



Análisis de los sistemas reproductivos en dos especies de *Arachis* de Corrientes, recursos genéticos claves para el mejoramiento del maní.



Pérez, Gimena Abril



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

Licenciatura en Ciencias Biológicas

**Análisis de los sistemas reproductivos en dos especies de *Arachis* de Corrientes,
recursos genéticos claves para el mejoramiento del maní.**

Alumna: Pérez, Gimena Abril

Director: Seijo, José Guillermo

Co-directora: García, Alejandra Vanina

**Genética Evolutiva Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura UNNE y Laboratorio
de Citogenética y Evolución Vegetal, Instituto de Botánica del Nordeste**

(IBONE – UNNE - CONICET)



2025|

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), en especial a los profesores que me acompañaron estos años y al Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) por darme un espacio de trabajo y apoyo para formarme como profesional.

A mis directores, Seijo y Ale por formarme y guiarme en gran parte de mi desarrollo académico y profesional. Su compromiso, calidez humana, paciencia y correcciones a las madrugadas fueron esenciales para confirmar mi vocación por esta carrera y al profesional que aspiro ser.

A Germán, profe de la facultad, por su constante predisposición y apoyo desinteresado hacia los estudiantes. Su compromiso con la enseñanza, su dedicación más allá de las obligaciones formales han sido una gran inspiración.

A mis padres, Daniela y Javier, abuelos y toda mi familia por la confianza y el apoyo durante todos mis años de carrera. Gracias por celebrar cada avance conmigo y por los sacrificios silenciosos que hicieron posible llegar hasta acá.

A mi compañero, Lucas, por alentarme desde el primer día a nunca bajar los brazos con amor y paciencia, por ser mi soporte emocional en este camino.

A mi amigo Seba, con quien compartí parte de mi infancia y ahora vida adulta, por siempre estar presente en todos los momentos importantes. A todos los amigos que formaron parte, en especial a Tiago S., gracias por recordarme que podía.

A los grandes amigos y compañeros que formé durante mi carrera, Mechi, Gonza M., Felipe, Juan, Gonza L., Cami, Nahue, Giuli, Zoel, Luciano, Juli y Nilson, pero sobre todo a Tiago G, por los años a la par y por motivarme a seguir.

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
Importancia del maní y su problema	7
Las especies de la sección <i>Arachis</i> como recursos genéticos del maní	7
Elección de las especies de <i>Arachis</i> para el estudio	11
1.1. Objetivo general	12
1.2. Objetivos particulares	12
1.3. Hipótesis de trabajo y predicciones.....	12
2. MATERIALES Y MÉTODOS	12
2.1. Materiales	12
2.2. Observaciones en poblaciones naturales	14
2.3. Observaciones en materiales cultivados ex situ	14
2.3.1. Morfología de la flor	14
2.4. Relación Polen – Óvulo.....	16
2.5. Apertura de anteras.....	17
2.6 Receptividad del Estigma	17
2.7. Ensayos de Reproducción en invernáculo por autogamia espontánea y artificial.....	17
3. RESULTADOS	19
3.1 Observaciones <i>in situ</i> en poblaciones naturales	19
3.2. Observaciones en materiales cultivados <i>ex situ</i>	21
3.2.1. Morfología de la flor.....	21
3.2.2. Relación Polen – Óvulo.....	26
3.2.3. Apertura de anteras.....	26
3.2.4. Receptividad del Estigma	27
3.2.5. Experimentos de Reproducción en Invernadero por autogamia espontánea y artificial.....	27
4. DISCUSIÓN.....	29
5. CONCLUSIÓN.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Localidades y coordenadas geográficas de los sitios de muestreo de las especies de <i>Arachis</i> .	12
Tabla 2. Detalle de las fechas, horarios y estadios de desarrollo (botón floral y flor abierta) de las muestras tomadas en poblaciones naturales de <i>A. correntina</i> y <i>A. villosa</i> .	13
Tabla 3. Principales polinizadores, frecuencia de visita y densidad floral en poblaciones naturales.	21
Tabla 4. Medidas de los caracteres florales en botón floral.	23
Tabla 5. Medidas de los caracteres florales en flor abierta.	24
Tabla 6. Contribución de los caracteres morfológicos a los CP1 y CP2 del Análisis de Componentes Principales de flores abiertas.	25
Tabla 7. Estimación de la exhibición floral conjunta en especies de <i>Arachis</i> .	26
Tabla 8. Relación polen/óvulo (P/O).	26
Tabla 9. Resultados de la determinación del horario de apertura de las anteras.	26
Tabla 10. Resultados del análisis de receptividad estigmática mediante la prueba de Osborn.	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Área de distribución de las especies de la sección y género <i>Arachis</i> .	8
Figura 2. Flor papilionoidea del género <i>Arachis</i> .	10
Figura 3. Sitios de muestreo e individuos de <i>A. correntina</i> y <i>A. villosa</i> .	13
Figura 4. Caracteres morfológicos medidos en flores y botones disectadas de <i>A. correntina</i> y <i>A. villosa</i> .	15
Figura 5. Ensayos de reproducción en invernáculo por autogamia espontánea y acción manual del sistema alas y quilla (<i>tripping</i>).	18
Figura 6. Características florales y reproductivas de <i>A. correntina</i> .	19
Figura 7. Características florales y reproductivas de <i>A. villosa</i> .	21
Figura 8. Detalles de la porción distal del estilo y del estigma en botón floral de <i>A. correntina</i> y <i>A. villosa</i> .	23
Figura 9. Heatmap de los caracteres morfométricos de botón floral y flores abiertas.	24
Figura 10. Análisis de Componentes Principales basado en caracteres morfológicos de las flores.	25
Figura 11. Dinámica de floración y elongación de ginóforos en <i>A. correntina</i> observadas en condiciones de invernáculo para el control autogamia.	28
Figura 12. Dinámica de floración y elongación de ginóforos en <i>A. villosa</i> observadas en condiciones de invernáculo para el control autogamia.	28
Figura 13. Eficiencia reproductiva de <i>A. correntina</i> y <i>A. villosa</i> bajo dos pruebas de control autogamia y autopolinización manual en condiciones controladas.	29
Figura 14. Disposición de las anteras pequeñas en distintos estadios del desarrollo floral de <i>Arachis</i> .	33

RESUMEN

Las especies silvestres *Arachis correntina* y *A. villosa* forman parte de la flora nativa de la provincia de Corrientes y presentan alelos con gran potencial para la introgresión de genes al maní cultivado. Aunque tradicionalmente se ha asumido que las especies del género son autógamas, estudios recientes muestran diferencias en la heterocigosis y la estructuración genética. Asimismo, observaciones indican que *A. correntina* presenta dificultades para producir semillas cuando es cultivada en ausencia de insectos polinizadores, mientras que *A. villosa* produce semillas abundantemente tanto en invernáculo como en campo. El conjunto de antecedentes sugiere que ambas especies difieren en sus sistemas reproductivos: *A. correntina* posee un sistema compatible con la alogamia, mientras que *A. villosa* es predominantemente autógama, sin embargo, el conocimiento acerca de su biología floral es limitado. Por lo tanto, para comprender mejor la diversidad reproductiva dentro del género, en este trabajo se evaluaron aspectos ecológicos, morfológicos y funcionales de estas especies.

Las observaciones en poblaciones naturales revelaron que *A. correntina* presenta una elevada exhibición floral (densidad de flores, tamaño de la corola y longitud del hipantio) y una mayor actividad de insectos polinizadores, que activan repetidamente el mecanismo de alas y quilla (realizando tripping). En cuanto a *A. villosa*, los resultados de exhibición floral indican una reducción de las estructuras de atracción floral, típico en especies principalmente autógamas. Estos resultados constituyen el primer registro de rasgos de presentación floral asociados a una mayor atracción a polinizadores en *Arachis correntina*, indicando un sistema reproductivo compatible con la alogamia. Asimismo, se documenta por primera vez la actividad de polinizadores nativos pertenecientes a diversos grupos taxonómicos, además de *Apis mellifera*, evidenciando que ambas especies reciben visitas, aunque en *A. correntina* con mayor frecuencia.

Los análisis de funcionalidad floral mostraron que ambas especies presentan protoginia parcial y hercogamia, aunque con consecuencias reproductivas distintas. La morfología estigmática de *A. villosa* —superficie amplia, retrorsa y expuesta— favorece el contacto con el polen propio incluso en ausencia de polinizadores, potenciando la autopolinización. En contraste, en *A. correntina*, el estigma pequeño y protegido por papilas periestigmáticas, reduce la probabilidad de autopolinización espontánea. El mecanismo de desplazamiento de las anteras pequeñas por elongación de los filamentos funciona como un émbolo floral en ambas especies, pero en *A. correntina* este proceso deposita polen principalmente en el cepillo estilar, facilitando su transferencia al cuerpo del polinizador, mientras que en *A. villosa* puede promover directamente la autofecundación.

Por último, los ensayos en condiciones controladas confirman que *A. villosa* presenta alta eficiencia de autogamia, mientras que *A. correntina* no forma ginóforos por autopolinización espontánea. La baja eficiencia del tripping manual sugiere que este movimiento de alas y quilla solo reproduce parcialmente las condiciones creadas por los polinizadores durante el contacto con la flor. Por lo tanto, la intervención de los polinizadores es necesaria para una transferencia polínica efectiva, especialmente en *A. correntina*. Estos resultados sugieren que ambas especies utilizan estrategias reproductivas contrastantes: *A. villosa* depende principalmente de la autogamia, mientras que *A. correntina* parece requerir de polinizadores para alcanzar el éxito reproductivo. Estas diferencias tienen implicancias directas en estrategias de conservación y programas de premejoramiento, ya que la dependencia de polinizadores, la exhibición floral y funcional de la flor influyen en la estructura genética, la variabilidad y la eficiencia reproductiva de las especies silvestres de *Arachis*.

1. INTRODUCCIÓN

Importancia del maní y su problema

El maní (*Arachis hypogaea* L.) es un cultivo industrial de gran importancia mundial, con 27,9 millones de hectáreas cultivadas y una producción anual de 47,1 millones de toneladas. Asia concentra el 62,5 % de la producción (China 36,3 % e India 19,5 %), seguida por África (26,1 %) y América (11,3 %) (FAOSTAT, 2019). Argentina ocupa el séptimo lugar mundial, aportando el 3 % de la producción global (FAOSTAT, 2024), aunque es el primer exportador mundial con aproximadamente 1 millón de toneladas anuales (Cámara Argentina del Maní, 2025). El maní se destaca como fuente de aceite vegetal, proteínas y compuestos bioactivos como resveratrol, flavonoides y fitosteroles (Settaluri *et al.* 2012; Arya *et al.* 2016).

Arachis hypogaea es un alopoliploide segmentario (AABB, $2n = 4x = 40$; Husted 1936; Fernández y Krapovickas 1994) originado por hibridación entre *A. duranensis* Krapov. y W.C.Greg. (subgenoma A) y *A. ipaënsis* Krapov. y W.C.Greg. (subgenoma B), seguida de duplicación cromosómica (Seijo *et al.* 2004, 2007). Este evento único habría ocurrido hace 10.000 a 15.000 años, posiblemente facilitado por el transporte humano de *A. ipaënsis* desde la Chiquitanía boliviana al área de distribución de *A. duranensis* (Bertioli *et al.* 2019, 2020). A partir de este origen único, el maní ha sido domesticado y luego diversificado en diversos agroecosistemas de Sudamérica, dando origen a dos subespecies, seis variedades botánicas y cientos de razas locales.

Aunque morfológicamente diverso, el maní cultivado es susceptible a diversas enfermedades fúngicas como roya, viruela y patógenos del suelo (*Thecaphora frezii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*) y a diversas plagas como araña y trips (Holbrook y Stalker 2003; de Blas *et al.* 2021; Rosso *et al.* 2023). La reducción de la base genética, producto de la domesticación, autogamia y del uso reiterado de pocos materiales del germoplasma primario para el desarrollo de variedades élite, ha limitado la obtención de variedades comerciales resistentes a estreses bióticos y abióticos (Holbrook y Stalker 2003; Ren *et al.* 2014). Por el contrario, las especies silvestres del género *Arachis* L. son genéticamente diversas y constituyen fuentes clave de genes de resistencia y otros caracteres de interés agronómico para el mejoramiento del cultivo (Stalker 2017).

Las especies de la sección *Arachis* como recursos genéticos del maní

El género *Arachis* es endémico de Sudamérica e incluye 83 especies agrupadas en 9 secciones taxonómicas de acuerdo a las características morfológicas, la compatibilidad en cruzamientos interespecíficos y la fertilidad de los híbridos interespecíficos (Krapovickas y Gregory 1994; Valls y Simpson 2005, 2017; Valls *et al.* 2013; Santana y Valls 2015; Seijo *et al.* 2021, 2025). La sección *Arachis* incluye al maní cultivado y a su antecesor silvestre *A. monticola* Krapov. y Rigoni [ambas especies alotetraploides (AABB) con $2n = 40$ (Seijo *et al.* 2018)], junto a 31 especies silvestres diploides (28 con $2n = 20$, tres con $2n = 18$), las que constituyen el acervo genético secundario del maní. Las especies silvestres se distribuyen desde el límite sur de la región Amazónica hasta el Río de la Plata, y desde las primeras estribaciones de los Andes hasta el Océano Atlántico (Fig. 1). Viven en la mayor parte de los ambientes tropicales y subtropicales húmedos y abiertos, en una amplia variedad de suelos y comunidades vegetales (Krapovickas y Gregory 1994; Valls y Simpson 2005; Bertioli *et al.* 2011). En Argentina viven seis especies silvestres, cuatro de la sección *Arachis*, dos de ellas, *A. duranensis* y *A. monticola* en el NOA, mientras que las otras dos *A. correntina* (Burkart) Krapov. y W.C.Greg. y *A. villosa* Benth en el NEA.

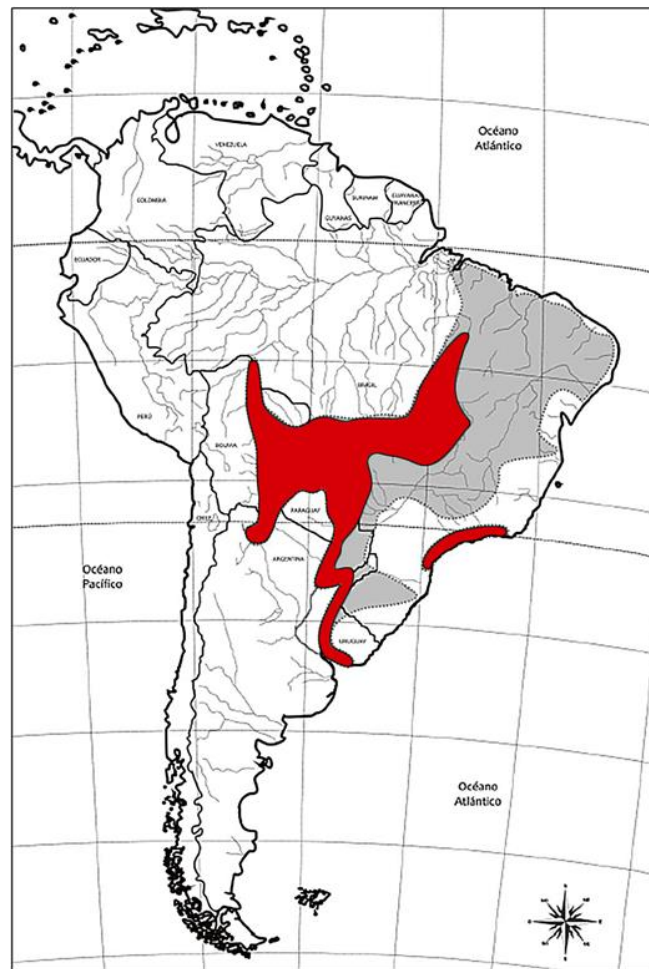


Figura 1. Área de distribución de las especies de la sección *Arachis* (rojo). en gris se muestra la distribución del género *Arachis*. Figura adaptada a partir de Krapovickas y Gregory (1994).

Las especies de la sección *Arachis* muestran una amplia variabilidad en cuanto a sus requerimientos ecológicos, pero también en cuanto a su constitución genómica. Hasta el momento se han descrito seis tipos genómicos en base a la cruzabilidad de las mismas y sus caracteres cromosómicos y genómicos (Stalker 1991; Robledo y Seijo 2008, 2010; Robledo *et al.* 2009; Silvestri *et al.* 2015; Seijo *et al.* 2017). Por sus diversas adaptaciones, estas especies constituyen importantes fuentes de alelos para abordar los problemas de susceptibilidad a estreses bióticos y abióticos que presenta el maní a nivel mundial, y en particular de Argentina (Simpson 2001; Seijo *et al.* 2012; Stalker *et al.* 2016; Seijo *et al.* 2018; de Blas *et al.* 2019, Bertioli *et al.* 2021, Rosso *et al.* 2023). Entre ellas, las especies pertenecientes a los genomas A y B, cercanas filogenéticamente al maní, son las mejores candidatas por presentar alta compatibilidad genómica con el cultivo.

