
MÉTODO DE ANÁLISIS FENOLÓGICO DE UN RODAL SU APLICACIÓN EN UN ENJAMBRE HÍBRIDO DE *Prosopis spp.*

Ana A. Córdoba¹ y Anibal R. Verga¹

RESUMEN

Se desarrolló una metodología para describir, cuantificar y analizar el comportamiento de la floración de un rodal y de sus árboles individuales. Esta metodología tiene por objeto obtener la información necesaria sobre fenología del rodal, para establecer modelos del sistema de apareamiento a partir del análisis conjunto con información proveniente de análisis con marcadores moleculares sobre árboles semilleros y descendencias. Se aplica la metodología propuesta al estudio del sistema de apareamiento de un enjambre híbrido de *Prosopis spp.*, presentándose algunos resultados preliminares. El trabajo se llevó a cabo en un rodal ubicado en la región del Chaco Árido argentino que constituye un enjambre híbrido formado por las especies puras de *Prosopis flexuosa* y *Prosopis chilensis* y sus híbridos interespecíficos. Para el desarrollo del modelo fue necesario contar con información cuali y cuantitativa de la fase de floración. Se realizó un seguimiento fenológico individual de los árboles, teniendo en cuenta la presencia y cantidad de flores en fase de flor completamente abierta (flor receptiva). En base a estas observaciones fue posible estimar el periodo de floración (inicio y fin) de cada uno de los árboles. Para cuantificar la floración, se establecieron a campo categorías de intensidad de producción de flores. Con toda la información obtenida se determinó la función que describe la curva media de floración individual relacionando tiempo e intensidad de floración. Ajustando las observaciones fenológicas individuales a la función hallada, fue posible construir la curva de floración de cada planta. De esta forma se estima el aporte de flores de cada árbol día por día. En base a esta información se desarrolla un modelo del sistema de apareamiento que con información genética adicional obtenida mediante marcadores moleculares hace posible abrir hipótesis sobre la existencia de mecanismos de aislamiento genético entre los componentes del enjambre.

Palabras clave: *Prosopis*, híbridos, fenología, modelos de apareamiento

¹ Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE) INTA Argentina. cordobaana@yahoo.com.ar; arverga@yahoo.com

METHOD OF PHENOLOGICAL ANALYSIS OF A STAND ITS APPLICATION IN A HYBRID SWARM OF *Prosopis spp*

SUMMARY

A methodology was developed to describe, to quantify and to analyse the behaviour of flowering of a stand and its individual trees. This methodology intends to obtain the necessary data on the stand phenology, to establish models of mating system from the joint analysis with information originated with molecular markers about tree seed and their progenies. This methodology is applied to the mating system of a hybrid swarm of *Prosopis*. The work was carried out in a stand of the Argentinean region of the Arid Chaco, that constitute an hybrid swarm formed by the pure species of *Prosopis flexuosa* and *Prosopis chilensis* and its interspecific hybrids. To develop the model was needed to count with qualitative and quantitative information about the floral phase. With this purpose, the pursue of the phenology of each tree was made, having in count the presence and the quantity of flowers in receptive phase (full open flower). These observations allow estimating the flowering period (beginning and end) of each tree. To quantify the flowering, categories of intensity of flowers production were established in the field. The function that described the average curve of individual flowering that relates time and intensity was determined with the information obtained. Adjusting the individual phenological observations to the function found was possible to construct individuals flowering curves. In this way is possible to estimate the flowers contribute of each tree every day. A model of the mating system is evolved on the basis of that information, which with additional genetic data, obtained with molecular markers, makes possible to identify the existence of genetic isolation mechanism between the swarm components.

Key words: *Prosopis*, hybrids, phenology, mating models

INTRODUCCIÓN

El sistema de apareamiento determina en buena medida la constitución genotípica de la descendencia de un rodal. Los programas más utilizados en la actualidad para analizar el sistema de apareamiento y estimar sus principales parámetros (CERVUS, Marshall *et al.* (1998); MLTR, Rittland (2002) y otros) utilizan como información únicamente la surgida del análisis de marcadores moleculares sobre descendencias y progenitores. Sin embargo la información que puede aportar el estudio fenológico de un rodal, puede ser determinante para entender los mecanismos involucrados.

Es obvio que una condición necesaria para que dos plantas se apareen entre si es que ambas posean flores maduras simultáneamente. Si existe una distribución no aleatoria entre los tipos genéticos que se estudian y el comportamiento en los tiempos e intensidades de floración, habrá un desfase entre la composición genotípica esperada de la descendencia según se considere o no este aspecto. Estos programas asumen, entre otros supuestos, que todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse entre si, por lo que en el proceso de análisis el comportamiento de la floración es uno de los factores desconocidos.

Este trabajo presenta un método para introducir al análisis del sistema de apareamiento el factor de la fenología floral, con el cual se obtienen frecuencias genotípicas esperadas en la descendencia que ya involucran el comportamiento fenológico del rodal, observado empíricamente. Quedando así descartado este efecto, se abre la posibilidad de afinar hipótesis sobre otros mecanismos ante diferencias entre frecuencias esperadas por el modelo y observadas mediante marcadores moleculares.

