

ANÁLISIS DE RECURSOS GENÉTICOS COMO HERRAMIENTA PARA LA DOMESTICACIÓN DEL ALGARROBO (*Prosopis alba* Griseb.)

Svriz, Irina Alejandra. Licenciada en Biotecnología. isvriz@correo.inta.gov.ar. 03722 15729224. La Cangayé 285. C.P. 3500, Resistencia-Chaco, Argentina.

INTRODUCCION

El Gran Chaco Americano es una eco-región boscosa de excepcional biodiversidad en América del Sur, que ocupa más de 1.000.000 km², comprendiendo el Centro-norte de Argentina, Oeste del Paraguay, Sureste de Bolivia y una pequeña porción de Brasil (TNC, FVS, DeSdel CHACO y WCS, 2005) (Figura 1). Dentro de esta eco-región, el Parque Chaqueño argentino abarca aproximadamente 67.500.000 ha, limitando al norte con Bolivia y Paraguay, al este y al sur con la región del espinal, y al oeste con las regiones de la Selva Tucumano Boliviana y Monte (UMSEF, 2002).

La eco-región se extiende desde latitudes tropicales hasta ambientes subtropicales, presentando una gran variedad de climas y relieves, lo que se traduce en una alta diversidad de especies animales y vegetales y la hace un área clave para la conservación de la biodiversidad.

Los nuevos factores de presión como el avance de la frontera agropecuaria y la incorporación de ganadería intensiva sobre vastas áreas de bosque nativo, se suman a la histórica acción antropogénica sobre las especies forestales de valor maderero y su ambiente, a través de su explotación selectiva, el uso del fuego, el desmonte y el sobrepastoreo. Estos patrones de uso tienen un doble efecto: por un lado producen erosión genética sobre las poblaciones y por el otro generan una modificación de las condiciones ambientales.

Los cambios en la actividad agropecuaria y forestal chaqueña plantean la necesidad de desarrollar nuevos recursos biológicos del bosque nativo adaptándolos al uso, de manera de dar sustento a sistemas productivos estables que ofrezcan alternativas económicas y ecológicamente viables.

El presente trabajo contribuye al proceso de domesticación de *Prosopis alba*, visto éste como el uso y la conservación del recurso genético, mediante el estudio de la variación genética de *Prosopis alba* con el uso de marcadores moleculares microsatélites (SSR) y su relación con el ambiente climático en su área de distribución. Se aportará así al conocimiento del recurso genético de una de las especies clave de algarrobo, completando estudios ya iniciados mediante el análisis morfológico.

Utilidades del Algarrobo

Dentro del género *Prosopis*, los algarrobos constituyen un componente importante del Parque Chaqueño debido a la calidad de su madera y la posibilidad de uso como recurso forrajero. Estas especies pueden utilizarse como parte estructural para el desarrollo de sistemas productivos sustentables capaces de "redirigir" en buena medida las presiones ganaderas y forestales que se ejercen actualmente sobre el bosque nativo.

Prosopis alba (algarrobo blanco) (Figura 2) es una especie de extenso hábitat natural y gran plasticidad, que permite su adaptación y desarrollo en diversos ambientes. Tiene amplia distribución en el territorio argentino, abarcando zonas

con una temperatura media anual superior a 12° C y prospera en áreas con 500 a 1300 mm de precipitación anual (Burkart, 1952).

El algarrobo blanco es de tamaño mediano, inerme o poco espinoso, de 5 hasta 15 metros de altura y el diámetro del tronco oscila entre los 40 y 150 cm. Su copa es extendida y aparasolada de hasta 15 m de diámetro (Galera, 2000). Su madera es de color castaño violáceo, con poco veteado, textura mediana a gruesa, durable a la intemperie y muy estable, con un peso específico de 0,80 kg/dm³ (Giménez y Moglia, 2003).

Es utilizada en carpintería de obra y fabricación de revestimientos, pisos, aberturas, muebles, artesanías y demás usos. Además, las vainas y legumbres han sido para la población campesina, junto con el maíz, el producto vegetal de mayor importancia y variada aplicación como alimento para el hombre y forraje para los animales por su gusto agradable y su alto valor nutritivo. (Prokopiuk y col., 2000).

