

CROMATOGRAFIA DE COMPUESTOS FENOLICOS EN EL GENERO BULNESIA

Por LIDIA POGGIO ¹

SUMMARY

This paper deals with a thin layer chromatographic study of the phenolic compounds of the leaves of seven species of the genus *Bulnesia* (Zygophyllaceae). A technique that prevents the exfoliation of the layer has been developed; chloroform is used as a second solvent, employing industrial polyamide. Thirty three compounds were differentiated by their relative position, colour under U.V. with and without exposition to ammonia vapor.

Each species could be identified by its chromatographic profile. The analysis of the profiles and phenograms obtained by numerical methods would indicate that the Northern South-American species *B. arborea* and *B. carrapo* are closely related to each other because the four compounds of *B. carrapo* are all present in *B. arborea*.

There are no significant differences in the chromatograms of Venezuelan and Colombian populations of *B. arborea*. The Southern South-American species: *B. bonariensis*, *B. foliosa* and *B. schickendantzii* would be closely related among them and with the Northern species because they possess two to three compounds in common.

On the other hand, *B. retama* and *B. sarmientoii* would be quite isolated from the rest of the species and between each other.

As noted earlier by the present and other authors, *B. sarmientoii* is an arboreal species, morphologically specialized, with extreme reductions in several morphological characteristics. Besides, it possess the smallest chromosomes and the lower DNA nuclear content. The present chromatographic study has revealed that this species possesses only one compound in common with *B. arborea*, *B. carrapo*, *B. foliosa* and *B. schickendantzii* and none with *B. bonariensis* and *B. retama*.

B. retama, as has been pointed in earlier studies, is the most extreme xerophyte in Argentina; it possesses larger chromosomes and a more asymmetric karyotype than the rest of the species studied; it also has the higher nu-

¹ Depto. de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 1428 Buenos Aires, Argentina. Carrera del Investigador Científico (CONICET).

Aceptado para su publicación: el 28-III-1979.

clear DNA content. It was demonstrated that this species has not any compound in common with the other species studied.

Preliminary work of phenolic compounds in leaves in the genera *Portieria* and *Plectrocarpa*, would indicate the existence of compounds that could be important markers in the study of generic relationships.

INTRODUCCION

Los compuestos fenólicos secundarios en plantas han sido muy valiosos en estudios biosistemáticos. Han sido utilizados para conocer el origen de híbridos y poliploides, obtener información acerca de las relaciones existentes entre distintos taxones y analizar los efectos del aislamiento geográfico o ecológico de ciertos grupos (Alston, 1965; Alston and Turner, 1962, 1963; Brehm and Ownbey, 1965; Hsiao, 1973; Fröst and Holm, 1972; Hunziker et al., 1978; Stebbins et al., 1963).

El género *Bulnesia* C. Gay que pertenece a la subfamilia *Zygophylloideae* presenta distribución disyunta entre el Norte y el Sur de Sudamérica y estaría integrado por ocho especies: *B. arborea* (Jacq.) Engler (Norte de Colombia y Venezuela) y *B. carrapo* Killip et Dugand (Centro de Colombia) se encuentran en el Norte, mientras que las seis especies restantes se distribuyen a partir de la región chaqueña en Paraguay y Bolivia hacia el Sur: *B. sarmientoi* Lor. ex. Griseb., *B. bonariensis* Griseb., *B. foliosa* Griseb., *B. schickendantzii* Hieron. ex Griseb., *B. chilensis* C. Gay (Chile) y *B. retama* (Gill ex Hook). Esta última se encuentra también en Perú.

En este trabajo se analizan los perfiles cromatográficos de siete especies con la finalidad de determinar sus patrones cromatográficos y analizar, por medio de ellos, sus relaciones taxonómicas. Además, se integrarán estos datos con los estudios morfológicos (Palacios y Hunziker, en preparación; Crisci et al., 1979), electroforéticos (Comas y Hunziker, 1977), cromosómicos (Poggio, 1977 a, b) y contenido de DNA nuclear (Poggio, 1977 b, 1977 c) que se han realizado en el género. Estos estudios permitirán establecer, además, las relaciones que existen entre *Bulnesia* y otros géneros de la misma subfamilia.

