

Universidad Nacional del Nordeste
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

“Variabilidad genética de *Stylosanthes*
Sw. (Fabaceae): comparación de
poblaciones de la provincia de
Corrientes antes y después de
disturbios ambientales”



Carrera: Licenciatura en Ciencias Biológicas

Lugar de trabajo: Laboratorio de Citogenética y Evolución Vegetal del Instituto de
Botánica del Nordeste (IBONE, UNNE - CONICET)

Alumna: Julieta Berenice Arcangeli
Directora: Dra. María Celeste Silvestri
Co - directora: Dra. Graciela Inés Lavia

Año: 2023

<u>Índice general</u>	Página
Resumen	6
Introducción	8
Materiales y Métodos	13
Resultados	19
Discusión	24
Conclusión	29
Bibliografía	30
Anexo	36

Índice de figuras

Página

Figura 1. Localización de áreas quemadas, áreas naturales protegidas y estaciones meteorológicas en la provincia de Corrientes en los meses de enero y febrero del año 2022. Extraído de Saucedo <i>et al.</i> 2023.	9
Figura 2. Distribución de cuatro y ocho poblaciones colectadas y evaluadas en 2016 - 2017 de <i>S. guianensis</i> y <i>S. hippocampoides</i> , respectivamente. Extraído de Silvestri <i>et al.</i> 2020b.	11
Figura 3. Morfología y forma de crecimiento de <i>S. hippocampoides</i> . A. Flores; B. Hábito rastrero de la especie; C. Frutos; D. Hojas trifoliadas.	13
Figura 4. Ambientes de las poblaciones estudiadas. A. y B. Geolocalización Población ASI, banquinas amplias de Ruta N Nº 12 Km 1171, Departamento Berón de Astrada. C. y D. Geolocalización Población TC, Reserva Natural Privada “Paraje Tres Cerros”, Departamento San Martín.	15
Figura 5. A. Perfil molecular de cebador (GA) ₈ C en gel de agarosa al 2 % revelado bajo luz UV y fotografiado. B. Preparación de soluciones para extracción de ADN. C. Extracción orgánica con 1 de volumen: alcohol isoamílico 24:1 %: rescate de fase acuosa. D. ADN precipitado en buffer de precipitación CTAB. E. ADN precipitado final luego de los lavados con etanol.	17
Figura 6. Localización de poblaciones y focos de incendios. A. Poblaciones ASI y TC. B y C. Focos de incendios principales próximos a la población ASI, en archivo vectorial (B) e imágenes satelitales (C).	19
Figura 7. Resumen de los patrones de bandas obtenidos para las poblaciones ASI y TC de <i>S. hippocampoides</i> .	20
Figura 8. Representación del porcentaje de la variación genética de <i>S. hippocampoides</i> .	21
Figura 9. Representación del Análisis de Coordenadas Principales basado en las distancias genéticas de Nei entre los individuos de las poblaciones ASI y TC.	21
Figura 10. A. Valor máximo de ΔK . B. Representación de las agrupaciones Bayesianas resultantes de STRUCTURE para $K= 2$. Los individuos de la población ASI son del 1 al 11, y los de la población TC del 12 al 21.	22

<u>Índice de tablas</u>	Página
Tabla 1. Material de estudio.	15
Tabla 2. Componentes de la mezcla de PCR utilizada.	16
Tabla 3. Temperatura de alineamiento y número de fragmentos amplificados correspondientes a los cebadores utilizados.	17
Tabla 4. Relevamiento de incendios de las poblaciones analizadas en 2016 - 2017 para la selección de las mismas a utilizar en el presente estudio.	19
Tabla 5. Valores de resumen de la diversidad genética para la especie <i>S. hippocampoides</i> , y las poblaciones ASI y TC basado en el análisis de 55 <i>loci</i> con ocho cebadores ISSR.	20
Tabla 6. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA). Porcentaje de variación de las tres primeras coordenadas principales.	21
Tabla 7. Comparación de los valores de los estadísticos descriptivos de diversidad genética de cada población para las cohortes 2.016 y 2022	22
Tabla 8. Resultados de la prueba estadística no paramétrica de Wilcoxon -Mann-Whitney.	23

<u>Índice del Anexo</u>	<u>Página</u>
1 Resultados de los test de normalidad de ambas poblaciones de los índices de Shannon y heterocigosis por <i>locus</i>	36
2 Script utilizado para análisis estadísticos en R studio	36

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMOVA: Análisis de la Varianza Molecular

cv: cultivar

CTAB: Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio

FCA: Facultad de Ciencias Agrarias

FIRMS: Sistema de Información sobre Incendios para la Gestión de Recursos

°C: grados centígrados

Ha: hectárea

He: Heterocigosis esperada

I: Índice de Shannon

IBONE: Instituto de Botánica del Nordeste

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

ISSR: Secuencias Intergénicas Repetidas Simples

kb: kilo base

km: kilómetro

km²: kilómetros cuadrados

MCMC: Monte Carlo con cadena de Markov

mg: miligramo

mm: milímetros

m.s.n.m.: metros sobre el nivel del mar

N: Nitrógeno

Na: Número de alelos diferentes

Ne: Número efectivo de alelos

NEA: Nordeste Argentino

ng: nanogramo

Np: Número de bandas privadas

NTB: Número total de bandas

PCoA: Análisis de coordenadas principales

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PLP: Porcentaje de Loci Polimórficos

SMN: Servicio Meteorológico Nacional

µl: microlitro (1 x 10-6l)

UNNE: Universidad Nacional del Nordeste.

UV: ultravioleta

V: Voltios

1. Denominación: "Variabilidad genética de *Stylosanthes* Sw. (Fabaceae): comparación de poblaciones de la provincia de Corrientes antes y después de disturbios ambientales"

2. Resumen

El nordeste argentino (NEA) es considerado la segunda región ganadera de Argentina. En los años 2016 - 2017, una investigación del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) tendiente a caracterizar leguminosas forrajeras nativas evaluó la diversidad genética de poblaciones naturales de la especie *Stylosanthes hippocampoides* Mohlenbr (Fabaceae) provenientes de distintos sitios del NEA. Posteriormente, entre los años 2019 y 2022, la provincia de Corrientes ha soportado largos períodos de sequías, temperaturas elevadas y escasas precipitaciones, condiciones que propiciaron la generación de incendios. Éstos llegaron a ocupar grandes extensiones, incluyendo a las localizaciones de las poblaciones evaluadas en 2016 - 2017. En este contexto, se analizó la variabilidad genética actual de dos poblaciones de *S. hippocampoides* evaluadas en 2016 – 2017, a modo de comparar la variabilidad genética pre y post incendio, e indagar si estas perturbaciones ambientales incidieron en la variabilidad genética intrapoblacional. Para lo cual, en principio se identificaron las poblaciones que fueron afectadas por los incendios y aquellas que no lo fueron mediante evaluación de imágenes satelitales de la plataforma Fire Information for Resource Management System (FIRMS). Posteriormente, se colecciónó germoplasma de dos poblaciones con igual georreferencia de aquellas analizadas en 2016 - 2017 (ASI: afectada por incendios, y TC: población control, no afectada), se evaluó la variabilidad genética de las mismas utilizando idénticos marcadores moleculares de secuencias intergénicas repetidas simples (ISSR) utilizados en dicha evaluación previa. Se calcularon los estadísticos descriptivos clásicos: número total de bandas (NTB), número de bandas exclusivas (Np), Heterocigosis esperada (He), Porcentaje de loci polimórficos (PLP) e Índice de Shannon (I), y se evaluó la estructuración de la variabilidad mediante análisis bayesiano, análisis de la varianza molecular (AMOVA) y análisis de coordenadas principales (PCoA). Dichos índices y análisis fueron obtenidos utilizando los programas GenAIEx 6.5 y STRUCTURE 2.3.4. Finalmente se comparó la variabilidad genética de cada población durante los dos períodos coleccionados (2016 - 2017 vs. 2022) mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney.

El AMOVA mostró que la mayor variación genética se encuentra entre las poblaciones y no dentro de ellas, lo cual coincide con la reproducción preferentemente autógama que presenta la especie. En los análisis de agrupación Bayesiana y PCoA, los individuos se corresponden a cada población en estudio con un alto grado de pertenencia. En cuanto a los resultados de los índices de diversidad intrapoblacional actuales, se observaron valores más elevados para la población TC que en la población ASI.

Con respecto a la comparación entre los dos períodos (2016 - 2017 vs 2022) de cada población, en la población ASI los valores de la He, el I y el PLP disminuyeron en relación a los obtenidos en 2016 - 2017, y en la población TC se observó un leve aumento de los mismos, sin embargo, las diferencias halladas resultaron no significativas estadísticamente. Esto podría deberse a que, la especie presenta estrategias que le permitieron atenuar los efectos negativos que los incendios pudieron causar en la variabilidad genética de la población ASI, tales como un banco de semillas conformado por semillas con cubierta dura que las protegería, sumado a su característica colonizadora que le permitiría una rápida recuperación post-incendio. En el caso de la población TC, las características ambientales y biológicas dentro de la reserva natural protegida en la que se encuentra, propiciarían el contacto con posibles

polinizadores y animales dispersores de frutos que contribuirían al mantenimiento de la variabilidad genética. Siendo las diferencias halladas no significativas, no se puede afirmar que los incendios sucesivos fueron la causa de una disminución en la diversidad genética de la población ASI, por lo que este trabajo podría considerarse como inicial para comprender la dinámica de la variabilidad genética en *S. hippocampoides* en respuesta a incendios. Posteriores estudios que incluyan un mayor número de poblaciones y generaciones podrían arrojar mayor comprensión de este proceso.

Considerando la posible proyección de los incendios en años subsiguientes, como consecuencia de factores culturales, actividades humanas y/o agravados por las consecuencias del cambio climático, resulta necesario este tipo de estudios, además del conocimiento de los factores que predisponen un ambiente a sufrir un incendio, para planificar medidas de conservación adecuadas para especies nativas de la región.

3. Introducción

3.1. Origen, fundamento y antecedentes del tema de investigación.

El conocimiento de la diversidad genética de las poblaciones resulta importante, entre otros motivos, por el hecho de que ésta determina el potencial de respuestas que permiten la supervivencia y la adaptación de los organismos (Caruso *et al.* 2015). Las perturbaciones ambientales pueden afectar los patrones de diversidad genética en poblaciones naturales debido a que pueden provocar variaciones en procesos demográficos y biológicos claves que influyen en la distribución de la diversidad genética (Banks *et al.* 2013). Considerando que la diversidad genética incide en todos los niveles de la biodiversidad, desde la aptitud y la viabilidad de los individuos y poblaciones, la adaptabilidad de las especies al cambio medioambiental, hasta la formación de nuevas especies, y en consecuencia en la estructura de las comunidades y la función de los ecosistemas, las interacciones entre las perturbaciones y la diversidad genética pueden tener importantes ramificaciones ecológicas y evolutivas (Banks *et al.* 2013; Hoffmann *et al.* 2003; MacDougall *et al.* 2013). Por lo tanto, es relevante conocer la variabilidad genética durante varias generaciones de poblaciones cuyos ambientes estén o han estado sometidos a perturbaciones naturales y/o antrópicas recurrentes, para inferir sobre su influencia en el mantenimiento de la diversidad poblacional, y sobre la distribución de la diversidad genética de las especies en posibles escenarios futuros.

Desde mediados del año 2019, las provincias del nordeste argentino (NEA, Chaco, Corrientes Formosa, Misiones, norte de Entre Ríos y Santa Fe) experimentaron anomalías negativas mensuales de precipitación. En los siguientes años, esta tendencia se acentuó y la situación en algunas regiones llegó a ser extrema, manifestándose períodos de sequía prolongados (Servicio Meteorológico Nacional 2020). Por ejemplo, considerando las precipitaciones anuales, el año 2020 con 980 mm, fue uno de los más secos de los últimos 30 años para la ciudad de Corrientes, durante 10 meses consecutivos llovió menos de lo normal, y las precipitaciones se concentraron en enero y febrero (Smichowski *et al.* 2021). Estos períodos de sequía extendida facilitan las condiciones para la ocurrencia de incendios, ya que el ambiente seco está más susceptible que el mismo ambiente en condiciones de humedad. Particularmente, los incendios acaecidos en la provincia de Corrientes durante los últimos años (2019 a 2022) ocuparon grandes extensiones y fueron recurrentes en un corto período de tiempo. De acuerdo con informes del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Corrientes, hacia fines de septiembre del año 2020 el área quemada representó un 5% de la superficie provincial (484.748 ha) (Kurtz *et al.* 2020), y durante los meses siguientes muchos focos de incendios continuaron activos. Desde mediados del año 2021 hasta principios del 2022, la situación empeoró, las escasas precipitaciones y las elevadas temperaturas propiciaron las condiciones para la proliferación de focos de calor e incendios, espontáneos o intencionales. Saucedo *et al.* (2023) informaron que la superficie provincial quemada era del 12% al 27 de febrero de 2022, correspondientes a 10425 km² de la provincia de Corrientes (Figura 1). Las causas principales de los incendios en el NEA, se vinculan con el mal manejo del fuego en prácticas culturales, como herramienta de manejo y limpieza de la vegetación, sumado a las condiciones naturales como la sequía y la distribución anual variable de precipitaciones que han potenciado la manifestación de incendios durante los últimos años (Smichowski *et al.* 2021).

