

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

“Caracterización morfológica, genética y climática en la zona de contacto entre *Prosopis alba* y el complejo *P. hassleri-P. fiebrigii* (Fabaceae)”

por

Ing. Ftal. Carmen Delcira Vega

Directora: Dra. Andrea Cosacov

Directora Asociada: Dra. María Cristina Acosta

Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales – Centro de Investigaciones Agropecuarias - INTA



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina
2020

COMISIÓN ASESORA

Dra. Beatriz Ofelia Saidman, FCEFYN-UBA
Dra. María Laura Las Peñas, IMBIV-CONICET
Dra. Viviana Solís Neffa, CONICET

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:
Calificación:

TRIBUNAL

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

Dedicatoria

A Sergio, Martina y Josefina

A mis padres y hermanos

Agradecimientos

A mis directoras Andrea Cosacov y Cristina Acosta por el apoyo recibido durante todo este tiempo, por la paciencia y por todo lo que me enseñaron en este maravilloso proceso.

A mi comisión asesora, Dra. Beatriz Saidman y Dra. María Laura Las Peñas, quienes me acompañaron estos años en la construcción de esta Tesis. Asimismo, a la Dra. Vivina Solís Neffa quien evaluó el manuscrito en su etapa final, y realizó aportes muy valiosos que contribuyeron a mejorar el manuscrito de la tesis.

Al Dr. Aníbal Verga, quien tan generosamente me invitó a trabajar en su equipo y me apoyó desde el primer día, no solo desde el punto de vista académico sino también desde lo humano, acompañándome y ayudándome a sobrellevar la distancia con los seres queridos.

A mis compañeros de trabajo quienes hicieron mucho por mí y por este trabajo colaborando en los muestreos, tareas de laboratorio y por el apoyo permanente, Diego López Lauenstein, Fernando Muttoni, Edgardo Carloni, Paula Venier, Ingrid Teich, Daniela Gómez, Yohana Ruarte, Dana Aguilar, Diego Facchin, sin ellos no habría sido posible todo esto.

Un agradecimiento especial a Andrés Camps, gran compañero y amigo, por todo el tiempo compartido, viajes, laboratorio, mates, por acompañarme en este proceso y ayudarme con los modelados de nicho.

A todos mis compañeros y compañeras del IFRGV. Por todos los momentos compartidos, que son muchos e inolvidables.

A todas las personas que colaboraron en los diferentes muestreos realizados en Formosa, en especial a Celia Linares, que en varias oportunidades acompañó al muestreo y cosecha de frutos brindando el medio de transporte, la predisposición y buena onda para lograr un viaje agradable y productivo.

A mi compañera y amiga Clelia Gómez, por acompañarme en varias oportunidades a realizar los muestreos, por la buena onda de siempre y por hacer de esos viajes inolvidables.

A la Prof. Ing. Agr. Lidia Perez de Molas y Mirtha Vera de Ortiz, Directora de carrera de Ing. Ftal de la Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Asunción

Paraguay, quienes colaboraron con la logística y acompañaron en el recorrido realizado en Paraguay.

Al Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales, al Programa de Formación de Postgrado del Instituto Nacional de Tecnologías Agropecuarias y a todos los proyectos de INTA y CONICET, que financiaron las diferentes actividades realizadas y que hicieron posible esta tesis.

Al Ing. Ftal. Víctor Pérez por su amistad, por su generosidad y por fomentar en mí el deseo de superación y búsqueda del conocimiento a través de mi formación académica y de investigación.

A mi familia por el apoyo de siempre a pesar de las distancias, a mis padres agradezco enormemente los sacrificios que hicieron posible que hoy yo pueda estar donde estoy. A mis hermanos a quienes amo con todo mi corazón.

Por último, a las personas más importantes de mi vida, Monchi, Marti y Jose quienes me ayudaron siempre, que soportaron mis ausencias y por su amor incondicional.

A todos los que hicieron posible la realización de esta tesis.

LISTADO DE PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

- 1) Vega C, Teich I, Acosta MC, Lopez Lauenstein D, Verga A, Cosacov A (2020) Morphological and molecular characterization of a hybrid zone between *Prosopis alba* and *P. nigra* in the Chaco region of northwestern Argentina. *Silvae Genetica* 69, 44 – 55.
- 2) Vega C, Aguilar D, Bessega C, Teich I, Acosta MC, Cosacov A, Ewens M, Vilardi J, Sérsic A, Verga A (2020) Genetic variation patterns of “algarrobos” from “Great American Chaco” (*Prosopis alba*, *P. nigra*, *P. hassleri*, *P. fiebrigii*, *P. ruscifolia*, *P. chilensis* and *P. flexuosa*), chapter 9. En: *Low Intensity Breeding of Native Forest Trees in Argentina* (Editores: Marchelli P. y Pastorino M.). Springer

Índice

Índice de figuras	x
Índice de tablas	11
RESUMEN	13
SUMMARY	14
1. INTRODUCCIÓN	15
Hipótesis	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	24
2. MATERIALES Y MÉTODOS	24
<i>Area de estudio</i>	24
<i>Especies en estudio</i>	27
1. <i>Prosopis alba</i>	27
2. <i>Prosopis hassleri</i>	28
3- <i>Prosopis fiebrigii</i>	29
<i>Muestreo de poblaciones naturales</i>	30
2.1- Caracterización morfológica	32
2.1.1. Medidas morfométricas	32
2.1.2. Análisis de los datos morfológicos	33
2.2. Modelado de nicho y requerimientos climáticos de cada morfotipo	34
2.2.1. Aspectos comunes al modelado de nicho de las especies focales	34
2.2.2 Solapamiento de Nichos	37
2.2.3 Ordenamiento de los grupos morfológicos en el espacio climático	39
2.3- Caracterización molecular	39
2.3.1. Extracción de ADN	39
2.3.2. Secuencias de ADN de cloroplasto	39
2.3.2.1 Genealogía y distribución geográfica de haplotipos	40
2.3.2.2 Estructuración poblacional y diversidad genética	40
2.3.2.3 Análisis demográficos de los filogrupos de la red del complejo	41
2.3.3 Microsatélites	42
2.3.3.1 Amplificación de los SSRs	43
2.3.2.2 Índices de diversidad genética por morfotipo	44
2.3.2.3 Frecuencias alélicas	44
2.3.2.4 Diferenciación genética entre los grupos morfológicos	45
2.3.2.5 Análisis Bayesiano de Estructuración genética	45

2.3.2.6 Estructura espacial de la variabilidad genética.....	45
2.4. Análisis citogenéticos	46
2.4.1 Germinación de semillas y fijación del material vegetal.....	46
2.4.2 Obtención de preparados cromosómicos	46
2.4.3 Bando cromosómico CMA/DA/DAPI.....	46
2.4.4 Análisis morfométrico de los cariotipos	47
2.4.5 Análisis de Componentes Principales y análisis fenético de los datos cariotípicos	47
2.5. Análisis integradores: caracterización morfológica, genética y climática de los grupos morfológicos	48
2.5.1 Correspondencia entre la asignación morfológica y genética: especies puras e híbridos	48
2.5.2 Mantel parcial	49
2.5.3 Análisis de Procrustes generalizado	49
2.5.4 Análisis de Componentes Principales integrador	49
2.5.5 Regresiones múltiples: influencia relativa de la variación genética y climática sobre la variación morfológica	50
3- RESULTADOS	50
3.1. Caracterización morfológica.....	50
3.1.1 Análisis exploratorio de los datos.....	50
3.1.2 Análisis Discriminante	51
3.1.3 Análisis univariados y multivariado de la varianza.....	54
3.1.4 Distribución de la variación morfológica en el espacio geográfico	56
3.1.5 Resultados principales	58
3.2. Modelado de nicho y requerimientos climáticos de cada morfotipo.....	59
3.2.1 Modelado de nicho	59
<i>Prosopis alba</i>	59
<i>Prosopis hassleri</i>	59
<i>Prosopis fiebrigii</i>	60
3.2.2 Solapamiento de Nichos	62
<i>Prosopis alba</i> vs <i>P. fiebrigii</i>	64
<i>Prosopis alba</i> vs <i>P. hassleri</i>	65
<i>Prosopis hassleri</i> vs <i>P. fiebrigii</i>	66
3.2.3 Análisis de componentes principales para las variables climáticas.....	68
3.2.4 Resultados principales	69
3.3 Caracterización molecular	71
3.3.1. Secuencias de ADN cloroplastidial del complejo	71
3.3.1.1 Genealogía y distribución geográfica de haplotipos.....	71

3.3.1.2 Estructuración poblacional y diversidad genética	72
3.3.1.3 Análisis demográficos de las poblaciones genéticas	74
3.3.1.4 Resultados principales	77
3.3.2 Microsatélites	78
3.3.2.1 Índices de diversidad genética	78
3.3.2.2 Frecuencias alélicas	80
3.3.2.3 Diferenciación genética entre los grupos morfológicos	82
3.3.2.4 Análisis bayesiano de estructuración genética	84
3.3.2.5 Estructura espacial de la variabilidad genética.....	87
3.3.2.6 Resultados principales	89
3.4. Análisis citogenéticos	90
3.4.1. Caracteres cromosómicos cuantitativos y cualitativos y estructura de los cariotipos	90
3.4.2. Análisis de Componentes Principales y análisis fenético de los datos cariotípicos	97
3.4.3 Resultados principales	98
3.5 Análisis integradores: caracterización morfológica, genética y climática de los morfotipos.....	99
3.5.1 Correspondencia entre la asignación morfológica y genética: especies puras e híbridos	99
3.5.2 Mantel parcial	103
3.5.3 Análisis de procrustes generalizado	103
3.5.4 Análisis de Componentes Principales integrador	104
3.5.5 Regresiones múltiples: influencia relativa de la variación genética y climática sobre la variación morfológica	105
4. DISCUSIÓN GENERAL	107
5. CONCLUSIONES.....	123
6. BIBLIOGRAFIA	124
7. MATERIAL SUPLEMENTARIO	143

Índice de figuras

Figura 1. <i>P. alba</i> . A) Ejemplar típico de la especie en la Provincia de Formosa fotografiado durante el muestreo realizado en junio de 2012. B) Muestras de hojas. C) Muestras de Frutos.	28
Figura 2. <i>P. hassleri</i> . A) Ejemplar típico de la especie en Laguna Blanca, Formosa, fotografiado durante el muestreo realizado en el mes de abril de 2015. B) Muestras de hojas. C) Muestras de frutos.	29
Figura 3. <i>P. fiebrigii</i> . A) Ejemplar típico de la especie en el departamento Presidente Hayes fotografiado durante el muestreo realizado en Paraguay en diciembre de 2018. B) Muestras de hojas. C) Muestras de frutos.	30
Figura 4. Totalidad de los árboles muestreados en la Provincia de Formosa, Argentina, y en los Departamentos Boquerón y Presidente Hayes de Paraguay, pertenecientes a los grupos morfológicos <i>P. alba</i> , <i>P. hassleri</i> , <i>P. fiebrigii</i> y <i>P. alba x P. hassleri</i> . Cada punto corresponde a un árbol individual. Las elipses indican los sitios correspondientes a los morfotipos intermedios sin la presencia de sus parentales.....	32
Figura 5. Caracteres morfológicos de hojas: ancho del foliólulo (AFOL), relación área del ápice del foliólulo/área del rectángulo que contiene al ápice (APREC), longitud del foliólulo (LFOL), longitud del pecíolo (LPE), longitud de la pinna (LPI) (Tomado de Vega et al. 2020).....	33
Figura 6. Puntos de presencia utilizados para la calibración del modelo y área M (área gris) para cada especie. A) <i>P. alba</i> ; B) <i>P. fiebrigii</i> y C) <i>P. hassleri</i>	37
Figura 7. Biplot de los dos primeros ejes del ACP realizado con las variables morfológicas de hoja indicando el morfotipo al que pertenece cada individuo. A) Biplot mostrando los individuos puros de cada especie y los intermedios. B) similar al panel A, pero los morfotipos intermedios clasificados previamente según su mayor similitud a <i>P. alba</i> o <i>P. hassleri</i> . Los diferentes colores corresponden a los diferentes morfotipos. MI, morfotipo intermedio. ..	51
Figura 8. Biplot resultante del Análisis Discriminante de los cinco grupos morfológicos en función de las diez variables morfológicas medidas: ancho de los foliolulos (AFOL), relación área del ápice del foliólulo/área total del foliólulo (APTOT), área de los foliólulos (ARFOL), distancia de los foliólulos (DIFOL), relación longitud / ancho del foliólulo (LAFOL), longitud de los foliolulos (LFOL), largo del pecíolo (LPE), largo de pinna (LPI), número de los foliólulos (NFOL), número de pinnas (NPI). MI, morfotipo intermedio.	52
Figura 9. A) Dendrograma obtenido con el método UPGMA, basado en la distancia morfológica entre los “árboles tipos” basado en los caracteres morfológicos de hoja. B) Ejemplares de herbarios correspondientes a los árboles tipos representantes de cada grupo morfológico. MI, morfotipo intermedio.	54
Figura 10. Individuos muestreados clasificados según su grupo morfológico. MI, morfotipo intermedio.	57
Figura 11. Mapa resultante de la interpolación espacial del primer eje del Análisis de componentes principales basado en los diez caracteres morfológicos de las hojas medidos en los 421 individuos.....	58
Figura 12. Resultado del Modelado de nicho para las tres especies en estudio: A) Mapa binario de presencia/ausencia de las tres especies (<i>P. alba</i> , <i>P. hassleri</i> y <i>P. fiebrigii</i>). Mapas de probabilidad (favorabilidad climática) de B) <i>P. alba</i> , C. <i>P. hassleri</i> D. <i>P. fiebrigii</i>	61
Figura 13. Gráficos de densidad para la latitud, longitud y las variables climáticas de mayor importancia en el modelado de nichos relacionadas con valores de precipitación y temperatura para los 5 grupos morfológicos. MI, morfotipo intermedio.	63
Figura 14. Solapamiento de nicho en <i>P. alba</i> y <i>P. fiebrigii</i> en el espacio climático. Los paneles A) y B) representan el nicho de <i>P. alba</i> y <i>P. fiebrigii</i> respectivamente, a lo largo de	

los dos primeros ejes del ACP basado en datos climáticos. El sombreado gris indica, cuanto más oscuro, mayor número de ocurrencias situadas en localidades con esas características climáticas del espacio de componentes principales. C) Superposición de nichos utilizando la métrica D, el cual se encuentra representado con el color azul y con color verde toda el área de nichos de ambas especies. Los histogramas D) y E) muestran los resultados de las pruebas de equivalencia y de similitud de nicho, las mismas se calcularon a partir de 1.000 repeticiones. Las barras grises muestran la frecuencia de los valores de D obtenidos en las simulaciones bajo las respectivas hipótesis nulas. La línea roja indica el valor observado del parámetro D. 65

Figura 15. Solapamiento de nicho en *P. alba* y *P. hassleri* en el espacio climático. Los paneles A) y B) representan el nicho de *P. alba* y *P. hassleri* respectivamente a lo largo de los dos primeros ejes del ACP basado en datos climáticos. El sombreado gris indica, cuanto más oscuro, mayor número de ocurrencias situadas en localidades con las características climáticas del espacio de componentes principales. C) Superposición de nichos utilizando la métrica D, el cual se encuentra representado con el color azul y con color verde toda el área de nichos de ambas especies. Los histogramas D) y E) muestran los resultados de las pruebas de equivalencia y de similitud de nicho, las mismas se calcularon a partir de 1.000 repeticiones. Las barras grises muestran la frecuencia de los valores de D obtenidos en las simulaciones bajo las respectivas hipótesis nulas. La línea roja indica el valor observado del parámetro D. 66

Figura 16. Solapamiento de nicho en *P. hassleri* y *P. fiebrigii* en el espacio climático. Los paneles A) y B) representan el nicho de *P. hassleri* y *P. fiebrigii* respectivamente a lo largo de los dos primeros ejes del ACP basado en datos climáticos. El sombreado gris indica, cuanto más oscuro, mayor número de ocurrencias situadas en localidades con esas las características climáticas del espacio de componentes principales. C) Superposición de nichos utilizando la métrica D, el cual se encuentra representado con el color azul y con color verde toda el área de nichos de ambas especies. Los histogramas D) y E) muestran los resultados de las pruebas de equivalencia y de similitud de nicho, las mismas se calcularon a partir de 1.000 repeticiones. Las barras grises muestran la frecuencia de los valores de D obtenidos en las simulaciones bajo las respectivas hipótesis nulas. La línea roja indica el valor observado del parámetro D. 67

Figura 17. Biplot de los dos primeros ejes del ACP realizado utilizando las variables climáticas de mayor importancia en el modelado de nicho relacionadas con valores de precipitación y temperatura para los 420 individuos muestreados, diferenciando a los morfotipos puros y los morfotipos intermedios. MI, morfotipo intermedio. 68

Figura 18. Estructura genética basada en secuencias de ADN de cloroplasto. A) Distribución geográfica de haplotipos. Los símbolos representan a los taxones estudiados y los colores indican el haplotipo. B) Red que representa las relaciones genealógicas entre los 6 haplotipos (designados con números) de ADN cloroplastidial. Los colores se corresponden con A). C) Red de haplotipos, pero discriminada por especies puras y morfotipos, los diferentes colores corresponden a los diferentes taxones estudiados. En B. y C., el tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia de haplotipos. Las líneas transversales indican la cantidad de cambios mutacionales entre los distintos haplotipos. MI, morfotipo intermedio. 71

Figura 19. Localización geográfica y delimitación de las poblaciones genéticas determinadas por el análisis SAMOVA. A) Grupos obtenidos para $k = 2$ y B) Grupos para $k = 3$. Los símbolos representan a los grupos morfológicos estudiados y los colores indican el grupo genético (grupo Este, representado por el color verde y grupo Oeste representado por el color violeta). MI, morfotipo intermedio. 73

Figura 20. Localización geográfica y reconocimiento de las poblaciones genéticas determinadas por el análisis SAMOVA para *P. hassleri* y *P. fiebrigii*, grupos obtenidos para

k= 2. Los símbolos representan a los morfotipos estudiados y los colores indican el grupo (Grupo 1, representado por el color rojo y grupo 2 representado por el color verde).....	73
Figura 21. Distribución de frecuencias de diferencias pareadas para: A) Todo el complejo; B) Grupo Este; C) Grupo Oeste. Perfil demográfico estimado con BSP para todo el complejo (D) y para el filogrupo noroeste (E). La línea continua representa los valores medios estimados y el área sombreada el intervalo de credibilidad (95% HDP).	77
Figura 22. Frecuencias alélicas en los loci de microsatélites Mo08 y Mo13 para los 6 grupos morfológicos analizados. MI, morfotipo intermedio.....	80
Figura 23. Frecuencias alélicas en los loci de microsatélites GL6, GL8, GL12 y GL15 para los 6 grupos morfológicos analizados. MI, morfotipo intermedio	81
Figura 24. Biplot de los dos primeros ejes del ACP sobre las frecuencias alélicas obtenidas con el análisis de microsatélites para los 6 grupos morfológicos. Los diferentes colores corresponden a los diferentes grupos morfológicos. MI, morfotipo intermedio	82
Figura 25. Dendrograma obtenido por el análisis UPGMA correspondiente a las distancias genéticas de Nei entre los seis grupos morfológicos (<i>P. alba</i> _Isla Cuba, <i>P. alba</i> , Morfotipo <i>P. alba</i> , Morfotipo <i>P. hassleri</i> , <i>P. hassleri</i> y <i>P. fiebrigii</i>).	83
Figura 26. Representación gráfica del análisis de agrupamiento bayesiano realizado para los 104 individuos basado en 6 loci de microsatélites para k=2. Los colores diferentes representan distintos grupos genéticos. MI, morfotipo intermedio.	84
Figura 27. Mapa donde están representadas las tres zonas de estudio: zona Noroeste, zona centro y zona Noreste, cada punto de diferente color corresponde al grupo morfológico estudiado. Además, para cada zona se encuentra su correspondiente corrida con el programa STRUCTURE 2.3.1. MI, morfotipo intermedio.....	86
Figura 28. Mapa resultante de la interpolación espacial del primer componente principal del Análisis de componentes principales de las frecuencias alélicas para los 74 individuos....	88
Figura 29. Mapa final con los 74 individuos de <i>Prosopis</i> analizados con microsatélites y reclasificados por su grupo genético.	89
Figura 30. Metafases mitóticas de las tres especies puras (2n=2x=18) teñidas secuencialmente con CMA/DA/DAPI. A-B) <i>P. alba</i> . C-D) <i>P. hassleri</i> . E-F) <i>P. fiebrigii</i> . A, C, E) CMA. B, D, F) DAPI. La escala representa 10 µm.	94
Figura 31. Metafases mitóticas del morfotipo intermedio <i>P. alba</i> x <i>P. hassleri</i> (2n=2x=18) teñidas secuencialmente con CMA/DA/DAPI. A-B) <i>P. alba</i> x <i>P. hassleri</i> Citotipo 1. C-D) <i>P. alba</i> x <i>P. hassleri</i> Citotipo 2. A, C) CMA: B, D) DAPI. La escala representa 10 µm.....	95
Figura 32. Idiogramas de <i>P. alba</i> , <i>P. hassleri</i> , <i>P. fiebrigii</i> y <i>P. alba</i> x <i>P. hassleri</i> . Los bloques negros indican la heterocromatina CMA+/DAPI-. En cada idiograma los cromosomas están acomodados en categorías según el índice braquial creciente y, dentro de cada grupo, de acuerdo a su longitud decreciente. La escala vale 4 µm. m=metacéntrico; sm: submetacéntrico.	96
Figura 33. Biplot de los dos primeros ejes del Análisis de Componentes Principales realizado utilizando los datos cromosómicos seleccionados.	97
Figura 34. Fenograma UPGMA derivado de la distancia euclídea promedio entre los cuatro morfotipos analizados utilizando los datos cromosómicos seleccionados.	98
Figura 35. Biplot de los dos primeros ejes del ACP realizado con las variables morfológicas de hoja indicando el grupo morfológico al que pertenece cada individuo. A) biplot mostrando los individuos clasificados a partir del análisis morfológico B) Similar al panel A, pero los individuos clasificados por grupos genéticos obtenidos a partir del análisis con microsatélites. MI, morfotipo intermedio.....	100
Figura 36. Consenso obtenido por el análisis de Procrustes de los 74 árboles coloreados por los cinco grupos morfológicos. A) APG entre la variabilidad morfológica y genética B) APG entre variabilidad morfológica y climática. MI, morfotipo intermedio.....	103

Figura 37. Biplot de los dos primeros ejes del ACP integrador realizado a partir de las variables sintéticas morfológicas, genéticas y climáticas. MI, morfotipo intermedio. 104

Figura 38. Patrones espaciales de la variabilidad morfológica, climática, genética y distribución geográfica de las especies focales. A) mapa correspondiente a la interpolación de la primera Componente Principal (CP1m) morfológica para los 421 individuos medidos; B) interpolación de la primera Componente Principal climática (CP1cli) para los 471 individuos; C) Mapa de interpolación de la CP1 genética para los 74 individuos estudiados a través de microsatélites, indicando la localización de los individuos puros e híbridos. Los círculos azules, verdes y rojos corresponden a las especies puras *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii*, respectivamente. Las estrellas blancas corresponden a híbridos. Las estrellas de color celeste y verde claro corresponden a híbridos introgresantes tipo *P. alba* y tipo *P. hassleri*, respectivamente. Los rombos de color celeste con borde verde claro corresponden a híbridos introgresantes con desacople *P. alba* (i.e. genéticamente tipo *P. alba*, pero morfológicamente *P. hassleri*) y los rombos de color verde claro con borde celeste corresponden a híbridos introgresantes con desacople tipo *P. hassleri*. D) Mapa de presencia de *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii* indicando la localización geográfica de los haplotipos encontrados en Argentina y Paraguay. Los símbolos corresponden a los grupos morfológicos: círculo, *P. alba*, triángulo morfotipo intermedio *P. alba*, cuadrado morfotipo intermedio *P. hassleri*, rombo *P. hassleri*, y estrella *P. fiebrigii*. Los colores corresponden a los seis haplotipos: H1 (naranja), H2 (violeta), H3 (fucsia), H4 (celeste), H5 (gris) y H6 (marrón). 106

Índice de tablas

Tabla 1. Resumen de los principales caracteres de hoja que diferencian a las especies en estudio. Ancho del foliólulo (AFOL), longitud del foliólulo (LFOL), longitud del pecíolo (LPE), longitud de la pinna (LPI), número de pares de foliolulos (NFOL).	30
Tabla 2. Descripción y características de los 6 microsátélites utilizados.	44
Tabla 3. Tabla de clasificación cruzada obtenida a partir del Análisis Discriminante. En filas se representa al grupo al que pertenece la observación y en columnas el grupo al que es asignada la misma observación al usar la función discriminante. Grupo 1, <i>P. alba</i> , grupo 2, morfotipo intermedio <i>P. alba</i> , grupo 3, morfotipo intermedio <i>P. hassleri</i> , grupo 4, <i>P. hassleri</i> , grupo 5, <i>P. fiebrigii</i>	53
Tabla 4. Resultados del ANOVA: medias (\pm EE.) en los grupos morfológicos para los rasgos medidos en hojas. Ancho del foliólulo (AFOL), relación área del ápice del foliólulo/área total del foliólulo (APTOT), área total del foliolulo (ARFOL), distancia entre foliolulos (DIFOL), error estándar (EE), relación longitud / ancho del foliólulo (LAFOL), longitud de los foliolulos (LFOL), longitud del pecíolo (LPE), longitud de la pina (LPI), número de pares de foliolulos (NFOL), número de pares de pinas (NPI). Entre paréntesis se indica el número de individuos de cada grupo morfológico. Las letras distintas dentro de cada fila, indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos para esa variable, luego de una prueba a posteriori de Tuckey.	56
Tabla 5. Valores de umbral y métricas de validación para cada Modelado de Nicho Ecológico de <i>Prosopis alba</i> , <i>P. hassleri</i> y <i>P. fiebrigii</i> . Nota: la denominación de los modelos se realiza de acuerdo a los parámetros incorporados para cada uno, que consisten en transformaciones aplicadas a las covarianzas que se modelan entre variables (llamadas “features classes”) y al coeficiente de regularización, que es un parámetro que penaliza al modelo para evitar la sobreparametrización y el sobreajuste.	62
Tabla 6. Índices de diversidad y análisis demográficos obtenidos para el complejo <i>Prosopis</i> (considerada como una única población) y para los 2 grupos de poblaciones genéticas derivados del análisis espacial de la varianza molecular. Número de muestras (N), número de haplotipos (H), identidad de los haplotipos (ID), número de sitios polimórficos (S), diversidad haplotídica (h), diversidad nucleotídica (π) y número promedio de diferencias pareadas (p +/- SD). D de Tajima (nivel de significación: $p < 0,05$), Fs de Fu (nivel de significación: $p < 0,02$), suma de los desvíos al cuadrado (SSD; nivel de significación $p < 0,05$) para un modelo de expansión demográfica como hipótesis nula. En negrita se muestran los resultados compatibles con expansiones demográficas. n.s. resultados no significativos. MI, morfotipo intermedio	75
Tabla 7. Índices de diversidad y análisis demográficos obtenidos para <i>P. hassleri-P. fiebrigii</i> (considerada como una única población) y para los 2 grupos de poblaciones derivados del análisis espacial de la varianza molecular. Número de muestras (N), número de haplotipos (H), identidad de los haplotipos (ID), número de sitios polimórficos (S), diversidad haplotídica (h), diversidad nucleotídica (π) y número promedio de diferencias pareadas (p +/- SD). D de Tajima (nivel de significación: $p < 0,05$), Fs de Fu (nivel de significación: $p < 0,02$), suma de los desvíos al cuadrado (SSD; nivel de significación $p < 0,05$) para un modelo de expansión demográfica reciente como hipótesis nula. En negrita se muestran los resultados compatibles con expansiones demográficas. n.s. resultados no significativos.....	76
Tabla 8. Parámetros de diversidad genética para los loci polimórficos de los microsátélites analizados para todos los grupos morfológicos (<i>P. alba</i> _Isla cuba, <i>P. alba</i> , morfotipo intermedio <i>P. alba</i> , morfotipo intermedio <i>P. hassleri</i> , <i>P. hassleri</i> y <i>P. fiebrigii</i>). Número de individuos (N), número de alelos (Na), número de alelos efectivos (Ne), riqueza alélica (R _A),	

heterocigocidad observada (Ho), heterocigocidad esperada (He), índice de diversidad de Shannon (I).	79
Tabla 9. Distancia genética de Nei entre los cuatro morfotipos encontrados. Los grupos del 1 al 6 se corresponden con los grupos morfológicos <i>P. alba</i> _Isla Cuba, <i>P. alba</i> , morfotipo intermedio <i>P. alba</i> , morfotipo intermedio <i>P. hassleri</i> , <i>P. hassleri</i> y <i>P. fiebrigii</i> , respectivamente.	83
Tabla 10. Valores de Fst entre pares de grupos morfológicos. En negrita se muestran las comparaciones que no fueron significativas ($p > 0,05$). MI, morfotipo intermedio.	84
Tabla 11. Parámetros de diversidad genética para los loci polimórficos para las zonas noroeste, centro y zona noreste). Número de individuos (N), número de alelos (Na), número de alelos efectivos (Ne), heterocigocidad observada (Ho), heterocigocidad esperada (He), índice de diversidad de Shannon (I).	87
Tabla 12. Datos cariotípicos para las especies <i>Prosopis alba</i> , <i>P. hassleri</i> , <i>P. fiebrigii</i> y el morfotipo intermedio <i>P. alba</i> x <i>P. hassleri</i> . Cromosomas metacéntricos y submetacéntricos (m y sm), regiones organizadoras nucleolares (NOR), longitud total del complemento haploide en μm (LTCH), desvío estándar (de), longitud cromosómica promedio (c), índice braquial medio (r), razón entre el cromosoma más largo y el más corto (R), índice de asimetría intracromosómica (A_1), índice de asimetría intercromosómica (A_2). * Tipo de asimetría cariotípica según Stebbins (1971).	91
Tabla 13. Caracteres cariotípicos de las especies de <i>Prosopis</i> teñidas con bandeado de fluorescencia. Heterocromatina asociada a las regiones organizadoras nucleolares (NOR-asoc.), heterocromatina pericentromérica (Peric.). Entre paréntesis, luego del nombre se indica el número de individuos y de metafases analizados con bandeado de fluorescencia. *Cantidad de heterocromatina expresada como porcentaje de la longitud total del complemento haploide.	93
Tabla 14. Caracterización morfológica, genética y citogenética de los 12 individuos estudiados a través de los análisis citogenéticos.	101
Tabla 15. Resumen de los principales caracteres morfológicos de hoja, caracteres genéticos y citogenéticos que diferencian a los cinco morfotipos estudiados. Ancho del foliólulo (AFOL), área total del foliólulo (ARFOL), longitud de los foliolulos (LFOL), longitud del pecíolo (LPE), longitud de la pina (LPI), número de pares de foliolulos (NFOL), número de pares de pinas (NPI), número cromosómico (n), heterocromatina pericentromérica (Peric.). MI, morfotipo intermedio.	102
Tabla 16. Correlaciones de Pearson entre los ejes sintéticos. Las correlaciones significativas se indican en negrita.	105

RESUMEN

Entre las especies de mayor valor forestal características del Gran Chaco Americano se encuentran las especies del género *Prosopis*, conocidas como algarrobos. En el contexto de la conservación dinámica de los recursos genéticos importa profundizar en los procesos evolutivos que subyacen a la variación morfológica y genética de las especies. La hibridación interespecífica es un proceso clave en el género que ha sido reportado hasta el momento siempre entre especies de algarrobos “blancos” y “negros”, ya que en general sus distribuciones naturales son simpátricas. Sin embargo, los algarrobos blancos, que en general tienen distribuciones contiguas (adyacentes), presentan zonas de contacto donde también podría tener lugar la hibridación interespecífica. El presente trabajo se enfocó en analizar la zona de contacto entre las especies de algarrobo blanco *P. alba*- *P. hassleri*- *P. fiebrigii*, estudiando tanto zonas puras de cada una de las especies como así también cubriendo todo el rango geográfico compartido por ellas. Se utilizaron diferentes aproximaciones como la delimitación morfológica de cada grupo, a través de la taxonomía numérica basado en caracteres foliares la caracterización del nicho climático de cada grupo mediante el Modelado de Nicho Ecológico, la caracterización genética a partir de secuencias no codificantes de cloroplasto y microsatélites nucleares, y, por último, estudios cariológicos detallados para las especies y los híbridos.

Los resultados mostraron la existencia de cinco grupos morfológicos, tres correspondientes a las especies puras y dos correspondientes a morfotipos intermedios. Las pruebas de solapamiento de nichos indicaron que los nichos climáticos de *P. hassleri* y *P. fiebrigii* son equivalentes y similares, sólo similares entre *P. alba* y *P. hassleri* y ni similares ni equivalente entre *P. alba* y *P. fiebrigii*. A partir de la caracterización genética con marcadores neutrales y con secuencias no codificantes de cloroplasto se logró diferenciar principalmente a *P. alba*, híbridos tipo *P. alba* y a un grupo que reunió a los individuos puros de *P. hassleri*, *P. fiebrigii* e individuos híbridos tipo *P. hassleri*. A partir de la caracterización citogenética se identificaron dos citotipos, un citotipo correspondiente a *P. alba* y otro citotipo correspondiente a *P. hassleri* y *P. fiebrigii*, algunos individuos híbridos presentaron citotipo *P. alba* y otros citotipo *P. hassleri* y *P. fiebrigii*. Al reclasificar los individuos estudiados de acuerdo al grupo genético y morfológico se encontraron individuos puros, híbridos e híbridos introgresantes. *Prosopis hassleri* y *P. fiebrigii* solo se diferenciaron a nivel morfológico, pero no en el resto de los análisis, por lo que podría tratarse de una única especie variable a escala geográfica. Se concluye que hay evidencias morfológicas y genéticas de hibridación entre *P. alba* y *P. hassleri*/*P. fiebrigii*. La variación morfológica se encontró espacialmente estructurada y significativamente asociada a la variación climática, es decir que la variación de los caracteres foliares podría ser el resultado de procesos de adaptación local de las especies/morfotipos a los diferentes ambientes.

El conocimiento generado a partir del presente estudio permite comprender el funcionamiento de este complejo de especies de algarrobos blancos y sirve de base para el diseño de programas de intervención para la conservación dinámica de estos valiosos recursos genéticos, mejorando la capacidad evolutiva del complejo y facilitando la adaptación a entornos cambiantes.

SUMMARY

Among the species with the greatest forest value, characteristic of the Gran Chaco Americano are the species of the genus *Prosopis*, known as Algarrobos. In the context of the dynamic conservation of the genetic resources, it is important to study in depth the evolutionary processes underlying the morphological and genetic variation of species. Interspecific hybridization is a key process in the genus that has always been reported so far between “white” and “black” algarrobos species, since in general their natural distributions are sympatric. However, white Algarrobos trees, which generally have contiguous (adjacent) distributions, present contact zones where interspecific hybridization could also take place. The present work focused on analyzing the contact area among the white algarrobos *P. alba*-*P. hassleri*-*P. fiebrigii*, studying both pure areas of each species as well as covering the entire geographic range shared by them. Different approaches were used, such as morphological delimitation of each group, through numerical taxonomy based on foliar characters; the characterization of the climatic niche of each group through Ecological Niche Modeling; genetic characterization from non-coding sequences of chloroplast and nuclear microsatellites; and finally detailed cariological studies for the species and the presumed hybrid.

The results showed the existence of five morphological groups, three corresponding to pure species and two corresponding to intermediate morphotypes. Niche overlap tests indicated that the climatic niches of *P. hassleri* and *P. fiebrigii* are equivalent and similar, only similar between *P. alba* and *P. hassleri* and neither similar nor equivalent between *P. alba* and *P. fiebrigii*.

From the genetic characterization with neutral nuclear markers and non-coding sequences of chloroplast DNA, it was possible to differentiate *P. alba*, hybrids type *P. alba* and a group that brought together the pure individuals of *P. hassleri*, *P. fiebrigii* and hybrids type *P. hassleri*. From the cytogenetic characterization, two cytotypes were identified, one corresponding to *P. alba* and the other one corresponding to *P. hassleri* and *P. fiebrigii*; some hybrid individuals presented *P. alba* cytotype and others *P. hassleri* and *P. fiebrigii* cytotype. When reclassifying the studied individuals according to the genetic and morphological characterization, pure, hybrid and introgressive hybrids were found. *Prosopis hassleri* and *P. fiebrigii* only differed at the morphological level, but not in the rest of the analyzes, so they could be considered as a single species that varies geographically. We concluded that there are morphological and genetic evidences of hybridization between *P. alba* and *P. hassleri*/*P. fiebrigii*. Morphological variation was found to be spatially structured and significantly associated with climatic variation, that is, the variation in foliar characteristics could be the result of local adaptation processes of the species / morphotypes to the different environments.

The knowledge generated from this study allows us to understand the functioning of this complex of white algarrobos species and serves as the baseline for the design of intervention programs for the dynamic conservation of these valuable genetic resources, improving the evolutionary capacity of the complex and facilitating the adaptation to changing environments.

1. INTRODUCCIÓN

Los bosques constituyen sistemas naturales de vital importancia, ya que por un lado son fuente importante de recursos económicos y por otro, son proveedores de servicios ambientales indispensables para el mantenimiento de la biodiversidad y de ecosistemas, y para la regulación del clima a escala regional y global (MEA 2005; IPCC 2007). De acuerdo al Primer Inventario de Bosque Nativo de Argentina, en los últimos años, la superficie de bosque nativo se habría reducido en más del 66% en relación a los bosques existentes a principio del siglo XX (SAyDS 2007).

El Gran Chaco Americano es la ecorregión boscosa más extensa del continente después del Amazonas y la más grande de bosques secos de América del Sur. Se trata de un área natural que contiene una enorme diversidad de ambientes, tales como selvas ribereñas, bosques secos, sabanas y pastizales, matorrales desérticos, esteros, bañados y salares (Spensley et al. 2013). Entre las especies forestales características de estos ecosistemas, se encuentran las especies del género *Prosopis* L. (Fabaceae), conocidas popularmente como algarrobos.

La explotación actual que sufren las especies forestales de *Prosopis* para la provisión de madera, extraída principalmente del bosque nativo (SAyDS 2007), resulta insostenible a mediano plazo y está ocasionando un deterioro importante de los bosques nativos remanentes. Es por ello que son necesarias acciones para fomentar planes de reforestación y enriquecimiento de los bosques nativos degradados, como así también la ordenación de los recursos genéticos dirigida a su conservación y uso sostenible.

La diversidad genética es un factor determinante de la capacidad adaptativa potencial de las poblaciones de una especie forestal ante condiciones cambiantes y adversas (FAO 2007). Es por ello que las estrategias de conservación deben estar dirigidas a garantizar el mantenimiento de los procesos evolutivos y la diversidad genética en las poblaciones forestales naturales, frente a los desafíos que impone el cambio climático. En este contexto, las áreas o regiones geográficas en las que especies del mismo género entran en contacto, se cruzan y producen descendencias, denominadas zonas híbridas (Barton y Hewitt 1985), son particularmente interesantes sistemas de estudio. El mantenimiento de las mismas ha recibido una considerable atención debido a su importante contribución para la comprensión de los procesos y patrones evolutivos. Esto se debe a que estas áreas son a menudo sitios activos de cambios evolutivos en los cuales la hibridación y la introgresión pueden: incrementar la diversidad genética intraespecífica, causar la transferencia de adaptaciones, e

incluso llevar a la aparición de nuevos ecotipos o especies (Petit et al. 1999). Estos conocimientos pueden ser utilizados luego para diseñar programas de intervención para la conservación dinámica de los recursos genéticos en cuestión, potenciando la capacidad evolutiva del complejo, facilitando así la adaptación a ambientes cambiantes.

Aunque la hibridación natural es un fenómeno bastante común en plantas (Arnold 1997; Mallet 2005), el papel evolutivo de la formación híbrida es, sin embargo, aún controvertido y en detalles poco explorado (Mallet 2005). El hecho de que la hibridación sea posible significa que las barreras reproductivas entre las especies son incompletas, y las barreras para el retrocruzamiento son a menudo aún más débiles en los híbridos (Mallet 2007). Por otro lado, otros autores enfatizan el papel creativo que tendría la hibridación en la generación de una "novedad evolutiva" (Arnold 1997; Rieseberg y Willis 2007; Soltis y Soltis 2009).

Cuando los genomas de especies divergentes se fusionan durante la hibridación, se produce una amplia gama de genotipos recombinantes, que luego están sujetos a selección (Burke y Arnold 20017). Esta diversidad genética suplementaria, generada durante los procesos de hibridación, permite exponer a la selección nuevas combinaciones de caracteres adaptativos, dando lugar a procesos microevolutivos, posibilitando la diferenciación de grupos de individuos adaptados a nuevas condiciones ambientales, al tiempo que aumenta la diversidad de las especies ya fijadas (Goulet et al. 2017; Yakimowski y Rieseberg 2017).

En plantas, numerosos estudios de hibridación y zonas híbridas han sido analizadas a través de caracteres morfológicos, isoenzimáticos y a través de polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPDs, por sus siglas en inglés) en diversos sistemas, entre las que se destacan: *Quercus* L. (Williams et al. 2001; Tovar-Sánchez y Oyama 2004; González Rodríguez et al. 2004); *Nothofagus* L. estudiada a través de caracteres morfológicos y marcadores isoenzimáticos (Donoso y Atienza 1983; Premoli 1996; Quiroga et al. 2001; Stecconi et al. 2004); *Populus tremula* L. y *P. tremuloides* L. (Gallo y Geburek 1991); *Pinus* L. (Panetsos 1975; Korol et al. 1995), *Abies* L. (Jain 1976) y *Eucalyptus* L. (Whitham et al. 1994). En particular, en *Prosopis* existen antecedentes de estudios sobre variación genética, sistemas de apareamiento y flujos de genes a través de caracteres morfológicos, bioquímicos y moleculares que demuestran la existencia de altos índices de variación genética intraespecífica y de híbridos interespecíficos (Solbrig y Bawa 1975; Saidman y Vilardi 1987; Saidman 1990; Verga 1995; Vega 2005; Joseau 2006; Mottura 2006; Ferreyra et al. 2013, Velazco Sastre 2019).

Las especies del género *Prosopis*, de la sección Algarobia son los conocidos comúnmente como algarrobos y se clasifican en dos grandes grupos, principalmente debido al color de sus frutos: “algarrobos blancos” (ej. *P. alba* Griseb., *P. hassleri* Harms., *P. fiebrigii* Harms, *P. chilensis* (Mol.) Stuntz y “algarrobos negros” (ej. *P. nigra* Griseb., *P. ruscifolia* Griseb., *P. flexuosa* D.C). El intercambio genético entre especies de algarrobo se produce normalmente entre especies “blancas” y “negras”, ya que en general sus distribuciones naturales son simpátricas (Bessega 2011; Verga 2014). Por ejemplo, en la literatura se mencionan enjambres híbridos entre *P. chilensis* (blanco) y *P. flexuosa* (negro) en el Chaco Árido y Monte (Verga 1995, Córdoba y Verga 2006, Mottura 2005, Joseau et al. 2013), entre *P. alba* (blanco) y *P. nigra* (negro) en el Parque Chaqueño y Espinal (Palacios 1981, Ferreyra 2000, Vega y Hernandez 2005, Vega et al. 2020), y también entre *P. alba* y *P. ruscifolia* (negro) en el Parque Chaqueño (Ferreyra et al. 2013). Sin embargo, las áreas donde coexisten algarrobos blancos de distinta especie son acotadas a zonas de contacto entre sus distribuciones prácticamente alopátricas. En particular, se ha observado que el sudoeste de Santiago del Estero, noroeste de Córdoba, y el Valle de Catamarca, son zonas donde entran en contacto *P. chilensis* y *P. alba*, mientras que en Este de Formosa entran en contacto *P. alba* y *P. hassleri* (Verga 2014). Excluyendo estas zonas particulares, el resto del Parque Chaqueño, el Monte y el Espinal se caracterizan por presentar enjambres híbridos de *Prosopis* únicamente entre especies “blancas” y “negras” (Verga 2014). Es importante mencionar que, si bien se identificaron zonas donde coexisten dos especies de algarrobos blancos, hasta el momento los trabajos en híbridos de *Prosopis* siempre se han realizado entre especies de algarrobos blancos y algarrobos negros, mientras que, hasta el momento, no se han reportado procesos de hibridación entre algarrobos blancos.

El uso de marcadores moleculares para determinar los patrones de variación y estructuración genética en las zonas de hibridación, es, en ocasiones, la única forma posible de detectar eventos que ocurren con una frecuencia baja, o procesos que de otra forma no pueden observarse (Verga et al. 2005; Joseau et al. 2013). Sin embargo, poder caracterizar la variación morfológica junto a la caracterización genética es fundamental, ya que contribuye a indagar de qué manera el proceso de hibridación podría estar afectando a caracteres fenotípicos con importancia funcional. Más aún, poder caracterizar la variación geográfica de caracteres genéticos y fenotípicos en toda la extensión del área de contacto entre especies nos brinda la posibilidad de indagar sobre la influencia de la variación climática y de la hibridación como posible fuente de variación genética y fenotípica. Si bien las aproximaciones que aquí planteamos se basan en evidencias provenientes de la

correlación de patrones, lo cual no es muestra concluyente de causalidad (Endler 1986), representando así una limitación de este tipo de trabajos, estos estudios son necesarios y constituyen los únicos puntos de partida en sistemas cuyos componentes, funcionamiento y procesos evolutivos están poco explorados; además, son el primer paso para luego plantear diseños experimentales que permitan indagar sobre los mecanismos que determinan los patrones encontrados (Lewontin 1974).

Diversas aproximaciones pueden contribuir a caracterizar los procesos evolutivos que ocurren en un área de contacto entre especies. A continuación, se presentan las aproximaciones que son utilizadas en esta tesis.

Taxonomía numérica a partir de la morfología de las hojas

Estudios previos sobre especies afines del género *Prosopis* (Verga 1995; Joseau et al. 2005; Verga y Gregorius 2007) han demostrado que la caracterización morfológica, mediante taxonomía numérica, basada en rasgos de las hojas y los frutos, permite obtener grupos de individuos con características genéticas comunes en un grado de detalle mucho mayor que el alcanzado mediante la sistemática clásica. A determinado grado de diferenciación morfológica se ha observado que pueden separarse grupos que, por sus distancias genéticas obtenidas con marcadores moleculares, alcanzan niveles entre ecotipos y sub-especies, por lo cual este método de análisis se presenta como una aproximación útil para caracterizar la variación morfológica a escala geográfica (Verga 2009). Estudios previos, han estimado una alta heredabilidad de rasgos relacionados con la forma y el tamaño de hojas y espinas, y con rasgos de crecimiento (altura y diámetro del tronco), lo que sugiere que se trataría de caracteres de importancia adaptativa, ya que sólo los rasgos heredables pueden estar sujetos a selección natural, (Bessegga et al. 2009, 2011; Ewens et al. 2012) así estos rasgos serían confiables para la caracterización taxonómica del sistema estudiado. En particular, en *Prosopis alba*, Bessegga et al. (2015) observaron que la mayor diferenciación fenotípica entre poblaciones se da con los caracteres foliares y comparándola con la variación molecular (Q_{st}/F_{st}) sugieren que la variación morfológica sería producto de procesos de selección natural. Finalmente, estos rasgos heredables presentan además importancia económica ya que pueden ser mejorados con fines de explotación a través de un proceso de selección artificial (Bessegga et al. 2011).

Modelado de nicho ecológico

Una aproximación que está siendo cada vez más utilizada en trabajos de conservación y manejo de recursos genéticos forestales es el *modelado de nicho ecológico* (ej. Guarino et al. 2002; Scheldeman et al. 2007, van Zonneveld et al. 2009; Wrege et al. 2009; Verga et al. 2009). Sobre la base de datos climáticos globales y datos geográficos, donde la especie o filogrupos se encuentran distribuidos, se pueden caracterizar los requerimientos climáticos y la distribución potencial de los mismos (Soberón y Nakamura 2009). El nicho ecológico es un concepto teórico que se utiliza frecuentemente en la conservación de recursos fitogenéticos. El concepto es aplicado por ejemplo en la identificación de la distribución natural de una especie para poder zonificar áreas genecológicas (e.g. Graudal et al. 1995; DFSC 2000) e identificar unidades de conservación *in situ* o para sitios de colecta con fines de conservación *ex situ* (e.g. Jarvis et al. 2005; Scheldeman et al. 2007). Existen varias definiciones de nicho ecológico, pero básicamente este concepto se refiere al espacio ambiental que una especie ocupa de forma natural (Begon et al. 1996, Pulliam 2000). La definición que generalmente es aceptada es la de Hutchinson (1957) que distinguió un nicho fundamental y un nicho realizado. El nicho fundamental es el rango de condiciones ambientales en el que una especie puede existir indefinidamente. Por otra parte, el nicho realizado es el espacio ambiental donde las especies existen en interacción con otros organismos (plantas, animales herbívoros, microorganismos, etc.). Este espacio es restringido por la suma de interacciones negativas (ej. competencia y depredación) que disminuyen la presencia de la especie, así como de las interacciones positivas (facilitación) que expanden el rango medioambiental en el que la especie puede establecerse. El Modelado Ecológico de Nicho (MNE; Peterson et al.1999) basado en datos climáticos es una herramienta de creciente evolución para la estimación del nicho fundamental (Peterson et al. 2011).

Estructura genética basada en secuencias de ADN de cloroplasto y microsatélites nucleares

El estudio de caracteres genéticos tanto de regiones no codificantes del ADN cloroplastidial como nuclear, son un buen complemento ya que son informativos de procesos ocurridos a distintas escalas temporales y espaciales (Avice 2000; Manel et al. 2003). Por un lado, la *filogeografía* que es el análisis de la distribución espacial de linajes de genes de una especie o complejo de especies, permite inferir los procesos históricos que determinaron dicha distribución (Avice 2000). Las genealogías o linajes de genes trazan las relaciones

evolutivas entre los haplotipos, y los métodos para construirlas se basan en la coalescencia, que es una herramienta matemática que permite reconstruir la genealogía hasta el punto en que los haplotipos "coalescen" en un haplotipo ancestral común (Avice 2000). La filogeografía, juega un rol clave en el estudio de los procesos históricos que determinan la distribución genética actual, combinando análisis genealógicos (información temporal) y geográficos (información espacial; Avice 2000; 2004; Manel et al. 2003). Las regiones no codificantes del genoma cloroplastidial son las portadoras fundamentales de señal histórica, ya que poseen una tasa de variación relativamente baja, aunque apropiada para estudios intraespecíficos (Shaw et al. 2005, 2007), su herencia es uniparental (generalmente matrilineal) y no presentan recombinación, siendo los marcadores cloroplastidiales los preponderantes y fundamentales en los estudios filogeográficos en plantas (Morris y Shaw 2018). Contrariamente, para analizar la estructuración genética debida a procesos contemporáneos más que históricos, los *microsatélites* (secuencias simples repetidas de ADN de 1 a 6 pares de bases que se repiten en tándem) son los adecuados, ya que poseen alto nivel de polimorfismo, alta tasa de mutación y herencia mendeliana codominante (Kalia et al. 2011). En los estudios de genética de poblaciones, la genotipificación por medio de microsatélites permite la identificación de cada alelo por locus, la obtención de datos poblacionales, y el cálculo de las frecuencias alélicas. De esta manera podemos estimar las distancias genéticas entre poblaciones o entre individuos (Bowcock et al. 1994, Ponsuksili et al. 1999) así como también analizar la estructura genética poblacional (Avice 1994; Chybicki y Burczyk 2008).