MATERIALES Y METODOS

Los ejemplares de herbario de los materiales estudiados se encuentran depositados en el herbario de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de Buenos Aires (BAFC). Todos los ejemplares de *B. arborea*, *B. carrapo*, *Plectrocarpa tetracantha* y *Portieria microphylla* fueron coleccionados e identificados por Juan H. Hunziker; las restantes especies fueron coleccionadas e identificadas por J. H. Hunziker, C. A. Naranjo y R. A. Palacios.

- Bulnesia arborea*: COLOMBIA: Depto. Bolívar = 9609, 9611, 9476, 9477, 9479, 9480, 9481 (BAFC). VENEZUELA: Estado Carabobo = 9033, 9035 (BAFC); Estado Lara = 9037, 9038, 9039, 9040, Tillet 7311 (642 a, b, c); Estado Aragua = 9041, 9042 (BAFC).
- Bulnesia carrapo*: COLOMBIA: Depto. Tolima = 9449 (7 individuos), 9618 (BAFC); Depto. Cundinamarca = 9622 (BAFC).
- Bulnesia bonariensis*: ARGENTINA: Prov. Salta, Depto. Metán = 9211 (BAFC). Prov. Tucumán, Depto. Trancas = 9205, 9206 (BAFC).-Prov. La Rioja, Departamento Gral. Belgrano = 9046, 9048, 9490, 9134 (BAFC); Depto. Independencia = 9142, 9153, 9154 (BAFC).
- Bulnesia foliosa*: ARGENTINA: Prov. Catamarca, Depto. Capital = 9159 (BAFC); Depto. Fray Mamerto Esquiú = 9163 (BAFC); Depto. Capayán = 9593 (BAFC).-Prov. La Rioja, Depto. Gral. Ocampo = 9126, 9124, 9127, 9129, 9133, 9135 (BAFC); Depto. Independencia = 9144, 9146, 9147, 9150 (BAFC); Depto. Gral. Belgrano = 9491 (BAFC).
- Bulnesia schikendantzii*: ARGENTINA: Prov. Salta, Depto. San Carlos = 9024 (BAFC). Prov. Catamarca, Depto. Andalgalá = 9188, 9195 (BAFC); Depto. Tinogasta = 9558 (BAFC).
- Bulnesia retama*: ARGENTINA: Prov. Catamarca, Depto. Andalgalá = 9192 (BAFC); Depto. Pomán = 9576 (BAFC).-Prov. La Rioja, Depto. Independencia = 9139, 9152; 9645 (Nº cultivo 408); Depto. Capital = 9157, 9651 (Nº cult. 423) (BAFC); Depto. Gral. Roca = 9113 (BAFC). Prov. San Juan, Depto. Calingasta = 9084, 9088, 9092 (BAFC); Depto. Caucete = 9099, 9103 (BAFC).-Prov. San Luis, Depto. Capital = 9059, 9061 (BAFC).-Prov. Mendoza, Depto. Las Heras = 9066, 9069 (BAFC).
- Bulnesia sarmientoi*: ARGENTINA: Prov. Salta, Depto. Gral. José de San Martín = 9212, 9214, 9216, 9217, 9219 (BAFC); Depto. Rivadavia = 9220, 9222 (BAFC). Prov. Formosa, Depto. Matacos = 9223 (BAFC); Depto. Pilcomayo = RAP 471 (BAFC).
- Plectrocarpa tetracantha*: ARGENTINA: Prov. La Rioja, Depto. Independencia = 9644 (Nº cult. 409) (BAFC).-Prov. San Juan, Depto. Caucete = 9097 (BAFC).
- Portieria michophylla*: ARGENTINA: Prov. Tucumán, Depto. Trancas = 9201 (BAFC). Prov. Córdoba = 9043, (Nº cult. 410) (BAFC).

El material coleccionado fue secado a 45° C. Se molió 1 g de hojas secas y se extrajo en metanol 80 % durante 24 horas a temperatura ambiente (20 a 24° C). El extracto metílico filtrado fue reducido a sequedad con evaporador rotativo a presión reducida. El residuo fue redissuelto en 1 ml de agua destilada y lavado con éter etílico varias veces.

