

# Rodales semilleros de Prosopis a partir del bosque nativo

## *Prosopis seeds stands from native forest*

Verga, A.<sup>1</sup>

Recibido en octubre de 2013

### RESUMEN

Uno de los principales problemas actuales del cultivo del algarrobo es la falta de uniformidad genética de la semilla. Este inconveniente proviene del intercambio genético entre especies que se da naturalmente en este complejo. El presente trabajo tiene por objeto presentar las bases metodológicas para transformar algarrobales nativos en rodales productores de semilla más estables genéticamente, que permitan una mayor uniformidad de las plantaciones y a su vez mayores ganancias genéticas en el proceso de mejoramiento. Se presentan dos métodos de evaluación: uno morfológico taxonómico y otro mediante un marcador bioquímico a fin de establecer raleos genéticos.

**Palabras clave:** Taxonomía; Certificación; Mejoramiento Genético Forestal.

### ABSTRACT

One of the main problems of the Prosopis tree crop is the lack of genetic uniformity of the seed. This inconvenience comes from genetic exchange between species that occurs naturally in this complex. The present work aims at presenting the methodological basis for transforming native Prosopis stands in more stable genetically seed producers stands, to allow more uniformity of plantations and higher genetic gains in the breeding process. Two methods of evaluation are explaining to establish genetic thinning: a taxonomic and morphological, and a biochemical marker analysis.

**Keywords:** Taxonomy; Certification; Forest Tree Breeding.

## 1. INTRODUCCION

Este trabajo propone una base metodológica sobre la cual puedan establecerse normas para la certificación de semilla de algarrobo de categoría seleccionada, considerando las especies *Prosopis alba*, *P. nigra*, *P. chilensis*, *P. flexuosa* y *P. hassleri*.

Uno de los problemas actuales del cultivo del algarrobo es la calidad genética de la semilla utilizada para la producción de plantines destinados a plantación. A pesar de existir algarrobales en el bosque nativo, de excepcionales características silvícolas, constituidos por individuos de excelente forma, buena sanidad y crecimiento, el material de propagación que se obtiene de ellos muestra ser sumamente variable. Esta alta segregación impide fijar en la descendencia las características deseables a partir del cultivo de los árboles semilleros seleccionados, disminuyendo significativamente, o haciendo totalmente nula la ganancia genética esperada de la selección realizada.

Este problema que se presenta para el cultivo, responde a las características generales observadas en las distintas especies de algarrobo. Los algarrobos conforman un complejo integrado por especies taxonómicas adaptadas a distintas condiciones del ambiente que se relacionan entre sí, en múltiples puntos de intercambio genético, denominados "enjambres

<sup>1</sup> Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales (IFRGV), CIAP, INTA. Camino 60 cuadradas km 5,5 (5119), Córdoba. Argentina. E-mail: anibal.r.verga@gmail.com

híbridos” (Saidman, 1986; Verga, 1995). Aparentemente esta capacidad que poseen los algarrobos de intercambiar información genética constituiría una estrategia evolutiva del complejo, generando alta diversidad en múltiples puntos de contacto entre especies taxonómicas. Esta diversidad genética suplementaria, generada en los enjambres híbridos, permite exponer a la selección nuevas combinaciones de caracteres adaptativos, dando lugar a procesos microevolutivos, posibilitando la diferenciación de grupos de individuos adaptados a nuevas condiciones ambientales, al tiempo que aumenta la diversidad de las especies ya fijadas (Verga, 1995, López Lauenstein *et. al.*, 2013).

La diversidad genética es una de las bases de la adaptación a largo plazo. Constituye la “materia prima” de la selección natural y su generación es vital para mantener la viabilidad de las especies frente a la diversidad de ambientes que se presentan en el espacio y en el tiempo. Por el contrario el cultivo representa una simplificación y un control del ambiente tales, que permiten mantener materiales mucho más uniformes, posibilitando así una adaptación mayor a los requerimientos del sistema productivo.

Debido a estas características particulares del complejo “algarrobo”, la generación de poblaciones genéticamente estables requiere de un esfuerzo adicional si lo comparamos con otras especies forestales, en las cuales se pueden extraer de sus poblaciones naturales grupos de individuos que mantienen sus características genéticas colectivas, sin mayores variaciones en sus descendencias. En el caso de los algarrobos es casi imposible encontrar poblaciones naturales “puras” de una especie determinada, por lo que no es posible la conformación de orígenes en el sentido forestal tradicional del término. Normalmente las especies se encuentran asociadas, integrando un complejo local adaptado, en su conjunto, a las distintas condiciones del ambiente que ocupan.

El intercambio genético entre especies de algarrobo se produce normalmente entre especies “blancas” y “negras”, ya que en general sus distribuciones naturales son simpátricas. Son comunes los enjambres híbridos entre *P. chilensis* (blanco) y *P. flexuosa* (negro) en el Chaco Árido y Monte, entre *P. alba* (blanco) y *P. nigra* (negro) en el Parque Chaqueño y Espinal, y también entre *P. alba* y *P. ruscifolia* (negro) en el Parque Chaqueño. Las áreas donde coexisten algarrobos blancos de distinta especie son acotadas a zonas de contacto entre sus distribuciones prácticamente alopatricas. El Sudoeste de Santiago del Estero y Noroeste de Córdoba, también el Valle de Catamarca, se caracterizan por algunas zonas donde entran en contacto *P. chilensis* y *P. alba* y el Este de Formosa por áreas de contacto entre *P. alba* y *P. hassleri*. En ambas zonas participan de los enjambres además, alguna o varias de las especies de algarrobos negros. Excluyendo estas zonas particulares, el resto del Parque Chaqueño, el Monte y el Espinal se caracterizan por presentar enjambres híbridos de *Prosopis* únicamente entre especies “blancas” y “negras”.

El objetivo de este trabajo fue establecer una metodología para la selección y transformación de algarrobales nativos en rodales semilleros, productores de material de propagación más uniforme y estable desde el punto de vista genético. Esta metodología servirá de base conceptual para que el INASE (Instituto Nacional de Semillas), en el marco de un convenio de cooperación técnica con el INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), dicte los requisitos legales para acceder a la certificación de semilla de algarrobo de categoría “seleccionada”. Esto permitirá mayores ganancias genéticas inmediatas y, de establecerse un sistema de trazabilidad de los materiales de propagación y plantaciones, éstas puedan transformarse a su vez en material base para los futuros programas de mejoramiento genético forestal.

