

ESTUDIO ELECTROFORETICO EN CUATRO ESPECIES DEL GENERO *PROSOPIS* (LEGUMINOSAE)

Por ALICIA D. BURGHARDT* y RAMON A. PALACIOS**

Summary *Electrophoretic study in four species of the genus Prosopis* (Leguminosae). Seed proteins of four species of *Prosopis* L. (*P. alba*, *P. nigra*, *P. hassleri* and *P. ruscifolia*) were studied by polyacrilamide gel electrophoresis. A total of 49 different bands were identified. No species displayed any characteristic and constant "markers" bands and the polypeptidic patterns showed high homology. The results were treated numerically by Cluster analysis and Minimum Spanning tree in order to study species relationships. *P. alba* and *P. hassleri* were the species that showed highest protein similarity (in contrast with Burkart's classification). *P. nigra* was placed in an intermediate position between *P. ruscifolia* and *P. alba*. There was a manifest differentiation between *P. hassleri* and *P. ruscifolia*. The results from protein electrophoresis are, in general agreement with those obtained in other studies and suggest the importance to restate the subdivision, within section *Algarobia*, of the genus *Prosopis*.

INTRODUCCION

El género *Prosopis* L. cuenta con aproximadamente 45 especies distribuidas en el sudoeste de Asia, Africa y predominantemente en América (Burkart, 1976). En la República Argentina, existen representantes de 27 especies que habitan la mayoría del territorio continental, excepto el sur de la Patagonia y la provincia de Misiones (Burkart, 1976, Hunziker et al., 1986).

Dado que los perfiles de proteínas seminales obtenidos por electroforesis demostraron ser altamente estables a nivel específico y se usaron con éxito en más de 45 géneros correspondientes a 13 familias de fanerógamas (Ladizinsky y Hymowitz, 1979), se encará el presente estudio para caracterizar a un grupo de especies pertenecientes a dos series de la sección *Algarobia*, que viven simpátricamente en la provincia fitogeográfica chaqueña. Estas especies presentan algunos problemas para su delimitación debido a que no existen discontinuidades morfológicas abruptas y aparecen frecuentemente formas transicionales (Hunziker et al., 1975).

Las especies estudiadas son *P. alba* Griseb. y *P. nigra* (Griseb.) Hieronymus de la serie *Chilenses* y *P. ruscifolia* Griseb. y *P. hassleri* Harms de la serie

Ruscifoliae (Burkart, 1976). Estas son especies estrechamente relacionadas según lo evidenciado por los estudios morfológicos (Burkart, 1976), cromosómicos (Hunziker et al., 1975, 1977, Naranjo et al., 1984), de composición ácida de aceites seminales (Madriñan Polo et al., 1976), cromatográficos (Carman, 1973, 1977, Gianinetta et al., 1975, 1976 a y b, Palacios y Bravo, 1981, Gitelli et al., 1981, 1984, Naranjo et al., 1984) e isoenzimáticos (Saidman, 1984, 1985); existiendo entre ellas hibridación natural en algunas áreas (Burkart, 1952; Palacios y Bravo, 1974, 1981; Hunziker et al., 1975, 1986; Naranjo et al., 1984). Asimismo, estudios previos de electroforesis de proteínas seminales, indican una gran similitud proteica entre algunas de estas especies (Burghardt y Palacios, 1981, 1984; Burghardt, 1982).

MATERIAL Y METODOS

Se realizó electroforesis de proteínas seminales (fracción acuosa) de ejemplares coleccionados por Ramón A. Palacios (RAP) en las provincias de Tucumán, Salta, Santiago del Estero, Chaco y Formosa; Otto T. Solbrig (OTS) en Formosa y Beryl Simpson (BS) en Santiago del Estero. La distribución de los ejemplares se detalla en la Figura 1.

A continuación se indica la procedencia y el número de herbario de los ejemplares estudiados, señalándose entre paréntesis el herbario donde se encuentran depositados (utilizando las siglas propuestas por Holmgren y Keuken, 1974). Las iniciales corresponden a los colectores ya indicados.