B. retama posee hojas sólo en las ramas muy jóvenes y es muy difícil hallarlas durante el período de floración (Descole et al., 1940) por lo tanto los extractos se realizaron moliendo tallos verdes delgados. En dos individuos se pudieron estudiar los compuestos fenólicos en hojas.

La cromatografía bidimensional en papel utilizando distintos sistemas de solventes no ofreció buena resolución (Poggio, 1977 b). Por tal motivo se realizó cromatografía bidimensional en capa delgada utilizando poliamida como adsorbente. Se probaron once sistemas distintos de solventes (Poggio, 1977 b) y el que mejor resolución dio fue: en la 1ª dirección 13 agua destilada: 3 metanol: 3 metiletiletona: 1 acetilacetona; 2ª dirección: 9 cloroformo: 4 metanol: 2 me-

tiletilcetona. El problema que se presentó utilizando este sistema de solventes fue el desprendimiento de la poliamida que se producía al colocar la placa en el segundo solvente. Probablemente esto se debería a que las moléculas de poliamida se hidratan en el primer solvente (muy rico en agua) y sufren una brusca contracción en el segundo solvente que contiene una alta proporción de cloroformo. Se logró una mejor adherencia entre el soporte y la poliamida teniendo en cuenta los siguientes factores: a) limpieza del soporte de vidrio: se hierven durante 4-5 horas en agua jabonosa, se cepillan, se enjuagan con agua destilada y se secan en estufa a 100° C aproximadamente; b) preparación de la poliamida, la proporción que mejor resultado dio fue 5 g de poliamida en 45 ml de cloroformo y metanol en una proporción 1:4; c) espesor de la placa de poliamida: sobre la placa de vidrio de 20 × 20 cm se distribuyó la poliamida (en forma mecánica o manual) con un espesor entre 1,5-2 μ .

El hallazgo de una técnica que permita la utilización de cloroformo como segundo solvente en cromatografía bidimensional en capa delgada utilizando poliamida industrial como adsorbente, sin que se produzca desprendimiento de la misma, es importante ya que este problema se ha presentado reiteradamente en otros laboratorios (Dr. D. Seigler, Universidad de Illinois, U.S.A., comunicación verbal).

La observación de los compuestos fenólicos se realizó bajo luz U.V. (3600 Å) con y sin exposición a vapores de amoníaco. La documentación de los resultados fue realizada mediante dibujos, copias fotostáticas utilizando papel heliográfico y fotografía en blanco y negro.

Para el estudio numérico, las siete especies constituyen los OTU's (Unidades Taxonómicas Operacionales). La matriz básica de datos MBD (Tabla II), se confeccionó con los 7 OTU's y 33 caracteres (compuestos fenólicos). Para estimar la similitud entre cada par de OTU's se utilizaron los coeficientes de correlación del momento producto de Pearson y el de distancia ("Taxonomic distance"); para efectuar el agrupamiento ("clustering") de los datos se usó el método de los pares no pesados utilizando medias aritméticas (UPGMA). Para cada uno de los métodos de agrupamiento se calculó el coeficiente de correlación cofenético (r) (Sneath and Sokal, 1973): Los datos fueron procesados en una IBM 360/50 utilizando los programas NT-SYS "System of Multivariate Computer Programs" diseñados por Rohlf, Kishpaugh y Kirk (1971), en el Centro de Estudios Superiores para Procesamiento de Información (C.E.S.P.I.) de la Universidad de La Plata.

RESULTADOS

Se encontraron en el género 33 compuestos que se diferencian entre sí por su posición relativa, color en U.V. con y sin exposición a vapores de amoníaco (tabla I, II y fig. 1). En la tabla I se indican