Por otro lado, el NEA es considerado la segunda región ganadera de Argentina, siendo el principal recurso forrajero los pastizales naturales, donde las gramíneas son dominantes y la producción puede ser alta, pero en general es de baja calidad (Sampedro *et al.* 2018). Incorporar especies forrajeras leguminosas nativas a los sistemas agropecuarios conduciría a un uso más eficiente de los recursos por permitir el resguardo del germoplasma nativo, aumentar la calidad de forraje por su aporte de Nitrógeno (N) a la dieta animal, mejorar la cobertura vegetal evitando la erosión del suelo y reponiendo el N a través de la fijación biológica (Rao *et al.* 2015). Al mismo tiempo, la producción forrajera en climas subtropicales se caracteriza por tener un período de latencia durante fin de otoño, invierno y comienzo de primavera (Blount y Acuña 2009). Las especies cultivadas con origen tropical generalmente no soportan las heladas invernales, y se comportan como plantas anuales (Avila *et al.* 2014; Pizzio y Bendersky 2018). Sumado a ello, la oferta comercial para los diversos sistemas agro-ganaderos del NEA, y especialmente de leguminosas forrajeras, es escasa (Rimieri *et al.* 2002). Por lo tanto, resulta muy importante colecciónar y caracterizar germoplasma nativo, con el objeto de hallar genotipos tolerantes a bajas temperaturas, capaces de rebrotar durante la primavera, para el mejoramiento de cultivos de forrajeras leguminosas, y en consecuencia lograr materiales perennes.

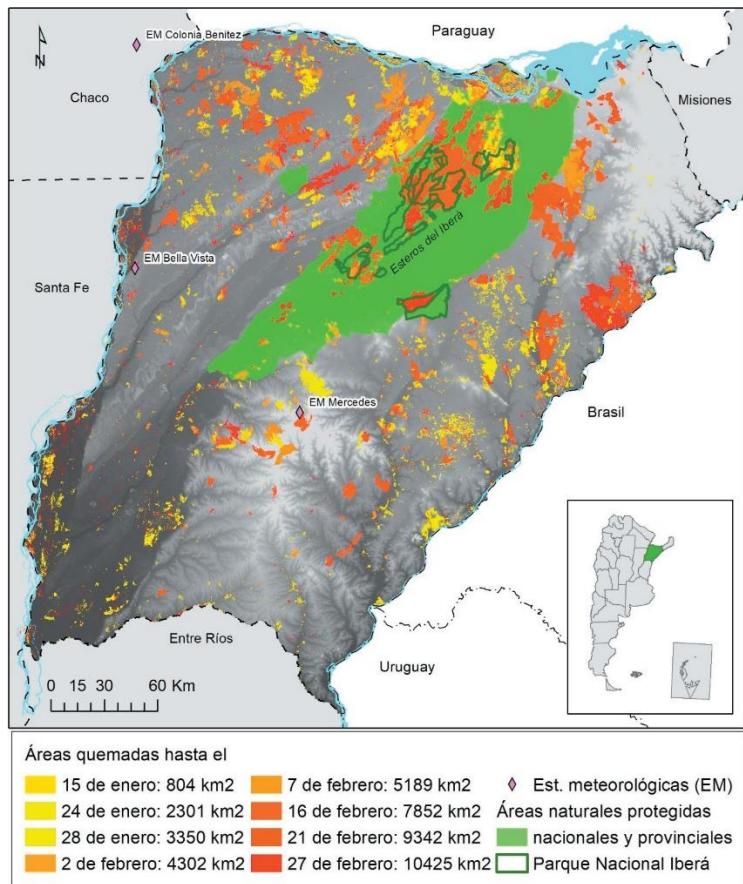


Figura 1. Localización de áreas quemadas, áreas naturales protegidas y estaciones meteorológicas en la provincia de Corrientes en los meses de enero y febrero del año 2022. Extraído de Saucedo *et al.* 2023.

Dentro de las leguminosas forrajeras nativas para el NEA, se destacan las especies del género *Stylosanthes* Sw., ya que en él se ubican cerca de la tercera parte de todas las variedades comerciales de

leguminosas pastables (Consoli *et al.* 1996). Este género pertenece a la familia Fabaceae, subfamilia Papilioideae, tribu Dalbergieae, incluye aproximadamente 50 especies predominantemente herbáceas, que se distribuyen naturalmente en regiones tropicales y subtropicales de América (Costa 2006). Su distribución se extiende desde el sur de Estados Unidos hasta Uruguay y la provincia de San Luis en Argentina, con dos centros principales de diversificación, uno en México y el otro en Brasil (Costa 2006; Vanni 2017). Además de destacarse por su importancia forrajera, las especies del género son utilizadas para mejorar las condiciones de los suelos (Chandra *et al.* 2006, 2011; Edye 1987; Kazan *et al.* 1993; Muir *et al.* 2014; Ramesh *et al.* 1997), y en ocasiones como control biológico de la garrapata del ganado (Sutherst *et al.* 1988).

Las especies de *Stylosanthes* son colonizadoras (Edye 1987), que se adaptan bien a suelos arenosos y de baja fertilidad, con bajos contenidos de fósforo y calcio y elevado contenido de aluminio, además, ocupan regiones en las cuales las precipitaciones no son abundantes (Karia *et al.* 2010). El número cromosómico básico del género es $n=10$, Vanni (2017) describió 23 taxones para Sudamérica, 11 de los cuales son diploides ($2n = 2x = 20$), ocho tetraploides ($2n = 4x = 40$), y la ploidía del resto de las especies no está confirmada (Maass y Sawkins 2004). Particularmente *Stylosanthes hippocampoides* Mohlenbr. es una especie diploide $2n = 2x = 20$ (Silvestri *et al.* 2020a). Asimismo, en el género se documentaron especies allotetraploides y alohexaploides (Maass y Sawkins 2004). La mayoría de las especies del género son autógamas (Bray y Hutton 1976) o preferentemente autógamas con algún porcentaje de alogamia, como *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. y *Stylosanthes capitata* Vog., en las cuales se registró hasta un 26 % y 31 % de alogamia, respectivamente, en ensayos de cruzamientos (Santos García *et al.* 2011). Se ha propuesto que los casos de polinización cruzada ocurrirían por insectos polinizadores (Miles 1985), y en cuanto a la dispersión de frutos, la hidrocoria (Barros *et al.* 2005), zoocoria (Costa *et al.* 2018; Gardener 1993) y la acción antrópica (Sawkins *et al.* 2001) como los causantes principales. En relación al tiempo generacional de las especies de *Stylosanthes*, no existen registros en condiciones naturales. En cuanto al ciclo de vida en ensayos realizados en Australia se ha registrado una vida máxima de ocho años para *Stylosanthes scabra* Vogel cv seca (Gardener 1984; Orr 2008), algunos individuos de *S. hippocampoides* sobrevivieron durante más de cinco años y la supervivencia de plántulas estuvo fuertemente afectada por las lluvias (Orr 2008), mientras que en otras experiencias individuos de las mismas especies persistieron menos de cuatro años (Jones *et al.* 2000). Sin embargo, se debe considerar que son experiencias realizadas en condiciones controladas y en un ambiente distinto a su lugar natural.

En Argentina crecen naturalmente ocho especies del género (Burkart 1943; Vanni 2017) y, al menos tres de ellas, son utilizadas como forrajeras en diferentes países: *S. guianensis*, *S. hippocampoides* y *S. scabra* (Maass y Sawkins 2004). La distribución de las dos primeras especies abarca al NEA (Vanni 2017). En el marco de una línea de investigación del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) tendiente a conservar y caracterizar leguminosas forrajeras nativas del NEA, en los años 2016 y 2017 se estudiaron poblaciones naturales de las especies *S. guianensis* y *S. hippocampoides*, provenientes del norte y sureste de la provincia de Corrientes y del suroeste de la provincia de Misiones (Figura 2). Se analizó el número cromosómico, y se evaluó la variabilidad genética mediante marcadores nucleares ISSR (Secuencias Intergénicas Repetidas Simples) de 12 poblaciones (cuatro de *S. guianensis* y ocho de *S. hippocampoides*). La variabilidad genética hallada fue mayor entre las poblaciones que dentro de ellas, y en general, las poblaciones se agruparon de acuerdo con sus sitios de origen, con algunas excepciones

(Silvestri *et al.* 2020b). Posteriormente a este estudio, como ha sido explicado previamente, la región atravesó períodos prolongados de sequía e incendios de pastizales y forestales. Las superficies quemadas de la provincia de Corrientes (Saucedo *et al.* 2022a, b, c, d) incluyen a las localizaciones de algunas de las poblaciones evaluadas en Silvestri *et al.* (2020b). No obstante, si bien los períodos de sequía afectaron a gran parte de la provincia, existe certeza que dos poblaciones ubicadas dentro de una Reserva Natural Privada evaluadas en el mismo trabajo, no han sido afectadas por incendios (Personal de la reserva, comunicación personal). Por lo tanto, existe un escenario favorable para indagar si los incendios ocurridos influyen en la variabilidad genética de estas poblaciones de *S. hippocampoides*.

Por todo lo expuesto, en el presente trabajo final de graduación se propone analizar la variabilidad genética actual de dos poblaciones naturales de *S. hippocampoides* que han sido previamente evaluadas en 2016 – 2017 (Silvestri *et al.* 2020b) con el objetivo de comparar la variabilidad genética de cada una de ellas luego de cinco años, y hacer inferencias acerca de la influencia de los disturbios ambientales ocurridos en Corrientes en el mantenimiento de la variabilidad genética de las poblaciones de esta especie en la región.

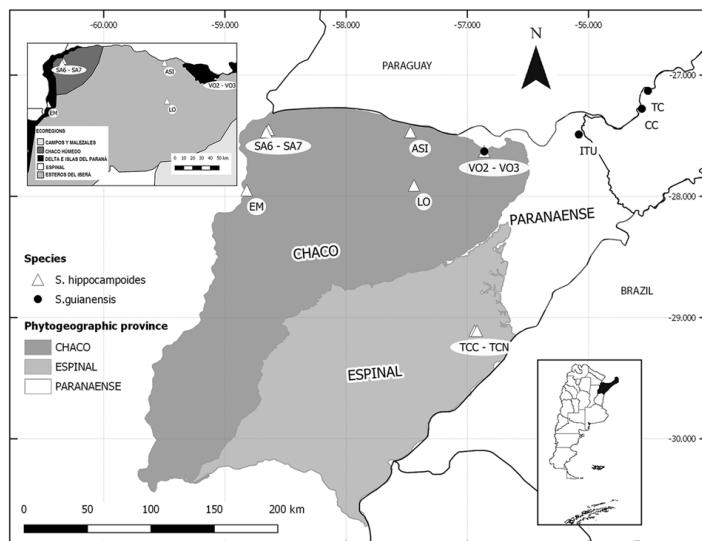


Figura 2. Distribución de cuatro y ocho poblaciones colectadas y evaluadas en 2016 - 2017 de *S. guianensis* y *S. hippocampoides*, respectivamente. Extraído de Silvestri *et al.* 2020b.

3.2. Objetivos

3.2.1. General

Contribuir al conocimiento sobre el mantenimiento de la variabilidad genética de poblaciones naturales de *Stylosanthes hippocampoides*, en relación con perturbaciones ambientales del NEA.

3.2.2. Particulares

3.2.2.1. Identificar poblaciones de *S. hippocampoides* evaluadas en 2016 - 2017 afectadas y no afectadas por incendios acaecidos en la provincia de Corrientes durante los años 2019 a 2022.

3.2.2.2. Localizar y colecciónar germoplasma de la población ASI pertenecientes a *S. hippocampoides*.

3.2.2.3. Localizar y colecciónar germoplasma de la población TC perteneciente a *S. hippocampoides* ubicada en la Reserva Natural Privada “Paraje Tres Cerros”.

3.2.2.4. Evaluar la variabilidad genética de las poblaciones colecciónadas en 2022 utilizando marcadores moleculares ISSR.