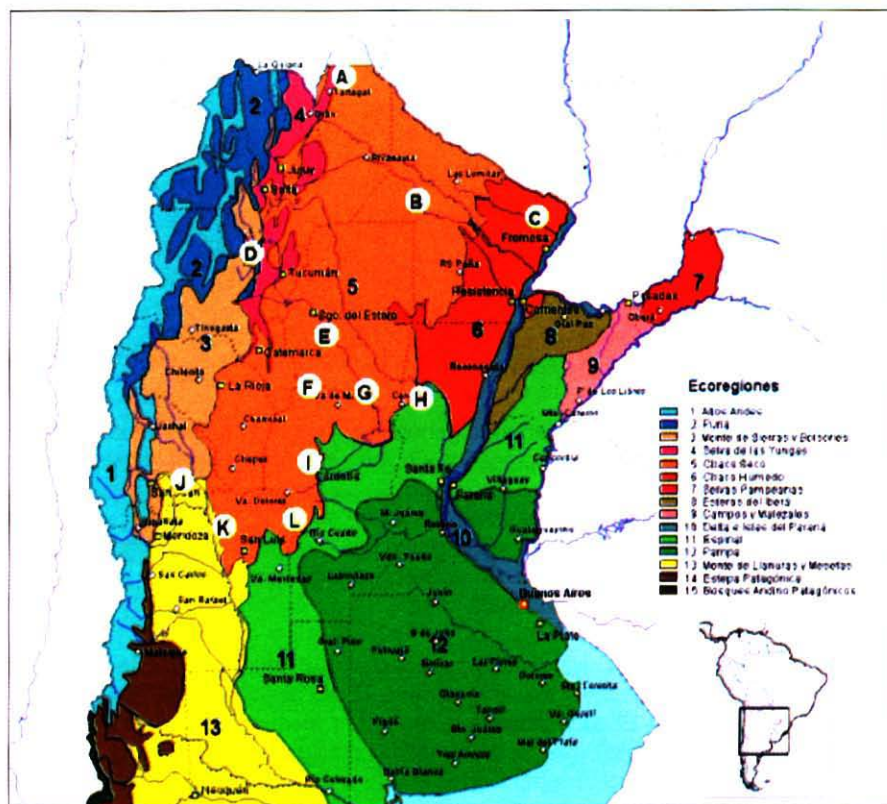
Cuando se trata de un enjambre híbrido, donde están presentes por lo menos dos especies y sus híbridos interespecíficos el sistema de apareamiento toma un significado especial. En este caso existe la posibilidad de estar frente a procesos microevolutivos que tienden a la generación de nuevas formas adaptadas a condiciones distintas que las de las especies parentales. En el caso de que estas nuevas formas tengan aplicación para el uso, la conformación de grupos de individuos con cierta estabilidad e identidad genética puede transformarse en base para la obtención de material de propagación adaptado a condiciones nuevas, tomando de esta forma importancia estratégica para el desarrollo de áreas marginales sujetas a procesos de desertificación.

El conocimiento de los mecanismos de aislamiento incipientes que puedan haber desarrollado estas nuevas formas permitiría su identificación, quedando definida la unidad genética básica para incorporarlas a un programa de mejoramiento, y a su vez podrían ser utilizados como herramienta para orientar su evolución posterior en el contexto de ese programa.

Debido a que es de interés conocer estos mecanismos, los tipos genéticos que se analizan buscan no ser neutrales, sino que precisamente estén ligados a cada uno de los componentes que integran el enjambre. Esto implica que es de esperar que no haya independencia entre los distintos tipos genéticos bajo análisis y su comportamiento en los tiempos e intensidades de la floración.

El género *Prosopis*, de flores hermafroditas y polinización entomófila, constituye en este aspecto un excepcional objeto de estudio y de aplicación para el uso en áreas marginales. De la simple observación de campo se puede comprobar que en sitios donde entran en contacto distintas especies afines de este género aparecen individuos de morfología intermedia. Su origen híbrido se ha podido comprobar en enjambres en el Chaco árido entre *Prosopis flexuosa* y *P. chilensis* (Verga, 1995). También en estudios similares en áreas de contacto entre *P. alba*, *P. nigra*, *P. chilensis* y *P. flexuosa* al norte de Córdoba, sur de Santiago del Estero y entre *P. alba* y *P. ruscifolia* en Santiago del Estero, existen evidencias de que se producirían cruzamientos interespecíficos con aparición de híbridos que prosperan principalmente en ambientes perturbados. En la Figura N° 1 se señala estos y otros sitios donde se ha podido observar este fenómeno entre distintas especies del género.

En los casos en que se ha realizado estudios, estos híbridos pueden ser clasificados morfológicamente y separados en grupos diferenciados de las especies puras. También se ha observado que los enjambre híbridos están asociados en general a ambientes perturbados de origen antrópico (bordes de ruta, campos desmontados y abandonados, áreas de riego, bosques secundarios a partir de incendios, etc.). La proliferación de individuos híbridos bajo estas condiciones hace pensar que éstos poseerían buena capacidad de adaptación. En áreas degradadas del Chaco árido se pueden observar individuos de origen híbrido de muy buen crecimiento y forma, destacándose en algunos casos, respecto de las especies puras.



A (TARTAGAL – SALVADOR MAZA): *Prosopis alba* – *P. sp*

C (FORMOSA – LAGUNA BLANCA): *P. alba* – *P. hassleri*

E (RÍOS DULCE Y SALADO, SANTIAGO DEL ESTERO) Y
G (DEPRESIÓN DE MAR CHIQUITA): *P. alba* – *P. ruscifolia*;

H (CERES, SANTA FE): *P. nigra* – *P. affinis*

J (SUR DEL BOSQUE TELTECA, MENDOZA): *P. flexuosa*
– *P. alpataco*;

B (IMPENETRABLE, CHACO): *P. alba* – *P. nigra*;

D (Valles Calchaquíes): *P. alba* – *P. ferox*;

F (CORREDOR ENTRE SALINAS GRANDES Y
SIERRAS DE CÓRDOBA): *P. alba* – *P. nigra* – *P. chilensis*;

I (PEDEMORTE SIERRAS DE POCHO): *P. chilensis* – *P. flexuosa*;

K (ÁREA INFLUENCIA RÍO DESAGUADERO, MENDOZA
- SAN LUIS) Y L (VALLE CONLARA): *P. flexuosa* – *P. caldenia*.

Figura N° 1

ENJAMBRES HÍBRIDOS DE *Prosopis* EN ARGENTINA. ALGUNAS ÁREAS DONDE APARECEN EN SIMPATRÍA ESPECIES AFINES DEL GÉNERO Y PROBABLES (EN ALGUNOS CASOS COMPROBADOS) HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS

La posibilidad de integrar a los individuos de origen híbrido en grupos morfológicos con base genética común y diferenciarlos netamente de las especies puras, significa que no todo el continuo de formas intermedias se encuentra representado en estos enjambres, sino que tendrían una serie

de características propias que permiten su diferenciación. Finalmente, otra característica de estos híbridos es su fertilidad normal, pudiendo producir semilla y propagarse sin inconvenientes.