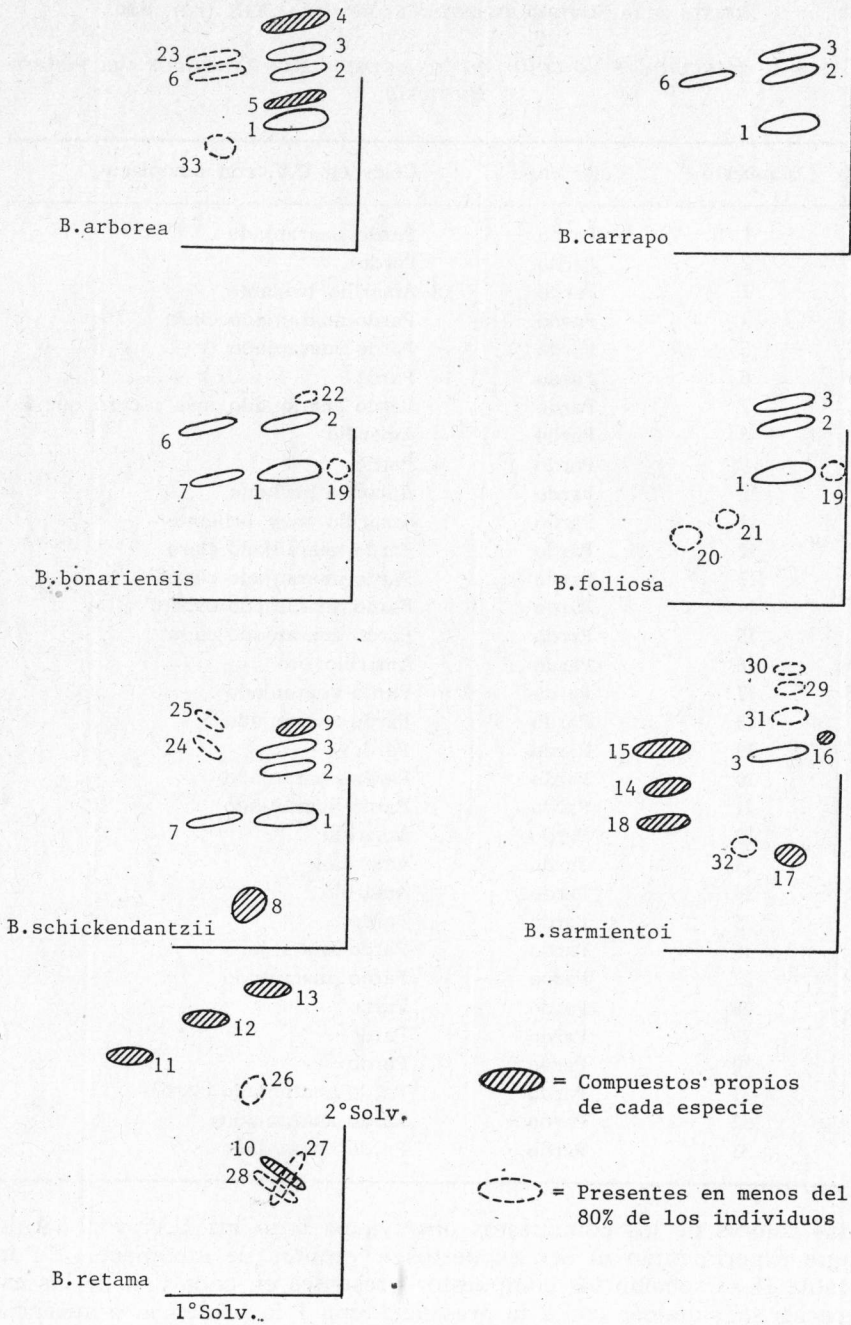


Fig. 1.— Representación esquemática de los cromatogramas de las especies de *Bulnesia*.

TABLA I. *Reacciones de color en los compuestos fenólicos del género Bulnesia*

Compuesto	Color en U.V.	Color en U.V. con amoníaco
1	Pardo	Pardo anaranjado
2	Pardo	Pardo
3	Pardo	Amarillo brillante
4	Pardo	Pardo anaranjado claro
5	Pardo	Pardo anaranjado
6	Pardo	Pardo
7	Pardo	Pardo anaranjado más oscuro que 1
8	Pardo	Amarillo
9	Pardo	Pardo
10	Pardo	Amarillo brillante
11	Pardo	Amarillo muy brillante
12	Pardo	Pardo anaranjado claro
13	Pardo	Pardo anaranjado claro
14	Pardo	Pardo anaranjado oscuro
15	Pardo	Pardo anaranjado claro
16	Pardo	Amarillo oro
17	Pardo	Pardo anaranjado
18	Pardo	Pardo anaranjado
19	Pardo	Pardo
20	Pardo	Pardo anaranjado
21	Pardo	Pardo anaranjado
22	Pardo	Amarillo
23	Pardo	Amarillo
24	Pardo	Amarillo
25	Pardo	Pardo
26	Pardo	Pardo anaranjado
27	Pardo	Pardo anaranjado
28	Pardo	Pardo
29	Pardo	Pardo
30	Pardo	Pardo
31	Pardo	Pardo anaranjado claro
32	Pardo	Pardo anaranjado
33	Pardo	Pardo anaranjado