Debido a la naturaleza alotetraploide del maní, para la introgresión efectiva de caracteres se requiere generar híbridos intergenómicos por cruzamientos de distintas especies silvestres diploides y el subsecuente desarrollo de anfidioides compatibles con las variedades élite (Simpson 1991, 2001, de Blas *et al.* 2021). Sin embargo, el conocimiento de los sistemas reproductivos de las especies de *Arachis* es aún muy escaso, y hasta el momento, la elección de las especies a cruzar se ha realizado en función

de la presencia de caracteres de interés más que por las eficiencias de cruzabilidad de las mismas. Asimismo, recientes análisis comparativos de cruzamientos interespecíficos han revelado diferencias significativas en la eficiencia de hibridación entre las distintas especies diploides de *Arachis* (García *et al.* 2024, 2025). Sin embargo, el conocimiento disponible sobre la biología reproductiva de las especies del género es aún insuficiente para explicar tales diferencias. Por ello, es de fundamental importancia incrementar el conocimiento de los sistemas reproductivos de las especies para optimizar la selección de parentales y la dirección del cruzamiento a utilizar en el desarrollo de anfidiplóides compatibles con el cultivo.

Sistema reproductivo de *Arachis*

Por analogía con el maní cultivado se ha asumido históricamente que el modo reproductivo predominante en el género es la autogamia (Krapovickas y Gregory 1994). Sin embargo, algunas especies no producen semillas, o lo hacen escasamente cuando se cultivan en invernaderos o cámaras de crecimiento (Banks 1990; Seijo com. pers.). En este sentido, Stalker y colaboradores (2016) registraron que más del 40 % de las accesiones analizadas no desarrollaron ginóforos, y por ende tampoco semillas en cultivo *ex situ*, sugiriendo la existencia de una fuerte limitación para la autopolinización/fecundación o el desarrollo de los embriones por autogamia en múltiples especies.

En cuanto a las flores, las mismas presentan una morfología típica de las leguminosas, que a priori podrían promover la autofecundación (Krapovickas y Gregory 1994). Las flores son sésiles, con hipantio muy desarrollado (de 2-3 cm hasta 10-12 cm) y se presentan en espigas paucifloras axilares dispuestas a lo largo de las ramas o agrupadas en la base de la planta. El cáliz es bilabiado, con el labio superior más ancho, 4-dentado, y el labio inferior falcado, acompañando a la quilla. El estandarte es de 1-2 cm de ancho, amarillo o más frecuentemente anaranjado, con líneas rojas en la cara superior o en la cara inferior o en ambas caras, y a menudo presenta una mácula basal de tonalidad más clara al resto del pétalo. Las alas generalmente son amarillas y la quilla es de color amarillo pálido o blanquecino. La quilla rodea estrechamente a los estambres, la porción distal del estilo y al estigma, que no sobrepasa el extremo distal de la misma (Gregory *et al.* 1973). Las anteras se disponen en dos ciclos, cuatro globosas, dorsifijas, biloculares, alternando con cuatro oblongo-adnatas (Fig. 2), normalmente acompañadas por dos filamentos estériles (Smith 1950). La dehiscencia de las anteras se produce dentro de la quilla (Carvalho da Costa 2012). El ovario se encuentra en la base del hipantio y el estilo presenta en la porción distal abundantes pelos formando un cepillo. Los estigmas estudiados con microscopía electrónica revelaron que la superficie estigmática tiende a ser más extendida en las especies anuales que en las perennes, sugiriendo que dicho carácter podría afectar la cantidad de polen depositado por estigma y, por ende, la frecuencia de autopolinización (Lu *et al.* 1990; Pérez *et al.* 2024).

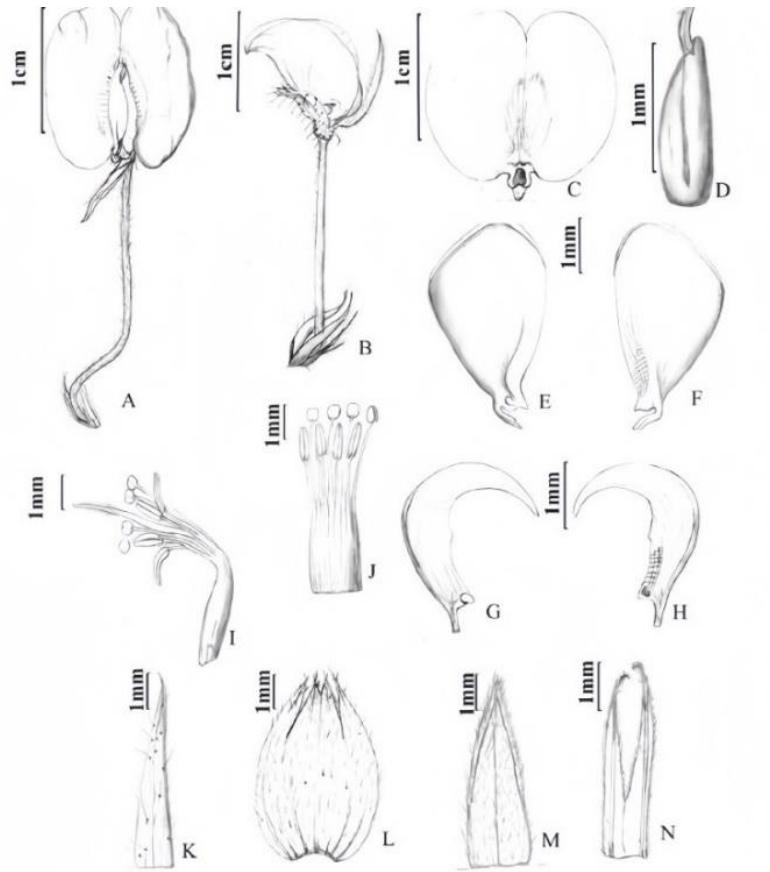


Figura 2. Flor papilionoidea perteneciente a una especie del género *Arachis*. A. Flor. B. Botón floral. C. Estandarte. D. Ovario. E. Ala cara abaxial. F. Ala cara adaxial. G. Pétalo de la quilla, cara ventral. H. Pétalo de la quilla, cara dorsal. I. Androceo con estilo y estigma. J. Androceo abierto. K. Cáliz: diente inferior. L. Cáliz: dientes superiores soldados. M. Bráctea externa. N. Bráctea interna. Figura tomada de Carvalho da Costa, L. (2012).

Si bien se ha propuesto que todas las especies de *Arachis* forman semillas por autofecundación, algunos análisis han documentado la ocurrencia de alogamia con alguna frecuencia. A partir del análisis de segregación de caracteres agronómicos en *A. hypogaea* L. se ha inferido la ocurrencia de hasta un 4 % de alogamia en parcelas cultivadas, fenómeno atribuido a polinización cruzada mediada por abejas (Banks *et al.* 1990). Asimismo, algunos análisis moleculares en *A. pintoi* Krapov. y W.C.Greg. y *A. repens* Handro sugieren la ocurrencia de cierto grado de alogamia (Oliveira y Valls 2003). Por otro lado, en *A. lignosa* (Chod. y Hassl.) Krapov. y Gregory, una especie que produce pocas o ninguna semilla en invernáculo, se ha documentado que los cruzamientos experimentales mejoraron la producción de semillas *ex situ* (Banks 1990). Sin embargo, hasta el momento no se han realizados estudios sistemáticos en poblaciones naturales ni en condiciones controladas que permitan comprender el funcionamiento de los sistemas reproductivos en las especies de *Arachis* y su efecto sobre la eficiencia reproductiva.

Las flores de *Arachis* presentan una morfología similar a la de otras leguminosas papilionoideas que poseen partes móviles especializadas para liberar el polen al ser manipuladas activamente por los polinizadores (Brantjes 1981a, b; Brantjes y De Vos 1981; Cocucci 1989; Córdoba 2011; Sérsic 1991; Edwards *et al.* 2005; Claßen-Bockhoff *et al.* 2004). En este sistema, los órganos fértiles permanecen

ocultos dentro de la quilla. Durante la intervención del polinizador, el mismo ejerce presión sobre los pétalos laterales y ventrales (alas y quilla) de la flor, provocando el descenso de los mismos, mientras el estandarte permanece relativamente inmóvil. Durante esta acción, el peso y la fuerza activa del insecto generan un desplazamiento diferencial del estilo y estigma hacia afuera de la quilla, mecanismo conocido como tripping (Mabin *et al.* 2024). Este movimiento puede, por un lado, favorecer un primer contacto del estigma con el polen de otras flores traídas por el polinizador, y por otro, puede inducir el arrastre del polen hacia afuera de la quilla por el cepillo del estilo, favoreciendo la adhesión de los granos de polen al polinizador (Faegri y van der Pijl 1966; Córdoba y Cocucci 2011). Este arrastre de polen está, a su vez, asociado de forma directa al mecanismo de presentación de polen descrito para papilionoideas, denominado pistón. En dicho mecanismo las pequeñas anteras de los estambres actúan como un pistón que empuja los granos de polen hacia la punta de la quilla (Paulino *et al.* 2016). En consecuencia, durante el tripping, el desplazamiento de las estructuras reproductivas promueve la expulsión de la masa de polen hacia afuera (Etcheverry 2001).

De este modo, aunque *Arachis* comprende especies autocompatibles, la combinación entre tripping y mecanismo de pistón puede favorecer la alogamia, cuya frecuencia depende tanto de la morfología floral como de la disponibilidad de polinizadores en el ambiente (Susó *et al.* 2015).

Elección de las especies de *Arachis* para el estudio

En la provincia de Corrientes viven dos especies silvestres perennes de *Arachis* que presentan alelos con gran potencial para la introgresión de genes de interés al maní cultivado (Stalker 2017). *Arachis correntina* se localiza en el noroeste de la provincia, en las lomadas arenosas comprendidas al Noroeste del Iberá y del Río Corriente y el Río Paraná. Por su parte, *A. villosa*, se distribuye en las dunas y suelos arenosos paralelos al Río Uruguay, al sur de la ciudad de Paso de los Libres, llegando hasta el río de la Plata (Krapovickas y Gregory 1994).

Estudios recientes de análisis de variación poblacional en *A. correntina* han detectado mayor heterocigosis y una estructuración genética más alta que la esperada para especies autóгамas (Moreno *et al.* 2023, 2025). Además, se ha documentado entre curadores de bancos de germoplasma e investigadores (G. Macchi UNA, Paraguay, G. Seijo, UNNE, C. Simpson Texas A&M University, y J.F. Valls CENARGEN, Brasil, com. pers.), que *A. correntina* se encuentra entre las especies que presentan dificultad para producir semillas cuando se cultivan en condiciones libres de insectos, aunque la misma produce semillas en sus ambientes naturales (Seijo com. pers.). Por otro lado, *A. villosa* produce abundante cantidad de semillas tanto en condiciones de invernáculo como en poblaciones naturales. Estas observaciones sugieren que las especies mencionadas presentan sistemas reproductivos diferentes, *A. correntina* con un sistema reproductivo que favorece la alogamia, mientras que *A. villosa* con un sistema reproductivo predominantemente autóгамo (Seijo ined.).

El conjunto de antecedentes, aunque fragmentarios, sugiere que las especies de *Arachis* podrían presentar diferentes estrategias reproductivas que permitirían explicar las diferentes eficiencias reproductivas observadas bajo condiciones controladas. Por lo tanto, en este trabajo se plantea estudiar sistemas reproductivos potencialmente diferentes en especies de *Arachis* tomando como modelo a *Arachis correntina* y *Arachis villosa*. Para ello se plantearon los siguientes objetivos e hipótesis:

1.1. Objetivo general

Inferir los sistemas reproductivos en dos especies silvestres de *Arachis*: *A. correntina* y *A. villosa*, y su influencia en la eficiencia reproductiva como modelos para generar información que permita optimizar estrategias de conservación *in situ* y *ex situ*, y facilitar el desarrollo de anfidiploides clave para el mejoramiento del cultivo de maní.

1.2. Objetivos particulares

1. Analizar la morfología y los aspectos funcionales de las flores de *Arachis correntina* y *A. villosa*.
2. Determinar la frecuencia de autopolinización espontánea y por acción mecánica artificial del sistema de alas y quilla (tripping) en ambientes libres de polinizadores, utilizando como indicador la producción de clavos.
3. Evaluar la presentación de flores y la actividad de polinizadores en poblaciones naturales de estas dos especies.

1.3. Hipótesis de trabajo

H1: Las especies silvestres de *Arachis* presentan diferentes sistemas reproductivos.

H2: Los diferentes sistemas reproductivos están asociados a diferencias morfológicas en los órganos florales y a la presentación de los mismos en la antesis.

H3: Las poblaciones naturales de *Arachis* registran visitas de polinizadores que podrían promover la alogamia.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

En este trabajo se estudiaron individuos de *Arachis correntina* y *A. villosa* en poblaciones naturales de la Provincia de Corrientes (Tabla 1), los cuales fueron coleccionados y cultivados en el invernáculo del Instituto de Botánica del Nordeste (UNNE-CONICET). En cada localidad de muestreo se registraron las coordenadas geográficas correspondientes (Fig. 3).

Tabla 1. Localidades y coordenadas geográficas de los sitios de muestreo de las especies de *Arachis*.

Especie	Localidad	Muestra
<i>Arachis correntina</i>	Camino Ingenio Primer Correntino. Santa Ana, San Cosme:	Muestra A: 27°26'33"S 58°38'25" W Muestra B: 27°26'17"S 58°38'24" W
	Plaza España, Corrientes,	Muestra C: 27°28'1.38"S 58°49'17.41"W
<i>Arachis villosa</i>	Paso de los Libres, Laguna Mansa.	Muestra D: 29°44'11" S 57°06'13" W



Figura 3. Sitios de muestreo e individuos de *A. correntina* y *A. villosa*. A. Ubicaciones geográficas de los sitios de muestreo. B. Ambiente natural de las poblaciones de *A. correntina* y C. *A. villosa*

Para ambas especies se tomaron muestras de las flores en distintos horarios del día y estadios de desarrollo, abarcando desde el estado de botón floral hasta el de flor completamente abierta (Tabla 2). Las muestras fueron rotuladas y fijadas en una solución de formol, alcohol etílico y ácido acético (FAA 5:90:5) o en alcohol etílico 70%.

Tabla 2. Detalle de las fechas, horarios y estadios de desarrollo (botón floral y flor abierta) de las muestras tomadas en poblaciones naturales de *A. correntina* (A, B y C) y *A. villosa* (D).

Especie			<i>A. correntina</i>			<i>A. villosa</i>
Fecha	Hora	Estadio	Muestra A	Muestra B	Muestra C	Muestra D
12/4/2024	07:55	Flor Cerrada			X	
11/4/2024	08:59	Flor Abierta			X	
12/4/2024	09:10	Flor Cerrada	X	X		
4/11/2024	10:45	Flor Abierta				X
11/4/2024	10:55	Flor Abierta			X	
12/4/2024	11:00	Flor Abierta	X	X		
12/4/2024	11:20	Flor Abierta	X	X		
26/9/2024		Flor abierta				X
10/2/2025					X	X
11/4/2024	13:15	Flor Abierta			X	
12/4/2024	13:20	Flor Abierta	X	X		
12/4/2024	13:40	Flor Abierta	X	X		
13/11/2024	14:45	Flor Abierta				X
8/9/2024	18:30	Botón floral			X	
25/11/2024						X
10/2/2025					X	X

2.2. Observaciones en poblaciones naturales

Las observaciones en poblaciones naturales se realizaron durante época de floración (octubre– mayo), en dos áreas de 50 m², para *A. correntina* (Muestra A y B) y tres áreas de 50 m² para el sitio de muestreo de *A. villosa* (Muestra D). En cada área se determinó el número de flores por m² a partir de fotografías tomadas a un metro de altura sobre superficies demarcadas en el campo, las que permitieron individualizar cada flor. Las fotografías para estimación de densidad de flores se tomaron de distintos sectores distribuidos aleatoriamente.

Se registraron las vistas de polinizadores a las flores de *Arachis*, la acción efectiva del mecanismo de alas y quilla por ellos, y la cantidad de flores en las que un mismo insecto accionaba el mecanismo de alas y quillas en un período de cinco minutos dentro de las áreas seleccionadas en cada especie. Asimismo, se documentó el horario de expansión del estandarte de las flores, considerando este evento como el de apertura de las flores, así como el horario de inicio y de cese de las visitas de los insectos a las flores de *Arachis*.

