



Escuela Superior de Ciencias Exactas y Naturales

“Análisis genéticos en *Amburana cearensis* (roble criollo) para asistir a programas de conservación y restauración de las Yungas Argentinas”

Trabajo de Tesis para optar al título de: Licenciado/a en
Biología

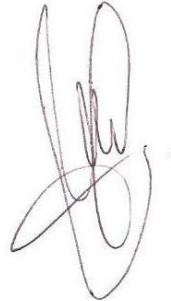
Alumna: Navarro, Florencia Denisse

(Matrícula: 48010704)

2023

Directora: Lic. María Cristina Soldati

- Título profesional: Licenciada en Genética.



Codirectora: Lic. Patricia Peralta

- Título profesional: Licenciada en Genética.
- Título académico: Master en ambiente y desarrollo sustentable.



Instituto de Recursos Biológicos, INTA, Castelar, Buenos Aires.

Marzo de 2023

INDICE GENERAL

DECLARACIÓN.....	6
ABREVIATURAS.....	7
1. RESUMEN.....	10
2. INTRODUCCIÓN.....	12
2.1 BOSQUES NUBLADOS DEL NEOTRÓPICO.....	12
2.2 SELVA TUCUMANO-BOLIVIANA O YUNGAS.....	13
2.2.1 DISTRIBUCIÓN LATITUDINAL Y ALTITUDINAL.....	15
2.2.2 USO, TRANSFORMACIÓN Y ESTADO DE CONSERVACIÓN DE LAS YUNGAS.....	19
2.3 LA ESPECIE.....	21
2.3.1 FAMILIA FABACEAE (LEGUMINOSAS).....	21
2.3.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	21
2.3.3 EXPLOTACIÓN DE LA ESPECIE Y LAS YUNGAS.....	23
2.3.4 USOS DE <i>AMBURANA CEARENSIS</i>	24
2.4 MARCADORES MOLECULARES.....	25
2.4.1 MICROSATÉLITES O SSRS.....	26
2.5 HIPÓTESIS.....	28
2.6 OBJETIVOS.....	28
2.6.1 OBJETIVO GENERAL.....	28
2.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1 ÁREA DE ESTUDIO.....	29
3.2 DESCRIPCIÓN DE LAS POBLACIONES ESTUDIADAS.....	29
3.3 ESTRATEGIA DE MUESTREO.....	30

3.4 MOLIENDA DEL MATERIAL VEGETAL.....	31
3.5 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN.....	31
3.6 MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES Y AMPLIFICACIÓN POR PCR.....	33
3.6.1 SEPARACIÓN Y DETECCIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS.....	35
3.7 ANÁLISIS DE DATOS.....	36
3.7.1 DIVERSIDAD GENÉTICA.....	37
3.7.1.1 VALIDACIÓN DE MARCADORES.....	37
3.7.1.2 PARÁMETROS DESCRIPTIVOS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA...38	
3.7.2 DIFERENCIACIÓN GENÉTICA.....	40
3.7.2.1 ANÁLISIS MOLECULAR DE LA VARIANZA (AMOVA).....	40
3.7.2.2 ESTRUCTURA POBLACIONAL UTILIZANDO MÉTODOS BAYESIANOS.....	40
3.7.2.3 FLUJO GÉNICO.....	41
3.7.3 DISTANCIA GENÉTICA.....	41
3.7.3.1 MATRIZ DE SIMILITUD (MS).....	41
3.7.3.2 ANALISIS DE AGRUPAMIENTO.....	42
3.7.3.3 TEST DE MANTEL.....	42
3.7.3.4 DISTANCIA GENÉTICA ENTRE POBLACIONES.....	43
4. RESULTADOS.....	44
4.1 VALIDACION DE LOS MARCADORES.....	44
4.2 DIVERSIDAD GENETICA.....	46
4.3 DIFERENCIACIÓN GENÉTICA.....	48
4.3.1 ANÁLISIS DE LA VARIANZA MOLECULAR (AMOVA).....	48

4.3.2 ESTRUCTURA POBLACIONAL UTILIZANDO MÉTODOS BAYESIANOS.....	49
4.3.3 FLUJO GÉNICO.....	51
4.4 DISTANCIAS GENÉTICAS.....	52
5. DISCUSIÓN.....	55
5.1 VALIDACION DE SSRs.....	55
5.2 DIVERSIDAD GENETICA.....	56
5.3 DIFERENCIACION GENETICA.....	59
5.4 DISTANCIAS GENÉTICAS.....	62
6. CONCLUSIONES.....	64
7. PROPUESTAS.....	65
8. BIBLIOGRAFÍA.....	66
9. AGRADECIMIENTOS.....	79

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Poblaciones de <i>A. cearensis</i> evaluadas en el NOA. Se detalla la cantidad de individuos colectados para cada población.....	31
Tabla 2: Secuencia de bases de ADN para par de “primers” utilizados. Se detallan los códigos de cada marcador y la fuente de origen.....	34
Tabla 3: Protocolo general de Amplificación de SSRs.....	34
Tabla 4: Condiciones ideales de amplificación para cada marcador estudiado. Se detallan el protocolo de ciclado, las concentraciones de MgCl ₂ y la temperatura de annealing de los SSRs.....	34
Tabla 5: Parámetros estadísticos descriptivos obtenidos para cada marcador. <i>An</i> : Alelos nulos, <i>Fis</i> : coeficiente de endogamia, <i>Ho</i> : heterocigosidad observada, <i>He</i> : heterocigosidad esperada.....	45
Tabla 6: Resultados del análisis de desequilibrio de ligamiento (DL). <i>P</i> : significancia del equilibrio (Valores menores a 0.05 indican DL), <i>CL</i> : combinación de los loci.....	45
Tabla 7: Parámetros descriptivos obtenidos sobre <i>Ae</i> , <i>Ho</i> , Diversidad Genética de Nei y <i>Uhe</i> para los seis marcadores.....	47
Tabla 8: Parámetros obtenidos para <i>Na</i> , número de alelos por locus y frecuencia alélica para los seis marcadores.....	48
Tabla 9: AMOVA realizado para las 7 poblaciones naturales de <i>A. cearensis</i> , considerando tres componentes de la varianza. <i>GL</i> : grados de libertad, <i>SC</i> : suma de cuadrados, <i>CV</i> : componentes de la varianza.....	49

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución de sectores latitudinales de las Yungas en el Noroeste de Argentina. Se detallan Áreas Protegidas de la región.....	14
Figura 2: Detalles de la corteza de <i>A. cearensis</i>	22
Figura 3: Detalles de las hojas de <i>A. cearensis</i>	23
Figura 4: Detalle de las semillas de <i>A. cearensis</i>	23
Figura 5: Esquema de amplificación y resolución de SSRs, en diferentes individuos.....	27
Figura 6: Mapa del NOA indicando las 7 poblaciones muestreadas de <i>A. cearensis</i>	29
Figura 7: Patrones de amplificación polimórficos de 3 marcadores SSR en <i>A. cearensis</i> , utilizando electroforesis en geles de poliacrilamida.....	46
Figura 8: AMOVA realizado para las 7 poblaciones naturales de <i>A. cearensis</i> , considerando tres componentes de la varianza.....	49
Figura 9: Distribución del Delta K.....	50
Figura 10: Contribución de los individuos / poblaciones de <i>A. cearensis</i> a los 2 grupos genéticos observados.....	51
Figura 11: Porcentaje de participación de las 7 poblaciones de <i>A. cearensis</i> en los 2 grupos genéticos K detectados.....	51
Figura 12: Correlación entre la Matriz de Similitud (MS) y la Matriz Cofenética (MC), obtenida a partir del fenograma, en función de los marcadores co-dominantes.....	52
Figura 13: Fenograma obtenido, a partir del método UPGMA, para los 84 individuos de <i>A. cearensis</i> analizados mediante los marcadores SSRs.....	53
Figura 14: Fenograma obtenido a partir de las distancias genéticas existentes entre las 7 poblaciones de <i>A. cearensis</i>	54

DECLARACIÓN

“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original, producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifiquen explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en otra institución. La reproducción total o parcial de la misma por cualquier medio, por parte de la Universidad de Morón, queda supeditada a la autorización del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).”

ABREVIATURAS

°C: Grados Centrígrados

μl: Microlitro

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Ae: Alelos exclusivos

AFLPs: Amplified Fragment Length Polymorphisms

AMOVA: Análisis molecular de la varianza

An: Alelos nulos

CL: Combinación de los loci

cm: Centímetros

CTAB: Bromuro de cetil trimetil amonio

DL: Desequilibrio de ligamiento

ds: Desvío estándar

EDTA: Etilen diamino tetra acetato

EHW: Equilibrio Hardy-Weinberg

F: Frecuencia alélica

F_{IS}: Coeficiente de endogamia

F_{st}: Coeficiente de diferenciación

GPS: Global Positioning System

ha: Hectáreas

He: Heterosigosidad esperada

Ho: Heterosigocidad observada

K: Grupos genéticos o “clusters”

Km: Kilómetros

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

m: Metros

MC: Matriz cofenética

mg/ml: Miligramos en mililitros

mg: Miligramos

mM: Milimolar

ml: Mililitros

mm: Milímetro

MS: Matriz de similitud

Na: Diversidad alélica

Ng: Nanogramo

Nm: Flujo génico histórico

NOA: Noroeste Argentino

Np: Número promedio de alelos por locus

OTU: Unidad taxonómica operativa

p/v: Peso en Volumen

P: Significancia del equilibrio

PCR: Polymerase Chain Reaction

r: Correlación cofenética

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphisms

rpm: Revoluciones por minuto

SAHN: Sequential Agglomerative Hierarchic Nonoverlapping

seg: segundos

STR: Short Sequence Repeats

Ta: Temperatura de annealing

TBE: Tris-Ácido Bórico-EDTA

TE: Tris-EDTA

UHe: Heterocigosidad esperada inesgada

UPGMA: Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average

VC: Vidrio corto

VL: Vidrio largo

1. RESUMEN

Amburana cearensis, también conocida como roble criollo, palo trébol y cerejeira, es una especie forestal perteneciente a la familia Fabaceae, con distribución en los bosques tropicales secos y de transición de Brasil, Bolivia, Perú, Paraguay y Argentina. En Argentina se encuentra restringida en la Selva Pedemontana de las Yungas, ecosistema que presenta un elevado número de especies forestales exclusivas, pero que al mismo tiempo se encuentra extremadamente amenazado debido a la tala de maderas valiosas como lo es la de *A. cearensis*. Este estrato es el más importante de las Yungas por su alta diversidad biológica en cuanto a especies animales y arbóreas. Históricamente es el piso que ha presentado una mayor presión antrópica, no solo por el aprovechamiento forestal, sino también por el intenso avance de la frontera agropecuaria. Actualmente *A. cearensis* está catalogada a nivel mundial como especie en peligro de extinción. En las provincias de Salta y Jujuy está prohibida su tala desde hace algunos años, sin embargo, la falta de control sobre la aplicación de los decretos que prohíben dicha tala, hace difícil la protección de la especie. Actualmente, tiene varios usos como la elaboración de muebles con alto valor económico y decoraciones, también se utiliza en investigaciones en el ámbito de la medicina, microbiología y conservación de la especie. El conocimiento de la variabilidad genética presente en las poblaciones naturales de *A. cearensis* puede resultar útil para complementar la información disponible sobre la especie, necesaria para delinear estrategias adecuadas de conservación y mejoramiento, en el largo plazo.

La diversidad y estructura genética de una especie se pueden estimar a través de marcadores moleculares, los cuales constituyen una herramienta valiosa para interpretar procesos evolutivos y de degradación de los recursos genéticos. En este trabajo se utilizaron los marcadores de tipo microsatélites (SSR), que son neutros, de tipo co – dominantes y que pueden ser visualizados en geles de agarosa o poliacrilamida.

En el presente trabajo de tesis se determinaron los niveles de diversidad, estructura y distancia genética, en siete poblaciones de roble criollo, distribuidas en el rango natural de la especie en Argentina. Los análisis moleculares se realizaron utilizando siete marcadores SSR desarrollados para la especie.

Los resultados obtenidos mostraron una diversidad génica moderada, destacándose la población de Piquirenda con los niveles de diversidad genética más elevados, así como también un mayor número de alelos exclusivos.