Estas tres características: capacidad adaptativa, cierta identidad morfológica y genética y fertilidad normal, pueden tomarse como producto de un proceso microevolutivo que se generaría a partir de estos enjambres híbridos.

Por otro lado la generalización de este proceso en distintas áreas y entre distintas especies del género, lleva a pensar que ésta podría ser una estrategia adaptativa de todo el conjunto de especies. Esta capacidad le permitiría al conjunto acomodarse fácilmente a cambios ambientales y a la ocupación de nuevos nichos a partir de exponer a la selección una mayor diversidad, producto del intercambio genético entre distintas especies ya establecidas y que evolucionaron bajo distintas condiciones.

Para que exista identidad y estabilidad genética de un grupo de individuos, y que estos tengan la posibilidad de evolucionar adaptándose a nuevas condiciones ambientales (ocupación de nuevos nichos) es condición necesaria que exista cierto grado de aislamiento genético de algún tipo, entre este nuevo grupo y las especies parentales. De lo contrario, el intercambio irrestricto imposibilitaría cualquier nueva adaptación y una evolución independiente, por lo que el desarrollo de mecanismos de aislamiento aparece inmediatamente como un carácter con ventaja adaptativa para la nueva "entidad taxonómica".

El objeto de estudio para conocer estos procesos es el enjambre híbrido y dentro de él, particularmente el sistema de apareamiento imperante. Es allí donde se manifiesta y está activo este complejo de especies. El conocimiento sobre estos mecanismos arrojará luz sobre el funcionamiento de este conjunto de especies tomadas como un todo (singameón). De acuerdo con Grant (1971) estos complejos generan nuevas formas con características adaptativas nuevas y sin impedimentos biológicos para evolucionar, ya que los híbridos producen descendencia tan fértil como las especies parentales. Entre los factores que permitirían la aparición de los híbridos uno de los más importantes es el de la "hibridización" del hábitat, en muchos casos como producto de la intervención humana (Anderson, 1948; Grant 1971). Prueba de esto, es que el grupo de especies afines e interrelacionadas de *Prosopis* que se analiza, ha logrado adaptarse a ambientes tan disímiles como el desierto de los bolsones cordilleranos donde forma masas puras, y los palmares en la zona húmeda de Formosa donde es un integrante secundario.

Para el desarrollo de una metodología de estudio del sistema de apareamiento se tomó como caso particular un enjambre híbrido entre *P. flexuosa* y *P. chilensis* ubicado al pie de las sierras de Pocho en el Chaco árido argentino.

Estudios previos sobre *Prosopis chilensis* y *P. flexuosa* (Palacios y Bravo 1981; Saidman y Vilardi, 1987; Saidman 1990; Verga 1995, Vilela y Palacios 1998, Verga 2000) han arrojado luz sobre la variabilidad genética, la diferenciación intra e interpoblacional, como así también para la identificación de híbridos interespecíficos, que han permitido reconocer procesos de introgresión entre ambas especies y afianzar la hipótesis general de que estas especies forman parte de un singameón o complejo homogamético.

Se llevaron a cabo estudios genéticos mediante marcadores isoenzimáticos y de comportamiento de fenología floral. Respecto de este último, se desarrolló la metodología para obtener un modelo que permita describir y cuantificar el comportamiento de la floración del rodal y de sus árboles individuales.

En este caso en particular, de los distintos mecanismos de aislamiento entre especies afines deben quedar descartados la falta de fertilidad o adaptación de los híbridos y las diferencias en el momento de receptividad de la flor (no existiría desfase producto de la receptividad de la flor en distintos momentos del día). Por otra parte, si entran en consideración las diferencias en las tasas de apareamiento entre los distintos tipos en el enjambre, debida a una capacidad de competencia diferencial entre polen de distinto origen; preferencias por parte de los insectos; arreglo espacial de los tipos que integran el enjambre en el rodal; desfases en el periodo de floración y en general incompatibilidad (pre- o postcigótica) determinadas genéticamente.

OBJETIVO

Desarrollar un método de análisis del comportamiento de la floración de un rodal con especial aplicación al estudio del sistema de apareamiento en enjambres híbridos del género *Prosopis*.

MATERIAL Y MÉTODO

Desarrollo Del Modelo

El modelo del sistema de apareamiento propuesto a partir del análisis de la fenología floral se construye sobre los siguientes supuestos:

- Se aparean entre sí únicamente individuos que superponen temporalmente la fase de flor receptiva. Se excluyen todos los otros mecanismos posibles de aislamiento enunciados más arriba.
- La cantidad de polen, óvulos y semillas que una planta produce diariamente es directamente proporcional a la cantidad de flores receptivas que genera el día en cuestión.
- La cantidad de polen no es limitante y su composición es la misma en todo el rodal (no hay efecto por distancia entre plantas).
- La cantidad total de semilla producida por un árbol es la suma de la producción diaria.
- No hay migración de genes (la parcela se comporta como un sistema cerrado).
- La meiosis es regular.
- El conjunto de individuos es hermafrodita y diploide.

En el caso de conocerse la tasa de autofecundación ésta puede ser incorporada en el modelo.

Registro Fenológico

El rodal debe ser mapeado de tal forma de contar con la información de las distancias entre todos los árboles que lo componen. Cada árbol debe ser identificado y estimado el volumen de copa. A intervalos regulares se visita el rodal y se realizan observaciones individuales asignando

a cada árbol un índice de Intensidad de Floración (IF), independiente del volumen de copa, según una escala cualitativa de por lo menos cuatro clases para el estadio de flor receptiva.

También se debe estimar el periodo de floración de cada árbol individual, como el periodo de tiempo en el cual las plantas presentaron flor receptiva. Para ello es necesario precisar los momentos de inicio y fin de fase de flor abierta pero, dado que los registros fenológicos son observaciones puntuales realizadas sobre un proceso que es continuo, en muy pocos casos sino en ninguno, coincidirán con el momento preciso de inicio y fin de la fenofase. En consecuencia, éstos deben estimarse. Por ello se deben registrar los otros estadios florales, además de la presencia y abundancia de flor receptiva. Esta información, analizada en forma conjunta con la velocidad de cambio de cada fenofase, que surge de las observaciones del comportamiento de la floración a campo, permite proyectar y reproducir hacia adelante y hacia atrás en el tiempo, la ocurrencia de las distintas fenofases, pudiéndose así delimitar el periodo de floración exacto de cada planta.

