Rossato et al. 2007), sino también a través de marcadores quimiotaxonómicos como las fracciones de hidrocarburos presentes en las ceras de la superficie de las hojas (Paroul et al. 2009). En el análisis filogenético más reciente de la subfamilia Attaleinae se observó que la separación entre estos dos géneros es clara (Meerow et al. 2009). La siguiente separación clara que se observa es la de un grupo que contiene únicamente muestras de *Butia yatay*, ramificándose muy próximo a la raíz del dendrograma. Dentro de este grupo se observa un subgrupo más compacto, correspondiente a la población CC, la cual presentó en el análisis de varianza molecular la mayor diferenciación con el resto. En el presente análisis *B. yatay* se estaría presentando como una entidad cohesiva, bien conformada y homogénea. Luego se distinguen dos grupos paralelos, uno de ellos con mayor número de muestras, que contiene dos subgrupos

hermanos, uno menor con individuos de *B. yatay* y otro más heterogéneo, conteniendo mayoritariamente individuos de *B. paraguayensis* intercalados con muestras de *B. lallemantii* y *B. yatay* de todas las poblaciones. Esto se corresponde con los bajos índices de diferenciación registrados entre estas dos especies y *B. paraguayensis* y esta similitud genética puede estar sugiriendo la existencia de intercambio génico, que podría haberse dado en la evolución de estas especies o puede seguir ocurriendo en el presente, especialmente entre *B. paraguayensis* y *B. lallemantii*, especies que presentaron los menores niveles de diferenciación interespecífica y tienen una distribución geográfica muy próxima en Uruguay (podría considerarse simpátrica), siendo claramente simpátrica en Rio Grande do Sul, en poblaciones como las de Sao Francisco de Asis y Miguel de Viana (Rossato com. pers.⁹).

La existencia de especies con áreas de distribución compartida es común en palmas, por ejemplo en géneros como *Geonoma*, *Bactris* y *Chamaedorea*, pero son especies con mecanismos de aislamiento reproductivo por diferencias fenológicas y en polinizadores (Svenning 2001, Roncal et al. 2007). En el caso de las especies incluidas en el presente estudio, las barreras que impiden intercambio de genes, de existir, parecen ser relativamente recientes, ya que los resultados de este trabajo podrían estar evidenciando instancias de hibridación en el pasado reciente. Este fenómeno es común en palmas (Uhl y Dransfield 1987), especialmente en las especies del género *Butia* que presentan gran propensión a generar híbridos naturales y artificiales con *Syagrus* (*XButyagrus nabonnandii*, (Prosch.) Vöster; *Butia lallemantii* x *Syagrus romanzoffiana*, Brussa y Grela 2007) y con otras especies de la subtribu Attaleinae (Wilcox y Wilcox 1990). Sin embargo, no hay registros de hibridación entre especies de *Butia*. Además, todos los casos de híbridos intergenéricos conocidos hasta ahora presentan esterilidad en distintos grados (Uhl y

⁹ Marcelo Rossato 2009

Dransfield 1987), con lo cual este intercambio genético no sería efectivizado en la población. Las barreras reproductivas entre *B. yatay* y *B. paraguayensis* podrían nunca haber existido por no ser necesarias al encontrarse alejadas geográficamente, tal como ocurre con una especie rara de Australia, *Ptycosperma bleeserii* (Arecaceae), la cual sufre de erosión de su acervo genético por introgresión de especies emparentadas normalmente alejadas geográficamente, cuando éstas son cultivadas en las cercanías de sus poblaciones naturales (Shapcott 1998). Sin embargo, esto se aplicaría en nuestras especies a su distribución en Uruguay, ya que a nivel regional comparten áreas de ocurrencia (Marcato 2004).

Muy posiblemente estas tres especies compartan genes provenientes de un ancestro común muy cercano, es preciso realizar estudios filogenéticos que esclarezcan la relaciones entre ellas, usando herramientas de mayor precisión para la detección de variabilidad genética, tales como las secuencias de regiones nucleares y cloroplásticas, aunque es posible que estas herramientas no sean suficientes para resolver dichas relaciones.

El hecho de que *Butia paraguayensis* no presente un grupo exclusivo también puede deberse a los altos niveles de variabilidad intrapoblacional registrados e incluso a el hecho de sólo contar con una población en el territorio de Uruguay, incluida en el estudio. El otro grupo separado en el dendrograma está formado principalmente por muestras de *B. lallemantii*, con unos pocos individuos de *B. paraguayensis* y *B. yatay* mezclados. Posiblemente se deba a la proximidad genética anteriormente descrita, pero también a los altos niveles de variabilidad intrapoblacional hallados para esta especie. Se puede observar que las poblaciones no se agrupan claramente dentro de este grupo, lo que se corresponde también con la alta variabilidad intrapoblacional y además con los bajos niveles de variabilidad interpoblacional registrados. Aunque la

comparación con el estudio de Roncal *et al.* (2007) sea complicada debido a tratarse de una especie diferente y de distintos niveles taxonómicos, en dicho trabajo tampoco se logró una agrupación clara de los individuos de cada variedad en el dendrograma. Sin embargo en ese caso no se explica por altos niveles de variabilidad, a pesar que el 100 % de la variabilidad registrada fue intrapoblacional, sino por la influencia de la localidad en el agrupamiento. Datos de un estudio sobre morfología y viabilidad polínica aún en progreso para poblaciones uruguayas indican que en *B. paraguayensis* existe un dimorfismo polínico no hallado en *Butia lallemantii*, con quien comparte sólo una de las dos formas de grano de polen (Mourelle *et al.*, datos no publicados). Esta sería otra característica morfológica distintiva entre estas dos especies y además podría tratarse de un mecanismo de aislamiento reproductivo incipiente. Un hallazgo reciente, interesante y que amerita mayor estudio es que no se han encontrado granos de polen de *Butia paraguayensis* en el suelo superficial del Cerro del Miriñaque, lo que indicaría que el polen viaja mayores distancias que la superficie del cerro chato, o quizá porque polinizadores estarían capturando muy eficientemente la gran mayoría del polen emitido (Mourelle com. pers.¹⁰).

Se pueden entonces plantear tres posibles explicaciones para los resultados encontrados en este trabajo. En primer lugar, como fue planteado anteriormente, la existencia de hibridación en el pasado reciente entre estas poblaciones y especies. Por otra parte, como también se discutió, la retención de polimorfismo ancestral proveniente de un ancestro común relativamente reciente (menos de 10 MA, Meerow *et al.* 2009). Por ultimo, no se puede descartar que lo que se esté evidenciando sea la consecuencia de una homoplasia de caracteres debida a que los marcadores utilizados no tienen especificidad de secuencia, con lo cual se puede considerar como un mismo marcador bandas de igual longitud pero sin homología de secuencia.

¹⁰ Dominique Mourelle 2009

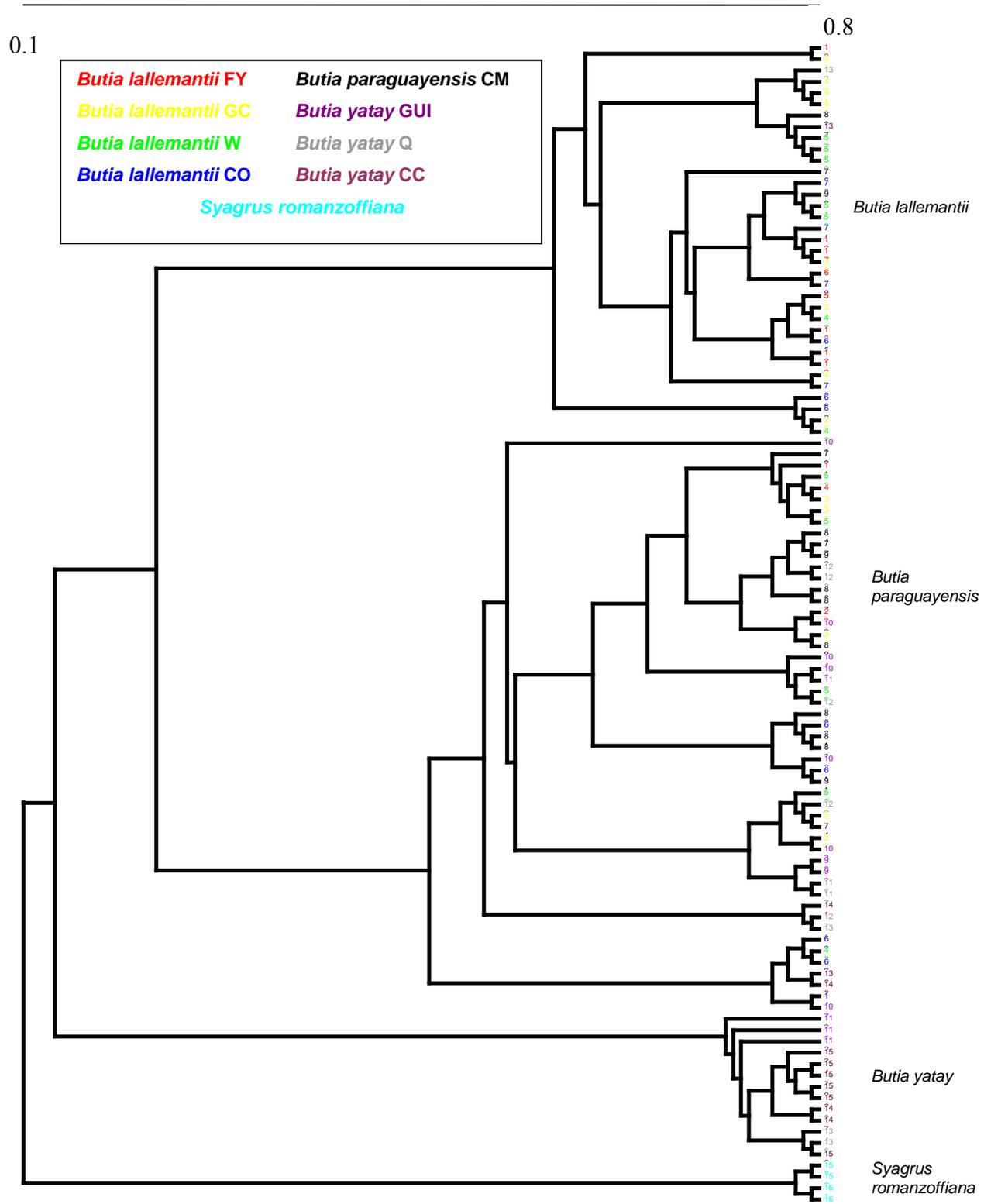


Figura 21. Dendrograma obtenido a partir del análisis de conglomerados basado en el coeficiente de Jaccard y realizado por el algoritmo de agrupamiento UPGMA. Los individuos fueron identificados con su correspondiente número y con el color de la población a la que pertenecen.

Para corroborar los resultados del dendrograma se realizó un análisis de coordenadas principales (Figura 22). Se consideraron las tres primeras coordenadas a la hora de graficar, estando el 30% de la variabilidad explicada por la primera coordenada, el 18% explicado por la segunda y el 16% por la tercera, con un porcentaje acumulado de 64%. Los individuos de *Syagrus romanzoffiana* se separan del resto, lo que coincide con lo hallado por Rossato *et al.* (2007), pero para las especies de *Butia* no se logró por este análisis evidenciar claras separaciones, aunque se registraron algunas tendencias. Las muestras de *Butia yatay* tienden a separarse del resto, aunque unos pocos individuos aparecen mezclados. Dentro del grupo de *B. yatay*, los individuos de la población CC forman una nube un poco más compacta, tal como se había observado en el dendrograma. Los individuos de *B. paraguayensis* y *B. lallemantii* no forman grupos separados. La primera especie se muestra intermedia entre *B. yatay* y *B. lallemantii*. Los individuos de *B. lallemantii* presentan una gran dispersión, que se corresponde con la alta variabilidad intrapoblacional encontrada. Al igual que en el dendrograma, no se observan grupos de individuos correspondientes a cada una de las poblaciones dentro de esta especie. En general esta especie tiene menor tendencia a superponerse con el grupo de *B. yatay*. Los resultados obtenidos por Rossato *et al.* (2007) para las especies de *Butia* son similares, ya que sólo las poblaciones de una especie (*Butia eriospatha*) se agrupan claramente tanto en el dendrograma como en el análisis de componentes principales. Marcato (2004) tampoco logró resolver las relaciones entre las especies dentro del género *Butia* por medio de datos morfológicos y moleculares (secuencias de ADNcp). En la filogenia de la tribu Cocoseae planteada por Meerow *et al.* (2009) el género *Butia* no presenta resolución interna, siendo muy reciente (10 ma) la divergencia entre las especies de *Butia*.