los colores de los compuestos observados bajo luz U.V. y el viraje que experimentan al ser expuestos a vapores de amoníaco. En la tabla II se señalan los compuestos presentes en cada una de las especies señalándose con 2 la presencia, con 1 la presencia o ausencia y con 0 la ausencia. La figura 1 representa en forma esquemática

TABLA II. Matriz básica de datos

Otu's	Compuestos																																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33			
<i>B. arborea</i>	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
<i>B. carrapo</i>	2	2	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>B. honariensis</i>	2	2	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>B. foliosa</i>	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>B. schickendantzii</i>	2	2	2	0	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>B. retama</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0		
<i>B. sarmientoi</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0

los cromatogramas de las siete especies estudiadas; se representan rayados los compuestos que son propios de cada especie y con línea punteada los que se presentan en menos del 80 % de los individuos estudiados.

En *B. arborea* se estudiaron individuos procedentes de Colombia y de Venezuela. Los individuos de ambas procedencias poseen los compuestos 1, 2, 3 y 5 en diecisiete de los dieciocho individuos estudiados; el compuesto 4 aparece en el 80 % de los once individuos de Venezuela y en el 100 % de los siete de Colombia. Los compuestos 23, 6 y 33 se presentan en menos del 80 % de los individuos estudiados. Un individuo de Venezuela (9033) que no posee los compuestos 4 y 5, pero posee el 6, presentaría un cromatograma similar al típico de *B. carrapo*.

B. carrapo presenta, en los nueve individuos estudiados, cuatro compuestos: 1, 2, 3 y 6 en alta concentración el primero y mediana concentración los restantes.

B. bonariensis posee cuatro compuestos en los diez individuos estudiados: 1, 2, 6 y 7; además, cuatro individuos presentan el compuesto 19, tres el compuesto 22 y uno los compuestos 19 y 22 simultáneamente.

En *B. foliosa* se estudiaron quince individuos, todos presentan los compuestos 1, 2 y 3, estando 1 en muy alta concentración y 2 y 3 en mediana concentración respecto a 1; siete individuos presentan el compuesto 19 exclusivamente; uno presenta 19, 20 y 21 y dos tienen 20 y 21.

En *B. schickendantzii* se estudiaron cuatro individuos, tres de ellos poseen los compuestos 1, 2, 3, 7, 8 y 9, faltando este último en el individuo restante. De los tres primeros uno de los individuos posee, además, los compuestos 24 y 25 y dos poseen el compuesto 24 solamente.

En *B. sarmientoi* los nueve individuos estudiados presentan los compuestos 3, 14, 15, 16, 17 y 18. El compuesto 17 se presenta en muy baja concentración, observándose trazas en la mayoría de los individuos estudiados. Los compuestos 29, 30, 31 y 32 se presentan en menos del 55 % de los individuos estudiados.

En los quince individuos estudiados de *B. retama* se observaron los compuestos 10, 11 y 12; el 13 estuvo presente en 14 de ellos; de estos últimos, cinco individuos poseerían el compuesto 26 y uno los compuestos 26 y 27. Dos individuos jóvenes en que se estudiaron compuestos fenólicos en hojas, poseerían los compuestos 10, 11 y 12; el 13 estaría ausente; uno de los individuos presenta el compuesto 26 y ambos presentarían un nuevo compuesto que se denominó 28.

Existe bastante coincidencia en el ordenamiento de los siete OTU's en el desarrollo del método UPGMA con los coeficientes de correlación y distancia utilizados (fig. 2 A, B).