Se evidenció por medio de un análisis de la varianza molecular que la mayor variación genética se encuentra dentro de los individuos. Los niveles de diferenciación genética entre poblaciones si bien moderados, fueron altamente significativos. Al mismo tiempo, el número de grupos genéticos obtenidos fue de $K = 2$, distribuidos de forma heterogénea para dos de las siete poblaciones (Piquirenda y Fraile Pintado), evidenciando diferencias entre las poblaciones del norte y sur. Al mismo tiempo, estas dos poblaciones presentaron agrupamientos diferenciales cuando se evaluaron las distancias genéticas entre los individuos y entre las poblaciones, diferenciándose claramente de las restantes poblaciones.

Estos resultados indican que sería importante preservar dichas poblaciones por su comportamiento diferencial, al igual que la población de La Lucrecia por su cantidad de alelos exclusivos. El hecho de que ninguna de estas poblaciones se encuentre dentro de un área protegida pone en riesgo los remanentes de variabilidad genética de la especie. Estos resultados deberían impulsar la creación de medidas de conservación de la especie, tanto *in situ* como *ex situ*.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 BOSQUES NUBLADOS DEL NEO TRÓPICO

Los bosques tropicales cubren solo el 10% de la superficie terrestre y albergan entre la mitad y dos tercios de las especies del planeta, además de capturar y procesar grandes cantidades de carbono (Wright, 2010; Malhi y Grace, 2000; Groombridge y Jenkins, 2003). En el continente americano, se encuentra la mayor superficie de bosques tropicales (55%), seguido de Asia (33.8%) y África (33.8%), convirtiendo al neo trópico en un lugar de gran interés para el estudio de la biodiversidad y la conservación (Achard et al., 2007).

Los bosques nublados del neo trópico se extienden desde México hasta Argentina, y se caracterizan por la persistente cobertura de nubes, que reduce la radiación solar y el déficit de vapor. Además, las precipitaciones se ven aumentadas por el aporte de neblina interceptada por la vegetación. Existe también variación de las precipitaciones en relación a los niveles altitudinales donde se encuentran estos bosques. Los suelos suelen ser húmedos con una capa gruesa de materia orgánica humificada. Los valores de biodiversidad son altos en relación a los árboles, hierbas, arbustos y epifitas, también se observa un alto número de endemismos. (Brown et al., 2001). En Argentina recibe el nombre de “Selva Tucumano-Boliviana” o Yungas. Es una provincia biogeográfica perteneciente al dominio Amazónico, que se extiende por las laderas orientales de los Andes desde Venezuela hasta el Noroeste Argentino (Rivera et al., 2015).

Estos bosques poseen una alta tasa de biodiversidad y son reconocidos como un Área de Endemismos para las Aves del Mundo, además de albergar importantes poblaciones de grandes mamíferos (Rivera et al., 2015). Por otro lado, brindan servicios ecosistémicos a las sociedades, los cuales se definen según Quijas (2010) como: “componentes de los ecosistemas que se consumen directamente, que se disfrutan, o que contribuyen, a través de interacciones entre ellos, a generar condiciones adecuadas para el bienestar humano”. Estos pueden ser servicios de suministro, como son la diversidad de plantas, animales y microorganismos, los cuales ofrecen una amplia gama de alimentos, fuentes energéticas, materiales de construcción, medicinas, especies ornamentales, etc. Otro tipo de servicios son los de regulación que benefician a grandes regiones o

a todo el planeta como es la regulación climática, a través de sus efectos en la temperatura y en la humedad relativa. Sin embargo, también se incluyen la quema de bosques para convertirlos en campos agrícolas o ganaderos que, con el uso de fertilizantes, han provocado el aumento de gases de efecto invernadero. Por último, ofrecen servicios culturales que abarcan beneficios recreativos y estéticos, así como aquellos asociados a la cultura (Cayuela y Granzow-de la Cerda, 2012). A pesar de los altos niveles de biodiversidad y servicios ecosistémicos que resguardan, y debido en gran parte a los numerosos beneficios que aporta, su superficie ha sido transformada para trabajos de agricultura y la ganadería. Su situación actual es crítica, siendo uno de los ecosistemas más transformados del mundo, con un elevado nivel de impacto antrópico (Brown et al., 2001).

2.2 SELVA TUCUMANO-BOLIVIANA O YUNGAS

En Argentina, la selva Tucumano-Boliviana o Yungas se desarrolla en el noroeste, como una franja de aproximadamente 50 km de ancho, extendiéndose de forma discontinua desde la frontera con Bolivia (donde continua hacia el Norte pasando por Tarija, Chuquisaca y Santa Cruz de la Sierra) hasta la provincia de Catamarca (Brown et al., 2001) (Figura 1). Las Yungas ocupan una superficie de aproximadamente 5.200.000 ha (Yungas en sentido estricto y en transición), desde la frontera con Bolivia (23° latitud sur) hasta Catamarca (29° de latitud sur). Presentan una longitud de 600 km en sentido norte-sur y menos de 100 km de ancho, en un rango altitudinal entre los 400 y 3.000 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m) (Brown, 2006).

Son selvas de montaña subtropicales, con un marcado control altitudinal de la vegetación que incluyen un sector intermedio que conforma una selva nublada o nubiselva. La selva se dispone formando una faja alargada siguiendo los cordones montañosos y constituye la terminación austral de la selva amazónica que ingresa a través de Bolivia (Pereyra, 2012). Las Yungas ocupan laderas que presentan una distribución discontinua, dada por los cordones montañosos, lo que genera también una discontinuidad de la distribución geográfica de la biodiversidad. Se reconocen entonces tres sectores geográficos latitudinales (Norte, Centro y Sur) (Brown et al., 2002).

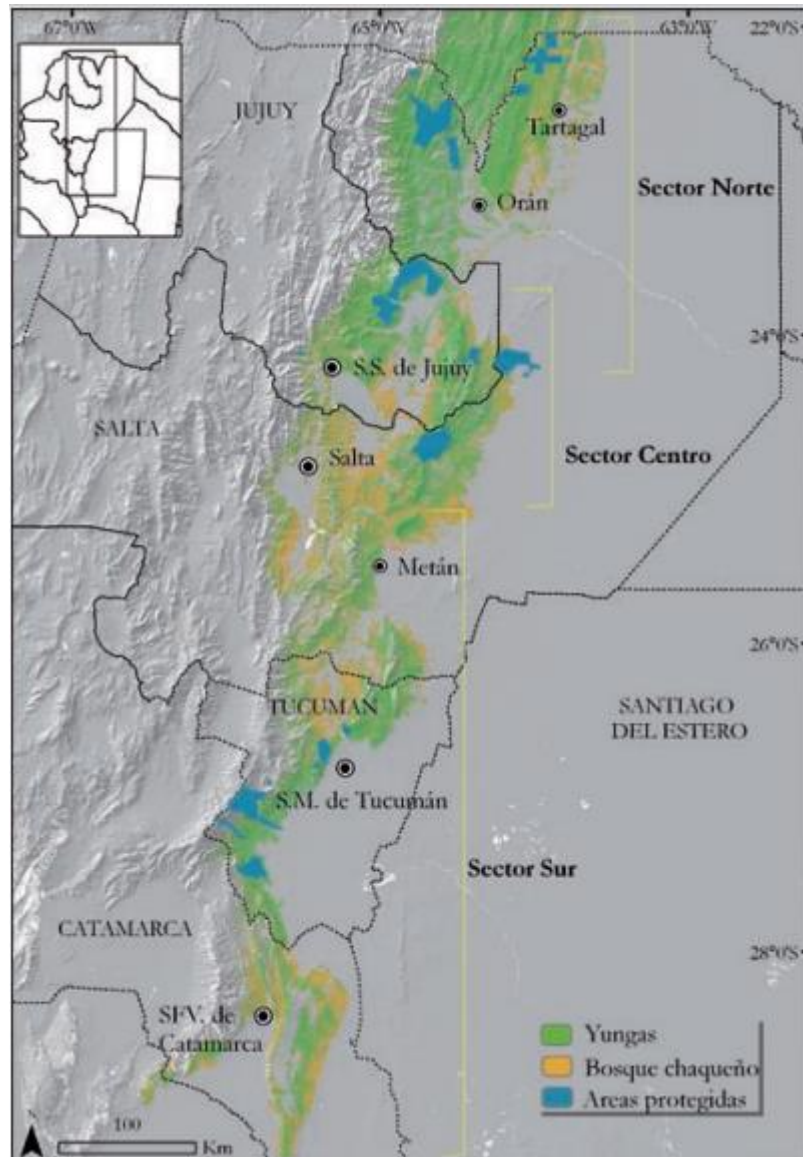


Figura 1: Distribución de sectores latitudinales de las Yungas en el Noroeste de Argentina. Se detallan Áreas Protegidas de la región (Fuente: Plan de Ordenamiento Territorial para las Áreas boscosas de la provincia de Jujuy. Ediciones del Subtrópico, 2007).

Las precipitaciones varían entre 900 y 2000 mm/año, debido a que las lluvias están influenciadas por la topografía y dependen de la altitud de las cadenas montañosas que se interponen a la condensación de la humedad (lluvias orográficas). Además, se deben considerar las precipitaciones horizontales dadas por la nubosidad baja, que en contacto con los bosques provocan la captación del agua de las neblinas, compensando la ausencia de lluvias en la estación seca

(mayo-agosto) (Peri et al., 2021). La temperatura media anual varía, en los sectores septentrionales es de 20,2 °C, en los australes 14,8°C y en los sectores de transición con la región chaqueña es de 23.8°C. La mayor amplitud térmica se da en el mes de agosto y es de 8°C. Las primeras heladas se registran en junio o julio, presentando valores entre 3°C y - 4°C, y a mediados de septiembre ya no se registran. Además, las temperaturas tienen una asociación inversa con la altitud. Complementariamente, el efecto de exposición de las laderas tiene una influencia local sobre la irradiación y la humedad del sitio (Peri et al., 2021).

El río de mayor caudal en la región de los Yungas es el Bermejo, aportando el 2% del caudal hídrico de la Cuenca del Río de la Plata, pero contribuye con el 75% de los sedimentos de dicha cuenca (Brown et al., 2001). Los suelos tienen moderado grado de desarrollo y gran variabilidad espacial, debido a las variaciones geomorfológicas y de la cobertura vegetal. Los materiales originarios son principalmente sedimentos fluviales gruesos y finos (regolito y coluvio). Si bien la morfodinámica es alta, constituyendo un medio natural inestable, la existencia de una importante cobertura vegetal arbórea ha permitido cierto grado de desarrollo de suelos. Los procesos principales son melanización, argiluvación y erosión-acumulación. Los suelos corresponden a los Órdenes Molisoles, Alfisoles, Entisoles e Inceptisoles (Pereyra, 2012).

Las Yungas argentinas albergan un número elevado de especies animales y vegetales que no ha sido cuantificado en detalle, pero podría representar un 40% de la riqueza de especies del país, en menos de 2% del territorio argentino (Cayuela y Granzow-de la Cerda, 2012). Además, generan recursos forestales madereros y no madereros de importancia, con una docena de especies arbóreas maderables comercializadas en los mercados regionales y nacional (Malizia et al., 2009). Por otro lado, proporcionan agua para riego y consumo humano, abarcando aproximadamente 400.000 ha de cultivos y cubriendo las necesidades hídricas de más de 2 millones de personas (Balvanera, 2012).

2.2.1 DISTRIBUCIÓN LATITUDINAL Y ALTITUDINAL

Como se mencionó anteriormente, las Yungas presentan una distribución discontinua en sentido Norte-Sur dada por la irregularidad de los cordones montañosos. La historia climática, el endemismo de especies de bosques

húmedos y los aislamientos de distintos sectores, responderían a la posibilidad de la migración latitudinal y la existencia de áreas que actúan como refugio a largo plazo. Estas áreas corresponden a la Alta Cuenca del Río Bermejo en Argentina y las áreas contiguas de Bolivia (Tariquia y Tarija) (Brown et al., 2002).

Las Yungas se caracterizan por un desarrollo altitudinal de unos 3000 m de desnivel (Cayuela y Granzow-de la Cerda, 2012). Existen especies adaptadas a las diversas condiciones ambientales (sequías, altas temperaturas, heladas y nevadas invernales) dependiendo del piso ecológico donde habitan. Es por esto que las Yungas se organizan en pisos o franjas de vegetación con características fisonómicas y florísticas diferenciables. (Brown et al., 2004).

- **SELVA PEDEMONTANA**

Se encuentra entre los 400 y 700 m.s.n.m en el pedemonte y serranías de escasa altitud. También es llamada “selva de transición” por ocupar áreas ecotonales con el bosque xerofito chaqueño (Cabrera, 1976). Ocupa las laderas de las montañas bajas del Alto Bermejo (sector con más de 2 millones de hectáreas), en una franja altitudinal de precipitaciones estivales que ocurren en un rango de 800-1000 mm anuales, concentrándose más en el periodo estival (noviembre-marzo) (Brown et al., 2009).