* Laboratorio de Genética.

** Laboratorio de Plantas Vasculares.

*** Depto. de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2º pabellón, 4º piso. Ciudad Universitaria. 1428 Buenos Aires, Argentina.

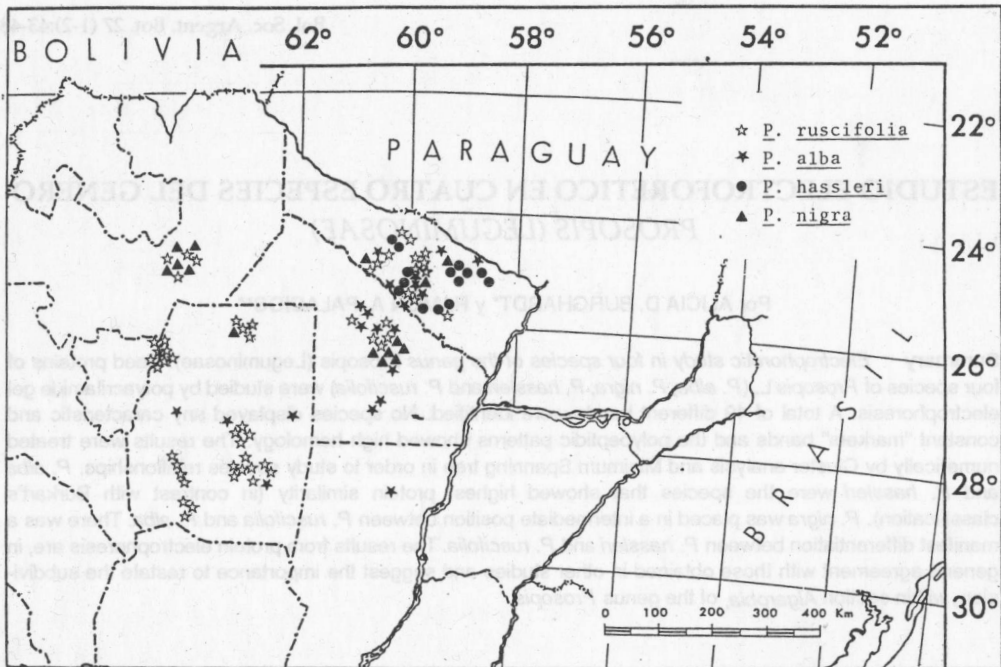


Fig. 1.— Distribución de los ejemplares estudiados.

Prosopis ruscifolia Griseb.: ARGENTINA. Prov. Formosa: RAP 554, 321, 332, 478, 539, 540, 550, 307, 334, 811, 813, 814, 815, 816 (BAFC). OTS 4266 (GH). Prov. de Santiago del Estero: BS 1037-1, 1037-4, 1037-5 (GH), RAP 511, 513, 516, 518, 519, 520, 521, 571, 572, 573, 576, 577, 667, 668, 669, 671, 829, 835, 836, 837, 838, 842, 945, 946, 947 (BAFC). Prov. Chaco: RAP 489, 498, 526, 527, 530, 533, 534, 536, 538 (BAFC). Prov. Tucumán: RAP 661, 662, 663, 664, 839, 840, 841 (BAFC). Prov. Salta: RAP 926, 937, 938 (BAFC). El total de individuos analizados fue de 155.

Prosopis alba Griseb.: ARGENTINA. Prov. Formosa: RAP 314, 323, 329, 330, 464, 548 (BAFC); OTS 4238 y 4247 (GH). Prov. Santiago del Estero: RAP 512, 522, 818 (BAFC); OTS-BS 4273 (GH). Prov. Chaco: RAP 496, 523, 529, 580, 920, 922, 923 (BAFC); OTS-BS 4281 (GH). Prov. Santa Fe: RAP 677 (BAFC). Total de individuos estudiados: 64.