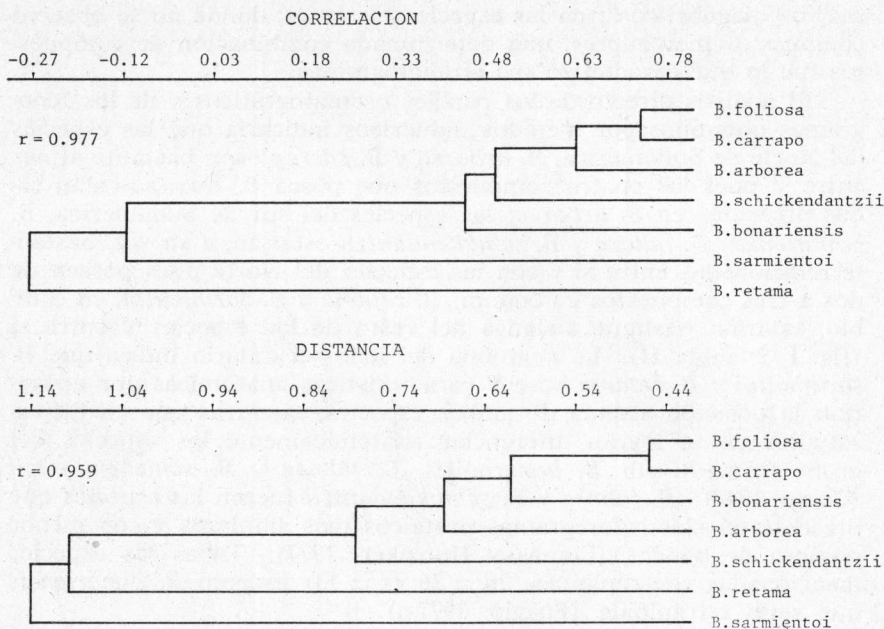


FIG. 2.— Fenogramas obtenidos utilizando coeficientes de correlación y distancia: A = Coef. de correlación de Pearson, método UPGMA; B = Coef. "Distancia Taxonómica", método UPGMA; r = coeficiente de correlación cofenética.

Los métodos desarrollados indicarían la existencia de tres grupos fenéticos: 1) *B. arborea*, *B. carrapo*, *B. foliosa*, *B. bonariensis* y *B. schickendantzii*, 2) *B. sarmientoi* y 3) *B. retama*.

Las cinco especies del primer grupo poseen cromatogramas que las caracterizan. Las variaciones en la afinidad de los OTU's según el coeficiente utilizado se podrían deber al hecho de poseer bajo número total de compuestos y pocos marcadores. Por este motivo, no será conveniente hacer inferencias acerca de las relaciones entre las especies del primer grupo fenético a partir de las hipótesis generadas por los fenogramas.

DISCUSION

El estudio de los compuestos fenólicos secundarios ha permitido en el género *Bulnesia* diferenciar cada una de las especies a través de sus perfiles cromatográficos. Hay varios compuestos comunes a más de un taxon, lo que indicaría la existencia de sistemas metabólicos similares. En cuatro especies se observaron compuestos "marcado-

res" o "diagnósticos"; en las especies restantes, donde no se observó compuestos marcadores, una determinada combinación de compuestos fue lo que caracterizó sus cromatogramas.

El análisis directo de los perfiles cromatográficos y de los fenogramas obtenidos por métodos numéricos indicaría que las especies del Norte de Sudamérica, *B. arborea* y *B. carrapo* son bastante afines entre sí pues los cuatro compuestos que posee *B. carrapo* están todos presentes en *B. arborea*; las especies del sur de Sudamérica, *B. bonariensis*, *B. foliosa* y *B. schickendantzii* estarían, a su vez, bastante relacionadas entre sí y con las especies del Norte pues poseen de dos a tres compuestos en común; *B. retama* y *B. sarmientoi*, en cambio, estarían bastante aisladas del resto de las especies y entre sí (fig. 1, 2; tabla II). La anatomía del leño secundario indica que *B. sarmientoi* y *B. retama* poseen características anatómicas que apoyarían la posición aislada de ambas especies, mientras que en dichos estudios no se logran diferenciar anatómicamente las especies del grupo formado por *B. bonariensis*, *B. foliosa* y *B. schickendantzii* (Cozzo, 1948). *B. foliosa* y *B. schickendantzii* fueron las especies que presentaron electroforegramas proteicos más similares y con menor número de bandas (Comas y Hunziker, 1977). Todas las especies mencionadas son diploides, $2n = 26$ ($x = 13$) excepto *B. bonariensis* que sería tetraploide (Poggio, 1977 a).