## 2. HERRAMIENTAS METODOLÓGICAS

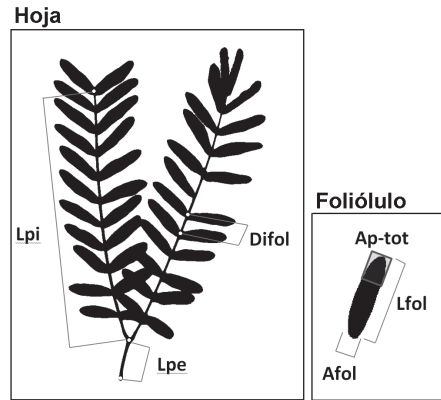
Con el fin de identificar la variación genética de origen interespecífico en un algarrobal, existen dos métodos de análisis relativamente sencillos y de bajo costo: el análisis morfológico a partir de muestras de hojas, y el análisis isoenzimático de semillas mediante la enzima Alcohol Deshidrogenasa (ADH). El análisis de ADH permite determinar, a partir de una muestra de semilla de un rodal, qué proporción proviene de cruzamientos interespecíficos entre los grupos de algarrobos “blancos”: *P. alba*, *P. hassleri*, *P. fiebrigii* y *P. chilensis*, y negros: *P. nigra*, *P. flexuosa* y *P. ruscifolia* (llamados así por la coloración de sus frutos). Por otro lado, mediante el análisis morfológico, es posible identificar aquellos individuos del algarrobal que pertenecen a otra/s especie/s que la deseada o bien que presumiblemente pueden ser de origen híbrido. Ambos métodos pueden ser aplicados debido a que los algarrobos presentan una muy fuerte correlación entre sus características morfológicas de hoja y su base genética, especialmente aquella relacionada con su origen específico (Saidman, 1986; Verga, 1995 y 2001; Joseau y Verga, 2005; Verga and Gregorius, 2007; Ferreyra *et al.*, 2013).

La metodología propuesta para la conversión de un algarrobal nativo en un rodal semillero certificado, productor de semilla de categoría “seleccionada”, consiste en un monitoreo mediante la enzima ADH y la realización de un raleo genético en función de la clasificación de cada uno de los individuos involucrados y de su entorno, mediante un análisis morfológico realizado a partir de muestras de hojas.

### *Análisis Morfológico*

El análisis morfológico se realiza a partir de muestras de hojas de cada individuo. Con ese fin se toman por lo menos cinco hojas completas, totalmente expandidas, en lo posible sanas y representativas de la variación observada en el árbol a analizar. Para realizar las mediciones, éstas se escanean o fotografian como se muestra en las imágenes de los “Árboles Tipo”. Mediante el programa HOJA de distribución gratuita (Verga, 2010), se realizan las mediciones de los siguientes caracteres para cada hoja (Figura1).

<b>Lpe</b>	Longitud del pecíolo (cm).
<b>Npi</b>	Número de pares de pinas.
<b>Lpi</b>	Longitud de la pina (cm).
<b>Nfol</b>	Número de pares de foliólulos por pina.
<b>Difol</b>	Distancia entre foliólulos. Se calcula mediante: $LPI/NFOL$
<b>Lfol</b>	Longitud del foliólulo (cm).
<b>Afol</b>	Ancho del foliólulo (cm).
<b>L-Afol</b>	Relación Longitud/Ancho de foliólulo. Se calcula dividiendo $LFOL/AFOL$
<b>ArFol</b>	Área del foliólulo ( $cm^2$ ).
<b>Ap-Tot</b>	Relación área del ápice del foliólulo ( $1/3$ del Largo de Folíolulo)/área total del foliólulo.
<b>ArTot</b>	Índice de Área total de la hoja. Se calcula mediante: $ArFol \times 2 \times Nfol \times 2 \times Npi$
<b>L-Difol</b>	Relación entre el largo de foliólulo y la distancia entre foliólulos ( $Lfol/Difol$ )
<b>Difol-A</b>	Relación entre la distancia entre foliólulos y el ancho del foliólulo ( $Difol/Afol$ )

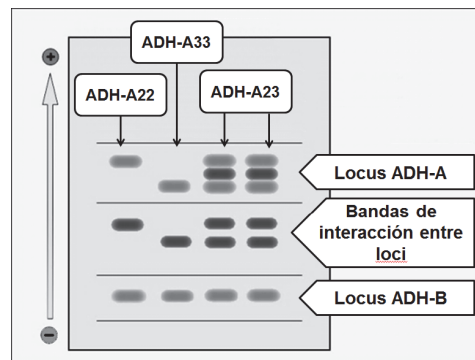


**Figura 1.** Caracteres morfológicos foliares

Con los datos obtenidos se realiza el análisis taxonómico mediante estadística multivariada. Para este objetivo en particular proponemos la utilización del método de Componentes Principales (programa InfoStat, Di Rienzo *et. al.*, 2012).

#### ***El análisis isoenzimático del locus ADH-A***

La enzima Alcohol Deshidrogenasa (ADH) presenta en el género *Prosopis* dos loci (Saidman, 1986) (Figura 2). El locus de mayor velocidad de migración, identificado con la letra “A”, posee tres alelos identificados por su velocidad decreciente de migración con los números 1, 2 y 3. Este sistema enzimático tiene la particularidad de que el alelo ADH-A-2 está prácticamente fijado en los algarrobos “negros”, mientras que en los “blancos” es el alelo ADH-A-3 el que presenta frecuencias cercanas a 1. Esta particularidad fue hallada por Saidman (1986) para *Prosopis alba* (ADH-A-33) y *P. ruscifolia* (ADH-A-22); para *Prosopis chilensis* (ADH-A-33) y *P. flexuosa* (ADH-A-22) por Verga (1995) y para *Prosopis alba* y *P. nigra* (ADH-A-22) por Joseau y Verga (2005). En los dos últimos casos se pudo corroborar una alta correlación entre los genotipos para el locus ADH-A y caracteres morfológicos de importancia taxonómica. Individuos homocigotas ADH-A-22 y ADH-A-33 responden a caracteres morfológicos de la especie respectiva, mientras que los heterocigotas ADH-A-23 aparecen con morfología intermedia en la mayoría de estos caracteres.