Caracterización citogenética

Finalmente, dentro de las aproximaciones genéticas, la *citogenética* brinda valiosos aportes para la resolución de problemas taxonómicos, evolutivos y aplicados, contribuyendo al conocimiento del origen y evolución de distintos grupos (Grant 1985; Poggio 2008). Asimismo, los estudios citogenéticos permiten realizar valiosos aportes al conocimiento de los mecanismos de aislamiento reproductivo, hibridización y modos de especiación en plantas. Los estudios cromosómicos son importantes para analizar la presencia de zonas híbridas con la finalidad de detectar la formación de nuevas subespecies por introgresión y conocer el impacto de la hibridación natural en la formación de complejos híbridos homoploides y/o poliploides (Grant 1985). El número de cromosomas y su homología, determinan en gran medida el comportamiento de los cromosomas homólogos en meiosis y el nivel de fertilidad de los híbridos y, por lo tanto, permite evaluar su éxito reproductivo y

el rol que cumplen los patrones de variación genéticos (Acosta y Premoli 2018). Con respecto al cariotipo, conocer sus características estructurales y cualitativas resulta importante en investigaciones taxonómicas y evolutivas ya que resulta de fundamental importancia para lograr una clasificación que refleje el proceso de evolución (Stace 2000; Poggio 1996; Poggio y Naranjo 2004; Acosta et al. 2005; Urdampilleta et al. 2005).

El género *Prosopis* y las especies focales de este estudio

Las especies del género *Prosopis* conforman un complejo integrado por especies taxonómicas adaptadas a distintas condiciones específicas del ambiente que se relacionan entre sí en múltiples puntos de contacto (Saidman 1986; Verga 1995). La alteración del ambiente que ocurre debido a la actividad humana, como la construcción de caminos, la agricultura, el riego y la explotación forestal (Anderson 1949, Grant 1981, Palacios et al. 1981) es una de las condiciones que favorecen el establecimiento de los híbridos (Grant 1981, Palacios et al. 1981; Shackleton et al. 2014). Por ejemplo, en algunos sitios donde las especies *P. chilensis* y *P. flexuosa* se encuentran en simpatria, luego de alguna perturbación (por ejemplo, desmontes) las formas intermedias empiezan a establecerse (Córdoba 2006). Esto se debería a que los nuevos genotipos podrían poseer vigor híbrido, o presentar nuevas características adaptativas inexistentes en las especies parentales (Donoso 1993; Zobel y Talbert 1994; Arnold 1997).

La particularidad del género *Prosopis* ($x=14$) es que todos los taxones estudiados hasta el presente son diploides ($2n=2x=28$) (Hunziker et al. 1975; Solbrig et al. 1977), a excepción de *P. juliflora* (SW) DC., que también presenta formas tetraploides ($2n=4x=56$) (Trenchard et al. 2008). En los estudios realizados hasta el presente en taxones diploides, el comportamiento cromosómico en la meiosis tanto en especies parentales como híbridas fue regular, formando 14 bivalentes. En ninguno de los casos, se reportaron cambios en el nivel de ploidía de los híbridos (Hunziker et al. 1975; Solbrig et al. 1977; Trenchard et al. 2008). Esta característica destaca la alta similitud genética y cromosómica entre las distintas especies del género, lo cual ha sido explicado en relación a un origen relativamente reciente del género (Bessegga et al. 2006; Catalano et al. 2008) que permitiría la existencia de híbridos viables, reforzando la idea de que algunas especies del género están evolutivamente activas, poniendo de manifiesto los problemas en el tratamiento taxonómico y la filogenia del grupo (Hunziker et al. 1975; Burkart 1976; Bessegga et al. 2006; Catalano et al. 2008). Sin embargo,

hasta el momento no se han llevado a cabo estudios cariotípicos detallados en el género, que permitan describir a las especies y analizar las características cromosómicas de los híbridos.

Prosopis alba, conocido comúnmente como “algarrobo blanco”, *Prosopis hassleri*, cuyos nombres comunes son “algarrobo paraguayo” y “algarrobo blanco” y *Prosopis fiebrigii* son las especies focales del presente estudio. Las tres especies pertenecen a la Sección Algarobia y son de las especies de algarrobo de mayor importancia. Las mismas son objeto de explotación con fines maderables debido a que poseen madera de excelente calidad; además, son utilizadas en sistemas productivos silvopastoriles, ya que constituyen un buen recurso forrajero (frutos dulces), proveen sombra para el ganado y se consocian adecuadamente con pasturas megatérmicas. Los frutos y sus derivados son también utilizados como alimento humano (Burkart 1976; Karlin et al. 1997; Pasiecznik 2001; Verga 2005). Por otra parte, estas especies son consideradas aptas para la recuperación de ecosistemas degradados debido a que, al ser leguminosas, fijan nitrógeno en simbiosis con bacterias del género *Rhizobium* (Acosta et al. 1994; Chavéz Díaz 2011).

Prosopis alba presenta una amplia distribución, creciendo en planicies subtropicales semiáridas de Argentina, Paraguay, Bolivia y Uruguay. *Prosopis hassleri* y *P. fiebrigii*, en cambio, poseen una distribución más restringida, hallándose sólo en la porción subhúmeda del Parque Chaqueño de Argentina y Paraguay. Estas especies ocupan en la Argentina sólo una franja de unos 90 km de ancho al sur del Río Pilcomayo en la Provincia de Formosa. El límite oeste de esta franja coincide con el ecotono entre el chaco semiárido y subhúmedo (Burkart 1976; Kees et al. 2011). Así, al sur de Paraguay y en la provincia de Formosa, *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii* se codistribuyen. En estas áreas de solapamiento, se ha observado la presencia de un posible híbrido con características morfológicas intermedias entre *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii* (Palacios 1981, Vega et al. 2012). En algunos casos se ha observado que este fenotipo intermedio forma poblaciones sin la presencia de las especies parentales putativas, principalmente en áreas perturbadas.

El presente trabajo está enfocado en analizar la zona de contacto entre las especies de algarrobo blanco *P. alba*- *P. hassleri*- *P. fiebrigii*, estudiando tanto zonas puras de cada una de las especies como así también cubriendo todo el rango geográfico compartido por ellas. Para ello, se utilizaron diferentes aproximaciones tales como el Modelado de Nicho Ecológico con el fin de identificar el área de distribución potencial y el óptimo climático de cada una de las especies/morfotipos; la delimitación morfológica de cada grupo, a través de la taxonomía numérica basado en caracteres foliares con el fin de clasificar los diferentes

morfotipos presentes; la caracterización genética y el estudio de la estructura genética a una escala más fina a partir de dos tipos de marcadores moleculares, como son las secuencias no codificantes de cloroplasto y los microsatélites nucleares; y por último estudios cariológicos detallados para las especies puras y el presunto híbrido.

Hipótesis

Las zonas de contacto entre especies de "algarrobos blancos", en particular la conformada por *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii* son áreas de alto flujo genético interespecífico, dando lugar a procesos de hibridación, sin cambios en el nivel de ploidía de los híbridos respecto de los parentales, y a sitios con alta variabilidad morfológica y genética.

La presencia de *P. alba*, *P. hassleri*, *P. fiebrigii* y de los morfotipos intermedios, varía en la zona de contacto de acuerdo a sus respectivos requerimientos climáticos.

Predicción

En las zonas donde individuos de las distintas especies se encuentran en simpatría se espera encontrar individuos con morfología intermedia, y más variabilidad morfológica y genética, respecto a localidades puras de cada especie.

Se espera que los individuos de morfología intermedia presenten características genéticas y citogenéticas intermedias o similares a *P. alba* y a *P. hassleri-P. fiebrigii*, y además que no presenten cambios de ploidía respecto a los parentales, confirmando el origen híbrido de los mismos.

Las especies parentales difieren en sus requerimientos climáticos y los sitios donde se localizan los morfotipos intermedios presentan condiciones climáticas intermedias respecto a las especies parentales.

Objetivo general

Caracterizar la zona de contacto entre los "algarrobos blancos" *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii* mediante el análisis de variables morfológicas, genéticas y requerimientos climáticos para poder inferir los mecanismos que podrían originar la diversidad morfológica y genética encontrada.

Objetivos específicos

1. Caracterizar morfológicamente a los individuos de cada especie y sus posibles híbridos, en diferentes zonas de contacto.
2. Caracterizar los requerimientos climáticos de las especies puras y los morfotipos intermedios.
3. Modelar la distribución potencial de cada especie focal, e identificar las zonas más probables de contacto entre las mismas.
4. Caracterizar genéticamente a los grupos morfológicos o morfotipos encontrados en las diferentes zonas de contacto.
5. Obtener datos cariológicos de las especies focales y de sus híbridos putativos.
6. Realizar un análisis integrado de la variabilidad morfológica, genética y citogenética e identificar y caracterizar los taxones/morfotipos encontrados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Area de estudio

El área de estudio abarca la totalidad de la Provincia de Formosa, Argentina y los departamentos Presidente Hayes y Boquerón de Paraguay. Toda la zona de estudio se encuentra comprendida dentro de dos regiones correspondientes al Gran Chaco Americano (Chaco subhúmedo y semiárido).

El Gran Chaco Americano es una unidad ambiental que se extiende desde latitudes definitivamente tropicales (18°S), hasta ambientes claramente subtropicales (31°S), abarcando desde los 57° Oeste hasta los 66° Oeste. Constituye una gran llanura de aproximadamente 1,14 millones de km² distribuidos en el centro norte de Argentina, oeste de Paraguay, sureste de Bolivia, y una pequeña parte del sur de Brasil (Pacheco Balanza et al. 2012; Spensley et al. 2013). Existen diversos criterios para clasificar este gran ecosistema, siendo el más aceptado aquel que lo define en función a tres sub-zonas: Chaco Sub-húmedo, con precipitaciones que van desde 1.200 a 700 mm; Chaco Semiárido, con 700 a 500 mm; y

Chaco Árido, con 500 a 300 mm. De este modo, el régimen pluvial es el principal factor para definir las regiones y las actividades productivas, marcando además un acentuado gradiente climático. Las temperaturas medias anuales oscilan entre 18 y 26°C, en tanto que la evapotranspiración potencial varía entre los 900 mm en el Sur y 1.600 mm en la frontera entre Paraguay y Bolivia. Las lluvias presentan una marcada concentración estival con ocurrencia de inviernos secos, con registros de precipitaciones durante el trimestre más seco del orden del 10-12% en el Chaco Húmedo, mientras que en el Chaco Seco y en el Árido, las mismas sólo alcanzan al 1-5% (Spensley et al. 2013).

Chaco Húmedo

Es una vasta planicie con pendiente general muy suave hacia el este que ha sido modelada por la acción de los mares y ríos. Se caracteriza por presentar un mosaico de franjas de tierras altas boscosas que alternan con zonas bajas de esteros y cañadas. Geomorfológicamente es un bloque hundido, relleno con sedimentos de los ríos Pilcomayo, Bermejo y Juramento. Es el diseño de un paisaje con albardones y amplias depresiones interfluviales. Dominan los procesos fluvio-morfológicos. La disolución de evaporitas (sulfatos y carbonatos) y el depósito de sedimentos, modelan las depresiones, mientras que la dinámica de meandros en llanuras muy planas y la fragmentación de albardones interconecta cauces antes autónomos en un proceso de transfluencias que modifica total o parcialmente la cobertura vegetal preexistente en unidades de paisaje que dejan de recibir aportes fluviales normales o la inversa (Morello et al. 2012).

El clima es subtropical cálido; las lluvias van de 750 a 1.300 mm anuales, lo que determina que esta subregión tenga una mayor diversidad biológica que el Chaco Semiárido. La acción modeladora de los ríos define dos áreas: en la zona norte y central el Chaco de Bosques y Cañadas, y en la zona sur los Bajos Submeridionales (Naumann, 2006).

Esta región chaqueña, se caracteriza por la presencia de bosques de *Schinopsis balansae* Engl. y *Aspidosperma quebracho blanco* Schltdl., que alcanzan hasta 25 metros de altura. El bosque tiene varios estratos, con valiosas especies, como *Calycophyllum multiflorum* Griseb. (palo blanco), *Cordia americana* (L.) Gottschling & J.S. Mill. (guayaibí), *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. (timbó colorado) *Gleditsia amorphoides* (Griseb.) Taub. (espina corona), *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos (lapacho rosado), etc., que se desarrollan en las áreas más elevadas, alternando con palmares puros de *Copernicia alba* Morong (palma caranday), y algarrobales de *P. nigra* (algarrobo

negro), *P. hassleri* (algarrobo paraguayo), *P. fiebrigii* (algarrobo paraguayo) espartillares y sabanas, que ocupan las áreas más bajas. En las márgenes de los ríos se presentan bosques dominados por aliso *Tessaria integrifolia* Ruiz & Pav. (palo bobo) o por *Salix humboldtiana* Willd. (sauce criollo) o por tala y selvas en galería (Naumann, 2006; Morello et al. 2012).

Chaco Semiárido

El Chaco Semiárido comprende Bolivia, la porción Occidental de Paraguay y en Argentina la mitad occidental de las provincias de Formosa y Chaco, la oriental de Salta, casi todo Santiago del Estero, norte, noreste y centro de Córdoba.

Es una vasta planicie interrumpida ocasionalmente por cursos de agua importantes y por serranías que presenta bosques adaptados a la sequía que van perdiendo porte y especies a medida que llegan al sur. El clima es continental, cálido subtropical, con áreas que presentan las máximas temperaturas absolutas del continente. Las precipitaciones varían entre los 500 y 700 mm anuales (Spensley et al. 2013). Las formaciones boscosas de esta zona, tienden a ser más homogéneas que en la zona este, son más bajas, presentan estructura más simple y el número de especies arbóreas es mucho menor. Dichas formaciones son las denominadas típicamente como quebrachales, por ser las especies arbóreas de mayor predominio *Schinopsis lorentzii* (Griseb.) Engl. (quebracho colorado santiagueño) y *Aspidosperma quebracho blanco* (quebracho blanco). En el estrato arbóreo predominan quebracho colorado santiagueño, quebracho blanco y *Bulnesia sarmientoi* (palo santo), a los que se agregan en menor cantidad *Sideroxylon obtusifolium* Roem. y Schult. (Guaraniná), *Caesalpinia paraguariensis* (D. Parodi) Burkart (guayacán), *Zizyphus mistol* Griseb. (mistol), *Prosopis kuntzei* Harms ex Kuntze (itín), *Cercidium praecox* (Ruiz & Pav. ex Hook.) Harms (brea), *Tabebuia nodosa* (Griseb.) Griseb (palo cruz), *Ceiba insignis* (Kunth) P.E. Gibbs & Semir. (palo borracho) y *Acanthosyris falcata* Griseb. (saucillo); 2) el estrato arbustivo: donde predomina *Ruprechtia triflora* Griseb. (guamí piré o cuero de vieja), diferentes especies de *Capparis* L., como *Capparis salicifolia* Griseb. (sacha sandía), *C. speciosa* Griseb. (sacha limón), *C. atamisquea* Kuntze (atamisqui), *Maytenus spinosa* (Griseb.) Lourteig & O'Donell (abre boca), *Acacia praecox* Griseb. (garabato), *Acacia furcatispina* Burkart. (teatín), *Celtis tala* Gill. ex Planch. (tala), entre otras, acompañadas de varias cactáceas como *Stetsonia coryne* (Salm-Dyck) Britton & Rose (cardón), *Opuntia elata* Link & Otto ex Salm-Dyck (tuna) (Sánchez y Bogado 2004).

Especies en estudio

1. Prosopis alba

Prosopis alba (Fig. 1), conocido comúnmente como “algarrobo blanco”, es un árbol de 5-15 m de altura con espinas escasas y pequeñas en las ramas, con una copa redondeada y extendida. Las hojas presentan un pecíolo de 0,5-8 cm de largo y pinnas de 6-14 cm de largo, con 25 a 50 pares de foliólulos por pinna, lineales rectos o levemente encorvados, agudos, subsésiles, de base asimétrica subcoriáceos, glabros 0,5-1,7 cm de largo y 1,2 mm de ancho separados por 1,5-6 mm. Las flores, dispuestas en racimos cilíndricos densifloros, amarillos de 7 a 11 cm de longitud, son hermafroditas, de color blanco verdosas a amarillentas, pequeñas, subsésiles. Los frutos poseen una longitud de 12 a 25 cm, por 11-20 mm de ancho y por 4-5 mm de grosor (Burkart 1976). Los segmentos o artejos en general no son evidentes en este fruto.

Prosopis alba tiene una amplia distribución, habita en la región Chaqueña oriental, creciendo, además, en otras planicies subtropicales semiáridas de Argentina (en las provincias de Formosa, Chaco, Salta, Jujuy, Santiago del Estero, Catamarca, Córdoba, Entre Ríos, Santa Fé), Paraguay y Bolivia. También se la puede encontrar en Uruguay (Burkart 1976).



Figura 1. *P. alba*. A) Ejemplar típico de la especie en la Provincia de Formosa fotografiado durante el muestreo realizado en junio de 2012. B) Muestras de hojas. C) Muestras de Frutos.

2. *Prosopis hassleri*

P. hassleri (Fig. 2), cuyos nombres comunes son “algarrobo paraguayo”, “algarrobo blanco”, “algarrobo del chaco”, es un árbol de 6 a 10 m. de alto, inerme o con pocas espinas y solitarias, axilares, a veces geminadas, blancas a rojizas, flexuoso. Las hojas son similares a *P. vinalillo* Stuck., uniyugadas, ocasionalmente algunas con dos yugas. Con pecíolo de 1,2–4 cm de largo, y pinnas de 5–19 cm de largo, los foliólulos dispuestos en 6–26 pares por pinna, opuestos, oblongos u ovados, obtusos, subcoriáceos, perinervados, rojizos cuando están secos, de 0,8–4 cm de largo por 1,8–7 mm de ancho. Las flores se disponen en racimos de 6–12 cm de largo, el pedúnculo mide 1 cm, pedicelos de 0,5–0,8 mm de largo, glabros o pubescentes, pétalos y ovario blancos. El fruto es una legumbre amarillo pajoso, subfalcado, compreso con suturas paralelas en la parte dorsal, estipitado y acuminado, de 14–24 cm de largo por 1,2–1,5 cm de ancho, con 24–33 segmentos, rectangulares, mesocarpo pulposo, y dulce (Burkart 1976).

La especie, posee una distribución más restringida que *P. alba*, hallándose sólo en la porción subhúmeda del Parque chaqueño de Argentina y Paraguay. Esta especie ocupa en la Argentina sólo una franja de unos 90 km de ancho al sur del Río Pilcomayo en la Provincia de Formosa. El límite oeste de esta franja coincide con el ecotono entre el chaco semiárido

y subhúmedo (Burkart 1976; Kees et al. 2011). Es un integrante de las sabanas y palmares de *Copernicia alba*, donde suele formar bosques mixtos con *P. alba*, *P. nigra*, o formar rodales puros como colonizador.



Figura 2. *P. hassleri*. A) Ejemplar típico de la especie en Laguna Blanca, Formosa, fotografiado durante el muestreo realizado en el mes de abril de 2015. B) Muestras de hojas. C) Muestras de frutos.

3- *Prosopis fiebrigii*

P. fiebrigii (Fig. 3), cuyos nombres comunes también son “algarrobo blanco” o “algarrobo paraguayo”, ya que comparten el mismo ambiente que *P. hassleri*, presentan una altura que va de los 4 a los 15 metros. Es un árbol aparentemente inerme, pero a veces con espinas pequeñas, solitarias o geminadas de 0,2-1 cm de largo. Presentan hojas grandes, con 2 a 9 pares de foliólulos por pinna, foliólulos opuestos, coriáceos, ovalados, lanceolados, 2,5-6,5 cm de largo y 0,6-3 cm de ancho, el pecíolo mide 0,5-5 cm, el largo de pinnas varía entre 6-17 cm. Las inflorescencias presentan numerosas flores pequeñas, de cáliz de 1 mm, corola de 4,5-5 mm blanco-amarillenta, con pétalos casi libres, lineales, verdosas, glabras pero vellosas dentro del ápice. El fruto es una legumbre recta, larga y delgada, acuminada y estipitada de 14-29 cm de largo, 1,1-1,8 cm de ancho, comprimido y de color amarillo paja cuando está maduro; los márgenes de los artejos casi rectos, paralelos (Burkart 1976).

Su distribución es similar a la de *P. hassleri*, prefiere suelos arcillosos, con pastizales y palmares con inundaciones periódicas. Se encuentra en Paraguay, en la región húmeda del Chaco y en Argentina, en una franja estrecha en la Provincia de Formosa (Burkart 1976).

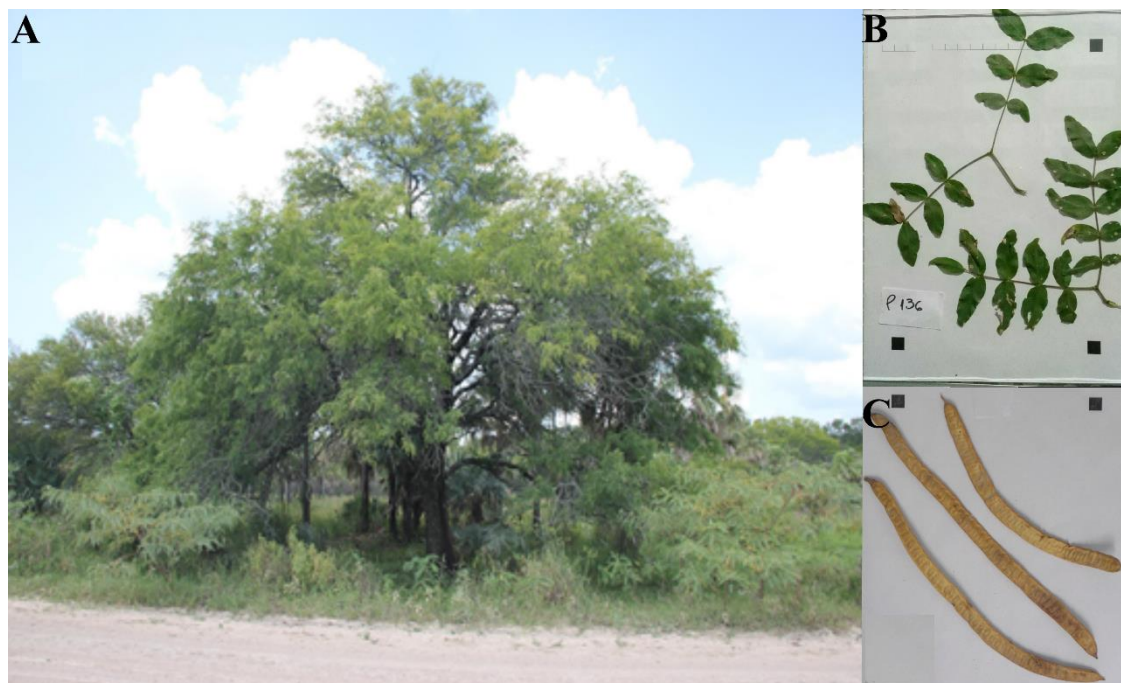


Figura 3. *P. fiebrigii*. A) Ejemplar típico de la especie en el departamento Presidente Hayes fotografiado durante el muestreo realizado en Paraguay en diciembre de 2018. B) Muestras de hojas. C) Muestras de frutos.

En la tabla 1 se resumen los principales caracteres morfológicos que diferencian a las especies en estudio según la clasificación taxonómica realizada por Burkart (1976).

Tabla 1. Resumen de los principales caracteres de hoja que diferencian a las especies en estudio. Ancho del foliólulo (AFOL), longitud del foliólulo (LFOL), longitud del pecíolo (LPE), longitud de la pinna (LPI), número de pares de foliolulos (NFOL).

Especie	LPE (cm)	LPI (cm)	NFOL (pares)	LFOL (cm)	AFOL (cm)
<i>P. alba</i>	0,5-8	6-14	25-50	0,5-1,7	0,12
<i>P. fiebrigii</i>	0,5-5	6-17	2-9	2,5-6,5	0,60-3,00
<i>P. hassleri</i>	1,2-4	5-19	6-26	0,8-4,0	0,18-0,70

Muestreo de poblaciones naturales

Durante los años 2012-2018 se realizaron cinco viajes que permitieron muestrear 30 localidades en la Provincia de Formosa y 25 en Paraguay, completando un total de 421

individuos (Fig. 4 y Tabla S1) pertenecientes a las especies de *P. alba*, *P. hassleri*, y *P. fiebrigii* y a individuos con morfología intermedia entre *P. alba* y *P. hassleri* (de aquí en adelante todos serán nombrados como morfotipos). El muestreo realizado abarcó casi toda el área de distribución de *P. hassleri* y *P. fiebrigii*, la porción más septentrional del área de distribución de *P. alba* y toda la zona de contacto entre las especies. Entre los sitios muestreados se incluyeron poblaciones naturales correspondientes a localidades puras de *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii* en alopatría, localidades donde las especies se encontraban en simpatría y zonas de contacto, donde no solo se encontraron a las especies puras de *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii*, sino además morfotipos intermedios. Además, se muestrearon cuatro zonas donde se detectó sólo la presencia de los morfotipos intermedios, sin la presencia de los parentales. Una de ellas localizada hacia el oeste, otra en el centro y una hacia el este de Formosa, y la otra en Paraguay.

La polinización en *Prosopis* está mediada por insectos (Genisse et al. 1990). En *P. alba* la distancia promedio de dispersión del polen se estimó entre 5,36 y 30,92 m (Bessega et al. 2012). Es por ello que, en cada una de las localidades, se muestrearon entre 7-10 árboles separados al menos por 100 m, incluyendo todos los morfotipos presentes en dicho punto. Cada árbol muestreado fue georreferenciado, y del mismo se tomaron las muestras de hojas y frutos apropiadas para los análisis morfológicos y genéticos. La determinación taxonómica de las muestras fue realizada en base a la clave taxonómica de *Prosopis* (Burkart 1976) y con el asesoramiento del Dr. Aníbal Verga del Instituto Nacional de Tecnologías Agropecuarias (INTA). Los ejemplares de herbario fueron depositados en el herbario de la Facultad de Ciencias Agrarias dentro de la Colección Algarrobo perteneciente al Banco Nacional de Germoplasma de *Prosopis* (BNGP).

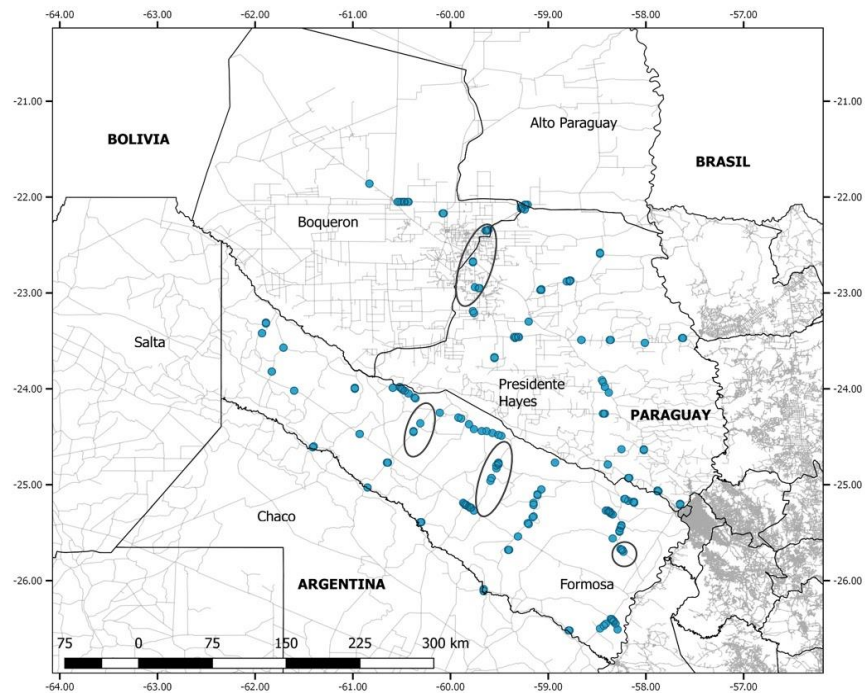


Figura 4. Totalidad de los árboles muestreados en la Provincia de Formosa, Argentina, y en los Departamentos Boquerón y Presidente Hayes de Paraguay, pertenecientes a los grupos morfológicos *P. alba*, *P. hassleri*, *P. fiebrigii* y *P. alba x P. hassleri*. Cada punto corresponde a un árbol individual. Las elipses indican los sitios correspondientes a los morfotipos intermedios sin la presencia de sus parentales.

2.1- Caracterización morfológica

2.1.1. Medidas morfométricas

En cada localidad muestreada, y de cada uno de los 7-10 árboles estudiados, se tomaron muestras de 5 hojas totalmente expandidas obtenidas de diferentes partes de la copa y se confeccionaron ejemplares de herbarios. A partir de estos ejemplares de herbario escaneados se realizaron las mediciones de 10 caracteres cuantitativos de hoja (Fig. 6) para el análisis de la variación morfológica a través de taxonomía numérica. Los caracteres medidos fueron: longitud del pecíolo (LPE), número de pares de pinas (NPE), longitud de pinnas (LPI), número de pares de foliólulos por pinna (NFOL), longitud del foliólulo (LFOL), ancho del foliólulo (AFOL), área del foliólulo (ARFOL), relación longitud/ ancho del foliólulo (LAFOL), relación área del ápice del foliólulo/área del rectángulo que contiene al ápice (APREC), relación área del ápice del foliólulo/área total del foliólulo (APTOT) (Fig. 5). Las medidas se tomaron mediante el programa Hoja 3.4 (Verga 2015).

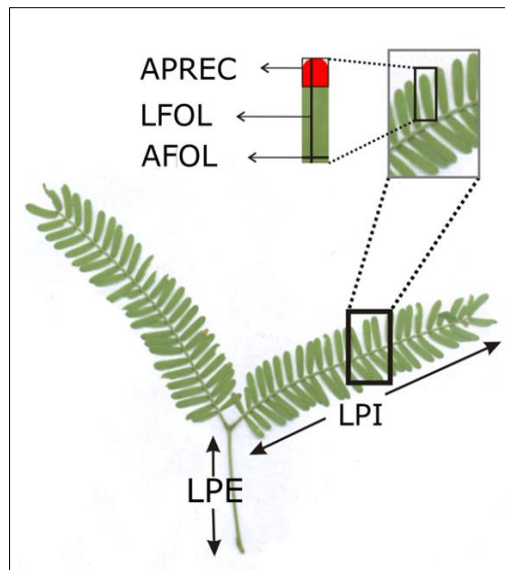


Figura 5. Caracteres morfológicos de hojas: ancho del foliólulo (AFOL), relación área del ápice del foliólulo/área del rectángulo que contiene al ápice (APREC), longitud del foliólulo (LFOL), longitud del pecíolo (LPE), longitud de la pinna (LPI) (Tomado de Vega et al. 2020).

2.1.2. Análisis de los datos morfológicos

Para el análisis morfológico se confeccionó una matriz inicial con las medias por individuo para los diferentes morfotipos. La matriz fue normalizada y a partir de ella se realizaron los análisis.

Posteriormente, se realizó un análisis exploratorio a través de un análisis de componentes principales (ACP), a partir de una matriz de correlación de las variables medidas y con el fin de poder visualizar la variabilidad morfológica se construyó un gráfico Biplot, y así poder explorar el ordenamiento de los individuos según su caracterización morfológica y la estructura de correlación de las variables morfológicas medidas. Al observar que en los individuos con morfotipos intermedios clasificados como *P. alba x P. hassleri* no conformaban un grupo homogéneo (ver resultados) ya que algunos individuos eran más parecidos a una u otra especie parental, se volvió a acudir a la taxonomía clásica y se los reclasificó en morfotipo intermedio *P. alba* y morfotipo intermedio *P. hassleri*.

La bondad de los agrupamientos predichos en el paso previo, se analizó mediante un Análisis Discriminante. Este análisis permite encontrar una o más combinaciones lineales de variables observables que maximicen las diferencias entre grupos determinados *a priori*. Estas funciones discriminantes permiten representar a los individuos en un espacio de menores dimensiones que maximice la variación entre los grupos (espacio canónico) y,

además, permite obtener una tabla de clasificación cruzada de los individuos de acuerdo a los grupos establecidos *a priori*. Una tasa de error cercana a 0%, es indicativo de que hay una diferenciación significativa entre los grupos establecidos *a priori*. Además, se realizó un análisis de la varianza multivariado (MANOVA) y análisis univariados para cada variable (ANOVA) entre los grupos morfológicos para poder determinar si son significativamente diferentes entre ellos. Se realizaron comparaciones de a pares *a posteriori* de ambos análisis (Hotelling y Tukey). Todos estos análisis se realizaron utilizando el programa InfoStat (Di Rienzo et al. 2017).

Por otro lado, para ilustrar mejor las características morfológicas de los grupos formados, se establecieron “Árboles Tipo”, incluyendo en la construcción de una nueva matriz de distancias euclídeas un individuo “virtual” por cada grupo, cuyos valores para cada carácter fueron iguales a los valores medios para cada grupo en cuestión. Una vez obtenida la matriz de distancias, se identificó un individuo por grupo (“árbol tipo” del grupo), utilizando como criterio de selección la menor distancia euclídea con el individuo “virtual” del grupo. Estos árboles se consideraron como los representativos de cada grupo.

Para poder caracterizar la distribución espacial de los morfotipos en el área de estudio se elaboró un mapa con el programa QGIS, donde se representaron a todos los individuos muestreados diferenciándolos por morfotipo, según la caracterización morfológica realizada anteriormente.

Finalmente, para poder visualizar el patrón espacial de variabilidad morfológica se construyó un mapa sintético mediante la interpolación de los valores de eje principal del ACP morfológico (PC1m). Para realizar la interpolación se utilizó el inverso de la distancia en grado 4 utilizando el programa QGIS 3.8 (QGIS Development Team 2018).

2.2. Modelado de nicho y requerimientos climáticos de cada morfotipo

2.2.1. Aspectos comunes al modelado de nicho de las especies focales

Para identificar el área de distribución potencial y el óptimo climático de *P. alba*, *P. hassleri*, *P. fiebrigii* se realizó un modelado de nicho ecológico (MNE) especie-específico. Para cada especie estudiada se compilaron puntos de presencia georreferenciados, utilizando información de muestreos propios o del grupo de trabajo. Los registros se depuraron a través de la eliminación de localidades repetidas y a través de la desagregación de puntos para evitar sesgos en los modelos. Así el conjunto final de datos georreferenciados para cada especie abarca toda su área de distribución, eliminando puntos en áreas de muestreo excesivo

(distancia mínima entre puntos de 30 km aproximadamente). Para *P. alba* se obtuvieron un total de 520 puntos georreferenciados (Fig. 6A) a partir de muestreos propios y de datos de muestreos concedidos por investigadores de otros grupos de trabajo (IMBIV, FCA-UNL), distribuidos en Argentina (en las provincias de Formosa, Chaco, Santiago del Estero, Salta, Jujuy, Santa Fé y Entre Ríos), Paraguay y Bolivia. A partir de este conjunto de datos se seleccionaron un total de 147 puntos para calibración y 100 puntos para validar los modelos. Para *P. hassleri* se obtuvieron un total de 140 puntos de presencia (Fig. 6B) provenientes de muestreos propios y de la base de datos del grupo de trabajo en toda su área de distribución en la provincia de Formosa (Argentina) y en Paraguay. A partir de este conjunto de datos, y debido a que la distribución de la especie está restringida al Chaco húmedo se seleccionaron un total de 27 puntos para calibrar el modelo y 27 para validarlo. Para *P. fiebrigii* se obtuvieron un total de 98 puntos (Fig.6C) localizados en la provincia de Formosa (Argentina) y en Paraguay. A partir de este conjunto de datos y debido a que la distribución de la especie, al igual que *P. hassleri*, está restringida al Chaco húmedo se seleccionaron un total de 24 puntos para calibración y 24 puntos para validar los modelos. Así, en el caso de *P. alba* se utilizó el 28 % de los puntos de presencia para la calibración y el 19 % para la validación de los modelos. En el caso de *P. hassleri* y *P. fiebrigii* se utilizó el 20 y 25 %, respectivamente, de los puntos de presencia para calibración y el mismo porcentaje para la validación de los modelos.

Los datos climáticos se obtuvieron de la base de datos mundial CHELSA (Climatologies at high resolution for the earth's land surface areas; <http://chelsa-climate.org/>) los cuales son generados a partir de la interpolación de datos climáticos globales con registros que abarcan desde el año 1979 al año 2013 con una resolución de 1 km (Karger et al. 2017), generando 19 variables bioclimáticas relacionadas a temperatura y precipitación. Esta base de datos está siendo más recomendada que WorldClim ya que el período temporal hasta el cual se extiende es más actual, las capas climáticas son de alta resolución y además se añade el efecto de la elevación.

Para determinar el área *M* de movilidad de cada especie, de acuerdo al diagrama BAM (Soberón y Peterson 2005), se trazó un polígono que abarcó todos los puntos de distribución registrados para la especie respectiva y un área buffer de aproximadamente 300 km. Para ello, se utilizaron las ecorregiones terrestres del mundo reportadas en Olson et al. (2004). Se escogieron aquellas que coincidían con la ubicación de los sitios de colecta para cada especie, evitando ecorregiones que, aunque similares, no tuvieran registros (Fig. 6 A-C). De las 19 capas bioclimáticas (temperatura media anual (BIO 1), rango diurno medio

(Media mensual (temperatura máxima - temperatura mínima)) (BIO 2), isothermalidad (BIO 3), que es la relación entre rango diario medio (promedio mensual (temperatura máxima-temperatura mínima) y el rango anual de temperatura (que es la relación entre la temperatura máxima del mes más cálido y la temperatura mínima del mes más frío), estacionalidad de la temperatura (desviación estándar * 100) (BIO 4), temperatura máxima del mes más cálido (BIO 5), temperatura mínima del mes más frío (BIO 6), rango anual de temperatura (BIO5-BIO6) (BIO 7), temperatura media del trimestre más húmedo (BIO 8), temperatura media del trimestre más seco (BIO 9), temperatura media del trimestre más cálido (BIO 10), temperatura media del trimestre más frío (BIO 11), precipitación anual (BIO 12), precipitación del mes más húmedo (BIO 13), precipitación del mes más seco (BIO 14), estacionalidad de la precipitación (coeficiente de variación) (BIO 15), precipitación del trimestre más húmedo (BIO 16), precipitación del trimestre más seco (BIO 17), precipitación del trimestre más cálido (BIO 18) y precipitación del trimestre más frío (BIO 19)) se eliminaron aquellas que estaban altamente correlacionadas (r de Pearson $> 0,80$) y que presentaban una ganancia menor, visualizada en la importancia de permutación y en la prueba de Jackknife implementada en el programa Maxent (Phillips et al. 2006).

Una vez definida el área M y las variables bioclimáticas seleccionadas para cada especie, se utilizó el programa Wallace (Kass et al. 2017), una plataforma modular basada en R para el modelado reproducible de nichos y distribuciones de especies, el cual utiliza la librería ENMeval (Muscarella et al. 2017). Esta plataforma permite probar diferentes combinaciones de parámetros que tienen que ver con el tipo de transformaciones aplicadas a las covarianzas que se modelan entre variables (llamadas “features classes” o tipo de transformación, TTr de aquí en adelante) y al coeficiente de regularización, que es un parámetro que penaliza al modelo para evitar la sobre parametrización y el sobreajuste; así es posible seleccionar los mejores modelos para cada especie (en cada caso se seleccionaron los mejores tres modelos) en base a los valores más bajos del criterio de información de Akaike corregido (AICc) y al número de parámetros. Una vez definidos los parámetros óptimos de los distintos modelos, se realizaron los modelados de nicho ecológico (MNE) finales de cada especie en el programa Maxent 3.4.1, que utiliza el algoritmo de máxima entropía (Phillips et al. 2006). Con todos los parámetros elegidos (variables seleccionadas, puntos de calibración y complejidad óptima) se corrieron 10 réplicas de dichos modelos con un inicio aleatorio (random seed) y validación cruzada. Se obtuvieron mapas binarios (*i.e.* presencia/ausencia) y de probabilidad de todos los modelos utilizando como valor de umbral el valor de idoneidad climática (*i.e.* probabilidad) más bajo reportado para los puntos de

presencia de cada especie. Para este método, y para la construcción de los otros mapas y figuras se utilizó Quantum GIS 2.18 (QGIS Development Team, <http://www.qgis.org/>) e Inkscape 0.91 (Proyecto Inkscape, <https://inkscape.org/>).

Por último, los modelos seleccionados se validaron con las herramientas provistas en Niche ToolBox (Osorio-Olvera et al. 2016) utilizando el valor de ROC parcial (Peterson et al. 2008), una prueba binomial (Anderson, Gómez-Laverde y Peterson 2002), Kappa, TSS, error de omisión (falso negativo de Fielding y Bell 1997) y comisión.

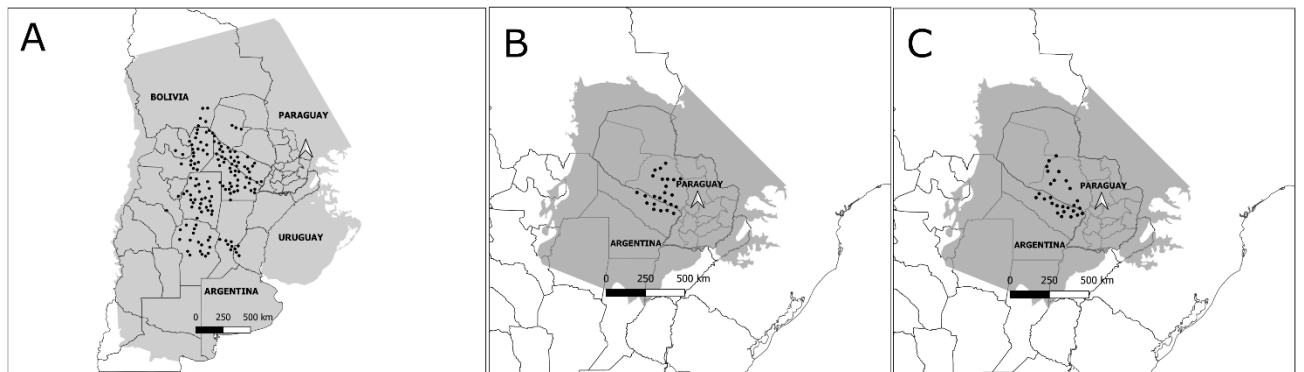


Figura 6. qPuntos de presencia utilizados para la calibración del modelo y área M (área gris) para cada especie. A) *P. alba*; B) *P. fiebrigii* y C) *P. hassleri*

2.2.2 Solapamiento de Nichos

En primer lugar, se analizó el comportamiento de las variables climáticas que mayor contribución mostraron en los modelados de nicho ecológico para cada una de las especies. Para esto se realizaron gráficos de densidad utilizando la librería *ggplot2* (Wickham 2016). Los datos de entrada son los puntos de presencia para cada especie y los valores de las variables climáticas (Chelsa) para cada uno de esos puntos. En este análisis además de incluir las especies puras se incluyeron los morfotipos intermedios. Se agregaron la latitud y longitud para comparar la extensión de la distribución espacial de los diferentes morfotipos. Posteriormente, la superposición de nichos se calculó utilizando la métrica D (Schoener 1970; revisado en Broennimann et al. 2012). Esta métrica compara la ocupación de dos especies en base a la abundancia relativa de cada especie en cada sitio (*i.e.* celda o pixel de resolución 2,5 arc min). Los sitios se encuentran caracterizados por las condiciones ambientales. La métrica D varía entre 0 (sin superposición de nicho) y 1 (superposición completa de nicho).

Además del cálculo de D, se realizaron pruebas de equivalencia (Graham et al. 2004) y similitud (Peterson et al. 1999) de nicho para cada par de especies, a partir de las pruebas

estadísticas de conservadurismo de nicho desarrollados por Warren et al. (2008) y Broennimann et al. (2012). Bajo ese enfoque la conservación de nicho es un continuo que va desde nichos idénticos (equivalentes) a nichos más similares que lo esperado por azar (Warren et al. 2008).

La prueba de equivalencia del nicho trabaja bajo la hipótesis nula de que “los modelados de nicho ambiental producidos por dos especies son idénticos”, suponiendo que dichas especies son intercambiables en su uso del espacio del nicho, y si se combinaran sus datos para construir nuevos modelados de nicho ambientales, estos serían equivalentes. En efecto esta prueba consiste en que, para un par de especies, con un determinado número de sitios georreferenciados para cada una, se construye un grupo de datos con los sitios de ambas, y mediante la asignación aleatoria de estos sitios se genera una nueva matriz para cada especie (pseudo réplica), se modelan las pseudo distribuciones y se mide el parámetro D. Este procedimiento se realiza 1000 veces y permite obtener un histograma de frecuencia de valores de D obtenidos bajo la hipótesis nula de que los nichos son equivalentes. Si el valor observado de D está incluido dentro del 95% de los valores simulados entonces la hipótesis nula de equivalencia no puede ser rechazada (Warren et al. 2008; Broennimann et al. 2012). Por su parte, la prueba de similitud del nicho examina si el solapamiento observado entre el nicho de dos especies es diferente respecto al solapamiento entre el nicho de una de las especies y nichos modelados a partir de datos de distribución muestreados aleatoriamente en el rango de distribución de la otra especie. Dicho de otro modo, la prueba de similitud evalúa si el modelado de nicho ambiental de una especie predice el nicho de la otra especie mejor de lo esperado por azar (Broennimann et al. 2012). Para esta prueba a partir de los puntos de ocurrencia de una de las especies se construyeron matrices de menor tamaño y de puntos elegidos al azar, y se calculó la superposición entre el nicho simulado con el nicho observado de la otra especie. Esto se repitió 1000 veces. Si el solapamiento observado es mayor que el 95% simulado, se rechaza la hipótesis nula de nichos diferentes. Se usó la librería *ecospat* (Broennimann et al. 2020) para calcular la superposición de nicho y realizar las pruebas de equivalencia y similitud. Se utilizaron como datos de entrada los puntos de presencia de cada especie, puntos aleatorios de fondo (“background”), área M (una común para las tres especies) y capas climáticas de interés (Chelsa), en este caso las que resultaron más importantes en el modelado de nicho ecológico de las 3 especies (BIOS 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 18 y 19).

2.2.3 Ordenamiento de los grupos morfológicos en el espacio climático

Finalmente, para analizar la localización de los individuos muestreados de cada morfotipo en el espacio climático, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) utilizando las variables climáticas que resultaron más importantes en el modelado de nicho de las 3 especies (variables bioclimáticas: isothermalidad (BIO3), que es la relación entre rango diurno medio (promedio mensual (temperatura máxima-temperatura mínima) y el rango anual de temperatura (que es la relación entre la temperatura máxima del mes más cálido y la temperatura mínima del mes más frío), estacionalidad de temperatura (BIO4), temperatura máxima del mes más cálido (BIO5), temperatura mínima del mes más frío (BIO 6), temperatura media del trimestre más seco (bio 8), temperatura media del trimestre más cálido (BIO 10), temperatura media del trimestre más húmedo (BIO 13), precipitación del mes más seco (BIO 14), estacionalidad de precipitación (BIO 15), precipitación del trimestre más cálido (BIO 18), precipitación del trimestre más frío (BIO 19). El ordenamiento de los 421 individuos muestreados se visualizó mediante un gráfico Biplot.

2.3- Caracterización molecular

2.3.1. Estracción de ADN

Se extrajo ADN a partir de hojas jóvenes utilizando el kit Genomic DNA Purification from Plant (NúcleoSpin Plant II). La calidad y concentración del ADN se verificó a través de geles de agarosa al 1,5 % y espectrofotometría en relación al grado de absorbancia (A260nm/A280nm) utilizando el equipo NanoDropR ND-1000 Technologies Inc. El ADN se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

2.3.2. Secuencias de ADN de cloroplasto

Los análisis fueron realizados sobre un total de 91 individuos pertenecientes a los diferentes morfotipos (27 de *P. alba*, 11 del Morfotipo intermedio *P. alba*, 9 del Morfotipo intermedio *P. hassleri*, 20 de *P. hassleri* y 24 de *P. fiebrigii*) provenientes de la Provincia de Formosa, Argentina, y los departamentos Boquerón y Presidente Hayes de Paraguay (Tabla S1). Se amplificó la región no codificante *ndhF-rplL32* de la región de copia única pequeña (SSC, small single copy) del genoma cloroplastidial (cpADN) con los cebadores *ndhF* (5'-GAAAGGTATKATCCAYGMATATT-3') y *rplL32R* (5'-

CCAATATCCCTTYYYTTTTCCAA-3') (Shaw 2007), ya que estudios preliminares mostraron a este marcador como el más variable entre varios analizados (Cosacov et al. 2014, 2015). Para llevar a cabo las amplificaciones se trabajó con un volumen final de 30 µl con la siguiente composición de reactivos: 1µl de ADN, 6 µl de buffer Gotaq (Promega), 1,2 µl de cada cebador, 0,6 µl de dNTP, 0,15 µl de Gotaq y 18,44 µl de agua. Se utilizó un termociclador Eppendorf Mastercycler *ep gradient S* con el siguiente programa de amplificación: desnaturalización a 80°C por 5 minutos seguidos de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, hibridación del cebador a 48 °C por 1 minuto, seguido de una rampa de 0,3 °C por segundo hasta 65°C, luego extensión del cebador a 65°C por 4 minutos y por último una extensión final por 5 minutos a 65°C (Shaw, 2007). La eficacia de la PCR fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % y los fragmentos amplificados fueron enviados a secuenciar por la empresa Macrogen Inc®.

Los electroferogramas fueron visualizados y editados utilizando el programa ChromasPro 1.7.7 y las secuencias fueron alineadas con BioEdit (Hall 1999) y ajustadas a mano. Cada sitio variable fue verificado para minimizar los errores en el alineamiento. Además, algunas inserciones/deleciones fueron codificados como caracteres binarios utilizando el método de codificación simple de Simmons y Ochoterena (2000).

Los siguientes análisis se realizaron: 1) en el conjunto de los individuos estudiados de *P. alba*, *P. hassleri*, *P. fiebrigii* y morfotipos intermedios y 2) considerando sólo a *P. hassleri* y *P. fiebrigii*.