B. sarmientoi posee sólo el compuesto 3 en común con *B. arborea*, *B. carrapo*, *B. foliosa* y *B. schickendantzii*. Esta es una especie arbórea, morfológicamente especializada, con una extrema reducción en el número de carpelos, folíolos, tamaño de hojas y flores (Hunziker, 1978). Poseería, además, los cromosomas más pequeños y el menor contenido de DNA del género (Poggio, 1977 a, c). Diversas técnicas de taxonomía numérica en base a datos morfológicos han mostrado que sería la especie más remota y aislada (Crisci et al., 1979).

B. retama, que no posee ningún compuesto en común con las especies estudiadas, sería la especie más xerófila del género (Solbrig, 1972) y, probablemente, la xerófita arbustiva más extrema en la Argentina como resultado de varias adaptaciones histofisiológicas (Hunziker, 1978). Además, esta especie posee cromosomas de mayor tamaño y cariotipo más asimétrico que el resto de las especies estudiadas como así también un mayor contenido de DNA nuclear (Poggio, 1977 a, c).

Porter (1974) ha sugerido que las especies de *Bulnesia* del sur de Sudamérica se habrían originado de progenitores tropicales, los que estarían representados actualmente por *B. arborea* y *B. carrapo*. La especie argentina *B. bonariensis* sería la que mayor similitud presenta con éstas en cuanto al tamaño de sus flores y frutos (Palacios y Hunziker, en preparación). Estudios de taxonomía numé-

rica en base a caracteres morfológicos realizados por Crisci *et al.* (1979), apoyan también la observación anterior. *B. bonariensis*, *B. arborea* y *B. carrapo* poseerían en común el compuesto fenólico "marcador" N° 6 (tabla II, fig. 1). No existen diferencias significativas entre las poblaciones de *B. arborea* procedentes de Colombia y Venezuela en cuanto a sus cromatogramas. Además, no se han encontrado diferencias entre las poblaciones venezolanas y colombianas de *B. arborea* en cuanto a sus electroforegramas proteicos (Comas y Hunziker, 1977).

Se realizaron estudios preliminares de compuestos fenólicos en hojas de las especies *Portieria microphylla*, *P. chilensis* y *Plectrocarpa tetracantha* que pertenecen a la misma subfamilia y que poseen el mismo número básico que *Bulnesia* ($x = 13$; Poggio, 1977 a). Se ha visto que poseen los compuestos 1, 2 y 3 en todos los individuos estudiados, como así también otros compuestos que son propios de cada una de las especies (Poggio, 1977b).

En el género *Larrea*, que estaría muy relacionado con los mencionados se ha realizado un extensivo estudio de glicósidos y agliconas de flavonoides por Mabry *et al.* (1977). Con las técnicas utilizadas en el presente trabajo, se ha visto que poseería los compuestos 1, 2 y 3 mencionados (Poggio, 1977b). Dichos compuestos podrían ser, por lo tanto, indicadores importantes en el estudio de relaciones genéricas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. J. H. Hunziker la sugerencia del tema, la lectura crítica e introducción de mejoras al manuscrito, así como la recolección del material estudiado. Este fue coleccionado en parte con el Lic. C. A. Naranjo y el Ing. Agr. R. A. Palacios a quienes agradezco su colaboración. Agradezco también al Dr. J. V. Crisci por el procesamiento de los datos numéricos y asesoramientos en la interpretación de los mismos, al Dr. M. Blanco por la orientación brindada para la resolución de algunos problemas de las técnicas cromatográficas, a la Sra. Elvira de Tença por la ayuda en la preparación del material para cromatografía y al Dr. O. T. Solbrig por las facilidades ofrecidas en el Gray Herbarium de la Universidad de Harvard.

BIBLIOGRAFIA

- ALSTON, R. E., 1965. Flavonoid chemistry of *Baptisia*: a current evaluation of chemical methods in the analysis of interspecific hybridization. *Taxon*, 14(8): 268-274.
- and B. L. Turner, 1962. New techniques in analysis of complex natural hybridization. *Proceedings of the Nat. Acad. of Sci.*, 48(2):130-137.
 - 1963. Natural hybridization among four species of *Baptisia* (*Leguminosae*). *Amer. Journ. of Botany*, 50(2):159-173.