Prosopis hassleri Harms: ARGENTINA. Prov. Formosa: RAP 311, 316, 320, 322, 462, 480, 556, 557, 558, 560, 561, 563, 683, 684, 708, 796, 802, 805, 807 (BAFC). El total de individuos analizados fue de 63.

Prosopis nigra (Griseb.) Hieronymus: ARGENTINA. Prov. Formosa: RAP 465, 473, 487 (BAFC); OTS 4255, 4267 (GH). Prov. Santiago del Estero: RAP 578, 830 (BAFC). Prov. Chaco: RAP 499, 524, 525, 528, 353 (BAFC). Total de individuos: 50.

Dado que algunas especies de la sección *Algarobia* (*P. velutina*, *P. chilensis* y *P. flexuosa*) serían autoincompatibles (Simpson, 1977), así como también lo es *P. nigra* (Palacios y Bravo, 1981) y habiéndose

encontrado autocompatibilidad parcial en *P. torquata* (Simpson et al., 1977), se supone que las especies aquí estudiadas son predominantemente alógamas, por lo cual se consideraron semillas diferentes como individuos genotípicamente distintos.

En todos los casos se estudió un número mayor de individuos que aquéllos que fueron aprovechables para el análisis.

Técnicas electroforéticas

La electroforesis fue realizada en placas horizontales de gel, al 7%, de poliacrilamida en agua destilada, utilizando como catalizadores TMED y persulfato de amonio. El gel se equilibró en "buffer" Lactato de Aluminio 0,05 M + urea 3 M durante 48 horas. Las muestras a analizar se realizaron moliendo semillas (una por muestra) en mortero de porcelana; seguido de tres extracciones con 0,5 ml de "buffer" Lactato de Aluminio 0,05 M + urea 3 M. El extracto obtenido se liofilizó, guardándose en desecador a 0°C.

Se realizó la corrida electroforética utilizando como "buffer" de corrida Lactato de Aluminio 0,05 M, durante aproximadamente cinco horas, con un voltaje de 20 V/cm.

Los geles se colorearon en solución de Amido-black al 0,2% en Metanol-Agua-Acido acético 5:5:1 y fueron decolorados en Agua-Metanol-Acido acético 10:4:1.

Técnicas numéricas

Las cuatro especies de *Prosopis* estudiadas constituyeron otras tantas unidades taxonómicas operativas (OTU). El total de caracteres considerados fue de 49, representando cada uno, una banda polipeptídica. Los estados posibles de cada carácter fueron sus respectivas frecuencias en las especies estudiadas.

A partir de la matriz básica de datos se calcularon la Distancia Taxonómica Promedio y la Distancia Manhattan (Sneath y Sokal, 1973) para cada par posible de OTU, obteniéndose dos matrices de distancia. Para analizar la afinidad existente entre las OTU, se realizaron análisis de agrupamientos ("Cluster") mediante la aplicación de distintos métodos (Sneath y Sokal, 1973) sobre la base de ambas matrices. Se calculó la distorsión introducida durante el proceso de agrupamiento mediante el coeficiente de correlación cofenético (r) desarrollado por Sokal y Rohlf (1962). Sus valores oscilan generalmente entre 0,6 y 0,9, siendo los cercanos o mayores de 0,8 indicadores de escasa distorsión.

Tabla 2.— Matriz de distancias (Distancias Taxonómicas Promedio)

	P. ruscifolia	P. nigra	P. alba	P. hassleri
P. ruscifolia	0,000			
P. nigra	0,168	0,000		
P. alba	0,173	0,169	0,000	
P. hassleri	0,168	0,183	0,135	0,000

Tabla 3.— Matriz de distancias (Distancias Manhattan)

	P. ruscifolia	P. nigra	P. alba	P. hassleri
P. ruscifolia	0,00			
P. nigra	5,97	0,00		
P. alba	6,01	5,35	0,00	
P. hassleri	6,10	6,47	4,35	0,00

También se calculó el coeficiente de congruencia entre los fenogramas obtenidos. Con el mismo objeto y a partir de la matriz de Distancias Manhattan, se confeccionó un Arbol de Valor Mínimo (Prim, 1957) que es también una forma de análisis de agrupamientos representado por un diagrama en el cual, la suma de la totalidad de las distancias es mínima.