Por otro lado se debe estimar la producción total de frutos de cada árbol en el rodal a través de una metodología similar a la utilizada para el registro de la floración. Se pueden determinar clases de abundancia de frutos independientes del tamaño de cada planta, para luego ponderar por este factor. Al igual que para la producción de flores individual, la información obtenida debe permitir evaluar el aporte porcentual de frutos de cada planta al total de frutos producidos por el rodal.

Estimación de la Función de Intensidad de Floración en el Tiempo, de un Árbol Individual

Para cuantificar el aporte de flores abiertas de cada árbol día por día (que representa en el modelo del sistema de apareamiento la cantidad de gametas de cada árbol que participan de los cruzamientos del rodal), es necesario hallar una función que lo describa. Sin embargo, dado que los registros fenológicos se realizan periódicamente y no en forma continua, el número de observaciones sobre cada individuo en particular no resulta suficiente para ajustar una función de floración por árbol.

La función que describe la intensidad de floración de cada árbol en el tiempo se puede obtener a partir del análisis conjunto de todos los registros fenológicos individuales en el rodal. Para poder realizar esta operación se estandariza entre 0 y 1 el periodo de floración individual de cada árbol. De esta forma se obtiene un conjunto de pares ordenados tiempo – intensidad de floración (t, IF) que permiten su ajuste a una función. Para facilitar este ajuste puede dividirse el tiempo total de floración a intervalos regulares. Para cada intervalo se calcula la media de los valores de IF correspondientes al conjunto de observaciones involucradas en ese intervalo, a fin de disminuir el ruido que genera el número distinto de puntos de IF a lo largo de todo el periodo de floración.

Una vez obtenida la función de ajuste de IF , se estandariza dividiendo cada valor diario de IF por el máximo de la función.

Cálculo del Aporte de Flores Receptivas de cada Árbol y de la Estructura Genética de la Nube de Polen para un Locus dado día por día en el Rodal

Ajustando los valores observados para un árbol individual según la función de IF

estandarizada, se puede obtener el valor absoluto de IF para cada día dentro de su periodo de floración. Este procedimiento implica el supuesto de que todos los árboles del rodal florecen respetando una misma función. Si se comprueba que el ajuste de los valores observados es bajo para algunos individuos o grupos de individuos, puede buscarse una función de IF para cada grupo, a partir de su análisis conjunto, siguiendo el procedimiento descrito para el rodal.

A fin de obtener un índice del aporte total de flores receptivas de cada árbol día por día (f) se debe multiplicar el IF por un factor que contemple el volumen de copa (VC):

$$f = IF \cdot VC$$

Donde IF es el valor del índice de floración absoluto de un árbol para un día en particular ajustado según la función hallada. VC es, para el caso de algarrobo, el volumen de copa estimado como una semiesfera, de radio igual a la mitad del diámetro de copa medido en metros.

Una vez calculado el índice de floración diario f para cada árbol día por día se pueden ordenar los datos en una tabla de análisis (Cuadro N° 1).

Cuadro N° 1
TABLA DE ANÁLISIS PARA EL ÍNDICE DE FLORACIÓN DIARIO

N° Árbol	Día					Total
	1	2	3	...	n	
1	f_{11}	f_{12}	f_{13}	...	f_{1n}	$\sum_{j=1}^n f_{1j}$
2	f_{21}	f_{22}	f_{23}	...	f_{2n}	$\sum_{j=1}^n f_{2j}$
3	f_{31}	f_{32}	f_{33}	...	f_{3n}	$\sum_{j=1}^n f_{3j}$
...						...
a	f_{a1}	f_{a2}	f_{a3}	...	f_{an}	$\sum_{j=1}^n f_{aj}$
Total	$\sum_{i=1}^a f_{i1}$	$\sum_{i=1}^a f_{i2}$	$\sum_{i=1}^a f_{i3}$...	$\sum_{i=1}^a f_{in}$	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n f_{ij}$

En el Cuadro N° 1, f_{ij} es el aporte de flores del árbol i el día j ; $i = 1, 2, 3, \dots, a$, donde a es igual al número de árboles considerado en el rodal y $j = 1, 2, 3, \dots, n$, donde $j = 1$ corresponde al primer día de floración del árbol más temprano y $j = n$ corresponde al último día de floración

del árbol más tardío.

$\sum_{i=1}^n f_i$, es el total de flores presentes en el rodal el día j , mientras que $\sum_{j=1}^n f_i$ calcula el total de flores aportadas al rodal por el árbol i . La doble sumatoria $\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n f_i$ representa el total de flores producidas por el rodal en todo el periodo de floración.

Para calcular la estructura genética de la nube de polen diaria en el rodal, para el locus

l con $l = 1, 2, 3, \dots, m$ número de alelos, según el modelo, se define $A_i = \frac{f_i}{\sum_{i=1}^n f_i}$ como el

aporte relativo de flores del árbol i el día j , donde $\sum_{i=1}^n A_i = 1$ y $0 \leq A_i \leq 1$, y $p_i = \sum_{j=1}^n (A_i \cdot \delta_j)$ (1)

como la frecuencia relativa en la nube de polen del alelo l el día j , donde $\delta_j = 1$ si el árbol i es homocigota para el alelo l ; $\delta_j = 0.5$ si el árbol i es portador heterocigota para el alelo l y $\delta_j = 0$ si el árbol i no posee el alelo l .