2.3.2.1 Genealogía y distribución geográfica de haplotipos

Los haplotipos fueron determinados mediante el programa DNAsp 5 (Rozas et al. 2003) y las relaciones genealógicas entre ellos se reconstruyeron mediante el algoritmo Median-Joining (Bandelt et al. 1999) con el programa Network 5.1. Luego, la configuración de haplotipos obtenidos se superpuso en un mapa de la región con el programa QGIS 3.8 a fin de representar su distribución geográfica.

2.3.2.2 Estructuración poblacional y diversidad genética

Se realizó un análisis espacial de la varianza molecular (SAMOVA) con el programa SAMOVA 1.0 (Dupanloup et al. 2002) para determinar las poblaciones genéticas. Este análisis considera la geolocalización y la información genética de cada individuo y genera

“k” número de grupos de tal modo de maximizar la componente intergrupala de la varianza y minimizar la componente intragrupo. Los análisis se corrieron para valores de k de 2 hasta 10.

Para cada grupo genético derivado del mejor agrupamiento determinado por el SAMOVA se estimaron los siguientes parámetros de diversidad genética: número de haplotipos, número de sitios polimórficos (S), diversidad haplotídica (h), diversidad nucleotídica (π) y promedio de diferencias pareadas (p) mediante el programa DNAsp.

Finalmente, para analizar si los morfotipos se diferenciaron significativamente en el tipo y frecuencia de haplotipos de cloroplasto, se realizaron sendos análisis de la varianza molecular (AMOVA) considerando todos los morfotipos y entre pares de morfotipos. Estos análisis fueron realizados con el programa Arlequin 3.11.

2.3.2.3 Análisis demográficos de los filogrupos de la red del complejo

Para inferir los procesos demográficos históricos se utilizaron las pruebas de neutralidad F_s de Fu (Fu 1997) y D de Tajima (Tajima 1989). Estos índices se calcularon para la especie y para los respectivos grupos genéticos obtenidos (ver resultados SAMOVA). Ambos estadísticos asumen que las poblaciones han estado en equilibrio entre mutación y deriva genética durante largos períodos. Cuando esto no sucede debido a una expansión o una retracción demográfica reciente, estos índices suelen adquirir valores negativos o positivos distintos de cero. La significancia de cada análisis fue determinada usando 10.000 réplicas bajo un modelo de coalescencia estándar.

Además, se calculó la distribución de frecuencias de las diferencias pareadas entre haplotipos (Rogers y Harpending 1992). Las distribuciones obtenidas se compararon con una distribución teórica esperada bajo un modelo de expansión demográfica súbita. Una distribución unimodal de la frecuencia de las diferencias entre pares de secuencias es típica de una población que ha sufrido una expansión demográfica reciente, mientras que una distribución multimodal es característica de poblaciones que han permanecido en equilibrio demográfico y una distribución bimodal es representativa de poblaciones que han sufrido una retracción demográfica (Rogers y Harpending 1992). El ajuste entre la distribución esperada, bajo la hipótesis nula de expansión demográfica, y la distribución observada, fue evaluado con las sumas de los desvíos al cuadrado (SSD) utilizando un re-muestreo no paramétrico de 1.000 réplicas. Las pruebas de neutralidad y el análisis de distribución de

frecuencias de las diferencias pareadas fueron efectuados en los programas Arlequin 3.11 (Excoffier y Lischer 2010) y DNAsp.

Por último, para estimar la variación del tamaño poblacional efectivo en el tiempo, se realizó el análisis bayesiano “Bayesian Skyline Plot” (BSP) implementado en el programa BEAST. Este análisis estima la dinámica poblacional en el tiempo sin depender de un modelo paramétrico previamente especificado y considera la incertidumbre asociada a la reconstrucción filogenética y al proceso estocástico de coalescencia (Drummond et al., 2005). Para ello se realizó un BSP para cada uno de los grupos bajo el modelo de sustitución nucleotídica seleccionado con el programa JModelTest 2.1.9 (Darriba et al. 2012). En ambos casos se utilizó el modelo HKY, y un reloj molecular estricto con una tasa de mutación con distribución uniforme (0,001-0,01 sustituciones por sitio por millón de años), la que abarca las tasas de mutación reportadas para regiones no codificantes de ADN de cloroplasto a nivel intraespecífico en diversas especies de Angiospermas (Alsos et al. 2005). El número de grupos fue fijado en 10 con un modelo “piecewise” constante con un valor inicial del parámetro “popsize” de 200 y con un mínimo de 5 y un máximo 1.000. Se realizaron dos corridas de 10 millones de iteraciones de la Cadena de Markov-Monte Carlo (MCMC) iniciando con un árbol al azar con parámetros muestreados cada 1.000 pasos para obtener un total de 10.000 árboles. La convergencia del análisis, la estacionalidad de los parámetros estimados y los valores óptimos del tamaño muestral efectivo ($ESS > 200$) fueron verificadas utilizando el programa Tracer 1.6 (Rambaut et al. 2014). Luego de descartar el 10% inicial de las corridas (burn-in), fueron combinados y se obtuvo el perfil demográfico estimado con el último programa mencionado.

2.3.3 Microsatélites

Se caracterizaron los niveles de variación y diferenciación genética dentro y entre los grupos morfológicos obtenidos después de la asignación morfológica. Para ello, se seleccionaron 74 individuos (Tabla S1) pertenecientes a los diferentes morfotipos distribuidos en la Provincia de Formosa (15 de *P. alba*, 10 del Morfotipo intermedio *P. alba*, 11 del Morfotipo intermedio *P. hassleri*, 14 de *P. hassleri* y 24 de *P. fiebrigii*). Además, se incorporó un sexto grupo morfológico como grupo externo de referencia, perteneciente a una población pura de *P. alba* de Isla Cuba que se encuentra ubicada en el suroeste de la Provincia de Formosa. Los datos de esta población fueron tomados de un estudio previo (López Lauenstein, 2019).

2.3.3.1 Amplificación de los SSRs

Para el análisis molecular de las muestras se utilizaron 2 loci de microsatélites o SSR (Mo08 y Mo13) desarrollados por Mottura et al. (2005) que han sido exitosamente probados en *P. alba* y *P. hassleri* (Bessega et al. 2009; Vega et al. 2020) y 4 loci de microsatélites desarrollados por Bessega et al. 2013 específicamente para *P. alba* (Tabla 2).

Las amplificaciones de PCR, para los cebadores (Mo08, Mo13) desarrollados por Mottura (2005), se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 15 µl que contenía 15 ng de ADN molde, 1,5 mM de MgCl₂, Tris-HCL 10 mM, pH 9,0, KCL 50 mM, 0,15 mM de cada dNTP, 0,5 unidades de *Taq* polimerasa (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) 0,6 µM de cada cebador. El termociclador Eppendorf Mastercycler *ep gradient S* se ajustó con el siguiente perfil de ciclo: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 45 s, temperatura de hibridación específica del cebador (58-64 °C) durante 45 s, y extensión del cebador a 72 °C durante 45 s, seguido de un paso de extensión final de 10 min a 72 °C.

Para los cebadores (GL6, GL8, GL12 y GL15) desarrollados por Bessega et al. (2013), las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 25 µl que contenía 10-30 ng de ADN, 0,6 µM de cada cebador, dNTP 0,2 mM, 0,3 U *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina). El perfil del ciclo fue: una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 45 s, temperatura de hibridación específica del cebador (58-62 °C) durante 45 s, y extensión del cebador a 72 °C durante 45 s seguido de una etapa de extensión final de 10 min a 72 °C.

La separación de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis capilar en secuenciador automático 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, en la Unidad de Genómica, Instituto de Biotecnología, CNIA INTA) que mide la fluorescencia inducida por láser usando un detector de múltiples longitudes de onda. Los datos colectados en forma de electroferogramas fueron analizados con el programa GeneMarker 1.97 (SoftGenetic, versión demo) con el objeto de clasificar los alelos detectados según sus pesos moleculares.

Tabla 2. Descripción y características de los 6 microsatélites utilizados.

Locus	Tamaño del fragmento	Secuencia del Primer (5' -3')	Motivo de Repetición	T° de annealing	GenBank accession
Mo08 ¹	211-221	F:TATCCTAAACGCCGGGCTAC R:TCCCATTCATGCATACTTAAACC	(AC) ₉	59	AJ879507
Mo13 ¹	223-239	F:TTGATTAGAGTTGCATGTGGATG R:TGCAGTCCCAAGTGTCAGAG	(GT) ₁₀ CT(GT) ₂	58	AJ879509
GL6 ²	203-237	F:CTGGTTGCTGTGATTGGAGG R:CTCCAGGGATCACAAAGACAAAC	(GAT) ₇ (AT) ₁₂	62	JX136854
GL8 ²	171-189	F:CAGGTGGGCATGAAGTTTCC R:CCAAGAACAACCTGCCGAAG	CT) ₅ (ATCT) ₃	58	JX136855
GL12 ²	335-383	F: GAGTGAAGGTCGGGAAGAGG R: CCATTGGACCAAGGCAGAAC	(CT) ₅	58	JX136857
GL15 ²	197-221	F: F:GTGTTATGGTCCCAACAGCC R:TGAAGAGGGAGGAATCGCAG	(AG) ₁₂	58	JX136858

¹ Mottura et al. 2005; ² Bessega et al. 2013

2.3.2.2 Índices de diversidad genética por morfotipo

En primer lugar, se detectó la presencia de alelos nulos a través del programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (<http://www.microchecker.hull.ac.uk/>; Van Oosterhout et al. 2004). El impacto de estos alelos se evaluó mediante el cálculo del parámetro de diferenciación *Fst* a partir del método ENA (*Exclusion of Null Alleles*) descrito por (Chapuis y Estoup 2014) utilizando el programa FreeNa. El programa se corrió con 30.000 remuestreos de Bootstrap. Finalmente, se estimó el desequilibrio por ligamiento (LD) entre pares de marcadores utilizando el programa Fstat 2.9.3.2 (Goudet 2002).

Se estimaron diversos índices de diversidad genética para cada grupo morfológico mediante los siguientes estadísticos: número de alelos por locus (*Na*), número efectivo de alelos por locus (*Ne*), heterocigosis observada (*Ho*), heterocigosis esperada (*He*), riqueza alélica (*R_A*), índice de información de Shannon (*I*). Para el cálculo de estos estadísticos se empleó el programa GenAlEx v.6.51b2 (Peakall y Smouse 2006).

2.3.2.3 Frecuencias alélicas

A partir de los perfiles genotípicos de cada individuo se construyó una matriz de frecuencias alélicas, con la cual se calcularon las distancias genéticas entre individuos. Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP), y los resultados obtenidos se graficaron en un Biplot, de manera de visualizar la ordenación de los individuos según su

caracterización genética. Además, se evaluó la presencia de alelos exclusivos para cada locus y morfotipo. Estos análisis se realizaron con el programa InfoGen (Balzarini y Di Rienzo 2016).

2.3.2.4 Diferenciación genética entre los grupos morfológicos

Se realizó un análisis de la varianza molecular (AMOVA) entre todos los morfotipos y entre pares. Además, se calculó la distancia estándar de Nei (1972) entre los grupos morfológicos y se construyó el dendrograma respectivo mediante el método UPGMA. Estos análisis se realizaron con el programa GenAIEx 6.50.

2.3.2.5 Análisis Bayesiano de Estructuración genética

Se estimó la estructuración genética poblacional empleando el método bayesiano implementado en el programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) asumiendo el modelo de mezcla (*admixture model*). El programa fue configurado para ejecutar 10 corridas independientes con un período de calentamiento de 500.000 iteraciones seguidas de 1.000.000 de iteraciones de Cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC) por cada valor de K ($K=1$ a $K=5$). El número de grupos más probables (K óptimo) fue seleccionado mediante el cálculo de un estadístico *ad hoc*, ΔK , según Evanno et al. (2005), empleando el programa Harvester (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>).

También se realizaron diferentes corridas con el programa Structure dividiendo al área de estudio en tres zonas diferentes: a) zona Noroeste, donde están presentes todos los morfotipos; b) zona Centro, donde el único morfotipo que no se encuentra es *P. alba*, y por último c) zona Noreste, donde también se encuentran todos los morfotipos.

2.3.2.6 Estructura espacial de la variabilidad genética

Con el fin de poder visualizar el patrón espacial de variabilidad genética, se construyó un mapa sintético interpolando el primer componente de un PCA realizado con la matriz de frecuencia de alelos (PC1g), utilizando la Interpolación IDW, distancia inversa ponderada con el programa QGIS 3.8 (QGIS Development Team 2018). Así, la interpolación de las variables sintéticas obtenidas mediante la aplicación de técnicas de reducción de la dimensión como lo es un PCA sobre matrices de datos moleculares, permite la confección

de mapas de variabilidad genética, facilitando la visualización de los patrones espaciales de la estructuración genética.

2.4. Análisis citogenéticos

2.4.1 Germinación de semillas y fijación del material vegetal

Para los estudios citogenéticos se seleccionaron frutos provenientes de tres individuos por morfotipo. En este caso, los morfotipos intermedios (tipo *alba* y tipo *hassleri*) fueron considerados como un único grupo.

Las raíces fueron colectadas de semillas germinadas en una caja de Petri, colocadas en una cámara de germinación. Dicha cámara se programó con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, una temperatura diurna de 27 °C y nocturna de 25 °C. Las raíces fueron tratadas con 8-hidroxiquinolina (2 mM) como inhibidor del huso acromático durante 3 horas a temperatura ambiente y 3 horas a 4 °C. Posteriormente, fueron fijadas en solución Farmer (3 partes de alcohol etílico absoluto y 1 parte de ácido acético glacial) por un mínimo de 12 h a 4 °C, para luego ser conservadas a -20 °C hasta su utilización.

2.4.2 Obtención de preparados cromosómicos

Las preparaciones cromosómicas, se llevaron a cabo mediante digestión enzimática con celulasa 1% (p/v) y pectinasa 1% (v/v) a 37 °C durante 60 minutos según Schwarzacher *et al.* (1980) y aplastamiento de los ápices radicales con ácido acético al 60 %. Los cubreobjetos fueron retirados por congelamiento con CO₂ según Bowen (1956) y los preparados se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

2.4.3 Bando cromosómico CMA/DA/DAPI

Se llevó a cabo la técnica de tinción triple (CDD) con los fluorocromos cromomicina A3, distamicina A y 4'-6-diamidino-2-fenilindol (CMA/DA/DAPI). Estos fluorocromos revelan simultáneamente bandas heterocromáticas ricas en pares de nucleótidos GC (bandas CMA/DA positivas y DA/DAPI negativas) y AT (bandas CMA/DA negativas y DA/DAPI positivas) (Schweizer 1981). Para realizar el bando se procedió según Schweizer (1976, 1980). Los cromosomas fueron observados y fotografiados en un microscopio óptico Leica DMLB utilizando epifluorescencia y se obtuvieron fotomicrografías mediante una cámara

digital Axiocam. Para microscopía de epifluorescencia se utilizaron los juegos de filtros apropiados para la excitación de los fluorocromos empleados en cada caso.

2.4.4 Análisis morfométrico de los cariotipos

Para el análisis morfométrico del cariotipo se utilizó el programa Karyotype Analysis 2.0 (Altinordu et al. 2016). Se efectuaron mediciones a los cromosomas referidas a la longitud del brazo corto (s), largo (l) y total (c), y largo de banda heterocromática; se calculó en cada caso la media y la desviación estándar, datos con los que se elaboraron los idiogramas respectivos de cada morfotipo analizado.

Para la descripción y ordenamiento de los cromosomas se empleó el índice braquial (r) siguiendo la nomenclatura de Levan et al. (1964): $r = l/s$, donde: l = longitud del brazo largo y s = longitud del brazo corto.

Según su índice braquial, los cromosomas fueron ubicados dentro de las siguientes categorías: Metacéntricos ($r = 1-1,70$) o Submetacéntricos ($r = 1,71-3,00$). Además, se calculó el largo total del complemento haploide (LTCH), sumando la medida del largo total de cada par cromosómico, el largo cromosómico promedio (c), el índice braquial medio (r) y la razón entre el cromosoma más largo y el más corto (R). Finalmente, la asimetría de los cariotipos fue estimada usando los índices de asimetría intracromosómica A_1 e intercromosómica A_2 propuestos por Romero Zarco (1986). Cuando A_1 tiende a cero indica que los cromosomas son en su mayoría metacéntricos, y cuando A_2 es próximo a cero, indica que los cromosomas tienen un tamaño similar.

También se empleó la clasificación de Stebbins (1971) que establece categorías de asimetría de cariotipos teniendo en cuenta, por un lado, la razón entre las longitudes del par mayor y el menor del complemento (R), y por otro, la proporción de pares de cromosomas con r mayor o igual a 2. Los cromosomas con similar morfología y que no presentaron marcadores para su segura identificación fueron agrupados.

2.4.5 Análisis de Componentes Principales y análisis fenético de los datos cariotípicos

Se realizó un análisis de componentes principales para visualizar el ordenamiento de los morfotipos de acuerdo a sus características cariotípicas. Además, se llevó a cabo un análisis numérico con el objeto de establecer las distancias cariotaxonómicas entre los morfotipos examinados, que se representaron mediante un fenograma. Para ambos análisis se utilizaron los siguientes caracteres cuantitativos: longitud cromosómica media (c), índice

braquial medio (r), razón entre la longitud del cromosoma mayor y menor (R), cantidad de heterocromatina expresada como porcentaje de la longitud total del complemento y máximo número de bandas por complemento diploide. El agrupamiento se efectuó mediante la técnica de ligamiento promedio, empleándose la media aritmética no ponderada (UPGMA) (Sneath y Sokal 1973; Crisci y López Armengol 1983). Se utilizó el programa InfoStat versión 2017 (Di Rienzo et al. 2017).

2.5. Análisis integradores: caracterización morfológica, genética y climática de los grupos morfológicos

2.5.1 Correspondencia entre la asignación morfológica y genética: especies puras e híbridos

A partir de la caracterización genética, se analizó su correspondencia con la variación morfológica y se reclasificaron los individuos en: 1) especies puras *P. alba*, *P. hassleri* o *P. fiebrigii* cuando se correspondía la asignación genética (i.e. probabilidad $> 0,7$) y la morfológica (i.e. asignación al respectivo grupo puro en el análisis discriminante), 2) híbridos, cuando se trataba de individuos intermedios tanto genética (i.e. probabilidad de 0,5 de ser *P. alba* o *P. hassleri*) como morfológicamente (i.e. asignación al respectivo grupo morfológico en el análisis discriminante), 3) híbridos introgresantes tipo *P. alba* o tipo *P. hassleri* (i.e. cuando la asignación genética a *P. alba* o *P. hassleri* tiene una probabilidad mayor a 0,5 de pertenecer a una u otra especie, respectivamente), 4) híbridos introgresantes con desacople, aquellos individuos que genéticamente corresponden a una especie pura, pero morfológicamente se corresponden con otra (ej. genéticamente son *P. alba* pero morfológicamente son *P. hassleri*, o en el caso de los morfotipos intermedios cuando genéticamente se corresponden con híbridos introgresantes tipo *P. hassleri*, pero morfológicamente corresponden al morfotipo intermedio *P. alba*, y viceversa).

A partir de esta reclasificación se elaboraron dos tablas resumen para las especies puras y los híbridos con los valores mínimos y máximos de los caracteres morfológicos más relevantes, genéticos y citogenéticos obtenidos en este trabajo.

Finalmente, los individuos de cada grupo fueron superpuestos al mapa de la interpolación de las frecuencias alélicas elaborado en la sección de *Microsatélites* y al mapa de presencia de *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii* obtenido en la sección *Modelado de Nicho*.

2.5.2 Mantel parcial

Para evaluar la asociación entre la variabilidad morfológica y genética entre todos los individuos analizados, se realizó una prueba de Mantel parcial, que evalúa la correlación entre las matrices de distancia genética y morfológica, mientras controla el efecto de la autocorrelación espacial incorporando una matriz de distancias geográficas entre individuos (Smouse et al. 1986). Los análisis fueron realizados utilizando la función *mantel.parcial* en la librería *vegan* (Oksanen et al. 2011) del programa R (Development Core team 2012). De la misma manera se evaluaron las asociaciones de las matrices morfológicas y genéticas con las variables climáticas. Para ello se seleccionaron aquellas variables climáticas que resultaron de mayor importancia en los modelados de nichos y que además se utilizaron para el análisis de solapamiento de nichos de los morfotipos estudiados.

2.5.3 Análisis de Procrustes generalizado

Asimismo, para cuantificar la asociación no necesariamente lineal entre estos conjuntos de datos y para visualizar el nivel de consenso entre el ordenamiento de los individuos en los distintos grupos de datos (i.e. morfológico, genético y climático), se realizó un Análisis de Procrustes Generalizado (Gower 1975), implementado en el programa *InfoGen* (Balzarini y Di Rienzo 2017).

2.5.4 Análisis de Componentes Principales integrador

Para analizar el ordenamiento de los individuos estudiados y del centroide de cada morfotipo en el espacio multidimensional considerado en esta tesis se realizó un análisis de Componentes Principales con variables sintéticas de cada grupo de datos. Para ello, se retuvieron los dos primeros ejes principales de un ACP morfológico (CP1m y CP2m), genético (CP1g y CP2g) y climático (CP1cli y CP2cli). El CP1m representa principalmente las variables ancho de foliolulo (AFOL) y longitud del foliólulo (LFOL), mientras que el CP2m, a las variables largo del pecíolo (LPE) y distancia entre foliólulos (DIFOL). El CP1g representa principalmente la variación de los loci GL6 y GL8, y el PC2g, a la variación de los loci GL12 y GL8. Por último, el PC1cli representa principalmente la variación en las variables precipitación del trimestre más frío (bio 19) y temperatura máxima del mes más cálido (bio 5), mientras que el PC2cli, de las variables estacionalidad de la temperatura (bio

4) y temperatura mínima del mes más frío (bio 6). Se realizaron correlaciones de Pearson entre todas las variables sintéticas para explorar en qué medida están asociadas.

2.5.5 Regresiones múltiples: influencia relativa de la variación genética y climática sobre la variación morfológica

Finalmente, para indagar el rol de la variación climática y genética sobre la variación morfológica, y para indagar sobre el rol de la variación climática y morfológica sobre la variación genética, se realizaron sendas regresiones múltiples utilizando como variables respuesta a los dos ejes principales del ACP morfológico (CP1m y CP2m), y a los dos ejes principales del PCA genético (CP1g y CP2g), en cada caso. Como variables predictoras se utilizaron los dos primeros ejes del PCA climático (CP1cli y CP2cli) y los ejes genéticos o los morfológicos, según fuese la variable respuesta utilizada. Se evaluaron todos los modelos posibles eligiendo el de menor AIC. Estos análisis se realizaron en el programa INFOSTAT.

3- RESULTADOS

3.1. Caracterización morfológica

3.1.1 Análisis exploratorio de los datos

Se analizaron un total de 421 individuos distribuidos en Argentina y Paraguay. El análisis de componentes principales realizado a partir de la tabla de medias por individuo para cada carácter morfológico permitió observar el ordenamiento de los individuos muestreados y la correlación de las variables medidas. Los dos primeros componentes (CP1 y CP2) obtenidos del ACP explican el 72,7% de la variabilidad total entre los individuos en relación a las variables foliares (Fig. 7). El primer componente, que explica el 61,5 % de la variación, ordena los árboles de acuerdo al ancho de los foliólulos (AFOL), longitud de los foliólulos (LFOL), número de los foliolulos (NFOL), área de los foliólulos (ARFOL), la distancia de los foliólulos (DIFOL), relación longitud / ancho del foliólulo (LAFOL) y al número de pinnas (NPI) mientras que el segundo componente ordena los árboles principalmente de acuerdo al largo del pecíolo (LPE), pero también a la relación área del ápice del foliólulo/área total del foliólulo (APTOT) y al largo de pinna (LPI) (Tabla S2).

Cuando en el biplot se identifica a cada individuo según la clasificación taxonómica previa, se observa que, si bien se trata de una variación morfológica continua, cada morfotipo se ubica en una porción restringida de esa variación. En los extremos de la misma se

encuentran hacia la izquierda, individuos puros *P. alba* y por el otro, los individuos puros *P. fiebrigii*. Los híbridos putativos, de morfología intermedia, se ordenaron entre los individuos puros de *P. alba* y *P. hassleri*. Los individuos de *P. fiebrigii* se ordenaron en una posición contigua a *P. hassleri* (Fig. 7 A). La Fig. 7 B muestra la clasificación de los morfotipos intermedios, en tipo *P. alba* y tipo *P. hassleri*. La diferenciación de los grupos morfológicos se evidencia a lo largo del eje 1, mientras que la variación observada a lo largo del eje CP2 no diferencia grupos morfológicos, sino que es variación intramorfos.

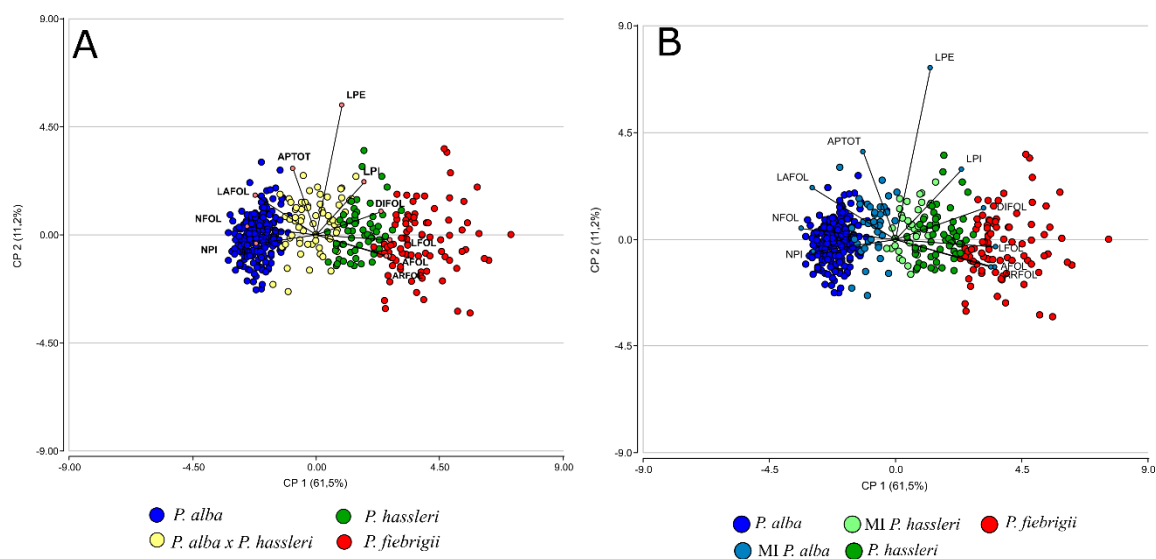


Figura 7. Biplot de los dos primeros ejes del ACP realizado con las variables morfológicas de hoja indicando el morfotipo al que pertenece cada individuo. A) Biplot mostrando los individuos puros de cada especie y los intermedios. B) similar al panel A, pero los morfotipos intermedios clasificados previamente según su mayor similitud a *P. alba* o *P. hassleri*. Los diferentes colores corresponden a los diferentes morfotipos. MI, morfotipo intermedio.

Los individuos puros *P. alba* y morfotipos intermedios *P. alba* se diferenciaron del resto de los individuos, principalmente por presentar mayores valores de NPI, NFOL, LAFOL. En cambio, los morfotipos intermedios *P. hassleri*, los individuos puros *P. hassleri* y *P. fiebrigii* se diferenciaron por presentar mayores valores de ARFOL, LFOL, AFOL, DIFOL. Como se mencionó en cada extremo de este patrón, se encuentran los individuos puros *P. alba* (hacia la izquierda) y *P. fiebrigii* (hacia la derecha).

3.1.2 Análisis Discriminante

En el análisis discriminante, las variables que mejor separan a los grupos morfológicos fueron el área foliar (ARFOL) y la longitud (LFOL) y ancho (AFOL) de los foliólulos, ubicándose en ambos extremos de esta variación los individuos puros de *P. alba*, y en el otro los individuos puros *P. fiebrigii*. El segundo eje diferencia principalmente a los

morfotipos intermedios de los respectivos individuos puros y a *P. hassleri* de *P. fiebrigii* por presentar mayor largo de pinna y menor número de los foliólulos (LPI, NFOL). El ordenamiento de los individuos en los dos ejes canónicos resultantes del análisis discriminante se muestra en la Fig. 8 y su correspondiente tabla de clasificación cruzada, en la Tabla 3.

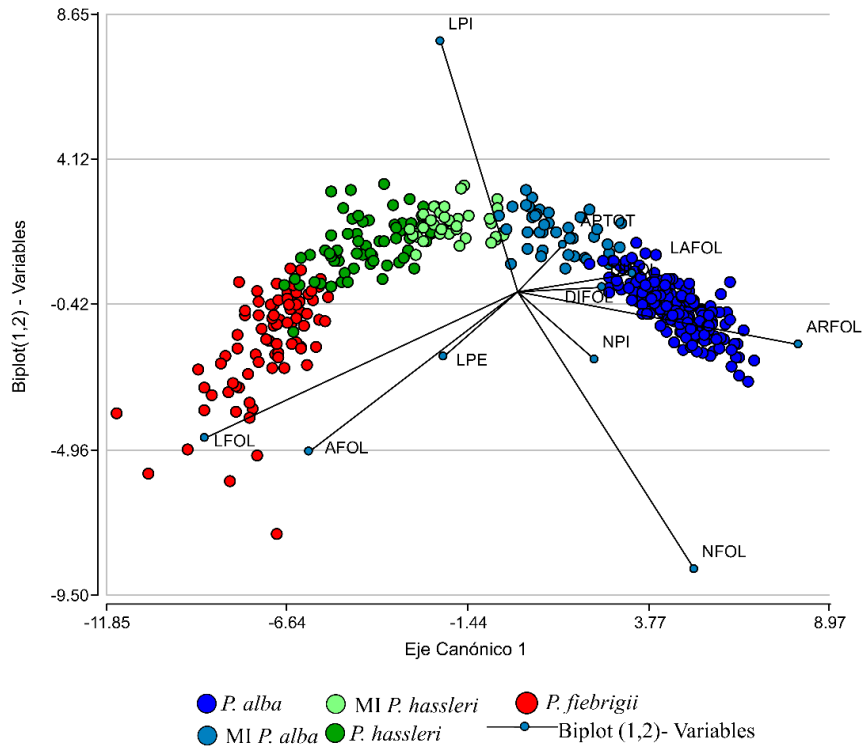


Figura 8. Biplot resultante del Análisis Discriminante de los cinco grupos morfológicos en función de las diez variables morfológicas medidas: ancho de los foliolulos (AFOL), relación área del ápice del foliólulo/área total del foliólulo (APTOT), área de los foliolulos (ARFOL), distancia de los foliolulos (DIFOL), relación longitud / ancho del foliólulo (LAFOL), longitud de los foliolulos (LFOL), largo del pecíolo (LPE), largo de pinna (LPI), número de los foliolulos (NFOL), número de pinnas (NPI). MI, morfotipo intermedio.

Tabla 3. Tabla de clasificación cruzada obtenida a partir del Análisis Discriminante. En filas se representa al grupo al que pertenece la observación y en columnas el grupo al que es asignada la misma observación al usar la función discriminante. Grupo 1, *P. alba*, grupo 2, morfotipo intermedio *P. alba*, grupo 3, morfotipo intermedio *P. hassleri*, grupo 4, *P. hassleri*, grupo 5, *P. fiebrigii*.

Grupo	1	2	3	4	5	Total	Error (%)
1	185	11	0	0	0	196	5,61
2	0	39	1	0	0	40	2,50
3	0	1	36	1	0	38	5,26
4	0	0	10	51	2	63	19,05
5	0	0	0	7	77	84	8,33
Total	185	51	47	59	79	421	7,84

La tabla de clasificación cruzada (Tabla 3), señala que de los 421 árboles analizados 388 fueron bien clasificados. La mayor tasa de error se encontró en el grupo 4 perteneciente a *P. hassleri*, en el que diez individuos, de un total de 63, fueron clasificados como morfotipo intermedio *P. hassleri* y dos como *P. fiebrigii*. En los demás grupos, también hubo error en la clasificación, pero la tasa de error fue menor. En el grupo 1, 11 individuos clasificados como *P. alba* puro, fueron asignados al morfotipo intermedio *P. alba*, y en este último grupo, un individuo fue asignado al morfotipo intermedio *P. hassleri*. En el caso del grupo 5, perteneciente a *P. fiebrigii*, siete individuos de 84, fueron clasificados como *P. hassleri*.

Posteriormente con el árbol tipo obtenido para cada grupo se construyó un dendrograma en el que se pueden observar dos grandes agrupaciones por distancias morfológicas. Una agrupa al árbol tipo de *P. alba* - morfotipo intermedio *P. alba* y al morfotipo intermedio *P. hassleri* y el otro grupo a *P. hassleri* y *P. fiebrigii* (Fig. 9).

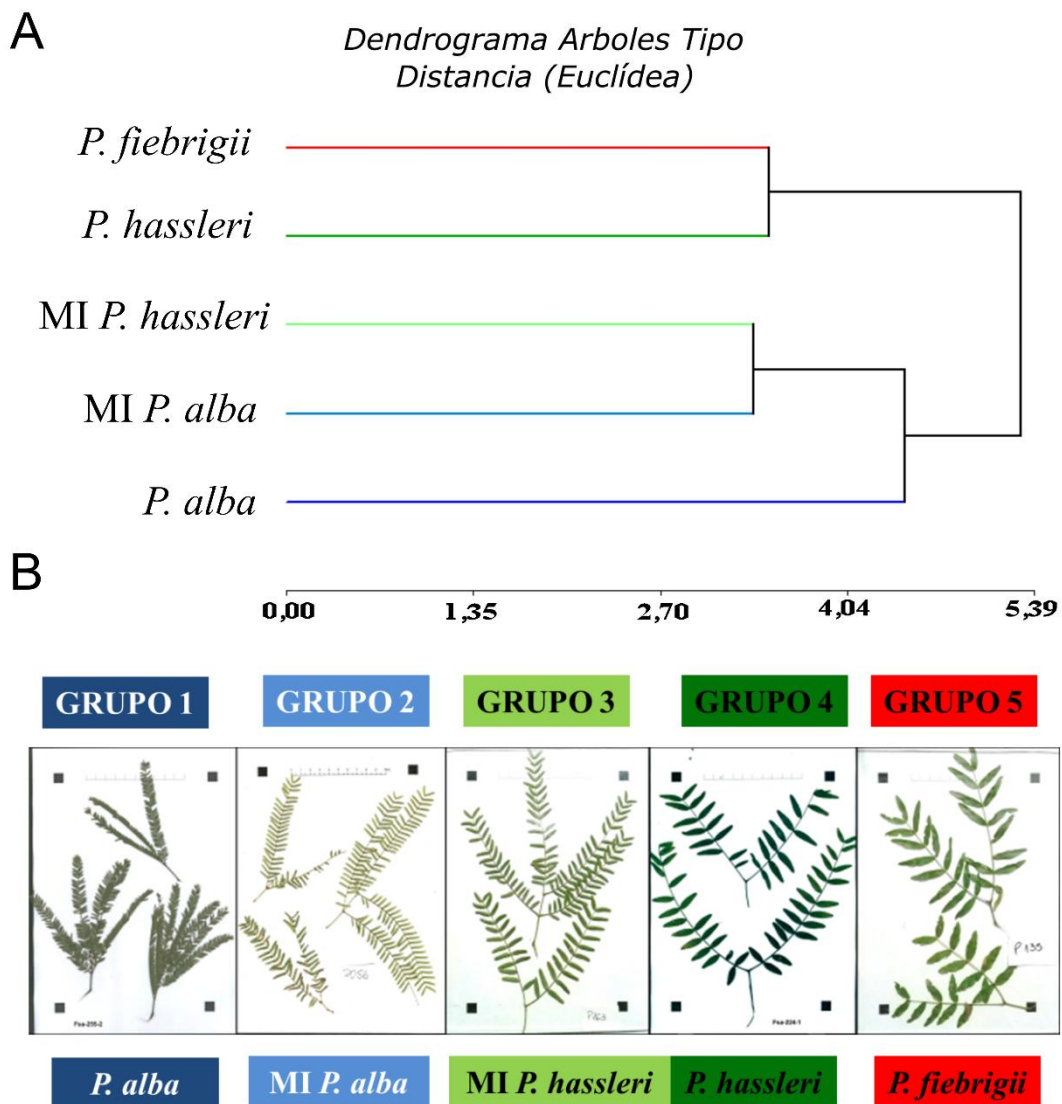


Figura 9. A) Dendrograma obtenido con el método UPGMA, basado en la distancia morfológica entre los “árboles tipos” basado en los caracteres morfológicos de hoja. B) Ejemplares de herbarios correspondientes a los árboles tipos representantes de cada grupo morfológico. MI, morfotipo intermedio.

3.1.3 Análisis univariados y multivariado de la varianza

Al realizar un análisis univariado de la varianza para cada uno de los caracteres de hoja medidos se encontraron diferencias significativas entre los grupos morfológicos para todas las variables (Tabla 4). Para las variables ancho del foliólulo (AFOL), longitud de los foliólulos (LFOL) y número de foliólulos (NFOL) todos los grupos morfológicos se diferenciaron entre sí significativamente. Para la variable largo de pina (LPI) los individuos puros *P. hassleri*, *P. fiebrigii* y el morfotipo intermedio *P. hassleri* no se diferenciaron entre sí, en cambio los individuos puros *P. alba* y el morfotipo intermedio *P. alba* se diferenciaron

entre sí y de los demás. Para las variables área foliar (ARFOL) y distancia de los foliólulos (DIFOL) no se encontraron diferencias entre los individuos puros *P. alba* y el morfotipo intermedio *P. alba*, sin embargo, los tres morfotipos restantes si se diferenciaron significativamente (*P. hassleri*, morfotipo intermedio *P. hassleri* y *P. fiebrigii*). Para el número de pinas (NPI) los individuos puros *P. hassleri* y *P. fiebrigii* no se diferenciaron entre sí, sin embargo, el resto de los morfotipos si se diferenciaron significativamente. Para la variable que relaciona la longitud y el ancho de los foliolulos (LAFOL), los individuos puros *P. alba* y el morfotipo intermedio *P. alba* no se diferenciaron entre sí, como así tampoco los individuos puros *P. hassleri* del morfotipo intermedio *P. hassleri*, pero si se diferenciaron todos ellos de *P. fiebrigii*. Para el largo del pecíolo (LPE) los individuos puros *P. alba* se diferenciaron de todos los morfotipos, el morfotipo intermedio *P. hassleri* y *P. fiebrigii* no se diferenciaron entre sí, como así tampoco el morfotipo intermedio *P. alba* de *P. hassleri*. Para la variable que relaciona el área del ápice del foliólulo/área total del foliólulo (APTOT) los individuos puros *P. alba* se diferenciaron de todos los demás morfotipos.

Finalmente, el análisis multivariado de la varianza y el análisis *a posteriori* de Hotelling corregido por Bonferroni mostraron que todos los grupos morfológicos se diferenciaron significativamente ($p < 0,05$) entre sí. El valor del Lambda de Wilks fue de 0,01 ($p < 0,0001$).

Tabla 4. Resultados del ANOVA: medias (\pm EE.) en los grupos morfológicos para los rasgos medidos en hojas. Ancho del foliólulo (AFOL), relación área del ápice del foliólulo/área total del foliólulo (APTOT), área total del foliolulo (ARFOL), distancia entre foliolulos (DIFOL), error estándar (EE), relación longitud / ancho del foliólulo (LAFOL), longitud de los foliolulos (LFOL), longitud del pecíolo (LPE), longitud de la pina (LPI), número de pares de foliolulos (NFOL), número de pares de pinas (NPI). Entre paréntesis se indica el número de individuos de cada grupo morfológico. Las letras distintas dentro de cada fila, indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos para esa variable, luego de una prueba a posteriori de Tuckey.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	F	<i>p</i> (Anova)
Variable \pm EE	(196)	(40)	(63)	(84)	(38)	(421)	
LPE	2,30 \pm 0,050 ^A	2,54 \pm 0,110 ^{AB}	2,81 \pm 0,110 ^B	2,54 \pm 0,090 ^{AB}	2,79 \pm 0,070 ^B	10,08	0,0001
LPI	9,85 \pm 0,140 ^A	11,25 \pm 0,300 ^B	12,60 \pm 0,310 ^C	13,28 \pm 0,240 ^C	13,54 \pm 0,210 ^C	78,08	0,0001
NPI	2,50 \pm 0,030 ^D	1,63 \pm 0,070 ^C	1,31 \pm 0,070 ^B	1,03 \pm 0,060 ^A	1,06 \pm 0,050 ^A	247,67	0,0001
NFOL	39,07 \pm 0,340 ^E	24,59 \pm 0,750 ^D	17,74 \pm 0,770 ^C	12,68 \pm 0,600 ^B	7,98 \pm 0,560 ^A	831,84	0,0001
AFOL	0,14 \pm 0,010 ^A	0,22 \pm 0,020 ^B	0,40 \pm 0,030 ^C	0,61 \pm 0,020 ^D	1,11 \pm 0,010 ^E	833,81	0,0001
LFOL	0,70 \pm 0,020 ^A	1,17 \pm 0,050 ^B	1,63 \pm 0,050 ^C	2,31 \pm 0,040 ^D	3,24 \pm 0,030 ^E	1240,07	0,0001
APTOT	0,14 \pm 0,001 ^A	0,14 \pm 0,003 ^B	0,13 \pm 0,003 ^B	0,13 \pm 0,003 ^B	0,12 \pm 0,002 ^B	10,38	0,0001
ARFOL	0,09 \pm 0,030 ^A	0,25 \pm 0,070 ^A	0,54 \pm 0,070 ^B	1,11 \pm 0,050 ^C	2,60 \pm 0,050 ^D	521,73	0,0001
LAFOL	5,23 \pm 0,050 ^C	5,31 \pm 0,110 ^C	4,14 \pm 0,110 ^B	3,87 \pm 0,090 ^B	2,99 \pm 0,080 ^A	177,16	0,0001
DIFOL	0,06 \pm 0,010 ^A	0,10 \pm 0,010 ^A	0,17 \pm 0,010 ^B	0,22 \pm 0,010 ^C	0,38 \pm 0,010 ^D	189,46	0,0001

3.1.4 Distribución de la variación morfológica en el espacio geográfico

La distribución espacial de los individuos clasificados según el grupo morfológico al que pertenecen (correspondiente a las especies puras *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii* y a los morfotipos intermedios *P. alba* y morfotipo intermedio *P. hassleri*) (Fig. 10) muestra que, *P. alba* presenta una distribución más amplia que el resto de los grupos morfológicos, encontrándose al sur de la Provincia de Formosa y de allí hacia el oeste tanto de Formosa como de Paraguay. Los individuos puros *P. hassleri* y *P. fiebrigii* comparten una distribución más restringida, que va desde el noreste hasta el centro-norte de la Provincia de Formosa, sin embargo, se pueden observar zonas en Paraguay donde está presente *P. fiebrigii* exclusivamente y otras zonas donde se encuentra *P. hassleri* de manera exclusiva. Además, se observan zonas de contacto entre los individuos puros *P. alba* y *P. hassleri* y *P. fiebrigii* donde aparecen los morfotipos intermedios *P. alba* y *P. hassleri*. Asimismo, se encontraron

poblaciones con la presencia de morfotipos intermedios, sin la presencia de parentales, correspondientes tanto a los morfotipos *P. alba*, como así también morfotipos *P. hassleri*.

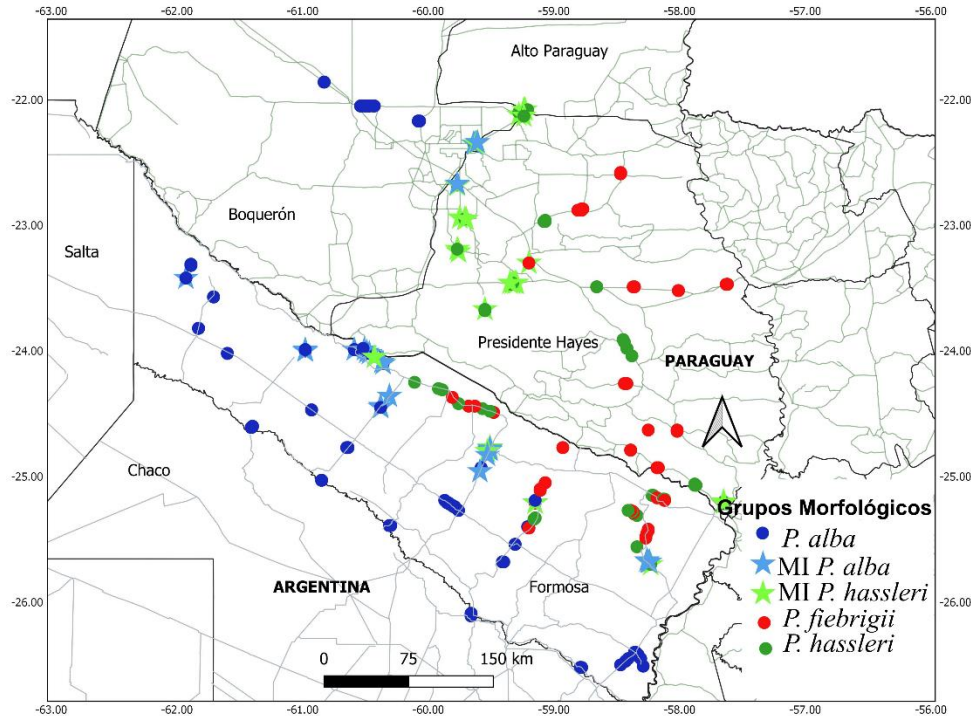


Figura 10. Individuos muestreados clasificados según su grupo morfológico. MI, morfotipo intermedio.

Por otra parte, cuando se analiza la variación morfológica a escala espacial, mediante la interpolación del primer componente del ACP morfológico (Fig. 11), se observa que, hacia el norte del área de estudio, es decir hacia donde predominan los individuos puros de *P. hassleri* y *P. fiebrigii*, se encuentran los árboles con mayores valores de: longitud del foliólulo (LFOL), ancho del foliólulo (AFOL), distancia entre los foliólulos (DIFOL), largo de pina (LPI) y área foliar (ARFOL). Hacia el sur, donde predominan los individuos puros de *P. alba*, se presentan árboles con menores valores de dichos caracteres, y mayores valores de: número de pares de pinas (NPI), número de foliólulos (NFOL) y la relación longitud / ancho del foliólulo (LAFOL). Los individuos con morfología intermedia se encuentran principalmente en una franja que abarca el norte de Formosa y el sur de Paraguay.

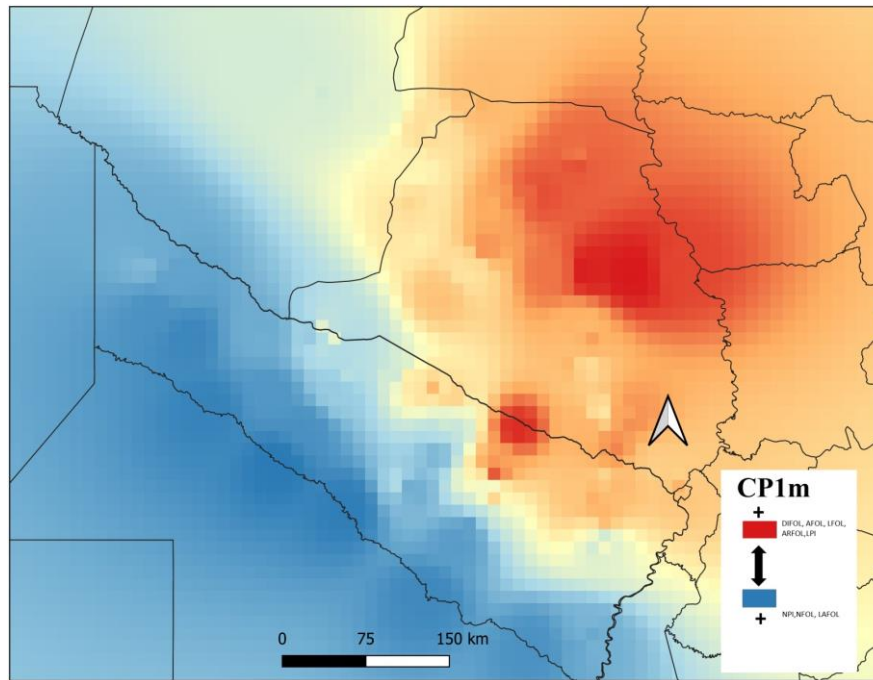


Figura 11. Mapa resultante de la interpolación espacial del primer eje del Análisis de componentes principales basado en los diez caracteres morfológicos de las hojas medidos en los 421 individuos.

3.1.5 Resultados principales

- A partir de la caracterización morfológica se pudieron identificar 5 grupos morfológicos, tres correspondientes a especies puras *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii* y 2 grupos correspondientes a los morfotipos intermedios *P. alba* y *P. hassleri*.
- Las variables de hoja que mejor se correlacionaron con el eje principal del ACP fueron la longitud, ancho y área del foliólulo (LFOL, AFOL y ARFOL), la distancia entre foliólulos (DIFOL), el número de pinnas (NPI) y número de foliólulos (NFOL).
- Todos los grupos se diferenciaron significativamente a nivel morfológico siendo las variables que mejor diferenciaron a los 5 grupos morfológicos el número de foliólulos (NFOL), el ancho de los foliólulos (AFOL) y la longitud de los foliólulos (LFOL).
- El patrón espacial de dicha variación morfológica indica que hacia el noreste del área de estudio aumentan el ancho del foliólulo, longitud de los foliólulos, distancia entre los foliólulos, área foliar y longitud de pima (AFOL, LFOL, DIFOL, ARFOL y LPI), en correspondencia con la localización de individuos puros de *P. hassleri* y *P. fiebrigii*, mientras que hacia el sur, aumentan el número de pinas, número de foliólulos y la relación entre la longitud y el ancho de los foliólulos (NPI, NFOL, LAFOL), en correspondencia con

la localización de individuos puros de *P. alba*. Las formas morfológicamente intermedias se localizan también en una posición intermedia a nivel espacial.

3.2. Modelado de nicho y requerimientos climáticos de cada morfotipo

3.2.1 Modelado de nicho

Prosopis alba

Las variables que más contribuyeron al modelo y que no se encontraban correlacionadas fueron las siguientes (en orden de importancia de acuerdo a la prueba de permutación de Jackknife): estacionalidad de las precipitaciones (BIO 15), temperatura máxima del mes más cálido (BIO 5), estacionalidad de la temperatura (BIO 4), precipitación del trimestre más cálido (BIO 18), temperatura media del trimestre más seco (BIO 9), temperatura media del trimestre más húmedo (BIO 8), temperatura del mes más húmedo (BIO 13) e isothermalidad (bio 3) (Tabla S3). Con esta selección se procedió a optimizar la complejidad del modelo en Wallace, obteniendo un total de 25 modelos de los cuales se seleccionaron los tres mejores, todos con TTr= H y distintos coeficientes de regularización (2, 2,5 y 3), los cuales presentaron el menor valor de delta AICc y menor número de parámetros. Finalmente, a partir de los valores de validación (Tabla 5), el mejor modelo resultante fue el H_2,5.