**Figura 2.** Zimograma esquemático de la enzima Alcohol Deshidrogenasa (ADH). Cada “calle” en sentido vertical, representa la distribución de bandas de un individuo obtenida a partir de una semilla o parte de una planta.

De esta forma la frecuencia del alelo ADH-A2 (propio de los algarrobos “negros”) en una muestra de semilla cosechada de un algarrobal de alguno de los algarrobos “blancos” puede utilizarse como un índice del grado de cruzamientos interespecíficos que se producen en el rodal analizado, y por lo tanto del “grado de hibridación del rodal”. Del mismo modo la frecuencia del alelo ADH-A3 en un algarrobal “negro” será índice del intercambio genético con los algarrobos “blancos”.

## Análisis del rodal

### La determinación de especies

El primer paso para la certificación de un rodal semillero como categoría “seleccionado” será comprobar que los individuos que lo componen respondan en su mayoría a una especie de algarrobo determinada, excluyendo la posibilidad de que se trate de un enjambre híbrido.

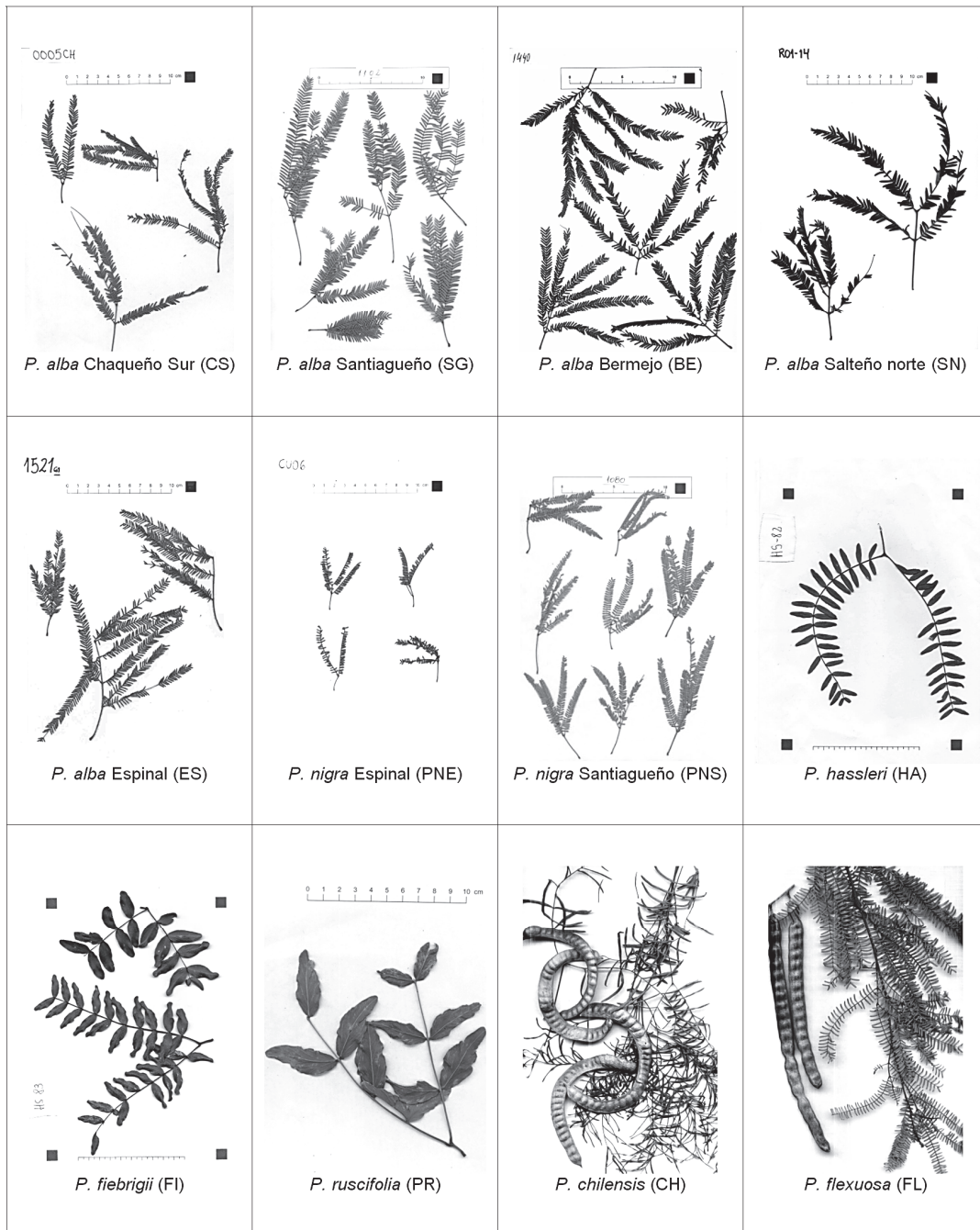
Las especies de algarrobo involucradas en este trabajo son: *P. alba*, *P. nigra*, *P. chilensis*, *P. flexuosa* y *P. hassleri*. A fin de establecer criterios morfológicos cuantitativos para la identificación específica de individuos de algarrobo, se seleccionaron 12 “Árboles Tipo” (AT) (Figura 3) a partir del análisis de 997 árboles, distribuidos en el Monte, Bosque Chaqueño y parte del Espinal y complementado con datos de otros 200 árboles, (principalmente del Este de Formosa, completando el muestreo de *P. hassleri*), según el método presentado por Verga, *et. al.* (2009). Además de las especies mencionadas, se incluyeron entre los 12 AT, *Prosopis ruscifolia* y *P. fiebrigii*. El primero debido a que participa de cruzamientos interespecíficos no deseados con las especies a certificar y el segundo porque constituye una especie descrita en la única monografía publicada del género (Burkart, 1976), como especie independiente, pero que aparentemente podría tratarse de una forma particular de *P. hassleri*.

