



AGROBACTERIUM RHIZOGENES VS INDUCCIÓN AUXÍNICA PARA LA RIZOGÉNESIS *IN VITRO* DE *PROSOPIS CHILENSIS* (MOL.) STUNTZ

AGROBACTERIUM RHIZOGENES VS AUXINIC INDUCTION FOR THE RIZOGENESIS *IN VITRO* OF *PROSOPIS CHILENSIS* (MOL.) STUNTZ

LUIS CARO*, P. MARINANGELI*, N.R. CURVETTO*,** Y L. HERNÁNDEZ*,***

*Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca (8000)

CONICET, Bs. Aires (1033) y *CICBA, La Plata (1900), Argentina. (lcaro@criba.edu.ar)

RESUMEN

Se evaluó la efectividad de *Agrobacterium rhizogenes* (Ar), cepa LBA 9402, para inducir y eventualmente mejorar la formación *in vitro* de raíces de *Prosopis chilensis*, en presencia o ausencia de ácido indol-3-butírico (AIB).

Los explantos consistieron en segmentos uninodales provenientes de plántulas de un mes de edad criadas *in vitro* a partir de semillas, los cuales se cultivaron en tubos de ensayo que contenían perlita saturada con medio basal líquido Broadleaved Tree Medium (MB), con sus sales mayores reducidas a la mitad de su concentración original a pH 5,8, con un fotoperíodo de 16/8 (luz/oscuridad) y a 25 ± 2°C.

Los segmentos fueron distribuidos en seis tratamientos: 1) MB (control); 2) Inmersión en AIB 1' (3 ppm); 3) MB + AIB (3 ppm); 4) Inoculación con Ar 1'; 5) Inmersión en AIB 1'(3 ppm) + inoculación con Ar 1', y 6) Inoculación con Ar 1' + MB + AIB (3 ppm).

A los 10 días de cultivo, los explantos fueron transferidos a medio basal fresco

solidificado con agar y libre de auxinas. Los segmentos inoculados con Ar fueron subcultivados en un MB que contenían cefotaxina (500 ppm). A los 30 días de subcultivo se determinó el porcentaje de enraizamiento, el número de raíces por explanto, el largo de las raíces y el peso seco de raíces.

El porcentaje de enraizamiento y el número de raíces primarias por explanto, fue superior en los microvástagos inoculados, llegando al 100% cuando además se sometieron a la acción del AIB (3 ppm) por inmersión. La inoculación de los segmentos produjo un número de raíces por explanto significativamente mayor y con un peso seco significativamente también mayor en comparación a los segmentos no inoculados.

Los tratamientos con *A. rhizogenes* resultaron en una mejor respuesta de enraizamiento, pero el tratamiento con AIB en el medio de cultivo sin inoculación produjo un buen porcentaje de enraizamiento, con más de dos raíces por explanto y con buena biomasa de raíces.

Palabras clave: ácido indol-3-butírico, *Agrobacterium rhizogenes*, enraizamiento, *Prosopis chilensis*

SUMMARY

This work assesses the effectiveness of *Agrobacterium rhizogenes* (Ar), LBA 9402 strain, to induce and to eventually improve the formation of *in vitro* roots of *Prosopis chilensis*, with the presence or absence of indol-3-butirico acid (AIB). The explants consisted of uninodal segments proceeding from seedlings one month old raised *in vitro* from the seeds. They were cultivated in tubes containing saturated perlite, with liquid basal environment Broadleaved Tree Medium (MB), with the major salts reduced to half of the original concentration at 5.7 pH, with a 16/8 photo-period (light/darkness) and at $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

The segments were distributed in six treatments: 1) MB (control); 2) 1' immersion in AIB (3 ppm); 3) MB + AIB (3 ppm); 4) inoculation with Ar 1'; 5) immersion in AIB 1' (3 ppm) + inoculation with Ar 1', and 6) inoculation with Ar 1' + MB + AIB (3 ppm). After ten days of culture the explants were transferred to a fresh basal environment solidified with agar and free of auxines. Those segments inoculated with Ar were sub-cultured in an MB containing cefotaxine (500 ppm). After 30 days of subculture the rooting percentage, number of roots by explant, length and dry weight of roots were determined. The rooting percentage and the number of primary roots per explant was higher in the inoculated micro-shoots, reaching 100% when the remaining underwent the AIB (3 ppm) action through immersion. The

inoculation of the segments produced a number of roots per explant significantly higher and with a dry weight also significantly higher compared with those non-inoculated segments.

The treatments with *A. rhizogenes* resulted in a better rooting response, but the AIB treatment in the culture environment without inoculation produced a good rooting percentage, with more than two roots per explant and a good root biomass.

Key words: *Agrobacterium rhizogenes*, indole-3-butiric acid, *Prosopis chilensis*, rooting

INTRODUCCIÓN

La propagación sexual es la vía más común de obtener nuevos ejemplares del Algarrobo de Chile (*Prosopis chilensis* Mol. Stuntz) en viveros, pero lamentablemente muchas características forestales selectas se pierden de este modo.

Se presenta entonces la alternativa de su micropropagación como técnica capaz de conservar las características deseables de individuos "elite". La micropropagación de plantas elite de *P. chilensis* (Caro *et al.*, 2002) posibilitaría entonces una propagación vegetativa con rápida ganancia de caracteres génicos deseables en programas de mejoramiento forestal.

En la micropropagación *in vitro* de especies forestales, se ha observado un desarrollo radical deficiente de los explantos incidiendo negativamente en la implantación de las microplantas a campo (Martínez Pastur *et al.*, 2000).

La infección en la base de microestacas cultivadas *in vitro* con *Agrobacterium rhizogenes* (Ar), una bacteria Gram (-) común en el suelo y con capacidad de infectar a vegetales a través de heridas, induciendo abundantes raíces adventicias (“hairy roots”) en el sitio de la infección (Tepfer, 1984; Petit *et al.*, 1986; Narasu & Giri, 2000), puede mejorar el enraizamiento de especies leñosas recalcitrantes para el enraizado *in vitro* (Damiano & Monticelli, 1998; Perez-Molphe & Ochoa-Alejo, 1998; Hoshino & Mii, 1998; Gutierrez-Pesce *et al.*, 1998). Utilizando diferentes cepas de esta bacteria, varios autores han logrado enraizamientos exitosos en especies de *Pinus*, *Larix*, *Eucalyptus* (McAfee *et al.*, 1993; MacRae & Van Staden, 1993).