Para construir el mapa binario de presencia-ausencia (Fig. 12A) y el mapa de probabilidad de presencia (Fig. 12B) de la especie se utilizó un umbral del 5 % (0,2627), es decir el valor más bajo de probabilidad de un punto de presencia luego de excluir el 5 % de los valores de probabilidad más bajos. Este umbral se utilizó ya que permitió excluir puntualmente a siete puntos localizados en Bolivia que ocasionaban una sobrepredicción en la distribución de *P. alba*.

Prosopis hassleri

Las variables que más contribuyeron al modelo y que no se encontraban correlacionadas fueron las siguientes (en orden de importancia de acuerdo a la prueba de permutación de Jackknife): temperatura media del trimestre más cálido (BIO 10), temperatura mínima del mes más frío (BIO 6) y precipitación del trimestre más frío (BIO 19) (Tabla S3). Con esta selección se procedió a optimizar la complejidad del modelo en Wallace, obteniendo un total de 25 modelos de los cuales se seleccionaron los tres mejores: LQH_0,5, H_0,5, H_1,5, los cuales presentaron el menor valor de delta AICc y menor número de

parámetros. Finalmente, a partir de los valores de validación de los modelos (Tabla 5), el mejor modelo resultante fue el LQH_0,5.

Para construir el mapa binario de presencia-ausencia (Fig. 12A) y el mapa de probabilidad de presencia de la especie (Fig. 12C) se utilizó como valor de umbral al valor de probabilidad más bajo de los puntos de calibración (0,1900).

Prosopis fiebrigii

Las variables que más contribuyeron al modelo y que no se encontraban correlacionadas fueron las siguientes (en orden de importancia de acuerdo a la prueba de permutación de Jackknife): temperatura media del trimestre más cálido (BIO 10), temperatura mínima del mes más frío (BIO 6), precipitación del trimestre más frío (bio 19), precipitación del mes más seco (BIO 14) e isothermalidad (BIO 3) (Tabla S3). Con esta selección se procedió a optimizar la complejidad del modelo en Wallace, obteniendo un total de 25 modelos de los cuales se seleccionaron los tres mejores: LQH_1,5; LQ_0,5; LQH_3, los cuales presentaron el menor valor de delta AICc y menor número de parámetros. Finalmente, a partir de los valores de validación de los modelos (Tabla 5), el mejor modelo seleccionado fue el LQH_1,5.

Para construir el mapa binario de presencia-ausencia (Fig. 12A) y el mapa de probabilidad de presencia (Fig. 12D) se utilizó como valor de umbral al valor de probabilidad más bajo de los puntos de calibración (0,3675).

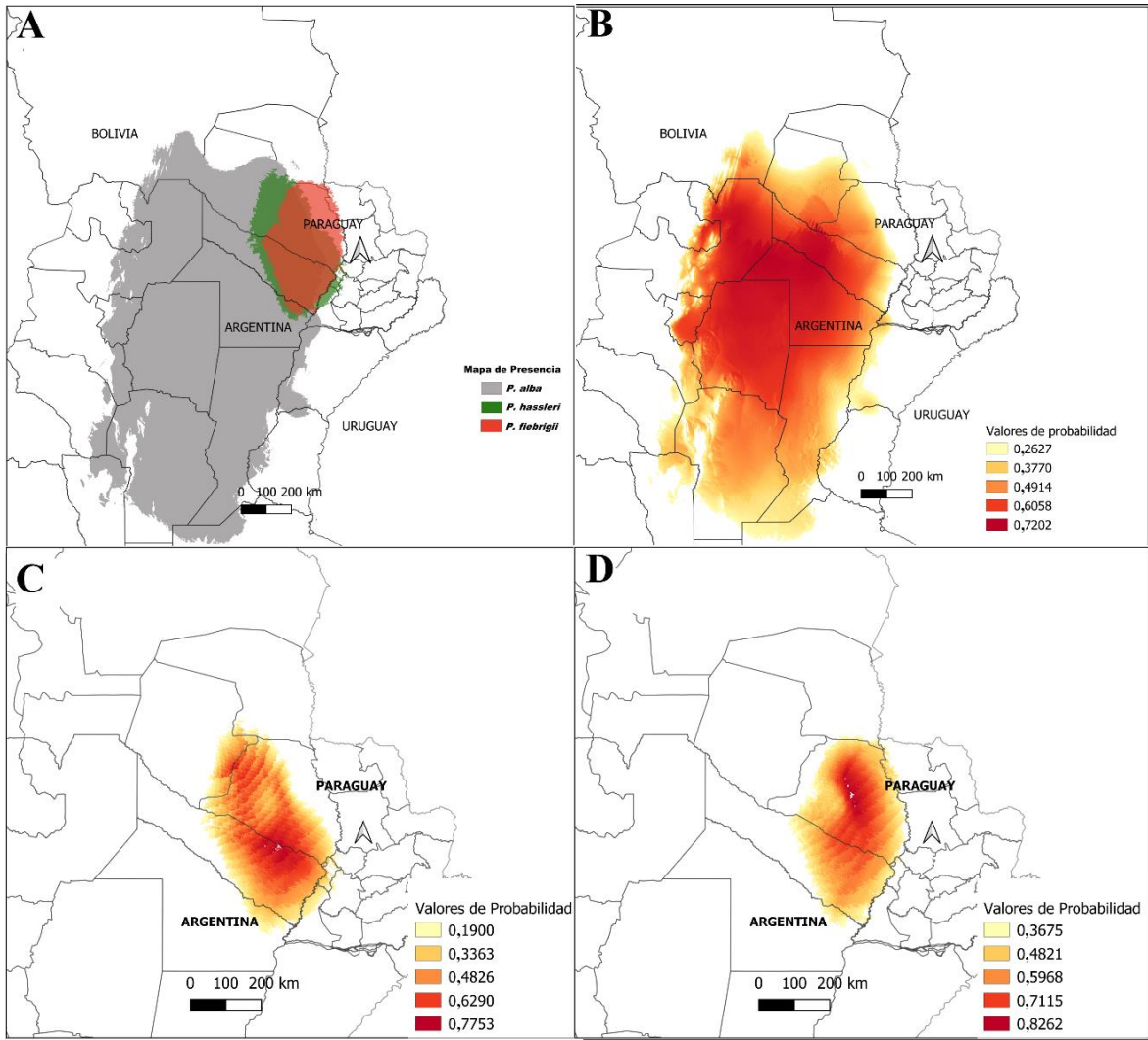


Figura 12. Resultado del Modelado de nicho para las tres especies en estudio: A) Mapa binario de presencia/ausencia de las tres especies (*P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii*). Mapas de probabilidad (favorabilidad climática) de B) *P. alba*, C) *P. hassleri* D) *P. fiebrigii*.

Tabla 5. Valores de umbral y métricas de validación para cada Modelado de Nicho Ecológico de *Prosopis alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii*. Nota: la denominación de los modelos se realiza de acuerdo a los parámetros incorporados para cada uno, que consisten en transformaciones aplicadas a las covarianzas que se modelan entre variables (llamadas “features classes”) y al coeficiente de regularización, que es un parámetro que penaliza al modelo para evitar la sobreparametrización y el sobreajuste.

MODELOS Métricas de Validación	<i>P. alba</i>			<i>P. hassleri</i>			<i>P. fiebrigii</i>		
	H_2,5	H_3	H_2	LQH_0,5	H_0,5	H_1,5	LQH_1,5	LQ_0,5	LQH_3
Umbral	0,2627	0,0489	0,0334	0,1900	0,1287	0,3990	0,3675	0,3292	0,4864
AUC ratio 0,05	1,8534	1,8520	1,8523	1,9535	1,9447	1,9407	1,9453	1,9174	1,9410
AUC parcial 0,05	0,9267	0,9259	0,9261	0,9767	0,9723	0,9703	0,9726	0,9587	0,9705
AUC parcial 0,5	0,4999	0,4999	0,4999	0,4999	0,4999	0,4999	0,4999	0,4999	0,4999
p binomial	2,2e-16	2,2e-16	2,2e-16	2,16e-07	2,16e-07	2,16e-07	2,98 e-06	2,98 e-06	2,98 e-06
Kappa	0,8089	0,9423	0,8089	0,9342	0,9342	0,9342	0,9311	0,9311	0,9311
TSS	0,7000	0,9000	0,7000	0,9643	0,9643	0,9643	0,9583	0,9583	0,9583
Prevalencia	0,9074	0,9074	0,9074	0,7368	0,7368	0,7368	0,7058	0,7058	0,7058
Sensibilidad	1	1	1	0,9642	0,9642	0,9642	1	1	1
Error de omisión	0	0	0	0,0357	0,0357	0,0357	0,0416	0,0416	0,0416
Error de comisión	0,0300	0,0100	0,0300	0	0	0	0	0	0

3.2.2 Solapamiento de Nichos

Los gráficos de densidad para analizar el rango de las variables climáticas y geográficas de las especies *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii* y de los morfotipos intermedios se encuentran representados en la Fig. 13. Se observa el solapamiento en el rango de valores para *P. fiebrigii* y *P. hassleri* en la mayoría de las variables. No ocurre lo mismo con *P. alba*

la cual presenta un rango climático más amplio y con los morfotipos intermedios que en general toman valores intermedios a las especies puras, y en algunos casos compartiendo mas los rangos de las variables con *P. hassleri* y *P. fiebrigii*.

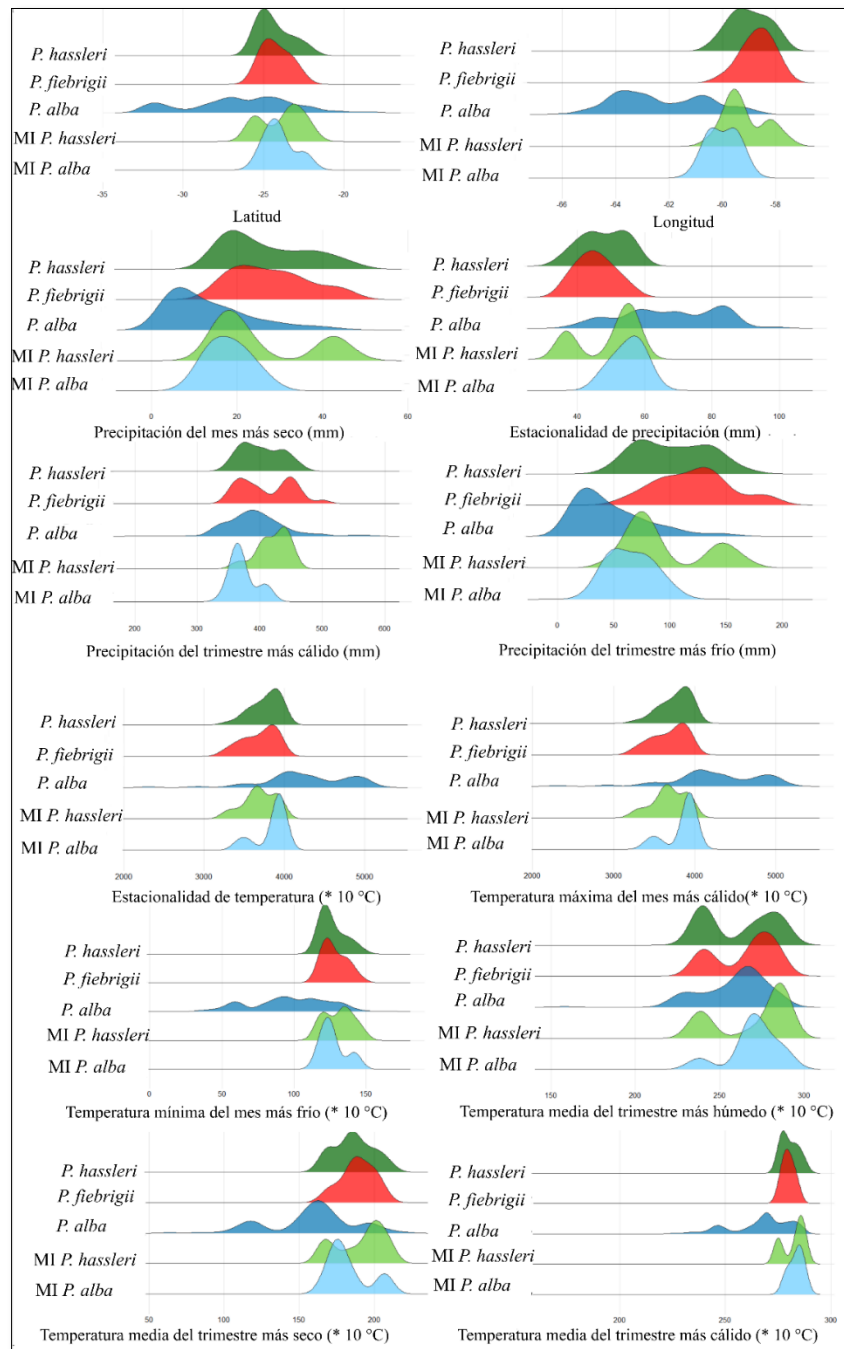


Figura 13. Gráficos de densidad para la latitud, longitud y las variables climáticas de mayor importancia en el modelado de nichos relacionadas con valores de precipitación y temperatura para los 5 grupos morfológicos. MI, morfotipo intermedio.

Tal como se observa en la Figura 13, la localización geográfica de los morfotipos intermedios abarca el mismo rango latitudinal que *P. hassleri* y *P. fiebrigii* y la porción más septentrional de la distribución de *P. alba*. Al considerar la longitud se observa un menor solapamiento (que al considerar la latitud) entre la distribución de *P. alba* y *P. hassleri/P. fiebrigii*, evidenciando distribuciones prácticamente contiguas; los morfotipos intermedios predominan en longitudes intermedias a los límites de la distribución de las especies puras. Al considerar las variables climáticas, se observa que para la variable temperatura del trimestre más húmedo, los cinco morfotipos comparten similares rangos de valores de dicha variable. Para la variable precipitación del trimestre más cálido y temperatura del trimestre más seco, las tres especies puras comparten el mismo rango de valores, mientras que los morfotipos intermedios se diferencian entre sí, hacia un extremo y otro del rango de valores que toman *P. alba* y *P. hassleri* y *P. fiebrigii* (intermedio tipo *P. alba* hacia lugares más fríos y secos que el tipo *P. hassleri*). Para las variables precipitación del trimestre más seco, estacionalidad de la temperatura, temperatura media del trimestre más seco y del más cálido, los morfotipos intermedios solapan sus distribuciones con las especies puras *P. fiebrigii* y *P. hassleri*, y marginalmente con *P. alba*. Para la estacionalidad de la precipitación, y la precipitación del trimestre más frío, los morfotipos puros se solapan parcialmente, encontrándose los morfotipos intermedios en una zona central, hacia el inicio o final del rango de valores de *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii*.

Luego de ver los comportamientos de las diferentes variables climáticas para cada uno de los morfotipos, se evaluó si efectivamente hay solapamiento de nichos para las tres especies puras, el análisis fue realizado de a pares. Debido a los pocos puntos disponibles este análisis no fue posible realizarlo para los morfotipos intermedios.

Prosopis alba vs *P. fiebrigii*

El valor D para la comparación de nichos de *P. alba* vs *P. fiebrigii* es de 0,14, por lo que la superposición de nicho entre las dos especies es del 14%. La prueba de equivalencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$), por lo que se rechaza la hipótesis nula de equivalencia de nichos, mientras que la prueba de similitud no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$), es decir que los nichos no resultaron significativamente similares entre ellos ni equivalentes (Fig. 14).

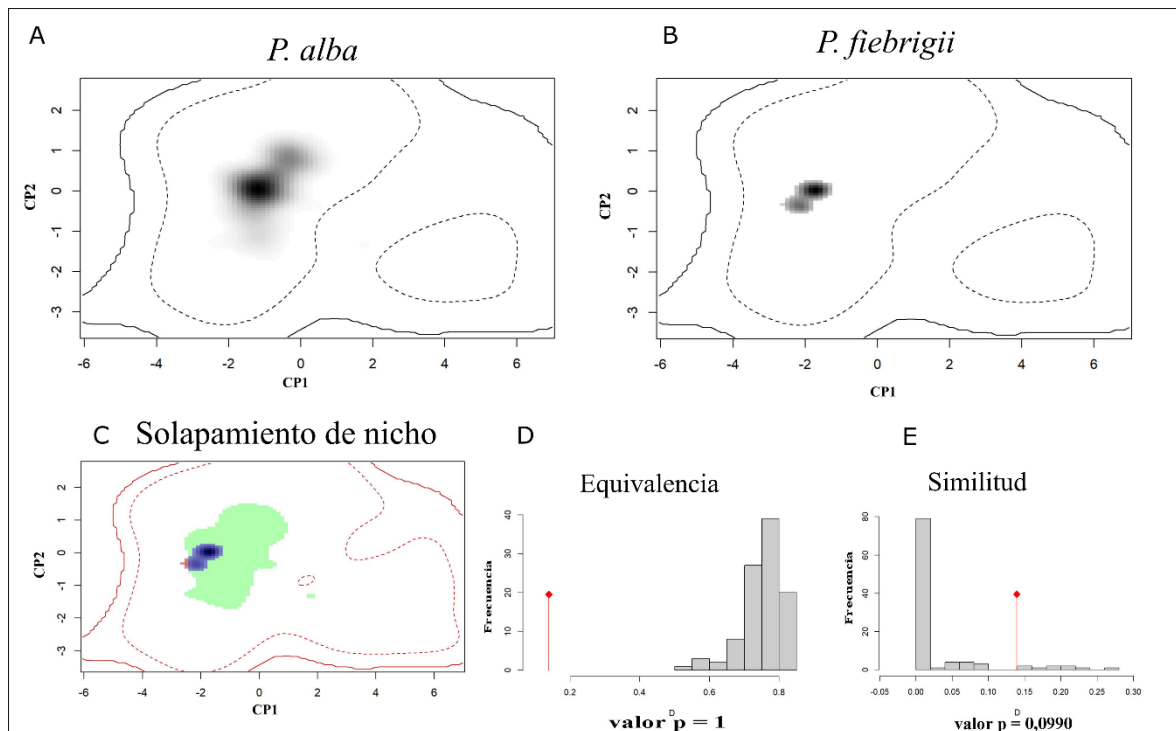


Figura 14. Solapamiento de nicho en *P. alba* y *P. fiebrigii* en el espacio climático. Los paneles A) y B) representan el nicho de *P. alba* y *P. fiebrigii* respectivamente, a lo largo de los dos primeros ejes del ACP basado en datos climáticos. El sombreado gris indica, cuanto más oscuro, mayor número de ocurrencias situadas en localidades con esas características climáticas del espacio de componentes principales. C) Superposición de nichos utilizando la métrica D, el cual se encuentra representado con el color azul y con color verde toda el área de nichos de ambas especies. Los histogramas D) y E) muestran los resultados de las pruebas de equivalencia y de similitud de nicho, las mismas se calcularon a partir de 1.000 repeticiones. Las barras grises muestran la frecuencia de los valores de D obtenidos en las simulaciones bajo las respectivas hipótesis nulas. La línea roja indica el valor observado del parámetro D.

Prosopis alba vs *P. hassleri*

El valor D para la comparación de nichos de *P. alba* vs *P. hassleri* es 0,16, por lo que la superposición de nicho entre las dos especies es del 16%. La prueba de equivalencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$), por lo que se rechaza la hipótesis nula de equivalencia de nichos; en tanto que la prueba de similitud si fue significativa ($p < 0,05$) indicando como resultado que los nichos son más similares entre sí que lo esperado por azar (Fig. 15).

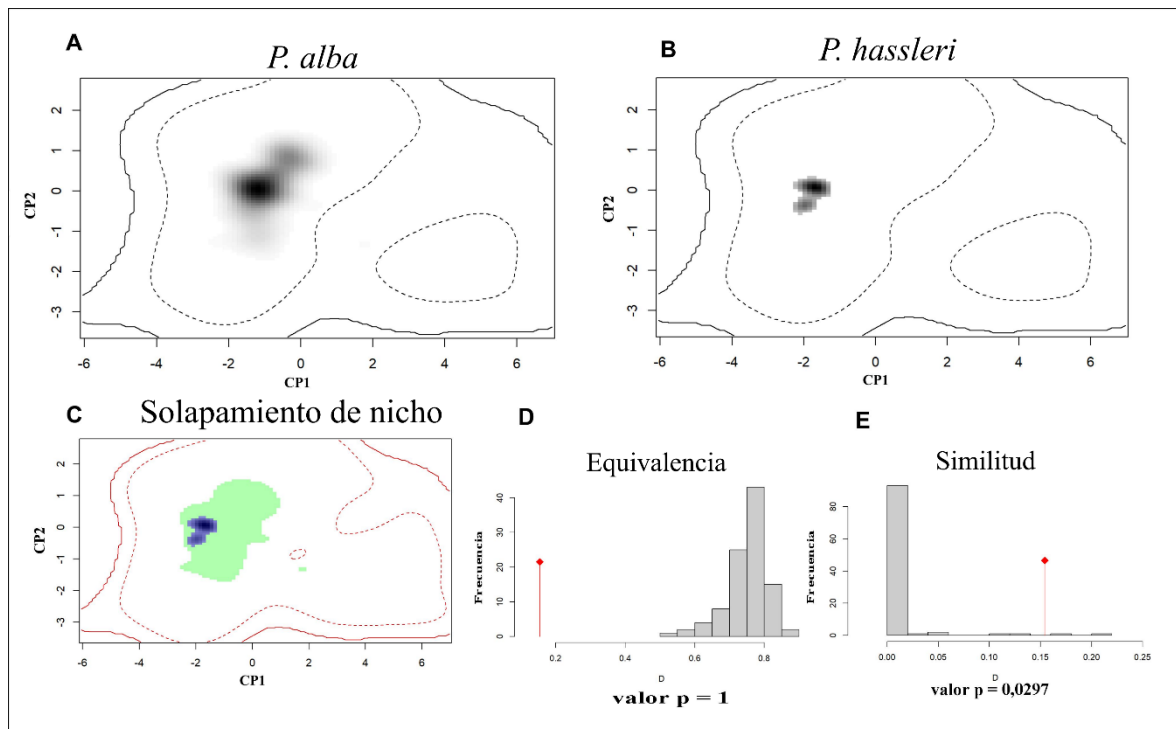


Figura 15. Solapamiento de nicho en *P. alba* y *P. hassleri* en el espacio climático. Los paneles A) y B) representan el nicho de *P. alba* y *P. hassleri* respectivamente a lo largo de los dos primeros ejes del ACP basado en datos climáticos. El sombreado gris indica, cuanto más oscuro, mayor número de ocurrencias situadas en localidades con las características climáticas del espacio de componentes principales. C) Superposición de nichos utilizando la métrica D, el cual se encuentra representado con el color azul y con color verde toda el área de nichos de ambas especies. Los histogramas D) y E) muestran los resultados de las pruebas de equivalencia y de similitud de nicho, las mismas se calcularon a partir de 1.000 repeticiones. Las barras grises muestran la frecuencia de los valores de D obtenidos en las simulaciones bajo las respectivas hipótesis nulas. La línea roja indica el valor observado del parámetro D.

Prosopis hassleri vs *P. fiebrigii*

El valor D para la comparación de nichos de *P. hassleri* vs *P. fiebrigii* es 0,75, por lo que la superposición de nicho entre las dos especies es del 75%. El valor obtenido para la prueba de equivalencia de nichos se encontró incluido dentro del 95% de los valores simulados ($p = 0,57$) por lo que la hipótesis nula de equivalencia no puede ser rechazada. La prueba de similitud resultó estadísticamente significativa ($p = 0,009$), por lo que los nichos además de ser equivalentes resultaron similares (Fig. 16).

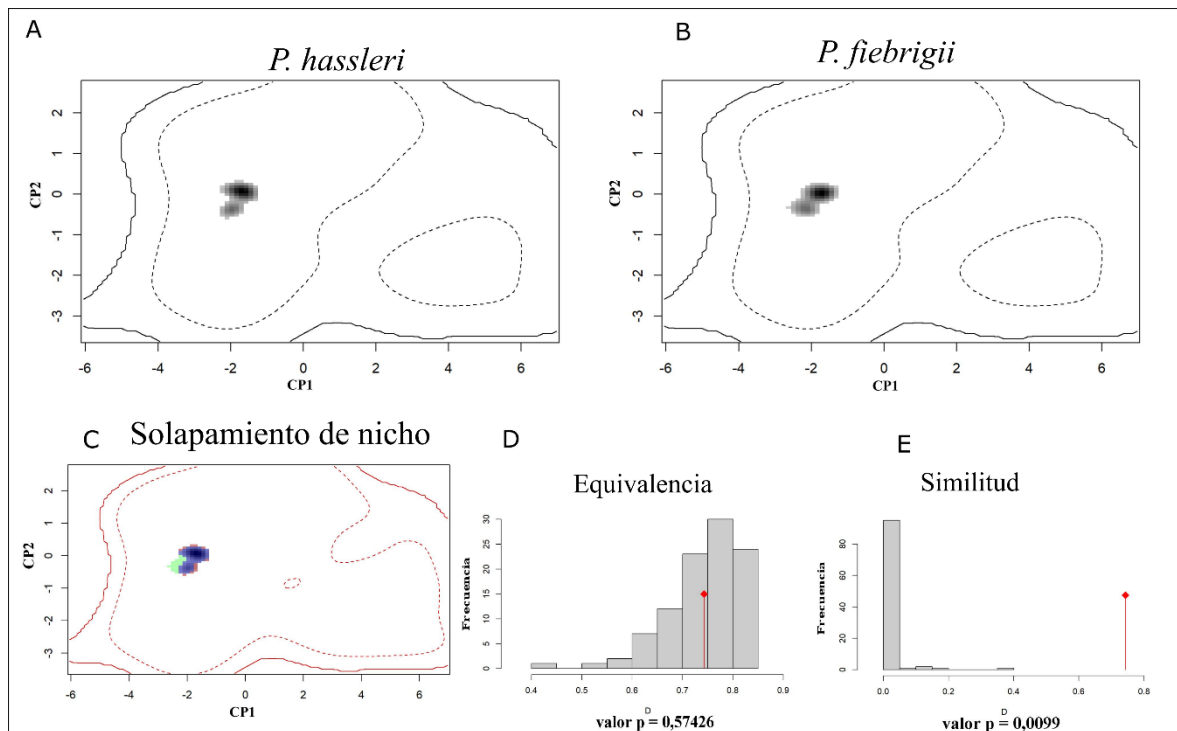


Figura 16. Solapamiento de nicho en *P. hassleri* y *P. fiebrigii* en el espacio climático. Los paneles A) y B) representan el nicho de *P. hassleri* y *P. fiebrigii* respectivamente a lo largo de los dos primeros ejes del ACP basado en datos climáticos. El sombreado gris indica, cuanto más oscuro, mayor número de ocurrencias situadas en localidades con esas las características climáticas del espacio de componentes principales. C) Superposición de nichos utilizando la métrica D, el cual se encuentra representado con el color azul y con color verde toda el área de nichos de ambas especies. Los histogramas D) y E) muestran los resultados de las pruebas de equivalencia y de similitud de nicho, las mismas se calcularon a partir de 1.000 repeticiones. Las barras grises muestran la frecuencia de los valores de D obtenidos en las simulaciones bajo las respectivas hipótesis nulas. La línea roja indica el valor observado del parámetro D.

3.2.3 Análisis de componentes principales para las variables climáticas

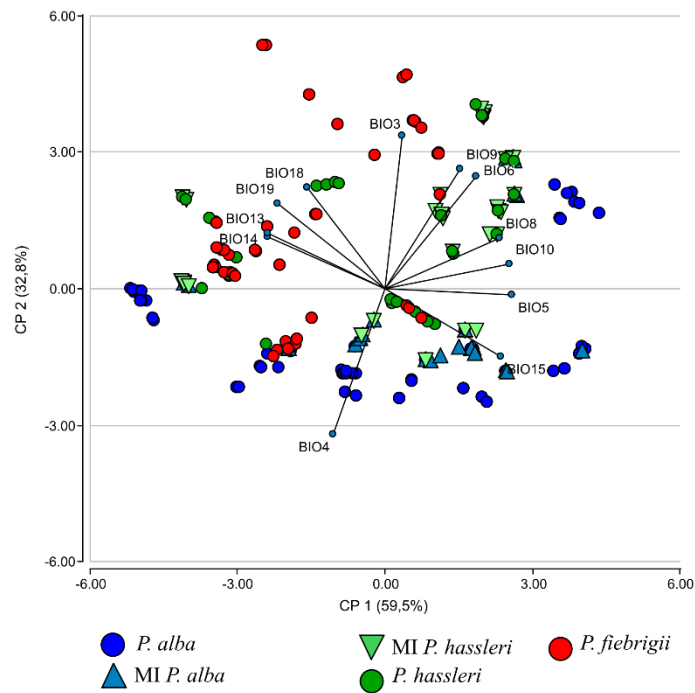


Figura 17. Biplot de los dos primeros ejes del ACP realizado utilizando las variables climáticas de mayor importancia en el modelado de nicho relacionadas con valores de precipitación y temperatura para los 420 individuos muestreados, diferenciando a los morfotipos puros y los morfotipos intermedios. MI, morfotipo intermedio.

El análisis de componentes principales realizado con las variables climáticas para visualizar el ordenamiento de todos los grupos morfológicos en el espacio climático, mostró que las dos primeras componentes CP1cli y CP2cli explican el 92,4 % de la variabilidad climática total (Fig.17). El primer componente, que resume el 59,5 % de la variación, ordena a los individuos puros y morfotipos intermedios de acuerdo a dos variables de temperatura, que son la temperatura máxima del mes más cálido (BIO 5) y la temperatura media del trimestre más cálido (BIO 10), y dos variables de precipitación, que son la precipitación del mes más húmedo (BIO 13) y la precipitación del mes más seco (BIO 14). Mientras que el segundo componente ordena los morfotipos principalmente de acuerdo a la isothermalidad (BIO 3), que es la relación entre rango diario medio (promedio mensual (temperatura máxima-temperatura mínima) y el rango anual de temperatura (que es la relación entre la temperatura máxima del mes más cálido y la temperatura mínima del mes más frío) y la estacionalidad de la temperatura (BIO 4). En términos generales se observa

que *P. hassleri* y *P. fiebrigii* ocupan los mismos sitios o sitios más próximos en el espacio climático respecto a *P. alba*. Se observa que los individuos puros de *P. alba* se encuentran distribuidos a lo largo de toda la componente 1, mientras que los individuos puros de *P. hassleri* y *P. fiebrigii* presentan una dispersión más restringida e intermedia sobre dicho eje.

También se observa que *P. hassleri*, y más notorio aún *P. fiebrigii* prevalecen en el cuadrante superior izquierdo, ocupando sitios con mayores precipitaciones (BIO 13, 14, 18 y 19), mayor isothermalidad (BIO 3) y menor estacionalidad (BIO 4) donde *P. alba* no se encuentra presente. Por su parte, se observa que los morfotipos intermedios están siempre asociados a *P. alba* o *P. hassleri* según el caso. Los morfotipos intermedios *P. alba* están restringidos principalmente al cuadrante inferior derecho (donde también se observan individuos de morfotipo intermedio *P. hassleri*), ocupando sitios con menores precipitaciones (BIO 13, 14, 18 y 19) y con mayor estacionalidad en las precipitaciones (BIO 15), mientras que los individuos del morfotipo intermedio *P. hassleri* presentan una gran dispersión tanto a lo largo del eje 1 como del eje 2.

3.2.4 Resultados principales

- El modelado de nichos permitió estimar la distribución potencial de *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii*.
- En general el modelado de las tres especies se ajusta a su distribución actual, evidenciándose, además, otras áreas climáticamente favorables en donde las respectivas especies no se habrían registrado. Por ejemplo, para el caso de *P. alba*, que es la especie de mayor distribución en Argentina, se evidencia que las áreas de mayor favorabilidad o probabilidad de presencia se extienden más hacia el sur de la distribución conocida.
- En cambio para *P. hassleri* y *P. fiebrigii*, que son las dos especies que presentan una distribución más restringida, su distribución potencial se extiende hacia el noreste de Argentina y Paraguay. Si bien, ambas especies comparten mayormente la distribución, la mayor probabilidad de presencia para *P. hassleri* se encuentra en el noreste de la Provincia de Formosa, extendiéndose hacia el noroeste de Paraguay mientras que *P. fiebrigii* se encuentra principalmente distribuido en Paraguay, presentando su área de mayor favorabilidad climática hacia el noreste de Paraguay.
- Al analizar los rangos de valores de las variables climáticas y geográficas de las especies puras *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii* y de los morfotipos intermedios se observó el solapamiento en el rango de valores para *P. fiebrigii* y *P. hassleri* en la mayoría de las

variables. No ocurrió lo mismo con *P. alba* la cual presentó un rango climático más amplio y con un solapamiento marginal con *P. hassleri* y *P. fiebrigii*. Los morfotipos intermedios siempre tomaron valores comprendidos en el rango de las especies puras.

- Para las variables precipitación del trimestre más cálido, y las temperaturas medias del trimestre más húmedo y más seco, *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii* comparten el mismo rango de valores (algo llamativo si se tiene en cuenta el amplio rango geográfico en el que se distribuye *P. alba*), mientras que los morfotipos intermedios se diferencian entre sí hacia un extremo y otro del rango de valores que toman las tres especies puras, encontrándose el morfotipo intermedio *P. alba* hacia zonas con menores valores de precipitación y temperatura, y el morfotipo intermedio *P. hassleri* hacia zonas con mayores valores de precipitación y temperatura.

- Para la variable estacionalidad de las precipitaciones se observa que los morfotipos intermedios *P. hassleri* son frecuentes en condiciones de alta estacionalidad donde los individuos puros *P. hassleri* y *P. fiebrigii* no lo son. Algo similar se observa para la variable estacionalidad de la temperatura, donde los morfotipos intermedios tanto tipo *P. alba* como *P. hassleri* son frecuentes en condiciones en las que *P. alba* puro es poco frecuente.

-En los análisis de solapamiento de nichos se encontró que los nichos entre *P. hassleri* y *P. fiebrigii* son equivalentes y similares; entre *P. alba* y *P. hassleri* son similares, pero no equivalentes y entre *P. alba* y *P. fiebrigii*, no son ni similares ni equivalentes.

- En el análisis de componentes principales, se observa que los individuos puros de *P. alba* se encuentran distribuidos a lo largo de toda la componente 1, mientras que los individuos puros de *P. hassleri* y *P. fiebrigii* presentan una dispersión más restringida e intermedia sobre dicho eje.

- En relación a la componente 2 se observa que los individuos localizados en el cuadrante superior, tanto los puros *P. alba*, *P. hassleri* y los morfotipos intermedios *P. hassleri* que están localizados principalmente en el cuadrante superior derecho del ACP y los individuos puros de *P. fiebrigii* localizados en el cuadrante superior izquierdo, corresponden a localidades de Paraguay, que presentan mayores precipitaciones, isotermalidad y menor estacionalidad.

3.3 Caracterización molecular

3.3.1. Secuencias de ADN cloroplastidial del complejo

3.3.1.1 Genealogía y distribución geográfica de haplotipos

A partir de la amplificación de la región *ndhF-rpL32* del genoma cloroplastidial, se obtuvo una matriz de 752 pares de bases (pb) con cinco sitios polimórficos, correspondientes a mutaciones puntuales de un nucleótido. Se identificaron seis haplotipos entre las 91 secuencias consideradas. Se resolvió una conexión ambigua (loop) que se generaba entre los haplotipos H4 y H6 siguiendo los criterios de topología, frecuencia y geográfico de Crandall y Templeton (1993).

En cuanto a la distribución geográfica de los seis haplotipos, los haplotipos H1 y H3 se encuentran ampliamente distribuidos, presentes en Paraguay y Argentina, mientras que 4 (H2, H4, H5 y H6) son exclusivos de Argentina. Los haplotipos H1 y H3 son compartidos por todas las especies y morfotipos, siendo el H1 más frecuente en *P. alba* (23/52) y el H3, más frecuente en *P. fiebrigii* (13/33) y en *P. hassleri* (9/33). El H4 es compartido por *P. alba* (un individuo) y *P. hassleri* (un individuo), el H2 y H5 solo se encontraron en el morfotipo intermedio *P. hassleri* (un individuo) y en el morfotipo intermedio *P. alba* (un individuo), respectivamente. Finalmente, el H6 se encontró solo en *P. alba* (dos individuos). En la Fig. 18 se muestran las relaciones genealógicas entre los haplotipos, su distribución geográfica y en que morfotipo fue detectado.

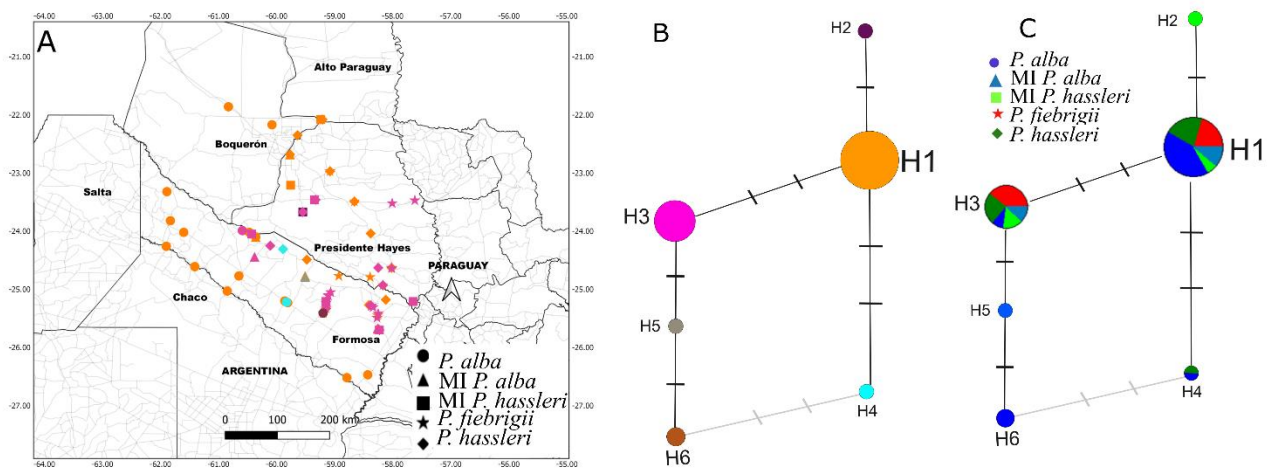


Figura 18. Estructura genética basada en secuencias de ADN de cloroplasto. A) Distribución geográfica de haplotipos. Los símbolos representan a los taxones estudiados y los colores indican el haplotipo. B) Red que representa las relaciones genealógicas entre los 6 haplotipos (designados con números) de ADN cloroplastidial. Los colores se corresponden con A). C) Red de haplotipos, pero discriminada por especies puras y morfotipos, los diferentes colores

corresponden a los diferentes taxones estudiados. En B. y C., el tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia de haplotipos. Las líneas transversales indican la cantidad de cambios mutacionales entre los distintos haplotipos. MI, morfotipo intermedio.

3.3.1.2 Estructuración poblacional y diversidad genética

El agrupamiento obtenido con $k=2$ (FCT= 0,73; $p < 0,00$), diferencia a un grupo (grupo Este) que reúne a individuos con los haplotipos H3 y H5 y en el que se encuentran representantes de todos los grupos morfológicos, a excepción de *P. alba*, y otro grupo que reúne a los individuos con los haplotipos H1, H2, H4 y H6 conformado por todos los grupos morfológicos (grupo Oeste; Fig 19). El agrupamiento con $k=3$ (FCT=0,74; $p < 0,00$) diferencia un tercer grupo, conformado con tres individuos del grupo Oeste (2 de *P. alba* y 1 de *P. fiebrigii*; Fig. 19A). Para el resto de los valores de k se comienzan a generar agrupamientos unitarios a pesar de maximizar la diferencia entre grupos (Tabla S4). Por lo tanto, se reconocen principalmente dos poblaciones genéticas, el grupo Este correspondiente a los individuos puros *P. fiebrigii* y *P. hassleri*, así como los morfotipos intermedios *P. alba* y *P. hassleri*, localizados desde el centro del área de estudio ($24^{\circ} 48' S$; $59^{\circ} 31' W$) hacia el este y el grupo Oeste compuesto principalmente por *P. alba*, aunque con representantes de todos los grupos morfológicos, localizados desde el centro hacia el Oeste (Fig. 19B). En cuanto a la diversidad genética, ambos grupos genéticos presentaron similares valores de diversidad haplotípica y nucleotídica (Tabla 6).

Al realizar el análisis de estructuración genética incluyendo sólo a *P. hassleri* y *P. fiebrigii* el agrupamiento óptimo recuperado con SAMOVA se obtuvo con $k=2$ (FCT=0,80; $p < 0,00$) ya que los análisis para el resto de los valores para k comienzan a generar agrupamientos unitarios a pesar de maximizar la diferencia entre grupos (Tabla S5). Por tanto, se reconocen dos poblaciones genéticas, una conformada en su mayoría por individuos de *P. fiebrigii*, y en menor medida de *P. hassleri* y el otro grupo compuesto principalmente por *P. hassleri* y algunos individuos de *P. fiebrigii* (Fig. 20). El grupo con mayor índice de diversidad haplotípica y nucleotídica es el compuesto principalmente por *P. fiebrigii* y algunos individuos de *P. hassleri* (Tabla 7).

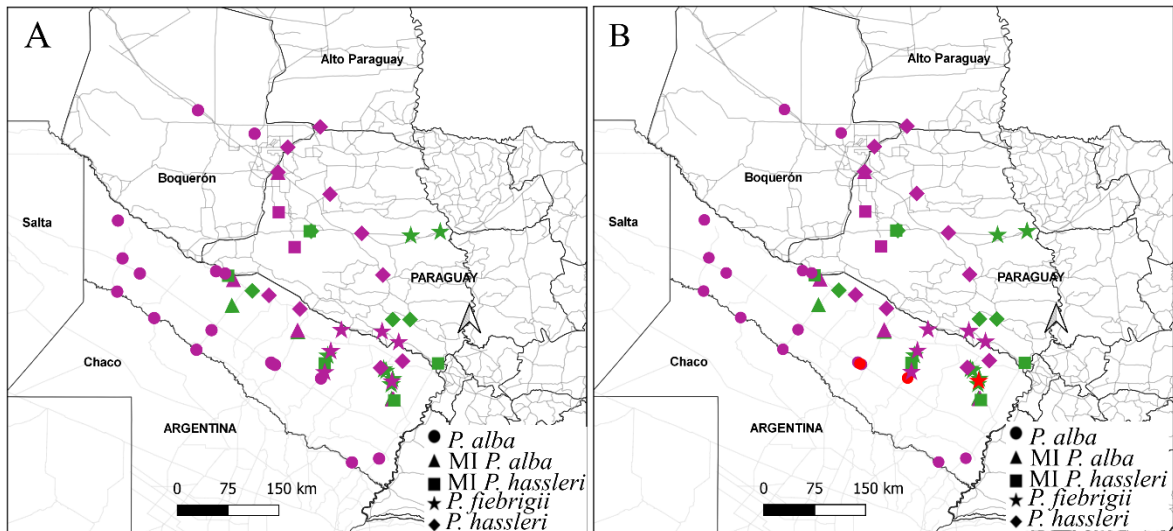


Figura 19. Localización geográfica y delimitación de las poblaciones genéticas determinadas por el análisis SAMOVA. A) Grupos obtenidos para $k = 2$ y B) Grupos para $k = 3$. Los símbolos representan a los grupos morfológicos estudiados y los colores indican el grupo genético (grupo Este, representado por el color verde y grupo Oeste representado por el color violeta). MI, morfotipo intermedio.

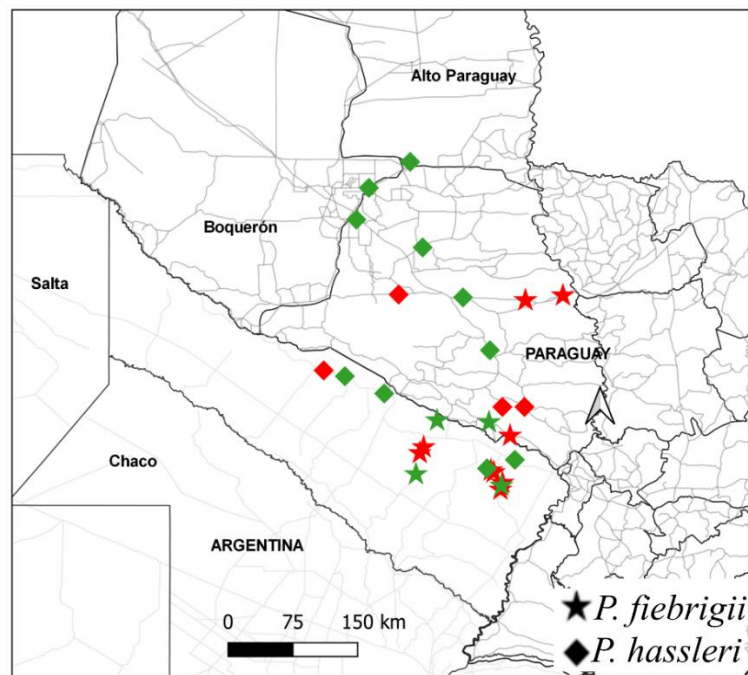


Figura 20. Localización geográfica y reconocimiento de las poblaciones genéticas determinadas por el análisis SAMOVA para *P. hassleri* y *P. fiebrigii*, grupos obtenidos para $k = 2$. Los símbolos representan a los morfotipos estudiados y los colores indican el grupo (Grupo 1, representado por el color rojo y grupo 2 representado por el color verde).

La diferenciación genética entre individuos puros y morfotipos explica el 18% de la varianza total, y esta diferenciación entre grupos es significativa (FCT= 0,187; $p = 0,0009$). Al hacer AMOVAs pareados para ver entre qué especies hay diferencias, solo se encontró que *P. alba*

y *P. fiebrigii* se diferencian significativamente (FCT= 0,302; $p = 0,002$), el resto de las especies no se diferencian significativamente entre sí ($p > 0,05$). La mayor variación genética (el 68,95 %) se encuentra entre individuos de la misma localidad.

3.3.1.3 Análisis demográficos de las poblaciones genéticas

Los índices F_s de Fu (Fu, 1997) y D de Tajima (Tajima, 1989) no resultaron estadísticamente significativos ni para los 2 grupos obtenidos con SAMOVA y tampoco cuando se corrieron los análisis para todo el complejo (Tabla 7). Con este resultado no hay evidencia de expansión demográfica en las poblaciones genéticas. Este escenario se respalda con los resultados obtenidos para los análisis de distribución de frecuencias de diferencias pareadas ya que ambos grupos muestran curvas que no se ajustan a lo esperado bajo un modelo de expansión demográfica (Tabla 6 y Fig. 21 A-C).

Cuando se corrió el mismo análisis para *P. hassleri* y *P. fiebrigii* los estadísticos F_s y D no resultaron estadísticamente significativos para los 2 grupos obtenidos con SAMOVA y tampoco cuando se corrieron los análisis para todos los individuos (Tabla 7). Con este resultado no hay evidencia de expansión demográfica en las poblaciones genéticas.

Por último, los Bayesian Skyline Plot (BSP) realizados para todo el complejo y para el grupo 2, que presentó un valor más cercano al de significancia, muestran un patrón de estabilidad, es decir no hay un patrón de cambio del tamaño efectivo en el tiempo, lo cual es consistente con todos los resultados anteriores (Fig. 21 C y D).

Tabla 6. Índices de diversidad y análisis demográficos obtenidos para el complejo *Prosopis* (considerada como una única población) y para los 2 grupos de poblaciones genéticas derivados del análisis espacial de la varianza molecular. Número de muestras (N), número de haplotipos (H), identidad de los haplotipos (ID), número de sitios polimórficos (S), diversidad haplotídica (h), diversidad nucleotídica (π) y número promedio de diferencias pareadas (p +/- SD). D de Tajima (nivel de significación: $p < 0,05$), Fs de Fu (nivel de significación: $p < 0,02$), suma de los desvíos al cuadrado (SSD; nivel de significación $p < 0,05$) para un modelo de expansión demográfica como hipótesis nula. En negrita se muestran los resultados compatibles con expansiones demográficas. n.s. resultados no significativos. MI, morfotipo intermedio

Grupos	N	Morfotipos	H	ID	S	Índices de diversidad			Análisis Demográficos		
						<i>h</i>	<i>π</i>	<i>p</i>	D	Fs	SSD
Complejo <i>Prosopis</i>	60	<i>P. alba</i> , MI <i>P. alba</i> y MI <i>P.</i> <i>hassleri</i> , <i>P.</i> <i>hassleri</i> y <i>P. fiebrigii</i>	6	H1, H2, H3, H4, H5, H6	5	0,525 +/- 0,054	0,001 5 +/- 0,001	1,127 +/- 0,748	0.140 n.s.	-0,460 n.s.	0,126 n.s.
Grupo Este	19	MI <i>P. alba</i> y MI <i>P.</i> <i>hassleri</i> , <i>P.</i> <i>hassleri</i> y <i>P. fiebrigii</i>	2	H3, H5	3	0,292 +/- 0,127	0,000 6 +/- 0,001	0,503 +/- 0,447	- 1,410 n.s.	-2,089 n.s.	0,027 n.s.
Grupo Oeste	41	<i>P. alba</i> , MI <i>P. alba</i> y MI <i>P.</i> <i>hassleri</i> , <i>P.</i> <i>hassleri</i> y <i>P. fiebrigii</i>	4	H1, H2, H4, H6	5	0,231 +/- 0,086	0,000 7 +/- 0,001	0,517 +/- 0,444	- 1,126 n.s.	-0,234 n.s.	0,028 n.s.

Tabla 7. Índices de diversidad y análisis demográficos obtenidos para *P. hassleri*-*P. fiebrigii* (considerada como una única población) y para los 2 grupos de poblaciones derivados del análisis espacial de la varianza molecular. Número de muestras (N), número de haplotipos (H), identidad de los haplotipos (ID), número de sitios polimórficos (S), diversidad haplotídica (h), diversidad nucleotídica (π) y número promedio de diferencias pareadas (p +/- SD). D de Tajima (nivel de significación: $p < 0,05$), Fs de Fu (nivel de significación: $p < 0,02$), suma de los desvíos al cuadrado (SSD; nivel de significación $p < 0,05$) para un modelo de expansión demográfica reciente como hipótesis nula. En negrita se muestran los resultados compatibles con expansiones demográficas. n.s. resultados no significativos.