Su importancia económica por los productos que ofrece la convierte en más demandada que otras especies, sumado a su valor ecológico como mejoradora de suelos por su aporte de nitrógeno, y demás características aquí enunciadas, por lo que ha sido priorizada en los programas de domesticación.

El total de extracción de madera para todo destino (rollizos, leña, carbón, postes, etc.) ascendió aproximadamente a 200.000 m³ en el 2003. En función de las existencias de algarrobo en el bosque nativo puede afirmarse que este ritmo de extracción no podrá sustentarse en el mediano plazo (Verga y col, 2009).

De esta forma los algarrobos se constituyen en un recurso biológico estratégico para el desarrollo del Parque Chaqueño en el contexto presentado y por lo tanto surge la necesidad del ordenamiento de sus recursos genéticos y de domesticación con destino a la producción de madera, estructuración de sistemas silvopastoriles y recuperación ecosistémica.

Estudios de variación morfológica

En la clasificación de Burkart (1976) se mencionan 44 especies y 27 variedades de *Prosopis*. La existencia de poblaciones de *Prosopis* con características intermedias condujo a Burkart a describir algunas como de origen híbrido.

Verga y col. (2009) lograron diferenciar grandes grupos por caracterización morfológica en las regiones fitogeográficas Chaqueña y Espinal Norte: *Prosopis chilensis*, *P. flexuosa*, *P. hassleri*, *P. nigra* y *P. alba*. Dentro de *P. alba* hallaron tres posibles ecotipos o subespecies: "Santiagoño", "Chaqueño Norte" y Chaqueño Sur", con diferencias morfológicas más importantes entre los algarrobos chaqueños y los santiagueños, especialmente a nivel de hojas.

Microsatélites

Los microsatélites son herramientas que han ganado importancia en el control de los programas de mejora genética forestal (Fornes, 2005), y se emplean en especies arbóreas forestales con un amplio rango de aplicación (Mottura, 2006). Debido a que revelan un alto nivel de polimorfismo, son marcadores muy informativos que pueden usarse en diversos estudios genéticos de poblaciones, desde un nivel individual (por ejemplo, identificación de clones y cepas) hasta especies estrechamente relacionadas.

A partir de los datos moleculares es posible obtener distintos índices de distancia genética y generar esquemas ramificados o dendrogramas, que ponen en evidencia la similitud genética de los materiales (Carrera y col., 2004).

El desarrollo de microsatélites (SSRs) realizado recientemente por Mottura (2006) permite abordar estudios que aporten elementos de juicio significativos para el ordenamiento de los recursos genéticos de las especies de *Prosopis*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Aportar herramientas para la conservación y el uso de los recursos genéticos de *Prosopis alba*.

Objetivo específico

Caracterizar desde el punto de vista ecológico y genético los dos principales subgrupos de *Prosopis alba*, ya identificados por su morfología.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio Ecológico y Genético de *Prosopis alba*

Se utilizó la información surgida del trabajo de Verga y col. (2009), en el que realizaron el análisis morfológico de 452 individuos de *Prosopis alba* del Chaco Semiárido y Subhúmedo del Parque Chaqueño. El trabajo muestra la existencia de por lo menos dos grupos de individuos dentro de la especie *P. alba* que alcanzarían, por su grado de diferenciación morfológica, el rango de subespecies.

Áreas de distribución de los grupos morfológicos

Mediante la utilización del procedimiento “PREDICT” del módulo “ECOLOGICAL NICHE MODELING” del programa DIVA-GIS (Hijmans *et al.*, 2001) se estableció el área de distribución geográfica potencial de cada uno de los grupos morfológicos en función de 19 parámetros ambientales siguiendo el método BIOCLIM (Nix, 1986; Busby, 1991; McMahon *et al.*, 1996).

Análisis con Marcadores Moleculares

Mottura *et al.* (2005) desarrollaron seis marcadores SSR en *Prosopis chilensis*, los cuales fueron designados: *Mo05*, *Mo07*, *Mo08*, *Mo09*, *Mo13* y *Mo16*. En este trabajo se analizaron los loci *Mo07*, *Mo08* y *Mo13*.

Se utilizó el ADN de 36 árboles semilleros de los dos grupos morfológicos de *Prosopis alba*, “chaqueño” y “santiagoño”. Las amplificaciones de ADN se hicieron en Thermal Cycler PxE 0.2 Thermo.