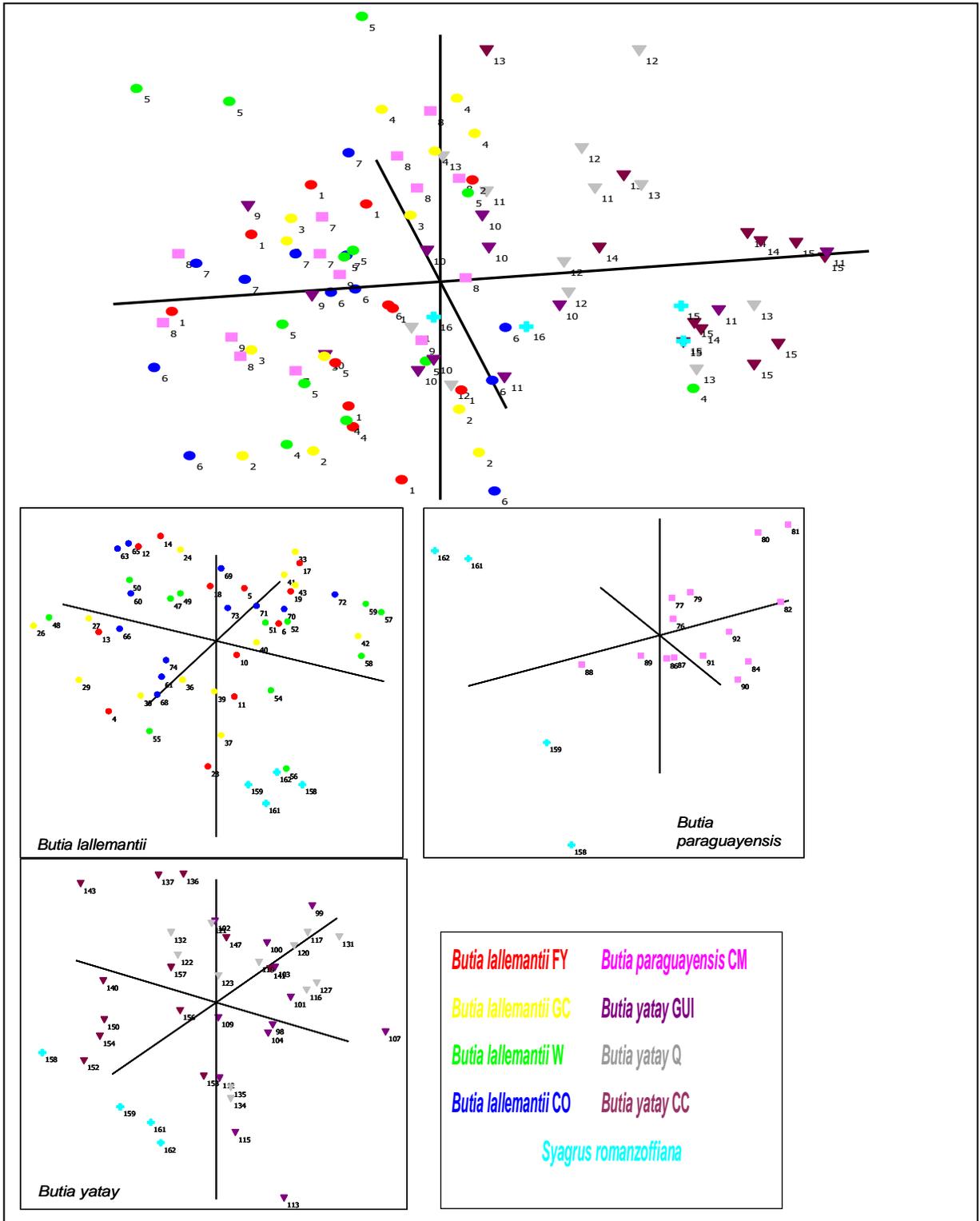


Figura 22. Análisis de coordenadas principales para todas las especies estudiadas en conjunto y para cada especie por separado comparada con *Syagrus romanzoffiana*. Cada individuo fue identificado con su correspondiente número y con el color de la población a la que pertenece.

No fue posible en el presente análisis de coordenadas principales general separar las poblaciones dentro de cada especie, por lo cual se realizó para cada especie, pero de todos modos no fue suficiente para obtener grupos claros por población. Todos los resultados anteriores (alta variabilidad intrapoblacional, baja diferenciación interpoblacional, dificultad para obtener agrupamientos claros para las poblaciones) a nivel genético, coinciden con la alta variabilidad encontrada a nivel morfológico en las poblaciones de estas especies. Rossato (2007) describe altos niveles de variabilidad fenotípica en términos de características morfológicas, potencial productivo y reproductivo y composición química del endocarpo en poblaciones de *Butia yatay*, *B. paraguayensis* (ahora *B. lallemantii*) y otras especies del género *Butia* de Rio Grande do Sul. Para poblaciones uruguayas de *Butia capitata* se han realizado descripciones similares, hallando también alta variabilidad fenotípica a nivel morfológico y de potencial productivo y reproductivo (Rivas y Barilani, 2004). Aún no existen estudios de este tipo para poblaciones de *Butia lallemantii*, *B. paraguayensis* o *B. yatay*, los cuales serían de sumo interés para observar si existen correlaciones entre la variabilidad fenotípica y la variabilidad genética neutra detectada con marcadores y comprobar si se registran adaptaciones locales, las cuales son de gran importancia a la hora de determinar áreas a ser protegidas (Leinonen *et al.* 2008).

Observando el dendrograma obtenido a partir del análisis de conglomerados y el análisis de coordenadas principales, se puede afirmar que los cinco cebadores seleccionados presentan moderada capacidad de discriminar entre las especies. Considerando esto, junto con la cantidad de cebadores de ISSR-PCR utilizados en estudios en otras especies de palmas (Roncal *et al.* 2007), otras monocotiledóneas (*Eragrostis tef* en Assefa *et al.* 2003, *Lolium perenne* en Ghariani *et al.* 2003, *Allium* spp. en Smolik *et al.* 2007), en dicotiledóneas (*Anacardium occidentale* en Archak *et al.* 2003,

Brassica spp. y *Arabidopsis thaliana* en Bernet y Branchard 2004, *Cunila* spp. en Agostini *et al*, 2008) e incluso en gimnospermas (*Cycas guizhouensis* en Xiao *et al.* 2004) sería conveniente utilizar un mayor número de cebadores en estudios futuros. De todos modos, tal como afirma Marcato (2004), la resolución de las relaciones entre las especies del género *Butia* es difícil, incluso utilizando gran variedad de datos morfológicos y moleculares.

Los resultados obtenidos en este trabajo tienen implicaciones en la conservación de las especies incluidas. En el caso de *Butia yatay*, el tamaño efectivo de los palmares presentes en Uruguay parecería estar garantizando el mantenimiento de niveles de variabilidad genética altos, por lo menos a nivel de adultos. Al no conocerse los niveles de flujo génico ni las distancias de dispersión de polen y semillas en estas especies, no se puede dejar de lado que las poblaciones de *B. yatay* o las pequeñas poblaciones de *B. lallemantii* pudieran estar actuando como una red de poblaciones o metapoblación, o incluso, junto con *B. paraguayensis*, recibiendo flujo génico de poblaciones más extensas y continuas en Rio Grande do Sul, manteniendo así el acervo genético de las especies (ver mapa en figura 2).

Finalmente no se puede descartar que estas poblaciones, especialmente las de *Butia lallemantii* y *Butia paraguayensis* según sugieren Brussa y Grela (2007), sean relictos ubicados en el límite sur de distribución de poblaciones más extensas, continuas con aquellas de Rio Grande do Sul y Paraguay o con las de Rio Grande do Sul y Argentina en el caso de *Butia yatay*, lo que podría estar explicando el mantenimiento de altos niveles de variabilidad genética ancestral, presentes en este continuo que fue interrumpido recientemente por acciones antrópicas. Se supone que esto es lo sucedido con *Butia capitata*, cuyas poblaciones eran un continuo de las ahora halladas en Rocha en Uruguay con las de Santa Vitoria do Palmar, Quaraí y Herval do Sul en Brasil, el

cual fue interrumpido por la tala de individuos para sustituirlos por plantaciones de arroz (Rossato y Barbieri 2007). Estas cuestiones podrían resolverse de realizarse un estudio filogeográfico para estas especies a lo largo de toda su distribución.

Dada la gran diversidad genética dentro de las poblaciones en estudio, se puede afirmar que tienen gran potencial para la implementación de medidas de conservación y sobre todo manejo sustentable, garantizando el reclutamiento en las poblaciones de *Butia yatay*, *B. paraguayensis* y *B. lallemantii*, y recuperando el número de individuos en las poblaciones de estas dos últimas especies. Estas medidas deben ser tomadas a la brevedad, dado que los resultados de este trabajo están mostrando la conservación de la variabilidad genética que poseían estas poblaciones antes de las alteraciones en sus ambientes, pero no se puede garantizar el mantenimiento de estos niveles de variabilidad en futuras generaciones. Para la urgente implementación de estas medidas se hace necesaria una definición inequívoca del estatus taxonómico de cada una de las entidades incluidas en este estudio, para lo cual deberán utilizarse herramientas moleculares como ser la secuenciación de regiones cloroplásticas y nucleares, que aporten mayor información en cuanto a las relaciones entre estas especies.

4. CONCLUSIONES

- Existe una gran uniformidad en la organización genómica estructural dentro del género *Butia*, tanto en la distribución y contenido de heterocromatina, como en el número y localización de los sitios de ADNr 45S. Esto surge del análisis realizado en *Butia capitata*, *B. yatay*, *B. paraguayensis* y *B. lallemantii*. Estas características serían distintivas para el género, y permiten identificar las especies de *Butia* de las de *Syagrus*, representado por *S. romanzoffiana* y a la vez diferencian claramente a dichos géneros de *Trithrinax*, representado en este estudio por *T. campestris*.
- El análisis del contenido de ADN nuclear 2C es también una característica que permite discriminar los tres géneros *Butia*, *Syagrus* y *Trithrinax*.
- En *B. yatay*, *B. paraguayensis* y *B. lallemantii* se evidencia una alta variabilidad genética intrapoblacional y una comparativamente baja variabilidad interpoblacional e interespecífica, arrojadas por el análisis de marcadores moleculares ISSR. Esto sugiere que poseen gran potencial genético de recuperación, si se toman urgentes medidas de conservación para reestablecer su reclutamiento y asegurar su integridad demográfica.
- Las distancias genéticas entre las poblaciones y especies estimadas a partir de marcadores ISSR no permiten concluir inequívocamente acerca de la identidad taxonómica de *B. paraguayensis* con respecto de *B. lallemantii* y de *B. yatay*, si bien esta última se presenta como una entidad mejor definida. Es necesario ampliar el estudio a un mayor número de cebadores de ISSR o utilizar marcadores moleculares que permitan evidenciar mayores niveles de variabilidad entre estas especies para obtener resultados concluyentes en este sentido.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, S.P.; Leitch, I.J.; Bennett, M.D.; Chase, M.W.; Leitch, A.R. 2000. Ribosomal DNA evolution and phylogeny in *Aloe* (Asphodelaceae). *American Journal of Botany*. 87(11): 1578-1583.
- Agostini, G.; Echeverrigaray, S.; Souza-Chies, T.T. 2008. Genetic relationships among South American species of *Cunila* D. Royen ex L. based on ISSR. *Plant Systematics and Evolution*. 274(3-4): 135-141.
- Ansari, H.A.; Ellison, N.W.; Reader, S.M.; Badaeva, E.D.; Friebe, B.; Miller, T.E.; Williams, W.M. 1999. Molecular Cytogenetic Organization of 5S and 18S-26S rDNA Loci in White Clover (*Trifolium repens* L.) and Related Species. *Annals of Botany*. 83(3): 199-206.
- Archak, S.; Gaikwad, A.B.; Gautam, D.; Rao, E.V.V.B; Swamy, K.R.M; Karihaloo, J.L. 2003. Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India. *Genome*. 46(3): 362-369.
- Asmussen, C.B.; Dransfield, J.; Deickmann, V.; Barfod, A.S.; Pintaud, J.C.; Baker, W.J. 2006. A new subfamily classification of the palm family (Arecaceae): evidence from plastid DNA phylogeny. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 151(1): 15-38.
- Assefa, K.; Merker, A.; Tefera, H. 2003. Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of genetic diversity in tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]. *Hereditas*. 139(3): 174-183.
- Baker, W.J.; Asmussen, C.B.; Barrow, S.; Dransfield, J.; Hedderson, T.A. 1999. A phylogenetic study of the palm family based on chloroplast DNA

- sequences from the *trnL-trnF* region. *Plant Systematics and Evolution*. 219(1-2): 111-126.
- Beccari, O. 1916. 11 genere *Cocos* Linn, e le palme affini. *L'Agricoltura Coloniale*. 10: 489-524.
- Bennett, M.D.; Leitch, I.J. 2005. Plant genome size research: A field in focus. *Annals of Botany*. 95(1): 1-6.
- Bennetzen, J.L.; Ma, J.; Devos, K.M. 2005. Mechanisms of Recent Genome Size Variation in Flowering Plants. *Annals of Botany*. 95(1): 127-132.
- Besendorfer, V.; Samardzija, M.; Zoldoš, V.; Šolic', M.E.; Papeš, D. 2002. Chromosomal organization of ribosomal genes and NOR-associated heterochromatin, and NOR activity in some populations of *Allium commutatum* Guss. (Alliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 139(1): 99-108.
- Bharathan, G.; Lambert, G.; Galbraith, D.W. 1994. Nuclear DNA content of monocotyledons and related taxa. *American Journal of Botany*. 81(3): 381-386.
- Bornet, B.; Branchard, M. 2004. Use of ISSR fingerprints to detect microsatellites and genetic diversity in several related *Brassica* taxa and *Arabidopsis thaliana*. *Hereditas*. 140(3): 245-248.
- Brussa, C.A.; Grela, I.A. 2007. *Flora Arbórea del Uruguay; Con énfasis en las especies de Rivera y Tacuarembó*. 1ª. imp. Uruguay, COFUSA. 544 p.
- Cabral, J.S.; Felix, L.P.; Guerra, M. 2006. Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Genetics and Molecular Biology*. 29(4): 659-664.
- Cabrera-Toledo, D.; González-Astorga, J.; Vovides, A.P. 2008. Heterozygote excess in ancient populations of the critically endangered *Dioon caputoi* (Zamiaceae, Cycadales) from central Mexico. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 158(3): 436-447.