El clima es tropical con estación seca (junio - noviembre) y temperaturas elevadas durante gran parte del año. Debido a esto, existe un alto riesgo de incendio cuando la vegetación se encuentra más seca y sometida a temperaturas que superan los 40°C. Esto se ve aumentado por la introducción de especies herbáceas exóticas de alta productividad de biomasa, que al secarse generan condiciones de óptima combustibilidad (Brown et al., 2004).

La Selva Pedemontana no solo es lugar de una alta diversidad biológica, sino que también sirve como refugio para especies de otros pisos altitudinales de la selva de montaña. Esto ocurre cuando las condiciones climáticas no son favorables (bajas temperaturas y escasez de recursos alimenticios) (Brown et al., 2004). Se han reconocido a grandes rasgos dos unidades ambientales claramente diferenciables dentro este piso de vegetación, la Selva de Palo Blanco y Palo amarillo (*Calycophyllum multiflorum* y *Phyllostylon rhamnoides*, respectivamente) en las áreas más septentrionales (Provincias de Salta y

Jujuy), y la Selva de Tipa y Pacará (*Tipuana tipu* y *Enterolobium contortisiliquum*, respectivamente) en los sectores más meridionales (Provincia de Tucumán principalmente) (Brown et al., 2009).

La fácil accesibilidad y cercanía del hombre a la Selva Pedemontana ha potenciado su degradación y transformación para actividades agropecuarias y ha generado mayor tasa de incendios, cacería y obtención de madera en forma insustentable, incluso de manera ilegal. Sin embargo, aún persiste una importante superficie en Argentina que alcanza las 900.000 ha (80% en ladera y 20% en áreas planas) (Brown et al., 2004).

- **SELVA MONTANA**

La Selva Montana se encuentra entre los 900 y los 1500 m.s.n.m sobre laderas de pendientes pronunciadas. Este sector recibe la mayor cantidad de agua en forma de lluvia ya que ahí se encuentra el óptimo pluvial. Su balance hídrico es positivo todo el año y en época invernal, la humedad relativa alcanza porcentajes de 90-100%. La precipitación efectiva promedia los 1200 mm anuales y la temperatura media ronda los 10 – 18°C (Politi et al., 2015). Es un piso altitudinal mejor conservado, debido a la poca accesibilidad dada por la topografía y el esfuerzo en la creación de áreas protegidas (Peri et al., 2021).

En las áreas meridionales este piso se puede subdividir altitudinalmente en “selva basal”, donde se encuentra mayormente las especies *Tipuana tipu* y *Phoebe porphyria*, y en “selva de las mirtáceas”, donde se encuentran diversas especies de esta familia (*Myrcianthes pseuomato*, *M. uniflora*, *M. callicoma*). En general predominan las especies perennifolias. La principal actividad económica en estas selvas es la extracción forestal selectiva y la ganadería extensiva. (Brown et al., 2001).

- **BOSQUE MONTANO**

El bosque Montano se encuentra entre los 1500-3000 m.s.n.m y representa el piso de los “bosques nublados” propiamente dichos, ya que hay una presencia casi continua de nubes. El clima es templado y presenta heladas invernales frecuentes y húmedas (Peri et al., 2021). Las precipitaciones rondan los 600-

1300 mm y la temperatura media anual esta entre los 12-18°C generando zonas de gran estrés térmico e hídrico para las especies (Politi et al., 2015).

Se ubica de forma limítrofe a los “pastizales de neblina”, mostrando el paisaje con mayor heterogeneidad estructural. Esta heterogeneidad está dada por los bosques en los distintos estadios sucesionales dados por el fuego, el cual ha sido utilizado por las poblaciones para renovar las pasturas y controlar los procesos de sucesión secundaria (Brown, 1995; Arturi et al., 1998; Grau y Veblen, 2000). La sucesión forestal post-fuego presenta diferentes etapas, en la primera pueden originarse arbustos (géneros *Baccharis*, *Senecio* y *Lepechinia*) que posteriormente son colonizados por *Podocarpus parlatorei* y luego por especies más comunes del bosque maduro, como árboles de la familia Myrtaceae (*Myrcianthes pseudomato*, *M. callicoma*, *Blepharocalyz salicifolius*). Sin embargo, cuando se presentan disturbios como deslizamientos de ladera, el proceso sucesional comienza con *Alnus acuminata* y continua de forma similar a la mencionada anteriormente (Brown et al., 2001 y Politi et al., 2015).

Las especies dominantes son el Pino del cerro (*P. parlatorei*), el Aliso (*A. acuminata*), el Palo yerba (*Ilex argentina*), el Nogal (*Junglans australis*) y el Palo luz (*Prunus tucumanensis*) (Brown et al., 2001).

• PASTIZALES DE NEBLINA

Los pastizales de neblina se encuentran desde los 2.000 a los 3.800- 4.000 m.s.n.m. según exposición geográfica y ubicación topográfica, donde entran en contacto con los Pastizales Altoandinos. Las diferencias climáticas en esta zona están vinculadas al gradiente altitudinal y dentro de una misma altura en función de la exposición de las laderas, profundidad de suelo e historia de uso. Los pastizales de neblina son ricos en gramíneas y leguminosas lo que lo convierte en un ambiente con alto potencial forrajero. En el límite superior la humedad disminuye y se observa la presencia de arbustos como la chilca. Por otro lado, el sobrepastoreo de ganado ovino y vacuno amenaza el ambiente ya que se lo ha sometido desde hace más de 300 años, sumado a esto, las quemadas intencionales generan un deterioro físico del suelo, erosión laminar,

carcavamiento y remoción en masa. Este ambiente es el más crítico desde el punto de vista del estado de dejación ambiental (SAyDS, 2007).

2.2.2 USO, TRANSFORMACIÓN Y ESTADO DE CONSERVACIÓN DE LAS YUNGAS

Los últimos reportes indican que, de las 5.200.000 ha de las Yungas, solo el 4.8% (251.770 ha) está protegido, y si solo se considera a las Yungas en sentido estricto, el porcentaje solo alcanza al 10%, siendo este el sector más “atractivo” para fines de conservación (Brown et al., 2005). De esto se deduce que, la protección actual de las Yungas es insuficiente para garantizar la conservación de la biodiversidad. Las áreas protegidas en general, están ubicadas en sectores donde hay muy poca probabilidad de que sean transformados (ej: suelos pobres, pendientes abruptas, condiciones climáticas extremas) y por razones paisajísticas o geopolíticas (áreas de fronteras) (Peri et al., 2021). Diversos estudios han demostrado que la Selva Pedemontana constituye uno de los estratos más importantes de las Yungas. Presenta una alta diversidad biológica y funciona como refugio durante el invierno para especies de otros pisos altitudinales, lo que genera que tenga un rol ecológico destacable en el contexto regional. Constituye el piso con mayor porcentaje de especies arbóreas exclusivas, muchas de las cuales tienen alto valor maderero, incluyendo el Roble Salteño (*Amburana cearensis*), el Cedro Orán (*Cedrela balansae*) y el Lapacho Rosado (*Tabebuia impetiginosa*) (Brown, 1995; Prado, 1995; Brown, 2001).

Este piso altitudinal es el que históricamente, ha presentado una mayor presión antrópica, debido fundamentalmente a su accesibilidad y al gran número de recursos naturales que ofrece, así como también a las altas tasas relativas de crecimiento vegetal y a la mayor estacionalidad climática (Brown y Malizia, 2004; SAyDS 2007; Grau y Aide, 2008). En el año 1876 se produce la llegada del ferrocarril a Tucumán, permitiendo el desarrollo de la explotación de madera a un ritmo industrial ya que además se introdujeron maquinarias movidas por motores de vapor, facilitando el transporte. En 1891 la red ferroviaria alcanza las ciudades de Salta y Jujuy, y en 1930 se completaron las líneas del ferrocarril, donde se realizó la explotación forestal. No fue hasta 1950 que se introdujo maquinaria para rodeo y equipo de topadoras para apertura de caminos, lo que permitió que sitios que antes eran inaccesibles, ahora fuesen de fácil acceso, incrementando aún

más la explotación de las Yungas. La explotación consistía en extraer las especies de mayor valor llamadas “maderas preciosas” y a medida que estas se agotaban o se volvía antieconómica su explotación, se extraían maderas de menor valor. El proceso de extracción de madera duró entre 30 y 50 años, quedando la fisionomía del bosque pero totalmente vacía de especies de valor. A esto se le suma el ganado sin manejo y el sobrepastoreo que, por ramoneo, elimina los renovales de casi todas las especies forestales e impide la rápida revegetación (SAyDS, 2005).

Esta cadena de sucesos provocó un gran aprovechamiento forestal y la transformación del 70-80% de la superficie boscosa original en campos agrícolas (Brown y Malizia, 2004; SAyDS, 2007; Grau y Aide, 2008), los cuales fueron utilizados para la agricultura de caña de azúcar, cítricos, banana, tabaco y soja. La tierra también ha sido utilizada para cultivos de frutilla, palta y mango, aunque estos tienen menor importancia económica, por lo que no se encuentran tan frecuentemente.

Las sucesivas extracciones de especies de alto valor maderable han provocado un empobrecimiento del estrato arbóreo provocando que las existencias de dichas especies se reduzcan enormemente (SAyDS, 2007). Además, los desmontes tradicionales de rozado y quema, crearon claros sin vegetación. Los registros muestran que, la tasa anual de deforestación en la ecorregión alcanza valores de -0,32% (SAyDS, 2007).

Como se mencionó, una práctica que afecta a la Selva Pedemontana es la ganadería. La habilitación de pasturas en tierras boscosas sumado el manejo inadecuado del ganado, elimina gran parte de los renovales por ramoneo, impidiendo la regeneración adecuada de las poblaciones (Pinazo y Gasparri, 2003) y, por otro lado, la concentración excesiva de ganado lleva a una compactación y erosión del suelo. La regeneración del bosque luego de este tipo de perturbación es muy lenta, debida al pisoteo y depredación de las plantas jóvenes (Zamora, 2006). Otras prácticas son el cambio en el uso de la tierra y el sobrepastoreo, las cuales generan situaciones de desequilibrio, provocando un aumento de la ocurrencia de disturbios naturales, tales como los deslizamientos de ladera, las inundaciones y los aluviones (Brown et al., 2001; SAyDS, 2007). Debido a esto, la Selva Pedemontana representa el ambiente más amenazado de las Yungas (Brown y Malizia, 2004), y uno de los ambientes más amenazados a nivel nacional (Brown et al., 2005).

2.3 LA ESPECIE

2.3.1 FAMILIA FABACEAE (LEGUMINOSAS)

La familia de las Fabaceas, también conocidas como Leguminosas, tiene una distribución cosmopolita, desde bosques húmedos hasta desiertos secos y fríos y ambientes acuáticos (Polhill et al., 1981). Se trata de una familia monofilética, con sinapomorfias como el gineceo súpero unicarpelar, el cual da lugar a frutos y semillas similares en las leguminosas, con placentación marginal a lo largo de la sutura adaxial (Polhill, 1994; Kajita et al., 2001; Wojciechowski et al., 2004). Se trata de la familia más grande entre las angiospermas y comprende alrededor de 727 géneros y 19.325 especies, distribuidas en tres subfamilias: Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae (Lewis et al., 2005).

2.3.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Amburana cearensis (Allemão) A.C.Smith, también conocida como roble criollo. Es una especie forestal neotropical de la familia Fabaceae, subfamilia Papilionoideae (Lorenzi, 1992; Mello et al., 2013). El género *Amburana* se encuentra distribuido en los bosques tropicales secos estacionales y las zonas de transición de América del Sur, en los países de Brasil, Bolivia, Perú, Paraguay y Argentina (Dimitri, 1997). En Argentina está restringida a las provincias de Salta y Jujuy, en una franja angosta (400-750 m de altitud) en la Selva Pedemontana (Prado, 2000).

Se trata de un árbol grande, de hasta de 20 m de altura y 80 cm de diámetro; corteza lisa y cubierta por una epidermis, delgada, papirácea, rojiza, que cae en trozos irregulares (Figura 2). Hojas alternas, imparipinadas, de 10 a 15 cm de longitud total (Figura 3); 7 a 11 foliolos alternos, ovalados e elíptico- ovalado, de base obtusa, ápice redondeado o agudo, borde entero, pinnatimovados, nervadura central bien demarcada, nervios secundarios menos visibles. Inflorescencias racemiformes que nacen en la extremidad de las ramitas o solitarias en las axilas de las hojas superiores. El fruto es una vaina recta, de base redondeada. La semilla es aovada y algo comprimida, 1 a 1,3 cm de diámetro, lisa y de color castaño claro, tiene prolongaciones membranosas que sirven de ala y miden 2 a

5 cm (Figura 4). Gracias a esta característica, la especie presenta dispersión anemocórica (Lorenzi, 2002; Carvalho, 2014).