3.2.2.5. Comparar la variabilidad genética de cada una de las poblaciones, ASI y TC, durante los dos períodos colecciónados (2016 vs. 2022).

3.3. Hipótesis de trabajo

La variabilidad genética de la población ASI evaluada en el año 2022 es menor a la hallada durante el período 2016, debido a que los eventos de sequía e incendios en la zona disminuyeron el número de individuos y como consecuencia, se produjo un fenómeno de cuello de botella, que redujo la variabilidad genética.

La variabilidad genética de la población TC evaluada en el año 2022 es igual a la hallada durante el período 2016, debido a que el número de individuos de la población no fue afectado, ya que en esas regiones no ocurrieron incendios.

4. Materiales y Métodos

4.1. Especie de estudio.

Stylosanthes hippocampoides Mohlenbr. Es una especie herbácea, perenne, autógama, con amplia distribución en Sudamérica. Crece en pastizales naturales y sabanas de Argentina, Bolivia, Paraguay, Uruguay, y regiones del oeste y sur de Brasil, que van desde los 550 a 1200 m.s.n.m. La provincia de San Luis (Argentina) representa el extremo más austral de su distribución geográfica. El hábito de crecimiento es rastrero a semierecto, morfológicamente presenta hojas trifoliadas, estípulas unidas en la base de la hoja, papiráceas, puntiagudas, con cerdas. Las inflorescencias son terminales, no ramificadas, en espiga globosa densamente floridas. Las flores presentan corola amarilla. El fruto es lomentoso con sólo un segmento fértil, es oblongo, glabro, con nervadura marcada, y se diferencia por su pico ganchudo, espiralado (Vanni 2017) (Figura 3).

Desde el punto de vista productivo, ha sido descripta como una especie con gran potencial forrajero en regiones subhúmedas y semiáridas de Paraguay, muy tolerante al estrés hídrico (Glatzle 1999). Un cultivar forrajero de esta especie denominado “oxley”, registrado en 1969, se desarrolló a partir de la selección de dos poblaciones naturales, una proveniente de la provincia de Corrientes y otra del departamento Central (Paraguay) (Barnard 1972; Vanni 2017). Sin embargo, actualmente no es hallado en el mercado. Este cultivar se destacó por su rendimiento en suelos arenosos, y por poseer mayor tolerancia al frío en comparación a otras legumbres de climas cálidos (Gardener *et al.* 1982; Orr 2008).

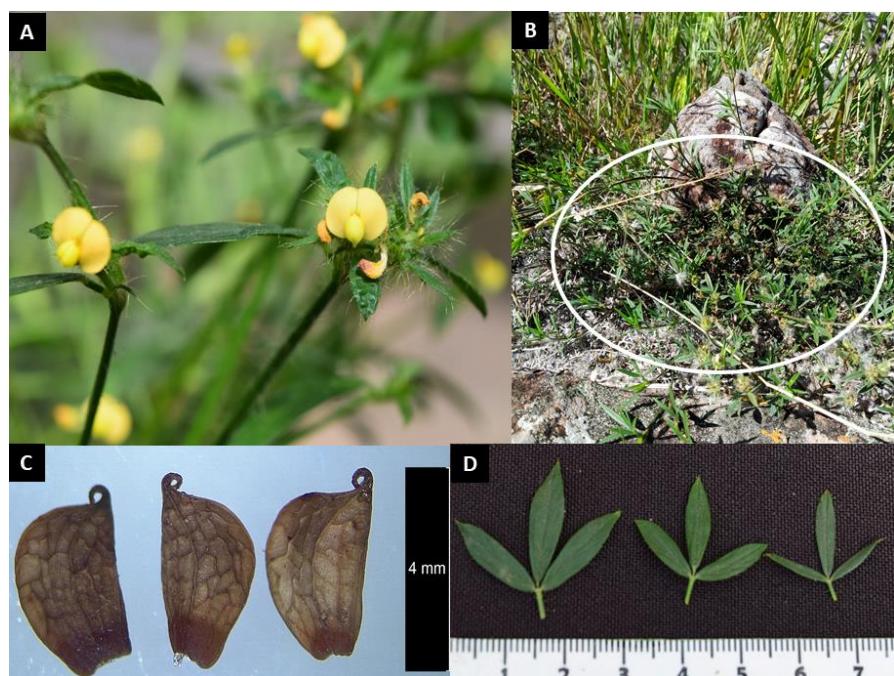


Figura 3. Morfología y forma de crecimiento de *S. hippocampoides*. **A.** Flores; **B.** Hábito rastrero de la especie; **C.** Frutos; **D.** Hojas trifoliadas.

4.2. Selección de las poblaciones para el estudio.

La selección de las poblaciones a evaluar en este trabajo se realizó mediante la superposición de las geolocalizaciones de todas las poblaciones evaluadas en 2016 – 2017 en el trabajo de Silvestri *et al.* (2020b), y las zonas afectadas por incendios en la provincia durante los años 2019, 2020, 2021 y 2022. Para ello, inicialmente se utilizaron las imágenes brindadas en los informes de INTA, para indagar las fechas y zonas de los incendios, y posteriormente se evaluaron las imágenes satelitales históricas provenientes de la base FIRMS: Fire Information for Resource Management System (FIRMS, s.f.). La base FIRMS provee información de incendios activos en tiempo casi real, dentro de las tres horas posteriores a la detección satelital procedente del Espectro radiómetro de Imágenes de Resolución Moderada (MODIS) a bordo de los satélites Aqua (2002) y Terra (1999). Los focos de calor son detectados mediante la radiación infrarroja emitida por el fuego, cada uno de estos focos se localiza en el centro de un pixel con una resolución espacial de 1 km² (Davies *et al.* 2008; Salinero 2009). Para su detección se utiliza un algoritmo contextual que compara la temperatura de brillo conjunta de un pixel candidato y sus vecinos, con valores umbrales típicos de incendios (Giglio 2013). Dicho algoritmo examina cada pixel del sector de barido del sensor y le asigna una de las clases según corresponda: dato perdido, agua, nube, fuego, no fuego o desconocido.

En cuanto a la población que se utiliza como control, se seleccionó una de las dos poblaciones ubicadas en la Reserva Natural Privada “Paraje Tres Cerros” en el departamento La Cruz (Corrientes), de la cual se tiene certeza que no fue afectada por incendios (Personal de la reserva, comunicación personal). Paralelamente, también se realizó el relevamiento de la geolocalización de ambas poblaciones con las imágenes satelitales históricas provenientes de la base FIRMS.

Una vez seleccionadas las poblaciones a evaluar (Tabla 1), se confeccionó un mapa para la visualización, superponiendo los archivos vectoriales de puntos (tipo shape) de los focos de incendios relevantes (descargados de la plataforma FIRMS), con los archivos vectoriales de polígono (tipo shape) de la provincia de Corrientes, y las geolocalizaciones de las poblaciones. La visualización y edición de las imágenes se realizó utilizando QGIS 3.4.2-Madeira (QGIS Development Team 2018).

4.3. Colección del material de estudio.

Se realizaron campañas para coleccionar material biológico de la población ASI, localizada en un sitio donde ocurrieron incendios, y de la población TC donde no hubieron incendios (Tabla 1). En ambos sitios, se tomaron muestras de un número de individuos adultos representativo de la población (10 como mínimo) considerando una separación de tres metros entre los mismos. El material herborizado de cada población se preserva en el herbario CTES. De cada individuo, se colectaron muestras de hojas que se conservaron en silice gel, y frutos (cuando estuvieron disponibles), que se conservaron en el banco de germoplasma BGCTES (IBONE - FCA, UNNE).

La población ASI, se encuentra en una banquina amplia de la Ruta Nacional Nº 12 altura del Km 1171, aproximadamente a 700 metros del cruce del arroyo Santa Isabel (Figura 4, A - B). La altura del lugar es de 70 m.s.n.m. Existe perturbación antrópica debido al mantenimiento de las banquinas mediante quemas periódicas y corte de las pasturas que allí se encuentran.

Tabla 1. Material de estudio.

Espece	Población	Localización y procedencia	Afectada por incendios
<i>S. hippocampoides</i>	ASI	Argentina, Corrientes, departamento Berón de Astrada. Latitud: -27.46661; longitud: -57.47094. Altitud: 70 m.s.n.m. SALV 1 (CTES)	Si
<i>S. hippocampoides</i>	TC	Argentina, Corrientes, departamento San Martín. Reserva Natural Privada “Paraje Tres Cerros”. Latitud: -29.10514; longitud: -56.93567. Altitud: 86 m.s.n.m. Pe 34 (CTES)	No

Por su parte, la población TC se geolocaliza en la Reserva Natural Privada “Paraje Tres Cerros”, específicamente en la ladera norte del cerro Nazareno (el cerro alcanza una altura máxima de 179 m.s.n.m.). Este cerro recibe el aire seco y gran incidencia del sol, su vegetación es poco densa y compuesta principalmente de hierbas gramíferas. En general, el ambiente está protegido de perturbaciones antrópicas (Figura 4, C - D).



Figura 4. Ambientes de las poblaciones estudiadas. **A** y **B**. Población ASI, banquinas amplias de RN N° 12 Km 1171, Departamento Berón de Astrada. **C** y **D**. Población TC, Reserva Natural Privada “Paraje Tres Cerros”, Departamento San Martín.

4.4. Extracción y amplificación del ADN.

El ADN total se extrajo a partir de 20 mg de hojas previamente deshidratadas en silice gel de los individuos coleccionados, utilizando los protocolos de extracción con CTAB (Cullings 1992; Doyle y Doyle 1987) (Figura 5). La calidad del ADN extraído fue evaluada mediante corridas electroforéticas en geles de agarosa al 0,8 %, y su concentración se estimó por espectrofotómetro. A partir de la evaluación de la calidad de ADN se seleccionaron 11 y 10 individuos de las poblaciones ASI y TC, respectivamente

Posteriormente se realizaron diluciones de 100 ng/μl en agua desionizada autoclavada, para emplearlas como ADN molde en las reacciones de amplificación. Dichas diluciones se conservaron a -20 °C hasta su uso. El ADN nuclear fue amplificado a través de reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) para un volumen final de 25 μl (Tabla 2), utilizando el siguiente programa: se inició con un paso de desnaturalización a 94 °C (5 minutos); seguida de 40 ciclos de: 94 °C durante 1 minuto (desnaturalización), 45 segundos a la temperatura de alineamiento correspondiente a cada cebador (Tabla 3), 72 °C durante 2 minutos (extensión); y un paso final de extensión a 72 °C durante 5 minutos.

Se utilizaron ocho cebadores específicos para ISSR (Secuencias Intergénicas Repetidas Simples) utilizados en Silvestri *et al.* (2020b) (Tabla 3). Los productos obtenidos junto a un marcador molecular de patrón conocido (2-log DNA Ladder: 0,1–10 kb) fueron separados en geles de agarosa al 2 % a 60 V durante dos horas, y teñidos durante 20 minutos con Bromuro de etidio (10 mG mL⁻¹) (se utilizó el mismo marcador molecular que en Silvestri *et al.* 2020b). En cada amplificación se incluyó un control negativo, para confirmar que las bandas obtenidas no fueran artefactos de la amplificación. Los perfiles moleculares se visualizaron bajo luz UV con un documentador de geles, se fotografiaron y posteriormente fueron analizados (Figura 5).

Las bandas con la misma distancia de migración, amplificadas con el mismo cebador, se consideraron homólogas. Cada banda se consideró como un único *locus* bialélico, uno amplificable y el otro nulo. Los datos se registraron manualmente como presencia (1) o ausencia de la banda (0). Con los datos obtenidos se construyeron matrices binarias de individuos por caracteres. Una banda es considerada polimórfica si se registran tanto su presencia como su ausencia.

Tabla 2. Componentes de la mezcla de PCR utilizada.

Reactivos	Concentración final
Agua desionizada	-
Tampón para Taq polimerasa	1 x
dNTPs	0,1 mM
Cebador	0,2 mM
Enzima Taq polimerasa	0,5 U/μl
ADN	20 ng/μl

Tabla 3. Temperatura de alineamiento y número de fragmentos amplificados correspondientes a los cebadores utilizados.