- Caperta, A.D.; Neves, N.; Morais-Cecílio, L.; Malhó, R.; Viegas, W. 2002. Genome restructuring in rye affects the expression, organization and disposition of homologous rDNA loci. *Journal of Cell Science*. 115(14): 2839-2846.
- Cardoso, L. 1996. El palmar, la palma y el butiá. PROBIDES (Programa de Conservación de la Biodiversidad y Desarrollo Sustentable en los Humedales del Este). Fichas didácticas nº. 4. 23 p.
- Cardoso, S.R.S.; Eloy, N.B.; Provan, J.; Cardoso, M.A.; Ferreira, P.C.G. 2000. Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. Populations estimated by AFLP analysis. *Molecular Ecology*. 9(11): 1753-1760.
- Castilho, A.; Vershinin, A.; Heslop-Harrison, J.S. 2000. Repetitive DNA and the chromosomes in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*). *Annals of Botany*. 85(6): 837-844.
- Castilho, A.; Heslop-Harrison, J.S. 1995. Physical mapping of 5S and 18S–25S rDNA and repetitive DNA sequences in *Aegilops umbellulata*. *Genome*. 38(1): 91-96.
- Chase, M.W.; De Bruijn, A.Y.; Reeves, G.; Cox, A.V.; Rudall, P.J.; Johnson, M.A.T.; Eguiarte, L.E. 2000. Phylogenetics of Asphodelaceae (Asparagales): an analysis of plastid *rbcL* and *trnL-F* DNA sequences. *Annals of Botany*. 86(5): 938-956.
- Chebataroff, J. 1974. Palmeras del Uruguay. Facultad de Humanidades y Ciencias. Uruguay. Universidad de la República. 31 p.
- Chung, M.Y.; Nason, J.D.; Chung, M.G. 2005. Patterns of hybridization and population genetic structure in the terrestrial orchids *Liparis kumokiri* and *Liparis makinoana* (Orchidaceae) in sympatric populations. *Molecular Ecology*. 14(14): 4389-4402.
- Ci, X.; Chen, J.; Li, Q.; Li, J. 2008. AFLP and ISSR analysis reveals high genetic variation and inter-population differentiation in fragmented

- populations of the endangered *Litsea szemaois* (Lauraceae) from Southwest China. *Plant Systematics and Evolution*. 273(3-4): 237-246.
- Cocucci, A.E. 1964. Sobre la embriología de *Butia paraguayensis* (Barb. Rodr.) Bailey (Palmae). Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. *Revista de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. Año XXV, nº. 1-2. pp 15-29.
- Corrêa, L.B.; Barbieri, R.L.; Rossato, M.; Büttow, M.V.; Heiden, G. 2009. Caracterização citológica de palmeiras do gênero *Butia* (Arecaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura*. 31(4): 1111-1116.
- Cremonini, R.; Colonna, N.; Stefani, A.; Galasso, I.; Pignone, D. 1994. Nuclear DNA content, chromatin organization and chromosome banding in brown and yellow seeds of *Dasypyrum villosum* (L.) Candargy. *Heredity*. 72(4): 365-373.
- Daghlian, C.P. 1981. A review of the fossil record of monocotyledons. *The Botanical Review*. 47(4): 517-555.
- Dahlgren, R.M.T.; Clifford, H.T.; Yeo, P.S.; Jakobsen, K. 1985. Superorder Areciflorae. In: Dahlgren, R.M.T.; Clifford, H.T.; Yeo, P.S. ed. *The families of monocotyledons: Structure, evolution and taxonomy*. Berlin- Heidelberg, Germany. Springer-Verlag. pp. 467-479.
- de Carvalho, R.A.; Dias, A.L. 2007. Interindividual Size Heteromorphism of NOR and Chromosomal Location of 5S rRNA Genes in *Iheringichthys labrosus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 50(1): 141-146.
- de Melo, N.F.; Guerra, M. 2003. Variability of the 5S and 45S sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. *Annals of Botany*. 92(2): 309-316.
- Deble, L.P.; Marchiori, J.N.C. 2006. *Butia lallemantii*, uma nova Arecaceae do Brasil. *Balduinia*. 9:1-3.
- Doležel, J.; Bartoš, J.; Voglmayr, H. ; Greiher, J. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry*. 51(2): 127-128.

- Doležel, J.; Greilhuber, J.; Lucretti, S.; Meister, A.; Lysák, M.A.; Nardi, L.; Obermayer, R. 1998. Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. *Annals of Botany*. 82(Supplement A):17-26.
- Doležel, J.; Gödhe, W. 1995. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry*. 19(2): 103-106.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19: 11-15.
- Dransfield, J.; Uhl, N.W.; Asmussen, C.B.; Baker, W.J.; Harley, M.M.; Lewis, C.E. 2008. *Genera palmarum: the evolution and classification of palms*. 1^a. ed. Kew, England. Kew Publishing. 744 p.
- Dransfield, J.; Uhl, N.W.; Asmussen, C.B.; Baker, W.J.; Harley, M.M.; Lewis, C.E. 2005. A New Phylogenetic Classification of the Palm Family, *Arecaceae*. *Kew Bull.* 60(4): 559-569.
- Dransfield, J.; Uhl, N.W. 1998. *Palmae*. In: Kubitzki, K.; Huber, H; Ruddal, P.J.; Stevens, P.S.; Stutzel, T. ed. *The families and genera of vascular plants*. Vol. 4. Flowering plants. Monocotyledons: Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae). Berlin- Heidelberg, Germany. Springer-Verlag. pp. 306-388.
- Ehrendorfer, F. 1964. *Cytologie, Taxonomie und Evolution bei Samenpflanzen*. *Vistas in Botany*. 4: 99-186.
- Excoffier, L. Smouse, P.E.; Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131(2): 479-491.
- Feyissa, T.; Nybom, H.; Bartish, I.V.; Welander, M. 2007. Analysis of genetic diversity in the endangered tropical tree species *Hagenia abyssinica* using ISSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 54(5): 947-958.
- Gaiero, P. 2005. *Caracterización citogenética de cuatro especies de palmas (Fam. Arececeae) nativas de Uruguay*. Trabajo final Licenciado en

- Biología. Montevideo. Uruguay. Facultad de Ciencias, Universidad de la República. 97 p.
- Ghariani, S.; Trifi-Farah, N.; Chakroun, M.; Marghali, S.; Marrakchi, M. 2003. Genetic diversity in Tunisian perennial ryegrass revealed by ISSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 50(8): 809-815.
- Glassman, S.F. 1979. Re-evaluation of the genus *Butia* with a description of a new species. *Principes*. 23(2): 65-70.
- Gomulkiewicz, R.; Holt, R.D. 1995. When does evolution by natural selection prevent extinction?. *Evolution*. 49(1): 201-207.
- González-Astorga, J.; Castillo-Campos, G. 2004. Genetic variability of the narrow endemic tree *Antirhea aromatica* Castillo-Campos & Lorence, (Rubiaceae, Guettardeae) in a tropical forest of Mexico. *Annals of Botany*. 93(5): 521-528.
- González-Guzmán, M.; Medina-Herranz, M.A.; Medina-Herranz, M.; Palomares-Hernández, G. 2006. Identificación y selección de marcadores moleculares Inter-microsatélite (ISSR) para la diferenciación varietal en *Capsicum annuum* L. In: Congreso de Mejora Genética en plantas (3º., 2006, Valencia, España). Resúmenes Solanáceas nº. 30.
- Ghosh, S. 1976. The nucleolar structure. *International Review in Cytology*. 44: 1-28.
- Guerra, M. 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic and Genome Research*. 120(3-4): 339-350.
- Guerra, M. 2004. FISH. Conceitos e Aplicações na Citogenética. 1ª imp. Brasil. Sociedade Brasileira de Genética. 184 p.
- Guerra, M. 2000. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and Molecular Biology*. 23(4): 1029-1041.
- Guerra, M.; Pedrosa, A.; Barros e Silva, A.E.; Cornélio, M.T.M.; Santos, K.; Soares Filho, W. dos S. 1997. Chromosome number and secondary

- constriction variation in 51 accessions of a *Citrus* germplasm bank. Brazilian Journal of Genetics. 20(3): 489-496.
- Guerra, M. 1987. Cytogenetics of *Rutaceae* IV. Structure and systematic significance of interphase nuclei. Cytologia. 52(2): 213-222.
- Hahn, W.J. 2002. A molecular phylogenetic study of the Palmae (Arecaceae) based on *atpB*, *rbcL*, and 18S nrDNA sequences. Systematics Biology. 51(1): 92-112.
- Hahn, W.J.; Kress, W.J.; Zimmer, E.A. 1995. Molecular sequence evolution of the Palmae - A study in deep branch phylogenetics. American Journal of Botany. 82 (6 - Supplement): 133.
- Hajdera, I.; Siwinska, D.; Hasterok, R.; Maluszynska, J. 2003. Molecular cytogenetic analysis of genome structure in *Lupinus angustifolius* and *Lupinus cosentinii*. Theoretical and Applied Genetics. 107(6): 988-996.
- Hall, K.J.; Parker, J.S. 1995. Stable chromosome fission associated with rDNA mobility. Chromosome Research. 3(7): 417-422.
- Hamrick, J.L.; Godt, M.J.W. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. Transactions of the Royal Society of London B. 351: 1291-1298.
- Hasterok, R.; Maluszynska, J. 2000. Cytogenetic analysis of diploid *Brassica* species. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica. 42(1): 145-154.
- Heslop-Harrison, J.S. 2000. Comparative genome organization in Plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. The Plant Cell. 12: 617-635.
- Hizume, M.; Sato, S.; Tanaka, A. 1980. A highly reproducible method of nucleolus organizer regions staining in plants. Stain Technology. 55: 87-90.
- Hoshi, Y.; Plader, W.; Malepszy, S. 1999. Physical mapping of 45S rRNA gene loci in the cucumber (*Cucumis sativus* L.) using fluorescence *in situ* hybridization. Caryologia. 52: 49-57.

- Hunter, P.R.; Gaston, M.A. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*. 26: 2465-2466.
- Iob, G.; Rossato, M; Barbieri, R.L. 2005. Caracterização molecular de populações de *Syagrus romanzoffiana* no Rio Grande do Sul/Brasil. In: Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe (5º., 2005, Montevideo, Uruguay). Resúmenes. Montevideo, Uruguay. Gega s.r.l. 63 p.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société vaudoise de sciences naturelles*. 44: 223-270.
- Jaurena, M.; Rivas, M. 2005. La pradera natural del palmar de *Butia capitata* (Arecaceae) de Castillos (Rocha): Evolución con distintas alternativas de pastoreo. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Uruguay. Serie técnica nº. 151. pp. 15-20.
- Jiang, J.; Gill, B.S. 1994. Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first 10 years. *Genome*. 37(5): 717-725.
- Jones, D.L. 1995. Palms throughout the world. 1ª ed. Washington, DC, USA. Smithsonian Institution Press pp. 10-19.
- Jourdan, C.; Rey, H. 1997. Architecture and development of the oil-palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) root system. *Plant Soil*. 189: 33-48.
- Kapelan Bio-Imaging. 1999-2003. Lab Image Free edition version 2.7.0.
- Karron, J.D. 1991. Patterns of genetic variation and breeding systems in rare plant species. In: Falk, D.A.; Holsinger, K.E. ed. *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford. Oxford University Press. pp. 87-97.
- Kenton, A. 1991. Heterochromatin accumulation, disposition and diversity in *Gibasis karwinskyana* (Commelinaceae). *Chromosome*. 100: 467-478.
- Leinonen, T.; O'hara, R.B.; Cano, J.M.; Merilä, J. 2008. Comparative studies of quantitative trait and neutral marker divergence: a meta-analysis. *Journal of Evolutionary Biology*. 21(1): 1-17.