Mediante el análisis de la totalidad de los árboles se identificaron grupos morfológicos. Para cada uno de ellos se estableció un árbol tipo según el método descrito por Verga *et. al.* (2009). Aquí se incluyen sólo aquellos árboles tipo que corresponderían a especies puras del género, según la clasificación de Burkart (1976). Debido a la importancia económica de la especie *Prosopis alba* y a que se ha estudiado a la fecha con mayor detalle, poseemos información más detallada sobre su variación en el Bosque Chaqueño. De allí que se presentan cinco distintos AT para esta especie, que corresponden a grupos de individuos comprobables diferencias importantes tanto desde el punto de vista adaptativo como productivo.

En la Tabla 1 se indican los valores para cada una de las variables morfológicas de hoja, correspondientes a cada uno de los árboles tipo seleccionados para este trabajo.

**Tabla 1.** Valores de los caracteres morfológicos de hoja correspondientes a los árboles tipo. Cod: Código del árbol tipo. El resto de las abreviaturas y unidades son las definidas en la Figura 1.

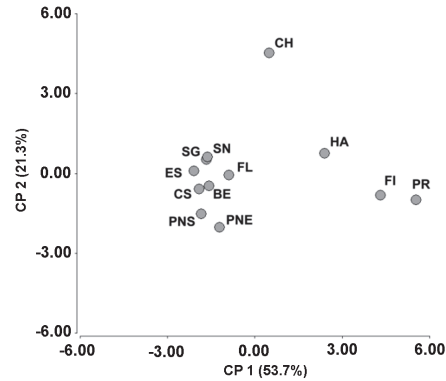
Nombre	Cod	Lpe	Npi	Lpi	Nfol	Difol	Lfol	Afol	LAfol	ArFol	ATot	ArTot	LDfol	Dfola
<i>P. alba</i> Chaco Sur	CS	2.26	2.2	9.84	41.6	0.237	0.60	0.11	5.39	0.063	0.204	23.2	2.53	2.12
<i>P. alba</i> Santiago	SG	3.60	1.9	8.70	33.5	0.260	0.89	0.15	5.86	0.116	0.174	29.4	3.45	1.69
<i>P. alba</i> Bermejo	BE	2.38	2.5	9.45	38.2	0.250	0.71	0.14	5.14	0.087	0.177	33.0	2.85	1.79
<i>P. alba</i> Salta Norte	SN	3.62	2.8	10.82	36.4	0.298	1.03	0.18	5.76	0.150	0.178	61.0	3.47	1.65
<i>P. alba</i> Espinal	ES	3.16	3.0	8.70	38.4	0.226	0.66	0.11	6.22	0.064	0.165	29.4	2.94	2.11
<i>P. nigra</i> Espinal	PNE	1.62	1.8	4.12	19.4	0.215	0.41	0.11	3.71	0.041	0.196	5.7	1.94	1.90
<i>P. nigra</i> Santiago	PNS	2.49	2.0	6.64	34.2	0.195	0.42	0.12	3.59	0.042	0.198	11.4	2.15	1.66
<i>P. hassleri</i>	HA	2.39	1.2	16.90	17.2	0.983	2.16	0.50	4.32	0.880	0.130	72.6	2.19	1.96
<i>P. fiebrigii</i>	FI	1.72	1.0	10.20	7.0	1.457	2.83	1.04	2.72	2.360	0.120	66.0	1.94	1.40
<i>P. ruscifolia</i>	PR	1.88	1.0	8.17	5.0	1.634	3.01	1.13	2.66	4.453	0.100	89.0	1.84	1.44
<i>P. chilensis</i>	CH	2.69	1.0	11.50	15.2	0.759	2.93	0.17	16.85	0.450	0.143	27.4	3.86	4.37
<i>P. flexuosa</i>	FL	2.71	1.4	7.61	18.0	0.409	0.66	0.12	5.76	0.069	0.177	7.2	1.62	3.55



**Figura 3.** Árboles Tipo. Principales tipos morfológicos de algarrobos seleccionados mediante taxonomía numérica. Si bien algunos se denominan con términos asociados a determinada área geográfica, donde son especialmente frecuentes, todos representan tipos morfológicos que pueden estar presentes en otras zonas. Se trata de individuos cuyos caracteres morfológicos se acercan más a los valores medios de los grupos que representan. Los primeros tres árboles tipo correspondientes a *P. alba*, según Verga *et. al.*, 2009. Las imágenes de los dos últimos, *P. chilensis* y *P. flexuosa*, extraídos de Joseau *et. al.* (2013).

### Determinación de especie a partir de muestras de hojas de un rodal

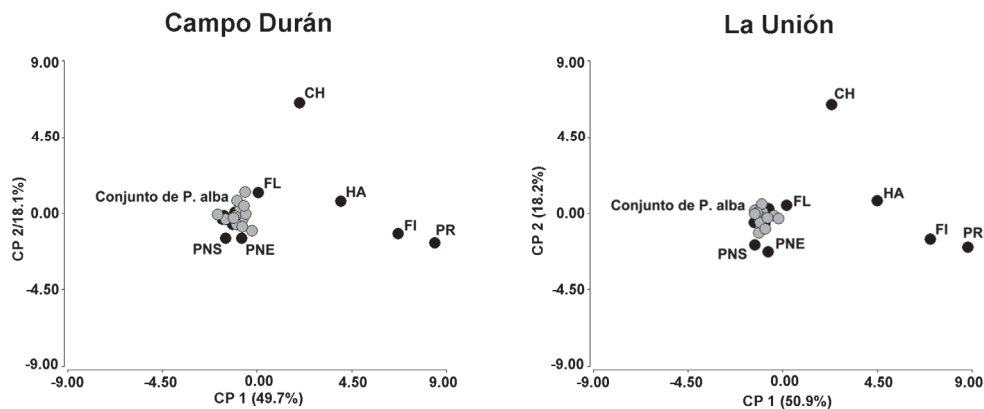
A partir del análisis de los caracteres de hoja de los 12 AT, mediante Componentes Principales, es posible crear un espacio bidimensional en función de los componentes principales 1 y 2 (Figura 4). La distancia entre puntos en este espacio es proporcional a la diferencia morfológica entre los AT.