- BREHM, B. G. and M. OWNBEY, 1965. Variation in chromatographic patterns in the *Tragopogon dubius-pratensis-porrifolius* complex (Compositae). *Amer. J. Bot.*, 52:811-818.
- CÓMAS, C. I. y J. H. HUNZIKER, 1977. Electroforesis de las proteínas seminales de las especies de *Bulnesia* (Zygophyllaceae). - III Congr. Latinoamericano de Genét. Montevideo, Uruguay: 21.
- COZZO, D., 1948. Anatomía del leño secundario de las especies argentinas de la tribu Zygophylleae. *Rev. del Inst. Nac. de Inv. de Cs. Nat.*, 1(3):57.
- CRISCI, J. V., J. H. HUNZIKER, R. A. PALACIOS and C. A. NARANJO, 1979. A numerical taxonomical study of the genus *Bulnesia* (Zygophyllaceae): Cluster analysis, ordination and evolutionary trees. *Amer. J. Bot.*, 66(2):133-140.
- DESCOLE, H. R., C. A. O'DONELL y A. LOURTEIG, 1940. Revisión de las Zigofiláceas argentinas. *Lilloa*, 5:257-352.
- FRÜST, S. and G. HOLM, 1972. Thin-layer chromatographic studies of phenolic compounds in seventeen parental varieties of *Barley*. *Hereditas*, 70:259-264.
- HSIAO, JU-YING, 1973. A numerical taxonomic study of the genus *Platanus* based on morphological and phenolic characters. *Am. Journ. of Bot.*, 60(7):678.
- HUNZIKER, J. H., 1978. Multidisciplinary evolutionary studies in the genus *Bulnesia* (Zygophyllaceae). Proc. XIV Internat. Congr. Genetics. Moscow, 1.
- HUNZIKER, J. H., R. A. PALACIOS, A. G. VALESÍ y L. POGGIO, 1978. Hybridization in *Larrea* (Zygophyllaceae): a morphological, cytogenetics and chemosystematic study. *Bol. Acad. Nac. Cs. Córdoba*, 52:281-314.
- MABRY, T. J., D. R. DIFEQ, Jr., M. SAKAKIBARA, C. F. BOHNSTEDT, Jr., and D. SEIGLER, 1977. The natural products chemistry of *Larrea*. Chap. 5 en Mabry, T. J., J. H. Hunziker and D. R. DiFeo (eds.). US/IBP Synthesis Series 6 "Creosote Bush: Biology and chemistry of *Larrea* in New World Deserts. Dowden, Hutchison and Ross, Inc. Penn., 284 páginas.
- POGGIO, L., 1977 a. Estudios cromosómicos en *Bulnesia*, *Pintoa*, *Porlieria*, *Plectrocarpa* y *Sericodes* (Zygophyllaceae). *Darwiniana*, 21(1):139-151.
- 1977 b. Cromosomas, Contenido de ADN y Cromatografía de Compuestos Fenólicos en *Bulnesia* y géneros afines (Zygophyllaceae). Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- 1977 c. Variación del contenido de ADN en *Bulnesia* (Zygophyllaceae). VIII Congr. Anual Soc. Arg. Genet. Posadas (Resumen): 77.
- PORTER, D. M., 1974. Disjunct distributions in the New World Zygophyllaceae. *Taxon*, 23:339-346.
- ROHLF, F. J., J. KISPAUGH and D. KIRK, 1971. NT-SYS. Numerical Taxonomy System of Multivariate Statistical Programs. Tech. Rep. State University of New York at Stony Brook, New York (Obra no vista).
- SNEATH, P. H. A. and R. R. SOKAL, 1973. Numerical Taxonomy. W. H. Freeman and Company, San Francisco: 573 páginas.
- STEBBINS, G. L., B. HARVEY, E. L. COX, J. N. RUTGER, G. JELENCOVIC and E. YAGIL, 1963. Identification of the ancestry of an amphidiploid *Viola* with the aid of paper chromatography. *Amer. Journ. Bot.*, 50:830-839.
- SOLBRIG, O. T., 1972. The floristic disjunctions between the "Monte" in Argentina and the "Sonoran Desert" in México and the United States. *Ann. of the Miss. Bot. Garden*, 59(2):218-223.