Tabla 1.— Matriz Básica de datos. Frecuencias de cada banda observadas en cada una de las especies.

ESPECIE	NUMERO DE BANDA																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
P. alba	0,20	0,36	1,00	0,00	0,00	0,06	1,00	0,04	0,01	0,74	0,48	0,03	0,15	1,00	0,01	0,00	0,60
P. hassleri	0,06	0,41	1,00	0,00	0,00	0,10	1,00	0,00	0,02	0,81	0,48	0,10	0,10	1,00	0,00	0,03	0,63
P. nigra	0,06	0,33	1,00	0,00	0,00	0,04	1,00	0,06	0,09	0,63	0,63	0,04	0,23	1,00	0,00	0,08	0,78
P. ruscifolia	0,31	0,50	1,00	0,004	0,02	0,03	1,00	0,03	0,33	0,79	0,46	0,12	0,32	1,00	0,06	0,06	0,86
ESPECIE	BANDA																
	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
P. alba	0,82	0,00	0,32	0,50	0,46	0,31	0,51	0,73	0,00	0,00	0,00	0,49	0,29	0,71	0,98	1,00	0,44
P. hassleri	0,75	0,00	0,33	0,57	0,44	0,38	0,40	0,62	0,38	0,02	0,27	0,29	0,43	0,51	1,00	1,00	0,60
P. nigra	0,74	0,12	0,71	0,90	0,19	0,09	0,08	0,73	0,00	0,01	0,10	0,06	0,79	0,54	1,00	1,00	0,40
P. ruscifolia	0,89	0,02	0,55	0,77	0,38	0,09	0,27	0,68	0,20	0,00	0,15	0,13	0,82	0,83	0,99	1,00	0,65
ESPECIE	BANDA																
	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49		
P. alba	0,50	0,35	0,33	0,02	0,29	0,23	0,51	0,36	0,16	0,05	0,39	0,00	0,08	0,00	0,40		
P. hassleri	0,62	0,56	0,22	0,11	0,22	0,43	0,51	0,48	0,51	0,02	0,24	0,00	0,51	0,06	0,38		
P. nigra	0,70	0,33	0,16	0,07	0,21	0,13	0,37	0,32	0,23	0,01	0,44	0,00	0,03	0,23	0,51		
P. ruscifolia	0,29	0,44	0,56	0,02	0,30	0,16	0,71	0,75	0,42	0,02	0,50	0,04	0,30	0,04	0,42		

RESULTADOS

El total de bandas encontrado fue de 49. Las mismas fueron numeradas de acuerdo a su movilidad catódica, comenzando por la de menor movilidad.

Las bandas 3, 7 y 14 son constantes para las cuatro especies estudiadas. Las muestras de *P. ruscifolia*, *P. nigra* y *P. hassleri* presentan siempre la banda 33 que apareció también en un 98% de los individuos de *P. alba*. La banda 32, también se presenta en alta frecuencia en las cuatro especies, siendo constante para todos los individuos de *P. nigra* y *P. hassleri*.

Las bandas 4, 5 y 46 sólo se encontraron en muy pocos individuos de *P. ruscifolia*, estando ausentes en el resto de las especies.

Las bandas 8, 15, 16, 19, 27, 28, 44 y 48 se hallan en baja frecuencia en las cuatro especies, estando alternativamente ausentes en algunas de ellas a saber: la 8 en *P. hassleri*, la 15 en esta especie y en *P. nigra*, la 19 en *P. hassleri* y *P. alba*, la banda 44 sólo ausente en *P. nigra*, la 27 en *P. ruscifolia* y *P. alba* y 28 y 48 no fueron encontradas en ningún individuo de *P. alba*. La banda 26 presentó frecuencia intermedia en *P. hassleri*, baja en *P. ruscifolia* y *P. alba* y estuvo ausente en *P. nigra*.