Las raíces transformadas son además capaces de regenerar plantas transgénicas enteras o clones, viables y genéticamente estables (Narasu & Giri, 2000). Especies recalcitrantes para su transformación pueden llegar a ser transformadas por inducción génica de la bacteria a través de cocultivo *in vitro* de Ar y tejidos vegetales cortados (Stachel *et al.*, 1985), aunque la capacidad para transformación varía de acuerdo a las distintas cepas de Ar (Kumar *et al.*, 1991; Giri *et al.*, 1997).

El medio de cultivo induce significativamente sobre la formación de “hairy roots” (Narasu & Giri, 2000). Medios con alta concentración salina como ser MS (Murashige & Skoog, 1962) favorecen la formación de hairy roots en algunas plantas mientras que, medios de baja concentración osmótica tal como BTM (Chalupa, 1983), incrementan la multiplicación bacterial en el medio siendo necesario

transferir los explantos varias veces a un medio fresco conteniendo antibiótico (Narasu & Giri, 2000).

El propósito del presente trabajo fue comparar la efectividad de la cepa LBA 9402 de Ar con la correspondiente del ácido indol butírico para inducir y eventualmente mejorar *in vitro* la formación de raíces en vástagos de *P. chilensis*.

MATERIAL Y MÉTODO

Material vegetal

Segmentos uninodales de 1-2 cm de longitud, provenientes de plántulas de un mes de edad crecidas *in vitro* a partir de semillas, fueron cultivados *in vitro* durante 30 días, en un medio Broadleaved Tree Medium (Chalupa, 1983) con los macronutrientes reducidos a la mitad de su concentración original (BTMm) (Caro *et al.*, 2002). Al cabo de ese período, vástagos conteniendo hojas verdaderas fueron seleccionados, para ser usados en la experiencia de enraizamiento *in vitro* con Ar y AIB.

Cultivo de las bacterias

Se cultivó la cepa LBA 9402 de Ar a partir de colonia aislada en medio líquido YEB con 50 ppm de rifampicina a 27 °C durante 12-14 horas hasta obtener una lectura de densidad óptica a 600 nm en el rango de 0,6 y 0,8. La concentración bacterial juega un rol importante en la producción de raíces transformadas, concentraciones sub-óptimas podrían resultar en una más baja habilidad de la bacteria para la transformación, y por otra parte, concentraciones elevadas podrían hacer decrecer la capacidad de transfor-

mación por inhibición competitiva (Kumar et al., 1991).

Cultivo *in vitro*

Los microvástagos fueron cortados en la base con un escalpelo y distribuidos en seis tratamientos sin desinfección debido a que provenían de un cultivo aséptico de semillas *in vitro*. Los tratamientos (T) aplicados fueron:

- T2: IBA 3 ppm x 1' MB
..... subcultivo MB
- T3: MB + AIB 3 ppm
..... subcultivo MB
- T4: Ar x 1' MB
..... subcultivo MB + cefotaxina
- T5: AIB 3 ppm x 1' + Ar x 1' — MB
..... subcultivo MB + cefotaxina.
- T6: Ar x 1' MB + AIB 3 ppm
..... subcultivo MB + cefotaxina.

En todos los tratamientos los microvástagos fueron cultivados en tubos de ensayo que contenían perlita saturada con medio basal BTMm, esterilizado a 0,1 MPa durante 20 min, previo ajuste del pH a 5,8 con KOH 0,5N. La solución de auxina fue esterilizada con filtros Millipore, de 0,2m. El cultivo se hizo a 25 ± 2 °C con un fotoperíodo de 16 h de luz fluorescente blanca ($PAR = 70 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

En T2 y T5 los explantos fueron sometidos a una inmersión durante 1 min en AIB (3 ppm) previo al cultivo en BTMm. En T3 y T6 se añadió 3 ppm de AIB al medio basal BTMm. En los tres últimos tratamientos (T4, T5 y T6) los microvástagos fueron inoculados con Ar durante 1 min previo al cultivo en medio basal BTMm.

A los 10 días de cultivo, los MVs fueron subcultivados a medio BTMm solidificado con agar (0,7% p/v) libre de auxinas. Los MVs inoculados con Ar fueron subcultivados en medio basal BTMm que contenían cefotaxina (500 ppm).

A los 30 días de subcultivo se registró el porcentaje de enraizamiento, el número de raíces primarias y peso seco de raíces en los MVs enraizados, y la longitud de los brotes.

Diseño y análisis estadístico

Se siguió un diseño estadístico completamente aleatorizado, con dos repeticiones de 25 microvástagos cada una, según el tratamiento. Sobre los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza de doble entrada y los valores medios de los tratamientos se separaron usando el ensayo de Tukey-Kramer.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de enraizamiento fue significativamente superior en los tratamientos con Ar en comparación a los que no fueron inoculados ($p = 0,03$), llegando al 100% en el tratamiento con Ar e inmersión por un minuto en IBA (Tabla 1). Esto último fue similar a la inducción radicular en *Simmondsia chinensis* informada por Benavides y Radice (1998).

En cuanto al número de raíces primarias, se observó un efecto estimulante tanto en los microvástagos inoculados con Ar como en los tratados con AIB. Si bien, el AIB en el medio de cultivo (T3) produjo un número promedio de raíces por explanto superior al control, con Ar el número de raíces fue aún mayor (Tabla 1).

Al comparar en promedio los tratamientos no inoculados con los inoculados, resultó ser significativamente superior el conjunto de los tratamientos con Ar en el número promedio de raíces y en el peso seco de las mismas ($p < 0,01$). El número de raíces primarias por explanto se incrementó por encima de tres al suministrar IBA en combinación con Ar, en ambas modalidades de uso de la auxina (Tabla 1).