Por otra parte, se examinó la colección Entomológica de Polinizadores del Instituto de Botánica del Nordeste, con el fin de identificar los ejemplares capturados en las flores de las especies nativas

2.3. Observaciones en materiales cultivados ex situ

2.3.1. Morfología de la flor

Para los análisis morfológicos, se utilizaron 15 botones florales de las 18:30 h para ambas especies y 15 flores abiertas del horario de las 13:15 para *A. correntina* y el horario comprendido entre las 10:45 – 13:00 h para *A. villosa* (Tabla 2), fijadas en alcohol al 70% en poblaciones naturales, y se realizaron los siguientes análisis:

2.3.1.1. Tamaño general de la flor: se seleccionaron tres caracteres: **a)** ancho del estandarte, medido en cm (Fig. 4A) **b)** longitud del diente inferior del cáliz, considerada una buena estimación del tamaño final de la flor (Krapovickas y Gregory 1994) (Fig. 4B), y **c)** longitud del hipantio, medida desde la inserción en la espiguilla hasta la base del cáliz (Fig. 4C). El material fue fotografiado con escala y las mediciones se realizaron utilizando el software Fiji (Schindelin *et al.* 2012).

2.3.1.2. Presentación de las anteras: se analizó la disposición de las anteras y se tomaron medidas de los siguientes caracteres: **a)** longitud de la porción libre del filamento de las anteras grandes (Fig. 4D), **b)** longitud de las anteras grandes (Fig. 4E), **c)** longitud de la porción libre del filamento de las anteras pequeñas (Fig. 4F), y **d)** longitud de las anteras pequeñas (Fig. 4G). Los análisis fueron realizados utilizando microscopio estereoscópico.

2.3.1.3. Análisis de la morfología de la porción distal del estilo y del estigma: se analizó **a)** la longitud del cepillo estilar (desde primer pelo hasta base estigma) (Fig. 4H), **b)** el ancho mayor (Fig. 4I), y, **c)** el ancho en la porción más distal (en el límite con el estigma) (Fig. 4J). Asimismo, se midió **d)** la longitud de los tres tricomas más largos del cepillo con el fin de estimar el diámetro/ancho máximo del mismo (Fig. 4K). El análisis fue realizado utilizando microscopio estereoscópico.

Para la caracterización del estigma se evaluaron la forma y disposición de la superficie estigmática y la disposición de las papilas estigmáticas. Además, se midieron **a)** el largo (Fig. 4L); y **b)** el ancho mayor de la superficie estigmática (Fig. 4M); y **c)** la longitud de tres papilas representativas (corta - mediana - larga) (Fig. 4N). La morfología del estigma fue analizada mediante microscopía electrónica de barrido

(MEB). Para ello, el material fijado en solución FAA fue transferido a alcohol etílico al 70% y secado a punto crítico con CO₂. La metalización se llevó a cabo con oro. Las fotografías fueron obtenidas con un microscopio ZEISS EVO15 del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad Nacional del Nordeste.

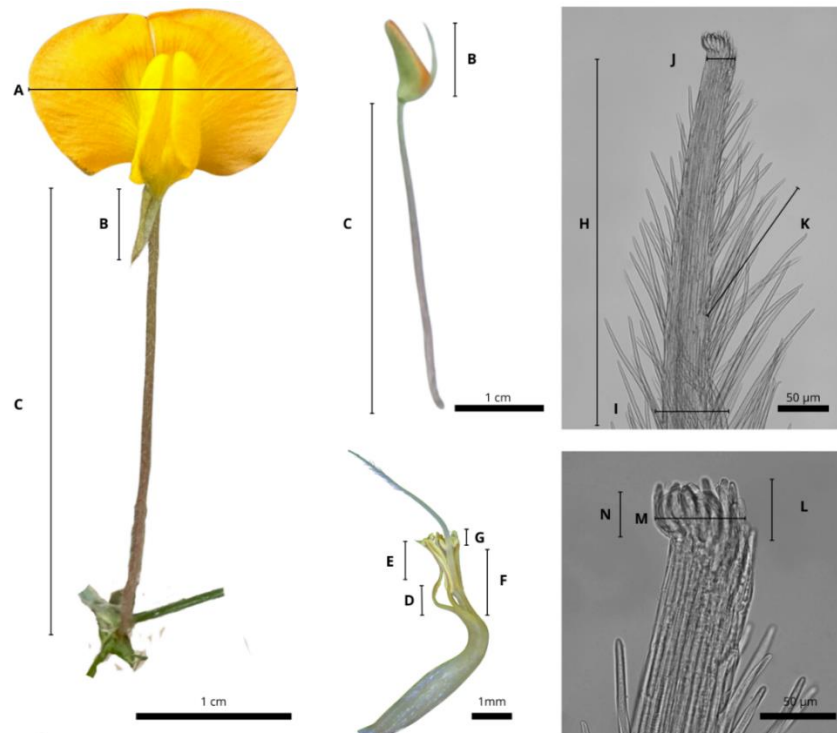


Figura 4. Caracteres morfológicos medidos en flores y botones disectadas de *A. correntina* y *A. villosa*. **A.** ancho del estandarte (cm); **B.** longitud del diente inferior del cáliz (cm); **C.** longitud del ovario-hipantio (cm); **D.** longitud de la porción libre del filamento de las anteras grandes (μm); **E.** longitud de las anteras grandes (μm); **F.** longitud de la porción libre del filamento de las anteras chicas (μm); **G.** longitud de las anteras chicas (μm); **H.** longitud del cepillo estilar (μm); **I.** ancho mayor del estilo (μm); **J.** ancho del estilo antes del estigma (μm); **K.** longitud de tricomas estilares (μm); **L.** longitud del estigma (μm); **M.** ancho mayor del estigma (μm); y **N.** longitud de papilas del estigma (μm).

2.3.1.4. Estimación de la exhibición floral: se realizó utilizando el criterio de Goodwillie *et al.* (2009) quien propone estimarlo a partir del producto entre densidad floral y tamaño de la flor. En este TFG como parámetro estimativo del tamaño floral se tomó al ancho del estandarte. Además, se agregó como factor determinante el largo del hipantio, ya que este carácter contribuye a la exhibición de las flores en las poblaciones naturales.

2.3.1.5. Análisis estadísticos de los datos: inicialmente, se evaluó si los datos obtenidos para cada carácter seguían una distribución normal mediante el test de Shapiro-Wilk. Se seleccionó este test debido a que presenta mayor sensibilidad para detectar desviaciones de la normalidad que otros test cuando se trabaja con muestras pequeñas a medianas ($n < 50$).

Dado que algunos de los parámetros no cumplieron con el supuesto de normalidad, las comparaciones de medias aritméticas y desvío estándar de las muestras entre especies se realizaron

mediante el test no paramétrico de Wilcoxon Mann-Whitney U, que permite evaluar diferencias entre dos grupos independientes sin asumir normalidad de los datos. Además, la identificación de las contribuciones relativas de cada parámetro estudiado a la variación morfológica total analizada de las especies se realizó mediante Análisis de Componentes Principales (ACP). Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software INFOSTAT (Di Rienzo *et al.* 2010).

Para mejorar comparación de los caracteres individuales entre las especies estudiadas, independizándose de las magnitudes, los valores promedio de los caracteres fueron estandarizados mediante Z-scores. Los valores estandarizados se representaron en un heatmap utilizando la plataforma Galaxy (Galaxy Europe, <https://usegalaxy.eu>).

2.4. Relación Polen – Óvulo

La relación polen/óvulo (P/O) se utilizó como una medida conservadora para inferir el tipo de sistema reproductivo, considerando que, en general, las especies alógamas presentan una relación mayor que las autógamas (Cruden 1977). Para determinar el número de óvulos por ovario, se diseccionaron cinco flores (de distintos individuos) por especie en un microscopio estereoscópico, realizando un corte longitudinal al ovario y contabilizando el número de óvulos.

El número total de granos de polen viables se contabilizó en tres botones florales por especie, del día previo a la antesis, cada uno provenientes de individuos diferentes. Para una estimación más precisa, se analizaron por separado las anteras grandes y las pequeñas. La estimación del número total de granos de polen se realizó utilizando carmín glicerina (1:1), el cual revela presencia de citoplasma en las células (Pittenger y Frolik, 1951) y se contabilizó siguiendo el siguiente protocolo:

2.4.1. Anteras grandes: se maceraron las cuatro anteras de cada botón sobre un porta objetos con dos gotas de carmín glicerina (1:1), lo que equivale aproximadamente a 40µL.

2.4.1.1. Del macerado inicial se extrajeron 35µL que fueron transferidos a un tubo y homogeneizados por pipeteo. Se tomaron 3 alícuotas de 3µL, las cuales se montaron en portaobjetos diferentes para el recuento. A partir de la media de estas alícuotas se calculó el número total de granos en el volumen total (35µL).

2.4.1.2. Los restos de tejidos de anteras se trasladaron a un tubo nuevo, se adicionaron 50µL de carmín glicerina (1:1) y se homogeneizaron con pulsos cortos en vórtex. De esta suspensión se tomaron tres alícuotas de 5µL para realizar nuevos preparados y recuentos. Se calculó la media de la cantidad de granos en las alícuotas de 5µL, con la que se estimó el número de granos en los 50µL totales.

2.4.1.3. El remanente del macerado inicial sobre el portaobjeto, luego de retirado los restos de las anteras, se cubrió con un cubreobjetos y también fue contabilizado el total de polen en la muestra.

El número total de granos de polen en las anteras grandes se obtuvieron mediante la sumatoria de los recuentos totales estimados en las tres fracciones: 2.4.1.1, 2.4.1.2 y 2.4.1.3.

2.4.2. Anteras pequeñas: Como estas anteras poseen muy poco polen, se realizó el recuento total de granos a partir de las cuatro anteras maceradas sobre un portaobjetos con dos gotas de carmín glicerina (1:1). Luego del macerado, se cubrieron con cubreobjetos y se realizó el conteo.

Los preparados fueron fotografiados en microscopio óptico y las fotografías fueron analizadas con el software Fiji para el conteo de los granos de polen. El número total de granos por flor se obtuvo mediante

la sumatoria de los recuentos totales para anteras grandes y pequeñas y el promedio por especie se obtuvo a partir de los valores estimados en tres flores. Finalmente, la relación polen-óvulo (P/O) por especie fue determinada mediante el cociente entre la estimación del número total de granos de polen por flor y el número de óvulos por flor:

$$\text{Relación P/O} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de granos de polen viable}}{\text{N}^\circ \text{ de óvulos}}$$

2.5. Apertura de anteras

La determinación del momento de la liberación del polen de las anteras se realizó utilizando las plantas mantenidas en invernáculo a partir de las cuales se fijaron botones florales en alcohol al 70% cada dos horas, entre las 18:30 de la tarde y las 05:00 de la mañana del día siguiente. La disección de los botones florales y la inspección de las anteras fueron realizadas en microscopio estereoscópico.

2.6 Receptividad del Estigma

La receptividad de los estigmas fue analizada en flores obtenidas de invernáculo libre de insectos, mediante el método de Osborn (1988), se basa en la detección de la actividad de enzimas peroxidasas en la superficie estigmática. Para ello, los estigmas (acompañados del cepillo estilar) fueron sumergidos en una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. La evaluación se realizó en botones florales (18:30 h) y en flores abiertas tomadas entre las 8 y 12 h. Para evaluar la posibilidad de falsos positivos por la presencia de granos de polen se utilizaron flores abiertas castradas y sin castrar dentro de invernáculo libre de insectos. La prueba se realizó en dos botones/flores para cada horario, por especie. La producción de burbujas en los estigmas se registró como indicador positivo de receptividad.

2.7. Ensayos de Reproducción en invernáculo por autogamia espontánea y artificial

Para la evaluación de reproducción en invernáculo se utilizaron un total de 6 individuos por especie, divididos en dos grupos de tres plantas para cada ensayo (Fig. 5A). Todos los ensayos se realizaron evitando el acceso de insectos polinizadores, para lo cual las macetas fueron cubiertas con una malla. En las ramas laterales de cada planta se rotuló la axila con la primera flor del ensayo, marcando el punto de inicio del seguimiento. Se registró diariamente la apertura de flores hasta alcanzar entre 70 y 100 flores, en *Arachis villosa* y *A. correntina* respectivamente. La aparición del ginóforo (clavo) se consideró un indicador de fertilización exitosa, dado que su desarrollo ocurre únicamente tras la fecundación del óvulo. No obstante, la formación de semillas no fue verificada directamente, por lo que los registros de ginóforos se interpretan como una estimación indirecta del éxito reproductivo. Las observaciones de aparición de clavos se extendieron hasta 15 días luego de la última flor marcada en los ensayos. Todo el trabajo experimental correspondiente a esta sección (2.7.1 y 2.7.2) fue efectuado diariamente entre las 08:30 y 09:00 h. durante los meses de enero y febrero de 2025:

2.7.1. Prueba de autopolinización y autofertilización (Control Autogamia): se evaluó la aparición de ginóforos (clavos) a partir de flores no manipuladas. Cada vez que emergía una nueva axila, esta se rotulaba y se identificaban los botones florales presentes próximos a abrir al día siguiente, se marcaron con hilos de distintos colores, asignando un color diferente según el orden de apertura (por ejemplo: rojo

= primera flor, azul = segunda, etc.) y la fecha de apertura de la flor. Se realizó un seguimiento diario de las axilas y la aparición de los ginóforos. La efectividad de la fertilización se estimó como el porcentaje de ginóforos formados respecto del total de flores evaluadas.

2.7.2. Prueba de autopolinización mediada por acción manual del sistema de alas y quilla (tripping):

este ensayo se diseñó para evaluar la influencia de la acción manual del sistema alas y quilla que simula la visita de un polinizador sobre la fertilización efectiva por autofecundación. Para tal fin, se accionó el sistema alas y quilla de forma manual, ejerciendo presión hacia abajo sobre las alas, manteniendo el estandarte inmóvil (Fig. 5B–E). Este movimiento se repitió tres veces por flor, imitando el comportamiento de insectos polinizadores registrados para leguminosas (Faegri y van der Pijl 1966; Córdoba y Cocucci 2011) y observados a campo en este Trabajo Final de Graduación (TFG). para *Arachis*.

Cada flor tratada fue rotulada con la fecha correspondiente, y el procedimiento se repitió hasta alcanzar entre 80 y 100 flores por especie. Al igual que en el ensayo anterior, se realizó un seguimiento diario de las axilas marcadas para registrar la aparición de los ginóforos. La efectividad de la fertilización se estimó como el porcentaje de ginóforos formados respecto del total de flores evaluadas.

Se descarta la ocurrencia de apomixis ya que en plantas de siete accesiones diferentes de *Arachis correntina* mantenidas en invernáculo durante 10 años nunca se formaron semillas (Seijo obs. pers.). Por otro lado, en ninguno de los estudios embriológicos en especies silvestres y sus híbridos realizados hasta el momento se ha reportado apomixis.



Figura 5. Ensayos de reproducción en invernáculo por autogamia espontánea y acción manual del sistema alas y quilla (tripping). A. Individuos utilizados en los ensayos de reproducción en invernadero. **B–D.** Mecanismo de acción manual del sistema de alas y quilla (tripping).

3. RESULTADOS

3.1 Observaciones *in situ* en poblaciones naturales

La población natural de *A. correntina* de Santa Ana presenta una gran densidad de plantas, dispuestas en manchones sobre una lomada arenosa, al borde de la laguna, en espacio abierto limitando con una zona transicional al bosque chaqueño (con *Schinopsis balansae* Engl.) y de lomada arenosa (de las especies *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos y *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong). Las plantas son muy ramificadas desde una corona, presentando múltiples ramas pegadas al piso, con entrenudos cortos y hojas pequeñas más o menos glabras. El análisis de la exhibición floral en los manchones en donde las plantas de esta especie se presentaron de forma continua reveló que la densidad promedio de flores es de 17,49 flores / m² (Fig. 6A y B). Asimismo, la observación directa de las ramas permitió constatar la presencia de ginóforos elongados y frutos en desarrollo (Fig. 6C).

Durante el periodo de floración, el análisis de visita de polinizadores se realizó en el mes de abril de 2024, día en que la salida del sol se registró a las 06:30 am; la temperatura ambiente fue de 18.8°C y la humedad 93 %. La visita de insectos a las flores inició a partir de las 09:00 y se extendió hasta las 12:00 h (Tabla 3), todos ellos fueron de la especie exótica *Apis mellifera*. El seguimiento de distintos individuos de abejas mostró que los mismos permanecen durante varios minutos en cada área establecida visitando muchas flores. Para cuantificar el número de flores visitadas por cada individuo de *Apis mellifera* (tres en total) se realizó el seguimiento individual de los mismos durante cinco minutos obteniéndose un promedio de 9,8 flores visitadas por minuto (Fig. 6D y E). Durante cada visita, las abejas realizaron tripping hasta tres veces por flor.