No se encontraron bandas "marcadoras" y exclusivas de ninguna de las especies estudiadas; por lo tanto, al no existir un electroforegrama característico para cada especie, no se consideró conveniente el confeccionar un esquema para representar a cada una de las especies, ya que cualquier criterio de presencia o ausencia que se considerara distorsionaría mucho los datos. Por esto último es que el estudio de la variabilidad interespecífica se realizó sobre la base de las frecuencias observadas de cada banda proteica en cada una de las especies. Dichas frecuencias observadas se resumen en la Tabla 1.

Las distancias Taxonómicas Promedio y Manhattan, calculadas considerando los datos indicados en la Tabla 1 se registraron en las Tablas 2 y 3 respectivamente.

La Figura 2 muestra dos de los fenogramas realizados: los obtenidos por el método de medias no ponderadas (UPGMA), uno basado en la matriz de distancias Taxonómicas Promedio (Tabla 2) y el otro en la de distancias Manhattan (Tabla 3). Se indican también los coeficientes de correlación fenética y el coeficiente de congruencia.

La Figura 3 es el Arbol de Valor Mínimo, obtenido a partir de los datos de la Tabla 3.

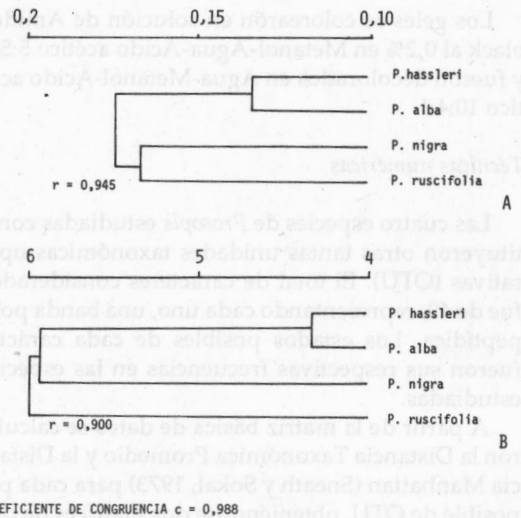


Fig. 2.— Fenogramas obtenidos mediante el método de pares no pesados basados en medias aritméticas (UPGMA). A: Fenograma basado en Distancias Taxonómicas Promedio. B: Fenograma basado en Distancias Manhattan.

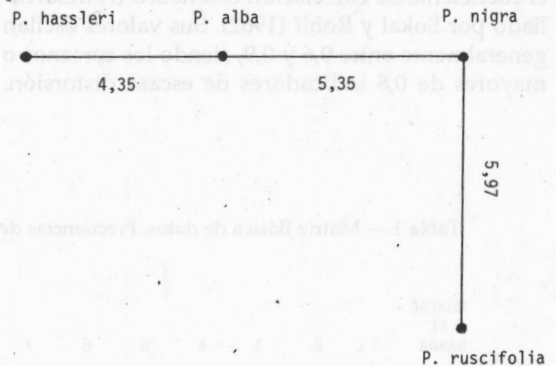


Fig. 3.— Arbol de Valor Mínimo (Retículo de Prim)

DISCUSION

Burkart (1976) incluye a las cuatro especies estudiadas en el presente trabajo dentro de la sección *Algarobia* y considera a *P. alba* y *P. nigra* como pertenecientes a la serie *Chilenses* y a *P. ruscifolia* y *P. hassleri* a la serie *Ruscifoliae*.