No se encontraron diferencias en el largo de raíces entre los diferentes tratamientos ($p > 0,63$) (Tabla 1).

Los microvástagos enraizados mostraron una mayor elongación promedio al ser comparados con vástagos que no presentaban raíces ($p < 0,001$), 22,78 mm y 9,36 mm, respectivamente. No se observó presencia de raíces en explantos no brotados.

Es importante destacar que si bien los tratamientos con Ar tuvieron una mejor calidad de enraizamiento, el tratamiento con IBA en el medio de cultivo sin Ar (T3) produjo un buen porcentaje de microvástagos con raíz (86%), con más

de dos raíces por microvástago y con buena biomasa (2,6 mg de peso seco promedio). Lo anterior recomendaría la elección de este camino si lo que se pretende es la micropropagación. Sin embargo, la rizogénesis mediada por Ar en *P. chilensis* sería presumiblemente ventajosa si las diferencias en su favor en volumen y peso radical resultasen a campo en una mayor supervivencia y crecimiento.

La elección de una u otra vía rizogénica, en última instancia, dependerá del comportamiento de las microplantas a campo, como por ejemplo una mayor supervivencia y crecimiento.

Una de las grandes ventajas que se aprecian a través de la generación de raíces por Ar es la ausencia de la fase de formación de callos que provoca variación somaclonal. Por otra parte, la presencia de “hairy roots” en *P. chilensis* posibilitaría además la obtención de individuos con mejor performance de implantación y un camino posible para el mejoramiento de la especie a través de la ingeniería genética. Es bien sabido que los programas clásicos de mejoramiento genético forestal, son lentos y tediosos,

Tabla 1: Enraizamiento y principales parámetros morfológicos evaluados en los explantos de *P. Chilensis* en los diferentes tratamientos. Las letras iguales no muestran diferencias significativas ($P=0,05$)
 Table 1: Rooting and main morphological parameters evaluated in the explants of *P. chilensis* after the treatments. Same letters do not show significant differences ($P= 0,05$)

Tratamientos	Enraiz. (%)	N° raíces por explanto	Largo de raíces (mm)	Peso seco raíces (mg)	Largo de los brotes (mm)
T1 (control)	42,95 a	0,76 a	60,00 a	3,247 a	17,19 a
T2 (IBA 1')	57,22 a	1,02 a	44,44 a	1,754 a	16,92 a
T3 (MB + IBA)	86,00 a	2,20 b	46,45 a	2,593 a	22,08 a
T4 (Ar)	84,00 a	2,74 b	43,08 a	3,571 a	18,42 a
T5 (Ar + IBA 1')	100,00 a	3,06 b	44,31 a	4,277 a	21,98 a
T6 (Ar + MB + IBA)	95,42 a	3,07 b	43,73 a	4,119 a	22,16 a

resultando sumamente difícil introducir genes específicos a través de ciclos de cruzamiento de líneas parentales. Ar puede ser una alternativa exitosa como ruta rápida y directa de introducción y expresión de genes específicos (Huang *et al.*, 1991).

BIBLIOGRAFÍA

- BENAVIDES, M.A. & S. RADICE, 1998. Root induction in *Simmondsia chinensis* (Link) Schbeid. using *Agrobacterium rhizogenes*. *Biocell* 22: 109-114.
- CARO, L.A., P. POLCI, V. ECHENIQUE & HERNÁNDEZ L.F., 2002. Micropropagation of *Proospis chilensis* (Mol.) Stuntz from young and mature plants. *Biocell*, 26: 25-33.
- CHALUPA, V., 1983. Micropropagation of conifer and broadleaved forest trees. *Communicationes Instituti Forestalis Cechosloveniae* 13: 7-39.
- DAMIANO, C. & S. MONTICELLI, 1998. *In vitro* fruit trees rooting by *Agrobacterium rhizogenes* wild type infection. *Electronic Journal of Biotechnology*, <http://www.ejb.org>, Vol.1 No.2, August 15, 1998.
- GIRI, A., S. BANERJEE, P.S. AHUJA & C.C. GIRI, 1997. Production of hairy roots in *Aconitum heterophyllum* wall using *Agrobacterium rhizogenes*. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant*, 33: 280-284.
- GUTIERREZ-PESCE, P., K. TAYLOR, R. MULEO & E. RUGINI, 1998. Somatic embryogenesis and shoot regeneration from transgenic roots of cherry rootstock Colt (*Prunus avium x P. pseudocerasus*) *Plant cell reports*, 17: 581-585.
- HOSHINO, Y. & M. MII, 1998. Bialaphos stimulates shoot regeneration from hairy roots of snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports*, 17: 256-261.
- HUANG, Y., A. DINER & F. KARNOSKY, 1991. *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation of a conifer: *Larix decidua*. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant*, 27:201-207.
- KUMAR, V., B. JONES & M.R. DAVEY, 1991. Transformation by *Agrobacterium rhizogenes* and regeneration of transgenic shoots of the wild soybean *Glycineargyrea*. *Plant Cell Reports*, 10:135-138
- MACRAE, S. & J. VAN STADEN, 1993. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation to improve rooting ability of eucalyptus. *Tree Physiology* 12: 411-418.
- MARTÍNEZ PASTUR, G., M. ARENA & N. CURVETTO, 2000. Calcium and Boron for *in vitro* rooting of *Nothofagus nervosa*. *Biocell*, 24(1):65-71.
- MCAFEE, B.J., E.E. WHITE, L.E. PELCHER & M.S. LAPP, 1993. Root induction in pine (*Pinus*) and Larch (*Larix spp.*) using *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34: 53-62.
- MURASHIGE, T. & F. SKOOG, 1962. *Physiology Plant*, 15:473-497.
- NARASU, M.L. & A. GIRI, 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances* 18:1-22.
- PEREZ-MOLPHE, E. & N. OCHOA-ALEJO, 1998. Regeneration of transgenic plants of Mexican lime from *Agrobacterium rhizogenes* transformed tissues. *Plant Cell Reports*, 17:591-596.