Grupos	N	H	ID	S	Índices de diversidad			Análisis Demográficos		
					h	π	p	D	Fs	SSD
<i>P. hassleri</i> - <i>P. fiebrigii</i>	27	3	H1, H2, H3	4	0,529 +/- 0,059	0.0015 +/- 0,0011	1,117 +/- 0,752	0,201 n.s	1,801 n.s.	0,194 n.s.
Grupo <i>P. fiebrigii</i>	13	2	H1, H2	2	0,385 +/- 0,132	0,0010 +/- 0,0009	0,769 +/- 0,600	0,543 n.s.	1,907 n.s.	0,2958 *
Grupo <i>P. hassleri</i>	14	2	H1, H3	2	0,143 +/- 0,119	0.0004 +/- 0,0005	0,286 +/- 0,323	-1,481 (p=0,0 5)	-0,296 n.s.	0,0278 n.s.

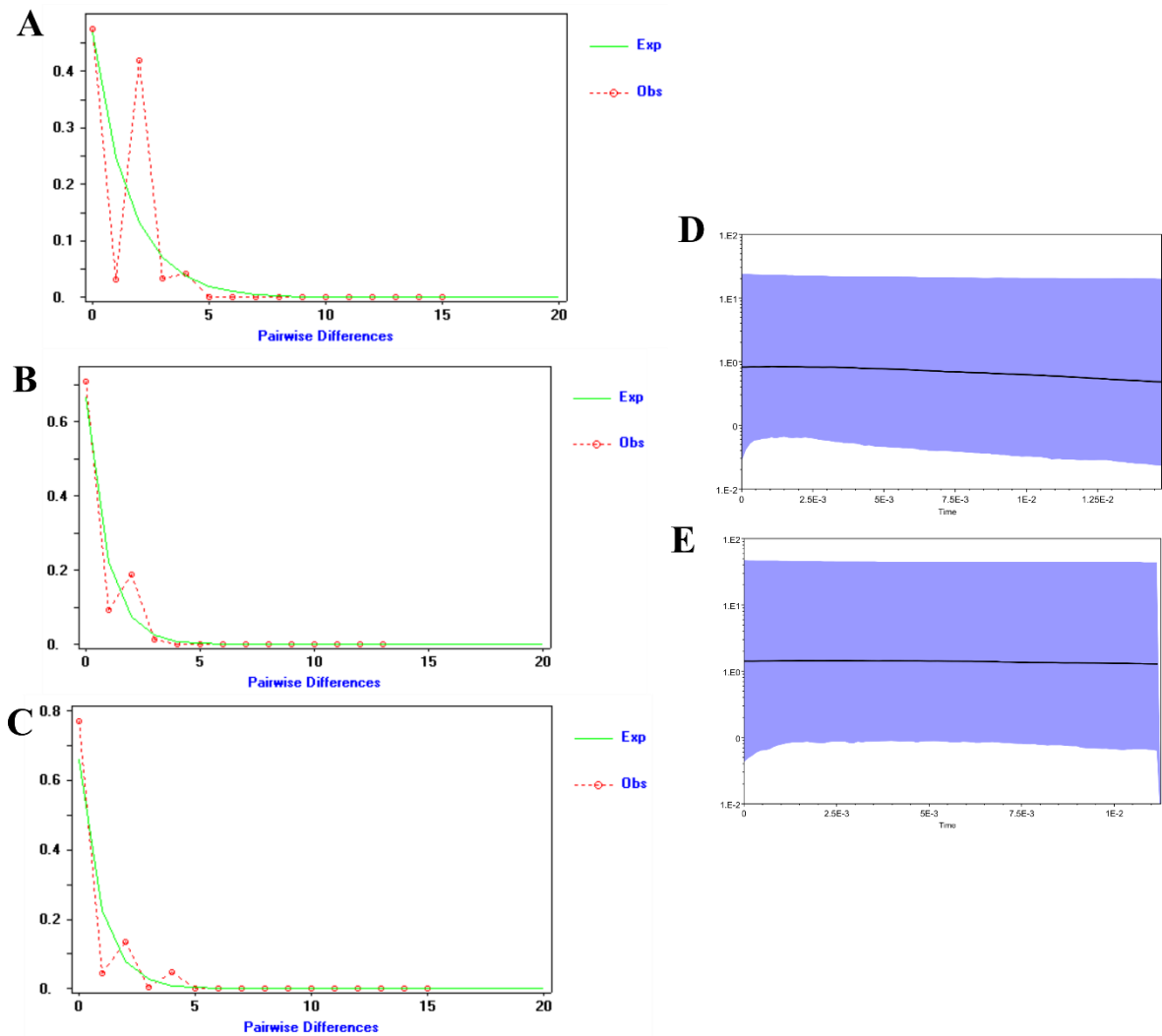


Figura 21. Distribución de frecuencias de diferencias pareadas para: A) Todo el complejo; B) Grupo Este; C) Grupo Oeste. Perfil demográfico estimado con BSP para todo el complejo (D) y para el filigrupo noroeste (E). La línea continua representa los valores medios estimados y el área sombreada el intervalo de credibilidad (95% HDP).

3.3.1.4 Resultados principales

- Se encontraron un total de seis haplotipos distribuidos en Argentina y Paraguay, de los cuales cuatro son exclusivos de Argentina.
- Los haplotipos H1 y H3, que son los haplotipos ampliamente distribuidos, son compartidos por todos los grupos morfológicos.
- Tres haplotipos de baja frecuencia fueron exclusivos de algún grupo morfológico, el H2 del morfotipo intermedio *P. hassleri*, el H5 del morfotipo intermedio *P. alba*, y el H6 de los individuos puros *P. alba*.
- El agrupamiento óptimo obtenido a través del SAMOVA fue de $k=2$, diferenciando a un grupo de individuos con los haplotipos H3 y H5 en el que se encuentran representantes de

todos los grupos morfológicos (a excepción de *P. alba*) y cuya distribución espacial es principalmente desde el centro hacia el este; el otro grupo que reúne a individuos con los haplotipos H1, H2, H4 y H6 conformado por todos los individuos puros y morfotipos intermedios y cuya distribución geográfica es principalmente el centro y oeste del área de estudio.

- Cuando se realizó el mismo análisis sólo para *P. hassleri* y *P. fiebrigii* se recuperaron dos grupos, uno representado principalmente por individuos puros de *P. fiebrigii* y otro representado principalmente por individuos puros de *P. hassleri*.

- No se encontró evidencia de expansión demográfica en las poblaciones genéticas en ninguno de los casos.

3.3.2 *Microsatélites*

No se detectó desequilibrio por ligamiento (LD) significativo entre ninguno de los pares de loci SSR genotipados (p ajustado $< 0,003$), por lo cual se puede afirmar que hay segregación independiente entre todos los marcadores estudiados (Tabla S6).

Mediante el programa MICROCHECKER, se encontró existencia de alelos nulos para los marcadores GL6 y GL12 de los grupos morfológicos 3 y 4 correspondientes a los morfotipos intermedios (tipo *P. alba* y tipo *P. hassleri*, respectivamente), y para el marcador GL6 del grupo 4 correspondiente a *P. hassleri*. Sin embargo, el cálculo global de F_{st} incluyendo todos los marcadores, realizados sin corrección (0,0545) y con corrección (0,0538) de alelos nulos en el programa FreeNA fue muy similar. Esto sugiere que estos loci pueden usarse como marcadores adecuados para evaluar la diversidad genética y la estructura de las poblaciones en estas especies.

3.3.2.1 *Índices de diversidad genética*

Los loci de microsatélites fueron polimórficos en todos los grupos morfológicos, encontrándose un número total de 74 alelos, y de 5 a 15 alelos por locus. El número de alelos por grupo varió entre 27 y 46 (Tabla 8).

Los parámetros de diversidad genética se muestran en la Tabla 9. El promedio de la heterocigocidad observada (H_o) de los loci polimórficos de cada grupo varió entre 0,402 (morfotipo intermedio *P. hassleri*) a 0,665 (*P. alba*_Isla cuba) y el de la heterocigosis esperada (H_e) varió entre 0,494 (*P. hassleri*) a 0,674 (*P. alba*_Isla cuba). La Riqueza alélica mostró el valor más alto en el morfotipo intermedio *P. alba* ($R_a=5,8$) y en los dos grupos morfológicos correspondientes a los individuos puros *P. alba* (grupo morfológico 1, $R_a=5,3$,

grupo morfológico 2, $R_a=5,5$). El índice de diversidad de Shannon también fue mayor para estos tres grupos.

Tabla 8. Parámetros de diversidad genética para los loci polimórficos de los microsatélites analizados para todos los grupos morfológicos (*P. alba*_Isla cuba, *P. alba*, morfotipo intermedio *P. alba*, morfotipo intermedio *P. hassleri*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii*). Número de individuos (N), número de alelos (Na), número de alelos efectivos (Ne), riqueza alélica (R_A), heterocigocidad observada (Ho), heterocigocidad esperada (He), índice de diversidad de Shannon (I).

<i>P. alba</i> _Isla Cuba								<i>P. alba</i>							
Locus	N	Na	Ne	R_A	Ho	He	I	Locus	N	Na	Ne	R_A	Ho	He	I
Mo08	30	5	1,9	3,8	0,467	0,463	0,964	Mo08	14	4	1,7	3,5	0,500	0,416	0,832
Mo13	30	7	3,6	4,9	0,700	0,722	1,490	Mo13	15	5	3,4	4,4	0,533	0,702	1,357
GL6	30	5	1,9	3,4	0,366	0,471	0,923	GL6	15	6	1,8	3,9	0,400	0,440	0,950
GL8	30	12	6,4	7,9	0,800	0,844	2,150	GL8	15	8	4,9	6,5	0,600	0,796	1,811
GL15	29	5	3,1	4,1	0,793	0,678	1,297	GL15	12	10	6,3	8,5	0,750	0,840	2,047
GL12	29	12	7,4	7,7	0,862	0,866	2,176	GL12	14	7	3,5	6,1	0,500	0,714	1,541
Promedio	30	8	4,1	4,1	0,665	0,674	1,500	Promedio	14	7	3,6	5,5	0,547	0,651	1,423
Morfotipo intermedio <i>P. alba</i>								Morfotipo intermedio <i>P. hassleri</i>							
Locus	N	Na	Ne	R_A	Ho	He	I	Locus	N	Na	Ne	R_A	Ho	He	I
Mo08	8	4	1,5	4,0	0,375	0,328	0,689	Mo08	11	3	1,5	2,9	0,364	0,329	0,600
Mo13	9	7	3,3	6,5	0,556	0,698	1,532	Mo13	11	4	1,6	3,4	0,364	0,398	0,752
GL6	10	5	3,5	4,9	0,100	0,715	1,426	GL6	11	4	1,8	3,6	0,182	0,463	0,862
GL8	9	6	2,5	5,7	0,778	0,593	1,271	GL8	10	4	1,9	3,8	0,400	0,500	0,914
GL15	10	9	6,3	8,0	0,800	0,840	1,987	GL15	10	8	4,7	7,0	0,800	0,826	1,756
GL12	9	6	5,1	5,9	0,333	0,802	1,692	GL12	10	5	1,9	4,3	0,300	0,511	1,010
Promedio	9	6	3,7	5,8	0,490	0,663	1,433	Promedio	11	5	2,2	4,2	0,402	0,480	0,982
<i>P. hassleri</i>								<i>P. fiebrigii</i>							
Locus	N	Na	Ne	R_A	Ho	He	I	Locus	N	Na	Ne	R_A	Ho	He	I
Mo08	12	2	1,5	2,0	0,250	0,330	0,512	Mo08	22	3	2,2	2,9	0,545	0,551	0,918
Mo13	12	4	1,8	3,3	0,333	0,451	0,836	Mo13	21	5	2,1	3,8	0,571	0,533	1,037
GL6	11	2	1,3	2,0	0,091	0,236	0,398	GL6	24	5	1,8	3,2	0,292	0,452	0,865
GL8	13	6	2,9	4,7	0,769	0,657	1,297	GL8	22	6	2,3	3,9	0,409	0,571	1,118
GL15	13	8	4,4	4,3	0,769	0,772	1,707	GL15	21	12	8,1	8,4	0,810	0,876	2,246
GL12	12	5	2,1	4,3	0,667	0,521	1,055	GL12	23	7	1,9	4,1	0,478	0,463	1,026
Promedio	12	5	2,3	3,8	0,480	0,494	0,968	Promedio	22	6	3,1	4,4	0,518	0,574	1,202

3.3.2.2 Frecuencias alélicas

Se calcularon las frecuencias alélicas para cada locus para los 6 grupos morfológicos (Fig. 22 y 23). Los marcadores más polimórficos fueron el GL8, GL12 y GL15, con 15 alelos cada uno. La mayoría de los alelos son compartidos por los individuos puros y morfotipos intermedios. Sin embargo, se detectaron un total de 23 alelos exclusivos. De los cuales, nueve se encontraron exclusivamente en *P. alba*_Isla Cuba (en todos los loci, menos en el GL15), siete en *P. alba* (en todos los loci, menos en el MO08), tres en el morfotipo intermedio *P. alba* (uno para el locus GL8, uno para el locus GL6 y uno para el GL15), uno en el morfotipo intermedio *P. hassleri* (para el locus G16), uno en *P. hassleri* (para el marcador GL8), y cuatro en *P. fiebrigii* (para los marcadores Mo13, GL12, GL15 y G16). Además, un alelo se encontró exclusivamente en los individuos de *P. alba* de ambas procedencias (*P. alba* y *P. alba*_ Isla Cuba; locus Mo08).

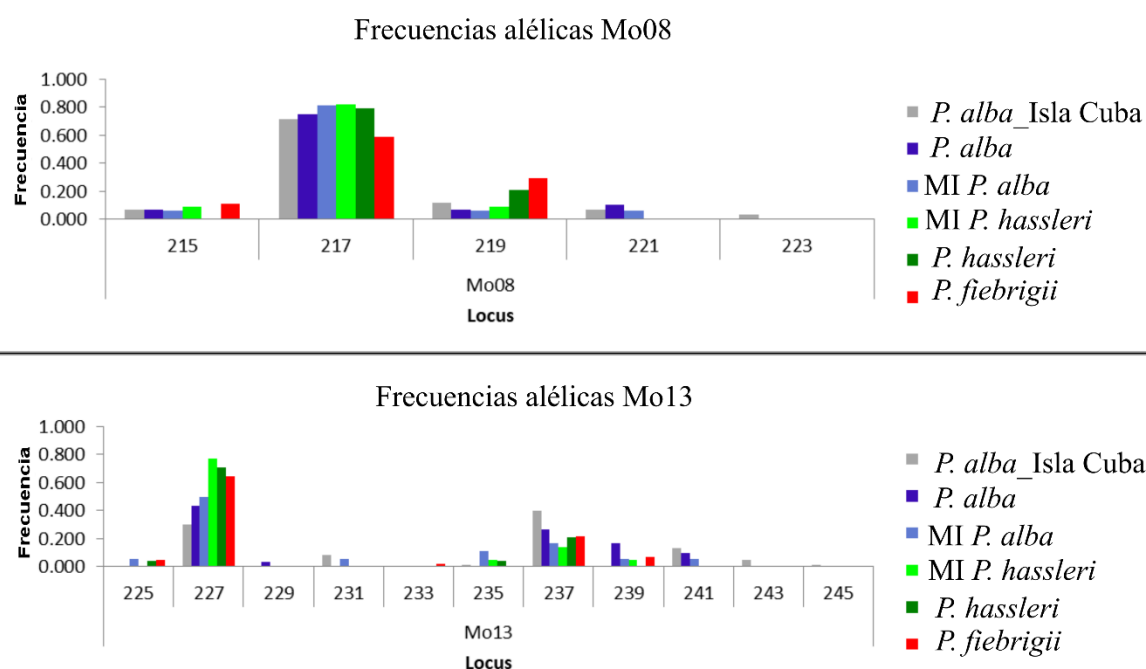


Figura 22. Frecuencias alélicas en los loci de microsatélites Mo08 y Mo13 para los 6 grupos morfológicos analizados. MI, morfotipo intermedio

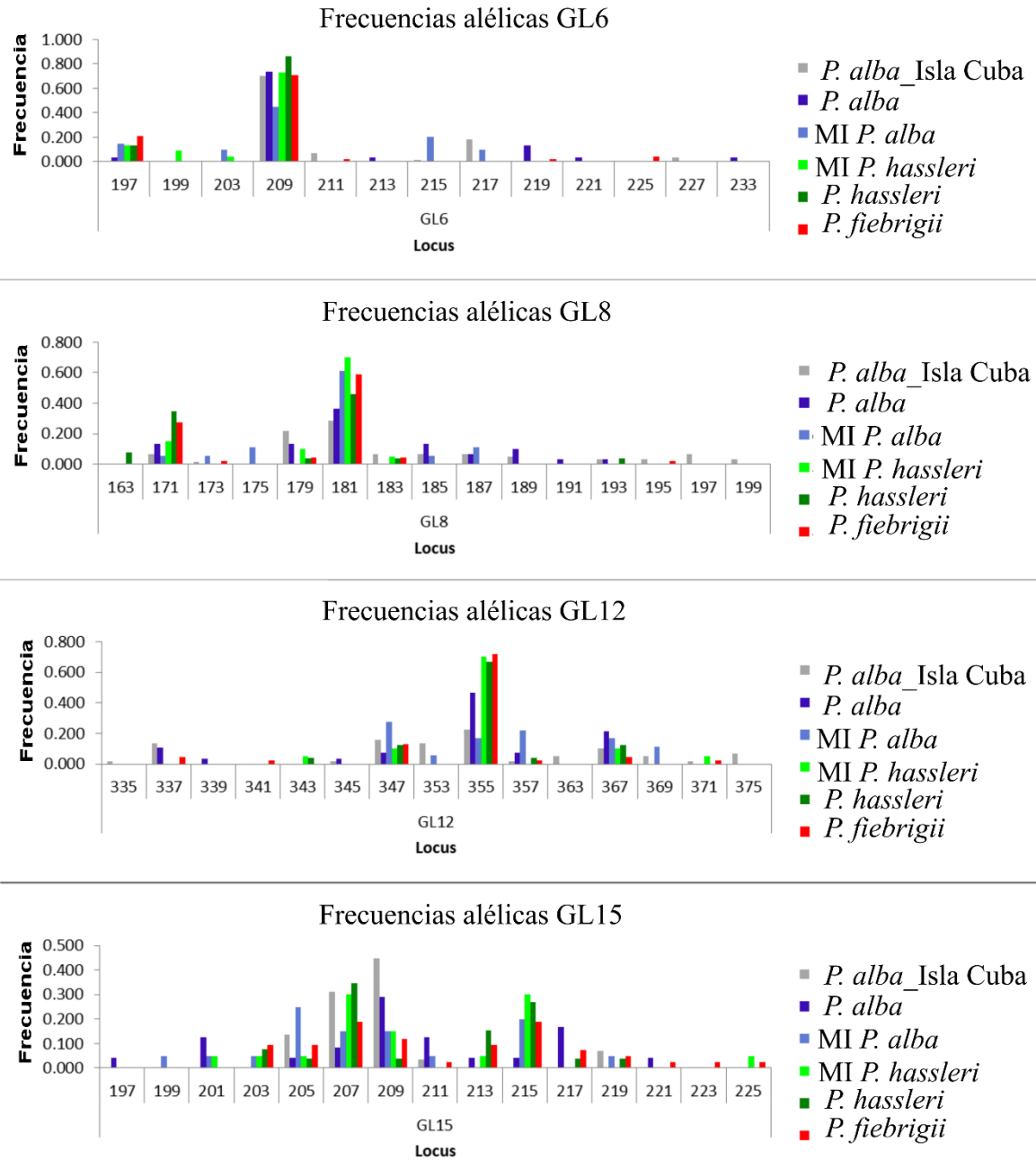


Figura 23. Frecuencias alélicas en los loci de microsatélites GL6, GL8, GL12 y GL15 para los 6 grupos morfológicos analizados. MI, morfotipo intermedio

El análisis de componentes principales realizado sobre las frecuencias alélicas para visualizar el ordenamiento de los individuos puros y morfotipos intermedios según su variabilidad genética, mostró que las dos primeras componentes (CP1g y CP2g) resumen el 13,9 % y el 9,3 % de la variabilidad genética observada, respectivamente (Fig. 24). El ordenamiento a lo largo del eje 1 muestra una variación continua entre los grupos morfológicos en las frecuencias alélicas. En ese gradiente se encuentran en el extremo izquierdo y bastante bien diferenciados los individuos puros *P. alba* de Isla Cuba, luego,

aunque hay una superposición de los distintos morfotipos, predominan los individuos puros *P. alba*, luego individuos puros *P. fiebrigii* y *P. hassleri*. Es decir, *P. alba*_Isla Cuba y *P. alba* se encuentran principalmente en los cuadrantes de la izquierda, y *P. hassleri* y *P. fiebrigii* en los cuadrantes de la derecha. Entre los morfotipos puros de *P. alba*, *P. fiebrigii* y *P. hassleri* se distribuyen de manera solapada los individuos intermedios *P. alba* y *P. hassleri*. A lo largo de la CP2 se observa un solapamiento total entre los grupos analizados.

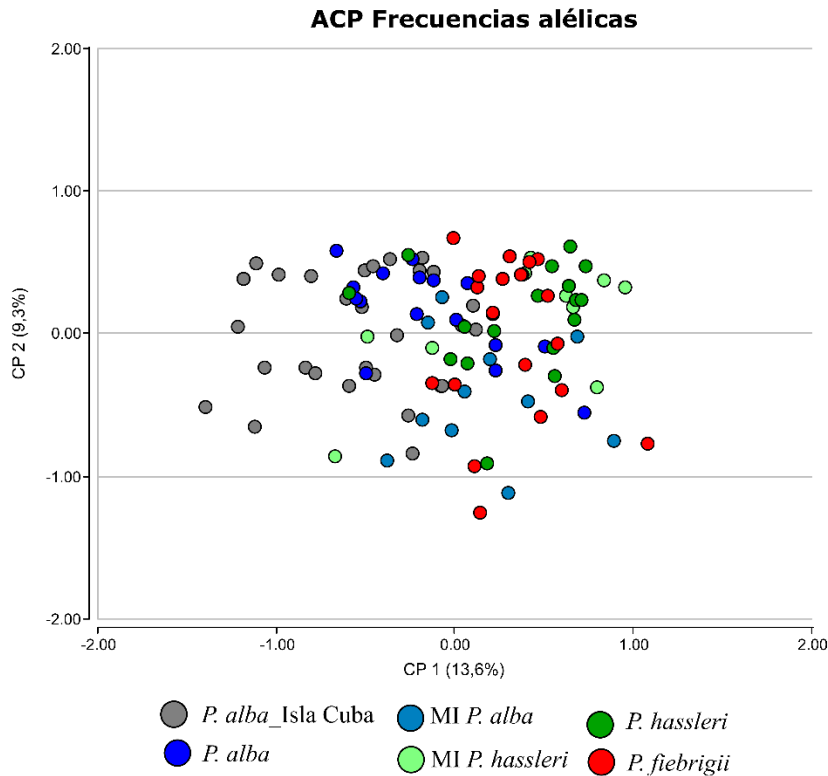


Figura 24. Biplot de los dos primeros ejes del ACP sobre las frecuencias alélicas obtenidas con el análisis de microsatélites para los 6 grupos morfológicos. Los diferentes colores corresponden a los diferentes grupos morfológicos. MI, morfotipo intermedio

3.3.2.3 Diferenciación genética entre los grupos morfológicos

En base a la distancia genética de Nei entre los grupos morfológicos (Tabla 9) se construyó un dendrograma para visualizar las similitudes genéticas entre grupos (Fig. 25). La mayor distancia de Nei se encontró principalmente entre los grupos 1 y 2 (correspondientes a *P. alba*_Isla Cuba y *P. alba*, y los grupos 4, 5 y 6 correspondientes al morfotipo intermedio *P. hassleri*, y a los individuos puros *P. hassleri* y *P. fiebrigii* (Tabla 9). Las menores distancias genéticas agruparon a *P. hassleri*, *P. fiebrigii* y el morfotipo

intermedio *P. hassleri*, ubicando al morfotipo intermedio *P. alba* en una posición intermedia, pero más asociado al último grupo mencionado.

Tabla 9. Distancia genética de Nei entre los cuatro morfotipos encontrados. Los grupos del 1 al 6 se corresponden con los grupos morfológicos *P. alba*_Isla Cuba, *P. alba*, morfotipo intermedio *P. alba*, morfotipo intermedio *P. hassleri*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii*, respectivamente.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
0,115					Grupo 1
0,204	0,108				Grupo 2
0,219	0,114	0,139			Grupo 3
0,210	0,115	0,182	0,035		Grupo 4
0,237	0,121	0,189	0,036	0,032	Grupo 6

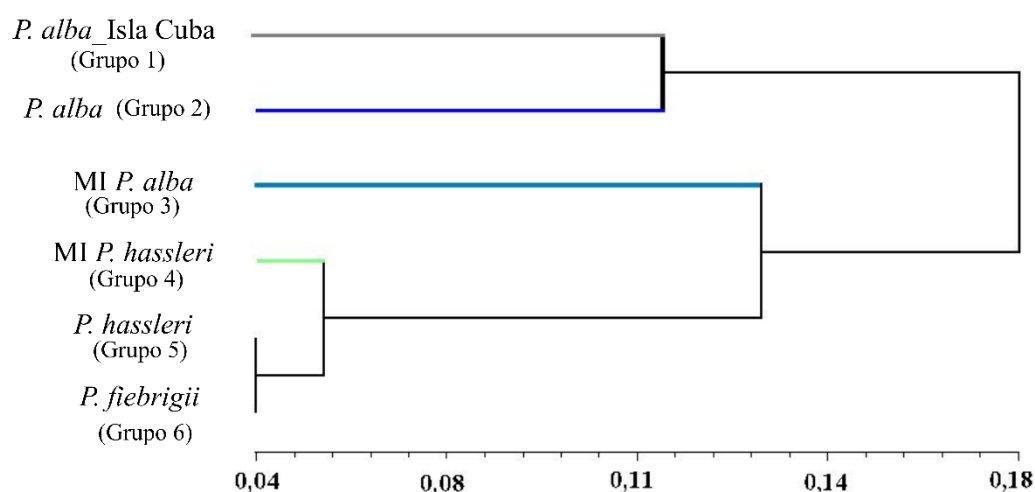


Figura 25. Dendrograma obtenido por el análisis UPGMA correspondiente a las distancias genéticas de Nei entre los seis grupos morfológicos (*P. alba*_Isla Cuba, *P. alba*, Morfotipo *P. alba*, Morfotipo *P. hassleri*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii*).

El AMOVA realizado entre todos los grupos fue significativo ($F_{st}=0,043$; $p = 0,0001$) y en prácticamente todos los pares comparados también (Tabla 10). De manera coincidente con la agrupación obtenida con la distancia de Nei, las comparaciones que arrojaron diferencias no significativas fueron entre el morfotipo intermedio tipo *P. hassleri* con *P. hassleri* y con *P. fiebrigii* (Tabla 10).

Tabla 10. Valores de Fst entre pares de grupos morfológicos. En negrita se muestran las comparaciones que no fueron significativas ($p > 0,05$). MI, morfotipo intermedio.

Pares Morfotipos	FST	P
<i>P. alba</i> _Isla Cuba- <i>P. alba</i>	0,0261	0,0020
<i>P. alba</i> _Isla Cuba- MI <i>P. alba</i>	0,0443	0,0004
<i>P. alba</i> _Isla Cuba- MI <i>P. hassleri</i>	0,0855	0,0001
<i>P. alba</i> _Isla Cuba- <i>P. hassleri</i>	0,0776	0,0001
<i>P. alba</i> _Isla Cuba- <i>P. fiebrigii</i>	0,0858	0,0001
<i>P. alba</i> - MI <i>P. alba</i>	0,0214	0,0443
<i>P. alba</i> – MI <i>P. hassleri</i>	0,0254	0,0276
<i>P. alba</i> - <i>P. hassleri</i>	0,0250	0,0215
<i>P. alba</i> - <i>P. fiebrigii</i>	0,0252	0,0061
MI <i>P. alba</i> - MI <i>P. hassleri</i>	0,0344	0,0150
MI <i>P. alba</i> - <i>P. hassleri</i>	0,0262	0,0452
MI <i>P. alba</i> - <i>P. fiebrigii</i>	0,0433	0,0017
MI <i>P. hassleri</i> - <i>P. hassleri</i>	-0,0126	0,7990
MI <i>P. hassleri</i> - <i>P. fiebrigii</i>	-0,0040	0,5870
<i>P. hassleri</i> - <i>P. fiebrigii</i>	-0,0085	0,8200

3.3.2.4 Análisis bayesiano de estructuración genética

Los resultados del análisis de agrupación bayesiana realizado con el programa STRUCTURE, y posteriormente analizados con el programa Harvester (Earl, 2011) mostraron un número óptimo de 2 grupos genéticos o clusters (Fig. 26 y Figura S1).

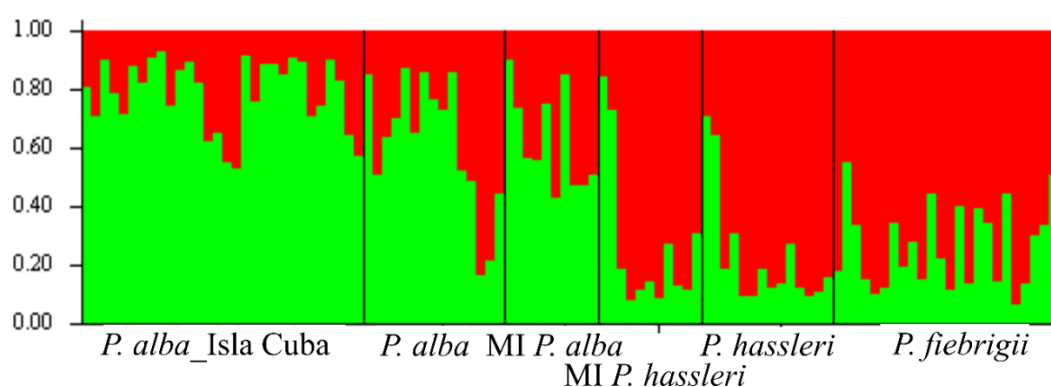


Figura 26. Representación gráfica del análisis de agrupamiento bayesiano realizado para los 104 individuos basado en 6 loci de microsatélites para $k=2$. Los colores diferentes representan distintos grupos genéticos. MI, morfotipo intermedio.

Los grupos genéticos se esquematizan a través de 2 colores diferentes y puede observarse que en los grupos en los que se observa mayor proporción del color verde corresponden a los individuos que morfológicamente corresponden a individuos puros *P.*

alba (*P. alba*_Isla Cuba y *P. alba*). En cambio, los grupos donde la mayor proporción es el color rojo, corresponden al morfotipo intermedio *P. hassleri*, y a los individuos puros de *P. hassleri* y *P. fiebrigii*.

El resultado del STRUCTURE es consistente con el dendrograma y con los AMOVAs realizados entre los diferentes grupos morfológicos, en el que se forman principalmente dos grupos, uno correspondientes a las especies puras de *P. alba* y otro agrupando al morfotipo intermedio *P. hassleri*, a *P. hassleri* y *P. fiebrigii* y el morfotipo intermedio *P. alba* en una posición intermedia a ambos grupos. Sin embargo, algunos individuos que morfológicamente corresponden a *P. alba* puros (*P. alba*_Isla Cuba y *P. alba*) presentan entre un 40-80% del genoma correspondiente a las especies *P. hassleri* y *P. fiebrigii*. Este desacople entre la información morfológica y la genética será tratada en la sección de análisis integradores (ver más abajo).

El análisis STRUCTURE realizado en tres zonas diferentes (Fig. 27): a) zona Noroeste, donde están presentes todos los morfotipos; b) zona Centro, donde el único morfotipo que no se encuentra es *P. alba*, y por último c) zona Noreste, donde también se encuentran todos los morfotipos, arrojó también para las zonas Noroeste y centro, el número óptimo de $k=2$, mientras que, para la zona Noreste, el mejor k resultó ser $k=3$. Es decir que hacia el noreste habría un genoma con mayor presencia que en el resto del área de estudio (Fig. 26).

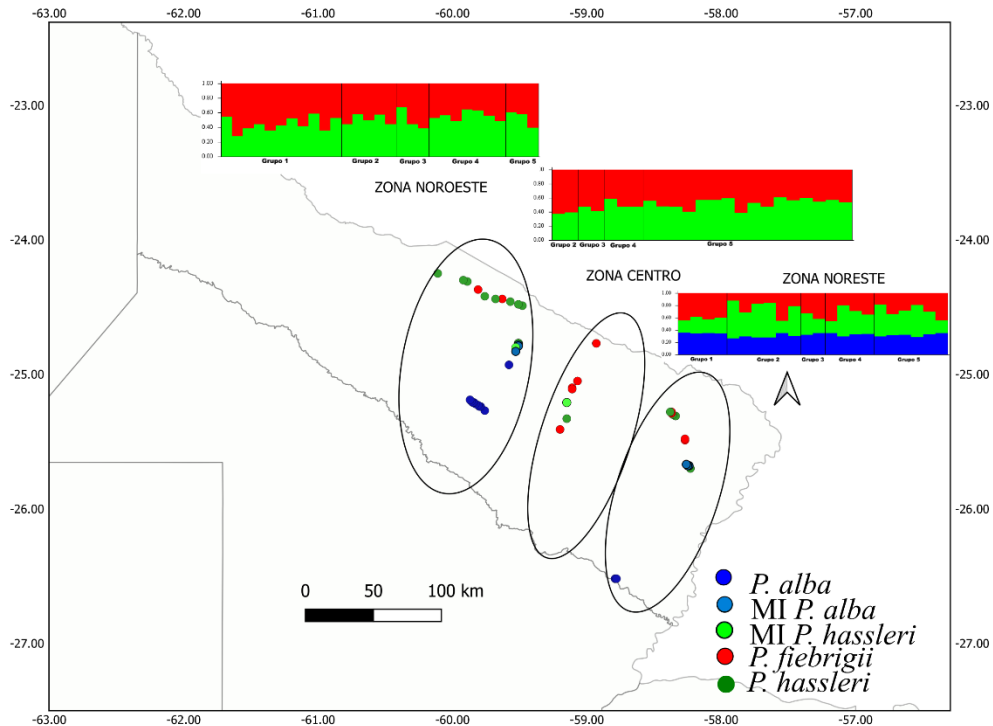


Figura 27. Mapa donde están representadas las tres zonas de estudio: zona Noroeste, zona centro y zona Noreste, cada punto de diferente color corresponde al grupo morfológico estudiado. Además, para cada zona se encuentra su correspondiente corrida con el programa STRUCTURE 2.3.1. MI, morfotipo intermedio.

Sin embargo, el análisis molecular de la varianza (AMOVA) entre las tres zonas no arrojó diferencias significativas entre ellas. La mayor parte de la varianza genética de las poblaciones fue encontrada dentro de los individuos (68 %) y luego entre individuos dentro de las zonas (32 %). La diferenciación entre zonas estimada mediante las frecuencias alélicas a través de F_{st} no fue significativa para ninguna de las zonas (Noroeste-centro $F_{st}=-0,003$; $p = 0,675$; Noroeste-Noreste $F_{st}=-0,005$; $p = 0,827$; Centro-noreste $F_{st}=-0,006$; $p = 0,178$). Los índices de diversidad genética obtenidos fueron muy parecidos en las tres zonas (Tabla 11).

Tabla 11. Parámetros de diversidad genética para los loci polimórficos para las zonas noroeste, centro y zona noreste). Número de individuos (N), número de alelos (Na), número de alelos efectivos (Ne), heterocigocidad observada (Ho), heterocigocidad esperada (He), índice de diversidad de Shannon (I).

Zona Noroeste						
Locus	N	Na	Ne	Ho	He	I
Mo08	27	4	1,6	0,444	0,374	0,743
Mo13	26	7	2,5	0,538	0,604	1,246
GL6	27	6	2,0	0,185	0,500	1,053
GL8	27	8	2,7	0,630	0,630	1,397
GL15	26	13	7,0	0,731	0,857	2,207
GL12	27	9	3,0	0,481	0,663	1,471
Promedio	27	8	3,1	0,502	0,605	1,353
Zona Centro						
Mo08	19	4	2,1	0,526	0,514	0,900
Mo13	21	6	2,1	0,476	0,526	1,038
GL6	22	7	2,5	0,318	0,592	1,241
GL8	22	9	3,1	0,545	0,677	1,501
GL15	21	11	7,2	0,762	0,861	2,155
GL12	22	8	2,6	0,545	0,612	1,360
Promedio	21	8	3,2	0,529	0,630	1,366
Zona Noreste						
Mo08	21	3	1,7	0,333	0,421	0,755
Mo13	21	6	2,4	0,429	0,579	1,221
GL6	22	6	1,4	0,227	0,287	0,685
GL8	20	6	2,8	0,500	0,645	1,294
GL15	19	10	6,9	0,895	0,855	2,080
GL12	19	7	2,3	0,368	0,571	1,252
Promedio	20	6	2,9	0,459	0,560	1,214

3.3.2.5 Estructura espacial de la variabilidad genética

El mapa sintético de la variabilidad genética espacial, obtenido mediante la interpolación del primer componente del PCA realizado con la matriz de frecuencia de alelos (PC1g) (Fig. 28), muestra que la variabilidad genética está espacialmente estructurada siguiendo principalmente un patrón latitudinal. Los individuos puros *P. alba* se ubican hacia el sur de la zona de estudio, mientras que los individuos puros *P. hassleri*, *P. fiebrigii* se localizan hacia el norte del área de estudio.

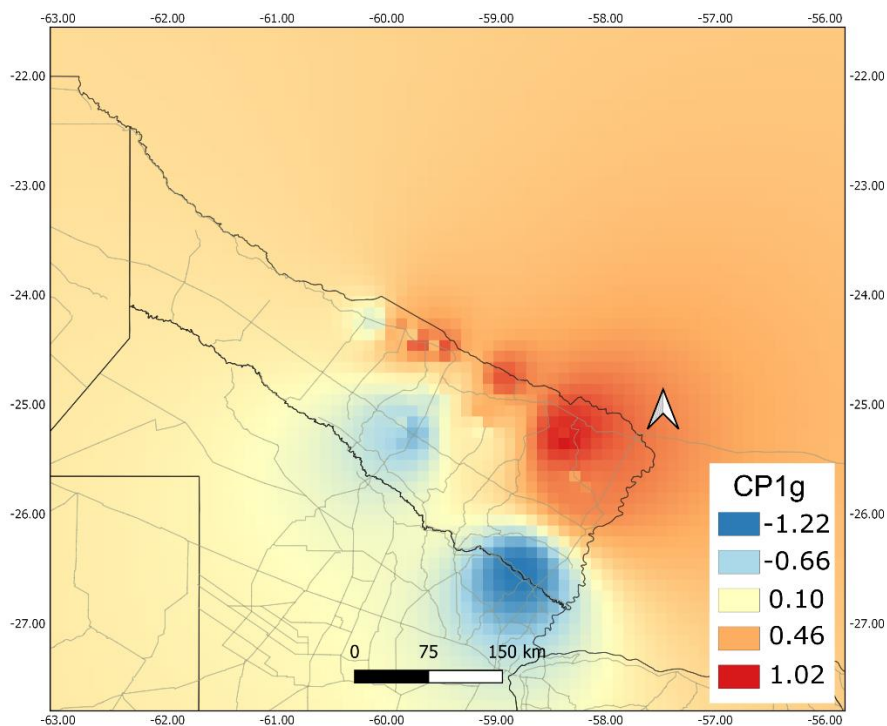


Figura 28. Mapa resultante de la interpolación espacial del primer componente principal del Análisis de componentes principales de las frecuencias alélicas para los 74 individuos.

Los morfotipos intermedios que aparecen en las zonas de contacto de estas especies, se distribuyen en los diferentes ambientes algunas veces más asociados a una u otra especie parental. Hacia el sureste y hacia el noreste se detectan los individuos con genomas más divergentes, y se corresponden con individuos puros *P. alba* y *P. hassleri/P. fiebrigii*, respectivamente.

Por último, se reclasificaron todos los individuos por su genotipo y se elaboró un mapa final con los 74 árboles analizados con microsátélites, en donde pueden observarse las zonas donde se encuentran los individuos puros y los híbridos interespecíficos (Fig. 29).

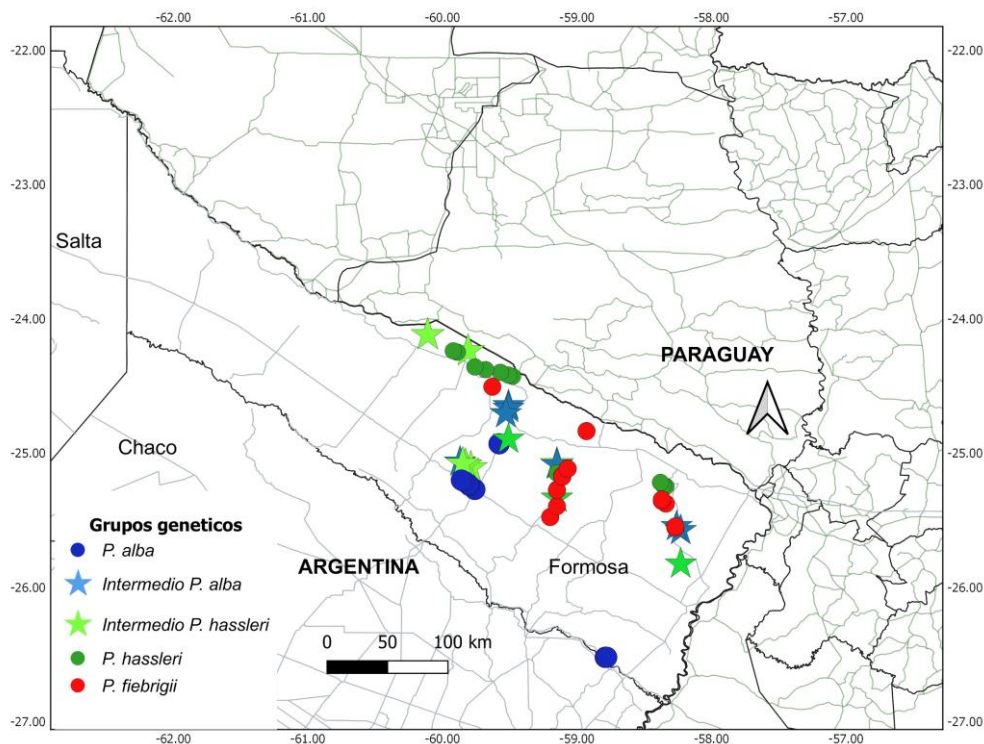


Figura 29. Mapa final con los 74 individuos de *Prosopis* analizados con microsatélites y reclasificados por su grupo genético.

3.3.2.6 Resultados principales

- Los resultados obtenidos a partir de la caracterización genética con microsatélites son coincidentes, en términos generales, con la clasificación basada en datos morfológicos de hoja, en la que principalmente se diferencian los morfotipos *P. alba* y el morfotipo intermedio *P. alba* de *P. hassleri*, *P. fiebrigii* y el morfotipo intermedio *P. hassleri*. Sin embargo, algunos individuos caracterizados morfológicamente como *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii* serían genéticamente híbridos.
- En los sucesivos AMOVAs realizados por pares de grupos morfológicos se encontraron diferencias significativas entre todos los grupos, a excepción del morfotipo intermedio *P. hassleri* con los individuos puros de *P. hassleri* y *P. fiebrigii*, y entre estos últimos.
- El análisis STRUCTURE realizado por zonas arrojó un valor de $k=2$ para la zona Centro y Oeste, y un $k=3$ para la zona Este, mostrando cierta diferenciación geográfica. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ellas y los índices de diversidad genética obtenidos fueron muy parecidos en las tres zonas, encontrándose mayor variabilidad dentro de los individuos y luego entre individuos dentro de las zonas.

- El patrón genético espacial visualizado a través del mapa de interpolación mostró que la variabilidad genética está espacialmente estructurada siguiendo principalmente un patrón latitudinal. Los individuos genéticamente más divergentes se encuentran hacia el sureste y hacia el noreste.

3.4. Análisis citogenéticos

Se estudiaron con bandeos de fluorescencia los cromosomas mitóticos de 3 muestras correspondientes a las 3 especies puras (*P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii*) y al morfotipo intermedio *P. alba* x *P. hassleri*. Las tablas con las medias cromosómicas y los desvíos estándar para cada complemento haploide de las especies puras y el morfotipo intermedio analizado se presentan en la tabla S7.

3.4.1. Caracteres cromosómicos cuantitativos y cualitativos y estructura de los cariotipos

Se determinó el número somático $2n = 2x = 28$ y una fórmula cariotípica de $7m+7sm$ para las especies puras y para el morfotipo intermedio (Tabla 12 y Fig. 32).

Tabla 12. Datos cariotípicos para las especies *Prosopis alba*, *P. hassleri*, *P. fiebrigii* y el morfotipo intermedio *P. alba x P. hassleri*. Cromosomas metacéntricos y submetacéntricos (m y sm), regiones organizadoras nucleolares (NOR), longitud total del complemento haploide en μm (LTCH), desvío estándar (de), longitud cromosómica promedio (c), índice braquial medio (r), razón entre el cromosoma más largo y el más corto (R), índice de asimetría intracromosómica (A_1), índice de asimetría intercromosómica (A_2). * Tipo de asimetría cariotípica según Stebbins (1971).

Taxón	2n	Fórmula cariotípica (n)	Pares con NOR	LTCH X(de)	c (de)	Rango de longitudes cromosómicas	r (de)	R	A_1	A_2	Tipo de asimetría cariotípica*
<i>P. alba</i>	28	7m+7sm	1 (m)	15,62 (2,25)	1,12 (0,21)	0,85-1,66	1,62 (0,53)	1,953	0,32	0,18	2A
<i>P. hassleri</i>	28	7m+7sm	1 (m)	18,03 (1,95)	1,29 (0,24)	0,98-1,92	1,67 (0,57)	1,959	0,33	0,19	2A
<i>P. fiebrigii</i>	28	7m+7sm	1 (m)	17,69 (2,63)	1,26 (0,19)	1,02-1,66	1,61 (0,52)	1,627	0,31	0,15	2A
<i>P. alba x P. hassleri</i>	28	7m+7sm	1 (m)	17,45 (1,61)	1,25 (0,22)	1,00-1,78	1,58 (0,52)	1,780	0,30	0,18	2A

Los tamaños cromosómicos variaron en un rango de 1,92-0,85 μm . El cromosoma más chico corresponde al par n° 7 de *P. alba* (0,85 μm) y el más grande al par n° 1 de *P. hassleri* (1,92 μm). El LTCH varió entre un mínimo de 15,62 μm , observado en *P. alba* y un máximo de 18,03 μm , correspondiente a *P. hassleri*. Así, el menor valor de *c* corresponde a *P. alba* (1,12) en tanto que *P. hassleri* presenta el mayor valor (1,29) (Tabla 12).

En cuanto a la asimetría cariotípica, los menores valores para los índices braquial medio y A_1 (indicativos de asimetría intracromosómica) fueron registrados en el morfotipo intermedio *P. alba* x *P. hassleri* (1,58 y 0,30, respectivamente) mientras que los mayores valores (1,67 y 0,33) se observaron en *P. hassleri*. En tanto que los índices R y A_2 (indicativos de asimetría intercromosómica), variaron entre 1,63 y 0,15 para *P. fiebrigii*, respectivamente, y 1,96 y 0,19 para *P. hassleri* (Tabla 12). Finalmente, tanto las especies puras como los morfotipos intermedios analizados se clasificaron como 2A de acuerdo a los tipos de asimetría cariotípica según Stebbins (Tabla 12).

Todos los individuos examinados presentaron 1 par de cromosomas con regiones organizadoras nucleolares (NORs) y satélites asociados, todos ubicados en los brazos cortos del primer par cromosómico metacéntrico (Fig. 31). Los individuos analizados presentaron heterocromatina constitutiva CMA +/ DAPI - (CMA+/DAPI-), indicativa de DNA satélite rico en pares de nucleótidos GC y su cantidad (en porcentaje de la longitud cariotípica) aunque escasa, varió entre los taxones examinados (Tabla 13). La menor cantidad corresponde a *P. alba* (0,46 % de la longitud cariotípica total), mientras que la mayor cantidad pertenece a *P. hassleri* (0,80 %). En cuanto a la distribución de la heterocromatina, las regiones organizadoras nucleolares siempre mostraron bandas heterocromáticas CMA+DAPI- asociadas, que son terminales en todos los casos (Figs. 30 y 31). Adicionalmente se observó una banda CMA+/DAPI- pericentromérica (es decir que ocupa el centrómero y regiones adyacentes de ambos brazos cromosómicos) en 1 o 2 cromosomas submetacéntricos del complemento que diferencia los taxones estudiados. En el caso de *P. hassleri* (Fig. 30 C y D) y *P. fiebrigii* (Fig. 30 E y F) siempre se observaron dos cromosomas (par n° 13 submetacéntrico) con bandas CMA+/DAPI- pericentroméricas, mientras que en *P. alba* siempre se encontró un sólo cromosoma con 1 banda CMA+/DAPI- pericentromérica (cromosoma n° 11 submetacéntrico) (Fig. 30 A y B). Por último, en el morfotipo intermedio *P. alba* x *P. hassleri* se encontraron tres individuos con un solo cromosoma con banda pericentromérica (Citotipo 1, Fig. 31 A y B) (32 metafases) y dos individuos con dos cromosomas con bandas pericentroméricas (Citotipo 2, Fig. 31 C y D) (24 metafases). Así,

el porcentaje de heterocromatina pericentromérica varió desde 0,12 y 0,18 en *P. alba* y Citotipo 1 de *P. alba x P. hassleri*, hasta 0,44 a 0,36 en *P. hassleri*, *P. fiebrigii* y Citotipo 2 de *P. alba x P. hassleri* (Tabla 13).

Tabla 13. Caracteres cariotípicos de las especies de *Prosopis* teñidas con bandeo de fluorescencia. Heterocromatina asociada a las regiones organizadoras nucleolares (NOR-asoc.), heterocromatina pericentromérica (Peric.). Entre paréntesis, luego del nombre se indica el número de individuos y de metafases analizados con bandeo de fluorescencia. *Cantidad de heterocromatina expresada como porcentaje de la longitud total del complemento haploide.