Cálculo de la Composición Genotípica de la Descendencia para cada Árbol Individual y de un Conjunto de Árboles

Se define P_{rli} como la frecuencia del genotipo rl (diploide) para el locus L en la descendencia del árbol i el día j , donde r es el alelo materno, $r = r_1$ o $r = r_2$ y $r = 1, 2, 3 \dots m$, r_1 y r_2 son los dos alelos que constituyen el genotipo del árbol i para el locus L . m es el número total de alelos para el locus L y finalmente $l = 1, 2, 3 \dots m$ y representa el alelo aportado por la nube de polen (paterno).

$$B_i = \frac{f_i}{\sum_{i=1}^n f_i}$$

Por otro lado se define: $\frac{f_i}{\sum_{i=1}^n f_i}$ como la cantidad relativa de flores aportadas por el árbol i el día j respecto del total de flores producidas por el árbol i durante todo el periodo de floración del rodal. Donde $\sum_{i=1}^n B_i = 1$ y $0 \leq B_i \leq 1$. Considerando un coeficiente de autofecundación S y un coeficiente de fecundación cruzada de $1-S$, P_{rli} queda definido como:

$$P_{rli} = B_i \cdot S \cdot \delta_i + B_i \cdot (1-S) \cdot p_i \cdot \gamma_i$$

Donde $\delta_i = 1$ si $r_1 = r_2 = l$; $\delta_i = 0.25$ si $r_1 \neq r_2$ y $l = r_1$ o $l = r_2$; $\delta_i = 0$ si $l \neq r_1$ y $l \neq r_2$; $\gamma_i = 1$ si $r_1 = r_2$; $\gamma_i = 0.5$ si $r_1 \neq r_2$ y p_i es la frecuencia del alelo l en la nube de polen el día j . En caso de no conocerse S , $S = 0$, pasando éste a ser uno de los supuestos del modelo.

Al finalizar el periodo de floración, la frecuencia final del genotipo rl en la descendencia del árbol semillero i será:

$$P_{rli} = \sum_{j=1}^n P_{rli} \quad \text{y} \quad \sum_{r=1}^m \sum_{l=1}^m P_{rli} = 1, \quad 0 \leq P_{rli} \leq 1$$

Para calcular la frecuencia genotípica de un grupo de árboles del rodal o de todo el rodal, se debe tener en cuenta el aporte relativo de semilla de cada árbol respecto del total de semilla producido por el conjunto.

Siguiendo la metodología utilizada para cuantificar las flores receptivas en un árbol, se define un índice de fructificación IFr . Al igual que IF , este índice surge de una escala cualitativa, independiente del tamaño del árbol, que estima la cantidad de frutos producidos por un árbol en por lo menos cuatro clases. A cada clase se le asigna un valor de IFr . Finalmente se estima el volumen total de frutos producidos por un árbol (Fr) multiplicando IFr por un factor de volumen de copa ($Fr = IFr \cdot VC$).

Considerando un grupo de N árboles se puede calcular el aporte relativo de frutos (fr) del árbol i ($i = 1, 2, 3, \dots, N$) respecto al total de frutos aportado por el grupo mediante:

$$fr_i = \frac{Fr_i}{\sum_{i=1}^N Fr_i}$$

Obsérvese que $\sum_{i=1}^N fr_i = 1$ y $0 \leq fr_i \leq 1$. Finalmente, la frecuencia relativa del genotipo ri para un grupo de árboles en el rodal o para todo el rodal considerando la fructificación diferencial de los individuos que lo integran, queda definida como:

$$P_{ri} = \sum_{i=1}^N (P_{ri} \cdot fr_i) \quad (2)$$

Si no existen datos sobre el nivel de fructificación de los árboles del rodal se puede asumir que el número de frutos de cada individuo es proporcional al número total de flores producidas por el árbol. De esta forma la ecuación 2 se modifica:

$$P_{ri} = \sum_{i=1}^N (P_{ri} \cdot pf_i) \quad (3)$$

$$pf_i = \frac{\sum_{j=1}^n f_{ij}}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n f_{ij}}$$

Donde $\frac{\sum_{j=1}^n f_{ij}}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n f_{ij}}$, esto es la producción relativa de flores del árbol i respecto del total de flores producidas por el rodal.

Contraste con Resultados Empíricos Obtenidos Mediante Marcadores Moleculares

Al igual que para los otros modelos de sistema de apareamiento, una vez calculadas las frecuencias genotípicas esperadas, tanto para el rodal como para cada árbol en particular, éstas pueden contrastarse con el número de semillas por genotipo halladas empíricamente

por análisis de marcadores moleculares o bioquímicos, utilizando la prueba de χ^2 . Diferencias no significativas pueden tomarse como un fuerte indicio de que los supuestos se cumplen, es decir que para el árbol en cuestión, o para el rodal en su conjunto (según el caso), los apareamientos pueden explicarse por su genotipo, la composición genotípica del rodal y su comportamiento fenológico.

Cuando las diferencias entre observado y esperado son significativas indican con certeza que los supuestos del modelo no se cumplen. En este caso, de la comparación de las frecuencias genotípicas esperadas y observadas, pueden surgir hipótesis sobre qué mecanismos operan para que éstas surjan. Debido a que se tiene la información sobre la distribución espacial de los genotipos y de sus tiempos e intensidades de floración se puede observar primero en forma cualitativa, analizando cada árbol individualmente, si existe influencia del entorno inmediato sobre la constitución de la descendencia observada respecto de la esperada. En este caso puede orientarse la investigación posterior a este nuevo factor: la distribución espacial del polen de un individuo en particular.

Ante la ausencia de otros mecanismos, el factor distancia puede determinarse mediante la distribución de un alelo único en el rodal, a través del análisis de las descendencias de árboles ubicados a distintas distancias del árbol portador, o mediante análisis de paternidad (Benedixen, 2001; Fromm, 2001). Con esta información es posible determinar una curva de ajuste de frecuencias relativas de apareamientos en función de la distancia. En este modelo esta función (normalizada entre 0 y 1) puede ser incorporada al modelo en el cálculo de la nube de polen, la que será distinta para cada árbol en particular e igual a:

$$p_{hi} = \sum_{i=1}^a (A_{ij} \cdot f(d_i) \cdot \delta_i)$$

Esta es la ecuación (1) modificada, ponderando el aporte relativo de flores de cada árbol A_{ij} por el valor de frecuencia de apareamiento en función de la distancia $f(d)$. Obsérvese que se agrega el subíndice i a la frecuencia alélica debido a que cada árbol posee, en este caso, una nube de polen propia. Para el caso particular de $d_i = 0$, $f(d)$ será igual a S (coeficiente de autofecundación).