- PETIT, A., J. BERKALOFF & J. TEMPÉ, 1986. Multiple transformation of plants cell by *Agrobacterium* may be responsible for the complex organization of hairy root T-DNA. Mol. Gen. Genetic 202:388-393.
- STACHEL, S.E., E. MESSENS, M. VAN MONTAGU & P. ZAMBRYSKI, 1985. Nature, 318: 624-629.
- TEPFER, D., 1984. Transformation of several spp. of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: Sexual transmittion of the transformed genotype and phenotype. Cell 37: 959-967.

Recibido: 08/2000

Aceptado: 10/2000



COMPONENTES DE LA VARIACIÓN ADAPTATIVA EN *PROSOPIS CHILENSIS*: EL ÍNDICE DE BROTAÇÃO

COMPONENTS OF ADAPTIVE VARIATION IN *PROSOPIS CHILENSIS*: THE BUD
BREAK INDEX

CARLOS CARRANZA*, G. VERZINO**, J. DI RIENZO***, M. LEDESMA*
Y J. JOSEAU**

* Estación Forestal INTA Villa Dolores, C.C 1, (5870) Villa Dolores, Pcia. de Córdoba

** Silvicultura, Facultad de Cs. Agropecuarias, U.N.C., C.C 509, (5000) Córdoba.

*** Estadística y Biometría, Facultad de Cs. Agropecuarias, U.N.C., C.C. 509, (5000) Córdoba.

RESUMEN

Se realizó un ensayo de genecología de *Prosopis chilensis* en la Estación Forestal INTA Villa Dolores (Córdoba) que incluía 17 poblaciones (procedencias) de Argentina y 6 de Chile.

El trabajo tenía los siguientes objetivos: 1. Verificar la presencia de un patrón de variación adaptativa de *P. chilensis* a las características geográficas (latitud, longitud), topográficas (altitud) y climáticas (precipitaciones) que se insinuara en una etapa anterior del proyecto y 2. Fijar pautas básicas para la transferencia de semillas de una zona a otra.

A fines del invierno del cuarto año de la plantación se efectuaron observaciones semanales para detectar el momento de inicio de brotación. Se comprobó la presencia de un patrón de diferenciación genética en función de la latitud, la longitud y la altitud de las procedencias. Así, existe una relación directa entre la velocidad de brotación (Índice de Brotación - IB) y la longitud, e inversa entre la velo-

cidad de brotación y la latitud y altitud de las procedencias. El efecto de latitud y altitud podría estar relacionado con una estrategia adaptativa para evitar el daño de heladas tardías. En consecuencia, para la transferencia de semillas entre diferentes zonas debiera considerarse la fecha probable de última helada.

Palabras clave: genecología, transferencia de semillas, procedencias, variabilidad

SUMMARY

A genecology study of Prosopis chilensis was performed in the Estación Forestal INTA Villa Dolores (Prov. de Córdoba), which included 17 populations (provenances) from Argentina and 6 populations from Chile.

The project objectives were the following: 1. To verify the presence of adaptive variation in Prosopis chilensis related to the geographic (latitude, longitude), to-

pographic (altitude) and climatic (precipitation) conditions of the seed source, detected in a previous stage of the project and 2. To provide guidelines for sound seed transfer.

In order to determine the beginning of shoot elongation, weekly measurements were done by the end of the winter of the plantation's fourth year. Genetic differentiation among provenances related to the latitude, longitude and elevation of the seed source was found. There was a direct relationship between the beginning of shoot elongation (Bud break Index - BI) and longitude as well as an inverse relationship between the beginning of shoot elongation and the latitude and altitude of the provenances. The latitude and altitude effect could be related to an adaptive strategy of the species to avoid late freezing damage. Therefore, in order to transfer seeds from one area to another, occurrence of late freezing events should be taken into consideration.

Key words: *genecology, seed transfer, provenance, variability*

INTRODUCCIÓN

El Banco Nacional de Germoplasma de *Prosopis* (BNGP), con sede en la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, provee semillas de distintas especies del género a demandantes de todo el mundo. *Prosopis chilensis* (Mol) Stuntz es una de las más importantes especies forestales en una amplia región que se extiende hacia el oeste de la República Argentina, en Chile, Perú y Bolivia. Es apreciado por la

calidad de su madera y de sus frutos y por la capacidad de adaptación a distintas condiciones de suelo y clima (Serra, 1997; Erize, 1997a, 1997b).

A pesar de la importancia potencial de *P. chilensis* para su cultivo en las regiones áridas y semiáridas del mundo con fines de producción y protección, es escasa la información disponible sobre pautas para la transferencia de semillas, en términos de adaptación (Verzino *et al.*, 1995, 1997, 1998). En este sentido, tampoco se dispone de información sobre las otras especies que componen el género en todo el mundo.

El éxito en la transferencia de semillas de una especie forestal de un lugar a otro depende fundamentalmente de la estrategia de adaptación de la misma al ambiente (Rehfeldt 1979a, 1991, 1994a, 1994b, 1995). Las especies se adaptan a variaciones espaciales o temporales utilizando distintas estrategias (Lerner, 1954; Levins, 1966). La especialización es una forma de adaptación en la que la selección natural altera la frecuencia génica en un ambiente dado para producir una población diferente. La selección actúa directamente sobre el genotipo, que a su vez se manifiesta fenotípicamente. La homeostasis, plasticidad fenotípica o flexibilidad genética, es otro mecanismo utilizado por algunas especies para adaptarse a un amplio rango de ambientes. Se produce a través de alelos con gran tolerancia ambiental y altos niveles de heterocigosis. Como resultado, un solo genotipo puede producir varios fenotipos, de acuerdo al ambiente en que se desarrolle, de esa forma la variabilidad genética es alta y se conserva. Rehfeldt (1984) define a estas especies como generalistas. La especiali-

zación y la homeostasis son procesos en cierta medida antagónicos. Generalmente, las especies no son totalmente especializadas o totalmente plásticas, por ejemplo, las especialistas requieren cierto grado de variabilidad genética para afrontar variaciones ambientales.