- Leitch, A.W. 2000. Higher levels of organization in the interphase nucleus of cycling and differentiated cells. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 138-152.
- Leitch, I.J.; Heslop-Harrison, J.S. 1993. Physical mapping of four sites of 5S rDNA sequences and one site of the alpha-amylase-2 gene in barley (*Hordeum vulgare*). *Genome*. 36(3): 517-523.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*. 52(2): 201-220.
- Lewis, C.E.; Doyle, J.J. 2001. Phylogenetic utility of the nuclear gene malate synthase in the Palm family (Arecaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 19(3): 409-420.
- Lima-de-Faria, A. 1976. The chromosome field I. Prediction of the location of ribosomal cistrons. *Hereditas*. 83: 1-22.
- Lorenz-Lemke, A.P.; Mader, G.; Muschner, V.C.; Stehmann, J.R.; Bonato, S.L.; Salzano, F.M.; Freitas, L.B. 2006. Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): a molecular and ecological analysis. *Molecular Ecology*. 15(14): 4487-4497.
- Lowe, A.J.; Boshier, D.; Ward, M.; Bacles, C.F.E.; Navarro, C. 2005. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity*. 95(4): 255-273.
- Madon, M.; Clyde, M.M., Cheae, S.C.; Heslop-Harrison, J.S. 2001. Physical mapping of rRNA genes on *Elaeis* chromosomes. *Journal of Oil Palm Research*. 13(1): 56-63.
- Madon, M.; Clyde, M.M.; Cheae, S.C. 1998. Cytological analysis of *Elaeis guineensis* and *Elaeis oleifera* chromosomes. *Journal of Oil Palm Research*. 10(1): 68-91.

- Madon, M.; Clyde, M.M.; Cheae, S.C. 1996. Fluorescent *in situ* hybridization of rRNA probe to the *Elaeis guineensis* (tenera) chromosomes. *Elaeis*. 8(1): 29-36.
- Madon, M.; Clyde, M.M.; Cheae, S.C. 1995. Cytological analysis of *Elaeis guineensis* (tenera) chromosomes. *Elaeis*. 7(2): 122-134.
- Marcato, A.M. 2004. Revisão taxonômica do gênero *Butia* (Becc.) Becc. e filogenia da subtribo Butiinae Saakov (Palmae). Tesis Doctorado en Biología. São Paulo, Brasil. Instituto de Biociencias, Universidade de São Paulo. 147 p.
- Meerow, A.W.; Noblick, L.; Borrone, J.W.; Couvreur, T.L.P.; Mauro-Herrera, M.; Hahn, W.J.; Kuhn, D.N.; Nakamura, K.; Oleas, N.H.; Schnell, R.J. 2009. Phylogenetic Analysis of Seven WRKY Genes across the Palm Subtribe Attaleinae (Arecaceae) Identifies *Syagrus* as Sister Group of the Coconut. *PLoS ONE*. 4(10): e7353.
- Michaelson, M.J.; Price, H.J.; Ellison, J.R.; Johnston, J.S. 1991. Comparison of plant DNA contents determined by Feulgen microspectrophotometry and laser flow cytometry. *American Journal of Botany*. 78:183-188.
- Miller, O.L. 1981. The nucleolus, chromosomes, and visualization of genetic activity. *Journal of Cell Biology*. 91: 15-27.
- Moore, H.E.; Uhl, N.W. 1982. The major trends of evolution in palms. *Botanical Review*. 48(1): 1-69.
- Moore, H.E.; Uhl, N.W. 1973. The monocotyledons: their evolution and comparative biology. VI. Palms and the origin and evolution of monocotyledons. *Quarterly Reviews in Biology*. 48: 414-436.
- Moraes, A.P.; Lemos, R.R.; Brasileiro-Vidal, A.C.; dos Santos Soares Filho, W.; Guerra, M. 2007. Chromosomal markers distinguish hybrids and non-hybrid accessions of mandarin. *Cytogenetics and Genome Research*. 119: 275-281.

- Morel, M. 2006. Morfología floral y fenología de la floración de la palma *Butia capitata* (Mart.) Becc. Arececeae. Trabajo final Licenciado en Ciencias Biológicas. Montevideo. Uruguay. Facultad de Ciencias, Universidad de la República. 72 p.
- Moro, J.R.; Silva, M.A.A.; Geraldo, J.S. 1999. Methodology for karyological study of Brazilian palms. *Acta Horticulturae* (ISHS). 486: 225-228.
- Moscone, E.A.; Lambrou, M.; Ehrendorfer, F. 1996. Fluorescent chromosome banding in cultivated species of *Capsicum* (*Solanaceae*). *Plant Systematics and Evolution*. 202(1-2): 37-63.
- Nei, M.; Li, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science*. 76: 5269-5273.
- Nunes, A.M.; Bianchi, V.J.; Fachinello, J.C.; De Carvalho, A.Z.E; Cardoso, G. 2008. Caracterização Molecular de Butiazeiro por Marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 30(3): 702-707.
- Olmedo Masat, O.M.; Chatellenaz, M.L.; Fontana, J.L. 2008. Dispersión de *Butia yatay* (Arecaceae) por el Ñandú (*Rhea americana*) en el Parque Nacional Mburucuyá, Corrientes. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones científicas y tecnológicas 2008 - Ciencias Biológicas. Resumen: B-005.
- Orr, A.H.; Unckless, R.L. 2008. Population Extinction and the Genetics of Adaptation. *American Naturalist*. 172(2): 160-169.
- Paroul, N.; Cansian, R.L.; Rossato, M.; Pauletti, G.F.; Serafini, L.A.; Rota, L.; Moyna, P.; Heinzen, H. 2009. Use of Palmae wax hydrocarbon fractions as chemotaxonomical markers in *Butia* and *Syagrus*. *Brazilian Journal of Biology*. 69(2): 353-361.
- Peakall, R.; Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6(1): 288-295.

- Pedrosa, A.; Sandal, N.; Stougaard, J.; Schweizer, D.; Bachmair, A. 2002. Chromosomal Map of the Model Legume *Lotus japonicus*. *Genetics*. 161(4): 1661-1672.
- Read, R.W. 1966. New chromosome counts in the Palmae. *Principes*. 10: 55-61.
- Rieseberg, L.H. 1997. Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 28: 359-389.
- Rival, A.; Beule, T.; Barre, P.; Hamon, S.; Duval, Y.; Noirot, M. 1997. Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) tissue cultures and seed-derived plants. *Plant Cell Reproduction*. 16: 884-887.
- Rivas, M. 2005. Desafíos y alternativas para la conservación *in situ* de los palmares de *Butia capitata*. *Agrociencia*. 9(1-2): 161-168.
- Rivas, M.; Barilani, A. 2004. Diversidad, potencial productivo y reproductivo de los palmares *Butia capitata* (Mart) Becc. de Uruguay. *Agrociencia*. 8(1): 11-20.
- Rodrigues, D.P.; Vinson, C.; Ciampi, A.Y.; Farias, Y.P.; Lemes, M.R.; Astolfi-Filho, S.; Clement, C.R. 2004. Novel microsatellite markers for *Bactris gasipaes* (Palmae). *Molecular Ecology Notes*. 4(4): 575-576.
- Rodríguez-Mazzini, R.; Molina, B. 1990. El zorro de monte (*Cerdocyon thous*) como agente dispersor de semillas de palma. PROBIDES (Programa de Conservación de la Biodiversidad y Desarrollo Sustentable en los Humedales del Este). Documentos de Trabajo nº. 30. 33 pp.
- Roncal, J.; Fransico-Ortega, J.; Lewis, C.E. 2007. An evaluation of the taxonomic distinctness of two *Geonoma macrostachys* (Arecaceae) varieties based on intersimple sequence repeat (ISSR) variation. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 153(4): 381-392.
- Rosa, L.; Castellani, T.T.; Reis, A. 1998. Biología reproductiva de *Butia capitata* (Martius) Beccari var. *odorata* (Palmae) na restinga do município de

- Laguna, SC. (en línea), Revista Brasileira de Botânica 21(3). Consultado set. 2009. Disponible en http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-84041998000300007&script=sci_abstract
- Röser, M. 1999. Chromosome structures and karyotype rearrangement in palms (Palmae). In: Henderson, A; Borchsenius, F. ed. Evolution, Variation and Classification of Palms. Memories of the New York Botanical Garden. 83. New York, USA. The New York Botanical Garden Press. pp. 61-71.
- Röser, M.; Johnson, M.; Hanson, L. 1997. Nuclear DNA amounts in palms (Arecaceae). *Botanica Acta*. 110: 79-89.
- Röser, M. 1995. Trends in the karyo-evolution of palms. In: Kew Chromosome Conference (4º, 1994, Kew, England). Proceedings. Kew, England. Brandham, P.E.; Bennett, M.D. ed. pp. 249-265.
- Röser, M. 1994. Pathways of karyological differentiation in palms (Arecaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 189(1-2): 83-122.
- Rossato, M. 2007. Recursos genéticos de butiás do Rio Grande do Sul. Tesis Doctorado en Agronomía. Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Universidade Federal de Pelotas. 133 p.
- Rossato, M.; Barbieri, R.L. 2007. Estudo etnobotânico de palmeiras do Rio Grande Do Sul. *Revista Brasileira de Agroecologia*. 2(1): 997-1000.
- Rossato, M.; Barbieri, R.L.; Schafer, A.; Zacarías, J. 2007. Caracterização molecular de populações de palmeiras do gênero *Butia* do Rio Grande do Sul através de marcadores ISSR. *Magistra*. 19(4): 311-318.
- San Martín, H.; Prigioni, C.; Sappa, A.; San Martín, A. 1996. Informe preliminar sobre algunos grupos zoológicos vinculados al ciclo anual de la palma butiá *Butia capitata* (Mart.) Becc. *Acta zoologica Platense*. 1(2): 1-15.
- SAS Institute. 2002. SAS/STAT® 6.12 Software. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

- Scariot, A. 1999. Forest fragmentation effects on palm diversity in central Amazonian Journal of Ecology. 87: 66-76.
- Schlüter, P.M.; Harris, S.A. 2006. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. Molecular Ecology Notes. 6(2): 569-572.
- Schwarzacher, T.; Ambros, P.; Schweizer, D. 1980. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. Plant Systematics and Evolution. 134(3-4): 293-297.
- Seijo, J.G.; Lavia, G.I.; Fernández, A.; Krapovickas, A.; Ducasse, D.; Moscone, E.A. 2004. Physical mapping of the 5S and 18S-25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). American Journal of Botany. 91(9): 1294-1303.
- Shapcott, A. 1998. The genetics of *Ptycosperma bleeseri*, a rare palm from the Northern Territory, Australia. Biological Conservation. 85: 203-209.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science. 236(4803): 787-792.
- Smolik, M.; Rzepka-Plevneš, D.; Kowalczyk, K.; Grabiec M. 2007. Study of genetic diversity of the onion species by ISSR-PCR analysis. Acta Scientiarum Polonorum. Biotechnologia. 6(1): 13-21.
- Srebniak, M.; Rasmussen, O.; Maluszynska, J. 2002. Cytogenetic analysis of an asymmetric potato hybrid. Journal of Applied Genetics. 43:19-31.
- Svenning, J.C. 2001. On the Role of Microenvironmental Heterogeneity in the Ecology and Diversification of Neotropical Rain-Forest Palms (Arecaceae). Botanical Review. 67(1): 2-41.
- Uhl, N.W.; Dransfield, J.; Davis, J.I.; Luckow, M.A.; Hansen, K.S.; Doyle, J.J. 1995. Phylogenetic relationships among palms: cladistic analysis of morphological and chloroplast DNA restriction site variation. In: Ruddal, P.J.; Cribb, P.J.; Cutler, D.F.; Humphries, C.J. ed. Monocotyledons:

- systematics and evolution. Royal Botanical Gardens, Kew, Londres. pp. 623-661.
- Uhl, N.W.; Dransfield, J. 1987. Genera Palmarum a classification of palms based on the work of Harold E. Moore Jr. The L.H. Bailey Hortorium and the International Palm Society, Lawrence, Kansas, USA. 610 p.
- Vaio, M.; Mazzella, C.; Porro, V.; Speranza, P.; López-Carro, B.; Estramil, E.; Folle, G. 2007. Nuclear DNA content in allopolyploid species and synthetic hybrids in the grass genus *Paspalum*. *Plant Systematics and Evolution*. 265(1-2): 109-121.
- Vaio, M.; Speranza, P.; Valls, J.F.; Guerra, M.; Mazzella, C. 2005. Localization of the 5S and 45S rDNA sites and cpDNA sequence analysis in species of the Quadrifaria group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). *Annals of Botany*. 96(2): 191-200.
- Vilhar, B.; Vidic, T.; Jogan, N.; Dermastia, M. 2002. Genome size and the nucleolar number as estimators of ploidy level in *Dactylis glomerata* in the Slovenian Alps. *Plant Systematics and Evolution*. 234(1-4): 1-13.
- Wagih, M.E.; Seehy, M.A.; Badaway, O.M.; Naser, M.I. 2007. Cytogenetic and DNA cytophotometric image analysis of some promising sugarcane varieties. *Sugar Tech*. 9(1): 11-16.
- Wanzenböck, E.M.; Schöfer, C.; Schweizer, D.; Bachmair, A. 1997. Ribosomal transcription units integrated via T-DNA transformation associate with the nucleolus and do not require upstream repeat sequences for activity in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 11: 1007-1016.
- Wilcox, M.; Wilcox, E.B. 1990. Practical methods for hybridization in the *Syagrus* alliance. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 103: 385-386.
- Wright, S. 1951. The genetic structure of populations *Annals of Eugenetics*. 15: 323-354.