Cebador	Secuencia	Temperatura de alineamiento	Número de fragmentos amplificados
(GA) ₈ -C	GAGAGAGAGAGAGAGAC	48 °C	3
(GA) ₈ -T	GAGAGAGAGAGAGAGAT	48 °C	5
(AG) ₈ -T	AGAGAGAGAGAGAGAGT	46 °C	7
(AC) ₈ -T	ACACACACACACACACT	55 °C	6
(AG) ₈ -GC	AGAGAGAGAGAGAGAGGC	55 °C	9
(AC) ₈ -G	ACACACACACACACACG	55 °C	9
(GA) ₈ -G	GAGAGAGAGAGAGAGAG	48 °C	8
(GT) ₈ -TC	GTGTGTGTGTGTGTTC	55 °C	8



Figura 5. **A.** Perfil molecular de cebador (GA)₈C en gel de agarosa al 2 % revelado bajo luz UV y fotografiado. **B.** Preparación de soluciones para extracción de ADN. **C.** Extracción orgánica con 1 de volumen: alcohol isoamílico 24:1 v/v : rescate de fase acuosa. **D.** ADN precipitado en buffer de precipitación CTAB. **E.** ADN precipitado final luego de los lavados con etanol.

4.5. Análisis de la variabilidad y estructuración genética.

A partir de la matriz confeccionada se calcularon los estadísticos descriptivos: número total de bandas (NTB), número de bandas exclusivas (NBE), heterocigosis esperada (He) con el factor de corrección para muestras pequeñas y siguiendo el método y corrección para marcadores dominantes (Lynch y Milligan 1994), y porcentaje de *loci* polimórficos (PLP). Se calculó el Índice de diversidad de

Shannon (I) (Shannon 1949) para una estimación relativa del grado de variación genética dentro de las poblaciones empleando la siguiente fórmula:

$$Sh = -1 \cdot \sum pi \cdot \ln (pi) + qj \cdot \ln (qj)$$

Donde pi es la frecuencia de la presencia y qj la frecuencia de la ausencia de cada banda (Legendre y Legendre 1998). Los datos fueron procesados con el programa GenAIEx 6.3 (Peakall y Smouse 2006).

El grado de diferenciación genética dentro y entre las poblaciones se estimó mediante métodos de agrupación bayesiana implementados en el programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000), con el modelo de individuos agregados o mezclados (“admixed”) en cada población, calculando su proporción de pertenencia a cada grupo, con un modelo de frecuencias correlacionadas (Falush *et al.* 2003). El rango de posibles grupos (K) analizados fue de 1 a 5, llevando a cabo 10 repeticiones independientes por cada estimación de K para verificar la consistencia de los resultados entre los diferentes análisis. La longitud de las iteraciones de Monte Carlo con cadena de Markov fue 100.000 réplicas y el proceso de “burn-in” se fijaron en 50.000 iteraciones (Falush, Stephens y Pritchard 2003). El ΔK óptimo se determinó mediante el método de Evanno *et al.* (2005).

La diferenciación genética total se partió y analizó para la especie y las poblaciones mediante el análisis de varianza molecular (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992), se calcularon los estadísticos ΦST . La significancia de dichos estadísticos fue obtenida mediante métodos de permutaciones (bootstrapping). A su vez se calcularon los índices de distancia y de identidad genética de Nei (Nei 1973) entre individuos. A partir de los valores de distancia genética, se evaluó mediante un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) el ordenamiento de la variabilidad genética dentro de las poblaciones y entre éstas. Los datos fueron procesados con el programa GenAIEx 6.5 (Peakall y Smouse 2006).

4.6. Comparación de la variabilidad genética entre los años 2016 vs 2022

Se realizó la comparación de los estadísticos descriptivos nombrados previamente, entre las evaluaciones del 2016 - 2017 vs 2022 de cada población, ASI y TC. Para establecer si la diferencia de variabilidad genética de cada población entre los años evaluados es significativa se realizó una prueba estadística para el índice de Shannon y la heterocigosis esperada (a partir de los valores por *locus* de cada población, utilizando datos previos del trabajo Silvestri *et al.* 2020b). En primer lugar, se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk de la distribución de los datos, como éstos mostraron que la distribución no puede asumirse normal (anexo, tabla 1), se aplicó la prueba no paramétrica de Wilcoxon - Mann - Whitney (Wilcoxon 1950) (anexo 2). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el entorno de R studio (R CoreTeam 2020).

Prueba de hipótesis:

- Hipótesis nula: no existen diferencias significativas entre los índices de diversidad genética (I y/o H_e) de los años 2016 - 2017 y 2022 de cada población.
- Hipótesis alternativa: existe diferencias significativas entre los índices de diversidad genética (I y/o H_e) de los años 2016 - 2017 y 2022 de cada población.

5. Resultados

5.1. Identificación de focos de incendios en relación a la localización de las poblaciones de *S. hippocampoides* evaluadas en 2016 - 2017

En la Tabla 4 se resumen los focos de incendios más relevantes para el trabajo por coincidir con las coordenadas de las poblaciones analizadas en los años 2016 – 2017 o por su cercanía a las mismas. Se registraron focos de incendios en la coordenada de la población ASI el día 30 de septiembre de 2020. Además, se registraron incendios a 0,96 km (960 metros) y a 0,24 km (240 metros) de la ubicación de ASI en los días 1 y 17 de Julio de 2019, respectivamente. Por lo tanto, se decidió seleccionar a esta población para evaluarla (Figura 6).

Tabla 4. Relevamiento de incendios de las poblaciones analizadas en 2016 - 2017 para la selección de las mismas a utilizar en el presente estudio.

Identificación de la población	Coordenadas de la población (latitud; longitud)	Fecha del foco de incendio	Coordenadas del foco de incendio (latitud; longitud)	Distancia en km entre el foco de incendio y la población
<i>S. hippocampoides</i>				
ASI	-27.46661; -57.47094	12/07/2019	-27.468; -57.475	0,24 km
ASI	-27.46661; -57.47094	1/07/2019	-27.474; -57.478	0,96 km
ASI	-27.46661; -57.47094	30/09/2020	Incluye a la coordenada de la población	
VO2	-27.63333; -56.85722	14/02/2022	-27.628; -56.861	0,63 km
LO	-27.90944; -57.44422	16/02/2022	-27.908; -57.442	0,17 km

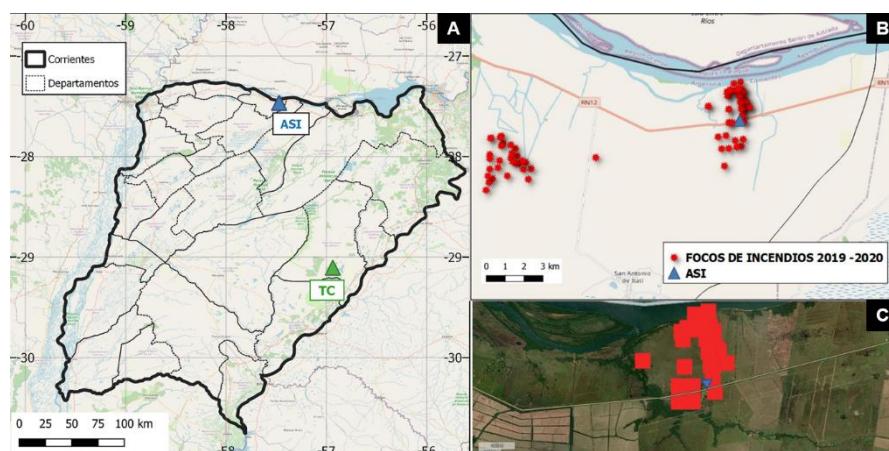


Figura 6. Localización de poblaciones y focos de incendios. **A.** Poblaciones ASI y TC. **B y C.** Focos de incendios principales próximos a la población ASI, en archivo vectorial (**B**) e imágenes satelitales (**C**).

5.2 Variabilidad genética.

Se detectaron un total de 55 bandas para las dos poblaciones de *S. hippocampoides*, con un 62,27 % de *loci* polimórficos. De los ocho cebadores utilizados para el análisis, aquellos con el mayor número de fragmentos amplificados fueron (AG)₈GC y (AC)₈G con un total de nueve bandas cada uno (Tabla 3). En cuanto a los índices de diversidad para la especie, se obtuvo una heterocigosis esperada (He) de 0,25 y el Índice de Shannon (I) presentó un valor de 0,37 (Tabla 5).

Se observa que los valores de los índices de diversidad intrapoblacional de la población ASI fueron inferiores a los obtenidos en la población TC (Tabla 5). La población ASI presentó un total de 44 bandas, siendo ocho de ellas exclusivas (Np) (Figura 7). Con respecto a los índices de diversidad intrapoblacional, presentó un valor de 0,17 para el I; la He fue de 0,11, y el PLP de 30,91 %. La población TC, por su parte, presentó un total de 47 bandas, siendo 11 de ellas privadas (Figura 7). El I fue de 0,23; la He fue 0,15; y un PLP de 38,18 %.

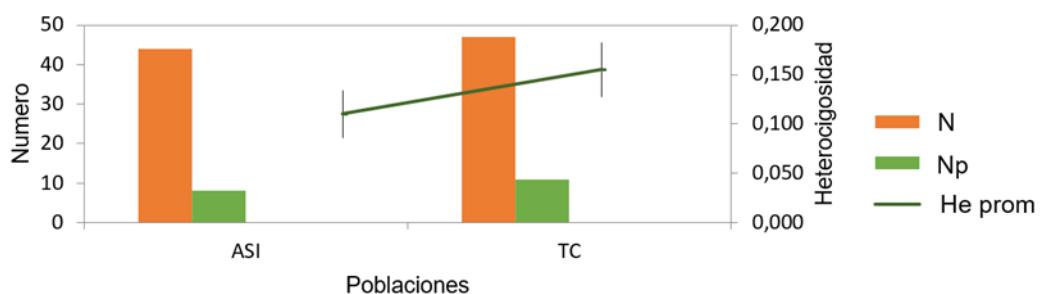


Figura 7. Resumen de los índices de diversidad calculados para las poblaciones ASI y TC de *S. hippocampoides*. Abreviaturas: N (número total de bandas), Np (número de bandas privadas), He prom (Heterocigosis esperada promedio)

Tabla 5. Valores de resumen de la diversidad genética para la especie *S. hippocampoides*, y las poblaciones ASI y TC basado en el análisis de 55 *loci* con ocho cebadores ISSR.

Población	N	NTB	Np	Ne	Na	I	He	PLP (%)
ASI	11	44	8	1,19 (±0,04)	1,11 (±0,09)	0,17 (±0,03)	0,11 (±0,02)	30,91 (±3,64)
TC	10	47	11	1,27 (±0,05)	1,24 (±0,09)	0,23 (±0,04)	0,15 (±0,03)	38,18 (±3,64)
Promedio	10,5	45,5	9,5	1,23 (±0,03)	1,17 (±0,07)	0,20 (±0,03)	0,13 (±0,02)	34,55 (±3,64)
<i>S. hippocampoides</i>	21	55	-	1,42 (±0,05)	1,67 (±0,06)	0,37 (±0,04)	0,25 (±0,03)	62,27

Abreviaturas. N (número de individuos), NTB (número total de bandas), Np (número de bandas privadas), Ne (número efectivo de alelos), Na (número de alelos diferentes), I (índice de Shannon), He (heterocigosis esperada), PLP (porcentaje de *loci* polimórficos), ± (desvío estándar).

5.3 Estructuración genética.

El análisis de la varianza molecular (AMOVA) mostró que el 34 % de la variación se encontraba dentro de las poblaciones, mientras que el 66 % entre ellas, con un valor φ_{ST} de 0,657 ($p < 0,005$) (Figura 8). La distancia genética de Nei entre las poblaciones fue de 0,36, mientras que el valor de identidad genética fue de 0,70. Por su parte, el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) basado en la distancia genética entre individuos, dividió ambas poblaciones en estudio, con las coordenadas 1 y 2 explicando el 60,23 % de la variación. La mayor información fue explicada por la coordenada 1 (53,34 %) (Tabla 6, Figura 9). El análisis de agrupación Bayesiana realizado con el programa STRUCTURE mostró que el valor máximo de ΔK se alcanzó cuando $K= 2$. Los individuos presentaron alto grado de pertenencia a una sola agrupación (Figura 10).

Análisis Molecular de la Varianza



Figura 8. Representación del porcentaje de la variación genética de *S. hippocampoides*.

Tabla 6. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA). Porcentaje de variación de las tres primeras coordenadas principales.