Taxón	Cantidad de heterocromatina CMA+/DAPI -*			Máximo N° de bandas por complemento diploide
	TOTAL	NOR-asoc.	Peric.	
<i>P. alba</i> (3,9)	0,46	0,34	0,12	3
<i>P. alba x P. hassleri</i> (3,10)	0,54-0,72	0,36	0,18-0,36	3 y 4
<i>P. hassleri</i> (3,4)	0,80	0,36	0,44	4
<i>P. fiebrigii</i> (3,10)	0,77	0,37	0,40	4

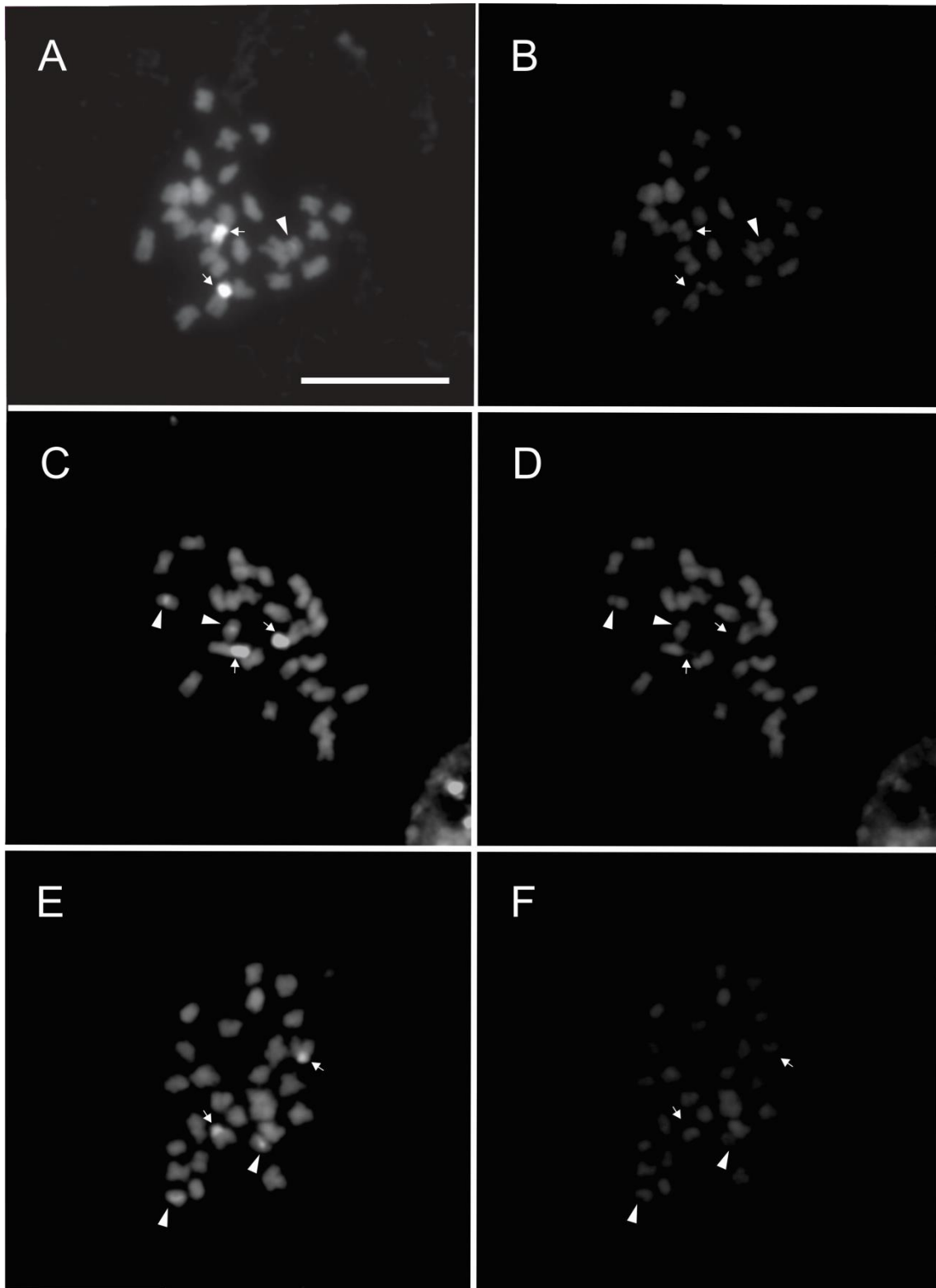


Figura 30. Metafases mitóticas de las tres especies puras ($2n=2x=28$) teñidas secuencialmente con CMA/DA/DAPI. A-B) *P. alba*. C-D) *P. hassleri*. E-F) *P. fiebrigii*. A, C, E) CMA. B, D, F) DAPI. La escala representa 10 μ m.

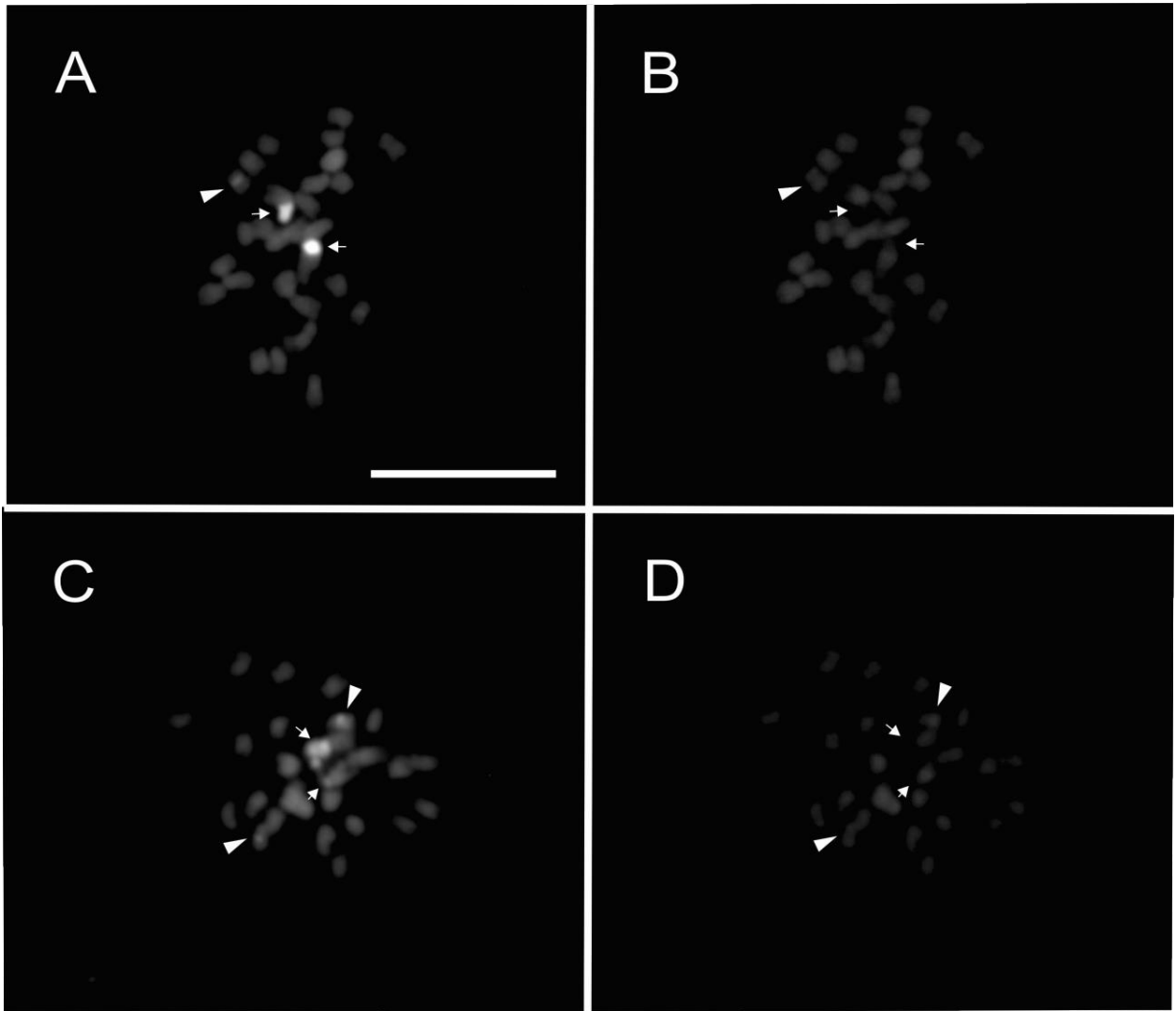
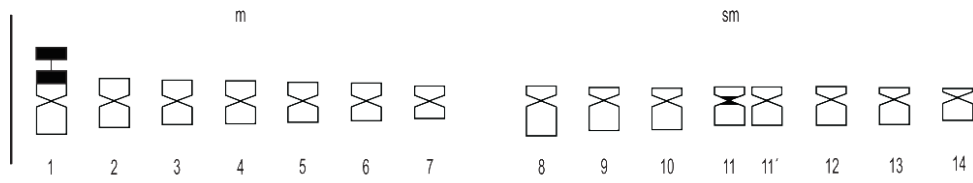
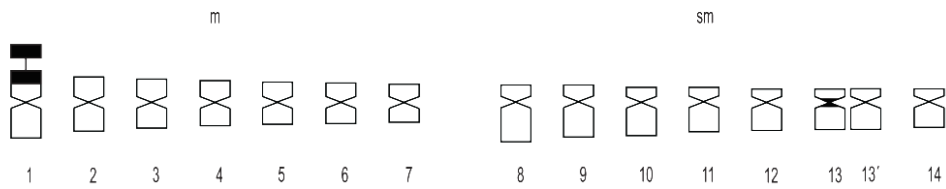


Figura 31. Metafasas mitóticas del morfotipo intermedio *P. alba* x *P. hassleri* ($2n=2x=28$) teñidas secuencialmente con CMA/DA/DAPI. A-B) *P. alba* x *P. hassleri* Citotipo 1. C-D) *P. alba* x *P. hassleri* Citotipo 2. A, C) CMA; B, D) DAPI. La escala representa 10 μm

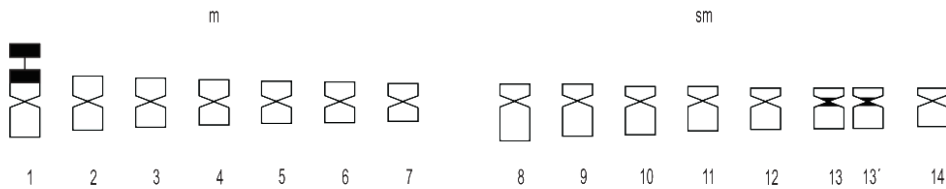
Prosopis alba



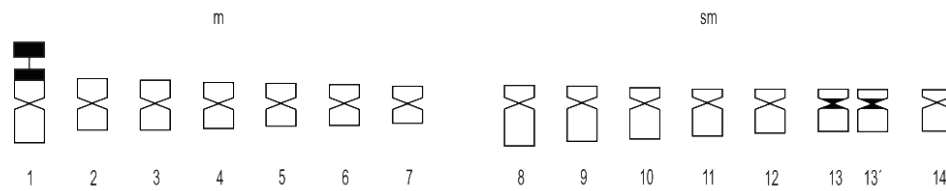
Prosopis alba x P. hassleri citotipo 1



Prosopis alba x P. hassleri citotipo 2



P. hassleri



P. fiebrigii

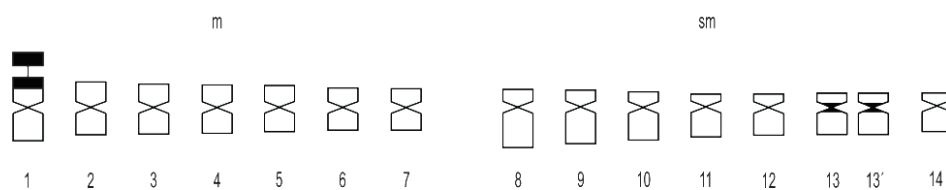


Figura 32. Idiogramas de *P. alba*, *P. hassleri*, *P. fiebrigii* y *P. alba x P. hassleri*. Los bloques negros indican la heterocromatina CMA+/DAPI-. En cada idiograma los cromosomas están acomodados en categorías según el índice braquial creciente y, dentro de cada grupo, de acuerdo a su longitud decreciente. La escala vale 4 μ m. m=metacéntrico; sm: submetacéntrico.

3.4.2. Análisis de Componentes Principales y análisis fenético de los datos cariotípicos

Los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2) obtenidos del ACP explican el 89,6 % de la variabilidad total entre los individuos en relación a los datos cromosómicos seleccionados (Fig. 33). El primer componente es el que mejor diferencia a las especies puras *P. hassleri* y *P. fiebrigii* y al morfotipo intermedio *P. alba* x *P. hassleri* Citotipo 2 de las especies puras *P. alba* y el morfotipo intermedio *P. alba* x *P. hassleri* Citotipo 1, de acuerdo a la cantidad de heterocromatina expresada como porcentaje de la longitud total del complemento (HC), el máximo número de bandas diploides y la longitud cromosómica media (c). Mientras que, el segundo componente diferencia a *P. alba* y *P. hassleri* de *P. fiebrigii* y el morfotipo intermedio *P. alba* x *P. hassleri* por presentar mayor índice braquial medio (r) y por la razón entre la longitud del cromosoma mayor y menor (R1). Las variables cariotípicas utilizadas para realizar estos análisis se encuentran en el Tabla S8.

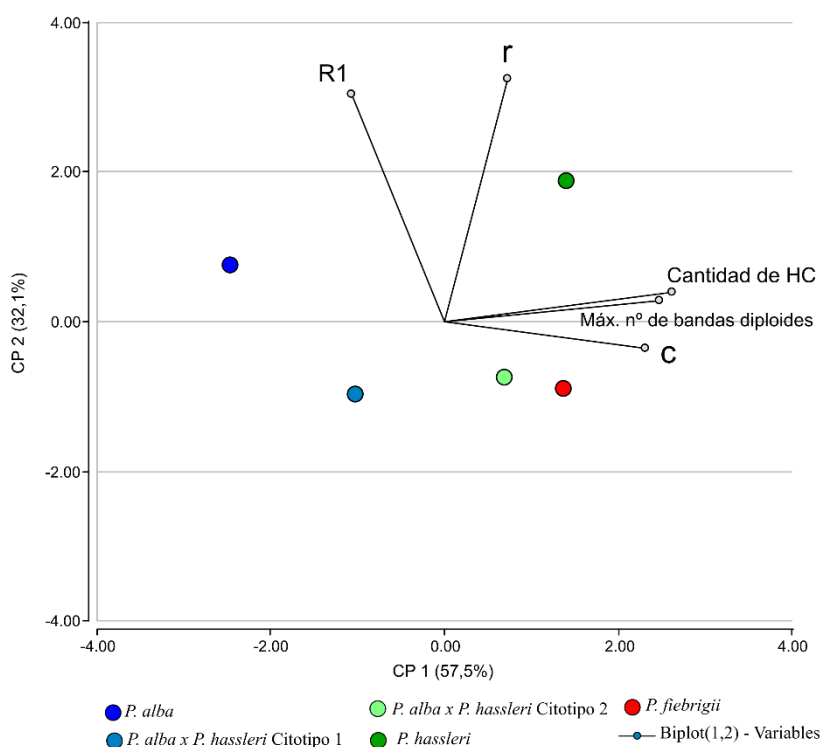


Figura 33. Biplot de los dos primeros ejes del Análisis de Componentes Principales realizado utilizando los datos cromosómicos seleccionados.

En el análisis de conglomerados (Fig. 34), la correlación cofenética obtenida entre el agrupamiento y los datos estandarizados fue alta ($r = 0,946$) y permitió distinguir los siguientes agrupamientos: *P. alba* y *P. hassleri* hacia los extremos, y los citotipos 1 y 2 de *P. alba* x *P. hassleri* más cercanos a *P. alba* y a *P. fiebrigii*, respectivamente.

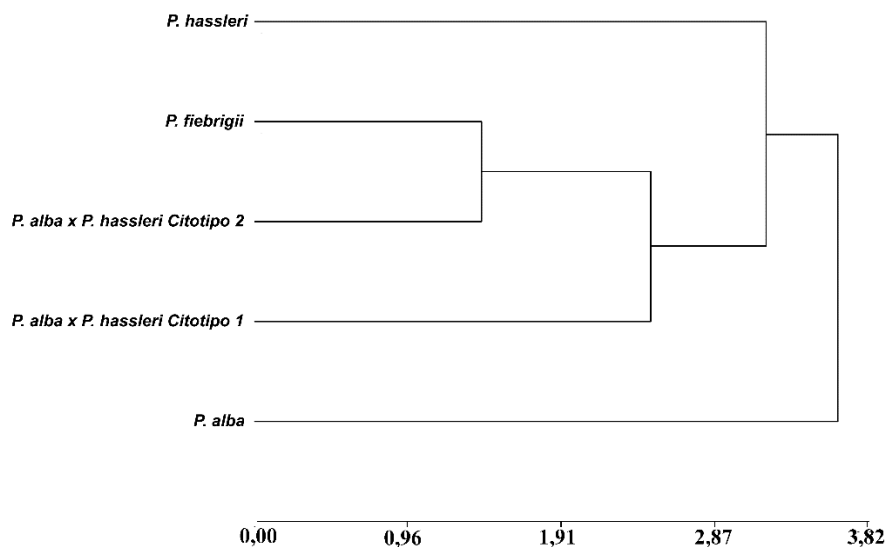


Figura 34. Fenograma UPGMA derivado de la distancia euclídea promedio entre los cuatro morfotipos analizados utilizando los datos cromosómicos seleccionados.

3.4.3 Resultados principales

- El número somático determinado fue $2n=2x=28$ y la fórmula cariotípica $7m+7sm$ para las especies puras y para el morfotipo intermedio.
- El cromosoma más chico se encontró en *P. alba* y el cromosoma más grande en *P. hassleri*. Lo mismo ocurrió con los valores de LTCH varió entre un mínimo de $15,62 \mu\text{m}$, observado en el morfotipo *P. alba* y un máximo de $18,03 \mu\text{m}$, correspondiente a *P. hassleri*.
- Todas las especies y el morfotipo intermedio examinados presentaron un par de cromosomas con regiones organizadoras nucleolares (NORs) y satélites asociados, todos ubicados en los brazos cortos del primer par cromosómico.
- Las regiones organizadoras nucleolares mostraron bandas heterocromáticas CMA+DAPI- asociadas, terminales en todos los casos.
- Se observó una banda CMA+/DAPI- pericentromérica (es decir que ocupa el centrómero y regiones adyacentes de ambos brazos cromosómicos) en 1 o 2 cromosomas submetacéntricos del complemento que diferencia los taxones estudiados.
- En el caso de *P. hassleri* y *P. fiebrigii* siempre se observaron dos cromosomas (par n° 13 submetacéntrico) con bandas CMA+/DAPI- pericentroméricas, mientras que en *P. alba*

siempre se encontró un sólo cromosoma con una banda CMA+/DAPI- pericentromérica (cromosoma n° 11 submetacéntrico).

- En el caso del morfotipo intermedio *P. alba* x *P. hassleri* se diferenciaron dos citotipos, uno con un sólo cromosoma con banda pericentromérica (Citotipo 1) y otro con dos cromosomas con bandas pericentroméricas (Citotipo 2). El porcentaje de heterocromatina pericentromérica fue menor en *P. alba* y Citotipo 1 de *P. alba* x *P. hassleri*, que en *P. hassleri*, *P. fiebrigii* y Citotipo 2 de *P. alba* x *P. hassleri*.

- A través del análisis de componentes principales se diferenció a las especies *P. hassleri*, *P. fiebrigii* y el citotipo 2 del morfotipo intermedio *P. alba* x *P. hassleri* de *P. alba* y del citotipo 1 del morfotipo intermedio *P. alba* x *P. hassleri*.

3.5 Análisis integradores: caracterización morfológica, genética y climática de los morfotipos

3.5.1 Correspondencia entre la asignación morfológica y genética: especies puras e híbridos

Se reclasificaron los 74 individuos estudiados de acuerdo al grupo genético obtenido a partir de la caracterización con microsatélites y de la asignación morfológica en el análisis discriminante.

Esto implicó que algunos individuos previamente clasificados a nivel morfológico como *P. alba*, y genéticamente como *P. hassleri* sean ahora considerados dentro del grupo de los híbridos introgresantes con desacople. Este desacople en algunos individuos se ilustra en la Fig. 39 donde se muestra el ordenamiento morfológico de los individuos estudiados y su pertenencia al respectivo grupo morfológico y genético. Se observa que el desacople ocurrió principalmente entre los morfotipos intermedios, así algunos individuos morfológicamente intermedios *P. alba*, se correspondieron con un genotipo intermedio *P. hassleri* y viceversa. Así también algunos individuos clasificados morfológicamente como *P. alba*, *P. hassleri* o *P. fiebrigii*, genéticamente fueron híbridos.

La localización de los individuos puros y los híbridos se mapeó junto a mapas sintéticos de la variación morfológica, climática y genética y en el mapa de presencia de las tres especies (obtenido con el modelado de nicho) se indicó la localización geográfica de los haplotipos de cloroplasto para cada grupo morfológico (Fig. 38).

Finalmente, se resumió el morfotipo, genotipo y citotipo final de los individuos que fueron estudiados en los análisis citogenéticos (Tabla 14) y los principales caracteres

morfológicos y genéticos obtenidos del análisis de las secuencias no codificantes de cloroplasto y de los análisis citogenéticos para cada una de las especies puras e híbridos (Tabla 15).

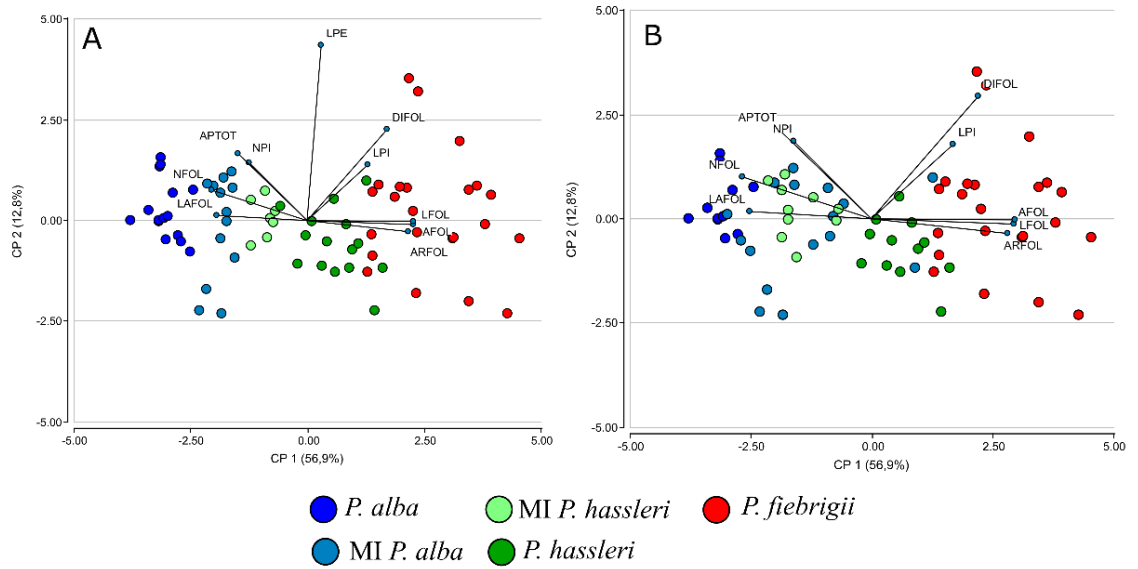


Figura 35. Biplot de los dos primeros ejes del ACP realizado con las variables morfológicas de hoja indicando el grupo morfológico al que pertenece cada individuo. A) biplot mostrando los individuos clasificados a partir del análisis morfológico B) Similar al panel A, pero los individuos clasificados por grupos genéticos obtenidos a partir del análisis con microsatélites. MI, morfotipo intermedio.

Tabla 14. Caracterización morfológica, genética y citogenética de los 12 individuos estudiados a través de los análisis citogenéticos.

N ° Arbol	Grupo morfológico	Genotipo	Citotipo
PZ-066	<i>P. alba</i>	<i>P. alba</i>	Citotipo 1
PZ-073	<i>P. alba</i>	<i>Intermedio P. hassleri (0,7 P. hassleri y 0,3 P. alba)</i>	Citotipo 1
PZ-063	<i>P. alba</i>	<i>P. alba</i>	Citotipo 1
PZ-059	<i>Morfotipo intermedio P. alba</i>	<i>Intermedio (0,5 P. alba y 0,5 P. hassleri)</i>	Citotipo 2
PZ-061	<i>Morfotipo intermedio P. alba</i>	<i>Intermedio (0,5 P. alba y 0,5 P. hassleri)</i>	Citotipo 1
FSA-209	<i>Morfotipo intermedio P. alba</i>	<i>Intermedio P. alba (0,7 P. alba y 0,3 P. hassleri)</i>	Citotipo 2
FSA-228	<i>P. hassleri</i>	<i>P. hassleri</i>	Citotipo 2
FSA-231	<i>P. hassleri</i>	<i>sin dato</i>	Citotipo 2
FSA-223	<i>P. hassleri</i>	<i>P. hassleri</i>	Citotipo 2
FSA-215	<i>P. fiebrigii</i>	<i>P. fiebrigii</i>	Citotipo 2
FSA-217	<i>P. fiebrigii</i>	<i>P. fiebrigii</i>	Citotipo 2
FSA-222	<i>P. fiebrigii</i>	<i>P. fiebrigii</i>	Citotipo 2

Tabla 15. Resumen de los principales caracteres morfológicos de hoja, caracteres genéticos y citogenéticos que diferencian a los cinco morfotipos estudiados. Ancho del foliólulo (AFOL), área total del foliólulo (ARFOL), longitud de los foliólulos (LFOL), longitud del pecíolo (LPE), longitud de la pina (LPI), número de pares de foliólulos (NFOL), número de pares de pinas (NPI), número cromosómico (n), heterocromatina pericentromérica (Peric.). MI, morfotipo intermedio.

Grupo Morfológico	Caracteres morfológicos de hojas							Secuencias de cloroplasto	Variables cariotípicas			
	LPE (cm)	LPI (cm)	NFOL (pares)	NPI (pares)	LFOL (cm)	AFOL (cm)	ARFOL (cm)	Haplotipos	2n	Rango de longitudes cromosómicas	Peric.	Máximo N° de bandas por complemento diploide
<i>P. alba</i>	1,9-3,6	8-14	38-49	2-3	0,6-1,3	0,1-0,2	0,1-0,2	H1, H3, H4, H6	28	0,85-1,66	0,12	3
MI <i>P. alba</i>	1,0-3,6	6-19	13-31	1-2	1-1,9	0,2-0,4	0,2-0,7	H1, H3, H6	28	0,98-1,92	0,18-0,36	3-4
MI <i>P. hassleri</i>	1,9-3,4	11-15	18-29	1-2,2	1-1,9	0,2-0,4	0,2-0,7	H1, H2, H3	28	0,98-1,93	0,18-0,36	3-4
<i>P. hassleri</i>	1,3-3	10-17	7-18	1-1,2	1,9-3,2	0,5-1	0,9-1,9	H1, H2, H4	28	1,02-1,66	0,44	4
<i>P. fiebrigii</i>	1,2-5,7	12-16	4-13	1-1,4	2,5-5,2	0,9-2,1	0,7-6	H1, H3	28	1,00-1,78	0,40	4

3.5.2 Mantel parcial

La prueba de Mantel parcial indicó que no existe una asociación estadísticamente significativa entre la variación morfológica y genética ($r=0,087$, $p = 0,114$) ni entre la variabilidad genética y climática ($r=0,056$, $p = 0,17$). La asociación sí fue significativa entre la variación morfológica y climática ($r=0,303$, $p = 0,001$).

3.5.3 Análisis de procrustes generalizado

El consenso entre la caracterización morfológica y genética calculada por APG fue del 40 %, y fue estadísticamente significativo ($p = 0,006$). El primer eje del APG resumió el 32,7 % de la variabilidad del consenso y el segundo eje explicó el 9,6 % (Fig. 36A). El gráfico revela una clara diferenciación entre los morfotipos *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii* en ambos extremos del gráfico y los morfotipos intermedios en el centro del gráfico.

El consenso entre la caracterización morfológica y climática fue del 30 %, y fue estadísticamente significativo ($p = 0,001$). El primer eje del APG resumió el 44,5 % de la variabilidad del consenso y el segundo eje, el 33,3 % (Fig. 36B). Este ordenamiento muestra una mayor dispersión que el anterior, pero también revela un ordenamiento de los grupos a lo largo del eje 1, estando en un extremo *P. hassleri* y *P. fiebrigii*, en el otro *P. alba* y entremedio de éstos, los morfotipos intermedios. Por último, el consenso entre la caracterización genética y climática fue del 25%, pero no resultó estadísticamente significativo ($p = 0,165$).

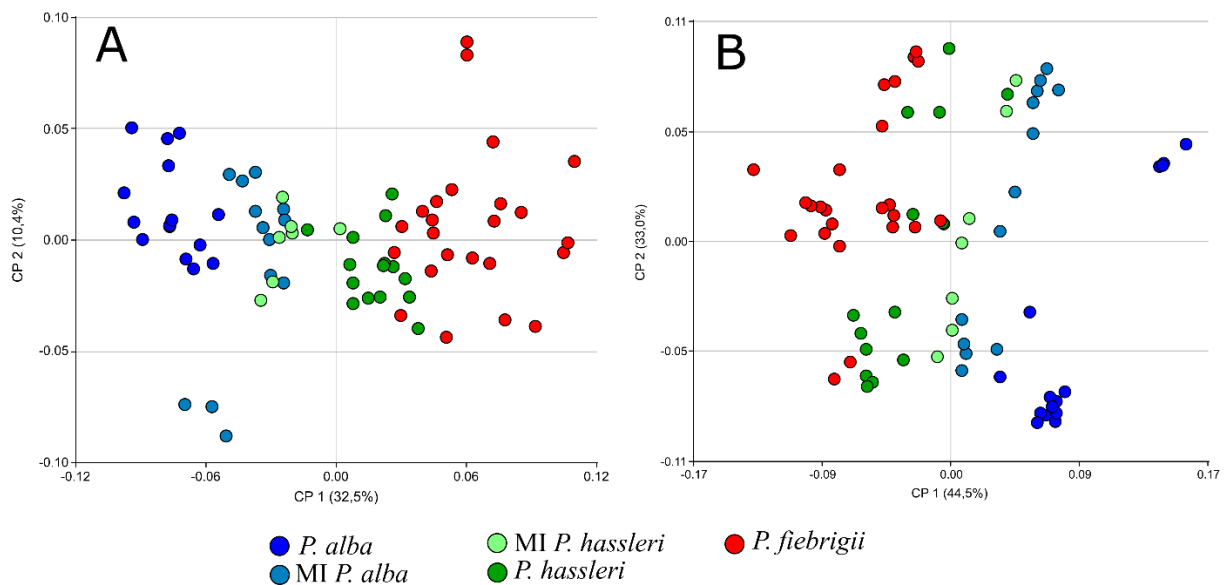


Figura 36. Consenso obtenido por el análisis de Procrustes de los 74 árboles coloreados por los cinco grupos morfológicos. A) APG entre la variabilidad morfológica y genética B) APG entre variabilidad morfológica y climática. MI, morfotipo intermedio.

3.5.4 Análisis de Componentes Principales integrador

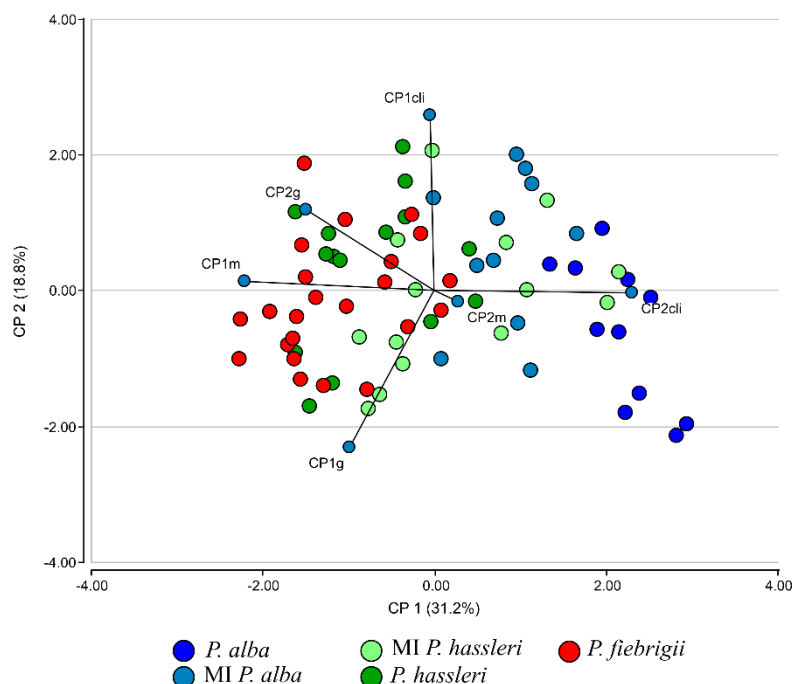


Figura 37. Biplot de los dos primeros ejes del ACP integrador realizado a partir de las variables sintéticas morfológicas, genéticas y climáticas. MI, morfotipo intermedio.

El análisis de componentes principales realizado a partir de las variables sintéticas del ACP morfológico, genético y climático permitió observar la correlación entre las variables sintéticas y el ordenamiento de los individuos en el espacio multidimensional considerado en esta tesis. En cuanto a la correlación entre variables se observa que la variación morfológica resumida en el eje CP1m está asociada de manera significativa ($p < 0,05$) en primer lugar con el eje climático 2 (CPcli2, $r=-0,6$), y en menor magnitud con el eje genético 2 (CPg2, $r=0,24$). A su vez el eje genético 2 se asocia de manera significativa con el eje climático 2 ($r=-0,31$; $p < 0,05$) (Fig. 37 y Tabla 16).

Los dos primeros componentes del ACP integrador explican el 50 % de la variabilidad total entre los individuos (Fig. 37). El primer componente, que explica el 31,2 % de la variación, ordena los árboles de acuerdo al eje CP1m (ancho de foliolulo y longitud del foliolulo) y al CP2cli (estacionalidad de la temperatura y a temperatura mínima del mes más frío), mientras que el segundo componente ordena a los individuos principalmente de acuerdo a las variables

CP1cli (precipitación del trimestre más frío y la temperatura máxima del mes más cálido) y al CP1g (marcadores GL6 y GL8).

El ordenamiento de los individuos a lo largo del eje 1 separa principalmente a los individuos puros *P. hassleri* y *P. fiebrigii*, que se diferencian principalmente por presentar mayor tamaño de los foliolulos (más anchos y más largos) y estar situados hacia zonas de mayor temperatura y con menor variación estacional de temperaturas, de *P. alba* y del morfotipo intermedio *P. alba*, mientras que el morfotipo intermedio *P. hassleri* se encuentra disperso a lo largo del eje 1. El ordenamiento a lo largo del eje 2 no muestra un patrón en relación a los morfotipos ya que todos están dispersos y superpuestos a lo largo de este eje.

Tabla 16. Correlaciones de Pearson entre los ejes sintéticos. Las correlaciones significativas se indican en negrita.

CP1gen	CP1gen	CP2gen	CP1clim	CP2clim	CP1morfo	CP2morfo
CP2gen	0					
CP1clim	-0,12	0,04				
CP2clim	-0,20	-0,32				
CP1morfo	0,18	0,24	0,06	-0,60	0	
CP2morfo	0,01	-0,09	0,04	0,05		0

3.5.5 Regresiones múltiples: influencia relativa de la variación genética y climática sobre la variación morfológica

La regresión múltiple realizada sobre el eje morfológico 1 sólo incluyó como variable predictora al eje climático 2 ($R^2=0,36$; $p < 0,0001$), mientras que la realizada sobre el eje morfológico 2 no fue explicada de manera significativa por ninguna de las variables predictoras. La regresión múltiple realizada sobre los ejes genéticos 1 y 2 tampoco fueron explicadas por las variables predictoras evaluadas.

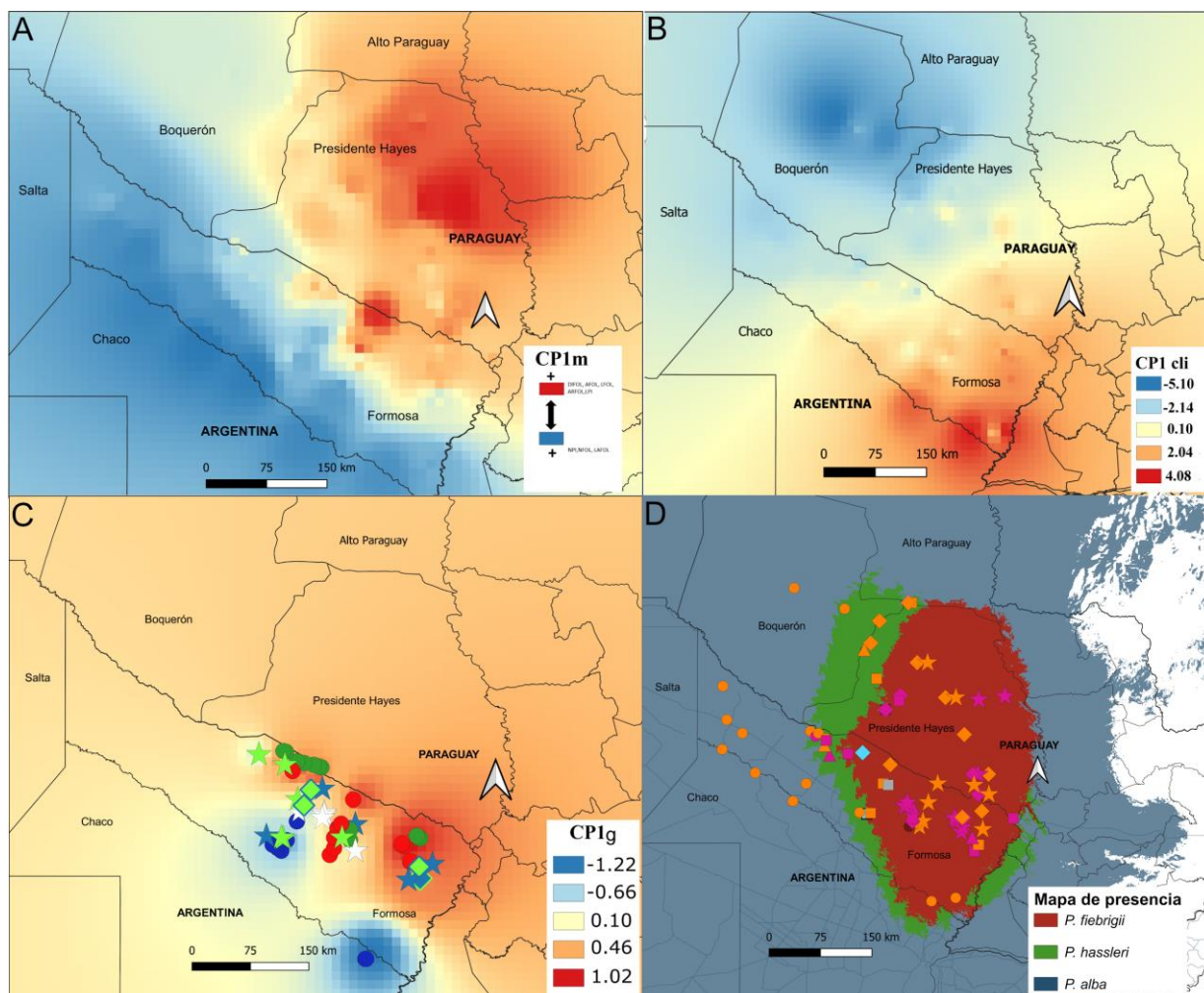


Figura 38. Patrones espaciales de la variabilidad morfológica, climática, genética y distribución geográfica de las especies focales. A) mapa correspondiente a la interpolación de la primera Componente Principal (CP1m) morfológica para los 421 individuos medidos; B) interpolación de la primera Componente Principal climática (CP1cli) para los 471 individuos; C) Mapa de interpolación de la CP1 genética para los 74 individuos estudiados a través de microsatélites, indicando la localización de los individuos puros e híbridos. Los círculos azules, verdes y rojos corresponden a las especies puras *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii*, respectivamente. Las estrellas blancas corresponden a híbridos. Las estrellas de color celeste y verde claro corresponden a híbridos introgresantes tipo *P. alba* y tipo *P. hassleri*, respectivamente. Los rombos de color celeste con borde verde claro corresponden a híbridos introgresantes con desacople *P. alba* (i.e. genéticamente tipo *P. alba*, pero morfológicamente *P. hassleri*) y los rombos de color verde claro con borde celeste corresponden a híbridos introgresantes con desacople tipo *P. hassleri*. D) Mapa de presencia de *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii* indicando la localización geográfica de los haplotipos encontrados en Argentina y Paraguay. Los símbolos corresponden a los grupos morfológicos: círculo, *P. alba*, triángulo morfotipo intermedio *P. alba*, cuadrado morfotipo intermedio *P. hassleri*, rombo *P. hassleri*, y estrella *P. fiebrigii*. Los colores corresponden a los seis haplotipos: H1 (naranja), H2 (violeta), H3 (fucsia), H4 (celeste), H5 (gris) y H6 (marrón).

4. DISCUSIÓN GENERAL

En el presente estudio se analizó el complejo formado por tres especies de algarrobos blancos, *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii*, y morfotipos intermedios en diferentes zonas de contacto en Argentina y Paraguay combinando diferentes herramientas para determinar el origen de la variación morfológica. Este es el primer estudio de hibridación entre especies de algarrobos blancos, y el primer trabajo de hibridación en *Prosopis* que analiza simultáneamente la variación morfológica de las hojas, combinada con estudios genéticos, citogenéticos y análisis climáticos de las especies parentales y sus híbridos.

El enfoque multidisciplinario es un punto de partida para establecer una línea base para formular estrategias adecuadas para el uso de las especies más promisorias del género *Prosopis* y es útil para el diseño de programas de intervención para la conservación dinámica de los recursos genéticos forestales (revisado en Janes y Hamilton 2017). En este contexto, el estudio de las zonas híbridas es particularmente interesante porque son sitios activos de cambios evolutivos en los cuales la hibridación (y la introgresión) pueden incrementar la diversidad genética intraespecífica, causar la transferencia de adaptaciones, e incluso generar nuevos ecotipos o especies (Petit et al. 1999).

Si bien la hibridación en *Prosopis* ha sido muy estudiada (revisado en Fontana et al. 2018) hasta el desarrollo de la presente tesis no se había documentado la hibridación entre especies de algarrobos blancos, que, por su mayor valor comercial en el mercado maderable con respecto a los algarrobos negros, presentan una gran importancia económica (Gimenez et al. 2008, Kees y Michela 2016). A diferencia de lo que ocurre entre los algarrobos blancos y negros, que en general pueden codistribuirse o solaparse en una amplia porción de su rango de distribución, los algarrobos blancos presentan distribuciones contiguas (adyacentes), por lo que la posibilidad de hibridación se restringe a la zona de contacto entre los márgenes de distribución de las especies (Bessegá 2011; Verga 2014). La hipótesis general planteada en este trabajo fue que las zonas de contacto entre especies de "algarrobos blancos", en particular la conformada por *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii* son áreas de alto flujo genético interespecífico, dando lugar a procesos de hibridación sin cambios en el nivel de ploidía de los híbridos respecto de los parentales, y a sitios con alta variabilidad morfológica y genética. En términos generales, la hipótesis planteada es aceptada ya que se determinó a través de los diferentes análisis realizados a lo largo de este trabajo, que los morfotipos intermedios encontrados en las zonas de contacto corresponden a híbridos interespecíficos tanto contemporáneos como de mayor

antigüedad ya que hay evidencias de híbridos introgresantes. También se detectó una gran similitud cariotípica entre los híbridos y los parentales.

Nuestra hipótesis y los resultados obtenidos son consistentes en gran medida con lo planteado por Roig (1993), quien haciendo una revisión del género *Prosopis* en Argentina, propuso algunas hipótesis sobre su evolución, destacando la importancia de los hábitats marginales en el proceso evolutivo. Es decir, los márgenes de la distribución de especies, que en muchos casos son zonas de contacto entre especies congéneres de distribución contigua (como el sistema aquí estudiado), serían zonas evolutivamente dinámicas, donde podría tener lugar la aparición de nuevos ecotipos o especies que luego colonizarían nuevos nichos.

Caracterización morfológica

El empleo de la taxonomía numérica basado en caracteres de hoja constituyó una herramienta fundamental para el análisis morfológico y la identificación de los materiales utilizados. En efecto, en el género *Prosopis* numerosos trabajos han utilizado los rasgos morfológicos de hojas y frutos para caracterizar e identificar grupos (Burkart 1976, Verga 1995; Pasiiecznik et al. 2001; Bessega et al. 2009; Vega et al. 2012; Ferreyra et al. 2013; Joseau et al. 2013; Aguilar et al. 2020; Vega et al. 2020). De estos trabajos algunos han sido realizados en sitios híbridos, pero a diferencia de lo reportado en esta tesis, siempre en sistemas híbridos entre una especie de algarrobo blanco y una especie de algarrobo negro (Joseau et al. 2007, Ferreyra et al. 2013, Teich et al. 2015; Vega et al. 2020).

Los análisis morfológicos aquí reportados permitieron identificar cinco grupos, tres pertenecientes a las especies puras de algarrobos blancos *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii* y dos correspondientes a los morfotipos intermedios tipo *P. alba* y *P. hassleri*. Sin embargo, se trata de una variación continua, en la que cada morfotipo se ubica en una porción restringida de esa variación; en un extremo del ordenamiento se encuentran los individuos puros de *P. alba*, caracterizados por presentar mayor número de pares de pinas (NPI), número de pares de foliólulos por pina (NFOL) y foliólulos más alargados (mayor relación longitud/ ancho del foliólulo, LAFOL), y en el otro extremo *P. fiebrigii*, presentando los mayores valores de área foliar (ARFOL), largo (LFOL) y ancho de foliolulos (AFOL) y mayor distancia entre foliolulos (DIFOL). De todas estas variables, las que mejor contribuyeron a asignar correctamente los individuos a los grupos morfológicos fueron el área foliar y el largo y ancho de los foliólulos. Estos resultados son parcialmente coincidentes con los obtenidos en un enjambre híbrido entre

P. caldenia Burkart y *P. flexuosa*, en el que las variables con mayor peso en la diferenciación morfológica fueron también la longitud del foliólulo, longitud de la pinna, distancia entre foliólulos, y el área del foliólulo (LFOL, LPI, DIFOL, y ARFOL; Velasco Sastre 2019). Así también, en otros trabajos de *Prosopis* se ha considerado a la longitud del foliólulo (LFOL) y a la forma de los mismos (relación longitud/ ancho del foliólulo, LAFOL) como un carácter clave para la diferenciación de ciertas especies (Verga 1995; Burghardt et al. 2000; Mantován 2000).

En este punto es importante mencionar que además de diferenciar especies, estos rasgos de forma y tamaño de las hojas, presentan una alta heredabilidad, constituyendo caracteres con potencial adaptativo (Bessega et al. 2009, 2011; Ewens et al. 2012).

Estudios morfológicos previos realizados en *Prosopis*, lograron identificar individuos híbridos y puros; en general, los individuos híbridos se encuentran en una posición morfológica intermedia a los parentales (ej. Córdoba y Verga 2006; Verga y Gregorius 2007, pero ver Ferreyra et al. 2013). Esto es consistente con los resultados aquí obtenidos ya que los individuos híbridos se ubicaron en una posición morfológica intermedia entre los parentales, específicamente entre los individuos puros de *P. alba* y los individuos puros de *P. hassleri*. Evaluar la posición de los híbridos en el ordenamiento morfológico es fundamental ya que es una primer evidencia de una de las consecuencias evolutivas más significativas de la hibridación como lo es la segregación transgresiva, que ocurre cuando los valores fenotípicos de los individuos híbridos caen por fuera del rango de variación presentado por los parentales (revisado en Goulet et al. 2017). Esta novedad fenotípica podría conferir cierto potencial adaptativo a los híbridos, permitiendo colonizar nuevos ambientes y/o persistir en el tiempo (Yakimowski y Rieseberg 2014). Si bien Rieseberg et al. (1999) encontró que un 97% de 113 trabajos revisados en plantas reportaron al menos un rasgo transgresivo, los estudios morfológicos realizados hasta el momento en híbridos de *Prosopis* en su rango nativo, muestran siempre valores intermedios de los híbridos respecto a sus parentales como lo encontrado en esta tesis (con la excepción de lo reportados en Ferreyra et al. (2013) para la longitud del pecíolo y el número de pares de pinnas).

Cuando se analizó la distribución de la variabilidad morfológica en el espacio geográfico, a través de la interpolación del primer eje del ACP, los árboles con mayores valores de largo (LFOL) y ancho del foliólulo (AFOL), distancia entre foliolulos (DIFOL), largo de pina (LPI), y área foliar (ARFOL), se encontraron hacia el norte del área de estudio, donde predominan los individuos puros de *P. hassleri* y *P. fiebrigii*. Sin embargo, hacia el sur, donde los valores de dichas variables son menores, predominan los individuos puros de *P. alba* y en

donde se observan además mayores valores en el número de pares de pinas (NPI), número de foliolulos (NFOL) y la relación longitud/ancho del foliólulo (LAFOL).

En la franja que abarca el norte de Formosa y sur de Paraguay, en una posición geográfica intermedia, se encuentran los individuos con morfología intermedia.

Las características topográficas del Parque Chaqueño Semiárido y Subhúmedo que pueden asociarse a una gran llanura, contribuyen a que este patrón de diferenciación “continua” se manifieste con más fuerza aún que lo observado en otras regiones, como por ejemplo en el Chaco árido, en donde existe una localización más marcada de los ambientes por la influencia de las sierras. Por ejemplo, en esa región se observa una distribución de *Prosopis chilensis* asociada al pedemonte, donde existen aportes extra de agua por escorrentía y subsuperficial, mientras que *P. flexuosa* ocupa las llanuras. En cambio, en el área aquí estudiada existe un importante gradiente O-E, no solo en las características climáticas, sino también edáficas y geomorfológicas y en la vegetación (Morello y Adamoli, 1968, 1974).

A pesar de que las especies aquí estudiadas presentan caracteres morfológicos bien definidos, no siempre es factible determinar para algunos individuos, solamente mediante un análisis morfológico, cual fue el cruzamiento que les dio origen, sobre todo al tratarse de un complejo de especies, por este motivo se combinaron diferentes herramientas para el análisis de los diferentes morfotipos encontrados en estas zonas de contacto.

Modelado de nicho ecológico

Uno de los enfoques utilizados fue el modelado de nicho, el cual permitió generar mapas de áreas que son potencialmente adecuadas para la presencia de cada una de las especies, de manera de predecir su distribución potencial, como así también el área potencial de simpatria entre las mismas (Soberón y Nakamura 2009) donde podrían tener lugar procesos de hibridación.