- Xiao, L.Q.; Ge, X.J.; Gong, X.; Hao, G.; Zheng, S.X. 2004. ISSR Variation in the Endemic and Endangered Plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae). *Annals of Botany*. 94: 133-138.
- Xifreda, C.C.; Sanso, A.M. 1996. Nueva combinación en *Butia* (Arecaceae). *Hickenia*. 43(2): 207-208.
- Zaffaroni, C. 2004. Distribución y mapeo de cinco categorías de densidades de los palmares de *Butia capitata* (Mart.) Becc. de Castillos (Rocha). Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. 60 p.
- Zietkiewicz, E.; Rafalski, A.; Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 20: 176-183.
- Zoldos, V.; Papes, D.; Cerbah, M.; Panaud, O.; Besendorfer, V.; Siljak-Yakovlev, S. 1999. Molecular-cytogenetic studies of ribosomal genes and heterochromatin reveal conserved genome organization among 11 *Quercus* species. *Theoretical and Applied Genetics*. 99: 969-977.
- Zuloaga, F.O.; Morrone, O.; Belgrano, M.J. 2009. Catálogo de las plantas vasculares del Conosur. (en línea). Buenos Aires, Instituto Darwinion. Consultado oct. 2009. Disponible en <http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/FA.asp>

6. ANEXOS

**Genetic diversity among endangered Uruguayan populations of *Butia* (Becc.) species
based on ISSR**

Gaiero P.¹, Mazzella C.¹, Agostini G.², Bertolazzi S.³, Rossato M.³

¹ Departamento de Biología Vegetal, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

² Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, RS, Brasil

³ Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brasil

¹ Universidad de la República, Departamento de Biología Vegetal

Avenida Garzón 780

PC 12900, Montevideo, Uruguay

Phone: 598 2 3543782 Fax: 598-2-3590436.

Corresponding Author: Paola Gaiero: pgaiero@fagro.edu.uy

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Botânica, Prédio 43433

PC: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

Phone: 55 51 3308-7569 Fax: 55 51 3308-7755

³ Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia.

R. Francisco Getúlio Vargas, 1130, Petrópolis

PC: 95001-970 - Caxias do Sul, RS, Brasil - POBox: 1352

Phone: 55 54 2121133 ext 2075 Fax: 55 54 2182149

Abstract: The genus *Butia* Becc. (Arecaceae) comprises 13 species distributed exclusively in South America. Four of them are distributed in Uruguay: *Butia lallemantii*, *B. paraguayensis*, *B. yatay*, and *B. capitata*. All species show serious regeneration problems which jeopardise their continuity in the near future, though *Butia lallemantii* and *B. paraguayensis* are in the most critical situation, with restricted distributions (fragmented and reduced by cattle grazing and forestation) and few individuals. The objective of this study was to assist the taxonomic resolution of the closely related species *B. paraguayensis*, *B. lallemantii* and *B. yatay*, and examine the genetic variability of their natural populations based on ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) markers, in view of long term conservation plans. Twenty individuals were sampled from four *B. lallemantii* populations, three *B. yatay* populations and the only *B. paraguayensis* population reported for Uruguay. Five representative specimens of *Syagrus romanzoffiana* were used as outgroup. Sixteen ISSR primers were tested and five were selected based on amplification profiles. Genetic distances among species determined through ISSR were not informative enough to draw conclusions on the taxonomic status of each species. Their relationship was evaluated by constructing dendrograms using UPGMA and principal coordinates analysis. Results indicate the existence of low variability among *Butia* species, and that *B. yatay* samples are more closely related than those of *B. paraguayensis* and *B. lallemantii*, which are very close species. Variability within populations was high, possibly due to past hybridization or life history traits. This variability provides great potential for recovery.

Keywords: Arecaceae; subtribe Attaleinae; genetic conservation; ISSR; palm genetic resources; low interspecific variability.

Introduction

The palm family (Arecaceae Schultz-Schultzenstein (1832) = Palmae) is one of the oldest groups present in fossil records of monocotyledons (Moore and Uhl 1982; Jones 1995). It originated in late Jurassic or early Cretacic in South America and Africa (western Gondwana), and then spread to other continents (Moore and Uhl 1982). Its current distribution is tropical to subtropical, and is less frequently recorded in temperate regions, probable relicts of milder climates (Dahlgren et al. 1985). This extremely diverse family comprises 189 genera with over 3000 species (Dransfield et al. 2005). Two of the five subfamilies in which the genus has been divided are present in Uruguay, Arecoideae, represented by genera *Butia* (Becc.) and *Syagrus*, and Coryphoideae represented by genus *Trithrinax* (Chebataroff 1974).

The neotropical genus *Butia* (tribe Cocoseae, subtribe Attaleineae) is distributed exclusively in South America, across Brazil, Paraguay, Argentina and Uruguay, which is its southernmost limit. Its distribution has been described as austral endemic by Pintaud et al. (2008). The genus has undergone adaptive radiations which explain the high number of species present in this region (Pintaud et al. 2008). Out of the 13 species included in this genus, four have natural populations in Uruguay: *Butia capitata* (Mart.) Becc., *B. yatay* (Mart.) Becc., *B. paraguayensis* (Barb. Rodr.) L. H. Bailey and *B. lallemantii* Deble and Marchiori. The latter, recently described (Deble and Marchiori 2006), has only been recorded in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, where its wide populations overlap with those of *B. paraguayensis*. The species has also been recorded

in Uruguay (Rivera), where it is restricted to small populations either on low sandstone slopes and ledges or in open fields and pine forested areas. Its natural habitats have probably been strongly affected by cattle grazing and forestation (Deble and Marchiori 2006; Brussa and Grela 2007).

Subtribe Attaleineae, with 11–12 genera, the majority of which are neotropical endemic (Dransfield et al. 2008), is regarded as interesting from the systematic standpoint due to the complexity of relationships among its species and to its unresolved taxonomy. It belongs to the monophyletic tribe Cocoseae (Hahn 2002). Only recently was a well-resolved phylogeny for Attaleineae obtained, when a phylogenetic analysis was performed using seven WRKY genes across the entire subtribe, whose monophyly is highly supported (Meerow et al. 2009). *Butia* and *Syagrus* have undergone several reevaluations, in which Uruguayan species were at times placed in the same genus (Glassman 1979). According to more recent studies on their phylogeny, these genera are not sister groups, but are closer to *Jubaea* and *Cocos*, respectively. *Butia* and *Jubaea* form a well-supported clade, diverging with the rise of central Andes, but with no further internal resolution. Species level divergences within *Butia* occurred in the last 10 MYBP. Phylogenetic analyses based on nuclear genes such as WRKY, using varied reconstruction methods (Maximum parsimony, Maximum likelihood and Bayesian) are powerful tools which allow resolution at generic level but do not resolve relationships among species, particularly those of *Butia* (Meerow et al. 2009). With respect to their taxonomy, doubts have been cast on *Butia paraguayensis*' taxonomic status, since it was

ranked as a subspecies called *Butia yatay* ssp. *paraguayensis* by Xifreda and Sanso (1996). Additionally, *Butia lallemantii* has been regarded as a stemless ecotype within *B. paraguayensis* (Marchiori 2004; Brussa and Grela 2007).

The species included in this study are exposed to severe conservation problems which are common to all native palms — aging populations, lack of recruitment — and in the cases of *B. lallemantii* and *B. paraguayensis* some more specific conservation issues, such as population depletion and fragmentation. Brussa and Grela (2007) state that *B. lallemantii* is likely to have had a continuous distribution stretching from Rio Grande do Sul to north-eastern Uruguay. The species is regarded as highly endangered, side by side with *B. paraguayensis*, which nowadays presents a single population of 175 individuals in Uruguay. In this scenario, their reduced populations, together with the larger ones belonging to *B. yatay*, should become the object of emergency studies and management practices in the short run.

Despite the various systematic uncertainties and conservation problems surrounding this genus, no studies on the population genetics of its species have been conducted in Uruguay, and regionally there is only one study on genetic diversity for species distributed in Rio Grande do Sul, Brazil: Rossato et al. (2007). Information about a species' genetic diversity is an essential tool in conservation plans. Genetic diversity parameters inferred from molecular marker analyses provide insights into divergence among populations and reductions in variability levels which may jeopardise the species

continuity in the long run, or point out genetic potential for recovery from demographic degradation and fragmentation.

When developing population genetics analyses, knowledge on the species' reproductive biology is crucial. This issue has only been addressed for *B. capitata* populations in Uruguay, but the findings can be extended to other species within the genus (Jones 1995). *B. capitata* is a monoecious and protandric species (Morel 2006), characteristics which suggest outcrossing. Although systematic studies on its mating system have not been conducted, Rivas and Barilani (2004) found high levels of phenotypic variability in its largest population, as expected for alogamous species. Pollination is likely to be entomophilous, though anemophilous pollination cannot be disregarded (Jones 1995). Seed dispersal is performed by frugivorous mammals (San Martín et al. 1996), particularly foxes, reaching a dispersal range of 0.5 to 2 km (Rodríguez-Mazzini and Molina 1990). In *B. yatay* there is evidence of seed dispersal by foxes and ñandúes (Masat et al. 2008).

Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) fingerprinting (Zietkiewicz et al. 1994) is an extremely useful tool in taxonomic comparisons and to determine intrapopulation genetic variability levels. It detects polymorphism based on the presence of microsatellites throughout the entire genome. Since these are universal dominant markers, studies can be conducted without previous knowledge of their sequence. Moreover, their patterns are species-specific, so they are useful when identifying profiles in closely related species (Zietkiewicz et al. 1994). ISSR markers have been widely used

to estimate genetic distances among species and to differentiate varieties within a species (Zietkiewicz et al. 1994; Bornet and Branchard 2004; González-Guzmán et al. 2006; Agostini et al. 2008). In palms ISSR markers have been employed to establish whether morphologically different varieties, sympatric and reproductively isolated were distinguishable, and also to calculate diversity and population divergence indexes (Roncal et al. 2007). In the genus *Butia* they have been used to characterise populations native to Rio Grande do Sul, Brazil. Levels of intra- and interpopulational polymorphism were determined for populations and interspecific distances were estimated (Rossato et al. 2007).

Considering the difficulties to define these species as specific entities, together with the serious threats to their continuity, the aim of this work was to analyse the genetic variation within and among populations of *Butia yatay*, *B. paraguayensis* and *B. lallemantii* detected through ISSR markers and to establish genetic distances and relationships among populations and species.

Materials and Methods

A total of 153 samples, 73 taken from four *Butia lallemantii* populations, 20 from one *Butia paraguayensis* population — the only population described in Uruguay — and 60 samples from three natural populations of *B. yatay*, were collected in different locations in Uruguay (Fig. 1). Fresh leaves were collected and dried in silica gel. Twenty individuals from each population (when available) were randomly selected for DNA

extraction. Five samples of *Syagrus romanzoffiana* from different origins were also included as outgroup in the analysis. Specimens of each species were identified by Dr. Larry Noblick and deposited in the 'B. Rosengurt' Herbarium, Facultad de Agronomía (Montevideo, Uruguay).

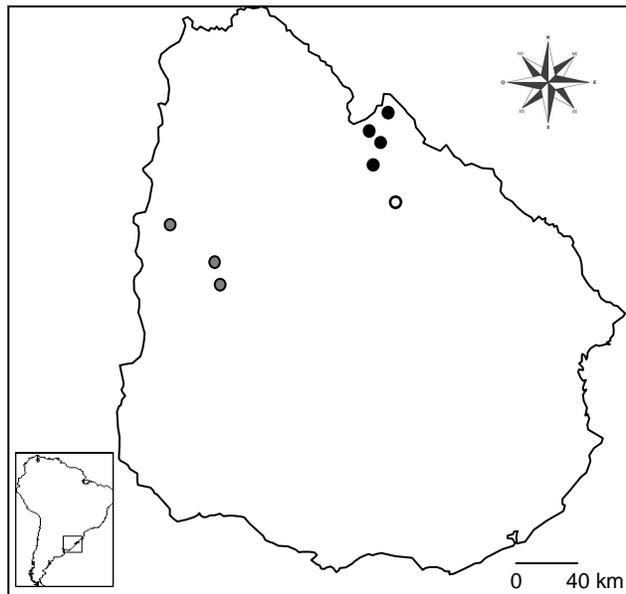


Fig 1 Populations of *Butia yatay* (grey dots), *Butia paraguayensis* (white dot) and *Butia lallemantii* (black dots) included in this study.

Table 1: Geographic coordinates (GPS) and number of samples of all populations included in this study.