Electroforesis en gel de poliacrilamida y análisis en secuenciador

Se utilizó la cuba electroforética vertical marca BIO-RAD, modelo Sequi-Gen[®] GT Nucleid Acid Electrophoresis Cell, con vidrios de 38 x 30 cm, y fuente de poder POWER PAC 3000 para la determinación de los pesos moleculares de los alelos. (Figura 2).

En paralelo a la electroforesis en poliacrilamida, los productos de PCR fueron analizados también en secuenciador automático de capilares ABI3130XL Applied Biosystems, en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología del INTA Castelar, Buenos Aires.

Para la interpretación de los resultados obtenidos en la secuenciación, se utilizó el programa GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems), con el que se calculó el tamaño de los alelos de interés, a partir de la observación de la altura y el área de los picos (Figura 3).

RESULTADO Y DISCUSIÓN

Estudio ecológico de *Prosopis alba*

Mediante el análisis BIOCLIM se calcularon las áreas más aptas desde el punto de vista bioclimático para ambos grupos de *Prosopis alba*. Cada área está dividida en cinco clases de calidad climática, donde mayor intensidad de verde indica mejores condiciones climáticas para el grupo en cuestión (Figura 4).

Estudio genético

En la tabla 1 se presentan las distancias genéticas d_0 halladas entre los dos grupos morfológicos para cada uno de los locus analizados y para el pool. En la misma tabla se indica la probabilidad y el desvío estándar de las diferencias entre ambos grupos calculadas mediante el *exact-test* (Raymond and Rousset, 1995) y para el pool mediante un χ^2 .

Por otra parte, la distancia genética, D (Nei, 1972), entre ambos grupos morfológicos y para el pool de genes analizados es $D=0.14$.

El coeficiente F_{st} de Wright, considerando ambos grupos y los tres loci estudiados, fue de 0.0162 con un intervalo de confianza (95%) entre -0.0094 y 0.0466.

Estudio morfológico, ecológico y genético de *Prosopis alba*

Del trabajo de Verga y col. (2009) surgió la existencia de por lo menos dos grupos de individuos dentro de la especie *Prosopis alba* que alcanzaron, por su grado de diferenciación morfológica, el rango de subespecies, a un nivel equivalente al encontrado entre especies taxonómicas del mismo género (Verga y Gregorius, 2007). Por esto, el primer trabajo constituyó una herramienta fundamental como material de partida para la confirmación de la existencia de las dos subespecies de *Prosopis alba* a partir de la caracterización genética aquí desarrollada, la cual refleja los resultados obtenidos en la clasificación morfológica.

De la distribución espacial de los individuos pertenecientes a los dos grupos de *Prosopis alba*, se puede inferir que ocupan ambientes distintos desde el punto de vista bioclimático, por lo que muy probablemente presentarían adaptaciones diferenciales y estaríamos ante por lo menos dos ecotipos. Esto tiene incidencia en las estrategias de mejoramiento tanto para el uso de estos recursos como para su conservación.

Basado en datos de varios estudios en isoenzimas, Nei (1974) reportó que las especies se diferencian entre sí con valores de distancias genéticas entre 0.10 y 1.0; las subespecies y variedades entre 0.02 y 0.20 y las razas entre 0.01 y 0.05.

En este sentido se puede afirmar que la distancia genética de Nei encontrada entre los dos grupos morfológicos de *Prosopis alba*, “chaqueño” y “santiagoño”, de $D = 0.14$, correspondería según el criterio mencionado, a la distancia entre dos subespecies.

La distancia genética d_0 (Gregorius, 1974), se utilizó también para estimar la diferenciación genética entre los grupos morfológicos, siendo $d_0 = 0.352$ para el pool génico, y se encuentra entre las que separan a los híbridos de sus especies parentales, lo que reafirma la hipótesis de que estos grupos están diferenciados al nivel de subespecies.

Prosopis chilensis y *P. flexuosa* son dos especies muy diferenciadas entre sí desde el punto de vista genético y adaptativo, por lo que se puede tomar la distancia $d_0 = 0.503$ como un buen punto de referencia para determinar el grado de diferenciación genética alcanzado para el nivel de especie entre los algarrobos.