A los efectos de la recolección y transferencia de material germoplásmico de *P. chilensis*, el BNGP necesita conocer su estrategia de adaptación al ambiente.

En estudios exomorfológicos e isoenzimáticos en poblaciones de *P. chilensis* y *P. flexuosa* (Verga, 1995), *P. chilensis* mostró una diversidad genética relativamente estrecha al compararlo con *P. flexuosa*. Este autor adelantó que si se tienen en cuenta algunas características exomorfológicas, como los frutos, *P. chilensis* correspondería a una especie especializada. Julio *et al.*, (1999) no encontró correlación entre las características geográficas y climáticas de las procedencias y seis sistemas isoenzimáticos. Los autores concluyeron que la adaptación en los algarrobos se producía, probablemente, por plasticidad fenotípica y no por alteración de las frecuencias génicas.

A pesar de su probada utilidad en estudios de genética de poblaciones (Hamrick & Godt, 1989; Julio *et al.*, 1999) las isoenzimas no resultan apropiadas para estudiar la variación adaptativa de las especies. Los estudios genecológicos, en cambio, han mostrado ser adecuados para investigar la variabilidad genética de las especies en función de la variabilidad ambiental (Joyce, 2001).

Mediante estos estudios, *Pseudotsuga menziesii* var *glauca* y *Pinus contorta*

fueron descritos como especialistas (Rehfeldt, 1979a, 1983a, 1989), *Pinus monticola* y *Larix occidentalis* como generalistas (Rehfeldt 1982, 1979b, 1984), mientras que *Pinus ponderosa* fue descrito como intermedio (Rehfeldt, 1990, 1991).

El crecimiento potencial, la tolerancia a heladas y el ritmo de crecimiento son las variables compuestas más frecuentemente utilizadas para medir la variación adaptativa de las especies (Rehfeldt, 1984; Dietrichson, 1964).

Verzino *et al.*, (1995) describieron, en una etapa anterior del presente proyecto, utilizando una componente del crecimiento potencial (el crecimiento en altura), un efecto significativo ($p \leq 0,01$) de la longitud y la altitud del lugar de cosecha sobre el crecimiento en altura de las plantas a los 197 días de la siembra ($R^2=0,36$). A los 505 días se observó que la longitud, altitud, latitud y precipitaciones del lugar de origen afectaban la tolerancia a heladas y la velocidad de crecimiento inicial de las plantas (Verzino *et al.*, 1998). Los resultados del estudio sugerían la presencia de un patrón de diferenciación adaptativa a cambios macroambientales. Era oportuno, entonces, corroborar dichos resultados con nuevos estudios que tuvieran en cuenta el ritmo de crecimiento de las plantas. Para el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos: 1. Verificar la presencia de un patrón de variación adaptativa de *P. chilensis* relacionado con las características geográficas (latitud, longitud), topográficas (altitud) y climáticas (precipitaciones) de las procedencias, que se insinuara en una etapa anterior del presente proyecto y 2.

Fijar pautas básicas para la transferencia de semillas de una zona a otra.

MATERIAL Y MÉTODO

Se seleccionaron 17 poblaciones (procedencias) de Argentina, cosechadas en Córdoba, La Rioja y Catamarca, en un

rango de 27°30' a 32°S y elevaciones que varían entre 430 m s.m. y 1450 m s.m. y 6 poblaciones de Chile, entre los 30°39' y 31°09'S y entre 475m s.m. y 900 m s.m. (Figura 1).

La Tabla 1 muestra las procedencias utilizadas, consignando el número de árbo-

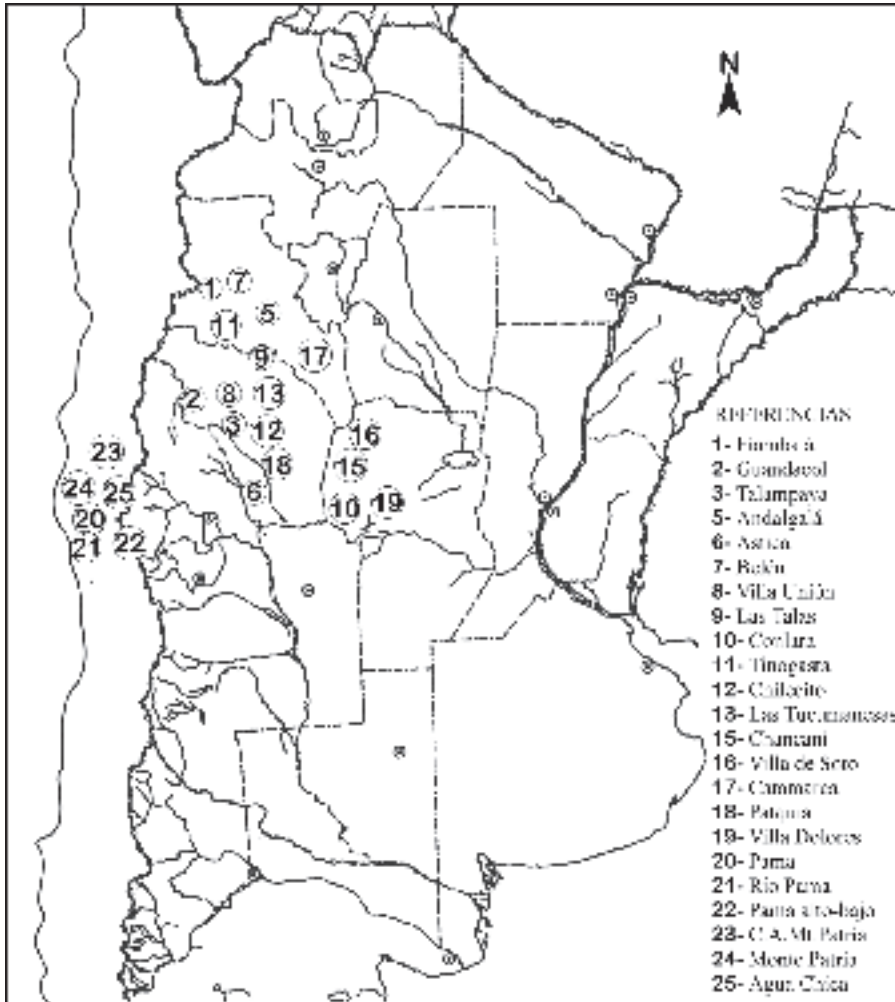


Figura 1. Ubicación de las procedencias incluidas en el ensayo
Figure 1. Location of the provenances included in the trial.

les que componen cada procedencia (mínimo de 7 árboles elegidos al azar, distanciados por lo menos 100 m entre ellos) y las características geográficas, fisiográficas y climáticas de las procedencias.