En el modelado de nicho de *P. alba* la estacionalidad de las precipitaciones (bio 15), la temperatura del mes más cálido (bio 5) y la estacionalidad de la temperatura (bio 4), fueron las tres variables bioclimáticas con mayor influencia en su distribución potencial. Por su parte, la temperatura media del trimestre más cálido (bio 10), la temperatura mínima del mes más frío (bio 6) y la precipitación del trimestre más frío fueron las tres variables bioclimáticas con mayor influencia en el modelado de las distribuciones potenciales de *P. hassleri* y *P. fiebrigii*. En general, las variables asociadas a valores de temperaturas fueron más influyentes en el

modelado de *P. alba*, mientras que las relacionadas con la precipitación resultaron claves para el modelado de *P. hassleri* y *P. fiebrigii*. Estos resultados son parcialmente coincidentes con Kees et al. (2011) que encontró que las variables más influyentes en la distribución de *P. hassleri* están relacionadas a los valores medios de temperatura anual, temperatura del trimestre más cálido y la temperatura máxima del periodo más cálido. Esta diferencia puede deberse a que el trabajo citado utilizó otro criterio de selección de variables, a que utilizó otra base de datos climática (Worldclim), pero sobre todo a que abarcó sólo la distribución de *P. hassleri* en la provincia de Formosa, mientras que el presente trabajo abarca prácticamente toda el área de distribución de *P. hassleri* y *P. fiebrigii* en Argentina y Paraguay.

El área de distribución potencial de *P. alba* se extendió por toda la región chaqueña y el Espinal y se evidenció que las áreas de mayor favorabilidad o probabilidad de presencia de la especie se extienden más hacia el sur del área de estudio, abarcando principalmente las provincias de Formosa, Salta, Chaco, Santiago del Estero hasta el norte de Córdoba, y Santa Fé en Argentina. En el caso de *P. hassleri* y *P. fiebrigii* las distribuciones potenciales se restringieron al Chaco subhúmedo de Argentina (Formosa) y Paraguay (Departamento Presidente Hayes), que coincide con la distribución descrita por Burkart (1976). La principal diferencia climática entre la distribución de *P. hassleri* y *P. fiebrigii* respecto a *P. alba* fueron las mayores precipitaciones, isothermalidad y menor estacionalidad en la que se encuentran las dos primeras especies.

A pesar de que *P. hassleri* y *P. fiebrigii* comparten prácticamente toda su distribución, la mayor probabilidad de presencia (o mayor favorabilidad) para *P. hassleri* se encuentra en el noreste de la Provincia de Formosa, extendiéndose a áreas localizadas hacia el noroeste de Paraguay, mientras que la mayor probabilidad de presencia de *P. fiebrigii* se encuentra principalmente en Paraguay, extendiéndose hacia el noreste de este país. Es decir que, si bien sus distribuciones se solapan, habría cierto nivel de diferenciación en los sitios más favorables para cada una. En esta línea, la superposición de nichos entre *P. hassleri* y *P. fiebrigii* fue de un 75 %, encontrándose que sus nichos resultaron no sólo significativamente similares, sino que además resultaron equivalentes. La prueba de equivalencia es muy estricta, ya que se espera aceptar la hipótesis nula planteada sólo cuando las especies analizadas toleran el mismo conjunto de condiciones ambientales (Warren et al. 2008). La menor superposición de nichos se encontró entre *P. alba* y *P. fiebrigii* con un 14 % siendo sus nichos ni similares ni equivalentes. Si bien la superposición de *P. alba* con *P. hassleri* (16 %) fue bastante similar a la reportada con *P. fiebrigii*, en este caso la prueba de similitud de nicho sí fue significativa.

Si bien el modelado de nicho y el análisis de solapamiento de nichos sólo se realizó en las especies puras, cuando se analizó el comportamiento de las variables climáticas que mayor contribución mostraron en el modelado, se incluyeron a los morfotipos intermedios. *Prosopis hassleri* y *P. fiebrigii* compartieron el rango de valores y sus óptimos en todas las variables climáticas, mientras que en sólo dos variables de las diez variables consideradas (Precipitación del trimestre más cálido y Temperatura media del trimestre más húmedo) *P. alba* presentó el mismo rango climático que *Prosopis hassleri* y *P. fiebrigii* (aunque para el caso de la variable Precipitación del trimestre más cálido presentó un óptimo localizado en sitios más secos que las otras dos especies). Estas dos variables presentaron un rango de variación pequeño en *P. alba*, lo cual es llamativo dada la amplia distribución geográfica de esta especie, lo que podría indicar que se trata de variables climáticas limitantes para *P. alba*. En las restantes variables climáticas (Precipitación del mes más seco, y del trimestre más frío, Estacionalidad de las precipitaciones y de la temperatura, y Temperatura media del trimestre más seco y más cálido) *P. alba* presentó un rango climático significativamente más amplio que las otras especies, solapándose marginalmente con los requerimientos climáticos de *P. hassleri* y *P. fiebrigii*.

En cuanto a los morfotipos intermedios los mismos siempre presentaron requerimientos climáticos comprendidos dentro del rango climático de sus parentales, pero en general, ambos morfotipos intermedios presentaron perfiles climáticos más similares a *P. hassleri* y *P. fiebrigii* que a *P. alba*. Algo interesante de destacar es el patrón obtenido para las variables precipitación del trimestre más cálido, temperatura media del trimestre más seco y del más húmedo, ya que los morfotipos intermedios se diferenciaron entre sí, hacia un extremo y otro del rango de valores que tomaron *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii*, es decir que, al considerarlos en conjunto, los morfotipos intermedios presentan una distribución bimodal afín a uno u otro parental. Esto podría ser consecuencia de lo que se conoce como introgresión adaptativa, que es el intercambio genético entre híbridos con uno de los parentales mediante retrocruzas, lo que posibilita la transferencia de rasgos favorecidos por selección natural presentes en el parental (Goulet et al. 2017). La introgresión adaptativa es un mecanismo que introduce variación adaptativa de manera más rápida que los eventos de mutación por lo que es un proceso evolutivo de gran relevancia (Abbott et al. 2013). Sin embargo, probar la existencia de dicho mecanismo tiene sus dificultades. Ensayos futuros que incluyan transplantes recíprocos y medidas de supervivencia y/o éxito reproductivo (fitness) son necesarias para profundizar sobre este aspecto.

Al considerar el ordenamiento de los grupos morfológicos en el espacio climático multivariado, los morfotipos intermedios *P. alba* se encontraron más restringidos (donde también se encontraron individuos de morfotipo intermedio *P. hassleri*), ocupando sitios con bajas precipitaciones y alta estacionalidad en las precipitaciones, mientras que los individuos del morfotipo intermedio *P. hassleri* presentan una gran dispersión a lo largo de todo el espacio climático. En particular, se observó que en el ordenamiento multivariado los morfotipos intermedios *P. hassleri* aparecen asociados a sitios de alta estacionalidad donde las especies puras *P. hassleri* y *P. fiebrigii* no lo están, y en sitios con altas precipitaciones y temperatura donde no se encontraría el parental *P. alba*. Es decir que el híbrido tipo *P. hassleri* ocupa nuevos nichos o espacios climáticos en relación a ambos parentales. Estas características observadas en los presuntos híbridos, de mayor frecuencia en relación a determinadas variables ambientales respecto de las especies parentales, podría deberse a que la hibridación no resulte en individuos con mecanismos fisiológicos intermedios, sino que presenten una combinación de rasgos tal que le permita sobrevivir en diferentes condiciones a lo largo del gradiente ambiental. Como se mencionó anteriormente, la segregación transgresiva (Rieseberg et al. 1999), que puede ocurrir por diversos mecanismos genéticos (revisado en Goudet et al. 2017), podría explicar los patrones obtenidos. Esto se propuso también en un estudio fisiológico de híbridos entre *P. chilensis* y *P. flexuosa* (López Lauenstein et al. 2013), que mostró que los híbridos presentaron una tasa de crecimiento más alta cuando la disponibilidad de agua es alta (similar a las especies parentales más vulnerables) y, al mismo tiempo, una alta supervivencia bajo estrés por sequía (similar a las especies parentales más resistentes). Asimismo, en un estudio realizado en una zona híbrida en un complejo de especies del género *Populus*, se encontró un mosaico de individuos híbridos entre *Populus alba* L. y *P. tremula* localizados en nichos ecológicos distintos al de las especies parentales. Este patrón parece ser mantenido en gran medida por el medio ambiente, particularmente los regímenes de perturbación de llanuras de inundación (Karrenberg et al. 2002).

Estos resultados son de gran importancia para poder detectar y considerar recursos genéticos adaptados a condiciones más extremas, donde las especies parentales no tienen posibilidades de prosperar.

Estructura genética y procesos demográficos

El análisis de las secuencias no codificantes de cloroplasto reveló que los dos haplotipos más frecuentes fueron compartidos por todas las especies y morfotipos. Esto puede ser explicado por procesos de hibridación que han ocurrido o están ocurriendo, con la posible captura de cloroplastos (Mc Kinnon et al. 2001; Fehrer et al. 2007; Acosta y Premoli 2010). Esto se produce cuando el citoplasma de una especie se reemplaza por el de otra especie a través de la hibridación/introgresión (Fehrer et al. 2007), lo cual podría explicar la presencia del H3 predominante en *P. hassleri* y *P. fiebrigii* y en menor frecuencia en *P. alba*. La captura de cloroplastos puede ocurrir con frecuencia en especies con distribución simpátrica y compatibilidad reproductiva y se debe principalmente al alto potencial de flujo de genes interespecíficos en las plantas (Rieseberg y Soltis 1991). Este fenómeno está bien documentado en especies arbóreas, como *Nothofagus*, *Alnus*, *Eucaliptus*, *Quercus*, entre otros (King y Ferris 2000; Mc Kinnon et al. 2001; Jimenez et al. 2007; Acosta y Premoli 2010). Por ejemplo, en algunos sistemas se observó que los haplotipos de cpDNA se asocian con regiones circunscritas geográficamente y no con las especies *per se* (Whittemore y Schaal 1991; Petit et al. 1993; Thórsson et al. 2001), patrón que se recupera parcialmente en este estudio (el H3 está restringido hacia el Este y presente en todas las especies y morfotipos intermedios). Una explicación alternativa al hecho de que las especies compartan los haplotipos de cloroplasto también podría deberse a una distribución incompleta de linajes, es decir que el polimorfismo ancestral se mantiene en las especies (Mc Kinnon et al. 2001). La relativa reciente diversificación de la sección Algarobia sugerida en estudios previos (Bessega et al. 2006; Catalano et al. 2008), sumado al escaso número de haplotipos detectados y a una representación bastante similar de las especies puras en ciertos haplotipos (por ejemplo, el H1), respalda la idea de que aún no ha ocurrido suficiente tiempo para que distintos haplotipos se fijen en las especies analizadas. Lamentablemente con la información disponible no es posible concluir sobre el rol de dichos procesos en los patrones encontrados, por lo que serán necesarios estudios futuros que incluyan más muestras y más marcadores tanto nucleares como de cloroplasto.

En el análisis de estructuración espacial SAMOVA se identificaron 2 grupos genéticos, uno representado por *P. hassleri*, *P. fiebrigii* y los morfotipos intermedios *P. alba* y *P. hassleri*, que se extienden desde el centro del área de estudio hacia el Este y el otro representado principalmente por *P. alba*, pero también por las especies puras *P. hassleri*, *P. fiebrigii* y los morfotipos intermedios, localizados desde el centro del área de estudio extendiéndose hacia el

Oeste. La diferenciación genética entre dichos grupos resultó significativa. En los AMOVAs pareados solo se encontró que *P. alba* y *P. fiebrigii* se diferenciaron significativamente.

Cuando se analizaron los individuos a través de microsatélites, el análisis bayesiano de estructuración genética basado en los marcadores microsatélites evidenció la presencia de dos genomas, uno corresponde a *P. alba* y el otro a *P. hassleri/P. fiebrigii*. La distribución espacial de ambos grupos genéticos y la predominancia relativa de los morfotipos, muestra una gran correspondencia con los grupos genéticos basados en los marcadores de cloroplasto. Al igual que ocurrió con las secuencias de ADN de cloroplastos, estos marcadores tampoco permitieron diferenciar a todos los grupos detectados a partir de la morfología, pero sí tuvieron una mayor resolución, ya que en este caso se diferenciaron de manera significativa los individuos puros de *P. alba*, los individuos intermedios tipo *P. alba*, y el resto de los grupos morfológicos, es decir *P. hassleri*, *P. fiebrigii* y los intermedios tipo *P. hassleri*, que no se diferenciaron entre sí. Los patrones observados al analizar las distancias genéticas de Nei y los análisis de agrupamiento bayesiano mostraron la mayor diferenciación genética entre los morfotipos puros de *P. alba* *Isla cuba* (grupo externo) y *P. alba* con respecto al morfotipo intermedio *P. hassleri*, y a los individuos puros *P. hassleri* y *P. fiebrigii* encontrándose el morfotipo intermedio *P. alba* en una posición intermedia a ambos grupos. El morfotipo intermedio *P. hassleri*, si bien se diferenció morfológicamente de las especies puras *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii*, genéticamente no se pudo diferenciar de *P. hassleri* y *P. fiebrigii*, al menos con los seis SSR utilizados en este trabajo. Esto podría deberse a que a veces los individuos híbridos tienen una predominancia del genoma de una u otra especie parental indicando la existencia de hibridación introgresiva (Arnold 1997). Esto ha sido observado en un enjambre híbrido entre *P. chilensis* y *P. flexuosa* donde si bien existe un fuerte flujo génico entre los diferentes grupos morfológicos, el apareamiento es asimétrico, ya que la hibridación está acompañada de un proceso de introgresión diferencial hacia uno de los parentales (Mottura 2006), lo que puede deberse a diferencias fenológicas y/o de abundancia de las especies parentales, entre otros factores (e.g. Acosta y Premoli 2010). La mayor similitud genética de los individuos híbridos hacia uno de los parentales, producto de la hibridación introgresiva, también ha sido reportado en numerosos trabajos previos en *Prosopis* (Landeras et al. 2006; Ferreyra et al. 2007; Sherry et al. 2011).

Cuando se analizó la distribución de la diversidad genética dividiendo el área de estudio en tres zonas, no se encontraron diferencias significativas entre ellas, la mayor parte de la varianza genética de las poblaciones fue encontrada dentro de los morfotipos (68 %) y luego

dentro de las zonas (32 %). Por un lado, estos resultados son consistentes con el sistema reproductivo de las especies de *Prosopis* que es principalmente alógamo. La polinización está mediada por insectos (Genisse et al. 1990) y la dispersión de semillas es endozoica (Reynolds 1954, Mares et al. 1977), ambas estrategias generalmente están asociadas a una dispersión limitada. Por otro lado, estos resultados son concordantes con los encontrados por Velasco Sastre (2019) en un enjambre híbrido de *P. caldenia* y *P. flexuosa*, que reveló que alrededor de 65 % de la varianza ocurrió entre individuos dentro de los morfotipos, el 20% entre individuos y el 15 % entre los distintos morfotipos. Sin embargo, se encontró cierta diferenciación geográfica en la zona Este, que se corresponde con el patrón genético espacial visualizado a través del mapa de interpolación, que mostró que la variabilidad genética está espacialmente estructurada siguiendo principalmente un patrón latitudinal ya que hacia el sureste y hacia el noreste se detectan los individuos con genomas más divergentes, que se corresponden con individuos puros *P. alba* y *P. hassleri/P. fiebrigii*, respectivamente.

En cuanto a los parámetros de diversidad genética, los valores de heterocigosis obtenidos en el morfotipo intermedio *P. alba* ($He=0,66$) fue levemente más alto que sus parentales *P. alba* ($He=0,65$), *P. hassleri* ($He=0,49$) y *P. fiebrigii* ($He=0,57$), mientras que el morfotipo intermedio *P. hassleri* ($He=0,48$) fue el que presentó el menor valor. Híbridos con valores He menores a la de sus parentales, indicarían que la población híbrida estaría establecida y habría sufrido erosión genética por cuellos de botella o por la colonización de nuevos ambientes, mientras que valores altos de He en los híbridos dan cuenta de un proceso de hibridación reciente (Yakimowski y Rieseberg 2014). Esto sugiere que el híbrido tipo *hassleri* podría ser considerado un híbrido de mayor antigüedad y persistencia que el híbrido tipo *alba*. Respaldo esta idea es importante mencionar que el híbrido tipo *hassleri* presentó más evidencia de hibridación introgresante, que se encuentra en tres localidades donde se detectaron sólo formas híbridas sin parentales y que se trata de un híbrido que ocupa un amplio espectro de condiciones climáticas abarcando zonas no habitadas por sus parentales. Mientras que los individuos híbridos tipo *P. alba* en general presentaron un genotipo conformado en similar proporción por el genoma de cada uno de los parentales, ocupa un espectro restringido de condiciones climáticas siempre compartidas con sus parentales y geográficamente siempre se encuentra en zonas de contacto entre *P. alba* y *P. hassleri*. En estudios previos realizados en híbridos en *Prosopis* se encontró que los individuos híbridos presentaron valores similares o intermedios a la heterocigosis esperada de los parentales, sugiriendo que se trataría de procesos de hibridación más recientes (Mottura 2006; Velasco Sastre 2019). Por último, la diferencia

reportada entre los parentales podría deberse a que en general, especies con amplia distribución geográfica, como es el caso de *P. alba*, presentan comparativamente valores más altos de diversidad genética que sus congéneres de distribución más restringida (en este caso, *P. hassleri* y *P. fiebrigii*) (Hamrick et al. 1992).

Los análisis demográficos realizados en los grupos obtenidos a partir de las secuencias de ADN de cloroplasto, sugirieron que ninguno de ellos habría experimentado una expansión demográfica en tiempos evolutivos recientes. Esto también se reflejó en la red de haplotipos obtenida en la que no se observó la típica conformación de estrella compatible con una expansión demográfica reciente. La inferencia de estabilidad demográfica obtenida podría deberse a la resolución de los marcadores que no fueron suficientes para detectar una señal histórica de expansión demográfica, como lo sugiere Grant et al. (2015). Sin embargo, los resultados de estabilidad demográfica son coincidentes con estudios paleoclimáticos y filogeográficos previos realizados en la región Chaqueña que muestran evidencia de estabilidad climática hacia el Este (Garalla et al. 2016; Scaldaferrero et al. 2018). Por ejemplo, algunos autores han postulado que esa zona de transición entre el Chaco Seco y Chaco húmedo habría constituido refugios climáticos durante el UMG, evidenciado tanto por análisis climáticos como genéticos (Werneck et al. 2011; Trujillo-Arias et al. 2017; Camps et al. 2018).

Caracterización citogenética

En el presente trabajo se llevó a cabo el análisis cariotípico de las tres especies puras e individuos híbridos de *P. alba* x *P. hassleri*/*P. fiebrigii*. El número cromosómico $2n=2x=28$ resulta consistente con el número de cromosomas reportados en *Prosopis* para todas las especies estudiadas hasta el momento (revisado en Trenchard et al. 2008). Muchos de los datos disponibles hasta la fecha sugieren que *Prosopis* es esencialmente un género diploide con un número de cromosomas somáticos de $2n = 2x = 28$ (Burkart 1976; Hunziker et al. 1975; Naranjo et al. 1984); sin embargo, existen algunos reportes de poliploidía en *P. juliflora*, ya que presenta formas tetraploides (Cherubini 1954; Hunziker et al. 1975; Burkart 1976; Pasiecznik et al. 2001). En el presente trabajo se confirman los números cromosómicos para *P. alba* y *P. hassleri*, (Hunziker et al. 1975; Bukhari 1997b), mientras que los del morfotipo intermedio *P. alba* x *P. hassleri* y de *P. fiebrigii* se informan por primera vez. Además, este es el primer estudio cariotípico detallado en el género realizado con bandeado de fluorescencia.

Si bien las técnicas utilizadas en este estudio no son las mismas que en Hunziker et al. (1975) y Pastrana et al. (1999), ambos trabajos reportan para *Prosopis* cromosomas relativamente pequeños y presencia de cromosomas metacéntricos y submetacéntricos. Hunziker et al. (1975) observó además que las características cromosómicas de las especies puras allí estudiadas eran similares entre sí y con los híbridos putativos lo cual coincide con los resultados de esta tesis. La fórmula cariotípica y el número de NORs fue el mismo para todos los grupos morfológicos estudiados. Todos los individuos examinados presentaron un par de cromosomas con regiones organizadoras nucleolares (NORs) y satélites asociados, ubicados en los brazos cortos del primer par cromosómico. Esta misma característica fue observada para las demás especies de *Prosopis* analizadas (Hunziker et al. 1975, Pastrana et al. 1999).

Cariotipos conservados entre especies del mismo género fueron observados en otras especies arbóreas donde habitualmente ocurren fenómenos de hibridación, como *Quercus*, *Eucalyptus*, *Fraxinus* y *Nothofagus* (Zoldos et al. 1999; Siljak-Yakovlev et al. 2014; Ribeiro et al. 2016; Acosta y Premoli 2018). Así, el hecho de que las especies compartan similares características cariotípicas refuerza la idea de que los híbridos (en este caso homoploides) puedan ser fértiles, ya que el apareamiento cromosómico en meiosis sería exitoso (Acosta y Premoli 2018). Esta fertilidad en los híbridos permitiría que puedan continuar cruzándose con las especies parentales dando como resultado la aparición de híbridos introgresantes como fue evidenciado con los datos de microsatélites y los análisis integradores. Hunziker et al. (1975) observó un comportamiento meiótico normal en los híbridos estudiados, por lo que propone que estos híbridos serían fértiles y viables.

Es interesante además que se encontraron algunas diferencias entre los cariotipos que permitieron identificar dos citotipos. Un citotipo correspondiente a *P. alba* y otro citotipo correspondiente tanto a *P. hassleri* como a *P. fiebrigii*; el híbrido presentó individuos con citotipo como *P. alba* y otros individuos con citotipo *P. hassleri/P. fiebrigii*. Estos citotipos difirieron en el patrón de distribución de la heterocromatina pericentromérica CMA+ y en su cantidad (expresada como porcentaje de la longitud total del complemento). El citotipo *P. alba* presenta un solo cromosoma (en heterocigosis) con una banda pericentromérica y por lo tanto menor cantidad de heterocromatina, mientras que el citotipo *P. hassleri-P. fiebrigii* presenta dos cromosomas homólogos con banda pericentromérica y mayor cantidad de heterocromatina. Sería interesante conocer si esta heterocromatina pericentromérica se encuentra asociada a genes ribosómicos, por lo que son necesarios estudios de hibridación *in situ* fluorescente y bandeo AgNOR que permitan caracterizarla. El hecho de que en los híbridos se encontraron

ambos citotipos, y que esto fue independiente a la morfología o genotipo revelado con microsatélites, apoyaría la idea de considerar a los individuos híbridos analizados, como introgresantes.

Por último, se encontró variación entre morfotipos en el tamaño cromosómico, el cromosoma más chico correspondió a *P. alba* y el más grande a *P. hassleri*. Esto se evidenció en el valor de la longitud cromosómica media (c), siendo mayor en *P. hassleri*. Los híbridos presentaron valores intermedios. La variación geográfica en los tamaños cromosómicos de las especies fue sugerida por Hunziker et al. (1975), sin embargo, en ese trabajo no se realizaron mediciones que permitan corroborarlo. Pastrana et al. (1999) encontró variación estadísticamente significativa entre poblaciones de *P. laevigata*, y sugirió que podría deberse a adaptaciones a las variaciones climáticas. Menor longitud cromosómica como es el caso de *P. alba* implica menor cantidad de ADN, promoviendo ciclos celulares más cortos y períodos de actividad fenológicos más cortos. Estas características podrían ser más beneficiosas en ambientes estresantes (Pastrana et al. 1999). Coincidentemente, tanto *P. alba* como la población de menor longitud cromosómica de *P. laevigata* habitan ambientes de mayor aridez.

Asociación entre la variación morfológica, climática y genética

En general se encontró una alta correspondencia entre la caracterización morfológica y genética, principalmente para las especies puras, pero en algunos casos se encontró un desacople entre el morfotipo y el genotipo, ya que algunos morfotipos que fueron identificados como especies puras, basados en caracteres morfológicos, resultaron individuos híbridos de acuerdo con la caracterización genética, y viceversa. Estos resultados son coincidentes con lo expresado en el estudio de un enjambre híbrido de *P. alba* y *P. nigra* realizado por Vega et al. (2020) que sugieren que los caracteres morfológicos son útiles para diferenciar especies (en ese caso *P. nigra* y *P. alba*), como lo propuso Burkart (1976), pero no para distinguir confiablemente entre individuos híbridos y puros. En el caso de los morfotipos intermedios, si bien todos los individuos correspondían genéticamente a individuos híbridos, individuos más similares genéticamente a *P. alba*, morfológicamente fueron más similares a *P. hassleri* y viceversa. Por lo tanto, cuando analizamos la asociación entre los datos morfológicos y genéticos a través de la prueba de Mantel parcial no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la variación morfológica y genética. Si bien existe una larga discusión en la

literatura sobre la pertinencia de la aplicación de la prueba de Mantel Parcial, y en particular cuando ambos conjuntos de datos presentan autocorrelación espacial (Oden y Sokal 1992; Dutilleul et al. 2000; Raufaste y Rousset 2001; Castellano y Balletto 2002; Rousset 2002; Legendre y Fortin 2010), dicho análisis sigue siendo uno de los más utilizados para evaluar asociaciones bajo autocorrelación espacial.

El desacople entre la morfología y los marcadores moleculares se ha observado muchas veces en zonas híbridas de plantas (Rieseberg y Ellstrand 1993), y en general, la introgresión de caracteres morfológicos es más restringida que la introgresión de los marcadores moleculares (Rieseberg y Wendel 1993). En estudios de hibridación entre especies de robles también se han encontrado incongruencias o solo congruencia parcial entre la variación morfológica y molecular, en la que todos los individuos parecían genéticamente intermedios o incluso más cercanos a un parental, pero morfológicamente eran más similares al otro parental (Gonzalez Rodriguez et al. 2004). Estas asociaciones cambiantes pueden explicarse si las retrocruzas ocurren con frecuencia entre los híbridos y sus especies parentales, lo que determina que los híbridos son un mosaico de caracteres parentales e intermedios (Allendorf et al. 2001; Gonzalez-Perez et al. 2004; Yuzbasioglu et al. 2008). Sin embargo, esto no se trataría de un proceso neutral, sino más bien adaptativo, ya que estudios previos han propuesto que cuando hay introgresión de caracteres morfológicos muy probablemente, esto estaría mediado por un proceso selectivo que favorece a un tipo morfológico más que a otro (revisado en Goulet et al. 2017).

La asociación significativa entre la variabilidad morfológica y climática, al igual que el ordenamiento del consenso significativo obtenido mediante el análisis de Procrustes Generalizado (APG), permitió diferenciar principalmente a los individuos puros *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii* ordenados de un extremo al otro del eje principal y los morfotipos intermedios en una posición intermedia entre *P. alba* y *P. hassleri*. Esta asociación entre la caracterización morfológica y climática sugiere que la variación morfológica podría ser el resultado de procesos de adaptación local de las especies/morfotipos a los diferentes ambientes. El patrón observado de covariación climática y morfológica parece respaldar dicha idea, ya que, en la zona noreste de Formosa y Paraguay, hacia donde se incrementan las precipitaciones, y donde se encuentran *P. hassleri* y *P. fiebrigii*, las hojas en general son más grandes (mayor longitud y ancho de los foliolulos), presentan menor número de pinnas y de foliolulos y además mayor distancia entre sí. Sin embargo, a medida que las precipitaciones disminuyen hacia el oeste, las hojas son más pequeñas, con mayor número de pinnas y foliolulos. Esta tendencia de

reducción del área foliar asociada a la disminución de las precipitaciones ha sido reportada en numerosos trabajos como una adaptación a ambientes más áridos (Fonseca et al. 2000).

Complejo P. hassleri-P fiebrigii

En la monografía del género *Prosopis* realizada por Burkart (1976), basada en caracteres morfológicos y de acuerdo a la distribución geográfica de las especies, se describe a *Prosopis hassleri* y *P. fiebrigii* como dos especies diferentes, describiendo la distribución de *P. hassleri* en Paraguay y en Argentina, en la zona Este de la Región Chaqueña; y a *P. fiebrigii* con una distribución similar a *P. hassleri*, pero con preferencia de suelos arcillosos, con pastizales y palmares con inundaciones periódicas, distribuida en Paraguay, en la región húmeda de la región Chaqueña y en Argentina, en una franja estrecha en la Provincia de Formosa (Burkart 1976). Sin embargo, Palacios y Bravo (1981) realizaron estudios morfológicos y cromatográficos en estas especies y mencionaron que estas especies crecen en simpatria y que las barreras de aislamiento reproductivo entre las mismas son relativamente débiles.

Las diferencias morfológicas encontradas entre *P. hassleri* y *P. fiebrigii* fueron significativas, pero conformando una variación continua, lo cual también se evidenció en el análisis discriminante ya que dos individuos de 63 de *P. hassleri* fueron clasificados como *P. fiebrigii* y siete de 84 de *P. fiebrigii*, como *P. hassleri*. Sin embargo, al analizar estas especies utilizando marcadores microsatélites en diferentes zonas de la Provincia de Formosa, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas y las distancias genéticas de Nei fueron las más bajas. Así también, cuando se analizaron a estas dos especies a través de secuencias no codificantes de cloroplasto, en áreas geográficas más amplias, abarcando casi toda el área de distribución de *P. hassleri* y *P. fiebrigii* en Argentina y Paraguay tampoco se encontraron diferencias genéticas significativas. Por su parte, los estudios citogenéticos revelaron el mismo número cromosómico $2n=2x=28$ para las dos especies. Además, presentaron el mismo Citotipo (se observaron siempre dos cromosomas (par n° 13 submetacéntrico) con bandas CMA+/DAPI-pericentroméricas). Así también presentaron valores similares en la cantidad de heterocromatina expresada como porcentaje de la longitud total del complemento (HC), el máximo número de bandas diploides y la longitud cromosómica media (c). Finalmente, los resultados obtenidos en los modelados de nichos y las pruebas de equivalencia y similitud de nichos revelaron que ambas especies presentan nichos casi idénticos. Sin embargo, también es importante notar que el área de mayor favorabilidad climática de cada una se localiza en

distintos lugares, mostrando una leve divergencia en las condiciones climáticas óptimas de cada especie. Para el caso de *P. hassleri* se encuentra en el noreste de la Provincia de Formosa, extendiéndose hacia el noroeste de Paraguay, y para el caso de *P. fiebrigii* se encuentra hacia el noreste de Paraguay.

A partir de los resultados del presente estudio sugerimos que *P. hassleri* y *P. fiebrigii* no corresponderían a dos especies diferentes, sino a una única especie variable a escala geográfica, con dos ecotipos presentes en el Chaco Subhúmedo. Estos ecotipos si bien comparten la mayor parte de su distribución, ocupan de manera diferencial el espacio climático, aunque esta diferenciación es pequeña, y probablemente las condiciones edáficas que habitan (aspecto que no pudo ser incluido en la presente tesis) sean también disímiles. Así, el ecotipo *fiebrigii* está caracterizado por presentar individuos con hojas con mayor área foliar y con foliolos más largos y anchos, que se distribuyen hacia el noreste de Formosa y Paraguay, correspondiente a zonas más húmedas, principalmente asociadas a palmares con inundaciones periódicas. Por su parte, el ecotipo *hassleri* se extendería hacia el noroeste de Formosa y Paraguay, y estaría asociado a menores precipitaciones y mayores temperaturas. Este ecotipo es el que se encontraría en la zona de contacto con *P. alba*, y en la que a partir del presente estudio se reveló la existencia de híbridos interespecíficos. Para poder determinar fehacientemente si *P. hassleri* y *P. fiebrigii* corresponden a una única especie, se continuarán profundizando los estudios genéticos y ecológicos sobre este complejo de especies.

Los problemas de delimitación de especies en el género *Prosopis* ocurren principalmente en la sección Algarobia, donde es muy común la aparición de formas intermedias originadas presumiblemente por la hibridación interespecífica en áreas donde entran en contacto diferentes especies. Una explicación alternativa, es que en lugar de tratarse de ecotipos de una especie más ampliamente distribuida, *P. hassleri* y *P. fiebrigii* tengan una larga historia de hibridación conformando actualmente un complejo de especies con una historia evolutiva común. En esta línea, se ha propuesto que en el género *Prosopis*, en particular en la sección Algarobia, se encuentran diversas formas adaptadas a distintas condiciones, que se cruzan entre sí y van ocupando nuevos ambientes. Es decir, se pierde el concepto de especie y la unidad evolutiva es el complejo (Verga 2014). Futuros estudios que incorporen más marcadores nucleares y nuevos sitios de muestreo en la que estas especies se encuentren en simpatria y alopatría son necesarios para concluir sobre el estatus taxonómico de dichas especies.

5. CONCLUSIONES

La presente tesis aporta al conocimiento de una zona de contacto de un complejo de tres especies de algarrobos blancos pertenecientes al género *Prosopis* utilizando diferentes aproximaciones y abarcando tanto zonas puras como así también cubriendo todo el rango geográfico compartido por ellas en Argentina y Paraguay.

A partir de las diferentes técnicas utilizadas fue posible conocer la variabilidad, diferenciación y estructura genética de poblaciones naturales de *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii* y de híbridos interespecíficos, confirmando la existencia de procesos de hibridación e introgresión. Se pudieron detectar tanto las especies puras *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii*, híbridos probablemente F1, híbridos introgresantes tipo *P. alba* o tipo *P. hassleri* e híbridos introgresantes con desacople entre las características genéticas y las morfológicas. Además, se detectaron indicios de una población híbrida, como es la de los híbridos tipo *hassleri*, que podría estar más establecida, caracterizada por bajos valores de H_e (valores menores a las especies parentales), y por presentar más frecuencia de desacople entre el fenotipo y genotipo, correspondiéndose con híbridos homoploides introgresantes. Este híbrido ocupa un amplio espectro de condiciones climáticas abarcando zonas no habitadas por sus parentales. Futuras líneas de trabajo son necesarias para conocer en qué medida este híbrido se ha establecido y si actualmente está aislado reproductivamente de sus parentales.

Los cambios en la distribución de las especies han sido y seguirán siendo una consecuencia importante del cambio climático (Rosenzweig et al. 2008). Los procesos de hibridación detectados entre *P. alba* y *P. hassleri/fiebrigii*, podrían considerarse como una estrategia evolutiva que aumenta el potencial de respuesta de estas especies frente a un escenario de cambio climático, en la que el flujo de genes entre las especies podría conferirles mayor adaptación y mayor capacidad de supervivencia *in situ*. Así *P. hassleri* podría transferir a *P. alba* mayor capacidad de supervivencia en ambientes más húmedos y con mayores precipitaciones, y por el contrario *P. alba* transferir a *P. hassleri/fiebrigii* mayor capacidad de adaptación a climas más secos y estacionales. El conocimiento generado a partir del presente estudio contribuye a comprender el funcionamiento de este complejo de especies y es una base para diseñar estudios que contribuyan a la conservación dinámica de los recursos genéticos, mejorando la capacidad evolutiva del complejo y facilitando la adaptación a entornos cambiantes.

6. BIBLIOGRAFIA

Abbott R, Albach D, Ansell S, Arntzen JW, Baird SJE, Bierne N, Boughman J, Brelsford A, Buerkle CA, Buggs R, Butlin RK, Dieckmann U, Eroukhmanoff F, Grill A, Cahan SH, Hermansen JS, Hewitt G, Hudson AG, Jiggins C, Jones J, Keller B, Marczewski T, Mallet J, Martínez-Rodríguez P, Möst M, Mullen S, Nichols R, Nolte AW, Parisod C, Pfennig K, Rice AM, Ritchie MG, Seifert B, Smadja CM, Stelkens R, Szymura JM, Väinölä R, Wolf JBW, Zinner D (2013) Hybrid and speciation. *J. Evol. Biol.*, 26: 229-246.

Acosta M, Oliva L, Abril A (1994) Colección de Rhizobios de *Prosopis* arbóreos en la zona semiárida de la Provincia de Córdoba (ARGENTINA). *Ciencia del Suelo* 12:38-40.

Acosta MC, Bernardello G, Guerra ME, Moscone A (2005) Karyotype analyses in several South American species of *Solanum* and *Lycianthes rantonnei* (Solanaceae). *Taxon*, 54: 713-723.

Acosta MC, Premoli AC (2010) Evidence of chloroplast capture in South American *Nothofagus* (subgenus *Nothofagus*, Nothofagaceae). *Mol. Phylogenetics Evol.* 54: 235–242.

Acosta MC, Premoli AC (2018) Understanding the extensive hybridization in South American *Nothofagus* through karyotype analysis. *Biol. J. Linn. Soc.* 188: 74-86. doi:10.1093/botlinnean/boy043.

Aguilar DL, Acosta MC, Baranzelli MC, Sérsic AN, Delatorre-Herrera J, Verga A, Cosacov A (2020) Ecophylogeography of the disjunct South American xerophytic tree species *Prosopis chilensis* (Fabaceae). *Biol. J. Linn. Soc.* 20: 1-17.

Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK (2001) The problems with the hybrids: setting conservation guidelines. *Trends. Ecol. Evol* 16 (11):613–622.

Alsos IG, Engelskjøn T, Gielly L, Taberlet P, Brochmann C (2005) Impact of ice ages on circumpolar molecular diversity: insights from an ecological key species. *Mol. Ecol.* 14: 2739–2753.

Anderson E (1948) Hybridization of the habitat. *Evolution.* 2(1):1-9.

Anderson E (1949) Introgressive hybridization. Wiley, Nueva York.

- Anderson RP, Gómez-Laverde M, Peterson AT (2002) Geographical distributions of spiny pocket mice in South America: insights from predictive models. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 11: 131–141.
- Arnold ML (1997) *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford University Press, Nueva York.
- Avise JC (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall. New York, USA.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachuset.
- Avise JC (2004) *Molecular markers, natural history and evolution*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts, EE.UU.
- Balzarini MG, Di Rienzo JA (2017) InfoGen versión 2017. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.info-gen.com.ar>.
- Bandelt HJ, Forster P, Rohlf A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37–48.
- Barton NH, Hewitt GM (1985) Analysis de hybrids zones. *A. Rev. Ecol. Syst.* 16, 113–148.
- Begon M, Harper J, Townsend C (1996) *Ecology: individuals, populations and communities*. 3ra ed. Blackwell Science Ltd.
- Besega, C, Ferreyra, L, Julio N, Montoya S, Saidman B, Vilardi J (2000) Mating System parameters in species of genus *Prosopis* (Leguminosae). *Hereditas* 132: 19-27.
- Besega C, Saidman B, Vilardi J (2000) Isozyme and RAPD studies in *Prosopis glandulosa* and *P. Velutina* (Leguminosae, Mimosoideae) *Genet. Mol. Biol.* vol. 23 N°3.
- Besega C, Saidman BO, Darquier MR, Ewens M, Sanchez L, Rozenberg PH, Vilardi JC (2009). Consistency between marker and genealogy based heritability estimates in an experimental stand of *Prosopis alba* (Leguminosae). *Am. J. Bot.* 96:458 465.
- Besega C, Pometti CL, Ewens M, Saidman BO, Vilardi JC (2012) Strategies for conservation for disturbed *Prosopis alba* (Leguminosae, Mimosoideae) forests based on mating system and pollen dispersal parameters. *Tree Genet. Genomes* 8: 277–288.
- Besega C, Pometti CL, Miller JT, Watts R, Saidman BO, Vilardi JC (2013). New microsatellite loci for *Prosopis alba* and *P. chilensis* (Fabaceae). *Appl. Plant Sci.* 1:1200324.

- Besega C, Pometti C, Ewens M, Saidman BO, Vilardi JC (2015) Evidences of Local Adaptation in Quantitative Traits in *Prosopis alba* (Leguminosae). *Genetica* 143(1): 31–44.
- Bowcock AM, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minc E, Kidd JR, Cavalli-Sforza LL (1994) High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*. 368: 455-457.
- Bowen CC (1956) Freezing by liquid carbon dioxide in making slides permanent. *Stain Technol*, 31, 87-90.
- Broennimann O, Fitzpatrick MC, Pearman, PB, Petitpierre B, Pellissier L, Yoccoz NG, Thuiller W, Josée Fortin M, Randin C, Zimmermann NE, Graham, CH, Guisan A (2012) Measuring ecological niche overlap from occurrence and spatial environmental data. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 21(4), 481-497.
- Broennimann O, Di Cola V, Guisan A (2020) ecospat: Spatial Ecology Miscellaneous Methods. R package version 3.1. <https://CRAN.R-project.org/package=ecospat>.
- Bukhari YM. 1997b. Nuclear DNA amounts in *Acacia* and *Prosopis* (Mimosaceae) and their evolutionary implications. *Hereditas* 126: 45–51.
- Burghardt AD, Brizuela MM, Palacios RA (2000) Variabilidad en plántulas de algunas especies de *Prosopis* L. (Fabaceae). En busca de descriptores morfológicos. *Multequina*, 9, 23-33.
- Burkart A (1976) A monography of the genus *Prosopis* (Leguminosae Subfam. Mimosoidae). *J. Arnold Arbor.* 219-249 / 451-525.
- Burke JM, Arnold ML (2001) Genetics and the fitness of hybrids. *Annu. Rev. Genet.* 35:31-52.
- Bramardi S, Bernet G, Asins M, Carbonell E (2005) Simultaneous Agronomic and Molecular Characterization of Genotypes via the Generalised Procrustes Analysis. *Crop Sci.* 45:1603–1609. Minidoi:10.2135/cropsci2004.0633.
- Cabrera A, Willink A (1973) Biogeografía de América Latina. O.E.A. Serie Biología, N° 13.
- Cabrera, A. L. (1976). Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. 2° ed. Tomo II. Fasc. I. Acme. Buenos Aires.
- Camps GA, Martínez-Meyer E, Verga AR, Sérsic AN, Cosacov A (2018) Genetic and climatic approaches reveal effects of Pleistocene refugia and climatic stability in an old giant of the Neotropical Dry Forest. *Biol. J. Linn. Soc.* 125 (2): 401-420. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/bly115>.

- Castellano S, Balletto E (2002) Is the Partial Mantel Test Inadequate? *Evolution* 56(9): 1871-1873.
- Catalano SA, Vilardi JC, Tosto D, Saidman BO (2008) Molecular phylogeny and diversification history of *Prosopis* (Fabaceae: Mimosoideae). *Biol. J. Linn. Soc.* 93: 621–640.
- Chapuis MP, Estoup A (2014) Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Mol. Biol. Evol.* 24: 621-631.
- Chybicki IJ, Burczyk J (2008) Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. *J. Heredity*, 100(1), 106-113.
- Cony MA (1998) Importancia de los estudios fisiológicos, ecofisiológicos y genéticos sobre las especies del género *Prosopis* para la recuperación de ecosistemas áridos degradados de América Latina. En: A. B. Cuba Salerno, A. Silva Peralta, & C. Cornejo Flores (Eds.), *Bosques secos y desertificación*. Lambayeque, Perú: INRENA - Proyecto Algarrobo. pp. 255-276.
- Córdoba A, Verga A (2006) Método de análisis fenológico de un rodal: Su aplicación en un enjambre híbrido de *Prosopis* spp. *Ciencia e Investigación Forestal – Instituto Forestal / Chile*. Volumen 14 N° 1: 92-109.
- Cosacov A, Johnson LA Paiaro V, Cocucci A, Córdoba FE, Sérsic AN (2013) Precipitation rather than temperature influenced the phylogeography of the endemic shrub *Anarthrophyllum desideratum* in the Patagonian steppe. *J. Biogeogr* 40: 168–182.
- Cosacov A, Vega C, Romanutti A, Acosta C, Sérsic AN, Verga A (2014) Resultados preliminares de la variación genética a escala geográfica del complejo *Prosopis* en el Gran Chaco. Reunión Regional de Algarrobo. Lugar: Roque Saenz Peña, Chaco.
- Chávez Díaz L, González P, Rubio E, Melchiorre M (2013) Diversity and Stress Tolerance in Rhizobia from Parque Chaqueño Region of Argentina Nodulating *Prosopis alba*. *Biol. Fertil. Soils* 49(8): 1153–65.
- Cherubini C (1954) Números de cromosomas de algunas especies del genero *Prosopis* (Leguminosae-Mimosoidae). *Darwiniana* 10: 637–643.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.
- Dimitri M (1997) Algarrobo Blanco (*Prosopis alba*). *Especies Forestales de la Argentina Occidental*. *El Nuevo Libro del Árbol*. I: 8-9.

- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2017) InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- DFSC (2000) Conservation of genetic resources of *Pinus merkusii* in Thailand. Technical Note No. 58. Humlebaek, Denmark.
- Donoso ZC, Atienza HJ (1983) Hibridación Natural entre especies de *Nothofagus* Siempreverdes en Chile. *BOSQUE*, 5(1), 21-34. doi:10.4206/ bosque. 1983.v5n1-03
- Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol. Biol. Evol* 22: 1185–1192.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol. Ecol* 11: 2571–2581.
- Dutilleul P, Jason DS, Frigon D, Legendre P (2000) The Mantel Test versus Pearson's Correlation Analysis: Assessment of the Differences for Biological and Environmental Studies. *J. Agr. Biol. Envir. St* 5(2): 131-150.
- Earl DA, Vonhold BM (2012). Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4:359–361.
- Endler JA (1986) Natural selection in the wild. Princeton, University Press. Princeton, New Jersey. USA.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14:2611–2620.
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin Suite Ver 3.5: A New Series of Programs to Perform Population Genetics Analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10(3): 564–67.
- Ewens M, Gezan S, Felker P (2012) Five Year Field Evaluation of *Prosopis alba* Clones on pH 9–10 Soils in Argentina Selected for Growth in the Greenhouse at Seawater Salinities (45 dS m⁻¹). *Forests* 2012, 3, 95-113; doi:10.3390/f3010095.
- FAO (2007) Situación de los bosques del Mundo. FAO, Roma, Italia. 277 p. EISBN 978-92-5-108403-8. <http://www.fao.org/3/a0773s/a0773s09.pdf>.

- Fehrer J, Gemeinholzer B, Chrtek JJ, Bräutigam S (2007) Incongruent plastid and nuclear DNA phylogenies reveal ancient intergeneric hybridization in *Pilosella hawkweeds* (Hieracium, Cichorieae, Asteraceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 42, 347–361.
- Ferreira LI, Bessega C, Vilardi JC, Saidman BO (2007) Consistency of population genetics parameters estimated from isozyme and RAPDs dataset in species of genus *Prosopis* (Leguminosae, Mimosoideae). *Genetica*, 131(3), 217-230.
- Ferreira L, Vilardi, J, Verga A, López V, Saidman B (2013) Genetic and morphometric markers are able to differentiate three morphotypes belonging to Section Algarobia of genus *Prosopis* (Leguminosae, Mimosoideae). *Plant Syst. Evol.* 299,1157-1173.
- Fielding AH, Bell JF (1997) A review of methods for the assessment of prediction errors in conservation presence/absence models. *Environ. Conserv.* 24: 38–49.
- Fontana ML, Pérez VR, Luna CV (2018) Características evolutivas en *Prosopis spp.*: citogenética, genética e hibridaciones. *Rodriguésia* 69 (2): 409-421. 2018.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.
- Galera F (2000) Los algarrobos. Las especies del género *Prosopis* (algarrobos) de América Latina con especial énfasis en aquellas de interés económico. pp 269.
- Gallo LA, Geburek TH (1991) Genetics of isozyme variants in *Populus tremula*, *P. tremuloides* and their hybrids. *Euphytica*. 53 (3): 225-233.
- Gallo L; Marcheli P; Azpilicueta MM; Crego P (2006) El uso de marcadores genéticos en el género *Nothofagus* con especial referencia a raulí y roble. *Bosque*, Vol. 27 N° 1, 2006, pp. 3-15.
- Garralla SS, Anzótegui LM, Mautino LR (2016) Relaciones paleoflorísticas del Mioceno–Plioceno del norte argentino. *Publicación Electrónica de la Asociación Paleontológica Argentina* 16 (1): 1–13.
- Genise J, Palacios R, Hoc, P, Carrizo, R, Moffat, L, Mom, M, Agullo, M, Agullo, L, Picca, P, 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

- Gillet E (1998) GSED-Program. User's Manual. Genetic Structures from Electrophoresis Data, Version 2.0. Abteilung für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung. Universität Göttingen. Göttingen. Alemania.
- Gimenez AM, Rios N, Moglia G, Lopez C (2008) Leño y corteza de *Prosopis alba* Griseb, algarrobo blanco, Mimosácea, en relación con algunas magnitudes dendrométricas. Bosque (Valdivia). Vol.19. N° 2. p. 53-62.
- Goldstein DB, Schötterer C (1999) Microsatellites: Evolution and applications. Oxford University Press. Oxford, UK.
- Goudet J (2002) Fstat, version 2.9.3.2. Institute of Ecology, Lausanne, Switzerland. <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.html>.
- Goulet BE, Roda F, Hopkins R (2017) Hybridization in Plants: Old Ideas, New Techniques. Plant Physiol. Vol. 173.
- Gonzalez-Rodriguez A, Arias DM, Valencia S, Oyama K (2004) Morphological and RAPD Analysis of Hybridization Between *Quercus affinis* and *Q. laurina* (Fagaceae), Two Mexican Red Oaks. Am. J. Bot. 91(3): 401–409.
- Graham CH, Ron SR, Santos JC, Schneider CJ, Moritz C (2004) Integrating phylogenetics and environmental niche models to explore speciation mechanisms in dendrobatid frogs. Evolution 58:1781–1793.
- Grant, V (1977) Organismic Evolution, San Francisco, U.S.A.
- Grant V (1981) Plant speciation. Columbia Univ.Press. New York
- Grant V (1985) The evolutionary process. W.H. Freeman and Co., San Francisco. 499p
- Grant V (1989) Hibridación natural y sus productos. Especiación Vegetal. 5: 211-291.
- Grant WS (2015) Problems and cautions with sequence mismatch analysis and Bayesian skyline plots to infer historical demography. J. Heredity 106: 333-346.
- Graudal L, Kjaer ED, Canger C (1995) A systematic approach to conservation of genetic resources of trees and shrubs in Denmark. For. Ecol. Manag. 73: 117-134.
- Gregorius H (1974) Genetischer Abstand Zwischen Populationen. I. Zur Konzeption der genetischen Abstandsmessung. Silvae Genet.23:1-3.