Figura 6. Características florales y reproductivas de *A. correntina*. **A.** Exhibición floral en población natural floral. **B.** Detalle de flor con un ala dislocada, evidencia de visita de polinizadores que realizaron tripping. **C.** Ginóforos elongados que evidencian la fertilización efectiva en esta población. (flecha roja) **D** y **E.** *Apis mellifera* realizando tripping. **F:** Individuo de *Psaenythia* sp. (Andrenidae).

También, se registró la presencia de una avispa (especie no determinada), que visitó seis flores en cinco minutos, aunque no efectuó tripping. Además, se observaron visitas de abejas solitarias pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos, incluyendo Megachilidae, Andrenidae y diversas tribus de Apidae (Fig. 6F). A partir de las 11:00 h se observó una disminución de la frecuencia de visitas de insectos polinizadores a las flores, hasta cesar por completo a partir del mediodía. Adicionalmente, en la Colección Entomológica de Polinizadores del IBONE se registraron cuatro individuos del género *Megachile* (Megachilidae), que fueron capturados mientras forrajeaban sobre flores de *Arachis correntina*.

En la población natural de *A. villosa* de Laguna Brava en Paso de los Libres, las plantas presentan una menor densidad floral, lo que permite distinguir con facilidad la pertenencia de las flores a los distintos individuos. La población se distribuye en parches discontinuos sobre el albardón arenoso del margen oeste del Río Uruguay, en espacios abiertos con *Butia noblickii* Deble Deble, Marchiori, F.S. Alves y A.S. Oliveira rodeados de bosque en galería. Las plantas presentan pocas ramas largas, con entrenudos más elongados que en *A. correntina*. El análisis de la densidad floral reveló un total de 3,1 flores/m² (Fig. 7A y B). Además, se constató la presencia de ginóforos elongados y frutos en desarrollo (Fig. 7C).

El análisis de visitantes florales se realizó en diciembre de 2024, día en que la salida del sol se registró a las 5:50 am la temperatura ambiente fue de 26°C y la humedad de 65 % a las 09:00 h. La visita de polinizadores se registró entre las 08:30 y las 10:00 h. El horario de inicio del registro estuvo determinado por la hora de llegada al sitio de muestreo, donde ya se observó actividad de insectos polinizadores, por lo que la hora de inicio de actividad de los mismos no se ha podido determinar. La mayoría de los individuos observados correspondieron a abejas solitarias nativas pertenecientes principalmente a los grupos Eucerini (Apidae) (Fig. 7D) y Anthidiini (Megachilidae) (Fig. 7E), aunque se registró ocasionalmente la visita de *Apis mellifera*, con escasa actividad sobre los individuos de *A. villosa*, pero muy activa en otras especies simpátricas. El seguimiento de los individuos de las abejas solitarias registradas indicó que los mismos visitaron en promedio 5 flores/minuto realizando tripping entre una y tres veces por flor. También se observaron otros insectos, entre ellos coleópteros, visitando las flores, pero ninguno realizó tripping (Fig. 7F). A pesar que la visita de insectos a *A. villosa* cesó partir de las 10:00 h, , los mismos polinizadores continuaron visitando flores de otras especies, entre ellas de las familias Verbenaceae J.St.-Hil. y Asteraceae Bercht. y J.Presl., co-distribuidas con la especie en estudio. En esta transición, se detectó un cambio en la coloración de la corola en flores de *A. villosa* expuestas a sol directo, tornándose más pálidas con manchas blanquecinas.



Figura 7. Características florales y reproductivas de *A. villosa*. **A.** Presentación floral en población natural floral. **B.** Detalle de flor con un ala dislocada, evidencia de visita de polinizadores que realizaron tripping. **C.** Frutos en desarrollo que evidencian la fertilización efectiva en esta población (flecha roja). **D.** Abeja de la tribu Eucerini (Apidae) realizando tripping. **E.** Abeja de la tribu Anthidiini (Megachilidae) capturada sobre las flores. **F.** Coleóptero aún no identificado.

Tabla 3. Principales polinizadores, frecuencia de visita y densidad floral en poblaciones naturales.

Especie	Visitantes principales	Frecuencia	Densidad floral
<i>A. correntina</i>	<i>Apis mellifera</i> ,	10 flores/minuto	17,94 flores/ m ² .
<i>A. villosa</i>	Eucerini y Anthidiini	5 flores/ minuto	3,1 flores/m ² .

3.2. Observaciones en materiales cultivados ex situ

3.2.1. Morfología de la flor

3.2.1.1. Tamaño general de la flor: en los botones florales de *A. correntina*, el diente inferior del cáliz presentó una longitud promedio de $0,93 \pm 0,10$ cm, valor significativamente mayor que el registrado en *A. villosa* ($0,63 \pm 0,10$ cm; $p = 0,0001$) (Tabla 4). En cambio, la longitud del ovario-hipantio no mostró diferencias significativas entre especies, con promedios de $3,44 \pm 0,99$ cm en *A. correntina* y $2,63 \pm 0,47$ cm en *A. villosa*.

En las flores abiertas, el ancho del estandarte fue de $1,81 \pm 0,19$ cm en *A. correntina*, valor significativamente superior al de *A. villosa* ($1,59 \pm 0,15$ cm; $p = 0,0014$). La longitud del diente inferior del cáliz también fue mayor en *A. correntina* ($0,96 \pm 0,11$ cm) que en *A. villosa* ($0,71 \pm 0,12$ cm; $p = 0,0001$). Por su parte, la longitud del ovario-hipantio mostró diferencias altamente significativas entre especies, con valores promedio de $7,96 \pm 0,92$ cm en *A. correntina* y $2,76 \pm 0,56$ cm en *A. villosa* ($p = 0,0001$) (Tabla 5).

3.2.1.2. Presentación de las anteras: en los botones florales de ambas especies, las anteras se dispusieron en dos verticilos: uno compuesto por cuatro anteras grandes y otro por cuatro anteras chicas. En esta etapa, la longitud de la porción libre del filamento de las anteras grandes fue de $942,23 \pm 138,60 \mu\text{m}$ en *A. correntina* y $871,11 \pm 118,92 \mu\text{m}$ en *A. villosa* ($p = 0,0001$). Las anteras grandes presentaron longitudes de $1333,33 \pm 1,1\text{E-}12 \mu\text{m}$ en *A. correntina* y $1462,22 \pm 132,12 \mu\text{m}$ en *A. villosa*, también con diferencias significativas ($p = 0,0001$). En cambio, la porción libre del filamento de las anteras chicas mostró valores de $882,22 \pm 101,49 \mu\text{m}$ en *A. correntina* y $662,22 \pm 134,38 \mu\text{m}$ en *A. villosa* ($p = 0,0001$), mientras que la longitud total de las anteras chicas no difirió significativamente entre especies ($279,11 \pm 13,42 \mu\text{m}$ y $280,00 \pm 13,45 \mu\text{m}$, respectivamente) (Tabla 4).

En las flores abiertas, los filamentos de las anteras chicas se alargaron y sobrepasaron el verticilo de las anteras grandes en ambas especies, aunque permanecieron por debajo del cepillo estilar. La porción libre del filamento de las anteras grandes midió $1055,56 \pm 115,90 \mu\text{m}$ en *A. correntina* y $1253,33 \pm 414,57 \mu\text{m}$ en *A. villosa*, sin diferencias significativas ($p = 0,2019$). La longitud de las anteras grandes fue significativamente mayor en *A. correntina* ($1548,89 \pm 81,76 \mu\text{m}$) que en *A. villosa* ($1311,11 \pm 155,58 \mu\text{m}$; $p = 0,0001$). En tanto, la porción libre del filamento de las anteras chicas presentó valores de $2024,44 \pm 126,35 \mu\text{m}$ en *A. correntina* y $2071,11 \pm 281,47 \mu\text{m}$ en *A. villosa* ($p = 0,3874$), sin diferencias significativas. La longitud de las anteras chicas fue idéntica en ambas especies ($293,33 \pm 26,89 \mu\text{m}$; $p = 0,9999$) (Tabla 5).

3.2.1.3. Análisis de la morfología de la porción distal del estilo y del estigma: En ambas especies, el ovario se localizó en la base del hipantio, y el estilo presentó en su porción distal numerosos tricomas largos que conforman un cepillo estilar, observable tanto en botón floral como en flor abierta (Fig. 8A y D). En los botones florales, la longitud del cepillo estilar fue de $1788,40 \pm 319,93 \mu\text{m}$ en *A. correntina* y $1703,40 \pm 303,44 \mu\text{m}$ en *A. villosa*, sin diferencias significativas ($p = 0,2569$) (Fig. 8B y E). El ancho mayor del estilo tampoco difirió entre especies ($129,13 \pm 11,49 \mu\text{m}$ y $137,80 \pm 24,96 \mu\text{m}$, respectivamente; $p = 0,1547$). Sin embargo, el ancho de la porción distal del estilo antes del estigma fue significativamente mayor en *A. villosa* ($51,13 \pm 5,95 \mu\text{m}$) que en *A. correntina* ($40,73 \pm 4,13 \mu\text{m}$; $p = 0,0001$) (Fig. 8C y F). La longitud del estigma fue similar en ambas especies ($48,05 \pm 7,61 \mu\text{m}$ en *A. correntina* y $51,13 \pm 3,36 \mu\text{m}$ en *A. villosa*; $p = 0,0569$). En cambio, el ancho mayor del estigma fue significativamente mayor en *A. villosa* ($91,00 \pm 10,99 \mu\text{m}$) que en *A. correntina* ($50,33 \pm 3,37 \mu\text{m}$; $p = 0,0001$). La longitud de tres papilas del estigma no mostró diferencias entre especies ($29,62 \pm 13,74 \mu\text{m}$ y $29,70 \pm 14,01 \mu\text{m}$; $p = 0,9835$) (Tabla 4).

En las flores abiertas, la longitud del cepillo estilar fue de $2223,60 \pm 224,63 \mu\text{m}$ en *A. correntina* y $2111,40 \pm 277,87 \mu\text{m}$ en *A. villosa*, sin diferencias significativas ($p = 0,3478$). El ancho mayor del estilo tampoco difirió entre especies ($154,27 \pm 4,57 \mu\text{m}$ y $156,87 \pm 19,94 \mu\text{m}$; $p = 0,1557$). Sin embargo, el ancho del estilo antes del estigma fue significativamente mayor en *A. villosa* ($53,73 \pm 6,71 \mu\text{m}$) que en *A. correntina* ($38,48 \pm 7,23 \mu\text{m}$; $p = 0,0001$). La longitud de tres tricomas estilares fue significativamente mayor en *A. correntina* ($329,91 \pm 39,90 \mu\text{m}$) que en *A. villosa* ($294,09 \pm 32,36 \mu\text{m}$; $p = 0,0001$). La longitud del estigma no presentó diferencias significativas ($48,60 \pm 9,30 \mu\text{m}$ en *A. correntina* y $52,87 \pm 10,38 \mu\text{m}$ en *A. villosa*; $p = 0,1998$). En cambio, el ancho mayor del estigma fue significativamente superior en *A. villosa* ($91,87 \pm 5,12 \mu\text{m}$) respecto de *A. correntina* ($50,60 \pm 3,33 \mu\text{m}$; $p = 0,0001$). Finalmente, la longitud de tres papilas del estigma no mostró diferencias significativas ($30,28 \pm 13,80 \mu\text{m}$ en *A. correntina* y $31,20 \pm 14,55 \mu\text{m}$ en *A. villosa*; $p = 0,6911$) (Tabla 5).

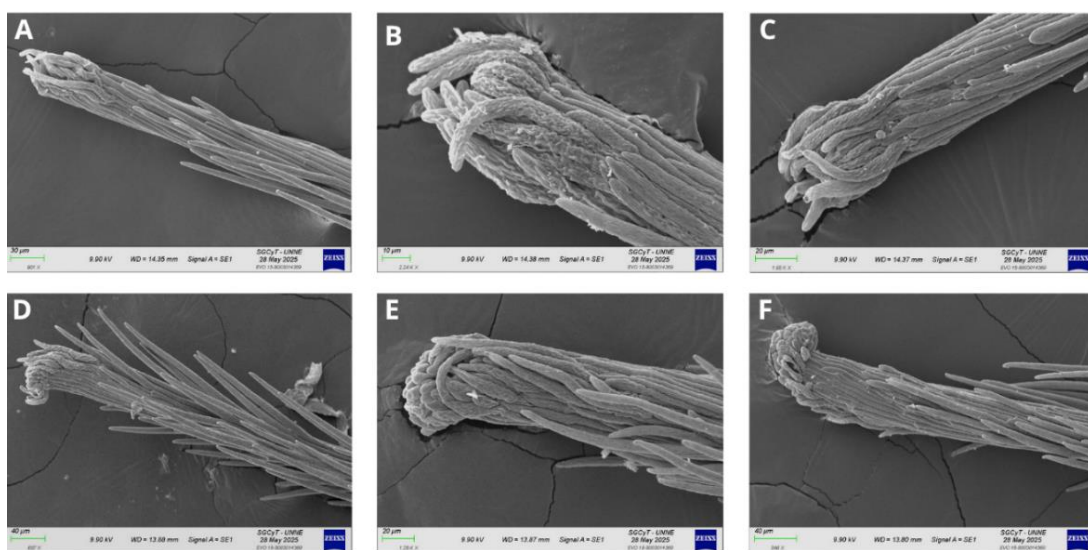


Figura 8 Detalles de la porción distal del estilo y del estigma en botón floral de *A. correntina* (A – C) y *A. villosa* (D – E). A y D. Porción distal del cepillo estilar. B, C, E y F. Detalles de estigma.

3.2.1.4. Análisis estadísticos de los datos: las medias y desvíos estándar de los caracteres morfométricos medidos en *A. correntina* y *A. villosa* se presentan en las Tablas 4 y 5, correspondientes a botones florales y flores abiertas, respectivamente. Los resultados del análisis comparativo entre especies, obtenidos mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney, se muestran en la Tabla 4 para los botones florales y en la Tabla 5 para las flores abiertas. El mapa de calor de los caracteres morfométricos de botón floral y flores abiertas estandarizados (Z-score) se muestra en la Figura 9.

Tabla 4. Medidas de los caracteres florales en botón floral. Los valores presentados corresponden a la media $\pm$ desvío estándar ($\bar{x} \pm s$) y el p-valor resultante del test de Wilcoxon-Mann-Whitney utilizado para comparar las medias de las dos especies. Con un asterisco (*) se indican diferencias significativas.

Especie	<i>A. correntina</i>	<i>A. villosa</i>	p
Caracteres morfométricos	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	
Longitud del diente inferior del cáliz (cm)	0.93 $\pm$ 0.10	0.63 $\pm$ 0.10	0.0001*
Longitud ovario hipantio (cm)	3.44 $\pm$ 0.99	2.63 $\pm$ 0.47	0.0290
Longitud de la porción libre del filamento de las anteras grandes (μm)	942.23 $\pm$ 138.60	871.11 $\pm$ 118.92	0.0001*
Longitud de las anteras grandes (μm)	1333.33 $\pm$ 1.1E-12	1462.22 $\pm$ 132.12	0.0001*
Longitud de la porción libre del filamento de las anteras chicas (μm)	882.22 $\pm$ 101.49	662.22 $\pm$ 134.38	0.0001*
Longitud de las anteras chicas (μm)	279.11 $\pm$ 13.42	280 $\pm$ 13.45	0.7160
Longitud del cepillo estilar (μm)	1788.40 $\pm$ 319.93	1703.40 $\pm$ 303.44	0.2569
Ancho mayor del estilo (μm)	129.13 $\pm$ 11.49	137.80 $\pm$ 24.96	0.1547
Ancho de estilo antes del estigma (μm)	40.73 $\pm$ 4.13	51.13 $\pm$ 5.95	0.0001*
Longitud 3 tricomas estilares (μm)	285.71 $\pm$ 30.42	290.91 $\pm$ 27.62	0.2927
Longitud estigma (μm)	48.05 $\pm$ 7.61	51.13 $\pm$ 3.36	0.0569

Ancho mayor estigma (μm)	50.33 ± 3.37	91 ± 10.99	0.0001*
Longitud 3 papilas del estigma (μm)	29.62 ± 13.74	29.70 ± 14.01	0.9835

Tabla 5. Medidas de los caracteres florales en flor abierta. Los valores presentados corresponden a la media $\pm$ desvío estándar ($\bar{x} \pm s$) y el p-valor resultante del test de Wilcoxon-Mann-Whitney utilizado para comparar las medias de las dos especies. Con un asterisco (*) se indican diferencias significativas.