Su madera es de color amarillo – ocre con un olor característico a cumarina, es moderadamente pesada, pero a la vez semi-dura a blanda por lo que es muy fácil de trabajar. El leño del roble criollo presenta en su corte longitudinal tangencial una notable similitud con el roble europeo (*Quercus robur*) y es por ello que se lo asocia con esta madera exótica de alto valor (Tortorelli, 2009). Comienza a reproducirse cuando el diámetro es mayor a 60 cm y el 90% de los individuos alcanzan la edad reproductiva cuando el diámetro supera los 67 cm (Van, 2005; Ayarde, 2006). Las semillas se producen cada 3 o 4 años durante los meses de septiembre a octubre, se dispersan abiertas y pierden variabilidad rápidamente (Ayarde, 2006; Lopez et al., 1987). Además, la producción de las semillas está relacionada con el diámetro de las plantas, es decir, a medida que este aumenta, también lo hace la producción de semillas hasta que llegan a un punto donde la producción es máxima (Ruíz, 2015). A partir de esa máxima, las semillas tienden a tener una baja por el envejecimiento del individuo. La primera floración y fructificación ocurre diez años después de la siembra (Carvalho, 1994). Las flores son hermafroditas y los principales polinizadores son las abejas, se destacan *Apis mellifera*, *Centris sp.*, *Frieseomelitta doederleini*, *Melipona marginata* y *Xylocopa sp.* como polinizadores diurnos. Entre los nocturnos se encuentran tres especies de polillas (lepidóptero) y una mosca (díptero) (Dias, et al., 2007).



Figura 2: Detalles de la corteza de *A. cearensis* (Fuente: Projeto verde, Cumaru – *Amburana cearensis* - <https://appverde.wordpress.com/2015/09/18/cumaru-amburana-cearensis/>)



Figura 3: Detalles de las hojas de *A. cearensis* (Fuente: Projeto verde, Cumarú – *Amburana cearensis* - <https://appverde.wordpress.com/2015/09/18/cumaru-amburana-cearensis/>)



Figura 4: Detalle de las semillas de *A. cearensis* (Fuente: Projeto verde, Cumarú – *Amburana cearensis* - <https://appverde.wordpress.com/2015/09/18/cumaru-amburana-cearensis/>)

2.3.3 EXPLOTACIÓN DE LA ESPECIE Y LAS YUNGAS

La selva Pedemontana alberga gran cantidad de especies y es el ecosistema forestal más amenazado de Argentina (Brown et al., 2006). Un análisis realizado por Brown y colaboradores en el 2009, indica que el área remanente del bosque es de 37% de su cobertura original y la mayoría de los rodales remanentes se hallan en lugares menos accesibles. Estos bosques están degradados y afectados por la tala, la cual solo se centra en pocas especies maderables valiosas (Brown et al., 2002). Esta explotación maderera no planificada y extractiva ha puesto en peligro a numerosas especies madereras valiosas, como lo es *A. cearensis* (Burkart, 1943). A nivel mundial se encuentra catalogada como una especie en

peligro de extinción (UICN, 1998) y en la Argentina, la especie presenta diferentes estados de conservación: en la provincia de Salta, por medio del decreto de 1960 (N°15.742/1960), la tala se veía restringida a individuos de con un diámetro mínimo legal de corte mayor a 60 cm y desde 2020 Salta también prohibió su corte mediante Resolución 14/19 de la Secretaría de Ambiente. Por otro lado, en la provincia de Jujuy en 1972, se prohibió la tala de la especie (Decreto N° 676-H-72). La falta de control de la aplicación de estos decretos hace difícil la aplicación de la ley, además de que los planes de manejo forestal no priorizan la protección de la especie (Politi et al., 2014).

2.3.4 USOS DE AMBURANA CEARENSIS

La madera de *A. cearensis* es utilizada para la elaboración de muebles de gran valor económico y estético, cajas, cofres, marcos de cuadros, instrumentos musicales, y revestimiento de interiores (Burkart, 1943). También tiene propiedades medicinales, la corteza y las semillas son utilizadas en el tratamiento de enfermedades respiratorias como tos, asma, bronquitis y tos ferina (Berg, 1986). Se han realizado numerosas investigaciones acerca de las propiedades químicas y biológicas de *A. cearensis*. En el 2014, Sá y colaboradores demostraron actividad bacteriostática del extracto clorofórmico de la corteza de tallo sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*. Por otro lado, se describió el extracto acuoso de *A. cearensis* como 100% tóxico para larvas de mosquito *Aedes aegypti*, especie vector de la conocida enfermedad dengue (Farias et al., 2010). También se ha estudiado como efecto anticancerígeno, en 2003 Lotufo junto a colaboradores, demostraron los efectos citotóxicos contra las líneas celulares de cáncer B-16 (cáncer de piel murino), HCT-8 (cáncer de colon humano), MCF-7 (cáncer de mama humano) y CEM y HL-60 (leucemia). Por otro lado, estudios *in vitro* han demostrado efectos neuroprotectores de extractos en cumarina de semillas de *A. cearensis*, especialmente un extracto de diclorometano, que ha demostrado ser citoprotector en líneas de células cerebrales y cultivos de células primarias, así como también el fenol glucósido de la corteza (Pereira et al., 2017a; Pereira et al., 2017b).

En 2015, Galindez y colaboradores estudiaron la dormición de las semillas de *A. cearensis* y demostraron que pueden ser conservadas en bancos de germoplasma, permitiendo así también el uso de la especie en proyectos de

producción de plantas en invernáculo, reforestación, restauración y conservación “ex situ” (Galindez et al., 2015).

2.4 MARCADORES MOLECULARES

La diversidad entre individuos de una misma especie se debe a las variaciones en el ADN y a factores ambientales. Las variaciones pueden ser, entre otras, mutaciones, inserciones, deleciones, duplicaciones o inversiones en secciones de ADN hereditario (Cortés y Lucero, 2021). Un marcador molecular es un fragmento de ADN que por sí solo o combinado en alineación con otros puede ser localizado dentro del genoma. Estas posiciones en el genoma, son específicas para cada individuo, grupo de individuos, especies o grupos sistemáticos mayores, por lo que sirven tanto para el análisis de individuos como de poblaciones (Karp y Edwards, 1997). Estos marcadores son ilimitados y no se ven afectados por factores ambientales y/o la etapa de desarrollo del organismo (Winter y Kahl, 1995). Se pueden visualizar utilizando diversas técnicas, entre ellas la electroforesis en geles y tinción con productos químicos (bromuro de etidio o nitrato de plata), la detección con sondas colorimétricas o la utilización de equipos más actuales, como los secuenciadores de 3^{ra} generación. Los marcadores de ADN, también pueden ser dominantes o co-dominantes, siendo estos últimos los que permiten diferenciar el estado heterocigota del estado homocigota (Collard et al., 2005).

Los marcadores moleculares pueden ser clasificados según Picca (2004) en tres grupos:

- Marcadores basados en la hibridación de ADN, como los RFLP (restriction fragment length polymorphisms).
- Marcadores basados en la amplificación del ADN por PCR (polymerase chain reaction) como los SSRs (Simple Sequence Repeats).
- Marcadores mixtos, una técnica que combina la amplificación por PCR y enzimas de restricción, como los AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms).

2.4.1 MICROSATÉLITES O SSRS

Los microsatélites, también llamados “Short Tandem Repeats” (STR) o SSRs, consisten en secuencias cortas, de 1 a 6 nucleótidos, que se repiten en tándem (Cortés y Lucero, 2021). Este tipo de secuencias se han encontrado tanto en genomas eucariotas como procariontas e incluso en genomas de mitocondrias y cloroplastos. Se distribuyen tanto en regiones del ADN codificante como no codificante y se caracterizan por ser altamente polimórficos, por lo que son ideales para el uso a nivel poblacional (Zane et al., 2022). Sus aplicaciones abarcan diferentes áreas, desde análisis de parentesco hasta la genética de poblaciones y la conservación/gestión de recursos biológicos (Jarne y Lagoda, 1996).

Un locus de microsatélite varía normalmente en longitud de 5-40 repeticiones, aunque son posibles las cadenas más largas. Las repeticiones de dinucleótidos, trinucleótidos y tetranucleótidos son las opciones más comunes para los estudios de genética molecular. Los dinucleótidos son la variante de microsatélite dominante en la mayoría de vertebrados y los trinucleótidos en plantas (Beckmann y Weber, 1992; Kantety et al., 2002; Chen et al., 2006). Estas secuencias son altamente variables, entre y dentro de individuos. Las variaciones se dan como diferencias en longitud entre distintos alelos del mismo locus, pudiéndose dar un número diferente de repeticiones del motivo básico en cada caso. Se estima que la tasa de mutación en los microsatélites varía entre 10^{-2} y 10^{-5} por generación y el mecanismo que mejor explica su alto grado de polimorfismo es la acumulación de errores producidos por el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación de ADN (Ellegren, 2004). La amplificación de los marcadores microsatélites se realiza mediante PCR, utilizando como “primers” o cebadores dos secuencias complementarias a las regiones flanqueantes del microsatélite. Esto da como resultado una masa de ADN suficiente que será visible en geles de agarosa y poliacrilamida (Figura 5).

Los SSRs son rápidos y fáciles de usar, sin embargo, el desarrollo para su correcto funcionamiento suele ser un proceso tedioso y costoso. Una vez desarrollados, tienen variadas aplicaciones debido a su reproducibilidad, naturaleza multialélica, herencia co-dominante, abundancia relativa y buena cobertura genómica (Liu y Cordes, 2004), se requiere poca cantidad de ADN para su amplificación y este no tiene que ser excelente calidad. Adicionalmente, la interpretación de los resultados es simple (de Vicente y Fulton, 2003). Las desventajas de su uso radican en que

la secuencia flanqueante debe ser conocida para poder diseñar los cebadores y también en que pueden presentar alelos nulos, los cuales son alelos que no amplifican. Los alelos nulos son el resultado de que el “primer” no hibride correctamente con el ADN molde durante la amplificación del locus del microsatélite mediante PCR; otra causa puede ser la amplificación preferencial de los alelos más cortos (debido a la calidad o cantidad inconsistente de la plantilla de ADN) o al deslizamiento de la polimerasa durante la amplificación por PCR (Gagneux et al., 1997; Shinde et al., 2003). Los alelos nulos no dejan bandas cuando tienen homocigosis, pero cuando tienen heterocigosis dejan solo una banda visible. Esto interfiere en la lectura de datos, ya que se puede registrar a un individuo como homocigoto cuando en realidad es heterocigoto. Esto se puede evitar evaluando distintas secuencias para el diseño de cebadores (Weising et al., 2005).

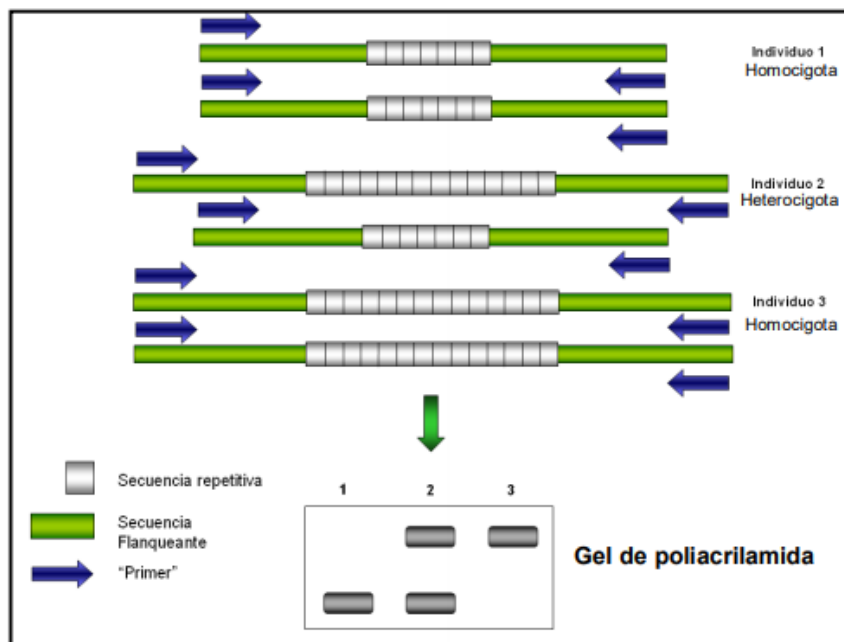


Figura 5: Esquema de amplificación y resolución de SSRs, en diferentes individuos (Soldati, 2010).