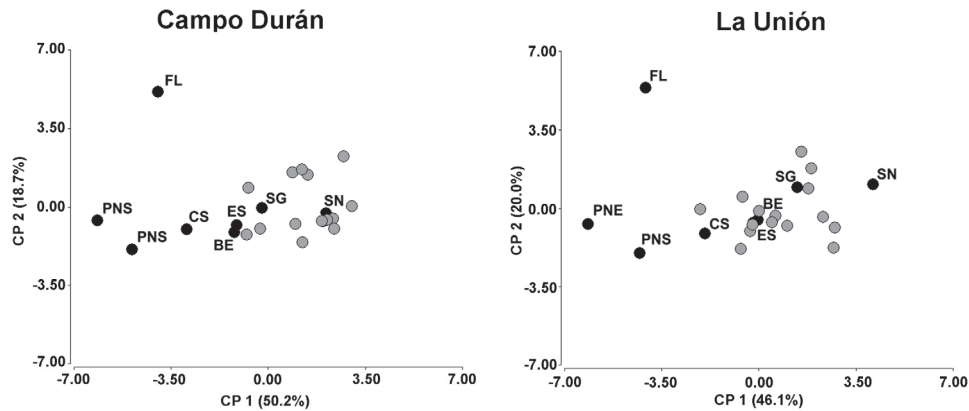
**Figura 4.** Análisis de Componentes Principales para los Árboles Tipo. Las abreviaturas de cada árbol tipo se corresponden con los individuos presentados en la Figura 3.

La inclusión de individuos pertenecientes a un rodal semillero a certificar en este espacio, permite observar si su posición se acerca a los puntos de las especies puras o bien aparecen entre ellas, asociadas a características híbridas. A modo de ejemplo se presentan en la Figura 5 dos casos: Campo Durán y La Unión. En cada sitio se seleccionaron en el rodal quince individuos en función de sus características deseables como árboles semilleros. Campo Durán corresponde a un algarrobal conformado por árboles de una comunidad Chané (Guaraní), situada al Norte de la Provincia de Salta, en cercanías del límite con Bolivia. Se encuentra en el ecotono entre Las Yungas y el Bosque Chaqueño. Los árboles crecen en calles y terrenos de las casas de la comunidad. El rodal de La Unión corresponde a una porción de 15 ha de los algarrobales situados en las márgenes del Río Bermejo, al Noreste de la misma Provincia.

Ambas muestras ocupan en el gráfico (Figura 5) el espacio de *Prosopis alba*. Con el objeto de precisar aún más la clasificación se puede realizar un segundo análisis de CP no teniendo en cuenta aquellas especies que con seguridad no participan del material analizado (Figura 6). En este caso se excluyeron del análisis *P. chilensis*, *P. hassleri*, *P. fiebrigii* y *P. ruscifolia*.



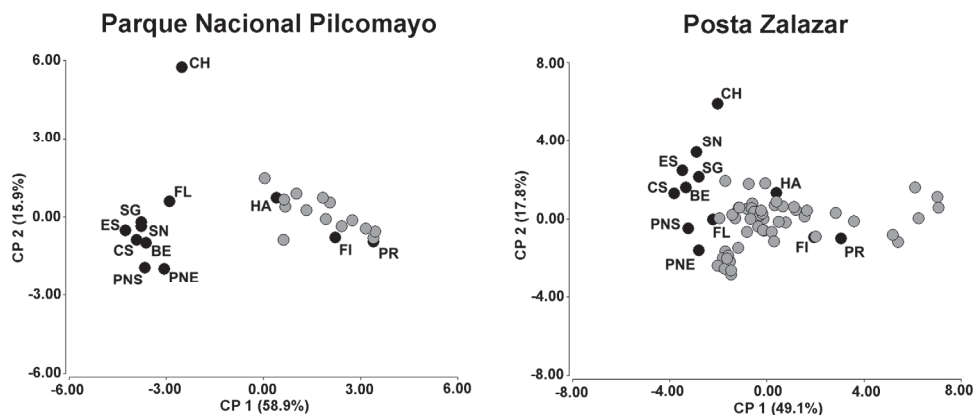
**Figura 5.** Análisis de Componentes Principales para dos muestras de dos rodales, en comparación con los árboles tipo. Izquierda Campo Durán (Salta) y derecha La Unión (Salta). Los círculos grises indican la posición respecto de los componentes 1 y 2 de los individuos de cada muestra. Círculos negros: Árboles Tipo.



**Figura 6.** Análisis de Componentes Principales para dos muestras de dos rodales en comparación con los árboles tipo. En este caso se eliminaron del análisis aquellos árboles tipo que aparecen en la Figura 5 muy alejadas de los individuos de la muestra. Izquierda: Campo Durán (Salta) y derecha: La Unión (Salta). Los círculos grises indican la posición de los árboles seleccionados del rodal respecto de los componentes 1 y 2. Círculos negros: Árboles Tipo.

Así se puede confirmar en detalle que las muestras tomadas de ambos rodales se corresponden con las características morfológicas de la especie *Prosopis alba*. No aparecen individuos hacia los sectores de *Prosopis nigra* ni de *P. flexuosa*. Los individuos muestreados en Campo Durán se corresponden con la morfología de *P. alba* de Salta Norte y algunos con la morfología de los *P. alba* santiagueños. En cambio en La Unión los individuos muestreados se agrupan en torno a los *P. alba* del Bermejo y Espinal (ambos de hoja más pequeña que los de Campo Durán).

En la Figura 7 se presentan otros dos análisis de CP. El primero no se trata de un rodal semillero sino de árboles individuales de Algarrobos muestreados en el Parque Nacional Pilcomayo y área aledaña en la Provincia de Formosa, zona de distribución de *P. hassleri*. El segundo es un rodal pequeño, que ocupa una superficie no mayor de tres hectáreas, en las inmediaciones de la población Posta Cambio a Zalazar, también en la provincia de Formosa. Este sitio se encuentra en el límite Oeste del área de distribución de *Prosopis hassleri*, donde esta especie entra en contacto con *Prosopis alba*. Además en la zona aparecen *P. nigra* y *P. ruscifolia*.



**Figura 7.** Análisis de Componentes Principales de muestras en relación a los árboles tipo. Izquierda: Muestra tomada de individuos aislados del Parque Nacional Pilcomayo y área aledaña. Derecha: Pequeño rodal en las inmediaciones de la localidad de Posta Cambio a Zalazar. Ambas en la provincia de Formosa. Los círculos grises indican la posición respecto de los componentes 1 y 2 de los individuos de cada muestra. Círculos negros: Árboles Tipo.