Desafortunadamente no existen datos reportados de F_{st} en subespecies de algarrobo que puedan ser útiles para realizar comparaciones. Puede mencionarse el trabajo de Joseau (2006), en el que la diferenciación entre poblaciones para los grupos morfológicos estudiados, osciló entre 0,059 y 0,087, considerando este valor de F_{st} como “moderado” según una escala presentada por Yeh (2000) de 0,051 a 0,15. Teniendo esto presente, el bajo valor de $F_{st} = 0.016$ no confirmaría la existencia de los dos subgrupos de *Prosopis alba*, pero de acuerdo a otros parámetros de variación genética tales como la distancia de Nei y la de Gregorius, sumados a las evidencias morfológicas y ecológicas encontradas, se puede afirmar que estamos en presencia de dos subespecies.

CONCLUSIONES

La conservación debe asegurar una alta diversidad genética, que permita disponer de material adaptado a los cambios ambientales en particular y un aprovechamiento productivo sustentable de los recursos genéticos, tanto en el manejo de bosques nativos como en el mantenimiento de programas de mejoramiento estables en el largo plazo.

En el muestreo de los árboles se pudieron hallar diferencias a nivel de subespecies entre los dos grupos morfológicos de *Prosopis alba* por medio de marcadores moleculares microsatélites. Estos mismos podrían emplearse para la determinación de unidades de conservación y para la selección de genotipos adaptados a las condiciones de la región.

En este sentido, pudo desarrollarse un protocolo que permitió el análisis genético del material recolectado, empleando geles de poliacrilamida y tres primers diseñados específicamente para el género *Prosopis*.

La observación de la distribución de las dos subespecies en función del clima permite distinguir importantes diferencias que avalan la hipótesis de que existen, además de las diferencias genéticas y morfológicas, importantes diferencias adaptativas entre estas dos subespecies.

RESUMEN

Los algarrobos constituyen un recurso biológico estratégico para el desarrollo del Parque Chaqueño en Argentina. Su domesticación permitirá proporcionar madera de calidad, sustituyendo a la proveniente del bosque nativo, estructurar sistemas silvopastoriles y contribuir a la recuperación ecosistémica en la región. El objetivo de este trabajo fue aportar información básica acerca de los recursos genéticos de *Prosopis alba*, una de las principales especies de algarrobo del Parque Chaqueño con potencial para la domesticación. Se utilizó como material de partida el análisis morfológico mediante taxonomía numérica de caracteres de hoja y fruto de 452 individuos de las regiones fitogeográficas del Chaco Semiárido y Subhúmedo, clasificadas *a priori* como *Prosopis alba*, según la taxonomía tradicional. Este análisis permitió diferenciar claramente dos grandes grupos. La magnitud de la diferenciación alcanzada entre estos grupos supuso la existencia de por lo menos dos subespecies. Del estudio de las áreas de distribución de estos grupos morfológicos, surgen también importantes diferencias ambientales que deberían corresponderse con importantes diferencias adaptativas. Finalmente se realizó un estudio mediante marcadores microsatélites (SSR) comparando las estructuras genéticas de ambos grupos morfológicos. Nuevamente las diferencias halladas se correspondieron con las distancias genéticas que aparecen a nivel de subespecies en la bibliografía. A partir de esta información ganada dividimos a la especie *Prosopis alba* en dos subespecies que denominamos *P. alba var. chaqueña* y *P. alba var. santiagueña*.

Palabras claves: domesticación, *Prosopis alba*, recursos genéticos.

BIBLIOGRAFIA

Burkart, A. (1976). A monography of the genus *Prosopis* (Leguminosae Subfam. Mimosoidae). Journal of the Arnold Arboretum. 219-249 / 451-525.

Burkart, A. (1952). Las Leguminosas Argentinas silvestres y cultivadas. Editorial ACME, segunda Ed. pp: 569.

Busby, J.R. (1991). BIOCLIM - A Bioclimatic Analysis and Prediction System. In: Margules, C.R. & M.P. Austin (eds.) Nature Conservation: Cost Effective Biological Surveys and Data Analysis. pp: 64-68.

Carrera A.; Tranquilli, G. y Helguera, M. (2004). Aplicaciones de los marcadores moleculares. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. 2: 149-160.