Coordenadas principales	1	2	3
Porcentaje (%)	53,34	6,89	6,70
Porcentaje acumulado (%)	53,34	60,23	66,93

Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)

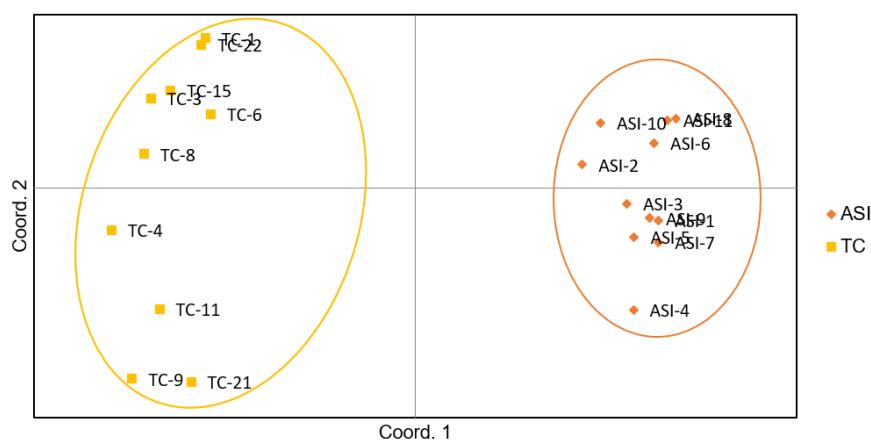


Figura 9. Representación gráfica del Análisis de Coordenadas Principales basado en las distancias genéticas de Nei entre los individuos de las poblaciones ASI y TC.

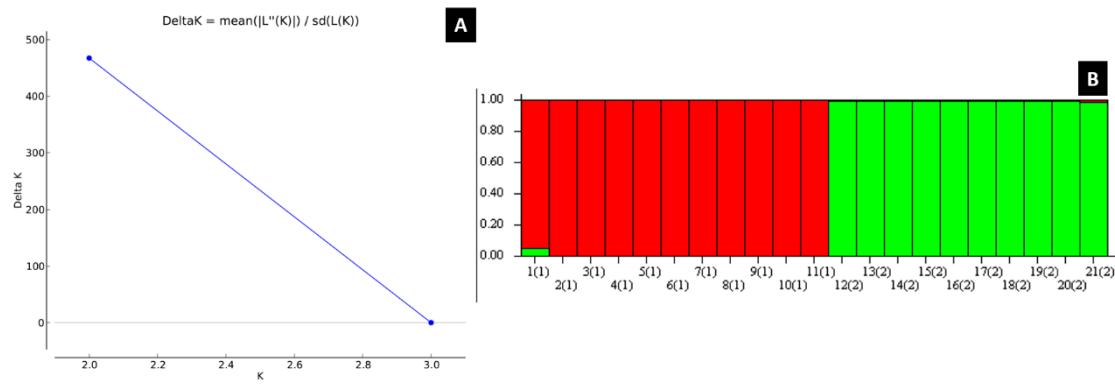


Figura 10. A. Valor máximo de ΔK . B. Representación de las agrupaciones Bayesianas resultantes de STRUCTURE para $K= 2$. Los individuos de la población ASI son del 1 al 11, y los de la población TC del 12 al 21.

5.4 Comparación de resultados 2016-2017 vs 2022.

En la tabla 7 se presenta la comparación de los índices descriptivos de diversidad de cada población entre los diferentes años. En general, se observan valores similares entre los años 2016 - 2017 y 2022. En particular, en la población ASI los valores del I, la He y el PLP se redujeron de 0,20 a 0,17; de 0,13 a 0,11; y de 39,26 % a 30,91 %, respectivamente. Mientras que, en la población TC, los índices de diversidad I, He y PLP mostraron un aumento de 0,17 a 0,23; de 0,11 a 0,15; y de 33,33 % a 38,18 %, respectivamente. El Na aumentó en ambas poblaciones, de 0,90 a 1,11 en ASI y de 0,74 a 1,24 en TC. El Ne disminuyó de 1,22 a 1,19 en la población ASI que, mientras que en la población TC aumentó de 1,20 a 1,27. Finalmente, el NTB hallado disminuyó en ambas poblaciones, de 69 a 44 y de 56 a 47, en ASI y TC, respectivamente. Mientras que el Np se mantuvo en ASI (8) y aumentó en TC (de 1 a 11).

Tabla 7. Comparación de los valores de los estadísticos descriptivos de diversidad genética de cada población para las cohortes 2016 y 2022

Índices	ASI		TC	
	AÑO 2016-2017	AÑO 2022	AÑO 2016-2017	AÑO 2022
N	9	11	8	10
NTB	69	44	56	47
Np	8	8	1	11
Ne	1,22 ($\pm 0,03$)	1,19 ($\pm 0,04$)	1,20 ($\pm 0,03$)	1,27 ($\pm 0,05$)
Na	0,90 ($\pm 0,08$)	1,11 ($\pm 0,09$)	0,74 ($\pm 0,08$)	1,24 ($\pm 0,09$)
I	0,20 ($\pm 0,02$)	0,17 ($\pm 0,03$)	0,17 ($\pm 0,02$)	0,23 ($\pm 0,04$)
He	0,13 ($\pm 0,02$)	0,11 ($\pm 0,02$)	0,11 ($\pm 0,02$)	0,15 ($\pm 0,03$)
PLP (%)	39,26	30,91	33,33	38,18

Abreviaturas. N (número de individuos); NTB (número total de bandas), Np (número de bandas privadas), Ne (número efectivo de alelos), Na (número de alelos diferentes), I (índice de Shannon), He (heterocigosis esperada), PLP (porcentaje de loci polimórficos), \pm (desvío estándar).

Las diferencias halladas entre los índices de diversidad intrapoblacional Índice de Shannon y Heterocigosis esperada de los años 2016 y 2022 de cada población no resultaron ser significativas mediante la prueba estadística no paramétrica de Wilcoxon -Mann-Whitney (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados de la prueba estadística no paramétrica de Wilcoxon -Mann-Whitney

Comparación	W (estadístico)	Valor p > 0,05
ASI 2016 y ASI 2022	3997	0,3393
TC 2016 y TC 2022	3452,5	0,374

6. Discusión

6.1. Diversidad y estructuración genética.

Conocer cómo se distribuye la diversidad genética, y sus niveles entre las poblaciones y dentro de ellas es importante para entender aspectos biológicos de las especies, así como para programas de conservación y de mejoramiento de las especies con potencial agronómico.

Los marcadores moleculares evaluados en el presente estudio mostraron una alta diversidad genética promedio para la especie *S. hippocampoides* (I: 0,20; He: 0,13; PLP: 34,55 %). Niveles de diversidad genética más bajos para la especie en estudio fueron obtenidos en Silvestri *et al.* (2020b) utilizando los mismos cebadores (I: 0,15; He: 0,10; PLP: 27,96 %), y en el trabajo de Kazan *et al.* (1993) utilizando polimorfismo en el ADN amplificado al azar (RAPD) (Polimorfismo utilizando índice de distancia genética: $1 - F = 0,146$). Sin embargo, otros autores han obtenido valores de diversidad genética más altos en otras especies del género utilizando ISSR, como en *S. capitata* (He: 0,292; PLP: 91,65 %), en *S. macrocephala* (He: 0,285; PLP: 91, 36 %) (Alzate-Marin *et al.* 2019) y en *S. scabra* (I: 0,187; He: 0,126; PLP: 95,27 %) (Costa *et al.* 2018). También, se hallaron niveles de diversidad más altos con otros marcadores moleculares como secuencias de repetición simple (SSR) en *S. guianensis* (He: 0,55) (Santos Gracia *et al.* 2012) y polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) en las especies *S. guianensis* (95, 5 % de bandas polimórficas Jiang *et al.* 2005), *S. humilis* (75 % de bandas polimórficas) y *S. viscosa* (83 % de bandas polimórficas) (Sawkins *et al.* 2001). Las diferencias encontradas entre los estudios anteriormente mencionados y los resultados de este trabajo, podrían deberse al número distinto de poblaciones e individuos utilizados, a las diferencias en variabilidad genética inherente para las distintas especies, y/o a la diferente naturaleza de los marcadores moleculares utilizados. Por ejemplo, mientras que en el trabajo de Silvestri *et al.* (2020b) se utilizaron ocho poblaciones de localizaciones geográficamente lejanas, en el presente estudio sólo se evaluaron dos poblaciones de *S. hippocampoides* separadas por a 200 km aproximadamente. Además, si bien en Kazan *et al.* 1993 se utilizaron dos poblaciones de *S. hippocampoides*, este último trabajo utilizó sólo cuatro individuos por población, mientras que aquí se utilizaron entre 10 y 11 individuos por población. En cuanto a los trabajos mencionados que obtuvieron mayor diversidad genética en otras especies de *Stylosanthes*, utilizaron de 32 a 150 poblaciones o accesiones de colecciones. Es esperable que, al utilizar un número mayor de poblaciones, las mismas manifiesten una mayor variación genética, como consecuencia de la mayor representación de la variación de la especie. Por otra parte, las diferencias entre la naturaleza de los distintos marcadores moleculares influye en la variabilidad hallada, por ejemplo, los marcadores dominantes como los ISSR, solamente tienen la capacidad de identificar dos alelos por *locus* como máximo (presencia / ausencia), mientras que, los marcadores multialélicos codominantes como los SSR pueden identificar varios alelos por *locus*, permiten discernir entre genotipos individuales, y en consecuencia ofrecen mayor información sobre la variabilidad genética (Turchetto-Zolet *et al.* 2017).

En cuanto a los resultados de estructuración genética, el AMOVA mostró que la variación genética es mayor entre las poblaciones que dentro de ellas, lo cual coincide con trabajos previos en *S. hippocampoides* (Silvestri *et al.* 2020b), en *S. scabra* (Costa *et al.* 2018), y en *S. capitata* y *S. macrocephala* (Alzate-Marin *et al.* 2019) utilizando marcadores ISSR, y en *S. humilis* (Sawkins *et al.* 2001; Vander

Stappen *et al.* 1998), *S. viscosa* (Sawkins *et al.* 2001), *S. macrocephala* (Barros *et al.* 2005) utilizando distintos marcadores moleculares. Lo cual es esperable considerando el tipo de reproducción sexual preferente por autofecundación que presenta *S. hippocampoides*, así como la mayoría de las especies del género (Sawkins *et al.* 2001). El análisis de agrupación Bayesiana, por su parte, mostró que los individuos presentaron alto grado de pertenencia a una sola agrupación, esto coincide con las dos poblaciones que fueron previamente seleccionadas para la realización de este estudio. Además, la división de las poblaciones en diferentes ejes de coordenadas del PCoA, sustenta la delimitación genética entre las poblaciones. Al mismo tiempo, ambas poblaciones mostraron bandas privadas, lo que indica una fuerte identidad genética. Estos resultados señalan que las poblaciones se encuentran estructuradas genéticamente, reconociendo a los dos lugares muestreados como dos poblaciones distintas. En relación a ello, Barros *et al.* 2005, han demostrado una tendencia a la regionalización de las poblaciones de *S. macrocephala* de acuerdo al análisis de estructuración genética, y en la evaluación de las poblaciones de *S. hippocampoides* de 2016 - 2017, en particular, las dos situadas en el Paraje Tres Cerros (incluyendo a la población TC aquí evaluada) se diferenciaron del resto de las poblaciones (Silvestri *et al.* 2020b).

En el estudio de Silvestri *et al.* (2020b) los valores de los índices de diversidad genética de las poblaciones TC y ASI de *S. hippocampoides* fueron similares, en cambio la diversidad genética actual obtenida en este trabajo fue inferior en la población ASI (según los índices de diversidad intrapoblacional: I, He y PLP). Como ha sido mencionado, TC se localiza en una Reserva Natural, específicamente a lo largo de la ladera norte del cerro Nazareno, que llega a alcanzar como altura máxima 179 m.s.n.m. Tal ubicación evita las perturbaciones antrópicas, a la vez que aumenta el contacto con posibles polinizadores naturales (si bien se presume que es preferentemente autógama, es importante aclarar que no existen estudios sobre las tasas de entrecruzamientos en la especie) y con predadores herbívoros como corzuela, conejos y caballos (Cajade *et al.* 2013) que se alimentan de la especie y podrían simultáneamente dispersar frutos. Los frutos del género *Stylosanthes* presentan una pequeña cantidad de pelos glandulares en la parte superior (Vanni, 2017), los cuales favorecen las posibilidades de epizoocoría, es decir, de la adherencia de los frutos al pelaje o piel de los animales, y consecuentemente su traslado (Deminicis *et al.* 2009), otros autores ya han sugerido (Costa *et al.* 2018) y demostrado (Gardener 1993) a la zoocorria como un potencial método de dispersión de frutos en las especies del género. Estas relaciones biológicas potenciales podrían influir en el movimiento de los alelos dentro de la población, y entre poblaciones vecinas (existen poblaciones de la misma especie en el cerro Chico y en el cerro Capará del “Paraje Tres Cerros”, situados a 1 km y 7,5 km respectivamente, y a 15 km aproximadamente en la Reserva Privada de la Estancia Loma Alta), resultando en el aumento o el mantenimiento de la variabilidad genética alta.