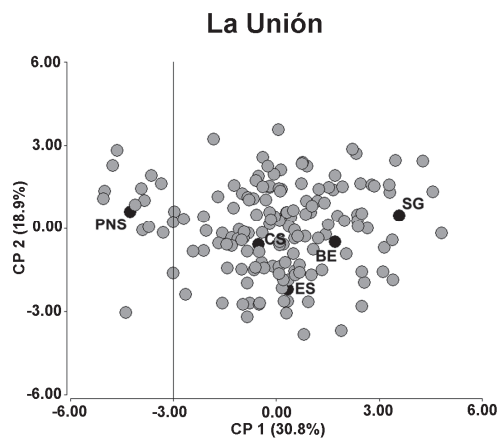


En la Figura 7 (izquierda) se puede observar que los árboles del área de Parque Nacional Pilcomayo se ajustan a las características morfológicas de *P. hassleri* y *P. fiebrigii*. Si bien algunos individuos se acercan al punto de *P. ruscifolia*, hay que tener en cuenta que *P. fiebrigii* posee hojas muy parecidas a esta especie, pero entre ambos no puede haber confusión, ya que el primero es prácticamente inerme y el segundo, en todos los casos, presenta espinas de más de 10 cm de largo. Por el contrario en Posta Zalazar (Figura 7, derecha), a pesar de ser un rodal relativamente pequeño, se presentan individuos con una amplia gama de morfotipos. Obsérvese que se ocupa con numerosos puntos el espacio entre el grupo de *P. hassleri*-*P. fiebrigii*-*P. ruscifolia* y el grupo de las especies de *P. alba* y *P. nigra*. Esto está indicando que este rodal se corresponde con un enjambre híbrido con la participación de por lo menos cuatro especies. Los puntos a la extrema derecha del gráfico representan individuos que se ajustan a la especie *P. ruscifolia*, mientras que el punto superior izquierdo se corresponde con un individuo cuya morfología se aproxima a *P. alba*. Un rodal de estas características es obviamente inviable para transformarlo en rodal semillero, ya que no es posible mediante raleos disminuir la enorme variabilidad existente.

### ***El análisis de la variación morfológica de un rodal cuya especie ya ha sido establecida***

Una vez identificada la especie a la que pertenece un rodal y excluida la posibilidad de que se trate de un enjambre híbrido, con un nivel de variación que será imposible manejar, se hace necesario realizar un análisis más detallado de la variación morfológica que presenta, a fin de poder clasificar cada individuo. Con este fin presentamos como estudio de caso el rodal descrito de La Unión. De la observación directa a campo se aprecia que en este rodal los Algarrobos son en su mayoría *P. alba*, pero también existen algunos *P. nigra*.

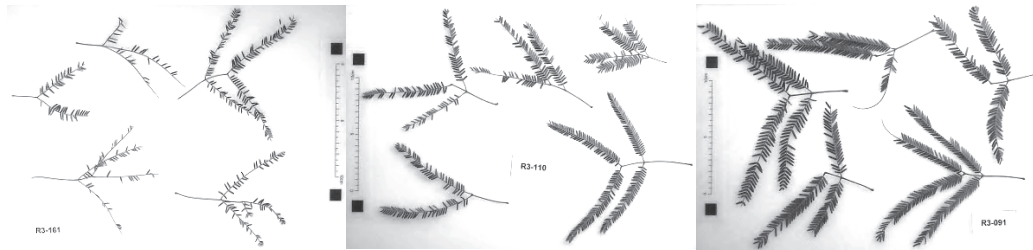
Para este ejemplo se tomaron muestras de hojas de la totalidad de los individuos presentes (200) en una franja de poco más de dos ha dentro del rodal. Mediante el programa HOJA se midieron cinco hojas de cada árbol y se realizó el análisis de Componentes Principales. En el análisis se excluyeron aquellos AT pertenecientes a aquellas especies que no están involucradas en el rodal (Figura 8). En el ejemplo presentado en la Figura 6, correspondiente a este mismo rodal (derecha), se habían tomado muestras únicamente de individuos fenotípicamente deseables. De allí se pudo observar su pertenencia a *P. alba*; pero en este caso, donde se analizó la totalidad de los individuos de un sector del lote, aparecen árboles que pueden ser clasificados como *P. nigra*.



**Figura 8.** Análisis de Componentes Principales de 200 individuos del Rodal La Unión. Los círculos grises indican la posición respecto de los componentes 1 y 2 de los árboles muestreados. Círculos negros: Árboles Tipo.

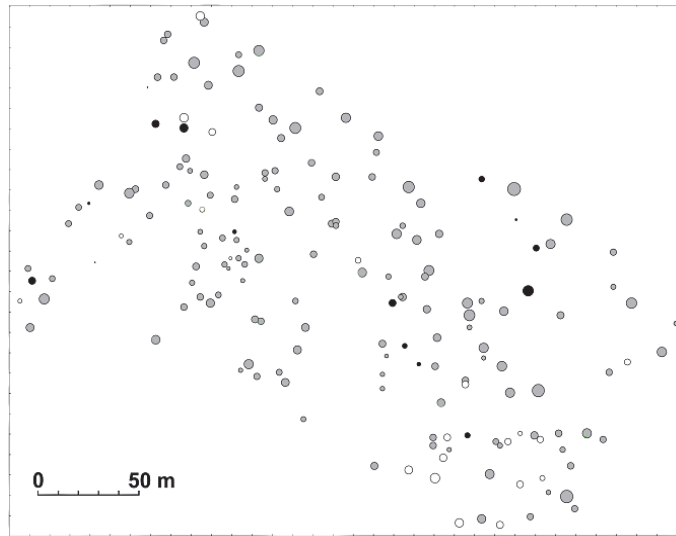
En la Figura 8 se puede observar una nube de puntos en torno al árbol tipo PNS (*P. nigra*, santiagueño). Si establecemos un umbral para el componente principal 1 de -3 (línea vertical en el gráfico), a la izquierda de la línea queda un grupo de individuos que responde a las características morfológicas de esa especie, mientras que a la derecha permanece una nube de puntos relativamente simétrica alrededor de los cuatro AT que podría asumirse como la variación “normal” de la especie *P. alba*.