Los parámetros para determinar los límites de las procedencias, el procedimiento de obtención de semillas y plantines así como la etapa de plantación hasta los 505 días fueron descritos por Verzino *et al.*, (1995,1998).

El ensayo fue conducido en la Estación Forestal del INTA Villa Dolores (Córdoba), a 31°57'S y, 65°08'O y 529 m s.m. Se utilizó un diseño de parcelas com-

pletamente aleatorizadas con 23 tratamientos (procedencias) y seis repeticiones de 6 plantas por parcela experimental.

A fines del invierno del cuarto año de la plantación (agosto) se realizaron observaciones semanales sobre todos los individuos del ensayo para detectar el momento de inicio de brotación. Además, se marcó el primer brote de tres plantas por repetición y se realizaron dos mediciones con diferencia de trece días sobre estos brotes. Las variables registradas fueron:

- brotación a los 1367, 1373 y 1385 días de la siembra (3 años y 9 meses aprox.)

Tabla 1. Procedencias, número de árboles y características geográficas, fisiográficas y climáticas de las zonas de cosecha

Table 1. Zones, sampled trees per population, geographic, physiographic and climatic conditions of the zones

Proc	Zona	Nº de Árboles	Latitud Sur	Longitud Oeste	Altitud [m s.m.]	Precip [mm]
1	Fiambalá	7	27°41'	67°37'	1350	96
2	Guandacol	13	29°30'	68°30'	1350	96
3	Talampaya	10	29°45'	67°59'	1450	100
5	Andalgala	11	27°40'	66°47'	1120	308
6	Astica	9	30°55'	67°23'	700	250
7	Belén	10	27°32'	67°06'	1370	411
8	Villa Unión	9	29°18'	68°14'	1350	85
9	Los Talas	10	28°26'	67°07'	1000	83
10	Conlara	9	31°57'	65°15'	520	631
11	Tinogasta	9	28°03'	67°35'	1300	163
12	Chilecito	10	29°20'	67°30'	1000	150
13	Las Tucumanesas	10	29°20'	68°06'	1460	71
15	Chancani	10	31°20'	65°26'	460	479
16	Soto	8	30°51'	64°57'	550	500
17	Catamarca	9	28°28'	65°47'	546	360
18	Patquia	9	30°05'	66°58'	431	250
19	VillaDolores	14	31°57'	65°08'	529	557
20	Pama (Chile)	8	31°09'	71°04'	650	161
21	Río Pama(Ch)	26	31°09'	71°04'	900	250
22	Pama Alto-Bajo (Ch)	10	31°09'	71°04'	650	162
23	ca. Mt.Patria (Chile)	25	30°39'	71°58'	450	174
24	Mt. Patria(Ch)	7	30°42'	70°57'	475	150
25	Agua Chica (Chile)	14	30°42'	70°57'	475	150

• longitud del primer brote a los 1400 y 1413 días de la siembra (3 años y 10 meses).

Con el objeto de inferir la velocidad de brotación de las procedencias se elaboró un Índice de Brotación (IB), basado en el índice de velocidad de germinación de Timson (1965), de acuerdo a la siguiente fórmula

$$IB = \sum_i^k \frac{B_i}{P_i}$$

donde: B_i es el porcentaje de brotación en la observación i -ésima, P_i es el número de intervalos transcurridos desde el inicio de las observaciones hasta la observación i -ésima y “ k ” es el número total de observaciones. Se tomó un intervalo de 10 días y se consideró al 15 de agosto como fecha de inicio de las observaciones. El cálculo del porcentaje de brotación se obtuvo promediando para cada procedencia los porcentajes de las 6 parcelas experimentales.

La Tabla 2 resume las fechas de observación de los brotes y los intervalos transcurridos desde el inicio de las observaciones.

Tabla 2. Fechas de observación de los brotes, días transcurridos desde la siembra e intervalos correspondientes

Table 2. Observation dates, days from seeding and intervals from beginning of the trial

Fecha de observación	Días desde la siembra	Intervalos transcurridos desde inicio de las observaciones
15 de agosto (inicio)	1.353	0
30 de agosto	1.367	1,4
5 de setiembre	1.373	2,0
17 de setiembre	1.385	3,1

Análisis estadísticos

A efectos de visualizar la distribución de los datos se implementaron tablas y gráficos de estadística descriptiva. Para analizar la posible asociación entre el IB y la longitud, altitud y latitud de las procedencias se utilizó análisis de regresión lineal múltiple. Con el objeto de conocer si existía diferencia entre las procedencias, en términos de longitud del brote primaveral, se aplicó análisis de la varianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 3 se pueden observar los valores de Índice de Brotación (IB) y errores estándar (SE) calculados para cada procedencia; mientras que la Figura 2 describe la posición de los IB, ordenados por procedencia y en relación a su valor promedio. Es interesante notar que todas las procedencias transandinas tuvieron índices de brotación por encima de la media (procedencias 20 a 25).