Especie	<i>A. correntina</i>	<i>A. villosa</i>	p
Caracteres morfométricos	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	
Ancho del estandarte (cm)	1.81 ± 0.19	1.59 ± 0.15	0.0014*
Longitud del diente inferior del cáliz (cm)	0.96 ± 0.11	0.71 ± 0.12	0,0001*
Longitud ovario hipantio (cm)	7.96 ± 0.92	2.76 ± 0.56	0.0001*
Longitud de la porción libre del filamento de las anteras grandes (μm)	1055.56 ± 115.90	1253.33 ± 414.57	0.2019
Longitud de las anteras grandes (μm)	1548.89 ± 81.76	1311.11 ± 155.58	0.0001*
Longitud de la porción libre del filamento de las anteras chicas (μm)	2024.44 ± 126.35	2071.11 ± 281.47	0.3874
Longitud de las anteras chicas (μm)	293.33 ± 26.89	293.33 ± 26.89	0.9999
Longitud del cepillo estilar (μm)	2223.60 ± 224.63	2111.40 ± 277.87	0.3478
Ancho mayor del estilo (μm)	154.27 ± 4.57	156.87 ± 19.94	0.1557
Ancho de estilo antes del estigma (μm)	38.48 ± 7.23	53.73 ± 6.71	0.0001*
Longitud 3 tricomas estilares (μm)	329.91 ± 39.90	294.09 ± 32.36	0.0001*
Longitud estigma (μm)	48.60 ± 9.30	52.87 ± 10.38	0.1998
Ancho mayor estigma (μm)	50.60 ± 3.33	91.87 ± 5.12	0.0001*
Longitud 3 papilas del estigma (μm)	30.28 ± 13.80	31.20 ± 14.55	0.6911

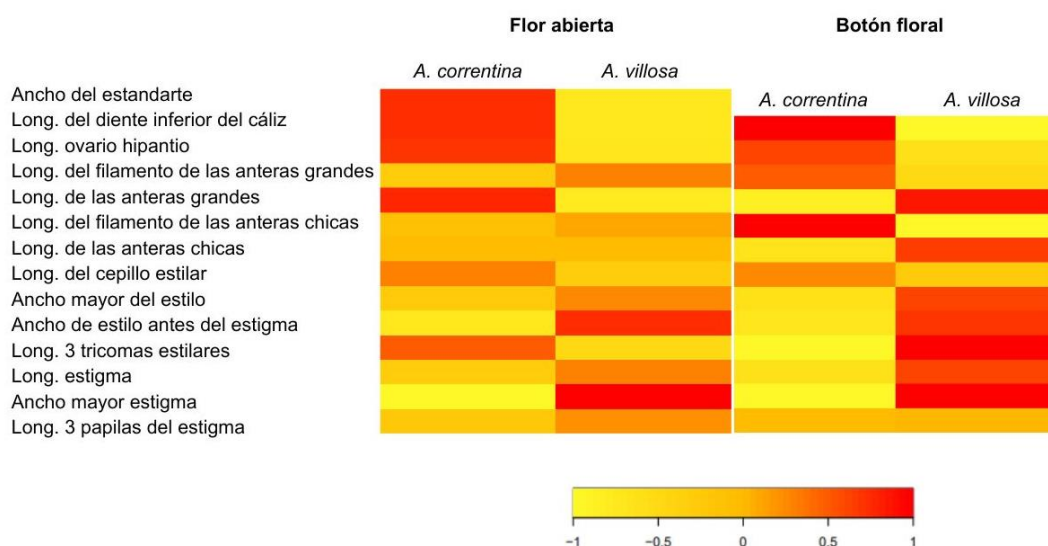


Figura 9. Heatmap de los caracteres morfométricos de botón floral y flores abiertas estandarizados (Z-score) en *A. correntina* y *A. villosa*. Se empleó un gradiente de colores para reflejar los valores relativos de cada parámetro (rojo valores altos; amarillo valores bajos).

El Análisis de Componentes Principales de los caracteres morfológicos reveló que las flores de *Arachis correntina* se segregan de las de *A. villosa* en el CP1, el cual explica ~34% de la variabilidad total de los datos (Fig. 10). Las variables más asociadas al componente 1 fueron el ancho del estigma (mayor en *A. villosa*), la longitud del hipantio y el ancho de la corola (ambos mayores en *A. correntina*). En el componente 2, que explica el 14,7 % de la variación total, los caracteres de las flores de *A. correntina* se proyectaron con mayor dispersión que las de *A. villosa*, quedando la variabilidad de estas últimas dentro de las primeras. Los caracteres que más contribuyen al CP2 fueron la longitud cepillo estilar, el ancho de la porción distal del estilo y la longitud del filamento libre de las anteras chicas. (Tabla 6)

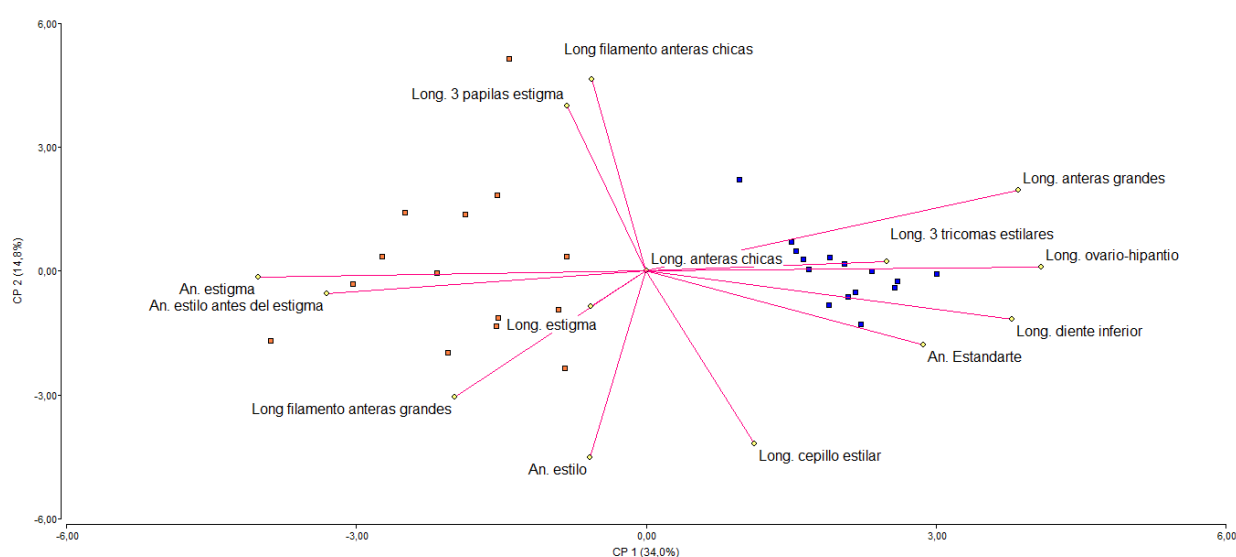


Figura 10. Análisis de Componentes Principales basado en caracteres morfológicos de las flores de *A. correntina* (azul) y *A. villosa* (verde). Las líneas indican la magnitud (longitud) y el sentido de la contribución de los caracteres a los CP1 y CP2.

Tabla 6. Contribución de los caracteres morfológicos a los CP1 y CP2 del Análisis de Componentes Principales de flores abiertas.

Caracteres morfométricos	CP1	CP2
Ancho del estandarte (cm)	0,29	-0,2
Longitud del diente inferior del cáliz (cm)	0,39	-0,1
Longitud ovario hipantio (cm)	0,42	0,01
Filamento libre antera grande (µm)	-0,21	-0,31
Longitud antera grande (µm)	0,4	0,19
Filamento libre antera chica (µm)	-0,05	0,48
Longitud antera chica (µm)	0	0
Longitud del cepillo estilar (µm)	0,11	-0,43
Ancho mayor del estilo (µm)	-0,06	-0,47
Ancho de estilo antes del estigma (µm)	-0,34	-0,05
Longitud 3 tricomas estilares (µm)	0,26	0,02
Longitud estigma (µm)	-0,06	-0,09

Ancho mayor estigma (μm)	-0,41	-0,01
Longitud 3 papilas del estigma (μm)	-0,08	0,41

3.2.1.5. Estimación de la exhibición floral: Al combinar la dimensión del estandarte con la longitud del hipantio en flores abiertas con la densidad de flores para realizar una estimación de la exhibición floral, este valor resultó casi 20 veces mayor en *A. correntina* que en *A. villosa*. (Tabla 7).

Tabla 7. Estimación de la exhibición floral conjunta en especies de *Arachis*.

Densidad	Ancho estandarte	Longitud hipantio	Exhibición floral
17,49	1,81	7,96	251,98
3,1	1,59	2,76	13,60

3.2.2. Relación Polen – Óvulo

La evaluación de los ovarios reveló que ambas especies presentan consistentemente 2 óvulos por flor. En cuanto al análisis del número total de granos de polen, los resultados mostraron que *Arachis correntina* presenta mayor cantidad de granos de polen por flor que *A. villosa* (9.288 vs. 6.565, respectivamente; Tabla 8). En consecuencia, la relación polen/óvulo (P/O) fue mayor en *A. correntina* (4.644) que en *A. villosa* (3.283).

Tabla 8. Relación polen/óvulo (P/O).

Muestra	<i>A. correntina</i>	<i>A. villosa</i>
Botón 1	10.254	5.545
Botón 2	9.602	9.440
Botón 3	8.008	4.711
Promedio	9.288	6.565
Número de óvulos	2	2
Relación P/O	4.644	3.283

3.2.3. Apertura de anteras

El análisis de las anteras reveló que en ambas especies las mismas permanecieron cerradas en todas las muestras fijadas entre las 18:30 pm y las 3:00 am. Las muestras fijadas a partir de las 4:00 am mostraron polen fuera de las anteras en todas las flores diseccionadas (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados de la determinación del horario de apertura de las anteras.

Especie	Fase floral	Horario	Resultado
<i>A. correntina</i>	Botón	18:30	Negativo
		00:00	Negativo
		01:00	Negativo
		02:00	Negativo
		03:00	Negativo
		04:00 05:00	Positivo Positivo
<i>A. villosa</i>	Botón	18:30	Negativo
		00:00	Negativo
		01:00	Negativo
		02:00	Negativo

		03:00 04:00 05:00	Negativo Positivo Positivo
--	--	-------------------------	----------------------------------

3.2.4. Receptividad del Estigma

La prueba de Osborn mostró que, en flores sin castrar de *A. correntina* y *A. villosa*, tomadas de plantas mantenidas en invernáculo, los estigmas presentan actividad peroxidasa desde el inicio de la expansión acelerada del botón floral (18:30 h del día previo a la apertura de la flor), manteniendo su actividad hasta las 12:30 h del día en que la flor se encuentra completamente abierta (Tabla 10). En flores emasculadas se observó el mismo periodo de actividad peroxidasa en los estigmas.

Tabla 10. Resultados del análisis de receptividad estigmática mediante la prueba de Osborn. Se indican resultados positivos (P) o negativos (N) tanto en flores con anteras (A) y emasculadas (E)

Especie	Fase floral	Horario	Repetición	Resultado
<i>A. correntina</i>	Botón	18:30	1	P (A)
			2	P (A)
	Flor abierta	08:30	1	P (A)
			2	P (A)
		09:10	1	P (E)
			2	P (E)
		09:40	1	P (E)
			2	P (E)
		10:40	1	P (E)
			2	P (E)
		11:00	1	P (E)
			2	P (E)
<i>A. villosa</i>	Botón	18:30	1	P (A)
			2	P (A)
	Flor abierta	09:10	1	P (E)
			2	P (E)
		09:40	1	P (E)
			2	P (E)
		10:40	1	P (E)
			2	P (E)
		11:00	1	P (E)
			2	P (E)

3.2.5. Experimentos de Reproducción en Invernadero por autogamia espontánea y artificial

3.2.5.1. Prueba de autopolinización y autofertilización (control autogamia): en *A. villosa* se registró la elongación de 53 ginóforos de un total de 73 flores marcadas, lo que representa una eficiencia reproductiva por autogamia espontánea del 72,6 %. La elongación de los ginóforos se observó a partir del quinto día desde la apertura de la primera flor incluida en el análisis y la observación se extendió hasta 15 días después desde la última flor estudiada. En contraste, en *A. correntina* no se observó elongación de ginóforos en ninguna de las 100 flores de tres plantas incluidas en el análisis. El seguimiento continuó durante 15 días posteriores a la apertura de la última flor evaluada, con el fin de verificar la posible aparición de nuevos ginóforos, sin embargo, el resultado fue una eficiencia reproductiva del 0 %.

Durante el periodo experimental, se registró un total de 73 flores en *A. villosa* en el transcurso de 43 días, mientras que en *A. correntina* se alcanzaron 100 flores en solo 31 días. En *A. correntina*, la floración

fue más continua y abundante, con la apertura de nuevas flores prácticamente todos los días, lo que indica una mayor tasa diaria de floración (Fig. 11). En contraste, *A. villosa* presentó una floración más espaciada en el tiempo, con intervalos sin apertura de flores y picos aislados de floración, reflejando un patrón de aparición más espaciado. (Fig. 12)

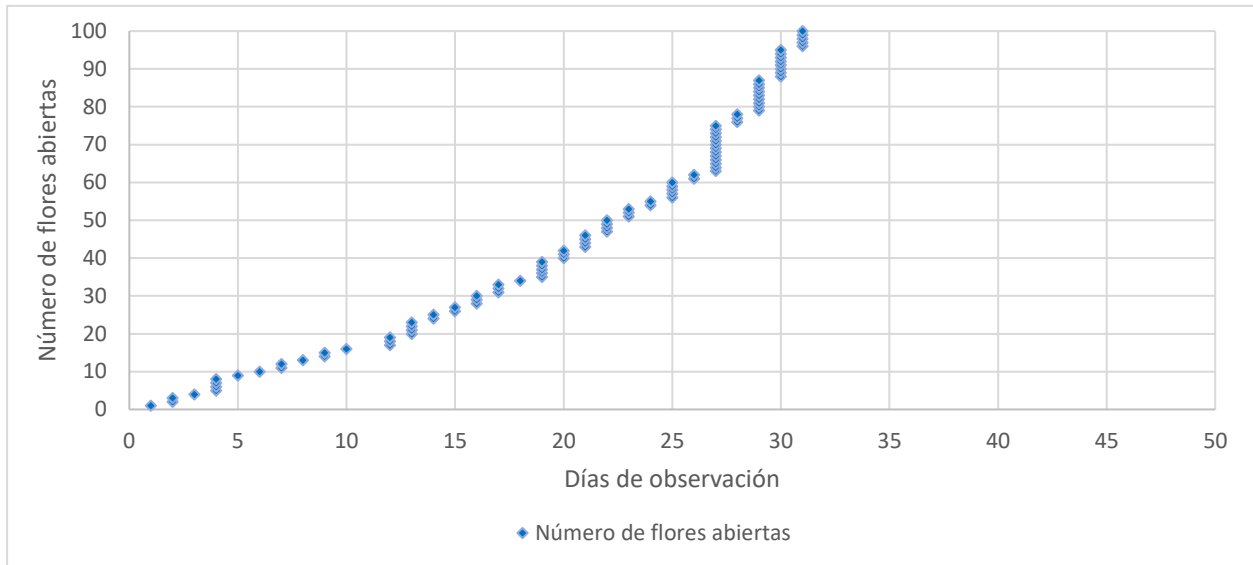


Figura 11. Dinámica de floración y elongación de ginóforos en *A. correntina* observadas en condiciones de invernáculo para el control autogamia.

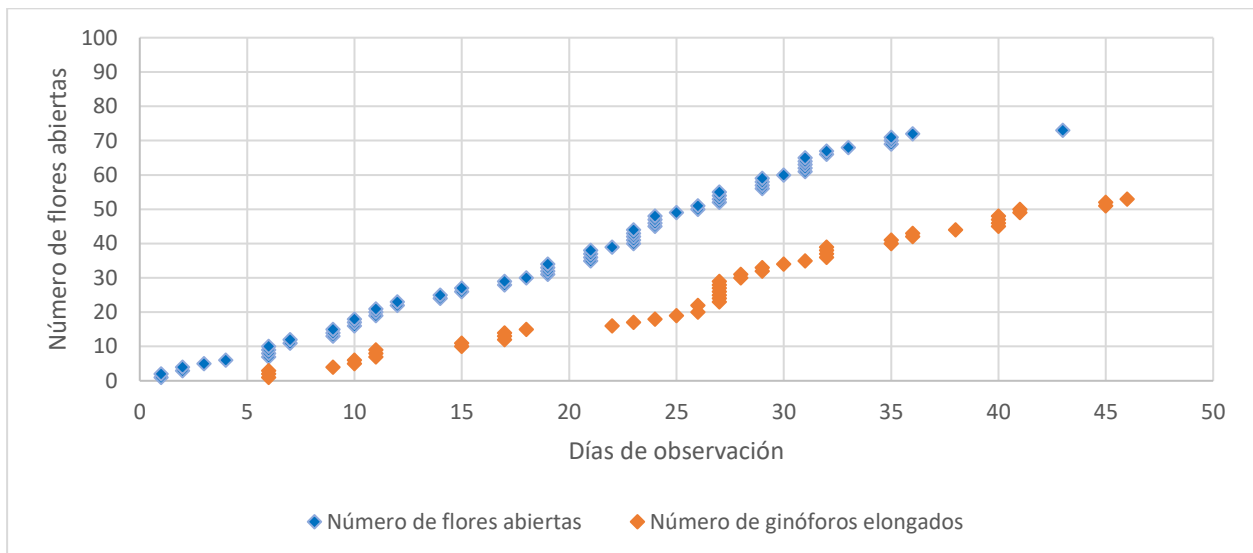


Figura 12. Dinámica de floración y elongación de ginóforos en *A. villosa* observadas en condiciones de invernáculo para el control autogamia.