A fin de visualizar las características morfológicas de los árboles a ralear, por un lado, y los seleccionados que conformarán la base del rodal semillero por el otro, se presentan en la Figura 9 las imágenes de hoja tomadas de los árboles 161 (izquierda) y 091 (derecha). En el análisis de CP presentado en la Figura 8 el árbol 161 se posiciona inmediatamente al lado del AT RNS y centraliza el grupo de puntos a la izquierda del umbral de -3 para el CP1 (eje x). El árbol 191, por el contrario se posiciona en el centro de la nube de puntos seleccionados en el mismo análisis de CP, que queda a la derecha del umbral de -3 para el CP1. También en la Figura 9 se presenta el árbol 110 (centro) que en el análisis de CP de la Figura 8 se posiciona exactamente sobre el umbral de selección de -3 para el CP1. Por sus características intermedias de hoja, este individuo, muy probablemente tenga origen híbrido entre *P. alba* y *P. nigra*.



**Figura 9.** Individuos identificados por su posición en el análisis de CP presentado en la Figura 8. Izquierda: Árbol 161. Representativo del tipo morfológico de los individuos a ralear. Centro: Árbol 110. Tipo morfológico intermedio, muy probablemente de origen híbrido *P. alba* x *P. nigra*. Se encuentra justo en el límite del umbral de selección indicado en la Figura 8. Derecha: Árbol 091. Representativo del tipo morfológico de los individuos que se corresponden con *P. alba* y que quedarían seleccionados como base para conformar el rodal semillero.

Debido a que se registró el posicionamiento geográfico de cada individuo al momento del muestreo de hojas y, que como resultado del análisis de CP se obtiene para cada individuo un valor de CP1 y CP2, se puede confeccionar un plano de la plantación e identificar espacialmente qué individuos deben ser raleados. En la Figura 10 se presenta el plano de la faja del lote analizado de La Unión, con la posición de cada árbol. Allí se indica qué árboles deben ser raleados para mejorar la uniformidad de la semilla a obtener del rodal.



**Figura 10.** Rodal La Unión. Círculos negros, individuos a ralearse según el resultado del análisis morfológico. Círculos blancos, árboles que no pudieron ser analizados por falta de hojas. Círculos grises, árboles seleccionados. El tamaño de los círculos es proporcional al DAP de cada árbol.

#### ***Monitoreo de la semilla producida en el rodal mediante análisis de la enzima ADH***

Del análisis mediante la enzima ADH realizado (Verga, 1995; Verga and Gregorius, 2007 y datos propios no publicados) se ha podido comprobar que en general las especies “puras” de algarrobos blancos poseen como máximo una frecuencia del 2.5% del alelo ADH-A3, el cual se encuentra casi fijado en las especies “negras” (esto es frecuencias cercanas a 1.00). Por otro lado es prácticamente imposible encontrar individuos “blancos” homocigotas para el alelo ADH-A3. Esto se debe a que con una frecuencia tan baja del alelo ADH-A3 en estas especies, la probabilidad de encontrar un homocigota ADH-A33, bajo el supuesto de equilibrio, sería de  $0.025^2 = 0.000625$ . Por otro lado, bajo el mismo supuesto y con esta frecuencia del alelo ADH-A3, es de esperar una frecuencia máxima de heterocigotas ADH-A23 de  $2 \times 0.025 \times 0.975 = 0.04875$ , entre la descendencia de un rodal de algarrobos blancos “puros”, mientras que el resto de la descendencia, el 95.1%, debería ser homocigota para el alelo ADH-A2.

Por otro lado los algarrobos negros “puros” duplican la frecuencia del alelo típico de los “blancos”. Siguiendo el mismo criterio de análisis expuesto para los algarrobos blancos, proponemos como criterio para la certificación de semilla de algarrobo de categoría “seleccionada” la Tabla 2 de umbrales máximos admitidos de frecuencias para alelos y genotipos. Consideramos que una muestra de semilla a certificar bajo estas condiciones, no debería exceder ninguno de estos umbrales.

A fin de presentar un criterio práctico para la certificación, en una muestra de 100 semillas, la presencia de 4 individuos heterocigotas para el alelo de los algarrobos negros, en el caso de los algarrobos blancos y de 9 para el alelo de los algarrobos blancos, en el caso de los algarrobos negros, estaríamos (con una probabilidad del 95%) frente al umbral mencionado o frecuencias mayores. También en una muestra de 100 semillas, la aparición de un solo individuo homocigota para el alelo “contrario”, estaría, en ambos casos, excediendo el umbral sugerido (cálculos realizados mediante el método de “bondad de ajuste” con la distribución de chi-cuadrado).

**Tabla 2.** Frecuencia umbral máxima para alelos y genotipos sugerida para la certificación de rodales semilleros de algarrobos blancos y negros.

Criterio	Frecuencia Umbral	
	Algarrobos blancos	Algarrobos negros
Alélica	0.02500 (ADH-A3)	0.05000 (ADH-A2)
Homocigotas	0.00063 (ADH-A33)	0.00250 (ADH-A22)
Heterocigotas	0.04875 (ADH-A23)	0.09500 (ADH-A23)

### 3. CONCLUSIONES

#### *La certificación de semilla de algarrobo de categoría “seleccionada”*

Sobre la base de la información aportada en este trabajo se busca presentar a continuación una propuesta metodológica de análisis para la transformación de algarrobales nativos de las especies *P. alba*, *P. nigra*, *P. chilensis*, *P. flexuosa* y *P. hassleri*, en rodales semilleros con características genéticas adecuadas que permitan su inscripción en un registro de certificación del INASE en la categoría “seleccionado”.

#### *Metodología propuesta*

##### *a) Toma de muestras*

Para el análisis morfológico se deberán tomar muestras de hoja, y si es posible de frutos (no excluyente), de la totalidad de los individuos existentes en el área del futuro rodal semillero y del área adyacente (50 m). Cada árbol deberá posicionarse con GPS e identificarse con un número correlativo marcado en el tronco. Tanto la muestra de herbario y eventualmente de frutos, como también el punto de GPS, quedarán identificados con el número de árbol. El límite inferior de DAP para que un individuo forme parte de la muestra será de 10 cm.