Cuando las diferencias significativas entre observado y esperado no pueden ser explicadas por los efectos de la distribución espacial de los genotipos, quedan en consideración las incompatibilidades genéticas, y en general los mecanismos de aislamiento determinados por factores genéticos, las posibles preferencias de insectos polinizadores (para el caso de especies entomófilas), diferencias en competencia entre polen de distintos orígenes, etc. que abren otras líneas de trabajo.

Aplicando la ecuación (2) se obtienen las frecuencias genotípicas de un grupo de individuos dentro del rodal o de todo el rodal. Este resultado esperado, según el modelo, también puede contrastarse con el observado para cada grupo o para el rodal según el caso. Debido a que el aporte en semilla al total de semillas del colectivo a analizar puede diferir y no distribuirse aleatoriamente respecto de los genotipos, se debería tener sumo cuidado en la toma de la muestra para obtener el dato empírico de frecuencias genotípicas.

El análisis de estos resultados comparados también con el esperado por equilibrio HW² puede aportar hipótesis para comprender el sistema de apareamiento imperante.

Aplicación Del Modelo. Análisis preliminar en un enjambre híbrido de *Prosopis spp*

Área de Estudio

El estudio se lleva a cabo en la Reserva Forestal Chancaní, Provincia de Córdoba, Argentina, ubicada en la región del Chaco Árido (Morello *et al*, 1985). El rodal es producto de treinta años de regeneración natural sobre un área abandonada, dedicada con anterioridad a agricultura bajo riego. Lo componen 92 árboles, entre los que se encuentran individuos pertenecientes a las especies puras de *Prosopis chilensis* y *Prosopis flexuosa* y otros de características morfológicas intermedia.

Caracterización Taxonómica de los Árboles del Rodal y Genética de las Descendencias

La clasificación de los árboles se llevó a cabo en base al análisis combinado de taxonomía numérica de caracteres morfológicos cualitativos y cuantitativos de hoja y fruto y de un marcador isoenzimático.

La caracterización genética se realizó mediante el análisis isoenzimático del locus ADH-A (enzima Alcoholdehidrogenasa) en 15 o más semillas provenientes de cruzamientos libres para cada árbol semillero, mediante separación electroforética sobre gel de almidón. Esta enzima es utilizada como marcador para facilitar la identificación de las especies puras de *P. chilensis*, que presenta el alelo 3 prácticamente fijado, *P. flexuosa* con una frecuencia del alelo 2 superior al 80% e híbridos interespecíficos de frecuencias intermedias para ambos alelos (Verga, 1995). El genotipo de los árboles semilleros se dedujo a partir de la composición genética de su descendencia mediante el método de Gillet (1997).

Registro Fenológico

Se realizaron las observaciones y los registros fenológicos siguiendo la metodología expuesta, durante un periodo de floración completo (2003-2004), cada una semana o más, dependiendo de la velocidad de cambio de las fenofases.

La abundancia de flores se relevó en base a cuatro clases (Cuadro N°2). Para caracterizarlas cuantitativamente, se asignó a cada una de ellas un valor estimado de la cantidad total de flores incluyendo todos los estadios florales, independientemente del volumen de la copa del árbol. Para ello, se seleccionaron árboles representativos de cada una de las categorías y se determinó, en cada caso, la cantidad de inflorescencias presentes en las ramas y el porcentaje de ramas florecidas.

² HW es la Ley del Equilibrio de Hardy-Weinberg. Establece que en una población con apareamiento al azar las frecuencias genotípicas de un locus individual se fijan en un valor de equilibrio (*Nota del editor*)

Por otro lado, las flores presentes en los árboles fueron clasificados en cuatro estadios florales o fenofases: pimpollo cerrado (*PC*), pimpollo con pistilo emergiendo (*PI*), flor completamente abierta (*A*) y flor vieja (*V*). Esta clasificación se realizó en base a la presentada por Genise *et al.* (1990) modificada. Luego, se asignó a cada fenofase presente en el árbol un valor porcentual, que representa su abundancia relativa en el árbol respecto del total de flores presentes, de tal forma que la suma $PC\% + PI\% + A\% + V\% = 100\%$.

Cuadro N° 2

**CATEGORÍAS DE FLORACIÓN, QUE REPRESENTAN DISTINTOS NIVELES DE ABUNDANCIA DE
AMENTOS ESPICIFORMES, ESTABLECIDAS ESPECÍFICAMENTE PARA EL RODAL EN ESTUDIO Y
UTILIZADAS EN EL REGISTRO FENOLÓGICO DE LOS ÁRBOLES INDIVIDUALES.**

Categoría	Ramas con flores	Número de inflorescencias por rama
1	Hasta el 30%	1 a 5
2	Del 31 al 50%	5 a 10
3	Del 51% al 80%	5 a 10
4	Más del 80%	Más de 10

Para ponderar la intensidad de floración que representa cada categoría se asignó a cada una de ellas un valor de índice de floración total (*IFT*) que involucra todas las fenofases. Correspondiendo para la categoría 1 un valor de $IFT = 1$; categoría 2, $IFT = 2$; categoría 3, $IFT = 4$; categoría 4, $IFT = 8$. De esta manera queda ponderada la cantidad total de flores en la planta. Finalmente se calculó el índice de flor receptiva (para aplicar al modelo):

$$IF = \frac{IFT \cdot A\%}{100}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción de la Floración (fase flor receptiva) en el Rodal

Siguiendo la metodología se halló la función que describe la intensidad de floración en el tiempo $f(t)$. A partir de esta función se calculó cada una de las curvas de floración individuales. La función polinómica de tercer grado:

$$f = 8.86 \cdot t^3 - 15.36 \cdot t^2 + 6.78 \cdot t - 0.08$$

ajusta con un $r^2 = 0.87$. Este ajuste corresponde hasta el tiempo $t = 0.8$. A partir de allí existen dos grupos de árboles que se comportan de distinta forma. En uno de ellos se puede observar un muy pequeño segundo pulso de floración que obligaría a la determinación de funciones específicas para cada uno de ellos. A los fines de esta presentación, a modo de ejemplo, se ajustó este último tramo (desde $t = 0.8$, hasta $t = 1.0$) mediante una función cuadrática que representa una solución de compromiso entre el comportamiento de ambos grupos

En la Figura N° 2 se puede observar el resultado de la superposición de las curvas de floración de cada uno de los 92 árboles que integran el rodal. Existen desfases importantes

tanto en tiempo como en volumen de flores aportado por cada uno.