Species	Population	Latitude	Longitude	Number of samples
<i>Butia lallemantii</i>	FY	S 31° 12' 49.8"	W 55° 48' 50.0"	20
<i>Butia lallemantii</i>	GC	S 31° 10' 01.6"	W 55° 51' 07.9"	22
<i>Butia lallemantii</i>	W	S 31° 23' 50.8"	W 55° 42' 24.5"	14
<i>Butia lallemantii</i>	CO	S 30° 59' 15.3"	W 55° 36' 53.5"	17
<i>Butia paraguayensis</i>	CM	S 31° 32' 00.8"	W 55° 37' 58.3"	20
<i>Butia yatay</i>	Q	S 31° 54' 36.8"	W 57° 39' 32.4"	20
<i>Butia yatay</i>	GUI	S 32° 20' 35.8"	W 57° 09' 33.9"	20
<i>Butia yatay</i>	CC	S 32° 23' 06.9"	W 57° 10' 58.7"	20

DNA extraction and sample pretreatment

Equal amounts (1 g) of leaf tissue from each sample were placed in porcelain mortars and frozen with liquid nitrogen to be ground to a fine powder. Total genomic DNA was extracted according to the CTAB method (Doyle and Doyle 1987). After precipitation the DNA pellet was washed in 200 µL ice-cold ethanol (75%) for five min and repeated with ice-cold absolute ethanol. DNA samples were evaluated in 0.8% agarose gels stained with 0.003% ethidium bromide. Each sample was incubated in 1 µL

RNAse (Invitrogen) at 37° C for 1 h. DNA samples were quantified in a Beckman DU 530 spectrophotometer at 260 nm and then diluted to a final concentration of 5 ng/μL.

Primer selection and ISSR-PCR amplifications

ISSR-PCR amplifications were conducted following Rossato et al. (2007) with some modifications in the reaction mix. Sixteen primers previously used by Rossato et al. (2007) were tested and five anchored primers — (CTC)₄RT, (AG)₈YT, (AC)₈T, (CA)₈G and (GA)₈T — were selected according to the quality of amplification profiles produced and to the number of markers obtained with two samples from each species.

Amplification reactions were performed in a total reaction volumes of 25 μL containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 0.2 mM each dNTP (dATP, dCTP, dTTP and dGTP), 1.15 mM MgCl₂, 0.1 μM of primer, 1.5U of Taq DNA polymerase (Invitrogen), 2% of DMSO and 50 ng of genomic DNA from each sample. DNA amplifications were conducted in a Tonegen Palm thermal cycler (Tonegen). Amplification conditions consisted of one initial 4:30 min step at 92° C, followed by 40 cycles of: 92° C (1 min), 48/50° C (depending on primer's annealing temperature, 50 s) and 72° C (2 min). Reactions were completed by a final extension step at 72° C (5 min) and 10° C (5 min). Each amplification set contained samples from all populations and a negative control without genomic DNA. In order to make comparisons among different amplification sets of a primer, an internal standard for each species was used. These were repeated in each amplification and run in each gel.

Image capture and analysis

ISSR amplification products were separated by horizontal electrophoresis in 1.5% agarose gel stained with 0.003% ethidium bromide, soaked in 1x TBE buffer (50 mM Tris, 50 mM boric acid, 2.5 mM EDTA, pH 8.3) at 90 mA. Electrophoresis gels were visualized and photographed under ultraviolet light. The size of the amplified products was determined by comparison with a molecular weight marker (10Kb DNA Ladder, Real Biotech Corporation). All clear and consistent bands were scored with the assistance of Lab Image Free Edition 2.7.0 (Kapelan Bio-Imaging, 1999-2003) as a binary variable for presence (1) or absence (0) of fragment sizes.

Statistical analyses

Binary data matrixes — 1/0— (data available from corresponding author) were built and employed to calculate divergence among populations (Φ_{ST}) using Nei and Li's distance coefficient (Nei and Li 1979) chosen as the most appropriate for unspecific markers like ISSR and RAPD, since it does not attribute any genetic meaning to the coincidence of absent bands. The coefficient was calculated using the formula: $D_{ij}^N = 1 - (2 N^{ij} / (N^i + N^j))$, where N^{ij} is the number of shared bands between samples i and j while N^i or N^j represent the amplified fragments in samples i and j respectively. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) (Excoffier et al. 1992) was performed for all samples and for each species separately using GENALEX (Peakall and Smouse 2006). Polymorphism and diversity indexes were calculated using the same software. Relationships among

species and populations were evaluated by performing a cluster analysis to construct dendrograms using Jaccard's coefficient (Jaccard 1908) and UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Average values) algorithm and also a Principal Coordinates Analysis (PCoA) both using FAMD (Fingerprinting Analysis with Missing Data) v. 1.21 (Schlüter and Harris 2006). *Syagrus romanzoffiana* was used as outgroup.

The discrimination potential of each primer was expressed by Simpson's coefficient ($h_j = \sum (1 - \sum p_i^2) / n$), where p_i is the frequency of the i^{th} allele, and n is the number of loci detected by each primer (Hunter and Gaston 1988). A value of 1.0 indicates that the primer is able to distinguish all samples and 0.0 indicates that it regards all samples as identical.

Results and discussion

To assess the suitability of ISSR primers, 16 primers were screened against total DNA from two of each species. Based on the number of amplification products, quality of the profiles, level of polymorphism and reproducibility, five primers were selected for the identification of *Butia* species and evaluation of their relationships and genetic variability. When applied to all samples, these primers displayed high discriminating ability, substantiated by Simpson's indexes ranging from 0.67 to 0.90, averaging 0.77 (Table 2). This justified the use of a small number of primers in this work. Using the five primers selected, the PCR protocol applied to the 153 samples studied amplified a total of 74 fragments, with an average of 14.8 fragments per primer. The size of the amplified

Table 2: Number of amplified fragments, number and percentage of polymorphic bands (intergeneric and interspecific), range of molecular weights (in bp), and Simpson's index (h) for the five primers used here.

Primer	N	N _{intergen}	N _{intersp}	%P _{intergen}	%P _{intersp}	Range (bp)	H
(CTC) ₄ RT	17	15	13	88	76.5	849 – 109	0.71
(AG) ₈ YT	17	17	16	100	94	708 – 73	0.85
(AC) ₈ T	17	17	16	100	94	911 – 391	0.90
(CA) ₈ G	11	10	10	91	91	648 – 100	0.67
(GA) ₈ T	12	12	12	100	100	600 – 127	0.77
Mean	14.8	14.2	13.4	95.8	91.1	419	0.77
Total	74	71	67	96	90.5	911-73	

products ranged from 73 to 911 bp and the number of amplified products per primer varied from 17 [(CTC)₄RT; (AG)₈YT; (AC)₈T] to 11 [(CA)₈G]. When the outgroup *Syagrus romanzoffiana* was included in the analysis, 96% of the amplified fragments (71) were polymorphic, whereas when only *Butia* species were considered the percentage of polymorphic bands was 90.5%. The polymorphism among *Butia* species was similar to that previously reported by Rossato et al. (2007) for populations of four species of *Butia* from Rio Grande do Sul (Brazil), which include *Butia yatay*. Studies using RAPD markers in *Butia capitata* revealed low polymorphism levels (57%) (Nunes et al. 2008),

whereas in *Syagrus romanzoffiana* the detected polymorphism was considerably higher (97%) (Rossato et al. unpublished data). In a study on *Geonoma macrostachys* (subfamily Arecoideae), Roncal et al. (2007) reported lower polymorphic values (51%) using ISSR markers.

A unique pattern of amplified fragments was obtained for each species with only some differences. These patterns of amplification revealed genus-specific markers. For instance, the primer (CTC)₄RT amplified a fragment of 520 bp that characterized all the species of genus *Butia* and another of 440 bp that was characteristic of *S. romanzoffiana*.

Genetic divergence (Φ_{ST}) calculated using Nei and Li's distance index (Nei and Li 1979) for all pairs of species varied from 0.053 (*B. lallemantii* and *B. paraguayensis*) to 0.157 (*B. lallemantii* and *B. yatay*) (Table 3). The genetic distance among *Butia* species was considerably low (0.12, on average) in comparison with data obtained by Rossato et al. (2007) for Rio Grande do Sul species. As expected, the highest divergence values (0.312, on average) were obtained between *Butia* species and the outgroup *S. romanzoffiana*.

Table 3: Genetic divergence among populations (Φ_{ST}), based on the Nei-Li's distance coefficient. Φ_{ST} values are shown below diagonal. Probability values based on 999 permutations are shown above diagonal. Values marked with an asterisk represent pairs of populations which are significantly divergent ($p < 0.05$) and ns represents pairs of populations which are not significantly divergent ($p > 0.05$).

	<i>Butia lallemantii</i>				<i>Butia</i> <i>paraguayensis</i>	<i>Butia yatay</i>			<i>Syagrus</i> <i>romanzoffiana</i>
	FY	GC	W	CO	CM	GUI	Q	CC	SR
FY	0.000	ns	*	*	*	*	*	*	*
GC	0.000	0.000	*	*	*	*	*	*	*
W	0.025	0.033	0.000	ns	*	*	*	*	*
CO	0.046	0.047	0.017	0.000	*	*	*	*	*
CM	0.054	0.047	0.054	0.055	0.000	*	*	*	*
GUI	0.114	0.091	0.125	0.083	0.089	0.000	ns	*	*
Q	0.150	0.131	0.137	0.109	0.109	0.016	0.000	*	*
CC	0.254	0.248	0.221	0.221	0.255	0.202	0.113	0.000	*
SR	0.324	0.337	0.280	0.324	0.332	0.262	0.297	0.338	0.000

The inter- and intraspecific variability values calculated using AMOVA were on average 10% and 84%, respectively, whereas variability among populations was 6% (Fig. 2). This is common in wild species, particularly alogamous ones, with long life cycles

and high levels of pollen dispersion (Hamrick and Godt 1996), as seems to be the case of the species included in this survey, according to previous studies on *B. capitata* (Rosa et al. 1998; Morel 2006).

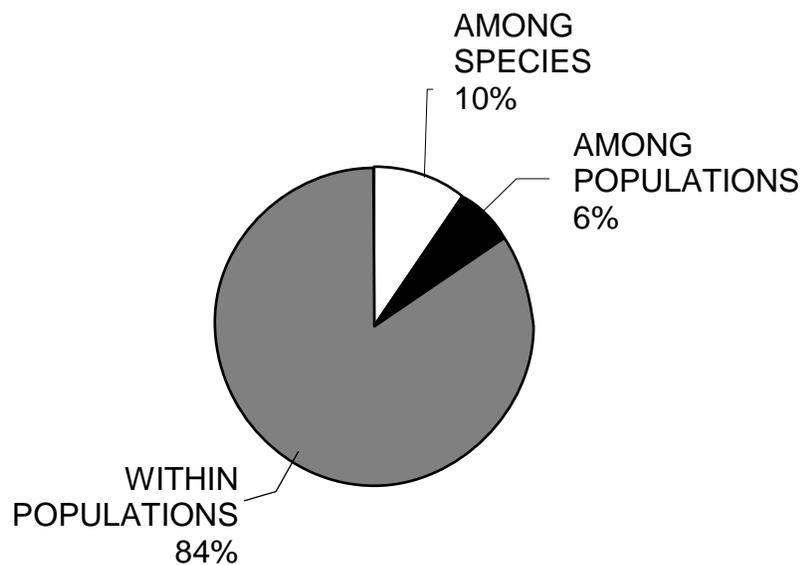


Fig 2 Proportion of the different components of variance considering all species

The ISSR-based UPGMA dendrogram (Fig. 3) separated the *Butia* species of interest from the outgroup (*S. romanzoffiana*). These data agree with previous works that used ISSR molecular markers (Rossato et al. 2007) and chemotaxonomic markers such as hydrocarbon extracts from waxes on the leaf surface (Paroul et al. 2009). According to the most recent phylogenetic analysis of subtribe Attaleinae, these two genera are clearly separated (Meerow et al. 2009).

The cluster formed by *Butia* species was divided into two groups. The first one (Group 1) was formed by two subgroups (Sg1 and Sg2), both encompassing samples of *B. paraguayensis*, *B. lallemantii* and *B. yatay*, and the second group (Group 2), which diverged first, was composed only by *B. yatay* samples. The first subgroup (Sg1) showed marked predominance of *B. lallemantii* specimens (61% of the total sampling), though on the other hand it displayed the lowest percentage of samples corresponding to *B. paraguayensis* (21.5%), and *B. yatay* (5.5%). Subgroup two (Sg2) appeared to be the most variable, formed by approximately 39% of *B. lallemantii* samples, 78.5% of *B. paraguayensis* and finally, 55.5% of *B. yatay* samples.

Group 2 was the most uniform and included all remaining samples corresponding to *B. yatay* (39%). Despite the genetic similarity observed among *Butia* species, preventing the formation of well-defined groups, *B. yatay* samples tended to form a specific group, even though some individuals appeared to be mixed with samples from other species. Within *B. yatay*, samples from CC population formed the most compact aggregation, as observed in the cluster analysis (Fig. 3).

Samples of *B. paraguayensis* and *B. lallemantii* appeared highly scattered in the dendrogram, not grouping according to their respective populations, possibly due to the low levels of divergence found in these species (Table 3). These results were confirmed by principal coordinates analysis (Fig. 4).