2.5 HIPÓTESIS

Sobre el rango de distribución natural de *A. cearensis*, aún existirían niveles de diversidad genética apropiados para su uso potencial en planes de conservación y restauración en el marco de un sistema forestal sustentable.

2.6 OBJETIVOS

2.6.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar y cuantificar los niveles y distribución de la variabilidad genética molecular de poblaciones naturales de *A. cearensis*, utilizando marcadores SSRs, con el fin de complementar acciones dirigidas a la adecuada conservación de la especie, en largo plazo.

2.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Puesta a punto de las técnicas moleculares aplicables a la especie objeto de estudio
- Disponer de los patrones moleculares de identificación genética de los individuos pertenecientes a las poblaciones naturales, así como estimar sus relaciones genéticas.
- Caracterizar y cuantificar los niveles de diversidad genética y su distribución dentro y entre poblaciones.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDIO

Fueron estudiadas 7 poblaciones naturales localizadas en el rango de distribución geográfica de la especie en Argentina, en las provincias de Salta y Jujuy (Figura 6, Tabla 1). Se abarcó un rango geográfico de aproximadamente 200 km.

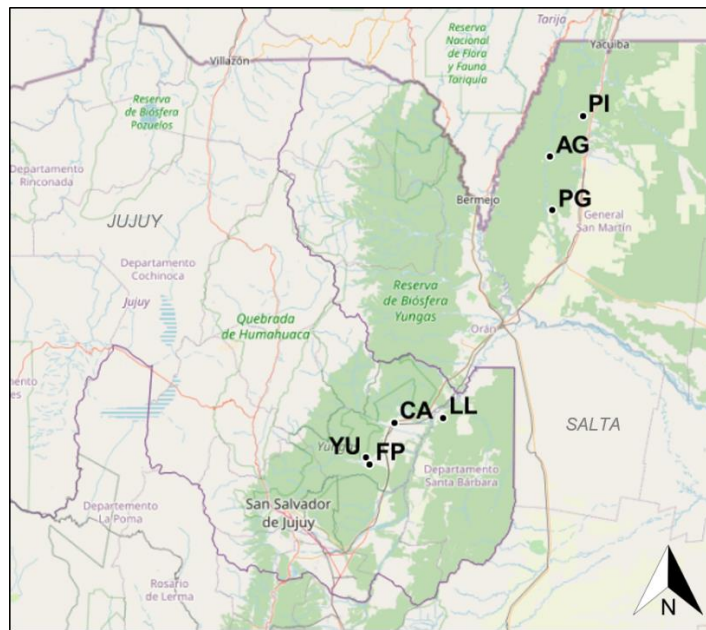


Figura 6: Mapa del NOA indicando las 7 poblaciones muestreadas de *A. cearensis*. Ver códigos de referencia en la Tabla 1.

3.2 DESCRIPCIÓN DE LAS POBLACIONES ESTUDIADAS

Las poblaciones de Piquirenda, Pocoy Ganadero y Aguay están ubicadas al noroeste de la provincia de Salta. El clima es subhúmedo - seco con una precipitación anual entre 1100 - 1220 mm y la temperatura media es de 22°C. La vegetación es variada y, por ejemplo, en la población de Aguay las especies arbóreas dominantes son del género *Anadenanthera*, *Astronium* y *Caesalpinia*. En la población de Pocoy se encuentra el género *Cordia*, *Anadenanthera* y *Phyllostylon*. El aprovechamiento forestal se lleva a cabo en las tres poblaciones y también la ganadería, con excepción de Aguay. Los suelos de las tres poblaciones se formaron a partir de materiales loésicos de textura franca a franco

arcillosa, bien provistos de materia orgánica y nutrientes, un pH ligeramente alcalino y bien drenado. Por otro lado, las poblaciones de Fraile Pintado, La Lucrecia, Calilegua Aserradero y Yuchan se encuentran en la provincia Jujuy. El clima es subhúmedo – húmedo, con una precipitación anual entre 700 - 780 mm y la temperatura media es de 20°C. La vegetación no es tan variable en estas zonas y predominan los géneros *Anadenanthera*, *Phyllostylon* y *Calycophysum*. El aprovechamiento forestal se lleva a cabo en la población de Yuchan, al igual que la ganadería. En la región se encuentran suelos de diferentes desarrollos genéticos, estos han evolucionado a partir de materiales loésicos y fluviales. Los de débil desarrollo presentan texturas francas a franco arcillosas. Los suelos de fuerte desarrollo tienen textura franco arcillosa, no tienen limitantes químicas ni físicas para su uso (Politi, 2022 com. pers., Godagnone y De La Fuente, s/a). En la zona de la población de La Lucrecia, los incendios son recurrentes y los árboles muestreados presentaban signos del fuego en sus bases (Balducci, 2023 com.pers.).

3.3 ESTRATEGIA DE MUESTREO

El muestreo de las poblaciones fue realizado por el equipo técnico de la Estación Experimental Agropecuaria Yuto del INTA, en el marco del Proyecto Nacional de INTA PE I113 "Abordaje integral para la conservación, mejoramiento y rescate de especies amenazadas de importancia para el SAAA en diferentes ambientes". También se analizaron poblaciones muestreadas por investigadores de la Cátedra de Biología de la Conservación de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Jujuy.

Se colectaron un total de 84 individuos, pertenecientes a 7 poblaciones naturales de la especie. El tamaño poblacional fue variable, entre 3 y 30 individuos (Tabla 1) y definido en función de la densidad de individuos observada en cada rodal, considerando para la colecta una distancia mínima de entre 80 y 100 metros a fin de evitar muestrear individuos emparentados (Soldati et al., 2012). Los individuos fueron georreferenciados mediante el empleo de GPS ("Global Positioning System") y el material vegetal fue colectado durante tres campañas realizadas en 2021 y 2022, entre los meses de septiembre y enero, a fin de evitar la época de lluvias más intensas. Fueron colectadas hojas jóvenes y en buen estado sanitario, a fines de obtener una buena calidad de ADN. Una vez colectadas las hojas estas

fueron desecadas en bolsas de red utilizando Sílica Gel (Chase et al., 1991). Las mismas, una vez secas, fueron conservadas a -20°C, en bolsas de red individuales, hasta su procesamiento.

Adicionalmente, fueron colectadas 15 muestras en el predio de la EEA Yuto de INTA, representativas del estado general de la especie en el país. Estas muestras fueron utilizadas para la puesta a punto de las metodologías y para realizar la validación de los marcadores SSR seleccionados. La colecta de este material, siguió idénticas condiciones a la colecta del material de las poblaciones naturales.

Población	Código	Nro. de individuos	Latitud	Longitud
Pocoy Ganadero	PG	7	-22,790390	-63,963243
Piquirenda	PI	19	-22,348290	-63,81201
Yuchán	YU	3	-23,935561	-64,905501
Calilegua Aserradero	CA	5	-23,771743	-64,764244
Aguay	AG	9	-22,540780	-63,974320
Fraile Pintado	FP	30	-23,963096	-64,887827
La Lucrecia	LL	11	-23,752062	-64,514203

Tabla 1: Poblaciones de *A. cearensis* evaluadas en el NOA. Se detalla la cantidad de individuos colectados para cada población.

3.4 MOLIENDA DEL MATERIAL VEGETAL

El material fue molido con el equipo “Tissue Lyser” (Quiagen). Se pesaron 80 mg de hojas desecadas para cada muestra, en tubos eppendorf de 2 ml rotulados para su identificación. A cada tubo se le agregaron 2 esferas de tungsteno para permitir la molienda del material vegetal. El programa de ruptura tisular tuvo una duración de 1 minuto con 30 segundos a una frecuencia de 24 1/Seg., repitiendo el proceso una o dos veces hasta obtener las muestras en forma de polvo fino.

3.5 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN

La extracción de ADN se realizó utilizando el método de CTAB (Bromuro de cetil trimetil amonio) (Doyle y Doyle, 1990) con modificaciones para las especies forestales trabajadas en IRB. A cada tubo se le agregó 1 ml de buffer de extracción CTAB (100mM Tris-HCL pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 1.4 M NaCL, 2% CTAB, 0,1%

β -mercaptoetanol y 1% PVP) y se homogeneizó utilizando un vortex. Luego se incubaron en estufa a 65°C durante 90 y se agitaron cada 10 minutos. Una vez finalizada la incubación, se dejaron enfriar los tubos hasta que estuvieron a temperatura ambiente para después adicionar 500 μ l de cloroformo - octanol (24:1) a cada tubo. Se homogeneizaron por inversión manual durante 10 minutos y luego se centrifugaron por 15 minutos a 13000 rpm a temperatura ambiente. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo de 2 ml para repetir por segunda vez la extracción con cloroformo - octanol. Una vez obtenida la fase acuosa nuevamente, se transfirió a un tubo de 5 ml con tapa calculando su volumen aproximado, para definir un volumen promedio de sobrenadante obtenido para todas las muestras. Para la precipitación del ADN se adicionaron 1/10 volumen de Acetato de sodio 3M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío en relación al promedio del sobrenadante. Se realizó una inversión manual de los tubos hasta que se observó el ADN precipitado. Con cuidado se transfirió el ADN a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se realizó una centrifugación a 8000 rpm por 10-20 segundos con el fin de descartar el líquido precipitado y adherir el pellet al tubo. Se realizó un lavado del ADN con 200 μ l de una solución de etanol al 76% y NaOAc 0.2 M durante 20 minutos y luego se descartó y se dejaron secar los tubos boca abajo sobre una servilleta. Posteriormente se realizó un segundo lavado con 200 μ l de una solución de etanol al 76% y NH₄OAc 10 Mm durante 5 minutos y nuevamente se dejaron secar los tubos del mismo modo que en el lavado anterior por 15-30 minutos cubiertos con film. Luego se resuspendió el pellet de ADN con 50-100 μ l de TE 10:1 (10 mM Tris – 1mM EDTA) por muestra según la cantidad de ADN obtenido. Se secaron los tubos destapados en estufa a 60°C durante 10 minutos. Finalmente se agregaron 2-3 μ l de ARNasa (10mg/ml) por muestra y se dejó actuar dicha enzima a temperatura ambiente por 30 minutos, luego se conservaron a -20°C para su posterior utilización.

La cuantificación se realizó con el espectrofotómetro NanoDrop 2000, Thermo Scientific. Se colocó 1 μ l por cada individuo al cual se le extrajo ADN y se determinó la masa en ng/ μ l. También se obtuvieron las relaciones A₂₆₀/A₂₈₀ y A₂₆₀/A₂₃₀ para verificar la presencia o ausencia de contaminantes.

3.6 MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES Y AMPLIFICACIÓN POR PCR

Los marcadores utilizados en este trabajo emplean la técnica de amplificación mediante PCR. Esta técnica permite, en presencia de la enzima ADN Taq polimerasa, la síntesis in vitro de cadenas de ADN, provocando un incremento exponencial del número de copias de cadenas de ADN (Mullis et al., 1986). La PCR imita el proceso de replicación que se da de forma natural en el ADN.

Si bien se pueden diseñar diferentes ciclos para el termociclador, un ciclo básico consta de tres etapas:

- Desnaturalización: permite la separación de la doble hélice de ADN a una temperatura de 92°C – 95°C.
- Annealing: permite el apareamiento de dichos oligonucleótidos a una temperatura de 50°C – 60°C.
- Polimerización: en esta parte la ADN Taq polimerasa extiende la nueva hebra de ADN a partir del extremo 3' OH del "primer". Esta etapa ocurre a 72°C.

Este ciclo se repite de 25 a 40 veces y es seguido por una etapa de extensión final, que garantiza la finalización de la polimerización.

En este trabajo se utilizaron siete SSRs desarrollados para *A. cearensis* por Seleme (2014) y Barral (2014) (Tabla 1). Los marcadores fueron elegidos en base a los niveles de polimorfismo. La amplificación de los mismos fue llevada a cabo en un termociclador "Biorad My Cycler" y se basó en el protocolo detallado en la Tabla 2, con las modificaciones propias de cada marcador, detalladas en la Tabla 3 (ciclos, T°a y concentraciones de MgCl₂).