Por otra parte, el número total de bandas obtenidas en el presente trabajo para ambas poblaciones fue menor a las obtenidas en las evaluaciones de los años 2016 - 2017 (Silvestri *et al.* 2020b), mientras que, el número de bandas privadas halladas fue mayor en la población TC y en la población ASI se mantuvo igual en ambos estudios. Las diferencias observadas podrían deberse al número distinto de poblaciones utilizadas en ambos estudios y a las diferencias de interpretación de las bandas, propios de cada investigador. En el presente trabajo, se ha evaluado un menor número de poblaciones que en 2016 - 2017, la población TCC evaluada en Silvestri *et al.* 2020b, por ejemplo, se geolocaliza aproximadamente a 1 km a la población TC aquí evaluada con la cual compartía bandas (en Silvestri *et al.* 2020b, se utilizaron las dos poblaciones a las que se llamaron TCN y TCC). Al estar presente sólo una de ambas poblaciones

en este trabajo, aumentó el número de bandas privadas, mientras que la población ASI, no tiene poblaciones cercanas tanto en el presente estudio como en Silvestri et al. 2020b.

6.2. Las perturbaciones ambientales y la diversidad genética.

Las perturbaciones ambientales influyen en la dinámica y diversidad de numerosos ecosistemas, pero sus consecuencias en la distribución de la diversidad genética han sido poco estudiadas. Son diversas las consecuencias que las perturbaciones pueden traer a las poblaciones, teniendo en cuenta la intensidad, la escala (pequeña o grande), la duración (breve o prolongada) y el origen (biótico, abiótico o antrópico) de las mismas (Banks et al. 2013). A partir de un relevamiento bibliográfico realizado, se observan tres situaciones principales con respecto a la diversidad genética poblacional luego de incendios naturales o artificiales: 1) *Disminución de la diversidad genética*, por ejemplo, el caso de *Athrotaxis cupressoides* y *Diselma archeri*, dos especies de coníferas perennes paleoendémicas intolerantes al fuego que se localizan en las áreas montañosas del oeste de Tasmania, Australia. Desde el Holoceno se reporta un historial de incendios severos en la región de distribución de estas especies, que se acentuaron a fines del siglo XX por las condiciones de sequías frecuentes y duraderas y el aumento de tormentas eléctricas secas. Worth et al. (2016) observaron que ambas especies eran eliminadas por los incendios severos, y que se regeneraban pobremente por semillas o crecimiento asexual luego de incendios de baja intensidad, esto condujo a que las poblaciones sufrieran cuellos de botella y consecuentemente la diversidad genética de las mismas se fue erosionando; 2) *Aumento de la diversidad genética*, en la especie *Erica coccinea* localizada en un ambiente propenso a incendios en el bioma *fynbos* en Sudáfrica. Mediante análisis con microsatélites, Segarra-Moragues y Ojeda (2010) evaluaron la variabilidad genética de poblaciones sembradoras (sensibles al fuego, uniformemente etarias, y generaciones no superpuestas) y rebrotadoras (resistentes al fuego, con múltiples cohortes y con dinámicas generacionales superpuestas) de la especie, hallando una mayor diversidad genética intrapoblacional y una mayor diferenciación interpoblacional en las poblaciones sembradoras. Los autores explican que estos mayores niveles de diversificación genética son consecuencias de los tiempos generacionales comparativamente más cortos y de la rotación más rápida de la población sembradora (sensible al fuego) a diferencia de las rebrotadoras, que presentan tiempos generacionales más prolongados; 3) *Mantenimiento de la diversidad genética*, existen casos como el arbusto *Persoonia mollis* ssp. *nectens*, donde ocurre un mantenimiento de la variabilidad genética al comparar poblaciones previas y posteriores a incendios (Ayre et al. 2009). Los autores proponen que las plantas que habitan en lugares donde las perturbaciones son frecuentes, en este caso incendios, muestran ciertas adaptaciones que les permiten aminorar los efectos negativos, como la capacidad de rebrotar a partir de cualquier estructura de la planta (rizomas, yemas de raíz, yemas de tallo, lignotubérculos) y/o la capacidad de almacenar un banco de semillas bajo la superficie o bien en el dosel. El hecho de que las perturbaciones pueden presentarse con distintas intensidades y frecuencias, conduce a que el éxito del rebrote sea variable, y que parte de las semillas contenidas en el banco permanezcan latentes (Pausas et al. 2004). Considerando el relevamiento bibliográfico realizado, el primer caso (disminución de la diversidad genética) resultó la situación menos frecuente en estudios de evaluación de la diversidad frente a incendios (Worth et al. 2017). Mientras que, el segundo y el tercer caso (aumento y mantenimiento de la diversidad, respectivamente) son los casos en mayor proporción en este tipo de estudios (Ayre et al. 2009; Lucas Borja et al. 2016; Maquia et al. 2013; Rajora y Pluhar 2003; Segarra-Moragues y Ojeda 2010;

Uchiyama *et al.* 2006). Por otro lado, en poblaciones de animales también se observan casos de disminución (Brown *et al.* 2013), aumento (Gates *et al.* 2021) y mantenimiento (Suárez *et al.* 2012) de la diversidad genética frente a perturbaciones ambientales.

En el presente trabajo, si bien es posible observar una leve disminución de los índices de variabilidad (He, I y PLP) en la población ASI en relación a los obtenidos en 2016 - 2017, las diferencias halladas no son estadísticamente significativas. Por lo tanto, no es posible afirmar que los incendios sucesivos ocurridos en los años 2019 a 2022 produjeran una disminución significativa en la diversidad genética de la población. En este caso, el mantenimiento de la variabilidad genética de la población ASI posterior a los incendios en relación a la variabilidad obtenida en 2016 - 2017, podría deberse, como lo plantean Ayre *et al.* (2009), a estrategias u adaptaciones de las poblaciones que les permiten atenuar los efectos negativos que las perturbaciones podrían causar. En este sentido, las especies de la familia Fabaceae, a la cual pertenece la especie en estudio, presentan semillas con cubiertas duras e impermeables, que necesitan de la escarificación para romper la latencia de las mismas y facilitar así la germinación (Fidelis *et al.* 2016). Más aún, son recomendados tratamientos de escarificación mecánica como inmersión de los frutos o semillas en agua a 80 °C durante 10 minutos, tratamiento con ácido sulfúrico concentrado, o pasar las semillas sobre una superficie caliente a 120 °C, para aumentar el éxito de la germinación en los cultivares de las especies de *Stylosanthes* (Tropical Forages, s.f.). Esta resistencia de los frutos o semillas podría permitir la formación de un banco de semillas almacenadas bajo la superficie, y aunque existe poca información sobre la edad, distribución, persistencia y composición genética de esas semillas, representarían a las contribuciones genéticas de los adultos de la generación más reciente previa al incendio, y también una serie de generaciones anteriores (Ayre *et al.* 2009). Los únicos datos del tiempo de ciclo de vida de *S. hippocampoides*, sustentarían esta propuesta, ya que proponen hasta más de cinco años (Orr 2008), y el tiempo transcurrido desde la primera evaluación hasta el presente trabajo fueron seis años. Esta estrategia reproductiva que algunas plantas poseen, les permitiría mantener su variabilidad genética posterior a las perturbaciones incluso si estas fueran de gran intensidad, debido a que la recuperación de la población se daría a partir de estos bancos de semillas establecidos por poblaciones anteriores a la perturbación, y no de una pequeña cantidad de individuos supervivientes (Ayre *et al.* 2009). Las especies del género *Stylosanthes* se caracterizan por presentar tolerancia a la sequía y una gran capacidad de colonización (Barros *et al.* 2005; Costa *et al.* 2018; Karia *et al.* 2010), tales rasgos les permitirían a sus poblaciones una rápida recuperación tras los incendios. Incluso si estos fueran frecuentes, como los ocurridos en Corrientes entre los años 2019 a 2022, sin el tiempo para la reposición de semillas entre incendios, el banco de semillas cumpliría un papel fundamental en la regeneración de la población, ayudando a mantener la variabilidad post-incendio (Uchiyama *et al.* 2006). Una posible explicación para el mantenimiento de la variabilidad de la población ASI luego de los incendios sucesivos del 2019 a 2022, está en relación al ambiente en el que se encuentra dicha población. Una amplia banquina de ruta que se encuentra constantemente sometida a perturbación antrópica debido al mantenimiento mediante quemas periódicas y corte de las pasturas (observación visual). Banks *et al.* (2013) mencionan que, como consecuencia de un régimen de perturbaciones frecuentes, las poblaciones que allí se localizan dependen de ellas para sobrevivir ya que se establecen las condiciones óptimas de ese hábitat a las cuales están adaptadas, entendiendo por condiciones óptimas la disponibilidad de recursos, la estructura del hábitat y la composición de la comunidad. Considerando la dureza de las semillas y la característica colonizadora de las especies de *Stylosanthes*, tras el incendio se produciría un denso desarrollo de las

plántulas debido al ablandamiento por el calor de las semillas duras en el banco superficial y a la reducción de la competencia (Tropical Forage s.f.). Siguiendo este planteo, la población ASI estaría adaptada a perturbaciones como quemas y cortes periódicos, motivo por el cual, los incendios de los últimos años (2019 a 2022) no produjeron modificaciones significativas en los valores de la variabilidad genética de dicha población. Esta hipótesis concuerda con el ensayo realizado por Gardener (1980), donde se sometieron a 16 cultivares de especies de *Stylosanthes* (no estuvo incluida *S. hippocampoides*) a quemas de cinco temperaturas crecientes para evaluar la resistencia. Las especies adaptadas a condiciones más áridas en Australia generalmente fueron más resistentes al fuego que aquellas utilizadas en las zonas costeras más húmedas. Además, antes de la quema de mayor temperatura, la mayoría de las líneas tuvieron un número suficiente de semillas para la regeneración, tanto en el suelo como en la superficie; y el número de plántulas de cada línea que se regeneraba durante la estación húmeda estaba altamente correlacionado con el número de semillas almacenadas en el suelo.

Por otra parte, si bien se observó un aumento de la diversidad genética en la población TC utilizada como control, como ha sido explicado, las diferencias halladas no fueron estadísticamente significativas. En el caso de la ubicación de la población TC, no existe una perturbación frecuente como el fuego a la cual podría adaptarse, pero como se ha mencionado previamente las características biológicas dentro de una reserva natural protegida, propiciaría el contacto con polinizadores y posibles animales dispersores de frutos que podrían influir en el mantenimiento de la variabilidad genética.

André *et al.* (2008) señala que la diversidad genética es un parámetro resistente que requiere de numerosas generaciones para llegar a disminuir o modificarse significativamente, teniendo en cuenta también la intensidad y frecuencia de las perturbaciones que se presenten. Por lo tanto, este trabajo podría considerarse un estudio inicial para comprender la dinámica de la variabilidad genética poblacional en *S. hippocampoides* post-incendios, sin embargo, aumentar el número de generaciones y poblaciones comparadas en futuras evaluaciones permitiría obtener una comprensión más completa y precisa. Finalmente, considerando la intensidad y frecuencia de los incendios ocurridos en la región durante los últimos años, y la posible proyección de los mismos en los próximos, debido a que a escala global son más frecuentes, incluso en sitios donde anteriormente no ocurrían (Saucedo *et al.* 2023), como consecuencia de actividades humanas, factores culturales, y/o agravados por las consecuencias del cambio climático, resulta importante este tipo de estudios para planificar medidas de conservación adecuadas para las especies nativas.

7. Conclusiones

La búsqueda de geolocalizaciones afectadas por incendios mediante la plataforma FIRMS resulta una herramienta valiosa para este tipo de estudios, permitiendo delimitar las áreas afectadas y las no afectadas.

Los resultados de la estructuración genética (AMOVA) evidenciaron que la mayor variabilidad se encontraba entre las poblaciones y no dentro de ellas, coincidente con el tipo de reproducción preferente de *S. hippocampoides*. Al mismo tiempo, el análisis de agrupación Bayesiana y PCoA, dividieron a las poblaciones en estudio, y los individuos presentaron alto grado de pertenencia a una sola agrupación, sugiriendo la diferenciación entre ambas. Por lo tanto, la caracterización molecular por ISSR en *S. hippocampoides*, sería una herramienta a utilizar para la identificación de poblaciones en planes de conservación y mejoramiento.

En cuanto a los índices de variabilidad intrapoblacional la población TC obtuvo valores superiores a los de la población ASI.

En comparación con los valores obtenidos en el estudio de los años 2016 - 2017, la población ASI redujo sus valores de He, I y PLP, mientras que la población TC mostró un aumento de los mismos. Sin embargo, las diferencias encontradas en los índices de diversidad intrapoblacional (I y He) entre los años 2016 – 2017 y 2022 de las poblaciones en estudio no resultaron estadísticamente significativas mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon. A partir de ello, se propone que las poblaciones de *S. hippocampoides* presentarían estrategias biológicas propias de las especies leguminosas, que actuarían como factores claves para atenuar los efectos negativos de los incendios acaecidos en Corrientes entre los años 2019 a 2022, y como consecuencia mantendrían la variabilidad genética en las poblaciones ASI y TC sin cambios significativos en las comparaciones realizadas.