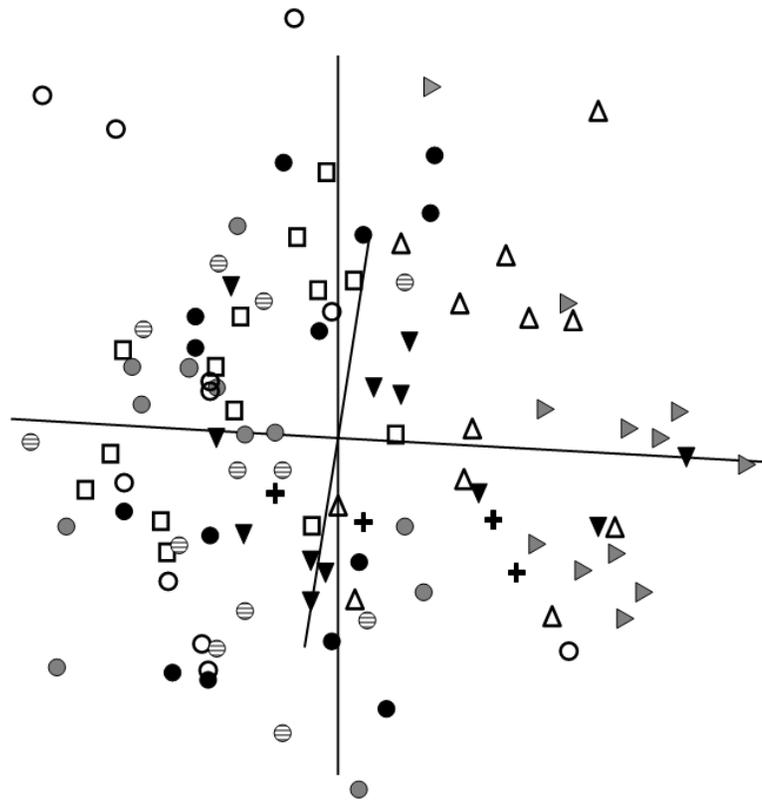


Fig 4 Principal coordinates analysis for all samples and species together. Individuals were identified with their corresponding species and population code. *Butia yatay* (triangles); population GUI (black triangles), population Q (white triangles) and population CC (grey triangles). *Butia paraguayensis* (white boxes). *Butia lallemantii* (circles); population FY (black circles), population GC (striped circles), population W (white circles), population CO (grey circles).

Regarding their morphology, *Butia yatay* is among the tallest species in genus *Butia*, whereas *B. paraguayensis* and *B. lallemantii* are among the shortest (Rossato 2007), particularly in the case of *B. lallemantii* — because most of its stem remains

underground. The main difference among these species is that while *B. yatay* and *B. paraguayensis* possess only one stem, *B. lallemantii* displays a cespitose habit, usually with three to six stems (Deble and Marchiori 2006). On the other hand, *B. paraguayensis* and *B. lallemantii* share some characteristics, such as leaf length and number, and fruit size and shape, which might help group them together and differentiate them from *B. yatay* (Deble and Marchiori 2006; Rossato 2007). Inflorescence length in *B. paraguayensis* is intermediate between those of *B. yatay* and *B. lallemantii* (Deble and Marchiori 2006; Rossato 2007), a feature which coincides with the genetic information found in the present study.

The low divergence levels depicted among *Butia* species could be seen as evidence of gene flow (Wright 1951; Slatkin 1987; Bohonak 1999), which is particularly likely in the case of *B. lallemantii* and *B. paraguayensis*, since their distribution areas are very close in Uruguay and overlap in Rio Grande do Sul. The existence of species with overlapping distributions is common in palms, although they display mechanisms of reproductive isolation through differences in phenology and specificity of pollinators (Svenning 2001; Roncal et al. 2007). In this case, however, these barriers might not be present or might have arisen recently, allowing for gene flow in the recent past. Hybridisation is common among palms (Uhl and Dransfield 1987), as is usually the case between *Butia* and *Syagrus* (*XButyagrus nabonnandii*, (Prosch.) Vöster; *Butia lallemantii* x *Syagrus romanzoffiana*, Brussa and Grela 2007). Therefore, hybridisation among the species included in this study could have taken place at some point in their recent past.

No present cases of hybrids among species of *Butia* have been reported, though their identification presents several difficulties. On the other hand, the low genetic differentiation among these species could result from shared ancestry, considering the retention of ancestral polymorphism. This is the case between two closely related *Quercus* species (Muir and Schlötterer 2004), although Lexer et al. (2006) consider gene flow as a more parsimonious explanation in this case. Proximity between *B. paraguayensis* and *B. yatay* was already expected, considering they have been repeatedly regarded as the same species, with *B. paraguayensis* a subspecies within *B. yatay* (Xifreda and Sanso 1996). Both have chemically similar fatty acids composition of the endocarp (Rossato 2007). Phylogenetic analyses within subtribe Attaleinae (Marcato 2004; Meerow et al. 2009) produced results which support our findings, since no internal resolution was obtained within *Butia* in those works.

This is the first report of a molecular characterization using ISSR markers for South American species of *Butia*. ISSR results showed high levels of genetic proximity among the three *Butia* species studied here, Species' separation into independent groups remains unclear. The high genetic variability found within populations indicates that their life history and reproductive traits ensure the maintenance of their gene pool, regardless the anthropic effect (Lowe et al. 2005; Feyissa et al. 2007; Cabrera-Toledo et al. 2008).

Combined studies using ISSR and other molecular markers will be important to increase our knowledge of the diversity of this genus. Future works will focus on different approaches to better clarify the taxonomy of *Butia*, including the phylogenetic

study of the genus based on the combined analysis of nuclear (ITS rDNA) and plastidial (*trnL-L-F*) DNA sequences, side by side with chemical and cytogenetic findings.

In conclusion, this work shows that the genetic proximity among the three species of *Butia* studied prevents them from being considered clearly separate genetic groups, and therefore their taxonomic definition remains uncertain. Further studies using tools which allow a more precise insight into their genetic variation — such as sequencing of nuclear and chloroplastic genes — are necessary to shed light on their relationships. The high levels of intrapopulation variability found in *Butia yatay*, *B. paraguayensis* and *B. lallemantii* indicate that their life history and reproductive traits, together with possible hybridization in their recent past, ensures the maintenance of their gene pool, regardless of the human influences they are under. If their recruitment levels are returned to normal and the integrity of their populations is restored, their genetic variability provides potential for recovery.

Acknowledgements

This work was supported by grant from Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) Fondo Clemente Estable (project ID FCE2007_612, Uruguay), and Universidade de Caxias do Sul (Brazil). Gaiero was supported by posgraduation grant from Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (Uruguay) and her internship at Universidade de Caxias do Sul was financed by Comisión Sectorial Investigación Científica, Universidad de la República (CSIC-UdelaR, Uruguay). We wish to thank L Noblick for plant identification, J Zacaría for assistance in DNA extractions and P Speranza, G García and M Rivas for useful comments on the manuscript and figures. We are grateful to COFUSA, FYMNSA and Weyerhaeuser for kindly allowing sample collection in their premises and their staff for assistance in the field.

References

- Agostini G, Echeverrigaray S, Souza-Chies TT (2008) Genetic relationships among South American species of *Cunila* D. Royen ex L. based on ISSR. *Plant Syst Evol* 274:135-141
- Bohonak AJ (1999) Dispersal, Gene Flow, and Population Structure. *Q Rev Biol* 74(1):21-46
- Bornet B, Branchard M (2004) Use of ISSR fingerprints to detect microsatellites and genetic diversity in several related *Brassica* taxa and *Arabidopsis thaliana*. *Hereditas* 140:245-248
- Brussa CA, Grela IA (2007) *Flora Arbórea del Uruguay. Con énfasis en las especies de Rivera y Tacuarembó*. Ed. COFUSA, Uruguay. 544 p
- Cabrera-Toledo D, González-Astorga J, Vovides AP (2008) Heterozygote excess in ancient populations of the critically endangered *Dioon caputoi* (Zamiaceae, Cycadales) from central Mexico. *Bot J Linn Soc* 158:436-447
- Chebataroff J (1974) *Palmeras del Uruguay*. Facultad de Humanidades y Ciencias, Mdeo, Uruguay. 33 p
- Dahlgren RMT, Clifford HT, Yeo PS (1985) *The families of monocotyledons. Structure, evolution and taxonomy*. Springer-Verlag, Berlin. pp 467-479
- Deble LP, Marchiori JNC (2006) *Butia lallemantii*, uma nova Arecaceae do Brasil. *Balduinia* 9:1-3
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry* 19:11-15

- Dransfield J, Uhl NW, Asmussen CB, Baker WJ, Harley MM, Lewis CE (2005) A New Phylogenetic Classification of the Palm Family, Arecaceae. *Kew Bull* 60(4):559-569
- Dransfield J, Uhl NW, Asmussen CB, Baker WJ, Harley MM, Lewis CE (2008) *Genera palmarum: the evolution and classification of palms*. Kew: Kew Publishing. 744 p
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491
- Feyissa T, Nybom H, Bartish IV, Welander M (2007) Analysis of genetic diversity in the endangered tropical tree species *Hagenia abyssinica* using ISSR markers. *Genet Resour Crop Evol* 54:947-958
- Glassman SF (1979) Re-evaluation of the genus *Butia* with a description of a new species. *Principes* 23(2):65-70
- González-Guzmán M, Medina-Herranz MA, Medina-Herranz M, Palomares-Hernández G (2006) Identificación y selección de marcadores moleculares Inter-microsatélite (ISSR) para la diferenciación varietal en *Capsicum annuum* L. III Congreso de Mejora Genética en plantas. Resúmenes Solanáceas n°30
- Hahn WJ (2002) A phylogenetic analysis of the Arecoideae line of palms based on plastid DNA sequence data. *Mol Phyl Evol* 23:189–204
- Hamrick JL, Godt MJW (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Phil Trans R Soc Lond* 351:1291-1298

- Hunter PR, Gaston MA (1988) Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 26:2465–2466
- Jaccard P (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise de Sciences naturelles* 44:223-270
- Jones DL (1995) *Palms throughout the world*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC. 410 p
- Kapelan Bio-Imaging (1999-2003) Lab Image Free edition version 2.7.0
- Lexer C, Kremer A, Petit RJ (2006) Shared alleles in sympatric oaks: recurrent gene flow is a more parsimonious explanation than ancestral polymorphism. *Mol Ecol* 15(7):2007-2012
- Lowe AJ, Boshier D, Ward M, Bacles CFE, Navarro C (2005) Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity* 95:255-273
- Marcato AM (2004) Revisão taxonômica do gênero *Butia* (Becc.) Becc. e filogenia da subtribo Butiinae Saakov (Palmae). Dissertation, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 147 p
- Marchiori JNC (2004) *Fitogeografia do Rio Grande do Sul: campos sulinos*. EST, Porto Alegre. 110 p
- Masat O, Olga M, Chatellenaz ML, Fontana JL (2008) Dispersión de *Butia yatay* (Arecaceae) por el Ñandú (*Rhea americana*) en el Parque Nacional Mburucuyá,

Corrientes. XII Reunión Argentina de Ornitología, San Martín de los Andes, Neuquén.

Meerow AW, Noblick L, Borrone JW, Couvreur TLP, Mauro-Herrera M, William J.

Hahn WJ, Kuhn DN, Nakamura K, Oleas NH, Schnell RJ (2009) Phylogenetic Analysis of Seven WRKY Genes across the Palm Subtribe Attaleinae (Arecaceae) Identifies *Syagrus* as Sister Group of the Coconut. PLoS ONE 4(10):e7353

Moore HE, Uhl NW (1982) The major trends of evolution in palms. Bot Rev 48(1):1-69

Morel M (2006) Morfología floral y fenología de la floración de la palma *Butia capitata* (Mart.) Becc. Arecaceae. Dissertation, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. 72 p

Muir G, Schlötterer C (2004) Evidence for shared ancestral polymorphism rather than recurrent gene flow at microsatellite loci differentiating two hybridizing oaks (*Quercus* spp.). Mol Ecol 14(2):549-561

Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 76:5269–5273

Nunes AM, Bianchi VJ, Fachinello JC, De Carvalho AZ, Cardoso G (2008) Caracterização Molecular de Butiazeiro por Marcadores RAPD. Rev Bras Frutic 30(3):702–707

Paroul N, Cansian RL, Rossato M, Pauletti GF, Serafini LA, Rota L, Moyna P, Heinzen, H (2009) Use of Palmae wax hydrocarbon fractions as chemotaxonomical markers in *Butia* and *Syagrus*. Braz J. Biol 69(2): 353–361

- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288–295
- Pintaud JC, Galeano G, Balslev H, Bernal R, Borchsenius F, Ferreira E, de Granville JJ, Mejía K, Millán B, Moraes M, Noblick L, Stauffer FW, Kahn F (2008) Las palmeras de América del Sur: diversidad, distribución e historia evolutiva. *Rev peru biol* 15(1):007- 029
- Rivas M, Barilani A (2004) Diversidad, potencial productivo y reproductivo de los palmares *Butia capitata* (Mart) Becc. de Uruguay. *Agrociencia* (1):11-20
- Rodríguez-Mazzini R, Molina B (1990) El zorro de monte (*Cerdocyon thous*) como agente dispersor de semillas de palma. Documentos de Trabajo 30. PROBIDES. 33 p
- Roncal J, Fransico-Ortega J, Lewis CE (2007) An evaluation of the taxonomic distinctness of two *Geonoma macrostachys* (Arecaceae) varieties based on intersimple sequence repeat (ISSR) variation. *Bot J Linn Soc* 153:381-392
- Rosa L, Castellani TT, Reis A (1998) Biología reproductiva de *Butia capitata* (Martius) Beccari var. *odorata* (Palmae) na restinga do município de Laguna, SC. *Rev Bras Bot* 21(3):281-287
- Rossato M (2007) Recursos genéticos de butiás do Rio Grande do Sul. Dissertation, Universidade Federal de Pelotas. 133 p
- Rossato M, Barbieri RL, Schafer A, Zacaría J (2007) Caracterização molecular de populações de palmeiras do gênero *Butia* do Rio Grande do Sul através de marcadores ISSR. *Magistra* 19(4):311-318

- San Martín H, Prigioni C, Sappa A, San Martín A (1996) Informe preliminar sobre algunos grupos zoológicos vinculados al ciclo anual de la palma butiá *Butia capitata* (Mart.) Becc. Acta zool platense 1(2):1-15
- Schlüter PM, Harris SA (2006) Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. Molec Ecol Notes 6:569-572
- Slatkin, M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science 236 (4803):787-792
- Svenning JC (2001) On the Role of Microenvironmental Heterogeneity in the Ecology and Diversification of Neotropical Rain-Forest Palms (Arecaceae). Bot Rev 67 (1):2-41
- Uhl NW, Dransfield J (1987) Genera Palmarum a classification of palms based on the work of Harold E. Moore Jr. The L.H. Bailey Hortorium and the International Palm Society, Lawrence, Kansas. 610 p
- Xifreda CC, Sanso AM (1996) Nueva combinación en *Butia* (Arecaceae). Hickenia 43 (II):207-208
- Wright S (1951) The genetic structure of populations Ann Eugen 15:323-354
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20:176-183

Plant Systematics and Evolution

Aims and scope

The journal is devoted to publishing original papers and reviews on plant systematics in the broadest sense, encompassing evolutionary, phylogenetic and biogeographical studies at the populational, specific and higher taxonomic levels. Taxonomic emphasis is on green plants.

Fields of interest: Plant systematics and evolution, phytochemistry, ultrastructure, cytology, anatomy, palynology, plant development, genetics, reproductive biology, ecology, distribution, palaeobotany, population genetics

Editorial Procedure

Authors are kindly asked to provide a list of reviewers including their scientific relations. Furthermore a short explanation (two sentences) of their findings should be given.

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.

- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead. Save your file in doc format. Do not submit docx files.

■ [Word template](#)

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

[LaTeX macro package](#)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are

not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

Scientific style

■ Please always use internationally accepted signs and symbols for units, SI units.

■ Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.

■ Genus and species names should be in italics.

■ Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

■ Details must be given about origin and determination of each organism studied. Scientific (Latin) names should conform to the international rules of nomenclature. Authors of species and infraspecific taxa investigated must be given either when first mentioned in text or included all in one of the tables. In principal, voucher specimens are to be deposited in a large public herbarium quoted using the abbreviation given in the "Index Herbariorum".

■ Data matrices including sequence alignments must be made available to the public. There must be a sentence included in the Materials and methods section that such information is available from the corresponding author. "DNA or proteine sequences must be deposited in public data bases (GenBank, EMBL, etc.) before the revised version is sent to the editor."

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).



This result was later contradicted (Becker and Seligman 1996).



This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1993).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

Journal article

- Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

Article by DOI

- Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book

- South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London
Book chapter
- Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
Online document
- Doe J (1999) Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. Available via DIALOG.
[http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Accessed 15 Jan 1999
Dissertation
- Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

■

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

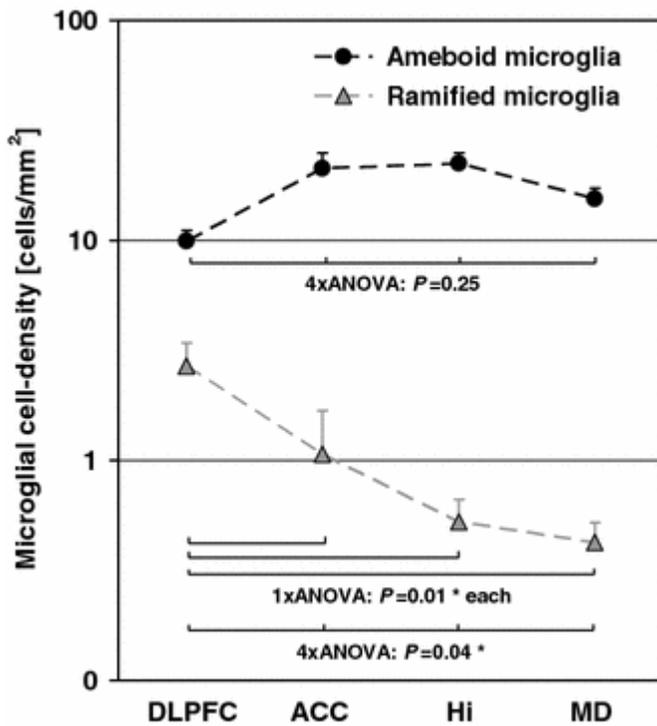
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use
- TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

- **Line Art**

Definition: Black and white graphic with no shading.

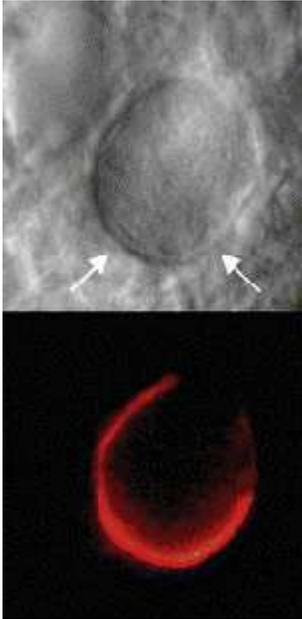
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering
- within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a
- minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
-



Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.
-



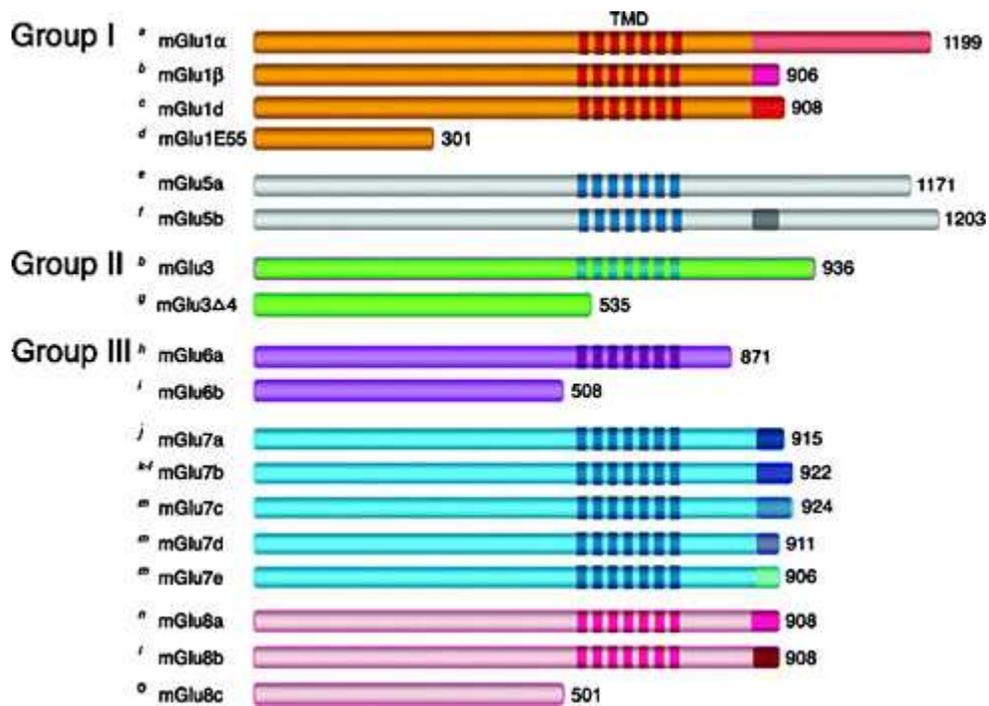
Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line

- drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

-



Color Art

Color art is free of charge for online publication.

- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes,

- circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form

- of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Always use MPEG-1 (.mpg) format.

-

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

■

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

If the readers should be encouraged to make their own calculations,

- spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

■

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.

Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

■

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the
■ author without any conversion, editing, or reformatting.

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

[Springer Open Choice](#)

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, they agree to the Springer Open Choice Licence.

Offprints

Additional offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Languages

Articles and abstracts must be in English or in the journal's official language(s), but the journal accepts additional abstracts in other languages of the author's choice (for instance in the author's first language, if not English or the journal's official language). Such abstracts are optional. Authors would need to supply such abstracts themselves, certify that they are a faithful translation of the official abstract, and they must be supplied in Unicode (see www.unicode.org for details), especially if they are using non-roman characters.

<http://www.unicode.org>

Such abstracts in other languages will carry a disclaimer:

"This abstract is provided by the author(s), and is for convenience of the users only. The author certifies that the translation faithfully represents the official version in the language of the journal, which is the published Abstract of record and is the only Abstract to be used for reference and citation."

Springer Open Choice™

Your Research. Your Choice.

Springer operates a program called Springer Open Choice. It offers authors to have their journal articles made available with full open access in exchange for payment of a basic fee ('article processing charge').

With Springer Open Choice the authors decide how their articles are published in the leading and well respected journals that Springer publishes. Springer continues to offer the traditional publishing model, but for the growing number of researchers who want open access, Springer journals offer the option to have articles made available with open access, free to anyone, any time, and anywhere in the world. If authors choose open access in the Springer Open Choice program, they will not be required to transfer their copyright.

Whatever the decision, an author's work will always benefit from all Springer has to offer. There is no difference in the way that they are treated between Springer Open Choice articles and other articles among the well over 100,000 that Springer publishes annually. All articles will be peer-reviewed, professionally produced, and available both in print and in electronic versions on SpringerLink. In addition, every article will be registered in CrossRef and included in the appropriate Abstracting and Indexing services. Springer Open Choice articles will have the possibility of incorporating additional non-text files such as sound or video in the electronic edition.

Copyright information

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before (except in form of an abstract or as part of a published lecture, review or thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as – tacitly or explicitly – by the responsible authorities at the institution where the work was carried out. Transfer of copyright to Springer becomes effective if and when the article is accepted for publication. The copyright covers the exclusive right (for U.S. government employees: to the extent transferable) to reproduce and distribute the article, including reprints, translations, photographic reproductions, microform, electronic form (offline, online) or other reproductions of similar nature.

All articles published in this journal are protected by copyright, which covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article (e.g., as offprints), as well as the translation rights. No material published in this journal may be reproduced photographically or stored on microfilm, in electronic data bases, video disks, etc., without first obtaining written permission from the publisher. The use of general descriptive names, trade names, trademarks, etc., in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

An author may self-archive an author-created version of his/her article on his/her own website. He/she may also deposit this version on his/her institution's and funder's (funder designated) repository, including his/her final version, provided it is not made publicly available until after 12 months of official publication. He/she may not use the publisher's PDF version which is posted on www.springerlink.com for the purpose of self-archiving or deposit. Furthermore, the author may only post his/her version provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on

Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The original publication is available at www.springerlink.com".

Please use the appropriate URL and/or DOI for the article. Articles disseminated via SpringerLink are indexed, abstracted and referenced by many abstracting and information services, bibliographic networks, subscription agencies, library networks, and consortia.

The author warrants that this contributions is original and that he/she has full power to make this grant. The author signs for and accepts responsibility for releasing this material on behalf of any and all co-authors.

After submission of this agreement signed by the corresponding author, changes of authorship or in the order of the authors listed will not be accepted by Springer.

While the advice and information in this journal is believed to be true and accurate at the date of its publication, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Special regulations for photocopies in the U.S.A. Photocopies may be made for personal or in-house use beyond the limitations under Section 107 or 108 of U.S. Copyright Law, provided a fee is paid. All fees should be paid to the Copyright Clearance Center, Inc., 222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, Tel.: +1-978-7508400, Fax: +1-978-6468600, <http://www.copyright.com>, stating the ISSN 0304-8608, the volume, and the first and last page numbers of each article copied. The copyright owner's consent does not include copying for general distribution, promotion, new works, or resale. In these cases, specific

written permission must first be obtained from the publisher.

The Canada Institute for Scientific and Technical Information (CISTI) provides a comprehensive, world-wide document delivery service for all Springer journals. For more information, or to place an order for a copyright-cleared Springer document, please contact Client Assistant, Document Delivery, CISTI, Ottawa K1A 0S2, Canada (Tel+ 1-613-9939251, Fax +1-613-9528243, e-mail: cisti.docdel@nrc.ca).

Springer-Verlag GmbH Wien is a part of
Springer Science+Business Media

springer.com

Ownership and Copyright

© Springer-Verlag GmbH Wien