Prueba de autopolinización por acción manual del sistema: El sistema fue accionado en 84 flores pertenecientes a tres plantas de *A. villosa*. Como resultado, se observó la elongación de sólo 2 ginóforos

al finalizar el período experimental, lo que representa una eficiencia reproductiva del 2,38 %. Este valor fue significativamente inferior al 72,6 % registrado en el ensayo de autofecundación espontánea.

En *A. correntina*, se accionó el sistema en 100 flores de tres plantas, observándose también la formación de 2 ginóforos. La eficiencia reproductiva resultante (2 %) fue ligeramente superior a la obtenida en el ensayo de autofecundación espontánea, en el cual no se registró formación de ginóforos (0 %) (Fig. 13).

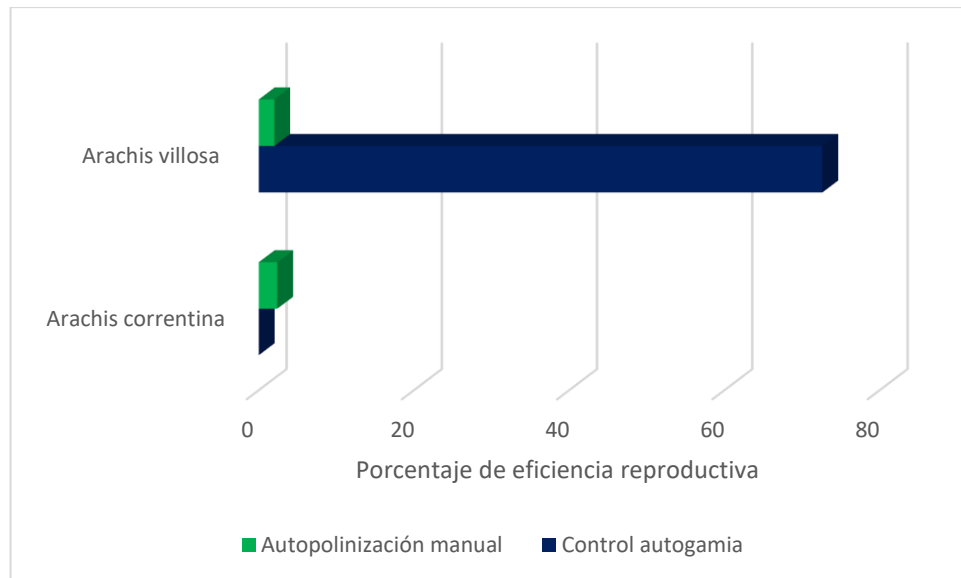


Figura 13. Eficiencia reproductiva de *A. correntina* y *A. villosa* (medida en porcentaje) bajo dos pruebas de control autogamia y autopolinización manual en condiciones controladas.

4. DISCUSIÓN

Los sistemas reproductivos en plantas engloban el conjunto de estructuras y procesos que determinan tanto la fecundidad como la composición genética de la descendencia. Estos sistemas regulan la producción de semillas y frutos y condicionan la transmisión de genes entre generaciones, por lo que constituyen un eje central en la organización de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones (Wright 1978). Como resultado, actúan también como un agente selectivo clave en la evolución de la forma vegetal y de los rasgos vinculados a la historia de vida (Willson 1979; Charlesworth y Charlesworth 1981; Charnov 1982).

Además de su importancia evolutiva, la comprensión de los sistemas reproductivos posee un valor práctico fundamental en agricultura, ya que permite manejar los patrones de cruzamiento y reproducción en cultivos y variedades domesticadas, así como el uso más eficiente de especies silvestres para introgresar genes de interés a los cultivos. En este sentido, la diversidad de estrategias reproductivas observada tanto en especies silvestres como cultivadas refleja la amplia variación que existe entre taxones, motivando el interés creciente por investigar estos sistemas y su impacto sobre la estructura genética y el rendimiento de las poblaciones (Uyenoyama *et al.* 1993; Holsinger 1996).

En este marco, el estudio llevado a cabo en este TFG constituye una primera aproximación hacia la comprensión del sistema reproductivo de dos especies de *Arachis* íntimamente relacionadas y distribuidas en el extremo sur del área de la sección. Si bien aún restan muchos aspectos por confirmar y dilucidar, los

análisis realizados demuestran claramente que estas especies han divergido en su sistema reproductivo, evidenciándose la alogamia como sistema reproductivo preferencial en una de ellas, en contrapartida a la autogamia considerada para todas las especies del género y se revela la existencia de insectos polinizadores nativos y exóticos en poblaciones naturales.

Observaciones *in situ* en poblaciones naturales

Las observaciones en laboratorio y a campo constituyen un componente esencial en el estudio de la biología floral, ya que permiten contextualizar los resultados experimentales bajo condiciones ecológicas reales y comprender la dinámica funcional de la polinización en las poblaciones naturales. En particular, la similitud del paisaje en las que viven las poblaciones naturales de las dos especies estudiadas indicaría que los nichos ecológicos de las mismas no han diversificado significativamente, ya que ambas viven en terrenos arenosos, cerca de cursos o espejos de agua y en parches de pastizales lindantes con bosque alto. Sin embargo, la mayor densidad de flores, el mayor tamaño de la corola y la mayor longitud de hipantio evidencia una mayor exhibición floral en *A. correntina*. La mayor densidad floral de *A. correntina*, en comparación con *A. villosa*, se debe a su mayor producción de flores por unidad de tiempo, asociada a una ramificación más abundante y a la mayor cantidad de axilas reproductivas. Al respecto, este es el primer análisis que demuestra diferencias en los patrones de exhibición floral entre especies de *Arachis*; hecho que cobra mayor significancia evolutiva dado que han sido históricamente consideradas como especies crípticas (Burkart 1952) o muy cercanas (Krapovickas y Gregory 1994; Grabiele *et al.* 2012; Leal Bertioli *et al.* 2024).

Las diferencias en la exhibición floral en grupos de especies evolutivamente cercanas son reconocidas como uno de los factores que podrían intervenir en la diversificación de los sistemas reproductivos (Goodwillie *et al.* 2009). En este sentido, la exhibición floral se considera como uno de los factores que tienden a disminuir en las transiciones de sistemas alógamos a autógamos en grupos de plantas con polinización asociada a insectos (Barrett 2010). Esta tendencia evolutiva es coherente con la dirección de evolución filogenética planteada para este par de especies por el hecho que *A. villosa* ocupa el extremo sur del área de distribución de la sección *Arachis* (Krapovickas y Gregory 1994) y por presentar una variabilidad genética que queda comprendida dentro de la variabilidad de *A. correntina* (Grabiele *et al.* 2012; Leal Bertioli *et al.* 2024; Inglis *et al.* 2025).

Con respecto a la identificación de actividad de polinizadores en *Arachis*, si bien hasta el momento, se han registrado actividad de *Apis mellifera* en accesiones de maní cultivado (Banks 1990) y en *A. pinto* (Otto 2007) cultivadas de *ex situ*, no hay registro de actividad de polinizadores en poblaciones naturales de *Arachis*. En este trabajo se documentó la actividad de *A. mellifera* en las poblaciones naturales de las dos especies silvestres de *Arachis* analizadas y, lo que resulta aún más relevante, es el registro por primera vez la actividad de abejas solitarias nativas pertenecientes a los grupos Eucerini (Apidae), Anthidiini (Megachilidae) y Protandrenini (Andrenidae) como insectos que activan el sistema de alas y quilla den las flores de *Arachis*. Por otra parte, se registraron individuos del género *Megachile* (Megachilidae) en la Colección Entomológica del IBONE, los cuales fueron capturados mientras forrajeaban sobre flores de *Arachis correntina* en la localidad de Santa Ana.

La actividad de los polinizadores sobre las flores de *Arachis* se concentra en un período muy breve, desde la apertura de las flores hasta antes de los primeros síntomas de senescencia floral (11 h). El registro

de finalización de visitas de polinizadores a flores de *Arachis* se dio alrededor de las 10 h en *A. villosa* y a las 12 h y *A. correntina*, a pesar que los mismos continuaban activos en flores de otras especies simpátricas, lo que sugiere que la recompensa obtenida en *Arachis* ya no justificaba la visita, como sucede en otros géneros de plantas (Gori 1983). Esta hipótesis también se sustenta en la observación que las flores que fueron visitadas por un polinizador, luego son visitadas efímeramente por polinizadores subsecuentes, generalmente sin llegar a posarse sobre las alas de la flor (observación personal). Dado que las flores de *Arachis* no presentan estructuras nectaríferas (Graham 1941), la recompensa que obtienen los polinizadores estaría dada por la carga polínica que presentan las flores, la cual sería ofrecida en su mayor parte para el primer visitante que realice tripping. Esta descarga inicial podría dejar alguna señal detectada por los polinizadores que aún no ha sido identificada, sin embargo, esta hipótesis debe validarse con más estudios de campo.

Si bien en este TFG no se abordó específicamente la cuantificación de la frecuencia de visitas de polinizadores, se documentó que un mismo polinizador visita muchas flores en la misma población, desplazándose varios metros dentro del área de observación delimitada, confirmando que las flores visitadas pertenecen tanto a una misma como a distintas plantas, lo que favorecería la polinización por geitonogamia o cruzada dentro de las poblaciones, respectivamente. Asimismo, al comparar la frecuencia de flores visitadas por minuto, se documentó que en *A. correntina* el valor fue casi del doble que en *A. villosa*. Si bien los datos disponibles aún son insuficientes, el hecho de que en *A. correntina* se registrara el doble de flores visitadas por minuto que en *A. villosa* podría explicarse por su mayor exhibición floral. No obstante, no puede descartarse que los polinizadores observados en este TFG presenten una actividad diferencial entre ambas especies.

Observaciones en materiales cultivados ex situ

Un punto de partida fundamental en el estudio de los sistemas reproductivos es la caracterización estructural y funcional de la flor (Faegri y van der Pijl, 1979; Weberling 1989; Bell 1991). Desde el punto de vista funcional, una flor podría considerarse como una estructura compuesta en la que la complejidad de sus componentes (con excepción de algunos procesos de exaptaciones y las restricciones filogenéticas) están adaptadas a la reproducción, principalmente sexual (Endress 1994). En este sentido, los análisis realizados bajo condiciones controladas (no expuestos a insectos polinizadores) estuvieron enfocados a generar conocimiento que permita interpretar el rol reproductivo de las variantes estructurales y funcionales de las flores que presentan las dos especies estudiadas.

Los datos de tamaño de flor abiertas demuestran dimensiones mayores (estadísticamente significativo) en *A. correntina* que en *A. villosa* para varios de los caracteres analizados, entre ellos el ancho del estandarte y la longitud del hipantio según el análisis de PCA. Cuando estos dos caracteres se combinaron con la densidad de flores en campo para estimar exhibición floral (Goodwillie *et al.* 2009), las diferencias entre las especies se volvieron muy significativas, aproximadamente 20 veces mayor en *A. correntina*.

Al respecto se ha propuesto que la tasa de alogamia está más fuertemente asociada con la dimensión de la exhibición floral conjunta (producto del tamaño de la flor y el número de flores/m²) que con el tamaño de la flor o densidad floral considerados de manera aislada (Goodwillie *et al.* 2009). A su vez, estos autores sugieren que una relación positiva entre la tasa de alogamia y exhibición floral, estaría en

concordancia con la teoría de asignación de recursos para reproducción sexual, que propone que la inversión total en estructuras atractivas por inflorescencia, en este caso parcelas de las poblaciones, es menor en las especies autóгамas. Por ende, una menor asignación a estructuras de atracción en especies autóгамas permitiría una mayor inversión de recursos reproductivos en la provisión de frutos o semillas (Lloyd 1987), lo que podría explicar, en parte, la tendencia a ratios más altos de fruto–flor y semilla–óvulo en especies autóгамas respecto de especies alógamas (Charlesworth 1989). Este razonamiento, podría explicar en parte, la alta producción de semillas citada usualmente por coleccionistas para *A. villosa* comparada con *A. correntina* en poblaciones naturales. Los experimentos a campo orientados a dilucidar la producción diferencial de semillas de plantas de ambas especies en condiciones naturales se encuentran en curso.

En cuanto a los aspectos funcionales, la receptividad del estigma es una etapa crucial en la maduración de la flor que puede influir en gran medida en la tasa de autopolinización, el éxito de la polinización en diferentes etapas de la flor, y en la interferencia entre las funciones masculina y femenina, entre otras (Rathcke 1983; Knox *et al.* 1986; Galen *et al.* 1987; Barrett 2002). Es por ello, que las pruebas sobre el momento y la duración de la receptividad estigmática son fundamentales para comprender los resultados de estudios de cruzamientos y de polinización artificial (Stone *et al.* 1995). El patrón temporal observado, sugiere que ambas especies presentan dicogamia protogínica parcial, es decir, las flores hermafroditas muestran receptividad estigmática que se inicia varias horas (9-10 h) antes de la dehiscencia de las anteras y se extiende casi por al menos 18 h (18 h del día 1 a 12 h del día 2), mientras que la liberación de polen ocurre recién a las 03- 04 h del día 2. Esta asincronía parcial evidenciando protoginia en una primera fase podría ser interpretado como un mecanismo favorecedor de la alogamia. Sin embargo, la superposición funcional de ambos sexos en una segunda etapa (entre las 04 h y las 12 h del día 2) permitiría la autopolinización, sistema reproductivo característico propuesto para el género *Arachis* (Krapovickas y Gregory 1994) y de otras leguminosas con mecanismos semejantes (Susó *et al.* 2015).

En las especies analizadas de *Arachis*, la protoginia observada no tendría relevancia para promover alogamia, ya que la fase inicial de receptividad estigmática ocurre alrededor de las 18:30 h del día 1, en estadio de botón floral y cuando no hay actividad de polinizadores himenópteros. Estudios previos han señalado que la efectividad de la dicogamia, en este caso la protoginia, para promover la alogamia depende críticamente de que las flores estén abiertas y su coincidencia con los horarios de actividad de los polinizadores (Lloyd y Webb 1986; Harder y Barrett 1996; Barrett 2002). Cuando la asincronía sexual ocurre en horas en que la flor permanece cerrada o sin visitantes, su valor adaptativo como mecanismo promotor de la alogamia es limitado o nulo, que sería el caso observado en las especies *Arachis* estudiadas.

En el periodo de solapamiento funcional entre las fases femenina y masculina, el estigma en ambas especies —localizado en la porción distal del estilo y protegido dentro de la porción distal de la quilla— se encuentra separado espacialmente de las anteras, espacio mayormente ocupado por el cepillo estilar. Esta separación espacial de los órganos sexuales en una flor hermafrodita, constituye otro factor que promueve la reducción de la autopolinización mediante la disminución del contacto directo entre el polen propio y el estigma (Lloyd y Webb 1986; Barrett 2002).

En *A. correntina*, la hercogamia observada se ve reforzada por la pequeña superficie estigmática, situada en el extremo de la quilla y protegida por densas papilas periestigmáticas, lo que dificulta el

contacto con el polen propio y, por tanto, reduce la probabilidad de autopolinización. En contraste, en *A. villosa*, la superficie estigmática es más amplia, plana y retrorsa, quedando más expuesta y aumentando la probabilidad de contacto con el polen de las anteras de la misma flor, lo que podría disminuir la eficacia de la hercogamia y favorecer la autopolinización (Lu *et al.* 1990).