Fornes, L. (2005). Mejoramiento genético de especies con fines industriales. Idia Forestales. pp: 125-130.

Galera, F. (2000). Los algarrobos. Las especies del género *Prosopis* (algarrobos) de América Latina con especial énfasis en aquellas de interés económico. pp: 269.

Giménez, A. y Moglia, J. (2003). Árboles del Chaco Argentino. Guía para el reconocimiento dendrológico. Facultad de Ciencias Forestales universidad nacional de santiago del estero. IV, 65-242.

Gregorius, H. (1974). Genetischer Abstand Zwischen Populationen. I. Zur Konzeption der genetischen Abstandsmessung. *Silvae Genetica*.23:1-3.

Hijmans, R.; Cruz, M.; Rojas, E. and Guarino, L. (2001). DIVA-GIS, version 1.4. A geographic information system for the management and analysis of genetic resources data. Manual. International Potato Center and International Plant Genetic Resources Institute, Lima, Peru.

Joseau, M. (2006). Caracterización morfológica y genética de poblaciones del género *Prosopis* del chaco semiárido del norte de Córdoba y sur de Santiago del Estero. Tesis doctoral Escuela para graduados. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba.

McMahon, J.; Hutchinson, M.; Nix, H. y Ord, K. (1996). ANUCLIM Version 1 User's Guide. Canberra: ANU, CRES.

Mottura, M.; Finkeldey, A.; Verga, A. y Gailing, O. (2005). Development and characterization of microsatellite markers for *Prosopis chilensis* and *Prosopis flexuosa* and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes*. 5 pp: 487-489.

Mottura, M. (2006). Development of microsatellites in *Prosopis spp.* and their application to study the reproduction system. Dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Forestry Science at the Faculty of Forest Sciences and Forest Ecology, Georg-August University of Göttingen.

Nei, M. (1974) A new measure of genetic distance. In *Genetic Distance*. Eds. J. F. Crow & C. Denniston. Plenum Press. New York, pp: 63-76.

Nix, H. (1986). A biogeographic analysis of Australian Elapid snakes, in Longmore, R. (ed.) *Atlas of Australian Elapid Snakes*. Australian Flora and Fauna Series 8: 4-15.

Prokopiuk, D.; Cruz, G.; Grados, N.; Garro, O. y Chiralt, A. (2000). Estudio comparativo entre frutos de *Prosopis alba* y *Prosopis pallida*. *Multequina* 9: 35- 45.

Raymond, M. and Rousset, F. (1995). An exact test for population differentiation. *Evolution* 49:1280-1283.

SAyDS Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable. Programa de Acción Subregional del Gran Chaco Americano Dirección de Conservación del Suelo y Lucha contra la Desertificación. Datos disponibles en <http://www.ambiente.gov.ar>.

TNC, FVS, DeSdel CHACO y WCS: The Nature Conservancy, Fundación Vida Silvestre, Fundación Para el Desarrollo Sustentable del Chaco y Wildlife Conservation Society-Bolivia (2005). Sitio Argentino de Producción Animal

Evaluación ecoregional del Gran Chaco Americano. 1º ed. Buenos Aires, Argentina.

UMSEF: Unidad de Manejo del Sistema de Evaluación Forestal (2002). Cartografía y Superficie de Bosque Nativo de Argentina. Dirección de Bosques, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Ministerio de Salud y Ambiente. Buenos Aires, Argentina.

Verga, A. y Gregorius, H. (2007). Comparing morphological with genetic distances between populations: A new method and its application to the *Prosopis chilensis* – *P. flexuosa* complex. *Silvae Genetica*. 56: 45-51.

Verga, A.; López Lauenstein, D; López, C.; Naval, M.; Joseau, J.; Gómez, C.; Royo, O.; Degano, W. y Marcó, M. (2009). Caracterización morfológica de los algarrobos (*Prosopis* sp.) en las regiones fitogeográficas Chaqueña y Espinal norte de Argentina. *Revista de Ciencias Forestales Quebracho* Vol.17(1,2) pp: 31-40.

Yeh F. (2000). Population Genetics. Chapter 3. Forest conservation Genetics. Principles and practice. A. Young, D. Boshier & Boyle (Editors).

PROGRAMAS

DIVA-GIS. 2007. Versión 5.4.