8. Bibliografía

- Alzate-Marin, A. L.; Costa-Silva, C.; Rivas, P. M. S.; Bonifacio-Anacleto, F.; Santos, L. G.; Moraes Filho, R. M. D. y Martinez, C. A. 2019. Diagnostic fingerprints ISSR/SSR for tropical leguminous species *Stylosanthes capitata* and *Stylosanthes macrocephala*. *Scientia Agricola*, 77 (3): e20180252. <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2018-0252>
- André, T.; Lemes, M. R.; Grogan, J. y Gribel, R. 2008. Post-logging loss of genetic diversity in a mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) population in Brazilian Amazonia. *Forest Ecology and Management*, 255 (2): 340-345. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.09.055>
- Avila R.; Barbera, P.; Blanco, L.; Burghi, V.; De Battista, J.P.; Frasinelli, C. ... y Veneciano, J. 2014 Gramíneas forrajeras para el subtrópico y el semiárido central de la Argentina. Sitio Argentino de Producción animal. Ediciones INTA. (archivo pdf) https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas_cultivadas_megatermicas/213-Gramineas_forrajeras_2014.pdf
- Ayre, D.J.; Ottewell, K.M.; Krauss, S.L. y Whelan, R.J. 2009. Genetic structure of seedling cohorts following repeated wildfires in the fire-sensitive shrub *Persoonia mollis* ssp. *nectens*. *Journal of Ecology*, 97(4):752-760. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2009.01516.x>
- Banks, S.C.; Cary, G.J.; Smith, A.L.; Davies, I.D.; Driscoll, D.A.; Gill, A.M.; Lindenmayer, D.B. y Peakall, R. 2013. How does ecological disturbance influence genetic diversity?. *Trends in ecology and evolution*. 28 (11): 670-679. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.08.005>
- Barnard, C.S. 1972. Registro No. B-12e-1 (cultivar Oxley) In: Mackay J.H.E. (Ed), Register of Australian herbage plant cultivars: supplement to the 1972. Australian Herbage Plant Registration Authority, CSIRO Division of Plant Industry, Canberra.
- Barros, A.M.; Faleiro, F.G.; Karia, C.T.; Shiratsuchi, L.S.; Pereira de Andrade, R. y Britto Lopes, G.K. 2005. Variabilidade genética e ecológica de *Stylosanthes macrocephala* determinadas por RAPD e SIG. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40: 899–909. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2005000900010>
- Blount, A. y Acuña, C.A. 2009. Bahiagrass. In: Singh R.J. (Ed.), *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement series: Forage Crops*, vol 5. CRC press Boca Raton, Florida, pp. 81–101
- Bray, R., y Hutton, E. 1976. Plant breeding and genetics. In: Shaw N. H. y Bryan W. W. (Eds.), *Tropical pasture research: Principles and methods*. Farham Royal, UK: CAB International, pp. 338–353.
- Brown, S. M.; Harrisson, K. A.; Clarke, R. H.; Bennett, A. F. y Sunnucks, P. 2013. Limited population structure, genetic drift and bottlenecks characterise an endangered bird species in a dynamic, fire-prone ecosystem. *PloS one*, 8(4): e59732. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059732>
- Burkart, A. 1943. Las Leguminosas Argentinas Silvestres y Cultivadas. 1ra ed. ACME Agency, Buenos Aires, 21pp.
- Cajade, R.; Medina, W. A.; Salas, R. M.; Fandiño, B.; Paracampo, A. H.; Garcia, I. D., ... y Álvarez, B. B. 2013. Las islas rocosas del Paraje Tres Cerros: un refugio de biodiversidad en el litoral mesopotámico argentino. *Biológica*, 16: 147-159.
- Caruso, G.; Broglia, V. y Pocovi, M. 2015. Diversidad genética. Importancia y aplicaciones en el mejoramiento vegetal Genetic diversity. Importance and applications in plant breeding. *Lhawet*, 45 (1): 45-50.

Chandra, A.; Pathak, P.S. y Bhatt, R.K. 2006. *Stylosanthes* research in India: Prospects and challenges ahead. *Current Science*, 90: 915-921. <http://www.jstor.org/stable/24091946>.

Chandra, A.; Tiwari, K.; Nagaich, D.; Dubey, N.; Kumar, S. y Roy, A.K. 2011. Development and characterization of microsatellite markers from tropical forage *Stylosanthes* species and analysis of genetic variability and cross-species transferability. *Genome*, 54: 1016-1028. <https://doi.org/10.1139/g11-064>

Consoli, L.; Vieira, M.L.C.; Lopes de Souza, C.Jr. Y Garcia, A.A.F. 1996. Tissue culture effects on quantitative traits in *Stylosanthes guianensis* (Leguminosae). *Brazilian Journal of Genetics*, 19 (3): 469-474.

Costa, J.C.; Fracetto, G.G.M.; Fracetto, F.G.C.; Souza, T.C.; Santos, M.V.F. y Lira Júnior, M.A. 2018. Genetic diversity in natural populations of *Stylosanthes scabra* using ISSR markers. *Genetic and Molecular Research*, 17 (1): gmr18219 <https://doi.org/10.4238/gmr16039866>

Costa, N. 2006. Revisão do gênero *Stylosanthes*. PhD, Universidad Técnica de Lisboa, Portugal.

Cullings, K.W. 1992. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology*, 1: 233-240. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1992.tb00182.x>

Davies, D.K.; Ilavajhala, S.; Wong, M.M. y Justice, C.O. 2008. Fire information for resource management system: archiving and distributing MODIS active fire data. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing*, 47(1): 72-79. [10.1109/TGRS.2008.2002076](https://doi.org/10.1109/TGRS.2008.2002076)

Deminicis, B.B.; Vieira, H.D.; Araújo, S.A.C.; Jardim, J.G.; Pádua, F.T. y Neto, A.C. 2009. Dispersão natural de sementes: importância, classificação e sua dinâmica nas pastagens tropicais. *Archivos de zootecnia*, 58(224): 35-58. <https://doi.org/10.21071/az.v58i224.5073>

Doyle, J.J. y Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19 (1): 11-15.

Edye, L.A. 1987. Potential of *Stylosanthes* for improving tropical grasslands. *Outlook on Agriculture*, 16: 124–130. <https://doi.org/10.1177/003072708701600305>

Evanno, G.; Regnaut, S. y Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14 (8): 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>

Excoffier, L.; Smouse, P.E. y Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data, *Genetics* 131 (2): 479–491. <https://doi.org/10.1093/genetics/131.2.479>

Falush, D.; Stephens, M. y Pritchard, J.K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies, *Genetics*, 164 (4): 1567–1587. <https://doi.org/10.1093/genetics/164.4.1567>

Fidelis, A.; Daibes, L.F. y Martins, A.R. (2016). To resist or to germinate? The effect of fire on legume seeds in Brazilian subtropical grasslands. *Acta Botanica Brasilica*, 30: 147-151. <https://doi.org/10.1590/0102-33062015abb0187>

FIRMS - NASA's Fire Information for Resource Management System, s.f. Recuperado en 01 de diciembre, 2022 extraído de <https://firms.modaps.eosdis.nasa.gov/map/#d:24hrs;@0.0,0.0,3z>

Gardener, C.J. 1984 The dynamics of *Stylosanthes* pastures. In: Stace H. M. y Edye L. A. (Eds), *The Biology and Agronomy of Stylosanthes*. Academic Press, Sydney. pp. 333–357.

Gardener, C.J. 1980. Tolerance of perennating *Stylosanthes* plants to fire. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, 20(106): 587-593 <https://doi.org/10.1071/EA9800587>

Gardener, C.J. 1993. The colonization of a tropical grassland by *Stylosanthes* from seed transported in cattle faeces. *Australian Journal of Agricultural Research*, 44(2): 299-315 <https://doi.org/10.1071/AR9930299>

Gardener, C.J.; Megarry, R.G. y McLeod, M.N. 1982. Seasonal changes in the proportion and quality of plant parts of nine *Stylosanthes* lines. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 22 (119): 391-401. <https://doi.org/10.1071/EA9820391>

Gates, D.; Jackson, B. y Schoville, S.D. 2021. Impacts of fire on butterfly genetic diversity and connectivity. *Journal of Heredity*, 112(4): 367-376. <https://doi.org/10.1093/jhered/esab027>

Giglio, L.; Randerson, J.T. y Van Der Werf, G.R. 2013. Analysis of daily, monthly, and annual burned area using the fourth-generation global fire emissions database (GFED4). *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 118(1): 317-328. <https://doi.org/10.1002/jgrb.20042>

Glatzle, A. 1999. Compendio para el manejo de pasturas en el Chaco. El Lector, Asunción, 156 pp

Hoffmann, W.A.; Orthen, B. y Do Nascimento, P.K.V. 2003. Comparative fire ecology of tropical savanna and forest trees. *Functional Ecology*, 17: 720-726. <https://www.jstor.org/stable/3599243>

Jiang, C.S.; Ma, X.R.; Zhou, D.M. y Zhang, Y.Z. 2005. AFLP analysis of genetic variability among *Stylosanthes guianensis* accessions resistant and susceptible to the stylo anthracnose. *Plant breeding*, 124(6): 595-598. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2005.01168.x>

Jones, R.M.; McDonald, C.K.; Clements, R.J. y Bunch, G.A. 2000 Sown pastures in subcoastal south-eastern Queensland: pasture composition, legume persistence and cattle liveweight gain over 10 years. *Tropical Grasslands*, 34: 21-37.

Karia, C.T.; de Andrade, R.P.; Fernandes, C.D. y M.Schunke, R. 2010. O gênero *Stylosanthes*. In: da Fonseca D.M y Martuscello J. A. (Eds.), *PlantasForrageiras*. UFV, Viçosa, Minas Gerais, pp. 366-401

Kazan, K.; Manners, J.M. y Cameron, D.F. 1993. Genetic relationships and variation in the *Stylosanthes guianensis* species complex assessed by random amplified polymorphic DNA. *Genome*, 36: 43-49. <https://doi.org/10.1139/g93-006>

Kurtz, D.B. y Barrios, R.A. 2020. Las quemas y los incendios en la provincia de Corrientes. Ediciones INTA.

Legendre, P. y Legendre, L. 1998. Numerical ecology, 2da ed. Elsevier Science, Amsterdam, 853 pp.

Lucas-Borja, M.E.; Ahrazem, O.; Candel-Pérez, D.; Moya, D.; Fonseca, T.; Tecles, E.H., ... y Gómez-Gómez, L. 2016. Evaluation of fire recurrence effect on genetic diversity in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) stands using Inter-Simple Sequence Repeat profiles. *Science of the Total Environment*, 572: 1322-1328. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.105>

Lynch, M. y Milligan, B. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3 (2): 91-99. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1994.tb00109.x>

Maass, B. y Sawkins, L. 2004. History, relationships and diversity among *Stylosanthes* species of commercial significance. In: Chakraborty S (Ed.), *High-yielding anthracnose-resistant Stylosanthes for agricultural systems* Monograph No. 111 Australian Centre for International Agricultural Research.. Canberra, pp:12-26.

MacDougall, A.S.; McCann, K.S.; Gellner, G. y Turkington, R. 2013. Diversity loss with persistent human disturbance increases vulnerability to ecosystem collapse. *Nature*, 494(7435): 86-89. <https://doi.org/10.1038/nature11869>

Maquia, I.; Ribeiro, N.S.; Silva, V.; Bessa, F.; Goulao, L.F. y Ribeiro, A.I. 2013. Genetic diversity of *Brachystegia boehmii* Taub. and *Burkea africana* Hook. f. across a fire gradient in Niassa National Reserve, northern Mozambique. *Biochemical Systematics and Ecology*, 48: 238-247. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.12.020>

Miles, J.W. 1985. Evaluation of potential genetic marker traits and estimation of out-crossing rate in *Stylosanthes guianensis*. *Australian Journal of Agricultural Research*, 36: 259-265. <https://doi.org/10.1071/AR9850259>

Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. 2020. El NEA, con sequía y excepcional bajante de los ríos | Servicio Meteorológico Nacional. (smn.gob.ar)

MODIS Collection 61 NRT Hotspot / Active Fire Detections MCD14DL distributed from NASA FIRMS. Available on-line <https://earthdata.nasa.gov/firms>. doi:10.5067/FIRMS/MODIS/MCD14DL.NRT.0061

Muir J.P.; Pitman, W.D.; Dubeux, J.C. y Foster, J.L. 2014. The future of warm-season, tropical and subtropical forage legumes in sustainable pastures and rangelands. *African Journal of Range and Forage Science*, 31: 187–198. <https://doi.org/10.2989/10220119.2014.884165>

Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the EEUU*, 70: 3321-3323. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3321>

NRT VIIRS 375 m Active Fire product VJ114IMGTDL_NRT distributed from NASA FIRMS. Available on-line <https://earthdata.nasa.gov/firms>. doi:10.5067/FIRMS/VIIRS/VJ114IMGT_NRT.002

Orr, D.M. 2008. Grazing management influences the dynamics of populations of *Stylosanthes hippocampoides* (Oxley fine stem stylo). *Tropical Grassland*, 42(4): 193-201.