Si bien el tratamiento sobre la base de estudios morfológicos (basados principalmente en características foliares) llevado a cabo por Burkart (1976) determinó la inclusión de *P. alba* y *P. hassleri* en

diferentes series, las distancias calculadas sobre la base de datos electroforéticos de proteínas seminales indican una gran similitud entre estas dos especies y los distintos métodos de agrupamiento son congruentes en reunir las en un mismo núcleo taxonómico. Los estudios cromatográficos (Palacios y Bravo, 1981) y los análisis isoenzimáticos (Saidman, 1984, 1985) coinciden en estimar una alta similitud entre estas dos especies. Además, la existencia de individuos híbridos interespecíficos entre ambas es significativa (once, según lo señalado por Palacios y Bravo (1981), considerada con respecto a los híbridos entre *P. alba* y la otra especie de la misma serie: *P. nigra*).

P. alba y *P. nigra* son morfológicamente muy similares y viven simpátricamente en amplias regiones de nuestro país, sin embargo los híbridos citados son escasos: dos para la región chaqueña (Palacios y Bravo, 1981) y dos en la provincia de Entre Ríos (Naranjo et al., 1984).

P. nigra es una especie que tiene amplia distribución geográfica, desarrollándose en zonas con 200 mm de precipitación media anual, hasta 1200 mm y desde el nivel del mar hasta 2500 m s. m. Su afinidad con las otras especies estudiadas no puede esclarecerse totalmente mediante la electroforesis de proteínas seminales. Los estudios cromatográficos (Palacios y Bravo, 1981) señalan una mayor similitud entre *P. nigra* y *P. alba* que entre la primera y *P. ruscifolia*, sin embargo, estas dos comparten dos manchas en forma exclusiva (Palacios y Bravo, 1981: 26); asimismo, Saidman (1985) encontró mayor similitud isoenzimática entre *P. alba* y *P. nigra* que entre ésta y *P. ruscifolia*, pero señala que "en algunos individuos de *P. nigra* y *P. ruscifolia*, las intensidades de coloración relativa de las bandas de ADH se apartan de las esperadas, hecho que sugeriría una incipiente divergencia genética entre estas especies y *P. alba* y *P. hassleri*". Los distintos fenogramas obtenidos sobre la base del presente estudio electroforético, a pesar de ser altamente congruentes (según lo indica el coeficiente de congruencia calculado) difieren en la ubicación de *P. nigra* ya que algunos la agrupan con *P. ruscifolia* y otros dentro del núcleo formado por *P. alba* y *P. hassleri*. En el Arbol de Valor Mínimo (Fig. 3) se visualiza que *P. nigra* es un taxón intermedio entre *P. ruscifolia* y *P. alba*, más cercano a ésta última; una similitud más baja con *P. hassleri* podría producir su agrupamiento alternativo con *P. ruscifolia*. Las diferencias entre *P. hassleri* y *P. nigra* son las más pronunciadas a nivel electroforético; en este caso existe concordancia con la división infragenérica propuesta por Burkart (1976). Esta, además, está en cierta forma evidenciada por los pocos individuos híbridos de ese origen (*P. hassleri*

x *P. nigra*) encontrados (Palacios, obs. personales); lo cual indicaría poca afinidad entre ambas.

P. ruscifolia es una especie invasora que ocupa grandes espacios caracterizados por modificaciones naturales del ambiente (inundaciones por cambio de los cauces y desbordes de los ríos, principalmente los ríos Pilcomayo y Dulce) y por la actividad humana (sobrepastoreo, tala, quema, agricultura, etc.). El área de distribución coincide con las de las otras tres especies, habiéndose detectado híbridos con todas ellas (Palacios y Bravo, 1981). Los híbridos *P. ruscifolia* x *P. alba* son los más frecuentes pero la presencia de dichos híbridos se da principalmente en Santiago del Estero, hallándose con menor frecuencia en otras procedencias estudiadas (Palacios, obs. personales); ésto podría indicar que existen diferencias genéticas entre poblaciones de *P. alba* o de *P. ruscifolia*. Estudios preliminares (Burghardt, en preparación) indicarían que las homologías proteicas entre procedencias de *P. alba* son mayores que las existentes entre poblaciones de *P. ruscifolia*. La ocurrencia de mayor cantidad de híbridos en Sgo. del Estero puede ser debida a condiciones ambientales que permitieron la manifestación de la hibridación. La presencia de asentamientos europeos en esta área datan de hace aproximadamente 400 años y la devastación de la masa boscosa determinó la existencia de hábitats abiertos que habrían permitido el desarrollo de mayor cantidad de individuos híbridos; no siendo, en este caso, necesariamente correlacionada su presencia con una mayor similitud genética entre las especies involucradas. A pesar de su similitud exomorfológica (folíolos grandes) son relativamente pocos los individuos híbridos detectados en la naturaleza entre *P. ruscifolia* y *P. hassleri*, lo cual está relacionado con la menor similitud de sus patrones electroforéticos de proteínas seminales.