Marcador SSR	Secuencia 5' - 3'	Fuente
Ac 1	F:GGAACAATTTAAAAGAATATCTGAAAG R:CTGTTTCAGAAATGGTAAGCCC	Seleme, 2014
Ac 5	F:GCCGGTTGCATTTACTGA R:GCATATCACATATTTCACTCCAG	
Ac 15	F:AGCTTTGCGATTCGGTCTCTTCC R:ATTTCCACAGCCGCATTAGTTTCATT	
Ac 32	F:CCGGGTCTCCTGGTTAGA R:AAAAAGGGTGGGTTCTGG	
Amb_D5	F:AGAATGATCTATTGCAACTCGG R:TGGACAAATATGAGTGACACCTC	Barral, 2018
Amb_D8	F:AGCAAGCGCTTAGCTTGGGTC R:ACGAAAAATGCAGCCGGGAAC	
Amb_G3/4	F:AGGCAACTCTAGCCCATGCAC R:TGTGGTGA CTGATGGACATGCT	

Tabla 2: Secuencia de bases de ADN para par de "primers" utilizados. Se detallan los códigos de cada marcador y la fuente de origen.

Reactivo	Concentración	Volumen
Templado (ADN)	2 ng/μl	2
Buffer de reacción	10X	1,25
BSA	2.5	0,4
DNTPs	10mM	0,25
MgCl ₂	2 - 3 mM	0,96
"Primer"	10 μM	1
T-Plus ADN Polimerasa	500 U	0.1
H ₂ O	-	c.s.p

Tabla 3: Protocolo general de Amplificación de SSRs.

Marcador	Protocolo de Ciclado	Concentración MgCl ₂	Ta (°C)
Ac 1	A	2 mM	Touch down 58°C; (↓1°C/ciclo)
Ac 5	B	3 mM	52°C
Ac 15	B	2 mM	53°C
Ac 32	B	3 mM	55°C
Amb_D5	B	2 mM	56°C
Amb_D8	B	2 mM	60°C
Amb_G3/4	B	3 mM	56°C

Tabla 4: Condiciones ideales de amplificación para cada marcador estudiado. Se detallan el protocolo de ciclado, las concentraciones de MgCl₂ y la temperatura de annealing de los SSRs.

Detalle de Protocolos de ciclado

Protocolo A: Desnaturalización inicial de 3 minutos a 95°C, 10 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos empezando a 58°C y con cada ciclo bajando 1°C al temperatura y 30 segundos a 72°C. Luego 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 48°C y 30 segundos a 72°C, posteriormente una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Protocolo B: Desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C, 30 ciclos de un minuto a 94°C, un minuto a 52°C – 60°C y un minuto a 72°C, posteriormente una extensión de 5 minutos a 72°C.

A cada tubo se le agregó una gota de “mineral oil” para evitar la evaporación de la muestra. Finalizada la amplificación, las muestras fueron conservadas a 4°C hasta su utilización.

3.6.1 SEPARACIÓN Y DETECCIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

Para poder separar los productos de amplificación y detectar las variantes alélicas presentes en los individuos, se utilizó el método de electroforesis vertical en geles desnaturizantes de poliacrilamida de alta resolución (6%), teñidos con AgNO₃ y revelados con NaOH (Benbouza et al., 2006).

Armado de geles de poliacrilamida: Se utilizaron vidrios de tipo “float” (vidrio corto - VC: 33 cm de ancho por 29 cm de largo; vidrio largo - VL: 33 cm de ancho y 41,5 cm de largo). Inicialmente se lavaron con agua corriente y detergente diluido con el fin de eliminar restos de reactivos e impurezas, luego fueron tratados con etanol 96%. El VC fue tratado con solución adherente “binding” (950 µl etanol 96%; 5 µl ácido acético; 3 µl Bind Silane) para lograr que el gel de poliacrilamida quede adherido al vidrio. Por otro lado, el VL fue tratado con solución repelente Sigmacote (Sigma) para evitar que el gel de poliacrilamida quedo adherido a este. Se colocaron sobre los laterales del VL dos separadores (0,4 mm de espesor) y sobre estos el VC. Ambos vidrios se sujetaron con broches para evitar el movimiento de estos. En el espacio entre los vidrios se agregó el gel de poliacrilamida (70 ml de solución poliacrilamida al 6% (acrilamida: bisacrilamida 19:1; Urea 42 % p/v y TBE 0.5X (Tris – borato 45 mM y EDTA 1mM); 33 µl TEMED;

330 µl APS) y se finalmente se dejó polimerizar por un periodo no menor a dos horas.

Preparación de las muestras para la siembra: A cada muestra se le agregaron 6 µl de un buffer de carga o "Loading Buffer" (formamida 96 % p/v; EDTA 10mM pH 8; xilencianol 0,1 % p/v y azul de bromofenol 0,1 % p/v), que permite visualizar las muestras al momento de la siembra y al mismo tiempo que estas se depositen con más facilidad sobre el gel. Las mismas fueron desnaturalizadas (4 minutos a 94°C) para separar las hebras de ADN y luego fueron colocadas en hielo para evitar la re-naturalización. Posteriormente se sembraron en el gel.

Siembra y corrida electroforética: Los geles se colocaron en cubas "Gibco-BRL Sequencing System Model" S2. En el ánodo se agregó buffer TBE 0,5X (Tris – Borato 90 Mm; EDTA 2Mm) y en el cátodo buffer TBE 1X. La corrida se realizó a 50W de 2 a 2,5 horas dependiendo del marcador utilizado.

Tinción de geles y revelado: Finalizada la corrida electroforética, se retiraron los vidrios de la cuba y se separaron con la ayuda de una espátula. Los geles quedaron adheridos al VC y estos se sumergieron en una solución de ácido acético glacial (0,5%) y alcohol 96% (10%) v/v con el fin de fijar las bandas al gel. Pasados 5 minutos se pasaron a una solución de nitrato de plata (AgNO_3 0.1% p/v y formaldehído al 37% 1,5 ml/l) durante 12 minutos en agitación y oscuridad. Pasados los minutos mencionados se lavaron los vidrios por unos 5 segundos en agua destilada y fueron sumergidos en la solución de revelado de hidróxido de sodio (NaOH 15 g/l) a la cual se le agregaron 2 ml/l de formaldehído 37%. Esto permite que los iones de plata se reduzcan a iones metálicos gracias al formaldehído permitiendo la formación de las bandas. Luego de que las bandas se vieron claras en el gel, se detuvo el revelado y se colocó el gel nuevamente en la solución de fijación del primer paso durante 2 minutos. Por último, se lavó el gel en agua de la canilla por 2 minutos y se dejó secar por 24 horas (Benbouza et al., 2006).

3.7 ANÁLISIS DE DATOS

El análisis de los datos fue realizado a partir de los datos moleculares obtenidos utilizando los marcadores SSR. Dependiendo del programa estadístico utilizado en cada caso, se realizaron diferentes codificaciones a partir de los datos

originales. En el caso de los programas Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000, Falush et al., 2007), GenAEx 6.503 (Peakall y Smouse, 2006) y GenePop 4.0 (Rousset, 2008), la codificación fue definida sobre la base de los pesos moleculares de los alelos, es decir, las matrices fueron conformadas indicando en cada individuo el peso molecular de su respectivo alelo o alelos, dependiendo del estado homocigota o heterocigota. Para la codificación de las matrices utilizadas en programa NTSYS-pc 2.0 (Rohlf et al., 1998), se tomó como base la presencia o ausencia de los alelos. Estos fueron codificados como 1 si estaban presentes y como 0 si estaban ausentes.

3.7.1 DIVERSIDAD GENÉTICA

Se estimaron diferentes parámetros estadísticos para estimar la diversidad genética de las poblaciones naturales de *A. cearensis*, utilizando dos programas bioinformáticos para el análisis de datos moleculares: GenAEx 6.503 y GenePop 4.0.

3.7.1.1 VALIDACIÓN DE MARCADORES

A fin de validar el grupo de marcadores seleccionados y de determinar los posibles desvíos del equilibrio Hardy-Weinberg, fueron estimados la frecuencia de alelos nulos, el Desequilibrio de Ligamiento y el coeficiente de endogamia. Estos análisis fueron realizados sobre una muestra del material colectado (N=15), representativo del estado natural de la especie.

► Alelos nulos: se calculó la presencia o ausencia de alelos nulos para cada locus polimórfico. Fue calculada la probabilidad de presencia de estos alelos para cada locus polimórfico. En base a los resultados se seleccionaron los marcadores Microsatélites para el análisis.

► Desequilibrio de ligamiento: este parámetro indica la asociación no azarosa entre dos marcadores en un mismo cromosoma, pudiendo deberse a la poca distancia entre estos o, una baja tasa de recombinación. Se estimó de acuerdo a la fórmula de Lewontin y Kojima (1960):

$$DL = x_{11} - p_1q_1$$

Donde:

- x_{11} : es la frecuencia observada del haplotipo que contiene a los dos alelos
- p_1 y q_1 son las frecuencias de los alelos en los loci

Valores de DL menores a 0.05 indican un desequilibrio de ligamiento significativo.

► **Coefficiente de endogamia (Fis):** se evaluó este coeficiente para determinar la desviación del Equilibrio Hardy-Weinberg en los marcadores, que puede ser debida a la endogamia por aislamiento geográfico o cruzamientos no aleatorios. Estos coeficientes fueron calculados según la fórmula:

$$Fis = (He - Ho) / He$$

Donde:

- He: Heterocigosidad esperada
- Ho: Heterocigosidad observada
- Ht: heterocigosidad total

3.7.1.2 PARÁMETROS DESCRIPTIVOS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA

A fin de estimar los niveles de diversidad genética presentes en las 7 poblaciones de *A. cearensis*, se calcularon una serie de parámetros que permiten describir la variabilidad genética de la especie.

► **Frecuencia alélica (F):** se estimó la frecuencia de cada uno de los alelos con respecto al total de alelos en una población, de acuerdo a la fórmula:

$$F = (N_{xx} + N_{xy}) / 2N$$

Donde:

- F: Frecuencia alélica
- N_{xx} : Número de individuos homocigotos para ese alelo
- N_{xy} : Número de individuos homocigotas
- N: Número total de individuos

► **Diversidad alélica (Na) y número promedio de alelos por locus (Np):** la diversidad alélica refiere al número de alelos existentes para un locus

determinado. El N_p es el cociente entre el número total de alelos detectados para todos los *loci* y el número total de *loci*, de acuerdo a la fórmula:

$$N_p = \sum Na / K$$

Donde:

- N_p : Número promedio de alelos por locus
- N_a : Número de alelos por locus
- K : Número total de locus

► **Alelos exclusivos (A_e):** alelos detectados únicamente en una población o individuo. Obtenidos para cada locus analizado.

► **Heterocigosidad observada (H_o):** estimada para cada población a partir del número total de heterocigotas observados, según la fórmula:

$$H_o = N^\circ \text{ Het} / N$$

Donde:

- N° : Het es el número de individuos heterocigotas
- N es el número total de individuos

► **Heterocigosidad esperada (H_e):** a heterocigosidad esperada por población, y la H_e promedio fueron calculadas a partir de las frecuencias alélicas, de acuerdo a la fórmula:

$$H_e = 2 \cdot p_i \cdot q_i = 1 - \sum p_i^2$$

Donde:

- p_i y q_i : frecuencias alélicas

Posteriormente el valor obtenido de H_e fue corregido en función del número de individuos (N) a partir de la expresión $2N / (2N-1)$, esto permite obtener la H_e no sesgada o U_{He} (Unbiased H_e).

$$U_{He} = H_e \cdot (2N / (2N-1))$$

Los parámetros de Frecuencia alélica, Multiplicidad alélica, Alelos exclusivos, H_o , H_e y U_{He} , fueron estimados con el programa GenAlEx 6.2 (Peakall y Smouse, 2006).

3.7.2 DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

3.7.2.1 ANÁLISIS MOLECULAR DE LA VARIANZA (AMOVA)

A fines de cuantificar los niveles de diversidad genética que existen dentro y entre las poblaciones de *A. cearensis*, se realizó un AMOVA, empleando el coeficiente de diferenciación F_{st} que indica la medida de la variación genética entre poblaciones relativa a la variación genética total.

3.7.2.2 ESTRUCTURA POBLACIONAL UTILIZANDO MÉTODOS BAYESIANOS

Mediante este método se estimó el número de grupos genéticos o “clusters” (K) y la asignación de los individuos a cada uno de ellos a partir de los datos moleculares obtenidos a través de los 7 SSRs. Se utilizó el programa Structure 2.2.4 (Pritchard et al., 2000, Falush et al., 2007), asumiendo frecuencias génicas similares entre posibles poblaciones (“correlated model”) y que cada individuo provenía puramente de una u otra población (“no admixture model”). Se modelaron 10 repeticiones por K y de 50,000 (“burn-in”) con 500,000 iteraciones.