GeneMapper® 4.0. Applied Biosystems.

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1: Distancias genéticas d_0 entre ambos grupos morfológicos, probabilidad (p) y desvío estándar (SE) según el *exact-test*. Para el pool la probabilidad corresponde al análisis de χ^2

Locus	d_0	p	SE
Mo07	0.484	0.0000	0.0000
Mo08	0.283	0.1612	0.0047
Mo13	0.288	0.1699	0.0037
Pool	0.352	0.0000	-



Figura 1: Región del Gran Chaco Americano (SAyDS).

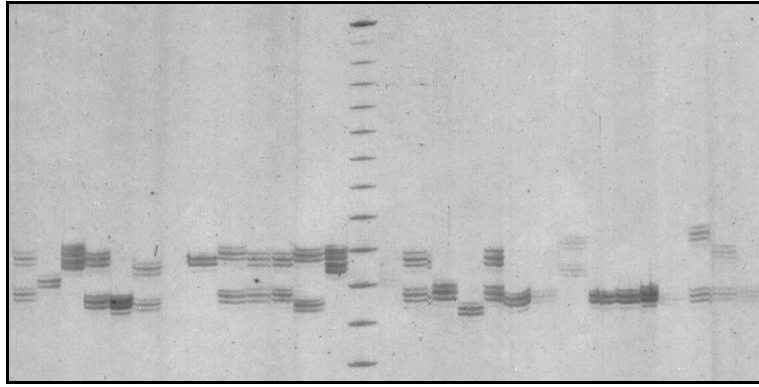


Figura 2: Imagen de corrida electroforética en gel de poliacrilamida, locus Mo 13.

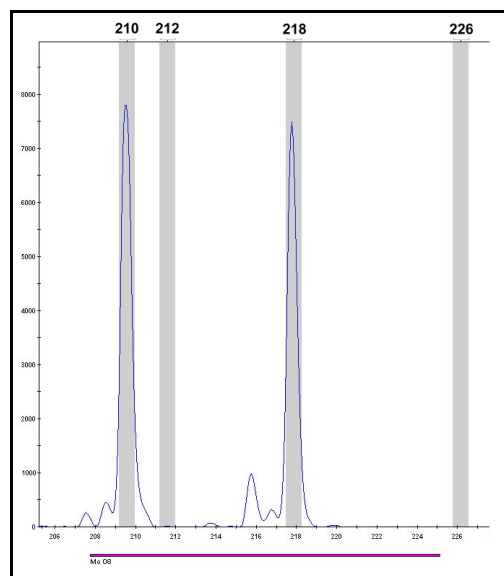


Figura 3: Fenograma mostrando picos de señales que corresponden a alelos del locus Mo 08.

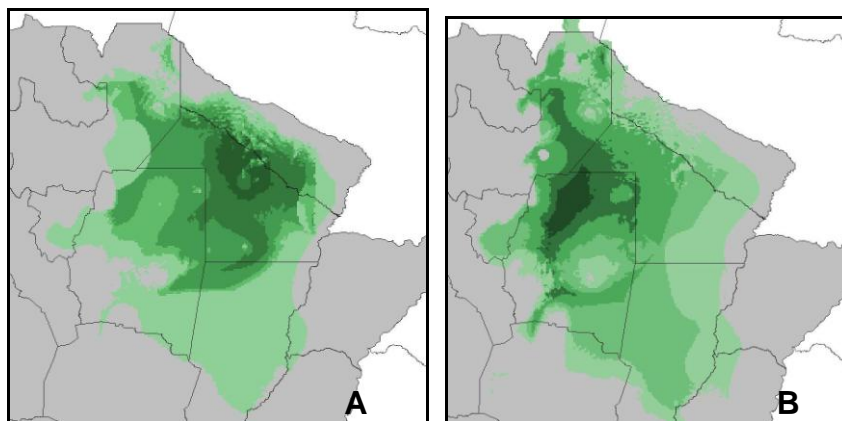




Figura 4: Mapas de aptitud climática para *Prosopis alba* “chaqueño” (A) y *P. alba* “santiagoño” (B). Verde más oscuro representa un ambiente más adecuado para el grupo morfológico en cuestión (Análisis realizado mediante BIOCLIM)