CONCLUSIONES

Los puntos principales a destacar son los siguientes:

- Gran homología proteica interespecífica que no permite una identificación precisa mediante electroforegramas característicos, debido a la falta de bandas marcadoras.
- Alta similitud entre *P. alba* y *P. hassleri*, lo cual no está en concordancia con su posición en el sistema taxonómico de Burkart (1976).
- Posición incierta de *P. nigra*, que por su morfología está próxima a *P. alba* (Burkart, 1976) y que los datos cromatográficos (Palacios y Bravo, 1981), isoenzimáticos (Saidman, 1984, 1985) y los aquí presentados la colocan en una posición intermedia entre *P. alba* y *P. ruscifolia*.

d) Separación manifiesta entre *P. hassleri* y *P. ruscifolia*, lo cual coincide con los datos cromatográficos (Palacios y Bravo, 1981) y electroforéticos (Saidman, 1984, 1985; Hunziker et al., 1986; Burghardt y Palacios, 1981, 1984).

Las evidencias presentadas en este trabajo, conjuntamente con las de Saidman (1985) y Hunziker et al. (1986), sugieren la realización de un replanteo de las divisiones infragenéricas en el género *Prosopis*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias a subsidios otorgados por el C.O.N.I.C.E.T. y la SECYT. Los autores desean expresar su agradecimiento a los Dres. Carlos A. Naranjo y Lidia Poggio por la lectura crítica del manuscrito y sus valiosas sugerencias.