El modelo asume que hay un número K de unidades genéticas, de grupos genéticos, “clusters” o poblaciones que pueden ser diferentes al número original de poblaciones muestreadas. En base a estos grupos, cada individuo es asignado a cada uno de los “clusters” identificados a partir de una probabilidad determinada de pertenencia a los mismos. El programa utiliza un método Bayesiano que utiliza un algoritmo para la estimación de las probabilidades: cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC - Markov Chain Monte Carlo). El número de grupos genéticos se determinó a partir del valor de K que maximizó tanto la probabilidad de los datos como del valor modal de ΔK calculado posteriormente como parámetro de segundo orden para definir el verdadero valor del número de clusters (K). (Evanno et al., 2005; Earl y von Holdt, 2012).

3.7.2.3 FLUJO GÉNICO

El Flujo génico histórico (Nm) entre poblaciones fue cuantificado de forma indirecta a partir del coeficiente F_{st} de acuerdo al modelo (Wright, 1951):

$$Nm = (1 - F_{st}) / 4.F_{st}$$

Donde:

- Nm : es el número estimado de migrantes por generación.
- F_{st} : coeficiente de diferenciación entre poblaciones.

Esta estimación asume un modelo de isla del flujo de genes y considera que el valor calculado de F_{st} es el mismo para todos los loci involucrados en el análisis (Berg y Hamrick, 1997). Posteriormente, esta estimación fue corregida por el número total de poblaciones examinadas, afectando a la fórmula anterior por un factor $\alpha = [n/(n-1)]^2$, donde n es el número de poblaciones muestreadas, llegando a la siguiente expresión (Crow y Aoki, 1984):

$$Nm = (1 - F_{st}) / 4.\alpha.F_{st}$$

3.7.3 DISTANCIA GENÉTICA

Para determinar las relaciones genéticas existentes entre la totalidad de los individuos analizados y poder determinar si existe un patrón de agrupamiento, se evaluaron los resultados de los índices de similitud genética obtenidos entre los individuos y el respectivo agrupamiento conforme a los mismos.

3.7.3.1 MATRIZ DE SIMILITUD (MS)

Las matrices de similitud se construyeron en base a las matrices básicas de datos, otorgando un valor de similitud para cada unidad taxonómica operativa (OTU) en relación a la variable analizada (alelo). La similitud se calculó mediante la aplicación de un coeficiente de asociación que mide las coincidencias y diferencias entre cada par de individuo o OTU. Se utilizó el coeficiente de similitud de Jaccard (1908):

$$J = a/(a+b+c)$$

Donde:

- **a (1,1):** es el número de bandas en que ambas OTUs tienen presencia.
- **b (1,0)** es el número de bandas en las cuales la primera OTU tiene presencia y la segunda ausencia.
- **c (0,1)** es el número de bandas en las cuales la primera OTU tiene ausencia y la segunda tiene presencia.

Este coeficiente no tiene en cuenta la co-ausencia (0,0) debido a que considera que la ausencia de una banda por parte de las dos OTUs no implica necesariamente la presencia de un ancestro en común (Gillies et al., 1997). El valor 1 indica que hay similitud total y el valor 0 indica que no hay similitud.

3.7.3.2 ANALISIS DE AGRUPAMIENTO

Debido a que la MS es insuficiente para expresar las relaciones genéticas entre la totalidad de OTUs analizados, ya que sólo muestra la similitud de a pares, se aplicó un método de agrupamiento utilizando el programa NTSYS-pc 2.0, el cual permite visualizar las distancias genéticas de manera gráfica en un fenograma. Se agruparon OTUs de forma exclusiva, aglomerativa, jerárquica y secuencial, en función de los valores de similitud, brindados por la MS, aplicando la técnica SAHN (“Sequential Agglomerative Hierarchic Nonoverlapping”). Para el ligamiento, se aplicó el método del ligamiento promedio denominado UPGMA (“Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average”) que utiliza el promedio aritmético no ponderado, entre los valores de similitud de cada OTU, respecto a los del grupo al cual va a agregarse.

3.7.3.3 TEST DE MANTEL

A partir de las distancias observadas entre pares de individuos en el fenograma del análisis de agrupamiento, se generó una Matriz Cofenética (MC) y luego con el Test de Mantel se calculó el coeficiente de correlación cofenética (r), el cual analiza la correlación existente entre las matrices cofenéticas y de similitud.

3.7.3.4 DISTANCIA GENÉTICA ENTRE POBLACIONES

Mediante el programa GenAIEx 6.503 se obtuvo la matriz de distancia genética de Nei entre poblaciones. Con estos datos se pudo obtener un fenograma poblacional y el ajuste correspondiente (r) comparando la matriz de distancia y su respectiva matriz cofenética, utilizando el programa NTSYS-pc 2.0.

4. RESULTADOS

4.1 VALIDACION DE LOS MARCADORES

A fin de validar los siete marcadores SSR seleccionados, se realizó un análisis de datos para estimar la presencia de alelos nulos, desequilibrio de ligamiento e índice de endogamia. El análisis se realizó sobre 15 individuos representativos de las poblaciones naturales de la especie, colectados en el campo experimental de la EEA Yuto del INTA.

Por lo general, los alelos nulos son causados por mutaciones en las secuencias flanqueantes al motivo repetitivo de los microsátélites. Estas mutaciones, impiden que los cebadores se apareen al ADN durante la PCR, lo que derivan la ausencia de los productos de amplificación (en este caso, los alelos). La presencia de estos alelos nulos, se manifiesta generalmente como un exceso de homocigotas. Si bien fue detectada la presencia de alelos nulos en los 7 loci analizados (Tabla 5), la frecuencia de los mismos fue menor a 0,05 en todos los casos, lo cual permitió mantener el set de marcadores elegido para continuar con los análisis.

Otro factor importante a tener en cuenta cuando se trabaja con marcadores de tipo SSR es el desequilibrio de ligamiento, a fines de detectar una segregación no independiente de marcadores, debida a su cercanía dentro de un mismo cromosoma o a muy bajas tasas de recombinación. No se encontró desequilibrio de ligamiento ($p \leq 0,05$) entre ninguno de los siete loci seleccionados. En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos para los loci AC 1, AC 5, AC 15, AC32, Amb_D5, Amb_D8 y Amb_G3/4.

Por último, fue calculado el estadístico *Fis* (Tabla 5), para evaluar posibles desvíos del Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW), debido a endogamia o cruzamientos no aleatorios. Los valores del coeficiente de endogamia fueron bajos para los siete loci analizados. Para el loci AC 5 se encontraron los valores más altos indicando un mayor desvío respecto del EHW. Este resultado es consistente con la frecuencia de alelos nulos observada para este locus, mayor a la de otros 5 loci, pero no lo suficientemente elevada como para descartarlo del análisis. En relación a los valores de heterocigosidad observada obtenidos para los 7 loci, la *Ho* promedio fue de 0,533 ($ds = 0,320$). La *He* tuvo un valor promedio de 0.598 ($ds = 0,131$), evidenciando un pequeño defecto de heterocigotas.

<i>Locus</i>	<i>An</i>	<i>Fis</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>
AC1	0,017	-0.040	0,733	0,682
AC5	0,049	0.054	0,333	0,340
AC15	0,037	0.078	0,200	0,460
AC32	0,001	-0.040	0,600	0,420
D5	0,047	0.081	0,133	0,667
D8	0,047	0.013	0,733	0,816
G3/4	0,026	-0.021	1,000	0,804
<i>Promedio</i>	0,032	0,017	0,533	0,598
<i>ds</i>	0,0182	0,021	0,320	0,191

Tabla 5: Parámetros estadísticos descriptivos obtenidos para cada marcador. *An*: Alelos nulos, *Fis*: coeficiente de endogamia, *Ho*: heterocigosidad observada, *He*: heterocigosidad esperada.

<i>CL</i>		<i>P</i>
AC1	AC5	0,281
AC1	AC15	0,560
AC1	AC32	0,488
AC1	D5	0,825
AC1	D8	0,412
AC1	G3/4	0,797
AC5	AC15	0,930
AC5	AC32	0,126
AC5	D5	0,375
AC5	D8	0,051
AC5	G3/4	0,720
AC15	AC32	1,000
AC15	D5	0,086
AC15	D8	1,000
AC15	G3/4	0,712
AC32	D5	0,100
AC32	D8	0,671
AC32	G3/4	0,661
D5	D8	0,610
D5	G3/4	0,260
D8	G3/4	0,441

Tabla 6: Resultados del análisis de desequilibrio de ligamiento (DL). *P*: significancia del equilibrio (Valores menores a 0.05 indican DL), *CL*: combinación de los loci.

4.2 DIVERSIDAD GENETICA

Se realizó la caracterización molecular de 84 individuos a través de los 7 SSRs seleccionados, lo que permitió detectar un total de 63 alelos. La diversidad alélica (N_a) promedio fue de 9 alelos, a través de los marcadores e individuos analizados. El número de alelos por locus fue variable, en un rango de 5 a 13, para los loci AC 32 y AC 1, respectivamente. En la Figura 7 se muestran parte de los resultados obtenidos con 3 de los marcadores utilizados para el estudio, empleando la técnica de separación en geles de poliacrilamida y posterior tinción con nitrato de plata de los fragmentos amplificados.

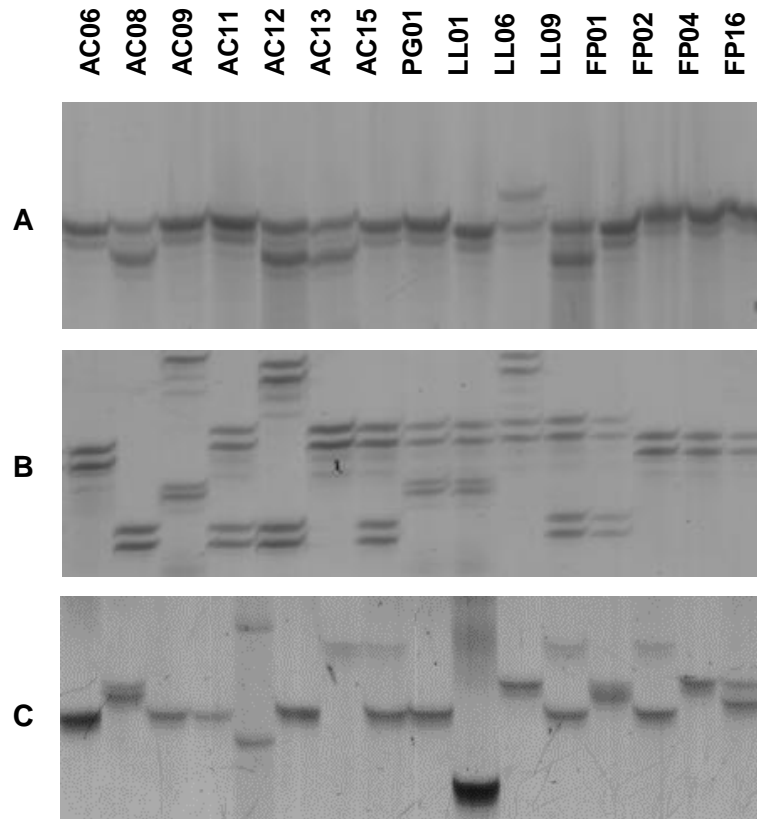


Figura 7: Patrones de amplificación polimórficos de 3 marcadores SSR en *A. cearensis*, utilizando electroforesis en geles de poliacrilamida: A: marcador AC 15; B: marcador Amb_D8; C: marcador AC 1. En la parte superior de las imágenes se indican los individuos amplificados.

En relación a los alelos exclusivos, fueron encontrados un total de 21, distribuidos en 5 de las 7 poblaciones analizadas. Las poblaciones de Yuchán y Calilegua Aserradero, no presentaron estos alelos poco frecuentes, pero si hay que destacar la gran cantidad de estos alelos que presentó la población Piquirenda (9) (Tabla 7).

Otro de los parámetros descriptivos de la diversidad genética evaluado fue la H_o a nivel poblacional, que presentó un valor promedio de 0,600 ($ds = 0,039$), con un valor máximo de 0,647 para la población de La Lucrecia y un valor mínimo de 0,501 para la población de Aguay (Tabla 7). La Heterocigosidad esperada promedio, también llamada Diversidad Genética de Nei, fue de 0,592 ($ds = 0,027$) en promedio. Los valores de H_e por población se encontraron en un rango de entre 0,522 nuevamente para la población de Aguay y 0,676 para la población de Piquirenda. Coincidentemente, los valores insesgados de H_e , se ubicaron en un rango de entre 0,555 y 0,697 para Aguay y Piquirenda, respectivamente, con un valor promedio de $U_{He}=0,61$ ($ds=0,03$) (Tabla 7).