Un mecanismo adicional que podría reducir o anular esta separación espacial es el alargamiento tardío del filamento de las anteras pequeñas, inferido a partir de la comparación entre la posición de estas anteras en botones florales y flores abiertas. En este proceso, las anteras pequeñas con escaso contenido de polen y que inicialmente se ubican en una posición más proximal que las anteras grandes—productoras de la mayor parte de la masa polínica— (Fig. 14A), experimentan un desplazamiento durante la dehiscencia o post-dehiscencia, posicionándose distalmente a las anteras grandes (Fig. 14B). Este movimiento, determinado por el alargamiento de los filamentos estaminales (de unas 1100 -1400 μm) funciona como un “ébolo floral” que impulsa el polen hacia el ápice de la quilla (Paulino *et al.* 2016). Durante este trayecto, el polen atraviesa el cepillo estilar, cuyos pelos antrorsos parecen no obstaculizar el movimiento hacia la punta de la quilla (Fig. 14C) (Claßen-Bockhoff *et al.* 2004b; Brantjes 1981a, b).

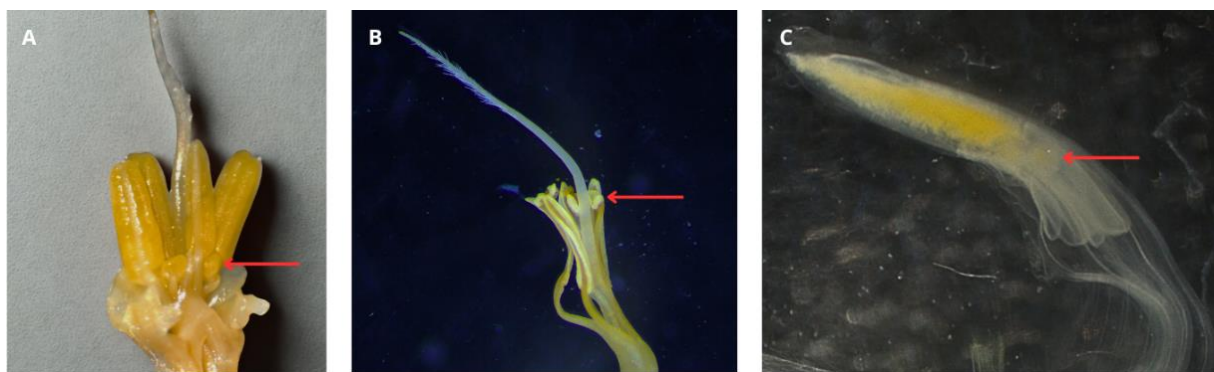


Figura 14. Disposición de las anteras pequeñas en distintos estadios del desarrollo floral de *Arachis*. A. Anteras pequeñas en botones florales a las 7:55 h. B. Anteras pequeñas elongadas en flores abiertas a las 12:00 h. C. Clarificación de la quilla de flor abierta mediante tratamiento con NaOH. Las flechas rojas señalan las anteras pequeñas en cada panel.

Este mecanismo de ébolo cargador de cepillo probablemente funcione diferencialmente en ambas especies. En *A. villosa* podría favorecer el contacto directo de la superficie retrorsa del estigma con el polen de la propia flor, superando las dificultades impuestas por la hercogamia, sin necesidad de intervención de polinizadores, a la vez que el cepillo queda cargado de polen para una eventual visita de polinizadores. Por su parte, en *A. correntina* este mecanismo no aumentaría las chances de polinización con polen de la propia flor debido a la morfología del estigma y de las papilas periestigmáticas, sino que cargaría el cepillo para que cuando los polinizadores activen el sistema de alas y quilla, el polen sea arrastrado hacia afuera de la quilla por el cepillo. Por otra parte, como el estigma se localiza por sobre la carga polínica propia en el cepillo, al ser exertado por el tripping de la flor, el primer contacto con polen será con el que transporta el polinizador, favoreciendo la alogamia, aunque aún se requiere de más observaciones de campo para confirmar esta hipótesis.

El conjunto de caracteres y mecanismos descriptos en ambas especies habrían evolucionado para favorecer la alogamia (manteniendo separación espacial y funcional efectiva) en *A. correntina* y para facilitar la autogamia en *A. villosa*, como lo reportado por otros grupos de angiospermas (Lloyd y Webb 1986; Harder y Barrett 1996). En este sentido, la aparición de una superficie estigmática ampliada y retrorsa, sumada al crecimiento diferencial del filamento estaminal de las anteras pequeñas causando el desplazamiento de polen hacia la parte distal de la quilla, habría sido clave para la promoción de la autogamia en *A. villosa*, anticipando la autofecundación por el mecanismo de émbolo, a la alogamia promovida por la acción del tripping por parte de los polinizadores.

Experimentos bajo condiciones controladas

Los ensayos experimentales de eficiencia reproductiva en condiciones controladas evidenciaron diferencias marcadas entre las especies. En *A. villosa*, la elevada eficiencia reproductiva (72,6 %) evidencia un sistema reproductivo capaz de formar semillas por autogamia muy eficiente en el periodo evaluado. Este resultado concuerda con lo esperado a partir de las observaciones de morfología funcional de las flores descripta en este TFG para la especie y con las observaciones de campo. En contraste, en *A. correntina* la no elongación de ginóforos bajo las mismas condiciones de cultivo controlado, evidenció la ausencia de autofecundación espontánea efectiva. Estos datos están en plena concordancia con los demás análisis obtenidos de morfología funcional y observaciones de campo, que sugieren un sistema reproductivo que promueve la polinización con polen de otra flor, por alogamia o geitonogamia.

Por otra parte, en los ensayos de acción manual de las alas y quilla (tripping) simulando el movimiento de los polinizadores la eficiencia reproductiva fue baja en ambas especies (2,38 % en *A. villosa* y 2 % en *A. correntina*), incluso inferior a la registrada por autogamia espontánea en *A. villosa*. La falta de elongación de ginóforos en los ensayos con tripping manual sugiere que, aunque la manipulación de las flores imita parcialmente el movimiento que realizan los polinizadores sobre las alas y la quilla floral, no reproduce con precisión las condiciones mecánicas y fisiológicas necesarias para lograr una transferencia de polen efectiva. En las flores papilioideas, la columna reproductiva (estambres y estigma) está encerrada dentro de la quilla de la flor y queda expuesta cuando el polinizador presiona contra el ala y los pétalos de la quilla (Mabin *et al.* 2024). Durante el proceso de tripping, el estigma roza el cuerpo del polinizador cargado de polen, mientras las anteras liberan simultáneamente nueva carga polínica sobre él (Paulino *et al.* 2016; Mabin *et al.* 2024). Por lo tanto, bajo condiciones experimentales, aun cuando se simule la actividad mecánica sobre los pétalos y la quilla, es probable que en ausencia de polinizadores la masa de polen quede desviada y no alcance el estigma —como se ha observado al registrarse la deposición de polen sobre el estandarte (dato no mostrado)—, lo que explicaría la falta de fecundación.

Considerando estas observaciones y los rasgos morfológicos de *A. correntina*, se esperaría que, en las poblaciones naturales, la combinación de la acción de tripping promovida por polinizadores con el mecanismo de presentación de polen tipo pistón incrementa la eficiencia de polinización al facilitar el contacto del estigma con el polen previamente acumulado en el insecto (Suso *et al.* 2015).

Implicancias genéticas de los diferentes sistemas reproductivos en las poblaciones de *Arachis*

La combinación de los sistemas reproductivos, flujo génico y dispersión de semillas determina el tamaño efectivo poblacional (N_e), la estructura genética y la variación disponible para la evolución. En especies con autogamia alta y dispersión extremadamente limitada, la genética de poblaciones predice incrementos marcados en la homocigosidad, mayor diferenciación entre plantas vecinas y reducción del N_e (Wright 1931; Dobzhansky 1937; Charlesworth y Charlesworth 1995; Hamrick y Godt 1996). Por el contrario, sistemas con mayor alogamia y transferencia de polen por polinizadores promueven el flujo génico, incremento del N_e y reducción de la deriva genética dentro de microparches espaciales (Ellstrand 2014). En plantas geocárpicas como *Arachis*, donde las semillas prácticamente no se dispersan más allá de la extensión de las ramas, el intercambio de polen es el principal mecanismo de flujo génico. Por ello, incluso diferencias sutiles en la presentación del polen, accesibilidad del estigma o eficiencia de la autogamia pueden generar patrones fuertemente contrastantes de estructura genética fina, moldeando los acervos genéticos, incluso a escalas tan pequeñas como de unos pocos metros (Vekemans y Hardy 2004).

En este contexto teórico, los sistemas reproductivos diferenciales observados en las dos especies de *Arachis* aquí estudiadas podrían estar influenciando la variabilidad y estructura genética de las poblaciones. En *A. correntina*, la evidencia de un sistema reproductivo que promueve la alogamia mediada por polinizadores incrementaría el flujo génico y generaría mayores niveles de heterocigosidad debido al intercambio de alelos entre plantas vecinas a través polinizaciones cruzadas. Esta hipótesis es totalmente compatible con los valores de heterocigosidad citada recientemente para distintas poblaciones de *A. correntina* (Moreno *et al.* 2025). En contraste, el sistema reproductivo que promueve la autogamia en *A. villosa*, en conjunto con la geocarpia, favorecería el establecimiento de linajes individuales, aumentando la homocigosidad dentro de cada uno de ellos. Esta predicción de baja heterocigosis en los individuos también fue recientemente observada en las poblaciones de *A. villosa* analizadas (Moreno *et al.* 2025). En este contexto, los efectos de la deriva genética podrían favorecer la fijación aleatoria de alelos y reducir aún más la variabilidad dentro de cada microparche, mitigados, en parte, por eventuales fecundaciones cruzadas mediadas por polinizadores.

El conjunto de datos evidencia como pequeños cambios estructurales en los órganos reproductivos podrían tener una gran influencia en la magnitud y distribución de la variabilidad genética en los acervos genéticos, en la dinámica evolutiva de las poblaciones, y probablemente en el potencial evolutivo de las especies de *Arachis*. Estas diferencias adquieren especial relevancia para la colección, conservación y el manejo tanto de sus poblaciones naturales como de las accesiones de germoplasma mantenidas *ex situ*.

5. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio revelan diferencias claras en los sistemas reproductivos de *Arachis correntina* y *A. villosa*. La primera presenta un sistema predominantemente alógamo, mientras que la segunda exhibe un sistema autógeno altamente eficiente aceptando la hipótesis que ambas especies presentan sistemas reproductivos diferenciales.

Estos sistemas reproductivos diferenciales están determinados por diferencias en caracteres florales, que por un lado incluyen la morfología del estigma que favorece la autofecundación en *A. villosa* y por otro el tamaño de las flores, que, en conjunto con la densidad floral, aumentan la exhibición promoviendo la alogamia en *A. correntina*; *confirmando* la segunda hipótesis.

Por primera vez, se documentó la actividad de polinizadores nativos pertenecientes a diversos grupos taxonómicos en poblaciones naturales de *Arachis*, y que estos insectos activan efectivamente el sistema de quilla y alas de las flores promoviendo la alogamia, confirmando la tercera hipótesis.

Los mecanismos reproductivos evidenciados para estas especies silvestres de *Arachis* tienen implicancias directas para la conservación *in situ* y *ex situ*, ya que comprender la dependencia de polinizadores para la reproducción efectiva y las estrategias de autopolinización, permite planificar de manera adecuada la preservación de poblaciones naturales y el mantenimiento de diversidad genética. Asimismo, los hallazgos aportan información valiosa para programas de mejoramiento de maní, al evidenciar cómo la morfología floral y la interacción con polinizadores pueden influir en la eficiencia reproductiva y en la producción de semillas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Arya, S. S., Salve, A. R., y Chauhan, S. (2016). Peanuts as functional food: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 31–41. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2007-9>
- Banks, D. J. (1990). Hand-tripped flowers promote seed production in *Arachis lignosa*, a wild peanut. *Peanut Science*, 17(1), 22–24. <https://doi.org/10.3146/i0095-3679-17-1-8>
- Barrett, S. C. H. (2002). Sexual interference of the floral kind. *Heredity*, 88, 154–159. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800020>
- Barrett, S. C. H. (2010). Understanding plant reproductive diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1537), 99–109. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0199>
- Bell, M. J., Shorter, R., y Mayer, R. (1991). Cultivar and environmental effects on growth and development of peanuts (*Arachis hypogaea* L.). II. Reproductive development. *Field Crops Research*, 27(1–2), 35–49. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(91\)90020-V](https://doi.org/10.1016/0378-4290(91)90020-V)
- Bertioli, D. J., Seijo, G., Freitas, F. O., Valls, J. F. M., Leal-Bertioli, S. C. M., y Moretzsohn, M. C. (2011). An overview of peanut and its wild relatives. *Plant Genetic Resources*, 9(1), 134–149. <https://doi.org/10.1017/S1479262110000444>
- Bertioli, D. J., Jenkins, J., Clevenger, J., Dudchenko, O., Gao, D., Seijo, G., et al. (2019). The genome sequence of *Arachis hypogaea* and the evolution of legume polyploidy. *Nature Genetics*, 51(5), 865–871. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0405-z>
- Bertioli, D. J., Abernathy, B., Seijo, G., et al. (2020). Evaluating two different models of peanut's origin. *Nature Genetics*, 52, 557–559. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-0626-1>
- Bertioli, D. J., Clevenger, J., Godoy, I. J., Stalker, H. T., Wood, S., et al. (2021). Legacy genetics of *Arachis cardenasii* in the peanut crop shows the profound benefits of international seed exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(38), 1–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.2104899118>
- Brantjes, N. B. M., y De Vos, O. C. (1981). The explosive release of pollen in flowers of *Hyptis* (Lamiaceae). *New Phytologist*, 87, 425–430. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1981.tb03213.x>
- Brantjes, N. B. M. (1981a). Floral mechanics in *Phlomis* (Lamiaceae). *Annals of Botany*, 47, 279–282. <https://www.jstor.org/stable/42754263>
- Brantjes, N. B. M. (1981b). Mechanical aspects of the corolla, a quantitative and functional approach. *Acta Botanica Neerlandica*, 30, 317.

- Bukart, A. (1952). Las leguminosas argentinas. *Aemé Agency: Buenos Aires*, 1, 156-143.
- Cámara Argentina del Maní. (2025). *Informe anual del sector manicero argentino 2025*.
<https://www.camaradelmani.org.ar/>
- Carvalho da Costa, L. (2012). *Biologia floral de espécies do gênero Arachis L. (Fabaceae-Papilionoideae), com ênfase em aspectos da morfologia floral e na anatomia de ovários* [Tesis doctoral, Universidade de Brasília]. Universidade de Brasília.
- Charlesworth, D., y Charlesworth, B. (1981). Allocation of resources to male and female functions in hermaphrodites. *Biological Journal of the Linnean Society*, 15(1), 57–74.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1981.tb00748.x>
- Charlesworth, B. (1989). The evolution of sex and recombination. *Trends in Ecology y Evolution*, 4(9), 264–267. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(89\)90196-1](https://doi.org/10.1016/0169-5347(89)90196-1)
- Charlesworth, D., y Charlesworth, B. (1995). Quantitative genetics in plants: The effect of the breeding system on genetic variability. *Evolution*, 49(5), 911–920.
- Charnov, E. L. (1982). Parent–offspring conflict over reproductive effort. *The American Naturalist*, 119(5), 742–748. <https://doi.org/10.1086/283947>
- Claßen-Bockhoff, R., Speck, T., Tweraser, E., Wester, P., Thimm, S., y Reith, M. (2004). The staminal lever mechanism in *Salvia* L. (Lamiaceae): A key innovation for adaptive radiation? *Organisms Diversity y Evolution*, 4(3), 189–205. <https://doi.org/10.1016/j.ode.2004.01.004>
- Córdoba, S. A., y Cocucci, A. A. (2011). Flower power: Its association with bee power and floral functional morphology in papilionate legumes. *Annals of Botany*, 108, 919–931.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcr196>
- Cocucci, A. A. (1989). El mecanismo floral de *Schizanthus* (Solanaceae). *Kurtziana*, 20, 113–132.
- Cruden, R. W. (1977). Pollen-ovule ratios: A conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, 25, 32–46. <https://doi.org/10.2307/2407542>
- de Blas, F. J., Bressano, M., Teich, I., Balzarini, M. G., Arias, R. S., et al. (2019). Identification of smut resistance in wild *Arachis* species and its introgression into peanut elite lines. *Crop Science*, 59(4), 1657–1665. <https://doi.org/10.2135/cropsci2018.10.0656>
- de Blas, F. J., Bruno, C. I., Arias, R. S., Ballén-Taborda, C., Mamani, E., Oddino, C., ... y Massa, A. N. (2021). Genetic mapping and QTL analysis for peanut smut resistance. *BMC Plant Biology*, 21(1), 312. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03023-4>
- Di Rienzo, J., Balzarini, M., González, L., Casanoves, F., Tablada, M., y Robledo, C. W. (2010). *Infostat: software para análisis estadístico*. FCA-UNCórdoba.
- Dobzhansky, T. (1937). Genetic nature of species differences. *The American Naturalist*, 71(735), 404–420.
<https://doi.org/10.1086/280726>
- Etcheverry, A. V. (2001). Dynamic dispensing of pollen: An empirical study. En VIII International Symposium on Pollination – Pollination: Integrator of Crops and Native Plant Systems (Vol. 561, pp. 67–70).
- Edwards, J., Whitaker, D., Klionsky, S., y Laskowski, M. (2005). A record-breaking pollen catapult. *Nature*, 435, 164. <https://doi.org/10.1038/435164a>
- Ellstrand, N. C. (2014). Is gene flow the most important evolutionary force in plants? *American Journal of Botany*, 101(5), 737–753.