Para constituir la muestra de semilla para el análisis de ADH se deberán cosechar por lo menos 10 frutos sanos y llenos, de un mínimo de 20 árboles y un máximo del 10% de la totalidad de los individuos del área del futuro rodal semillero. Los árboles cosechados deberán distribuirse uniformemente por el área del futuro rodal. Las muestras de frutos de cada individuo cosechado se deberán identificar con el número de árbol correspondiente y mantener por separado.

##### *b) Análisis del rodal*

Aplicando los métodos expuestos se determinará/n la/s especie/s que integran el área estudiada. En el caso de que el material pueda asociarse a alguno de los AT definidos, no se observen individuos morfológicamente intermedios o de otra especie que la deseada y que el análisis de ADH arroje valores por debajo de los umbrales consignados, el rodal quedará habilitado para su certificación. Por el contrario, si el material enviado no puede ser asociado a un AT determinado, es decir que se trataría de una zona de hibridación, se considerará que el sitio no es apto para la instalación de un rodal semillero certificado como “seleccionado”.

Si el requisito de pertenencia a una especie determinada se cumple, pero se constata la presencia de otra/s especie/s acompañante/s no deseada/s y del estudio morfológico resulta la necesidad de realizar raleos mayores del 25% de los individuos, se considerará que el sitio no es

apto para la certificación. Si el número de individuos a raleo es menor del 25% se realizará la recomendación de raleo, proporcionando la lista de los individuos a apear y el plano correspondiente.

Una vez realizados los trabajos de raleo genético, si éste se efectuó antes del período de floración, se solicitará una nueva muestra de semilla de ese mismo año (caso contrario, al año siguiente), de las características indicadas más arriba. De constatare mediante el análisis ADH que no se exceden los umbrales para la especie en cuestión, el rodal quedará habilitado para su certificación.

Finalmente, además del raleo genético, en todos los casos deben seguirse las normas clásicas de manejo de un rodal semillero forestal: raleos silvícolas para eliminar árboles muertos, débilos y con competencia a fin de permitir la liberación de copas para una mejor floración y fructificación; eliminación del sotobosque para facilitar las tareas de cosecha; como así también, de ser necesario, la aplicación de tratamientos fitosanitarios.

#### AGRADECIMIENTOS

Esta publicación hubiera sido imposible sin la información de más de 1200 árboles muestreados en la extensísima y nada fácil región donde se distribuyen estas especies. Este épico trabajo ha sido posible gracias al esfuerzo de Diego López Lauenstein, Carmen Vega, Fernando Muttoni, Fernando Castro Schule, Cristian Despósito, Ana Córdoba, Gustavo Bronstein, Jacqueline Joseau, Fernando Chávez, Carlos Carranza, Marcela Ledesma, Gabriel De Luca, Carlos Gómez, Sebastián Kees, Pedro Delvalle, Carlos López, Mauricio Ewens, Marcelo Navall, Martín Zárate, Elba Capello, Walter Degano, Valerio Gon, Hernán Hernández, Martín Marcó y Carla Salto. La información ganada con esta labor tiene pocos precedentes en la exploración y relevamiento de los recursos genéticos forestales nativos en nuestro país.

#### 4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Burkart, A. 1976. "A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam. Mimosoideae) (Part 1 and 2). Catalogue of the recognized species of *Prosopis*." Journal of the Arnold Arboretum. 57:219-249 y 450-525.
- Di Rienzo, J. A.; F. Casanoves; M. G. Balzarini; L. Gonzalez; M. Tablada and C. W. Robledo. 2012. "InfoStat versión 2012". Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <<http://www.infostat.com.ar>>
- Ferreira, L. I.; J. C. Vilardi; V. López; A. Verga and B. O. Saidman. 2013. "Genetic and morphometric markers are able to differentiate three morphotypes belonging to Section Algarobia of genus *Prosopis* (Leguminosae, Mimosoideae)". Plant Systematics and Evolution. 1-17. Springer Vienna.
- Joseau, M. J.; A. R. Verga; M. del P. Díaz and N. B. Julio. 2013. "Morphological diversity of populations of the Genus *Prosopis* in the Semiarid Chaco of Northern Cordoba and Southern Santiago Del Estero". American Journal of Plant Sciences, vol.4(11), pp.2092-2111.
- Joseau M J y A R Verga. 2005. "Caracterización morfológica y genética de poblaciones del genero *Prosopis* del Chaco Semiárido del Norte de Córdoba y Sur de Santiago del Estero". XXXIV Congreso Argentino de Genética. Trelew, Chubut, 11 y 14 de septiembre. S-191.
- López Lauenstein, D.; M. Fernández and A. Verga. 2013. "Drought stress tolerance of *Prosopis chilensis* and *Prosopis flexuosa* species and their hybrids". Trees-Structures and Function. 27:285-296.

- Saidman, B. O. 1986. "Isoenzymatic studies of alcohol dehydrogenase and glutamate oxalacetate transaminase in four Southamerican species of *Prosopis* and their natural hybrids". *Silvae Genetica* 35: 3-10. J. D. Sauerländer's Verlag Federal Research Institute for Rural Areas, Forestry and Fisheries. ISSN 0037-5349 ISI: 0.3.
- Verga, A. 1995, "Genetische Untersuchungen an *Prosopis chilensis* und *P. flexuosa* (Mimosaceae) im trockenen Chaco Argentiniens". Göttingen Research Notes in Forest Genetics. Abteilung für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung der Universität Göttingen ISSN 0940-7103, Nro. 19, 96 pp.
- Verga, A. R. 2001. "Clave para la identificación de híbridos entre *Prosopis chilensis* y *P. flexuosa* sobre la base de caracteres cuantitativos". *Multequina* 10:17-22.
- Verga, A. and H. R. Gregorius. 2007. "Comparing morphological with genetic distances between populations: A new method and its application to the *Prosopis chilensis* - *P. flexuosa* complex". *Silvae Genetica*, 56(2), 45-51.
- Verga A.; D. López Lauenstein; C. López; M. Navall; J. Joseau; C. Gómez; O. Royo; W. Degano y M. Marcó. 2009. "Caracterización morfológica de los algarrobos (*Prosopis* sp.) en las regiones fitogeográficas Chaqueña y Espinal norte de Argentina". *Quebracho* 17(1,2) (31-40).
- Verga, A. 2010. "Programa HOJA". Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales, CIAP, INTA. Distribución gratuita.