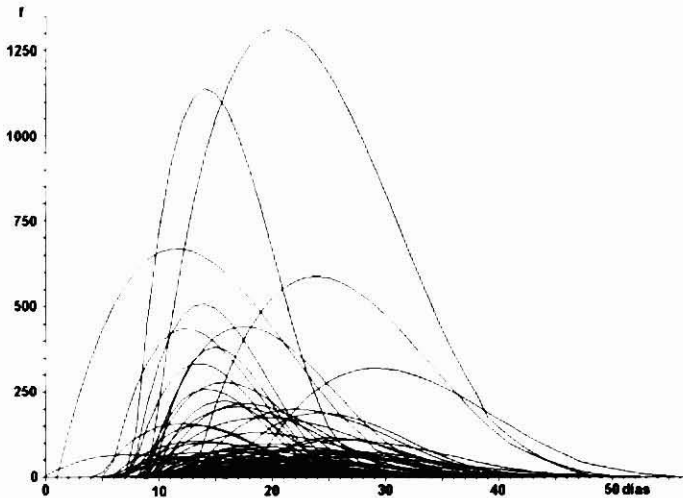


Figura N° 2

ÍNDICE DE FLORACIÓN (F) EN FUNCIÓN DEL TIEMPO (DÍAS) DONDE PUEDE OBSERVARSE EL PERÍODO DE FLORACIÓN (FASE FLOR RECEPTIVA) Y LA CANTIDAD TOTAL DE FLORES APORTADAS POR CADA UNO DE LOS ÁRBOLES DEL RODAL DÍA POR DÍA.

Cálculo de las Frecuencias Genotípicas Esperadas en la Descendencia según el Análisis Fenológico y la Constitución Genotípica de los Árboles Semilleros para el Locus ADH-A

Siguiendo con la aplicación del método expuesto se calculó la evolución de las frecuencias alélicas del locus ADH-A en la nube de polen en el rodal durante todo el período de floración (Figura N° 3).

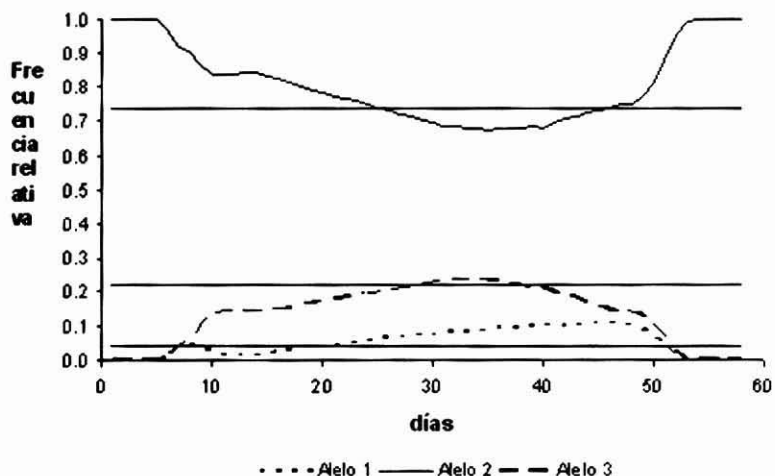


Figura N° 3

EVOLUCIÓN DIARIA DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS PARA EL LOCUS ADH-A EN LA NUBE DE POLEN, SURGIDA DEL ANÁLISIS DE LA CONSTITUCIÓN GENOTÍPICA DE LOS ÁRBOLES SEMILLEROS Y EL DESARROLLO DE LA FLORACIÓN EN EL RODAL DURANTE TODO EL PERÍODO DE FLORACIÓN. EN LÍNEA RECTA PUNTEADA LA NUBE DE POLEN ESTIMADA BAJO EQUILIBRIO HW PARA CADA ALELO.

La importante variación en la composición alélica de la nube de polen a través del período de floración del rodal, demuestra que las diferencias en cuanto a período e intensidad de floración entre los árboles que constituyen el rodal, observada en la Figura N° 2, no se distribuye al azar entre los genotipos. Una distribución al azar respecto de los genotipos de los árboles semilleros, debería tender a una composición uniforme de la nube de polen en el tiempo y equivalente a la estructura alélica del rodal (en el gráfico como líneas rectas punteadas), por lo que puede deducirse una relación entre los genotipos y el modo de floración (período e intensidad).

Obsérvese que además de la variación, las frecuencias alélicas en la nube de polen calculadas bajo el supuesto de apareamientos totalmente al azar se apartan de la media esperada según el cálculo que involucra el comportamiento fenológico del rodal. Esto es especialmente notorio para el alelo 3 donde este valor está muy por encima de la media esperada según el modelo. Esto es consecuencia de que el volumen medio de flores producido por los individuos portadores del alelo 3 es inferior al resto. A la inversa ocurre con los portadores del alelo 2 y en menor medida del alelo 1. La media del índice de floración f para *P. chilensis* (con preponderancia del alelo 3) es de 580, mientras que para *P. flexuosa* (principales portadores de los alelos 2 y 1) es de 1695 en este rodal. Por otro parte el grupo híbrido (con frecuencias intermedias para los alelos 2 y 3) resultó el de mayor producción de flores $f = 3302$. Estas diferencias notables, junto a las diferencias en los tiempos de floración, asociadas a los tipos genéticos estudiados, determinan una estimación distinta según el

modelo respecto del que puede hallarse considerando que todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse.

A partir de la estructura genética diaria de la nube de polen calculada y de los aportes relativos diarios de flores receptoras de cada árbol, siguiendo los procedimientos del modelo, se calculó la estructura genotípica de la descendencia del rodal. En el cálculo se consideraron coeficientes de autofecundación determinados por Mottura para cada uno de los tres grupos que conforman este rodal (comunicación personal). En el Cuadro N° 3 se presenta este resultado junto a las estructuras genotípicas para el locus ADH-A de los árboles semilleros y la calculada según el equilibrio HW correspondiente. Debido a que aún no se cuenta con el procesamiento de la información sobre la fructificación del rodal, los cálculos de frecuencias genotípicas según el modelo no incluyen este factor, sino que se realizó considerando la producción diferencial de flores (ecuación 3).