BIBLIOGRAFIA

- BURGHARDT, A. D. 1982. Estudios electroforéticos en el género *Prosopis* (Leguminosae). XIII Congreso de la Soc. Arg. de Genética. Resúmenes: 74.
- y R. A. PALACIOS. 1981. Caracterización electroforética de algunas especies de *Prosopis* (Leguminosae). XII Congr. Arg. de Genética. Resúmenes: 11.
- 1984. Variabilidad electroforética en cuatro especies de *Prosopis* (Leguminosae). XV Congr. Arg. de Genét. Resúmenes: 65.
- BURKART, A. 1952. *Las Leguminosas Argentinas Silvestres y Cultivadas*. Buenos Aires. Edit. Acme.
- 1976. A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam. Mimosoideae). J. Arnold. Arbor. Harv. Univ. 57 (3): 217-249; (4): 450-530.
- CARMAN, N. J. 1973. Systematic and ecological investigations in the genus *Prosopis* (Mimosaceae) emphasizing the natural products chemistry. Ph. D. Thesis Univ. of Texas, Austin.
- 1977. Cap. 3. Patterns of Variation. Variation in the natural products chemistry. En *Mesquite. Its Biology in Two Desert Scrub Ecosystems*. B. B. Simpson (Ed.). Dowden Hutchinson & Ross Inc. Stroudsburg, Pennsylvania: 50-54.
- GIANINETTO, I. B.; J. L. CABRERA; J. C. OBERTI & H. R. JULIANI. 1975. Flavonoids compounds of the genus *Prosopis* (Leguminosae). I. *Lloydia* 38 (3): 265.
- 1976a. Flavonoids in genus *Prosopis* (Leguminosae) II. *Phytochem.* 15: 1098.
- 1976b. Flavonoids in genus *Prosopis* (Leguminosae) III. *Phytochem.* 15: 2027.
- GITELLI, A. M.; I. B. GIANINETTO; J. L. CABRERA & H. R. JULIANI. 1981. Flavonoides en el género *Prosopis* (Leguminosae) IV. *Anales de la Asoc. Quím. Arg.* 69: 33-36.
- 1984. Flavonoids in *Prosopis* V. *Anales Asoc. Quím. Arg.* 72 (5): 501-504.
- HOLMGREN, P. K. & W. KEUKEN. 1974. *Index Herbariorum. Part. 1. The Herbaria of the World*. En *Regnum Vegetabile* Vol. 92. Utrecht, Netherlands: 397 pp.
- HUNZIKER, J. H.; L. POGGIO; C. A. NARANJO; R. A. PALACIOS & A. B. ANDRADA. 1975. Cytogenetics of some species and natural hybrids in *Prosopis* (Leguminosae) *Can. J. Genet. Cytol.* 17: 253-262.
- C. A. NARANJO; R. A. PALACIOS & L. POGGIO. 1977. Chromosomal cytology and hybridization. En B. Simpson (Ed.) *Mesquite. Its Biology in Two Desert Scrub Ecosystems* US/IBP. *Synthesis Series* 4 Cap. 3: 56-59. Dowden, Hutchinson & Ross. Stroudsburg, Pennsylvania.
- B. O. SAIDMAN; C. A. NARANJO; R. A. PALACIOS; L. POGGIO & A. D. BURGHARDT. 1986. Hybridization and genetic variation of argentine species of *Prosopis*. *Forest Ecology and Management* 16: 301-315.
- LADIZINSKY, G. & T. HYMOWITZ. 1979. Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary Studies. *Theor. Appl. Genet.* 54: 145-151.
- MADRIÑAN POLO, C.; J. H. HUNZIKER & P. CATTANEO. 1976. Aceites de semilla de especies de *Prosopis* y *Prosopidastrum*. *Anales Asoc. Quím. Arg.* 64: 127-138.
- NARANJO, C. A.; L. POGGIO & S. ENUS ZEIGER. 1984. Phenol chromatography, morphology and cytogenetics in three species and natural hybrids of *Prosopis* (Leguminosae-Mimosoideae). *Pl. Syst. Evol.* 144: 257-276.
- PALACIOS, R. A. & L. BRAVO. 1974. Estudio morfológico de las semillas de algunos *Prosopis* del Nordeste Argentino. *Darwiniana* 18: 437-452.
- 1981. Hibridación natural en *Prosopis* (Leguminosae) en la Región Chaqueña Argentina. Evidencias morfológicas y cromatográficas. *Darwiniana* 23 (1): 3-35.
- PRIM, R. C. 1957. Shortest connection networks and some generalizations. *Bell. Syst. Tech. J.* 36: 1389.
- SAIDMAN, B. O. 1984. Estudio isoenzimático en especies de *Prosopis* (Leguminosae) XV Congr. Arg. de Genét. Resúmenes: 66.
- SAIDMAN, B. O. 1985. Estudio de la variación alozímica en el género *Prosopis*. *Tesis Doctoral. Univ. Bs. As.*
- SIMPSON, B. 1977. Breeding systems of dominant perennial plants of two disjunct warm desert ecosystems. *Oecologia* (Berl) 27: 203-226.
- J. L. NEFF & A. R. MOLDENKE. 1977. *Prosopis*. Flower as a resource. En B. Simpson (Ed.) *Mesquite. Its Biology in Two Desert Scrub Ecosystems* US/IBP *Synthesis Series* 4 Cap. 5: 84-107. Dowden, Hutchinson & Ross. Stroudsburg, Penn.
- SNEATH, P. H. A. & R. R. SOKAL. 1973. *Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification*. San Francisco. W. Freeman.
- SOKAL, R. R. & F. J. ROHLF. 1962. The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon* 11: 33-40.