Tabla 3. Índice de Brotación y error estándar para 23 procedencias de *Prosopis chilensis*
Table 3. Bud break Index and standard error for 23 provenances of *Prosopis chilensis*

PROC	IB	SE	PROC	IB	SE
1	67.02	8.84	15	41.64	6.37
2	33.01	6.40	16	22.10	5.46
3	35.31	6.52	17	26.13	5.44
5	54.87	7.17	18	63.26	8.09
6	31.73	6.23	19	23.77	5.71
7	46.66	6.81	20	48.50	7.54
8	30.93	5.59	21	52.18	7.62
9	65.11	8.17	22	64.28	8.78
10	23.76	5.18	23	52.15	8.17
11	61.56	7.73	24	73.35	9.58
12	24.10	5.35	25	73.32	9.19
13	29.65	6.05			

Para abreviaturas ver texto

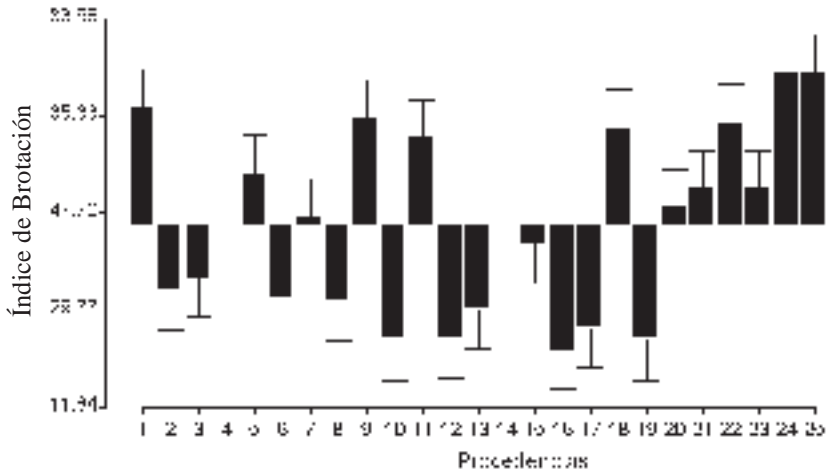


Figura 2. Representación del índice de brotación con referencia al valor medio (45.41)
 Figure 2. Distribution of Bud break Index, by provenance, regarding the mean value (45.41)

La Tabla 4 presenta la estadística descriptiva de las variables *Longitud del brote en fecha I* (1400 días desde la siembra) y *Longitud del brote en fecha II* (1413 días desde la siembra). El análisis de la varianza aplicado a ambas variables no mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las procedencias, lo que puede ser atribuido a una excesiva variabilidad intrapoblacional, cuya ocurrencia ya fue detectada en anteriores estudios sobre esta especie (Verga, 1995; Verzino *et al.*, 1995, 1998).

Si bien los ANOVA de las variables *Longitud del brote en fecha I* y *Longitud del brote en fecha II* no arrojaron diferencias entre las procedencias, el análisis de regresión lineal múltiple permitió detectar una relación altamente significativa ($p \leq 0.010$), aunque de signo contrario, entre la velocidad de brotación, expresada a través del índice de brotación (IB), y las variables geográficas (latitud y longi-

tud), y significativa ($p \leq 0.05$) entre la velocidad de brotación (IB) y la altitud de las procedencias (Tabla 5). Así, las procedencias más occidentales, de localidades ubicadas más al norte y a menor altura, brotarían más tempranamente.

El marcado efecto de la longitud se debería principalmente a la presencia de las procedencias de origen chileno. El efecto de latitud y altitud podría estar relacionado con una estrategia adaptativa para evitar el daño de heladas tardías.

Cabe acotar que existe correlación entre latitud y altitud, derivada de la estructura del muestreo, ya que coincidentemente, en este ensayo, las procedencias de baja latitud provienen, en términos generales, de las zonas con mayor altitud, mientras que las procedencias de alta latitud provienen de las zonas con menor altitud. En consecuencia, es posible que el alto nivel de significación de la

Tabla 4. Valores medios y errores estándar para las dos fechas de medición de crecimiento inicial del brote

Table 4. Mean and standard error for the variables Shoot Length in date I and Shoot Length in date II

PROC	Long.Fecha I	Long.Fecha II
1	12.28 ± 1.76	21.46 ± 1.13
2	9.83 ± 2.31	21.28 ± 2.81
3	9.40 ± 1.89	21.22 ± 2.65
5	14.19 ± 0.79	28.35 ± 1.15
6	7.30 ± 0.89	16.29 ± 2.43
7	15.24 ± 1.75	28.89 ± 1.19
8	10.67 ± 3.88	10.97 ± 4.34
9	9.06 ± 1.40	18.10 ± 0.87
10	11.15 ± 1.03	24.89 ± 1.29
11	16.79 ± 2.92	24.75 ± 1.74
12	11.30 ± 1.32	19.28 ± 2.73
13	8.75 ± 1.65	23.57 ± 1.93
15	9.18 ± 0.55	23.63 ± 1.47
16	7.47 ± 0.61	17.98 ± 1.14
17	7.23 ± 0.85	19.82 ± 1.30
18	15.25 ± 1.53	23.86 ± 1.93
19	7.06 ± 1.14	18.03 ± 2.01
20	9.03 ± 0.72	24.63 ± 2.01
21	13.78 ± 1.57	26.25 ± 1.68
22	15.36 ± 0.85	28.86 ± 0.99
23	11.19 ± 2.22	25.38 ± 2.15
24	13.97 ± 0.75	27.56 ± 1.33
25	12.74 ± 1.97	26.14 ± 1.65

latitud esté enmascarando, en este análisis, el efecto de la latitud, cuya significación no aparece tan marcada. En otras palabras, de haberse considerado ambos factores por separado, el efecto de la latitud se hubiera manifestado de forma

Tabla 5. Análisis de regresión para índice de brotación en función de altitud, longitud y latitud de la procedencia

Table 5. Regression analysis where Bud break Index is the dependent variable and latitude, longitude and altitude of the seed source are the independent variables

Variable	Coefficient	Std Error	Std Coef	T	P(2 Tail)
CONSTANT	-25.8076	115.7434	0.0000	-0.2230	0.8259
LAT	-8.4599	2.7985	-0.6249	-3.0230	0.0070
LONG	5.0639	1.2736	0.6298	3.9769	0.0008
ALT	-0.0235	0.0100	-0.6840	-2.3483	0.0298

más significativa, ya que tanto latitud como altitud ejercen una importante influencia sobre el Índice de Brotación.