- Endress, P. K. (1994). Floral structure and evolution of primitive angiosperms: Recent advances. *Plant Systematics and Evolution*, 192, 79–97. <https://doi.org/10.1007/BF00985910>
- FAO. (2019). *FAOSTAT statistical database*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/faostat/en/>
- FAO. (2024). *FAOSTAT statistical database*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/faostat/en/>
- Faegri, K., y van der Pijl, L. (1966). *The principles of pollination ecology*. (1st ed.). Oxford: Pergamon Press.
- Faegri, K., y van der Pijl, L. (1979). *The principles of pollination ecology*. (3rd ed.). Oxford: Pergamon Press.
- Fernández, A., y Krapovickas, A. (1994). Cromosomas y evolución en *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia*, 8(1–4), 187–220. <https://www.jstor.org/stable/41941178>
- García, A. V., Chalup, L., y Seijo, J. G. (2024). Toward the development of a cross-compatibility framework to enhance the utilization of peanut CWRs. *Crop Science*, 1–16. <https://doi.org/10.1002/csc2.21332>
- García, A. V., De Blas, F., Moreno, E. M. S., y Seijo, J. G. (2025). Reproductive efficiency and asymmetric barriers outweigh genetic distance and genome type in the crossability among peanut wild relatives. *American Journal of Botany* (in press).
- Galen, C., Zimmer, K. A., y Newport, M. E. (1987). Pollination in floral scent morphs of *Polemonium viscosum*: A mechanism for disruptive selection on flower size. *Evolution*, 41(3), 599–606.
- Grabiele, M., Chalup, L., y Robledo, G. (2012). Genetic and geographic origin of domesticated peanut as evidenced by 5S rDNA and chloroplast DNA sequences. *Plant Systematics and Evolution*, 298(6), 1151–1165. <https://doi.org/10.1007/s00606-012-0627-3>
- Graham, E. (1941). *Legumes for erosion control and wildlife*. Miscellaneous Publication 412. U.S. Department of Agriculture.
- Gregory, W. C., Krapovickas, A., Smith, B. W., y Yarbrough, J. A. (1973). Structure and genetic resources of peanuts. En *Peanuts – Culture and Uses* (pp. 47–133). American Peanut Research and Education Association.
- Goodwillie, C., Sargent, R. D., Eckert, C. G., Elle, E., Geber, M. A., Johnston, M. O., Kalisz, S., Moeller, D. A., Ree, R. H., Vallejo-Marín, M., y Winn, A. A. (2010). Correlated evolution of mating system and floral display traits in flowering plants and its implications for the distribution of mating system variation. *New Phytologist*, 185(2), 311–321. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03043.x>
- Gori, D. F. (1983). Post-pollination phenomena and adaptive floral changes. In C. E. Jones y R. J. Little (Eds.), *Handbook of experimental pollination biology* (pp. 31–49). Van Nostrand Reinhold.
- Hamrick, J. L., y Godt, M. J. W. (1996). Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 351, 1291–1298.
- Harder, L. D., & Barrett, S. C. H. (1996). Pollen dispersal and mating patterns in animal-pollinated plants. En D. G. Lloyd & S. C. H. Barrett (Eds.), *Floral biology* (pp. 140–190). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1165-2_6
- Holbrook, C. C., y Stalker, H. T. (2003). Peanut breeding and genetic resources. En J. Smartt (Ed.), *The peanut: The genus Arachis* (pp. 207–233). CRC Press. DOI:10.1002/9780470650202
- Holsinger, K. E. (1996). The scope and the limits of conservation genetics [Review of *Conservation genetics: Case histories from nature*, by J. C. Avise y J. L. Hamrick]. *Evolution*, 50(6), 2558–2561. <https://doi.org/10.2307/2410726>

- Husted, L. (1936). Cytological studies on the peanut, *Arachis*. *Botanical Gazette*, 97(3), 599–617.
<https://doi.org/10.1508/cytologia.7.396>
- Inglis, P. W., Custodio, A. R., Seijo, J. G., Valls, J. F. M., y Moretzsohn, M. C. (2025). A slow march along the South American Dry Diagonal: A multi-gene molecular phylogeny and biogeographical history of the peanut genus, *Arachis* L. *Annals of Botany*, 136(4), 795–820.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcaf139>
- Knox, R. B., Williams, E. G., y Dumas, C. (1986). Pollen, pistil, and reproductive function in crop plants. In J. Janick (Ed.), *Plant breeding reviews* (Vol. 4, pp. XX–XX). Wiley.
<https://doi.org/10.1002/9781118061015.ch2>
- Krapovickas, A., y Gregory, W. (1994). *Taxonomía del género Arachis* (Leguminosae) (pp. 1–186).
<https://www.jstor.org/stable/41941177>
- Lu, J., Mayer, A., y Pickersgill, B. (1990). Stigma morphology and pollination in *Arachis* L. (Leguminosae). *Annals of Botany*, 66(1), 73–82. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a088002>
- Lloyd, D. G., y Webb, C. J. (1986). The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms I. Dichogamy. *New Zealand Journal of Botany*, 24(1), 135–162.
<https://doi.org/10.1080/0028825X.1986.10409725>
- Lloyd, D. G. (1987). Allocations to pollen, seeds and pollination mechanisms in self-fertilizing plants. *Functional Ecology*, 1(2), 83–89. <https://doi.org/10.2307/2389709>
- Mabin, M. D., Slawin, C., Lynch, A. M., Fragoso, F., y Brunet, J. (2024). The tripping mechanism of flowers affects pollen transfer dynamics. *Journal of Pollination Ecology*, 36, 1–13.
[https://doi.org/10.26786/1920-7603\(2023\)770](https://doi.org/10.26786/1920-7603(2023)770)
- Moreno, S., De Blas, F., y Seijo, G. (2023). Variabilidad y estructuración genética de *Arachis correntina*, pariente silvestre perenne del maní cultivado. *Journal of Basic and Applied Genetics, Supl. Vol. 34*. Sociedad Argentina de Genética.
- Moreno, S., Pérez, G., García, A., y Seijo, G. (2025). Evidencias genético-poblacionales y reproductivas contrastantes en especies hermanas de *Arachis*. *Journal of Basic and Applied Genetics, Supl. Vol. 36*. Sociedad Argentina de Genética.
- Oliveira, M. A. P., y Valls, J. F. M. (2003). Morphological characterization and reproductive aspects in genetic variability studies of forage peanut. *Scientia Agricola*, 60(2), 299–304.
- Osborn, M. M., Kevan, P. G., y Lane, M. A. (1988). Pollination biology of *Opuntia polyacantha* and *Opuntia phaeacantha* (Cactaceae) in southern Colorado. *Plant Systematics and Evolution*, 159(1–2), 85–94. <https://doi.org/10.1007/BF00937427>
- Otto, J. C. S. (2007). *Determinação do grau de homozigose de genótipos selecionados do híbrido natural W34b (BRA 031143) da espécie Arachis pintoi Krapov. y Gregory, por meio de marcadores moleculares* (Dissertação de mestrado). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu.
- Paulino, J. V., de Freitas Mansano, V., y Prenner, G. (2016). Evidence for division of labor and division of function related to the pollen release in Papilionoideae (Leguminosae) with a heteromorphic androecium. *International Journal of Plant Sciences*, 177(7), 590–607

- Pérez, G. A., García, A. V., González, A. M., y Seijo, J. G. (2024). Diversidad de estilo-estigma en especies de *Arachis* con diferentes ciclos de vida y genomas. *Abstracts – V Jornadas Paraguayas de Botánica. Steviana*. ISSN 2304-2907.
- Pittenger, T. H., and E. F. Frolik. 1951. Temporary mounts for pollen abortion determinations. *Stain Technology* 26: 181–184.
- Rathcke, B. 1983. Competition and facilitation among plants for pollination. In: *Pollination Biology* (L. Real, ed.), pp. 305– 329. Academic Press, New York.
- Ren, X., Jiang, H., Yan, Z., Chen, Y., Zhou, X., Huang, L., ... y Liao, B. (2014). Genetic diversity and population structure of the major peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars grown in China by SSR markers. *PLoS ONE*, 9(2), e88091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088091>
- Ren, X., Jiang, H., Yan, Z., Chen, Y., Zhou, X., Huang, L., ... Liao, B. (2014). Genetic diversity and population structure of the major peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars grown in China by SSR markers. *PLOS ONE*, 9(2), e88091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088091>
- Robledo, G., Lavia, G. I., y Seijo, G. (2009). Species relations among wild *Arachis* species with the A genome as revealed by FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection. *Theoretical and Applied Genetics*, 118, 1295–1307. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-0981-x>
- Robledo, G., y Seijo, G. (2008). Characterization of the *Arachis* (Leguminosae) D genome using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) chromosome markers and total genome DNA hybridization. *Genetics and Molecular Biology*, 31, 717–724. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572008000400019>
- Robledo, G., y Seijo, G. (2010). Species relationships among the wild B genome *Arachis* species (section *Arachis*) based on FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection: A new proposal for genome arrangement. *Theoretical and Applied Genetics*, 121, 1033–1046. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1369-7>
- Rosso, M. H., De Blas, F. J., Massa, A. N., Oddino, C., Giordano, D. F., Seijo, J. G., ... y Bressano, M. (2023). Two QTLs govern the resistance to *Sclerotinia minor* in an interspecific peanut RIL population. *Crop Science*, 63(2), 613–621. <https://doi.org/10.1002/csc2.20875>
- Santana, S. H., y Valls, J. F. M. (2015). *Arachis veigae* (Fabaceae), the most dispersed wild species of the genus, and yet taxonomically overlooked. *Bonplandia*, 24(2), 139–150. <https://www.jstor.org/stable/26413093>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., et al. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Seijo, G., Lavia, G. I., Fernández, A., Krapovickas, A., Ducasse, D., Bertoli, D. J., y Moscone, E. A. (2004). Physical mapping of the 5S and 18S–25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaënsis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). *American Journal of Botany*, 91(9), 1294–1303. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.9.1294>
- Seijo, G., Lavia, G. I., Fernández, A., Krapovickas, A., Ducasse, D. A., Moscone, E. A., y Bertoli, D. J. (2007). Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*, Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. *American Journal of Botany*, 94(12), 1963–1971. <https://doi.org/10.3732/ajb.94.12.1963>

- Seijo, J. G. (2012). *Novel diversity in wild peanut relatives and the importance of their conservation in South America*. En Symposium of Conservation of Regional Crop Wild Relatives, 6th International Congress in Crop Sciences, Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Seijo, G., Samoluk, S. S., Ortiz, A. M., Silvestri, M. C., Chalup, L., Robledo, G., y Lavia, G. I. (2017). Cytological features of peanut genome. En R. K. Varshney, M. K. Pandey, y N. Puppala (Eds.), *The Peanut Genome* (pp. 37–52). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-63935-2_4
- Seijo, J. G., Kovalsky, E. I., Chalup, L. M. I., Samoluk, S. S., Fávero, A., y Robledo, G. A. (2018). Karyotype stability and genome-specific nucleolar dominance in peanut, its wild 4× ancestor, and a synthetic AABB polyploid. *Crop Science*, 58(4), 1671–1683.
- Seijo, G. J., Atahuachi, M., Simpson, C. E., y Krapovickas, A. (2021). *Arachis inflata*: A new B genome species of *Arachis* (Fabaceae). *Bonplandia*, 30(2), 169–174. <https://doi.org/10.30972/bon.3024942>
- Seijo, G. J., Atahuachi, M. B. M., García, A. V., y Krapovickas, A. (2025). *Arachis woodii* (Leguminosae): A new species from the Bolivian Pantanal. *Bonplandia*, 34, 5–11. <https://doi.org/10.30972/bon.3417880>
- Sérsic, A. N. (1991). Observaciones sobre el mecanismo floral de *Calceolaria* (Scrophulariaceae). *Kurtziana*, 21, 153–164.
- Settaluri, V. S., Kandala, C. V. K., Puppala, N., y Sundaram, J. (2012). Peanuts and their nutritional aspects—A review. *Food and Nutrition Sciences*, 3(12), 1644–1650. <https://doi.org/10.4236/fns.2012.312215>
- Silvestri, M. C., Ortiz, A. M., y Lavia, G. I. (2015). rDNA loci and heterochromatin positions support a distinct genome type for 'x = 9 species' of section *Arachis* (*Arachis*, Leguminosae). *Plant Systematics and Evolution*, 301, 555–562. <https://doi.org/10.1007/s00606-014-1092-y>
- Simpson, C. E. (1991). Pathways for introgression of pest resistance into *Arachis hypogaea* L. *Peanut Science*, 18(1), 22–26. <https://doi.org/10.3146/i0095-3679-18-1-8>
- Simpson, C. E. (2001). Use of wild *Arachis* species/introgression of genes into *Arachis hypogaea* L. *Peanut Science*, 28(2), 114–116. <https://doi.org/10.3146/i0095-3679-28-2-12>
- Leal-Bertioli, S. C. M., de Blas, F. J., Chavarro, M. C., Simpson, C. E., Valls, J. F. M., Tallury, S. P., Moretzsohn, M. C., Custodio, A. R., ... (2024). Relationships of the wild peanut species, section *Arachis*: A resource for botanical classification, crop improvement, and germplasm management. *American Journal of Botany*, 111(6). <https://doi.org/10.1002/ajb2.16357>
- Smith, B. W. (1950). *Arachis hypogaea*: Aerial flower and subterranean fruit. *American Journal of Botany*, 37(10), 802–815. <https://doi.org/10.2307/2437758>
- Stalker, H. T. (1991). A new species in section *Arachis* of peanuts with a D genome. *American Journal of Botany*, 78, 630–637. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1991.tb12587.x>
- Stalker, H. T., Tallury, S. P., Seijo, G., y Leal-Bertioli, S. C. (2016). Biology, speciation, and utilization of peanut species. En H. T. Stalker y R. F. Wilson (Eds.), *Peanuts* (pp. 27–66). AOCS Press. <https://doi.org/10.1016/B978-1-63067-038-2.00002-2>
- Stalker, H. T. (2017). Utilizing wild species for peanut improvement. *Crop Science*, 57(3), 1102–1120. <https://doi.org/10.2135/Stone>, J. L., Thomson, J. D., y Dent-Acosta, S. J. (1995). Assessment of

- pollen viability in hand-pollination experiments: A review. *American Journal of Botany*, 82(9), 1186–1197. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1995.tb11591.x>
- Suso, M. J., Bebeli, P. J., y Palmer, R. G. (2015). Reproductive biology of grain legumes. In A. M. De Ron (Ed.), *Grain legumes* (Handbook of Plant Breeding, Vol. 10, pp. 365–399). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2797-5_12
- Valls, J. F. M., y Simpson, C. E. (2005). New species of *Arachis* (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. *Bonplandia*, 14(1–2), 35–63. <https://www.jstor.org/stable/41941266>
- Valls, J. F. M., Da Costa, L. C., y Custodio, A. R. (2013). A novel trifoliolate species of *Arachis* (Fabaceae) and further comments on the taxonomic section *Trierectoides*. *Bonplandia*, 21(1), 91–97. <https://www.jstor.org/stable/43575384>
- Valls, J. F. M., y Simpson, C. E. (2017). Una nueva especie de *Arachis* (Fabaceae) de Mato Grosso, Brasil, afín a *A. matiensis*. *Bonplandia*, 26(2), 143–149. <https://doi.org/10.30972/bon.2622575>
- Vekemans, X., y Hardy, O. J. (2004). New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*, 13, 921–935.
- Uyenoyama, M. K. (1993). Genetic incompatibility as a eugenic mechanism. In N. W. Thornhill (Ed.), *The natural history of inbreeding and outbreeding: Theoretical and empirical perspectives* (pp. 60–73). University of Chicago Press.
- Weberling, F. (1989). Structure and evolutionary tendencies of inflorescences in the Leguminosae. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 29, 35–58.
- Willson, M. F. (1979). Sexual selection in plants. *The American Naturalist*, 113(6), 777–790. <https://doi.org/10.1086/283437>
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16(2), 97–159. <https://doi.org/10.1093/genetics/16.2.97>
- Wright, S. (1978). *Evolution and the genetics of populations: Vol. 4. Variability within and among natural populations*. University of Chicago Press. (ISBN 978-0-226-91052-9)



ANEXO