Como se puede observar en el Cuadro N° 3 las estimaciones por el modelo y bajo equilibrio HW difieren principalmente para los genotipos 22 y 23, lo que implica que el comportamiento de la floración en el rodal tiene un efecto significativo sobre la composición genética de la descendencia para aquellos alelos que están ligados a numerosas características que diferencian especies puras de híbridos. Si se calcula el coeficiente de endogamia comparando la descendencia esperada por el modelo contra la esperada por apareamientos totalmente al azar se encuentra $F = 0.23$, indicando que el comportamiento de la floración en el rodal actuaría aumentando la probabilidad de apareamientos entre genotipos iguales. Considerando que estos genotipos están asociados a los grupos taxonómicos en estudio, esto indica un principio de aislamiento entre ellos debido a su comportamiento diferencial en la fenología floral.

Cuadro N° 3
FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DEL LOCUS ADH-A OBSERVADAS EN LOS ÁRBOLES SEMILLEROS Y ESTIMADAS PARA LA DESCENDENCIA DEL RODAL, TOMADO EN CONJUNTO, CALCULADAS SEGÚN EL MODELO Y SEGÚN LOS SUPUESTOS BAJO EQUILIBRIO HW. EN LA ÚLTIMA COLUMNA SE INDICA EL VALOR F DE ENDOGAMIA CORRESPONDIENTE A LA ESTRUCTURA GENOTÍPICA SEGÚN EL MODELO COMPARADA CON LA ESPERADA SEGÚN EQUILIBRIO HW.

	Genotipos						F
	11	12	13	22	23	33	
Árboles semilleros	0.00	0.03	0.04	0.61	0.19	0.12	
Esperado según modelo	0.01	0.05	0.02	0.64	0.23	0.05	0.23
Esperado en equilibrio HW	0.00	0.06	0.02	0.55	0.32	0.05	

El contraste posterior, contra frecuencias observadas tanto a nivel de rodal como a nivel individual, podrán dejar de lado el factor floración para individualizar otros posibles mecanismos de aislamiento que estén operando en el rodal entre los grupos que lo integran.

CONCLUSIONES

Cuando se trata de analizar el sistema de apareamiento para conocer el comportamiento de grupos genéticos que interactúan en un enjambre híbrido es necesario analizar la evolución de marcadores asociados a los grupos en cuestión. Debido a esta asociación es de esperar que el comportamiento de los portadores de estos marcadores sea distinto respecto de la fenología floral. El modelo propuesto, que considera este factor, ayuda a un análisis más detallado de los otros mecanismos involucrados en el sistema de apareamiento, en comparación con los modelos utilizados tradicionalmente, que presentan entre sus supuestos apareamientos al azar para cada individuo del colectivo.

En el ejemplo expuesto se pudo comprobar que la fenología floral tiene realmente un efecto importante que modifica las frecuencias genotípicas esperadas, y además en un sentido que afirma la hipótesis, de que en estos enjambres híbridos existen incipientes mecanismos de aislamiento entre los grupos genéticos que lo componen.

REFERENCIAS

- Anderson, E. 1948.** Hybridization of the habitat. *Evolution* 2: 1-9.
- Benedixen, K. 2001.** Zum Reproduktionssystem des Feldahorns (*Acer campestre* L.) – Blühphänologie und genetische Untersuchungen -. Dissertation. Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung der Universität Göttingen. 152pp
- Genise, J.; Palacios, R.; Hoc, P.; Carrizo, R.; Moffat, L.; Mom, M.; Agullo, M.; Picca, P y Torregrosa, S. 1990.** Observaciones sobre la biología floral de *Prosopis* (*Leguminosae*, *Mimosoideae*). II. Fases florales y visitantes en el distrito Chaqueño Serrano. *Darwiniana* 30 :71-85.
- Fromm, M. 2001.** Reproduktion enier entomophilen Baumart in geringer Populationsdichte – Das Beispiel de Winterlinde (*Tilia cordata* Mill.) -. Dissertation. Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung der Universität Göttingen. 236pp.
- Gillet, E. M. 1997.** Estimators for the genetic contributions to single –plant progenies. *Biometrics* 53, 214-233.
- Grant V. 1971.** *Plant Spetiation*. Columbia University Press, New York and London. 303 p.
- Marshall, T.; Slate, J.; Kruuk, L. and Pemberton, J. 1998.** Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7:639-655.
- Morillo, J.; Protomastro, J.; Sancholuz, L y Blanco, C. 1985.** Estudio macroecológico de los Llanos de La Rioja. Serie del cincuentenario de la Administración de Parque nacionales 5:1-53.
- Palacios, A. y Bravo, L. 1981.** Hibridación natural en *Prosopis* (*Leguminosae*) en la región chaqueña argentina. Evidencias morfológicas y cromatográficas. *Darwiniana* 23:3-35.
- Ritland, K. 2002.** Extensions of models for the estimation of mating systems using *n* independent loci. *Heredity* 88:221-228.
- Saidman, B. 1990.** Isoenzyme studies on hybrid swarms of *Prosopis caldenia* and sympatric species. *Genetics*. 39:5-8.
- Saidman, B and Vilardi, J. 1987.** Analysis of the genetic similarities among seven species of *Prosopis*. *Theor. Appl. Genet.* 75:109-1116.

Verga, A. 1995. Estudios genéticos en *Prosopis chilensis* y *Prosopis flexuosa* (Mimosaceae) en el Chaco árido argentino. Göttingen Research Notes in Forest Genetics. Göttinger Forstgenetische Berichte 19. 79 Pp.

Verga, A. 2000. Clave numérica para la identificación de híbridos entre *Prosopis chilensis* y *P. flexuosa* en el Chaco árido. Reunión Nacional del Algarrobo. Mendoza, 14 al 17 de noviembre de 2000

Vilela, A. y Palacios, R. 1998. Nueva clave para la identificación de especies sudamericanas del género *Prosopis* (Mimosaceae). Araldoa 5: 57-66.