Los resultados de este trabajo corroboran anteriores presentaciones de los autores (Verzino *et al.*, 1998) quienes describieron para *P. chilensis* de 505 días una relación directa entre longitud y susceptibilidad a heladas, e inversa entre esta última variable y la latitud y altitud de las procedencias. El nivel de determinación, $R^2=0,539$, es importante ya que el modelo explicaría más del 50% de la variabilidad total. Un nivel de determinación inferior ($R^2=0,39$) fue enunciado por Rehfeldt (1991) quien incluyó altitud, longitud y latitud en modelos predictivos del crecimiento de *Pinus ponderosa* var. *ponderosa*.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo confirman la presencia de un patrón de variación adaptativa de la especie en función de la longitud, la latitud y, en menor medida, la altitud. Esa diferenciación se ve reflejada en su brotación primaveral. En consecuencia, para la transferencia de semillas entre diferentes zonas debiera considerarse la fecha probable de heladas tardías.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Dennis Joyce por su valiosa contribución en el diseño del proyecto, al Prof. Ramón Palacios por la identificación taxonómica de los árboles muestreados y a la Secretaría de Ciencia y Técnica y la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba, al INTA y a CAFPTA por el apoyo económico brindado.

BIBLIOGRAFÍA

- ERIZE, F. (Dir), 1997a. El nuevo libro del árbol. Tomo I. Especies forestales de la Argentina Occidental., 2° ed. El Ateneo, Buenos Aires.
- ERIZE, F. (Dir), 1997b. El nuevo libro del árbol. Tomo II. Especies forestales de la Argentina Oriental., 2° ed. El Ateneo, Buenos Aires.
- HAMRICK, J.L. & M.J. GODT, 1989. Allozyme diversity in plant species. In: Plant population genetics, breeding, and genetic resources. (Eds. Brown, Clegg, Kahler and Weir), pp.43-63, Sinauer Ass.Inc., Massachusetts.
- JOYCE, D., 2001. Genetic resource management. In: Wagner, R. and S. Colombo (eds.), Regenerating the Canadian Forest. Principles and practice for Ontario. pp 141-154. Fitzhenry and Whiteside Lt., Ontario, Ca.
- JULIO, N., J. JOSEAU, B. SAIDMAN y J.VILARDI, 1999. Análisis de relación entre variables genéticas y ambientales en poblaciones de *Prosopis chilensis* (Leguminosae) de Argentina y Chile. Proceedings XXIX Congreso Argentino de Genética, pp.126.
- LERNER, I.M., 1954. Genetic homeostasis. 134 p., Oliver and Boyd (Eds.), London.
- LEVINS, R. 1966. Evolution in changing environments. 120p., Princeton Univ. Press, N.Y.
- REHFELDT, J., 1979a. Ecological adaptations in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var *glauca*) populations I. North Idaho and Northeast Washington. Heredity 43: 383-397.
- REHFELDT, J., 1979b. Ecotypic differentiation in *Pinus monticola* in northern Idaho, myth or reality. Am. Nat. 114: 627-736.
- REHFELDT, J., 1982. Differentiation in *Larix occidentalis* populations from the northern Rocky Mountains. Silvae Genetica 31:13-19.
- REHFELDT, J., 1983. Adaptation of *Pinus contorta* populations to heterogeneous environments in northern Idaho. Canadian Journal of Forest Resources. 13:405-411.
- REHFELDT, J., 1984. Microevolution of conifers in the Northern Rocky Mountains: a view from common gardens. IN Proc. Eight North American Forest Biology Workshop, Logan, Utah, pp.132-146.
- REHFELDT, J., 1989. Ecological adaptations in Douglas-fir, *Pseudotsuga mensiesii* var. *glauca*,: a synthesis. For.Ecol.and Manag. 28: 203-215.
- REHFELDT, J., 1990. Genetic differentiation among populations of *Pinus ponderosa* from the upper Colorado River Basin. Bot.Gaz. 151: 125-137.
- REHFELDT, J., 1991. A model of genetic variation for applications in gene resource management. Can. Journal For.Res. 21: 1491-1500.
- REHFELDT, J., 1994a. Adaptation of *Picea engelmannii* populations to the heterogeneous environments of the Intermountain West. Can. J. of Botany, 72, 8.
- REHFELDT, J., 1994b. Genetic structure of western red cedar populations in the Interior West. Can. J. of For. Res. 24(4).

- REHFELDT, J., 1995. Genetic variation, climate models and the ecological genetics of *Larix occidentalis*. For. Ecol. and Manag. 78 (1-3).
- SERRA, M.T., 1997. *Prosopis chilensis*. EN Especies arbóreas y arbustivas para las zonas áridas y semiáridas de América Latina. Serie: Zonas Áridas y Semiáridas N°12, FAO, Santiago, Chile.
- TIMSON, J., 1965. New method of recording germination data. Nature, 207, 216-217
- Verga, A., 1995. Estudios genéticos en *Prosopis chilensis* y *P. flexuosa* (Mimosaceae) en el Chaco Árido Argentino. Tesis Universitat Gottingen. (inédito)
- VERZINO, G., C. CARRANZA, M. LEDESMA, M. JOSEAU y J. DI RIENZO, 1995. Genecología de *Prosopis chilensis* (Mol) Stunz dentro de su rango de distribución en Argentina y Chile. Resultados preliminares. En: Actas Segundas Jornadas Técnicas Forestales del Parque Chaqueño. Sgo. del Estero.
- VERZINO, G., M. LEDESMA, C. CARRANZA, M. JOSEAU y J. DI RIENZO, 1998. Genecología de *Prosopis chilensis* (Mol) Stunz dentro de su rango de distribución en Argentina y Chile. Avances en el conocimiento. I° Congreso Latinoamericano IUFRO "El manejo sustentable de los Recursos forestales. Desafío del Siglo XXI (en CD), Valdivia, Chile.

Recibido: 5/2000
 Aceptado: 11/2000