- Gregorius H (1978) The concept of genetic diversity and its formal relationship to heterozygosity and genetic distance. *Math. Biosciences* 41: 253-271.
- Gregorius H (1987) The relationship between the concepts of genetic diversity and differentiation. *Theor. Appl. Genet.* 71, 397-401.
- Gregorius H (1988) The meaning of genetic variation within and between subpopulations. *Theor. Appl. Genet.* 76, 947-951.
- Guarino L, Jarvis A, Hijmans RJ, Maxted N (2002) Geographic Information Systems (GIS) and the conservation and use of plant genetic resources. In: J. Engels (ed.) *Managing Plant Genetic Diversity*. CAB International. Wallingford, UK. pp. 387-404.
- Gower JC (1975). Generalized Procrustes analysis. *Psychometrika* 40:33–51.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Hamrick JL, Godt MJW, Sherman-Broyles SL (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* 6:95-124, <https://doi.org/10.1007/BF00120641>.
- Harrison RG (1990) Hybrid zones: windows on evolutionary process. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, 7, 69-128.
- Harrison RG (1993) Hybrids and hybrid zones: Historical Perspective. En: R.G. Harrison, (ed.). *Hybrid zones and the Evolutionary Process*. Oxford University Press.
- Hutchinson GE (1957) Concluding remarks. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol* 22, 415–42.
- Hunziker JH, Poggio L, Naranjo C, Palacios, RA (1975) Cytogenetics of some species and natural hybrids in *Prosopis* (Leguminosae). *Can. J. Genet. Cytol.*, 17, 253:262.
- Hunziker JH (1986) Hybridization and genetic variation of Argentina species of *Prosopis*. *Forest Ecol. Manage* 16: 301-305.
- IPCC 2007 Cambio climático 2007: Informe de síntesis. IPCC, Ginebra, Suiza.
- Jain SK (1976) Patterns of survival and microevolution in plant populations. In: S. Karlin and E. Nevo (Editors), *Population Genetics and Ecology*. Academic Press, New York, pp. 49- 89.
- Janes JK, Hamilton JA (2017) Mixing It Up: The Role of Hybridization in Forest Management and Conservation under Climate Change. *Forests* 2017, 8, 237; doi:10.3390/f8070237.

- Jarvis A, Williams K, Williams D, Guarino L, Caballero PJ, Mottram G (2005) b. Use of GIS for optimizing a collecting mission for a rare wild pepper (*Capsicum flexuosum* Sendtn.) in Paraguay. *Genet. Resour. Crop Ev.* 52: 671–682.
- Jiménez P, López de Heredia U, Collada C, Lorenzo Z, Gil L (2004) High variability of chloroplast DNA in three Mediterranean evergreen oaks indicates complex evolutionary history. *Heredity* 93, 510–515.
- Joseau J, Verga A, Díaz M (2005) Los Recursos Genéticos de *Prosopis*. IDIA XXI, Año V, N° 8, pp: 207-211.
- 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.
- Joseau J, Verga A, Díaz M, Julio N (2013) Morphological Diversity of Populations of the Genus *Prosopis* in the Semiarid Chaco of Northern Cordoba and Southern Santiago Del Estero. *Am. J. Plant Sci.* 4 (November): 2092–2111. <http://www.scirp.org/journal/ajps%0Ahttp://dx.doi.org/10.4236/ajps.2013.411261>.
- Karlin U, Coirini R, Catalan L, Zaata M (1997) Especies Arbóreas y Arbustivas Para Zonas Áridas y Semiáridas de América Latina.” In Serie Zonas Áridas y Semiáridas, Santiago de Chile, Chile: OEA. Programa conjunto FAO-PNUMA de Control de la Desertificación en América Latina y el Caribe, 41–51.
- Kalia RK., Rai MK, Kalia S, Singh R, Dhawan AK (2011). Microsatellite Markers: An overview of the recent progress. *Euphytica*, 177, 309-334.
- Karger D, Conrad O, Böhner J, Kawohl T, Kreft H, Soria-Auza RW, Zimmermann NE, Linder HP, Kessler M (2017) Climatologies at high resolution for the earth’s land surface areas. *Scientific Data* 4, 170122. <https://doi.org/10.1038/sdata.2017.122>.
- Karrenberg S, Edwards PJ, Kollmann J (2002) The life history of Salicaceae living in the active zone of floodplains. *Freshw. Biol.* 2002, 47, 733–748.
- Kass JM, Vilela B, Aiello-Lammens ME, Muscarella R, Merow C, Anderson RP (2018) Wallace: A flexible platform for reproducible modeling of species niches and distributions built for community expansion. *Methods Ecol. Evol.* 9:1151–1156. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12945>.

- Kees S, Gómez C, Verga A, Vera M, Cardozo F, López D, Muttoni F, Gon V (2011) Predicción del área potencial de dispersión de *Prosopis hassleri* en la provincia de Formosa, Argentina. I Congreso Forestal del Chaco Sudamericano. Filadelfia – Paraguay.
- King RA, Ferris C (2000) Chloroplast DNA and nuclear DNA variation in the sympatric alder species, *Alnus cordata* (Lois.) Duby and *A. glutinosa* (L.). Gaertn. Biol. J. Linn. Soc. Lond. 70, 147–160.
- Korol L, Madmony A., Kiov Y. and Schiller G. 1995. *Pinus halepensis* x *Pinus brutia* hybrids. Identification using morphological and biochemical traits. *Silvae Genet* 44: 186-190.
- Landeras G, Alfonso M, Pasiecznik NM, Harris PJC, Ramirez L (2006) Identification of *Prosopis juliflora* and *Prosopis pallida* accessions using molecular markers. *Biodiversity Conservation*, 15, 1829–1844.
- Legendre P, Fortin MJ (2010) Comparison of the Mantel test and alternative approaches for detecting complex multivariate relationships in the spatial analysis of genetic data. *Mol. Ecol. Resour.* 10(5): 831-844.
- Lewontin RC (1974). *The genetic Basis of Evolutionary Change*. New York: Columbia U. Press.
- López Lauenstein D (2010) Estrategias ecofisiológicas de adaptación a la sequía en plantas jóvenes de dos especies de *Prosopis* y sus híbridos interespecíficos. Tesis de Maestría. Escuela para graduados. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba.
- López Lauenstein DA, Fernandez ME, Verga AR (2013) Drought stress tolerance of *Prosopis chilensis* and *Prosopis flexuosa* species and their hybrids. *Trees* 27:285–296.
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol. Evol.* 20, 229–237.
- Mallet J (2007) Hybrid speciation. *Nature* 446: 279– 283.
- Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends Ecol. Evol.* 18: 189–197.
- Mantován NG (2000) Diferenciación morfológica entre poblaciones de *Prosopis flexuosa* D.C. en la provincia filogeográfica del Monte. Argentina. III Reunión Nacional de la Asociación Argentina de Prosopis. Mendoza. Argentina.

- Mares M, Enders F, Kingsolver J, Neff J, Simpson B (1977) *Prosopis* as a niche component. En: Simpson B. (Ed.), *Mesquite: Its Biology in Two Desert Scrub Ecosystems*. Hutchinson & Ross Inc., Dowden, Pensilvania, pp. 123–149.
- MEA. Millennium Ecosystem Assessment (2005) *Ecosystems and Human Well-being: Biodiversity Synthesis*. World Resources Institute, Washington, DC.
- McKinnon GE, Vaillancourt RE, Jackson HD, Potts BM (2001) Chloroplast sharing in the Tasmanian eucalypts. *Evolution* 55: 703–711.
- Morello J, Matteucci SD, Rodriguez AF, Silva ME, Mesopotámica P, Llana P, Medanosa, P (2012) *Ecorregiones y complejos Ecosistémicos de Argentina*. Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires.
- Morris AB, Shaw J (2018) Markers in time and space: A review of the last decade of plant phylogeographic approaches. *Mol. Ecol.* 27: 2317-2333.
- Mottura M, Finkeldey A, Verga A, Gailing O (2005) Development and characterization of microsatellite markers for *Prosopis chilensis* and *Prosopis flexuosa* and cross-species amplification. *Mol. Ecol. Notes.* 5, 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.
- Muscarella R, Galante P, Soley-Guardia M, Boria R, Kass J, Uriarte M, Anderson R (2017) Package ENMeval. Automated Runs and Evaluations of Ecological Niche Models. Version 0.2.2. <https://cran.r-project.org/package=ENMeval>.
- Namkoong G, Koshy MP, Aitken S (2000) Selection. In: Young A, Boshier D, Boyle T (eds) *Forest conservation genetics. Principles and practice*. CSIRO, Collingwood, and CABI, Oxford, pp 101–111.
- Naumann M (2006) *Atlas del Gran Chaco Sudamericano*. Sociedad Alemana de Cooperación Técnica (GTZ). 92 pp. ErreGé y Asoc. Buenos Aires.
- Nei M (1972) Genetic distance between populations. *Am. Nat.*, 106: 283-292.
- 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.

Oden N, Sokal R (1992) An investigation of three-matrix permutation tests. *J. Classif.* 9(2): 275-290.

Osorio-Olvera L, Barve V, Barve N, Soberón J (2016) nichetoolbox: From getting biodiversity data to evaluating species distribution models in a friendly GUI environment. R package version 0.1.6.0. Available at: <http://shiny.conabio.gob.mx:3838/nichetoolb2/>.

Pacheco Balanza D (2012) Características sociales y productivas del Chaco boliviano, en Cambio Climático, Sequía y seguridad alimentaria en el chaco Boliviano, Ed- Universidad de la Cordillera – Fundación de la Cordillera, 2012.

Panetsos CP (1975) Natural hybridization between *Pinus halepensis* and *Pinus brutia* in Greece. *Silvae Genet.* 24: 163-168.

Pasiecznik NM, Felker P, Harris PJC, Harsh LN, Cruz G, Tewari JC, Cadoret K, Maldonado LJ (2001). *The Prosopis juliflora-Prosopis pallida* Complex: A Monograph. HDRA, Coventry, UK, pp 172.

Palacios R, Bravo L (1981) Hibridación natural en *Prosopis* (Leguminosae) en la región chaqueña argentina. *Evidencias morfológicas y cromatográficas. Darwiniana.* 23: 3-35.

Pastrana FT, Mercado-Ruaro P, Ata AM (1999) Cambios en la longitud cromosómica total en tres poblaciones de *Prosopis laevigata* (Fabaceae). *Implicaciones genecológicas y evolutivas. Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México, Bot.* 70(1): 13–28.

Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28:2537–2539.

Peterson AT, Soberón J, Sánchez-Cordero V (1999) Conservatism of ecological niches in evolutionary time. *Science* 285: 1265–1267.

Peterson AT, Papes M, Soberon J (2008) Rethinking receiver operating characteristic analysis applications in ecological niche modeling. *Ecol. Model.* 213: 63–72.

Peterson AT, Soberon J, Pearson RG, Anderson RP, Martínez-Meyer E, Nakamura M, Araújo M (2011) *Ecological niches and geographic distributions.* Princeton: Princeton University Press.

Petit RJ, Kremer A, Wagner DB (1993) Geographic structure of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks. *Theor. Appl. Genet.* 87, 122–128.

- Petit JR, Jouzel J, Raynaud D, Barkov NI, Barnola JM, Basile I, Benders M, Chappellaz J, Davis M, Delayque G, Delmotte M, Kotlyakov VM, Legrand M, Lipenkov VY, Lorius C, Pépin L, Ritz C, Saltzman E, Stievenard M (1999) Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature* 399: 429-436.
- Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol. Model.* 190: 231–259.
- Poggio L (1996) Algunos aportes a la citogenética y especiación vegetal. *Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. Buenos Aires, Argentina, 48: 79-92.
- Poggio L, Naranjo CA (2004) Citogenética. En: Echenique, V.; Rubinstein, C.; Mroginski, L. *Biología y Mejoramiento Vegetal*. Buenos Aires, Editorial INTA, pp. 69-79.
- Ponsuksili, S, K. Wimmers, F. Schmol, P. Horst y K. Schellander (1999) Comparison of multilocus DNA fingerprints and microsatellites in an estimate of genetic distance in Chicken. *J. Heredity.* 90: 656-659.
- Premoli AC (1996) Allozyme polymorphisms, outcrossing rates, and hybridization of South American *Nothofagus*. *Genetica* 97: 55-64.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly PJ (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.
- Pulliam R (2000) On the relationship between niche and distribution. *Ecol. Lett.* 3: 349-361.
- Quiroga MP, Vidal Russell R, Premoli AC (2001) Posible hibridación entre *Nothofagus pumilio* y *N. antarctica*: evidencia morfológica e isoenzimática. I. Reunión Binacional de Ecología Argentina-Chile, Bariloche, Argentina. p. 194.
- Rambaut A, Suchard MA, Xie D, Drummond AJ (2014) Tracer v1.6. Available at: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Raymond M, Rousset F (1995) An exact test for population differentiation. *Evolution* 49:1280-1283.
- Reynolds H (1954) Some interrelations of the Merriam kangaroo rat to velvet mesquite. *J. Range Manag.* 7, 176–180.

- Ribeiro T, Barrela RM, Bergès H, Marques C, Loureiro J, Morais-Cecílio L, Paiva JA (2016) Advancing *Eucalyptus* genomics: cytogenomics reveals conservation of *Eucalyptus* genomes. *Front. Plant Sci.* 7: 510.
- Rieseberg LH, Willis JH (2007). Plant speciation. *Science* 317: 910– 914.
- Rieseberg LH, Ellstrand NC (1993) What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization? *Crit. Rev. Plant Sci.* 12: 213-241.
- Roig FA (1993) Aportes a la Etnobotánica del Género *Prosopis*. En: Contribuciones Mendocinas a la quinta Reunión Regional para América Latina y el Caribe de la Red de Forestación del CIID. Unidades de Botánica y Fisiología Vegetal IADIZA. Pp. 99-121.
- Rogers AR, Harpendin H (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9: 552-569.
- Rousset F (2002) Partial Mantel Tests: Reply to Castellano and Balletto. *Evolution* 56(9): 1874-1875.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA Polymorphism Analyses by the Coalescent and Other Methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Raufaste N, Rousset F (2001) Are partial mantel tests adequate? *Evolution* 55(8): 1703-1705.
- Saidman B (1986) Isoenzymatic studies of alcohol dehydrogenase and glutamate oxalacetate transaminase in four South American species of *Prosopis* and their natural hybrids. *Silvae Genet.* 35: 3-10.
- Saidman BO, Vilardi J (1987) Analysis of the genetic similarities among seven species of *Prosopis* (Leguminosae: Mimosoideae). *Theor. App. Genet.* 75: 109-116.
- Saidman BO (1993) Las isoenzimas en el estudio de la variación genética y las afinidades entre especies de *Prosopis*. *Bol. Genét. Inst. Fitotéc. Castelar.* 16: 25-37.
- Saidman BO, Vilardi JC, Montoya, S., Dieguez, M. J. y Hopp, H. E. (1998). Molecular markers: a tool for understanding the relationships among species of *Prosopis* (Leguminosae, Mimosoideae). In: Puri S. (ed.), *Tree Improvement: J. Appl. Res. Technol.* Oxford & IBH, New Delhi, 311-324.
- SAyDS (2007) 1° Inventario Nacional de Bosques Nativos. Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación. Buenos Aires, Argentina.

- Scaladaferro MA, Barboza GE, Acosta MC (2018) Evolutionary history of the chili pepper *Capsicum baccatum* L. (Solanaceae): domestication in South America and natural diversification in the Seasonally Dry Tropical Forests. *Biol. J. Linn. Soc.* XX, 1–13.
- Servedio MR, Noor MAF (2003) The role of reinforcement in speciation: Theory and data. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 34: 339-64.
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE, Small RL (2005) The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am. J. Bot.* 92: 142-166. doi:10.3732/ajb.92.1.142.
- Shaw J, Edgar B, Lickey EB, Schilling EE, Small R (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in Angiosperms: the tortoise and the hare III. *Am. J. Bot.* 94: 275–288.
- Scheldeman X, Willemen L, Coppens D'eeckenbrugge G, Romeijn-Peeters E, Restrepo MT, Romero Motoche J, Jimenez D, Lobo M, Medina CI, Reyes C, Rodriguez D, Ocampo JA, Van Damme P, Goetghebeur P (2007) Distribution, diversity and environmental adaptation of highland papaya (*Vasconcellea spp.*) in tropical and subtropical America. *Biodivers. Conserv.* 16(6): 1867-1884.
- Schoener TW (1970) Nonsynchronous spatial overlap of lizards in patchy habitats. *Ecology*, 51, 408–418.
- Schwarzacher T, Ambros P, Schweizer D (1980) Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Syst. Evol.* 134, 293-297.
- Schweizer D (1976) Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58(4), 307-324.
- Schweizer D (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 27(2-3), 190-193.
- Schweizer D (1981) Counterstain-enhanced chromosome banding. *Human Genet.* 57, 1-14.
- Sherry M, Smith S, Patel A, Harris P, Hand P, Trenchard L, Henderson J (2011) RAPD and microsatellite transferability studies in selected species of *Prosopis* (section *Algarobia*) with emphasis on *Prosopis juliflora* and *P. pallida*. *J. Genet.* 90(2), 251-264.

- Siljak Yakovlev S, Bartoli A, Roitman G, Barghi N, Mugnier C (1994) Etude caryologique de tris especes d' *Hypochaeris* originaires d'Argentine: *H. chillensis*, *H. microcephala* var. *albiflora* et *H. megapotanica*. Can. J. Bot. 72: 1496-1502.
- Simmons MP, Ochoterena H (2000) Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. Syst. Biol. 49: 369–381.
- Smouse PE, Long JC, Sokal RR (1986) Multiple regression and correlation extensions of the Mantel Test of matrix correspondence. Syst. Zool. 35:627–632.
- Stace, CA (2000) Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. Taxon, 49: 451-477.
- Stebbins, GL (1971) Chromosomal evolution in higher plants. E. Arnold Publ., London.
- Stecconi M, Marchelli P, Puntieri J, Picca P, Gallo L (2004) Natural hybridization between a deciduous (*Nothofagus antarctica*, *Nothofagaceae*) and an evergreen (*N. dombeyi*) forest tree species: evidence from morphological and isoenzymatic traits. Ann. Bot. (Lond.) 94: 775-786.
- Soberón J, Peterson A (2005) Interpretation of models of fundamental ecological niches and species' distributional areas. Biodiversity Informatics, 2, 1-10.
- Soberón J, Nakamura M (2009) Niches and distributional areas: concepts, methods, and assumptions. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 106: 19644-19650.
- Solbrig OT, Bawa KS (1975) Isozyme variation in species of *Prosopis* (Leguminosae). J. Arnold Arbor. 56(4), 398-412.
- Solbrig O, Bawa K, Carman N, Hunziker J, Naranjo J, Palacios R, Poggio L & Simpson B (1977) Patterns of variation. In: Simpson BB (ed.) Mesquite: its biology in two desert ecosystems. Dowden, Hutchinson and Ross, Stroudsburg. Pp. 44-60.
- Soltis PS, Soltis DE (2009) The role of hybridization in plant speciation. Annu. Rev. Pl. Biol. 60: 561–588.
- Soberón J, Nakamura M. 2009. Niches and distributional areas: concepts, methods, and assumptions. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 106: 19644-19650.
- Spensley Jason, Sabelli A, Buenfil J (2013) Estudio de Vulnerabilidad e Impacto Del Cambio Climático En El Gran Chaco Americano.

- Tajima F (1989) The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* 123: 598–601.
- Teich I, Mottura M, Verga A, Balzarini, M (2015) Asociación entre variabilidad Genética y fenotípica con ajuste por autocorrelación espacial en *Prosopis*. *Basic and Applied Genetics*; Lugar: Buenos Aires; Año: 2015 vol. XXVI p. 63 – 74.
- Thórsson AT, Salmela E, Anamthawat-Jónsson K (2001) Morphological, cytogenetic, and molecular evidence for introgressive hybridization in birch. *J. Hered.* 92, 404–408.
- Tovar-Sánchez, E. and K. Oyama. 2004. Natural hybridization and hybrid zones between *Q. crassifolia* and *Q. crassipes* (Fagaceae) in Mexico: morphological and molecular evidence. *Am. J. Bot.* 91:1352-1363.
- Trenchard LJ, Harris PJ, Smith S, Pasiecznick NM (2008) A review of ploidy in the genus *Prosopis* (Leguminosae). *Bot. J. Linn. Soc.* 2008, 156, 425–438.
- Trujillo-Arias N, Dantas GPM, Arbeláez-Cortés E, Naoki K, Gómez MI, Santos FR, Miyaki CY, Aleixo A, Tubaro PL, Cabanne GS (2017) The niche and phylogeography of a passerine reveal the history of biological diversification between the Andean and the Atlantic forests. *Mol. Phylogenetics Evol.* 112: 107–121.
- Urdampilleta JD, Ferruci MS, Vanzela ALL (2005) Karyotype differentiation between *Koelreuteria bipinnata* and *K. elegans* ssp. *formosana* (Sapindaceae) based on chromosome banding patterns. *Bot. J. Linn. Soc.* 149: 451-455.
- Van Zonneveld M, Koskela J, Vinceti B, Jarvis A (2009) Impact of climate change on the distribution of tropical pines in Southeast Asia. *Unasylva* 60: 231-232.
- Vega C, López Lauenstein D, Verga A (2012) Caracterización morfológica del complejo *Prosopis alba*- *P. hassleri* en la Provincia de Formosa. Reunión Nacional del Algarrobo. Universidad Nacional de Córdoba. IFRGV-CIAP-INTA. Córdoba, Argentina.
- Vega C, Teich I, Acosta MC, Lopez Lauenstein D, Verga A, Cosacov A (2020) Morphological and molecular characterization of a hybrid zone between *Prosopis alba* and *P. nigra* in the Chaco region of northwestern Argentina. *Silvae Genet.* 69, 44 – 55.
- Velasco Sastre Teresa (2019) Dinámica evolutiva de enjambres híbridos entre *Prosopis caldenia* y *Prosopis flexuosa* en el Espinal, distrito del Caldenal. Tesis de Doctorado en

Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.

Verga A (1995) Genetic study of *Prosopis chilensis* y *Prosopis flexuosa* (Mimosaceae) in the dry Chaco of Argentina. Tesis Doctoral. Göttingen Research Notes in Forest Genetics. Abteilung für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung der Universität Göttingen

Verga A (2000) Algarrobos como especies para forestación: una estrategia de mejoramiento. SAGPyA Forestal. 16: 12-19.

Verga A (2005) Recursos genéticos, mejoramiento y conservación de especies del género *Prosopis*. In: MEJORES Árboles para más Forestadores. Buenos Aires: Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, 2005. p. 205-221.

Verga A, López C, Naval M, Joseau J, Gómez C, Royo O, Degano W, López Lauenstein D, Marcó M (2007) Caracterización morfológica de los algarrobos (*Prosopis* sp.) en las regiones fitogeográficas Chaqueña y Espinal norte de Argentina. En prensa.

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

Verga A (2014) Rodales semilleros de *Prosopis* a partir del bosque nativo. Quebracho Vol.19(1,2):125-138.

Verga A (2015) Hoja 3.6. Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales, CIAP, INTA. De distribución gratuita a pedido: anibal.r.verga@gmail.com.

Verzino G, Joseau M (2005) El Banco Nacional de Germplasma de *Prosopis*: Conservación de recursos forestales nativos en Argentina.

Warren DL, Glor RE, Turelli M (2008) Environmental niche equivalency versus conservatism: quantitative approaches to niche evolution. Evolution, 62, 2868–2883.

Werneck FR (2011) The diversification of eastern South American open vegetation biomes: historical biogeography and perspectives. Quat. Sci. Rev. 30: 1630–1648.

Wickham H (2016) ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York.

Whitham TG, Morrow PA, Potts BM 1994 Plant hybrid zones as centers of biodiversity: the herbivore community of two endemic Tasmanian eucalypts. Oecologia 97:481–490.

- Williams JH, Williams JB, Howard DJ (2001). Reproductive processes in two oak (*Quercus*) contact zones with different levels of hybridisation. *Heredity* 87: 680–690.
- Whittemore AT, Schaal BA (1991) Interspecific gene flow in sympatric oaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2540–2544.
- Wrege MS, Higa RCV, Britez RM, Garrastazu MC, De Sousa VA, Caramori PH (2009) Climate change and conservation of *Araucaria angustifolia* in Brazil In: *Adapting to climate change. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Unasylva* 231/232, 60 Rome, Italy. pp. 231-232.
- Yakimowski SB, Rieseberg LH (2014) The Role of Homoploid Hybridization in Evolution: A Century of Studies Synthesizing Genetics and Ecology. *Am. J. Bot.* 101 (8): 1247 – 1258.
- Yuzbasioglu E, Mehmet Y, Ozcan S, (2008) Natural hybridization between *Phlomis lycia* D. Don x *P. bourgaei* Boiss., (Lamiaceae) revealed by RAPD markers. *Genetica* 133:13–20.
- Zobel B, Talbert J (1994) Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales. Ed. UTEHA, México. 546 p.
- Zoldos V, Papes D, Cerbah M, Panaud O, Besendorfer V, Yakovlev SS (1999) Molecular-cytogenetic studies of ribosomal genes and heterochromatin reveal conserved genome organization among 11 *Quercus* species. *Theor. Appl. Genet.* volume 99, pages 969–977.
- Zuloaga FO, Morrone O (eds.) (1999) Catálogo de las Plantas Vasculares de la Argentina: Dicotyledoneae. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 74, 1-1246.

7. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1. Localidades de muestreo, coordenadas geográficas por localidad. Además, se indican los morfotipos estudiados a través de secuencias no codificantes de cloroplasto y Microsatélites. MI, morfotipo intermedio.

Especie	Localidad	Provincia	País	Latitud (S)	Longitud (O)	N° individuos secuenciados	N° individuos genotipados
<i>P. alba</i>	El Bragado	Formosa	Argentina	-24,02001111	-61,59999167	1	-
<i>P. alba</i>	Ingeniero Juárez	Formosa	Argentina	-23,81999444	-61,83000833	1	-
<i>P. alba</i>	Pozo de Maza	Formosa	Argentina	-23,57001389	-61,70987778	-	-
<i>P. alba</i>	El Remanso	Formosa	Argentina	-23,41977222	-61,92996944	-	-
<i>P. alba</i>	Norte del Remanso	Formosa	Argentina	-23,31999722	-61,89000556	1	-
<i>P. alba</i>	Sur de Laguna Yema	Formosa	Argentina	-24,60935278	-61,40985278	2	-
<i>P. alba</i>	El Quemado nuevo (Norte de Laguna Yema)	Formosa	Argentina	-23,99994444	-60,97999167	-	-
<i>P. alba</i>	Juan G. Bazán	Formosa	Argentina	-24,46999167	-60,93002778	-	-
<i>P. alba</i>	Las lomas	Formosa	Argentina	-24,77008056	-60,63993611	1	-
<i>P. alba</i>	Sur de Las lomas	Formosa	Argentina	-25,030025	-60,84988611	2	-
<i>P. alba</i>	Sur de Estanislao del Campo	Formosa	Argentina	-25,39259444	-60,30093611	-	-
<i>P. alba</i>	Bañaderos 1	Formosa	Argentina	-26,10989444	-59,66000000	-	-
<i>P. alba</i>	Bañaderos 2	Formosa	Argentina	-26,08998333	-59,65999167	-	-
<i>P. alba</i>	Sur de Palo Santo	Formosa	Argentina	-25,68003889	-59,40990833	-	-
<i>P. alba</i>	Km 100	Formosa	Argentina	-26,52007222	-58,78934167	2	4 <i>P. alba</i>
<i>P. alba</i>	Ruta 11	Formosa	Argentina	-26,46998611	-58,42962222	1	-
<i>P. alba</i>	Acceso a Herradura	Formosa	Argentina	-26,42079167	-58,33061667	-	-
<i>P. alba</i>	Rodal Isla Cuba	Formosa	Argentina	-24,26000000	-61,90000000	3	-
<i>P. alba</i>	Palo Santo	Formosa	Argentina	-25,54000278	-59,30993056	-	-
<i>P. alba</i>	Ibarreta	Formosa	Argentina	-25,24171944	-59,80165556	4 <i>P. alba</i>	9 <i>P. alba</i>

<i>P. alba</i>	Ruta 9 Transchaco	Depto Boquerón	Paraguay	-21,86000278	-60,82996667	1	
<i>P. alba</i>	Mariscal Estigarribia	Depto Boquerón	Paraguay	-22,05023611	-60,53963333	1	
<i>P. alba</i>	Filadelfia	Depto Boquerón	Paraguay	-22,17009722	-60,07996389	-	-
<i>P. fiebrigii</i>	Ruta 23	Formosa	Argentina	-25,10938889	-59,10948056	2 <i>P. fiebrigii</i>	5 <i>P. fiebrigii</i>
<i>P. fiebrigii</i>	Ruta 23	Formosa	Argentina	-25,04998056	-59,06999722	2 <i>P. fiebrigii</i>	3 <i>P. fiebrigii</i>
<i>P. fiebrigii</i>	Ruta 23	Formosa	Argentina	-24,76991944	-58,92944722	2 <i>P. fiebrigii</i>	3 <i>P. fiebrigii</i>
<i>P. fiebrigii</i>	Colonia Ñande Mbaepá	Depto Presidente Hayes	Paraguay	-24,79013611	-58,39013889	1 <i>P. fiebrigii</i>	-
<i>P. fiebrigii</i>	Zona Moisés Galeano	Depto Presidente Hayes	Paraguay	-24,26029167	-58,42807222	-	-
<i>P. fiebrigii</i>	Ruta 5	Depto Presidente Hayes	Paraguay	-23,47068056	-57,620025	1 <i>P. fiebrigii</i>	-
<i>P. fiebrigii</i>	Ruta 5	Depto Presidente Hayes	Paraguay	-23,52003333	-58,01003056	1 <i>P. fiebrigii</i>	-
<i>P. fiebrigii</i>	Ruta 5	Depto Presidente Hayes	Paraguay	-23,48763056	-58,36548333	-	-
<i>P. fiebrigii</i>	Zona la Patria, Estancia Riacho G	Depto Presidente Hayes	Paraguay	-22,58619444	-58,47008333	-	-
<i>P. hassleri</i>	Ruta 9 Transchaco	Depto Presidente Hayes	Paraguay	-23,97346944	-58,42259444	1 <i>P. hassleri</i>	-

<i>P. hassleri</i>	José Falcón	Depto Presidente Hayes	Paraguay	-25,06781667	-57,87700556	-	-
<i>P. hassleri</i>	Zona Zalazar, Villa Hayes	Depto Presidente Hayes	Paraguay	-22,87391111	-58,77847222	-	-
<i>P. hassleri-P. fiebrigii</i>	Ruta 23	Formosa	Argentina	-25,33036944	-59,14970556	1 <i>P. fiebrigii</i> 1 <i>P. hassleri</i>	1 <i>P. fiebrigii</i> 1 <i>P. hassleri</i>
<i>P. hassleri-P. fiebrigii</i>	Ruta 86	Formosa	Argentina	-24,40444444	-59,75869167	2 <i>P. hassleri</i> 1 MI <i>P. hassleri</i>	8 <i>P. hassleri</i> 2 <i>P. fiebrigii</i>
<i>P. hassleri- P. fiebrigii</i>	Riacho He He	Formosa	Argentina	-25,45592222	-58,26265	1 <i>P. fiebrigii</i>	2 <i>P. fiebrigii</i>
<i>P. hassleri- P. fiebrigii</i>	Tres Lagunas	Formosa	Argentina	-25,28463611	-58,37628611	6 <i>P. fiebrigii</i> 2 <i>P. hassleri</i>	3 <i>P. hassleri</i> 4 <i>P. fiebrigii</i>
<i>P. hassleri- P. fiebrigii</i>	Laguna Blanca	Formosa	Argentina	-25,17344444	-58,14727222	1 <i>P. hassleri</i>	-
<i>P. hassleri- P. fiebrigii</i>	Ruta 12	Depto Presidente Hayes	Paraguay	-24,92961944	-58,17469444	1 <i>P. hassleri</i> 1 <i>P. fiebrigii</i>	-
<i>P. hassleri- P. fiebrigii</i>	Ruta 9 Transchaco	Depto Presidente Hayes	Paraguay	-24,63479722	-58,02087222	2 <i>P. hassleri</i> 2 <i>P. fiebrigii</i>	-
<i>P. hassleri- P. fiebrigii</i>	Pozo Colorado	Depto Presidente Hayes	Paraguay	-23,49083056	-58,66026944	1 <i>P. hassleri</i> 1 <i>P. fiebrigii</i>	-
<i>P. hassleri- P. fiebrigii</i>	Zona Zalazar, Villa Hayes	Depto Presidente Hayes	Paraguay	-22,96602778	-59,07423333	1 <i>P. hassleri</i> 1 <i>P. fiebrigii</i>	-
<i>P. alba-P. fiebrigii</i>	Ruta 23	Formosa	Argentina	-25,40993333	-59,20004444	2 <i>P. alba</i> 2 <i>P. fiebrigii</i>	2 <i>P. fiebrigii</i>

MI <i>P. hassleri</i>	José Falcón	Depto Presidente Hayes	Paraguay	-25,20061389	-57,64946111	1 MI <i>P. hassleri</i>	-
MI <i>P. hassleri</i>	Campo Aceval	Depto Presidente Hayes	Paraguay	-23,20009167	-59,76663611	1 MI <i>P. hassleri</i>	-
MI <i>P. hassleri</i> MI <i>P. alba</i>	Colonia Pastoril	Formosa	Argentina	-25,68089167	-58,24961389	5 MI <i>P. hassleri</i> 1 MI <i>P. alba</i>	8 Morfotipo <i>P. hassleri</i> 1 MI <i>P. alba</i>
MI <i>P. alba</i> - MI <i>P. hassleri</i>	Ruta 28	Formosa	Argentina	-24,45000278	-60,37996667	-	-
MI <i>P. alba</i>	Ruta 86	Formosa	Argentina	-24,09003333	-60,36997222	-	-
MI <i>P. hassleri</i> - MI <i>P. alba</i> - <i>P. alba</i>	Ruta 95	Formosa	Argentina	-24,80114444	-59,52331667	2 MI <i>P. alba</i>	2 <i>P. alba</i> 5 MI <i>P. alba</i> 3 MI <i>P. hassleri</i>
MI <i>P. hassleri</i> - <i>P. hassleri</i>	Zona Cruce Douglas	Depto Presidente Hayes	Paraguay	-23,46012222	-59,32978056	1 MI <i>P. hassleri</i> 1 <i>P. hassleri</i>	-
MI <i>P. hassleri</i> - <i>P. hassleri</i> - <i>P. fiebrigii</i>	Zona Río Verde	Depto Presidente Hayes	Paraguay	-23,30153889	-59,19719444	-	-
MI <i>P. hassleri</i> - <i>P. hassleri</i>	Avalos Sanchez Ñu Pyahu, Paraguay	Depto Presidente Hayes	Paraguay	-23,67010278	-59,54981389	1 MI <i>P. hassleri</i> 1 <i>P. hassleri</i>	-
MI <i>P. hassleri</i> - <i>P. hassleri</i>	Altona	Depto Presidente Hayes	Paraguay	-22,94973056	-59,71255	-	-
MI <i>P. hassleri</i> - <i>P. hassleri</i>	Zona Centinela	Depto Presidente Hayes	Paraguay	-22,10175	-59,25208056	1 MI <i>P. hassleri</i> 1 <i>P. hassleri</i>	-
MI <i>P. alba</i> , MI <i>P. hassleri</i> , <i>P.</i>	Ruta 23	Formosa	Argentina	-25,21011389	-59,14988333	1 <i>P. hassleri</i> 2 MI <i>P. alba</i>	2 MI <i>P. alba</i> 2 MI <i>P. hassleri</i>

<i>hassleri, P. fiebrigii</i>						2 MI <i>P. hassleri</i>	2 <i>P. hassleri</i> 2 <i>P. fiebrigii</i>
MI <i>P. alba</i> - MI <i>P. hassleri</i> - <i>P. alba</i>	Posta Cambio Zalazar	Formosa	Argentina	-24,00357778	-60,47421111	1 <i>P. alba</i> 1 MI <i>P. hassleri</i>	-
MI <i>P. alba</i> - MI <i>P. hassleri</i> <i>P. hassleri</i>	Cruce Los Pioneros	Depto Presidente Hayes	Paraguay	-22,67838611	-59,76963333	1 MI <i>P. hassleri</i> 1 <i>P. hassleri</i>	-
MI <i>P. alba</i> - MI <i>P. hassleri</i> <i>P. hassleri</i>	Loma Plata	Depto Boquerón	Paraguay	-22,34841944	-59,62329444	1 <i>P. hassleri</i>	-
MI <i>P. alba</i> - <i>P. alba</i>	Ruta 86	Formosa	Argentina	-24,10005556	-60,35998889	1 <i>P. alba</i> 1 MI <i>P. alba</i>	
MI <i>P. alba</i> - <i>P. alba</i>	Ruta 86	Formosa	Argentina	-23,99001944	-60,58998611	4 <i>P. alba</i>	-

Tabla S2. Contribución de las variables morfológicas en las dos primeras componentes principales. Ancho del foliólulo (AFOL), relación área del ápice del foliólulo/área total del foliólulo (APTOT), área total del foliólulo (ARFOL), distancia entre foliolulos (DIFOL), error estándar (EE), relación longitud / ancho del foliólulo (LAFOL), longitud de los foliolulos (LFOL), longitud del pecíolo (LPE), longitud de la pina (LPI), número de pares de foliolulos (NFOL), número de pares de pinas (NPI).

Variables	CP1	CP2
AFOL	0,39	-0,13
LFOL	0,39	-0,04
NFOL	-0,37	0,05
ARFOL	0,37	-0,14
DIFOL	0,34	0,14
LAFOL	-0,32	0,22
NPI	-0,32	-0,05
LPI	0,26	0,31
LPE	0,14	0,79
APTOT	-0,12	0,40

Tabla S3. Variables bioclimáticas utilizadas para el MNE con el valor de importancia de permutación (%) para *Prosopis alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii*.

Especie	Variables bioclimáticas	Importancia de permutación (%)
<i>P. alba</i>	Estacionalidad de precipitación (coeficiente de variación)	22,6
	Temperatura máxima del mes más cálido	15
	Estacionalidad de temperatura (desviación estándar * 100)	13,6
	Precipitación del cuarto más cálido	10,3
	Temperatura media del trimestre más seco	8,5
	Temperatura media del trimestre más húmedo	3,5
<i>P. hassleri</i>	Temperatura media del trimestre más cálido	44,3
	Temperatura mínima del mes más frío	19,6
	Precipitación del trimestre más frío	10,4

<i>P. fiebrigii</i>	Temperatura media del trimestre más cálido	43,4
	Temperatura mínima del mes más frío	11,4
	Precipitación del trimestre más frío	11,4
	Precipitación del mes más seco	7,6
	Isotermalidad (BIO2 / BIO7) (* 100)	4,9

Tabla S4. Resultados del análisis espacial de la varianza (SAMOVA) para el complejo *Prosopis* con distintos valores de k. Índices de fijación * $p < 0,05$

K	Entre Grupos (FCT)	Dentro de Grupos (FSC)	Entre poblaciones (FST)	N grupos individuales
2	0,726*	-0,457	0,592*	-
3	0,741*	-0,700	0,559*	-
4	0,766*	-0,934	0,547*	1
5	0,778*	-1,063	0,541*	2
6	0,786*	-1,195	0,531*	2
7	0,809*	-1,511	0,520*	3
8	0,805*	-1,581	0,498*	2
9	0,817*	-1,801	0,487*	3
10	0,824*	-2,014	0,417*	4

Tabla S5. Resultados del análisis espacial de la varianza (SAMOVA) para *P. hassleri* y *P. fiebrigii* con distintos valores de k. Índices de fijación * $p < 0,05$

K	Entre Grupos (FCT)	Dentro de Grupos (FSC)	Entre poblaciones (FST)	N grupos individuales
2	0,800*	-0,409	0,719*	-
3	0,855*	-0,923	0,721*	1
4	0,864*	-1,447	0,667*	1
5	0,891*	-2,138	0,659*	1
6	0,892*	-2,359	0,639*	2
7	0,896*	-2,489	0,609*	2
8	0,911*	-3,396	0,609*	3
9	0,911*	-3,396	0,609*	3
10	0,915*	-3,923	0,583*	4

Tabla S6. Valor p para desequilibrio genotípico basado en 1500 permutaciones.
 El valor p ajustado para el nivel nominal del 5% es: 0,003
 El valor p ajustado para el nivel nominal del 1% es: 0,0007

	p valor
Mo08 X Mo13	0,912
Mo08 X G16	0,496
Mo08 X G18	0,029
Mo08 X G115	0,933
Mo08 X G112	0,849
Mo13 X G16	0,056
Mo13 X G18	0,226
Mo13 X G115	0,267
Mo13 X G112	0,151
G16 X G18	0,269
G16 X G115	0,930
G16 X G112	0,196
G18 X G115	0,853
G18 X G112	0,471
G115 X G112	0,736

Tabla S7. Medidas de cromosomas somáticos en especies de *Prosopis*. Longitud del brazo corto (p), longitud del brazo largo (q), longitud total del cromosoma (c), longitud total del complemento haploide (LTCH), índice braquial medio (r), desviación estándar (de), metacéntrico (m), submetacéntrico (sm), región organizadora nucleolar (NOR); banda heterocromática terminal (t), banda heterocromática pericentromérica (pe). Entre paréntesis, luego del nombre y número de ejemplar de herbario de cada especie, se indica el número de individuos y de metafases examinados con bandeado CMA/DA/DAPI.

Par	Longitudes cromosómicas absolutas (µm): media (de)			%LTCH	r (de)	tipo	Posición	Banda heterocromática		Tipo^
	p	Q	c					Longitud		
								Absoluta (µm)	% LTC	
<i>Prosopis alba</i> (3, 9)										
1	0,79 (0,11)	0,87 (0,12)	1,66 (0,25)	10,63	1,10 (0,08)	m	t (p)	0,34	2,18	CMA+
							satélite	0,32	2,05	CMA+
2	0,60 (0,09)	0,69 (0,11)	1,29 (0,21)	8,27	1,17 (0,04)	m				
3	0,56 (0,10)	0,62 (0,13)	1,19 (0,25)	7,59	1,10 (0,03)	m				

4	0,53 (0,09)	0,60 (0,09)	1,14 (0,18)	7,27	1,70 (0,11)	m				
5	0,50 (0,11)	0,55 (0,11)	1,04 (0,23)	6,65	1,68 (0,10)	m				
6	0,47 (0,08)	0,51 (0,10)	0,98 (0,19)	6,30	1,63 (0,06)	m				
7	0,39 (0,08)	0,46 (0,07)	0,85 (0,16)	5,46	1,75 (0,12)	m				
8	0,40 (0,06)	0,92 (0,09)	1,32 (0,16)	8,45	3,49 (0,30)	sm				
9	0,36 (0,07)	0,77 (0,09)	1,14 (0,17)	7,27	3,23 (0,24)	sm				
10	0,35 (0,04)	0,75 (0,13)	1,10 (0,18)	7,01	3,26 (0,31)	sm				
11	0,38 (0,07)	0,71 (0,10)	1,08 (0,17)	6,93	2,88 (0,35)	sm	pe	0,12	0,77	CMA+
12	0,35 (0,06)	0,68 (0,14)	1,02 (0,21)	6,54	2,92 (0,37)	sm				
13	0,32 (0,06)	0,65 (0,12)	0,97 (0,17)	6,19	3,22 (0,79)	sm				
14	0,27 (0,05)	0,58 (0,07)	0,85 (0,11)	5,42	3,33 (0,48)	sm				

Prosopis hassleri

(3, 4)

1	0,90 (0,13)	1,01 (0,14)	1,92 (0,27)	10,63	1,12 (0,05)	m	t (q)	0,36	2,00	CMA+
							satélite	0,40	2,22	CMA+
2	0,67 (0,07)	0,71 (0,07)	1,38 (0,15)	7,65	1,06 (0,01)	m				
3	0,62 (0,09)	0,69 (0,09)	1,31 (0,18)	7,26	1,12 (0,04)	m				
4	0,56 (0,06)	0,66 (0,07)	1,23 (0,10)	6,80	1,19 (0,13)	m				
5	0,55 (0,08)	0,59 (0,08)	1,15 (0,15)	6,36	1,08 (0,05)	m				
6	0,50 (0,04)	0,58 (0,08)	1,08 (0,12)	6,01	1,16 (0,07)	m				
7	0,45 (0,04)	0,53 (0,04)	0,98 (0,08)	5,43	1,17 (0,08)	m				
8	0,48 (0,05)	1,12 (0,14)	1,59 (0,19)	8,45	2,34 (0,10)	sm				
9	0,41 (0,02)	1,05 (0,16)	1,46 (0,17)	8,07	2,53 (0,34)	sm				
10	0,40 (0,03)	0,95 (0,16)	1,34 (0,18)	7,45	2,35 (0,31)	sm				

11	0,38 (0,06)	0,87 (0,13)	1,24 (0,19)	6,88	2,31 (0,11)	sm				
12	0,37 (0,02)	0,78 (0,11)	1,15 (0,14)	6,39	2,08 (0,18)	sm				
13	0,38 (0,05)	0,75 (0,06)	1,12 (0,11)	6,20	2,01 (0,17)	sm	pe	0,22	1,22	CMA+
14	0,33 (0,03)	0,76 (0,12)	1,09 (0,15)	6,03	2,26 (0,16)	sm				

Prosopis fiebrigii
(3,10)

1	0,79 (0,16)	0,87 (0,16)	1,66 (0,36)	9,39	1,10 (0,06)	m	t (q)	0,37	2,09	CMA+
							satélite	0,39	2,21	CMA+
2	0,68 (0,14)	0,73 (0,14)	1,41 (0,06)	7,95	1,07 (0,06)	m				
3	0,63 (0,13)	0,70 (0,13)	1,32 (0,06)	7,46	1,12 (0,06)	m				
4	0,61 (0,13)	0,68 (0,13)	1,28 (0,04)	7,24	1,12 (0,04)	m				
5	0,59 (0,10)	0,64 (0,10)	1,23 (0,05)	6,95	1,08 (0,05)	m				
6	0,53 (0,12)	0,59 (0,12)	1,12 (0,26)	6,35	1,15 (0,26)	m				

7	0,51 (0,09)	0,59 (0,09)	1,09 (0,35)	6,16	1,19 (0,35)	m			
8	0,47 (0,06)	1,05 (0,06)	1,53 (0,47)	8,62	2,23 (0,47)	sm			
9	0,45 (0,08)	0,96 (0,08)	1,41 (0,22)	7,98	2,16 (0,22)	sm			
10	0,41 (0,07)	0,86 (0,07)	1,27 (0,39)	7,17	2,13 (0,39)	sm			
11	0,36 (0,03)	0,79 (0,03)	1,15 (0,29)	6,50	2,19 (0,29)	sm			
12	0,37 (0,05)	0,79 (0,03)	1,15 (0,29)	6,27	2,03 (0,23)	sm			
13	0,37 (0,05)	0,72 (0,05)	1,09 (0,16)	6,16	1,92 (0,16)	sm	Pe	0,20	1,13
14	0,34 (0,03)	0,69 (0,03)	1,02 (0,14)	5,79	2,03 (0,14)	sm			

Prosopis alba x P. hassleri

	(3,10)									
1	0,84 (0,10)	0,94 (0,10)	1,78 (0,19)	10,20	1,11 (0,07)	m	t (q) satélite	0,36 0,36	2,06 2,06	CMA+ CMA+
2	0,69 (0,10)	0,75 (0,10)	1,44 (0,19)	8,25	1,09 (0,03)	m				
3	0,62 (0,08)	0,68 (0,08)	1,31 (0,16)	7,51	1,10 (0,05)	m				
4	0,58 (0,07)	0,63 (0,08)	1,21 (0,15)	6,92	1,08 (0,05)	m				
5	0,54 (0,05)	0,57 (0,06)	1,12 (0,11)	6,39	1,06 (0,02)	m				
6	0,52 (0,05)	0,56 (0,05)	1,08 (0,09)	6,17	1,10 (0,05)	m				
7	0,48 (0,05)	0,52 (0,05)	1,00 (0,10)	5,71	1,09 (0,05)	m				
8	0,46 (0,08)	1,03 (0,11)	1,49 (0,18)	8,55	2,28 (0,22)	sm				
9	0,45 (0,07)	0,92 (0,14)	1,37 (0,20)	7,85	2,04 (0,15)	sm				

10	0,40 (0,05)	0,88 (0,14)	1,28 (0,18)	7,33	2,17 (0,22)	sm			
11	0,40 (0,04)	0,79 (0,11)	1,19 (0,14)	6,81	1,95 (0,19)	sm			
12	0,36 (0,05)	0,74 (0,08)	1,10 (0,12)	6,30	2,06 (0,24)	sm			
13	0,36 (0,05)	0,73 (0,07)	1,09 (0,11)	6,22	2,06 (0,20)	sm	0,18	1,03	CMA+
14	0,34 (0,05)	0,67 (0,07)	1,01 (0,11)	5,80	2,00 (0,23)	sm			

Tabla S8. Variables cariotípicas de los cuatro morfotipos estudiados que fueron utilizadas para el análisis de componentes principales y los análisis fenéticos.

Morfotipo	c	r	R	Cantidad de HC	Máximo número de bandas por complemento diploide
<i>P. alba</i>	1,12	1,62	1,953	0,46	3
<i>P. alba x P. hassleri</i>	1,25	1,58	1,780	0,54	3
<i>Citotipo 1</i>					
<i>P. alba x P. hassleri</i>	1,25	1,58	1,780	0,72	4
<i>Citotipo 2</i>					
<i>P. hassleri</i>	1,29	1,67	1,959	0,80	4
<i>P. fiebrigii</i>	1,26	1,61	1,627	0,77	4

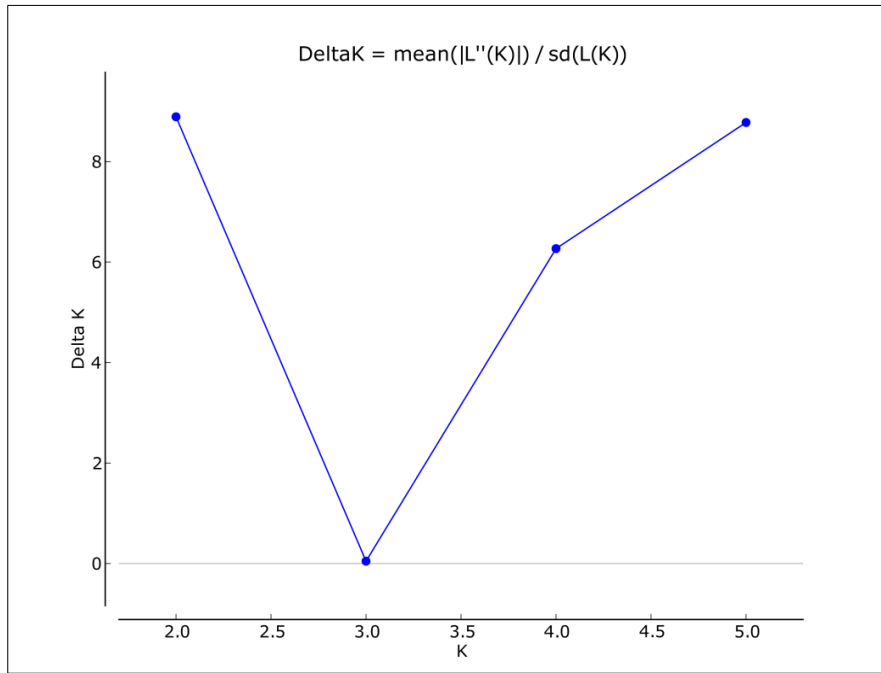


Figura S1. Determinación del número óptimo de grupos (K) mediante el método del Delta K según Evanno et al. (2005).