Pausas, J.G.; Bradstock, R.A.; Keith, D.A. y Keeley, J.E. 2004. Plant functional traits in relation to fire in crown-fire ecosystems. *Ecology*, 85(4): 1085-1100. <https://doi.org/10.1890/02-4094>

Peakall, R.O.D. y Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6 (1): 288-295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>

Pizzio, R. y Bendersky, D. 2018. Base forrajera y su potencial de mejora en el NEA. In: Sampedro D. (Ed). *Cría Vacuna en el NEA*. INTA ediciones, Buenos Aires, pp 19-40.

Pritchard, J.K.; Stephens, M. y Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155 (2): 945-959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>

QGIS DEVELOPMENT TEAM. 2018. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>

R Core Team. 2020. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Core Team.

Rajora, O.P. y Pluhar, S.A. 2003. Genetic diversity impacts of forest fires, forest harvesting, and alternative reforestation practices in black spruce (*Picea mariana*). *Theoretical and applied genetics*, 106 (7): 1203-1212. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1169-9>

Ramesh, C.R.; Mal, B.; Hazara, C.R.; Sukanya, D.H.; Ramamurthy, V. y Chakraborty, S. 1997. Status of *Stylosanthes* development in other countries. III. *Stylosanthes* development and utilization in India. *Tropical Grassland*, 31: 467-475.

Rao, I.; Peters, M.; Castro, A.; Schultze-kraft, R.; White, D.; Fisher, D.; ... y Rudel, T. 2015. Livestockplus: the sustainable intensification of forage-based agricultural systems to improve livelihoods and ecosystem services in the tropics. *Tropical Grassland*, 3: 59–82.

Rimieri P.; Schneiter, J.O. y Carrete, J.R. 2002. Producción primaria, mejoramiento y calidad: pasturas cultivadas de la región pampeana húmeda. Idia XXI: *Revista de información sobre investigación y desarrollo agropecuario*, 2 (2): 19-22.

Salinero, E.C. 2009. Detección y análisis de incendios forestales desde satélites de teledetección. *Revista Real Academia de Ciencias Exactas Físicas y Naturales*, 103: 173-182.

Sampedro, D.; Barbera, P.; Bendersky, D.; Calvi, M.; Cetrá, B.; Flores, A.; ... y Sarmiento, N. 2018. Cría vacuna en el NEA. Ediciones INTA, Buenos Aires. 249 pp.

Santos-Garcia, M.O.; Karia, C.T.; Resende, R.M.S.; Chiari, L.; Vieira, M.L.C.; Zucchi, M.I. y Souza, A.P. 2012. Identification of *Stylosanthes guianensis* varieties using molecular genetic analysis. *AoB Plants*. 2012: pls001. <https://doi.org/10.1093/aobpla/pls001>

Santos-Garcia, M.O.; Resende, R.M.S.; Chiari, L.; Zucchi, M.I. y Souza, A.P. 2011. Mating systems in tropical forages: *Stylosanthes capitata* Vog. and *Stylosanthes guianensis* (Aulbl.) Sw. *Euphytica*, 178: 185–193. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0293-x>

Saucedo, G.; Ybarra, D. y Barrios, R. 2022a. Determinación de la Superficie Quemada por Incendios en la Provincia de Corrientes, basado en el Índice Normalizado de Área Quemada (NBR). Grupo de Recursos Naturales – EEA- INTA-Corrientes. Informe técnico (26 de enero de 2022).

Saucedo, G.; Perucca, A.R.; Ybarra, D. y Kurtz, D. 2022b. Determinación del área quemada en Corrientes según coberturas vegetales. Grupo de Recursos Naturales – EEA- INTA-Corrientes. Informe técnico (02 de febrero de 2022).

Saucedo, G.; Perucca, A.R. y Kurtz, D. 2022c. Informe técnico: Evolución de las áreas quemadas en Corrientes según coberturas vegetales. Grupo de Recursos Naturales – EEA- INTA-Corrientes. Informe técnico (11 de febrero de 2022)

Saucedo, G.; Perucca, A.R. y Kurtz, D. 2022d. Informe técnico INTA: Evolución de las áreas quemadas en Corrientes según coberturas vegetales. Grupo de Recursos Naturales – EEA- INTA-Corrientes. Informe técnico (18 de febrero de 2022).

Saucedo, G.I.; Perucca, A.R. y Kurtz, D.B. 2023. Las causas de los incendios de principios del año 2022 en la provincia de Corrientes. *Ecología Austral*, 33(1): 273-284. <https://doi.org/10.25260/EA.23.33.1.0.2020>

Sawkins, M.C.; Maass, B.L.; Pengelly, C.; Newbury, H.J.; Ford-Lloyd, B.V.; Maxted, N. y Smith, R. 2001. Geographical patterns of genetic variation in two species of *Stylosanthes* Sw. using amplified fragment length polymorphism. *Molecular Ecology*, 10: 1947–1958. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01347.x>

Segarra-Moragues, J.G. y Ojeda, F. 2010. Postfire response and genetic diversity in *Erica coccinea*: connecting population dynamics and diversification in a biodiversity hotspot. *Evolution*, 64(12): 3511-3524. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.01064.x>

Servicio Meteorológico Nacional. 2020. Informe especial por déficit de lluvias en la región noreste de argentina. Informe_especial (smn.gob.ar)

Shannon, C.E. y Weaver, W. 1949. The mathematical theory of communication. University of Illinois Press. *Urbana*, 117: 104-107.

Silvestri, M.C.; Acuña, C.A. y Lavia, G.I. 2020a. Chromosome number of *Stylosanthes* species - IAPT/IOPB 33. *Taxon*, 69(6): E51-E52. <https://doi.org/10.1002/tax.12414>

Silvestri, M.C.; Acuña, C.A.; Moreno, E.M.S.; Garcia, A.V.; Vanni, R.O. y Lavia, G.I. 2020b. Patterns of genetic diversity and potential ecological niches of *Stylosanthes* species from northeastern Argentina. *Crop Science*, 60: 1436–1449. <https://doi.org/10.1002/csc2.20117>

Smichowski, H.; Montiel, M.R.; Romero, V.; Kowalewsk, M. y Contreras, F.I. 2021. Evaluación de incendios en áreas periurbanas de la ciudad de Corrientes (Argentina) durante la sequía extrema del año 2020. *Papeles de Geografía*, 67: 151-167. <https://doi.org/10.6018/geografia.486441>

Suárez, N.M.; Betancor, E.; Fregel, R.; Rodríguez, F. y Pestano, J. 2012. Genetic signature of a severe forest fire on the endangered Gran Canaria blue chaffinch (*Fringilla teydea polatzeki*). *Conservation Genetics*, 13: 499-507. <https://doi.org/10.1007/s10592-011-0302-1>

Sutherst, R. W.; Wilson, L.J.; Reid, R. y Kerr, J.D. 1988. A survey of the ability of tropical legumes in the genus *Stylosanthes* to trap larvae of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Ixodidae). *Australian Journal of experimental Agriculture*, 28(4): 473-479. <https://doi.org/10.1071/EA9880473>

Tropical Forages (s.f.) *Stylosanthes guianensis* var. *intermedia*. Recuperado el 02 de octubre, 2023 de https://www.tropicalforages.info/text/entities/stylosanthes_guianensis_var_intermedia.htm#

Turchetto Zolet, A.C.; Turchetto, C.; Martini Zanella, C. y Passaia, G. 2017. Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 181 pp.

Uchiyama, K.; Goto, S.; Tsuda, Y.; Takahashi, Y. y Ide, Y. 2006. Genetic diversity and genetic structure of adult and buried seed populations of *Betula maximowicziana* in mixed and post-fire stands. *Forest ecology and management*, 237(1-3): 119-126. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2006.09.037>

Vander Stappen, J.; Van Campenhout, S.; Gama Lopez, S. y Volckaert, G. 1998. Sequencing of the internal transcribed spacer region ITS1 as a molecular tool detecting variation in the *Stylosanthes guianensis* species complex. *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 869-877. <https://doi.org/10.1007/s001220050814>

Vanni, R.O. 2017. The genus *Stylosanthes* (Leguminosae - Dalbergiaeae) in South America. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 52(3): 549-585. <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v52.n3.18033>

Wilcoxon F. 1950. Some rapid approximate statistical procedures. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 52 (6):808-814

Worth, J.R.; Jordan, G.J.; Marthick, J.R.; Sakaguchi, S.; Colhoun, E.A.; Williamson, G.J., ... y Bowman, D.M. 2016. Fire is a major driver of patterns of genetic diversity in two co-occurring Tasmanian palaeoendemic conifers. *Journal of Biogeography*, 44(6): 1254-1267. <https://doi.org/10.1111/jbi.12919>

Anexo

Anexo 1: Resultados de los test de normalidad de ambas poblaciones (para los dos años 2016 y 2022) de los de Índices de Shannon y heterocigosis por *locus* normal.

Datos	W (estadístico)	Valor p
Índice de Shannon		
ASI 2016	0.70263	3.437e-15
ASI 2022	0.6383	2.201e-10
TC 2016	0.64959	2.2e-16
TC 2022	0.67287	8.525e-10
Heterocigosis esperada		
ASI 2016	0.69903	2.772e-15
ASI 2022	0.63773	2.154e-10
TC 2016	0.64353	2.2e-16
TC 2022	0.68233	1.256e-09

- Hipótesis nula: las muestras siguen una distribución normal
- Hipótesis alternativa: las muestras siguen una distribución diferente a la normal

En todos los casos $W < 1$, lo que indica que los datos se desvían de una distribución normal perfecta, además el valor p es extremadamente pequeño (valor de significancia 0,05). Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que los datos se desvían significativamente de una distribución normal.

Anexo 2: Script utilizado para análisis estadísticos en R studio

```
#Abro directorio
setwd ("C:/Users/Julieta/Desktop/Plan tesina Julieta/COMPARACIONES 2016vs2022")
#Llamo a mis tablas
ASI2016<-read.csv(file = "ASI2016.csv", sep = ";", dec = ",", header = TRUE, stringsAsFactors = T, fileEncoding="UTF-8-BOM")
View(ASI2016)
str(ASI2016)
ASI2022<-read.csv(file = "ASI2022.csv", sep = ";", dec = ",", header = TRUE, stringsAsFactors = T, fileEncoding="UTF-8-BOM")
View(ASI2022)
str(ASI2022)
#nombro a la columna que me interesa (primero I, y después He)
I1<- ASI2016[,3]
I2<-ASI2022[,3]
```

```

He1<-ASI2016[,4]
He2<-ASI2022[,4]
# Histograma con detalles varios
hist(I1, col="red", xlab="Variable Respuesta", ylab="Frecuencia", main="Histograma I por locus")
hist(I2, col="red", xlab="Variable Respuesta", ylab="Frecuencia", main="Histograma I por locus")
hist(He1, col="red", xlab="Variable Respuesta", ylab="Frecuencia", main="Histograma He por locus")
hist(He2, col="red", xlab="Variable Respuesta", ylab="Frecuencia", main="Histograma He por locus")
#Modo gráfico. Si queremos saber si una variable tiene distribución normal, podemos comparar los valores
de los percentiles entre la distribución incógnita y la distribución normal estándar, y trazamos la recta de
referencia mediante las siguientes sentencias.
qqnorm(I1)
qqline(I1, col="red", lwd=10)
qqnorm(I2)
qqline(I2, col="red", lwd=10)
qqnorm(He1)
qqline(He1, col="red", lwd=10)
qqnorm(He2)
qqline(He2, col="red", lwd=10)
#Hago pruebas Formales de Normalidad
shapiro.test(I1)
shapiro.test(I2)
shapiro.test(He1)
shapiro.test(He2)
##NO TIENEN DISTRIBUCIÓN NORMAL, ENTONCES HAGO WILCOX.TEST

#Wilcox test
wilcox.test(I1,I2)
wilcox.test(He1,He2)

```