Las frecuencias alélicas promedio, a través de las poblaciones analizadas fueron registradas en la Tabla 8.

Población	A_e	H_o	H_e	U_{he}
Pocoy Ganadero (PG)	1	0,600	0,610	0,675
Piquirenda (PI)	9	0,635	0,676	0,697
Yuchán (YU)	0	0,595	0,565	0,690
Calilegua Aserradero (CA)	0	0,600	0,554	0,616
Aguay (AG)	2	0,501	0,522	0,555
Fraile Pintado (FP)	5	0,622	0,611	0,621
La Lucrecia (LL)	4	0,647	0,604	0,636
<i>Promedio</i>	3	0,600	0,592	0,642
<i>ds</i>	3,266	0,039	0,027	0,029

Tabla 7: Parámetros descriptivos obtenidos sobre A_e , H_o , Diversidad Genética de Nei y U_{he} para los seis marcadores.

Locus	Na	Alelo	Frecuencia	Locus	Na	Alelo	Frecuencia
AC 1	13	214	0,095	AC32	5	242	0,534
		228	0,277			244	0,008
		230	0,014			246	0,305
		232	0,216			248	0,136
		238	0,039			252	0,016
		242	0,066	Amb_D5	7	190	0,004
		256	0,020			192	0,004
		264	0,072			194	0,004
		268	0,084			196	0,004
		272	0,013			218	0,086
		282	0,013			220	0,206
		290	0,059			222	0,693
		302	0,031	Amb_D8	11	154	0,033
AC 5	12	218	0,006			156	0,019
		220	0,012			158	0,006
		222	0,067			160	0,091
		224	0,137			164	0,004
		226	0,034			166	0,08
		230	0,034			170	0,462
		232	0,025			172	0,098
		238	0,026			178	0,016
		240	0,372			180	0,016
		242	0,241			186	0,031
		244	0,043	Amb_G3/4	8	254	0,03
		246	0,002			256	0,11
AC 15	7	212	0,012			258	0,068
		214	0,121			260	0,154
		216	0,008			262	0,026
		222	0,781			264	0,259
		224	0,055			266	0,244
		226	0,017	268	0,108		
		228	0,006				

Tabla 8: Parámetros obtenidos para Na, número de alelos por locus y frecuencia alélica para los seis marcadores.

4.3 DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

4.3.1 ANÁLISIS DE LA VARIANZA MOLECULAR

Con el fin de estimar la estructura genética poblacional, se realizó un AMOVA, considerando tres componentes de la varianza (entre poblaciones, entre individuos dentro de poblaciones y dentro de individuos). El AMOVA evidenció una

moderada, aunque altamente significativa, diferenciación genética poblacional ($F_{st} = 0,065$; $p \leq 0,001$). La mayor parte de la variación genética (81 %) se debió a la variación genética dentro de los individuos (Figura 8; Tabla 9).

Variación	GL	SC	CV	Varianza (%)
Entre las poblaciones	6	36,723	0,160	6%
Dentro de las poblaciones	77	201,319	0,313	13%
Dentro de los individuos	84	167,000	1,988	81%
Total	167	405,042	2,462	100%

Tabla 9: AMOVA realizado para las 7 poblaciones naturales de *A. cearensis*, considerando tres componentes de la varianza. GL: grados de libertad, SC: suma de cuadrados, CV: componentes de la varianza.

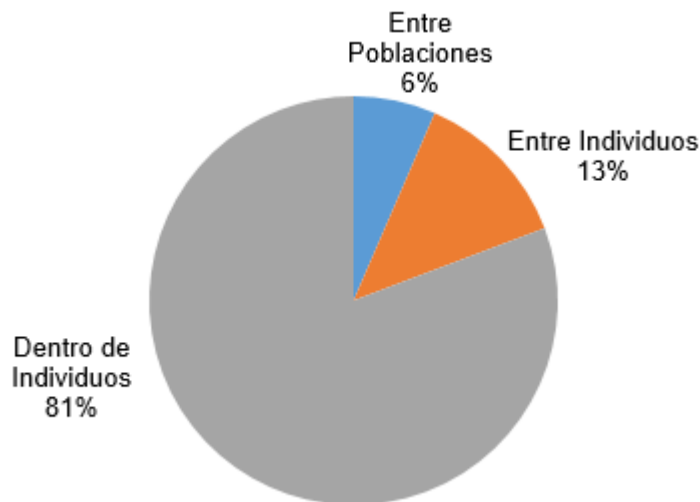


Figura 8: AMOVA realizado para las 7 poblaciones naturales de *A. cearensis*, considerando tres componentes de la varianza.

4.3.2 ESTRUCTURA POBLACIONAL UTILIZANDO MÉTODOS BAYESIANOS

Por otro lado, el número de “clusters” o grupos genéticos (K) obtenido a partir de los siete marcadores SSR, cuyo valor maximizó, tanto los valores de probabilidad de los datos, así como el valor modal de ΔK posteriormente calculado, fue de $K = 2$ (Figura 9). Se aprecian algunas diferencias en la composición genética de las poblaciones de en función a la provincia a la que pertenecen, con resultados

contrastantes principalmente para las poblaciones de Piquirenda y Fraile Pintado (Figuras 10 y 11).

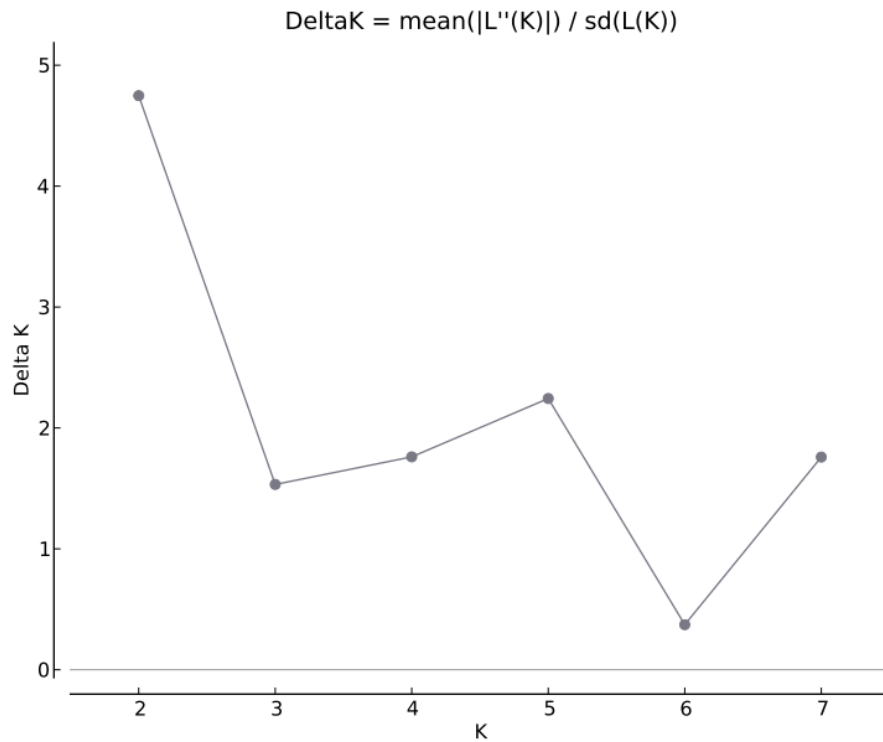


Figura 9: Distribución del Delta K, donde el mayor valor ocurre en $K = 2$.

El grupo 1 (rojo), tuvo mayor prevalencia en las poblaciones del sur, localizadas en la provincia de Jujuy, donde se presentó en el 91% de los individuos de la Población Fraile Pintado, en el 68% de los individuos de la población La Lucrecia, en el 49% de los individuos de la población Calilegua Aserradero y se presentó también, aunque en menor medida (41%), en la población de Yuchán.

Por el contrario, el grupo 2 (verde) tuvo mayor presencia en las poblaciones del norte, localizadas en la provincia de Salta, al límite con Bolivia. La población de Piquirenda fue la que evidenció una mayor presencia de este grupo, con un 95% de sus individuos que lo poseen.

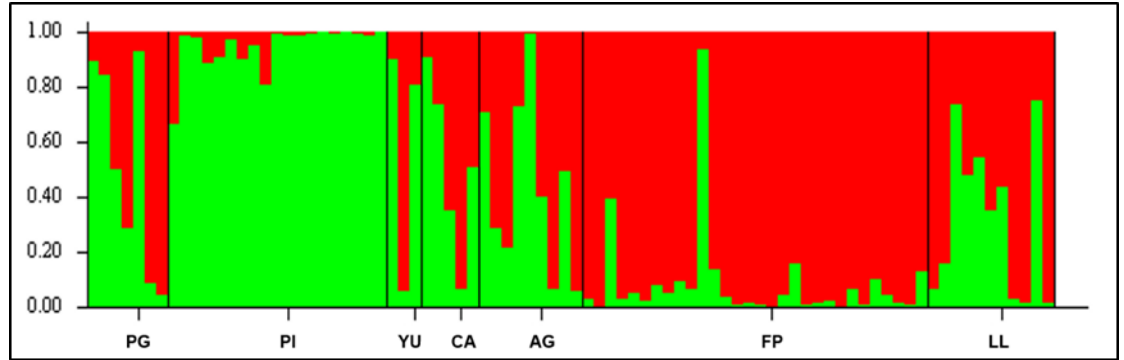


Figura 10: Contribución de los individuos / poblaciones de *A. cearensis* a los 2 grupos genéticos observados.

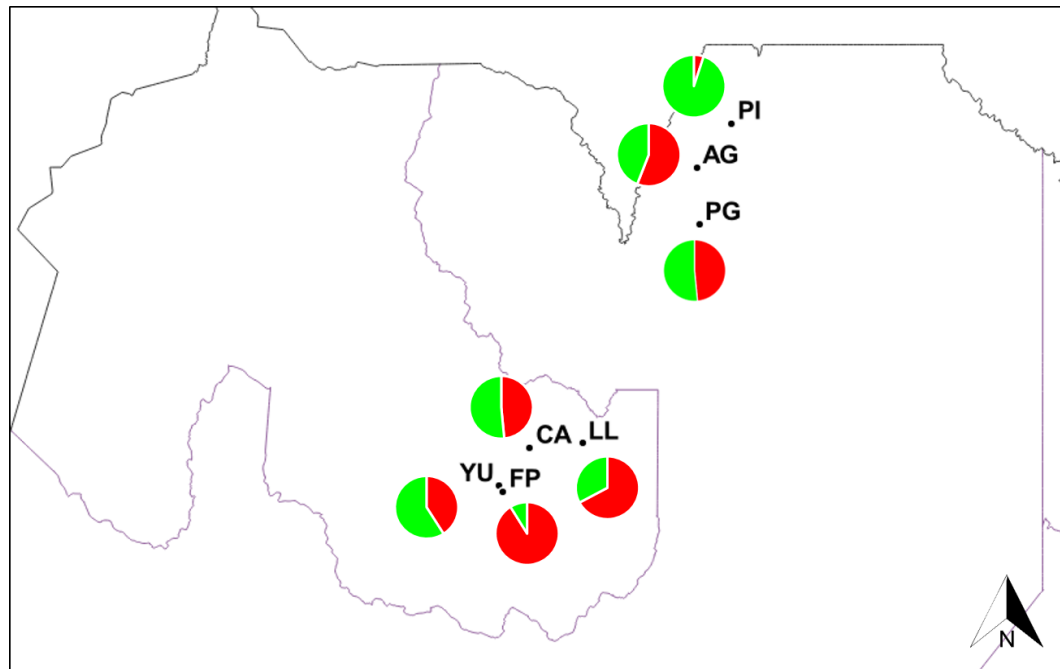


Figura 11: Porcentaje de participación de las 7 poblaciones de *A. cearensis* en los 2 grupos genéticos K detectados.

4.3.3 FLUJO GÉNICO

El Flujo génico histórico (Nm) entre poblaciones fue estimado en 2,6 a partir del estadístico $F_{st} = 0,065$ (Lynch y Milligan, 1994).

4.4 DISTANCIAS GENÉTICAS

Mediante el programa NTSYS-pc 2.0 (Rohlf et al., 1998), se estimaron las distancias genéticas entre los individuos pertenecientes a las 7 poblaciones obteniéndose el fenograma correspondiente (UPGMA), el cual presentó un valor de ajuste moderado a alto ($r = 0.684$, Test de Mantel) (Figura 12 y Figura 13).

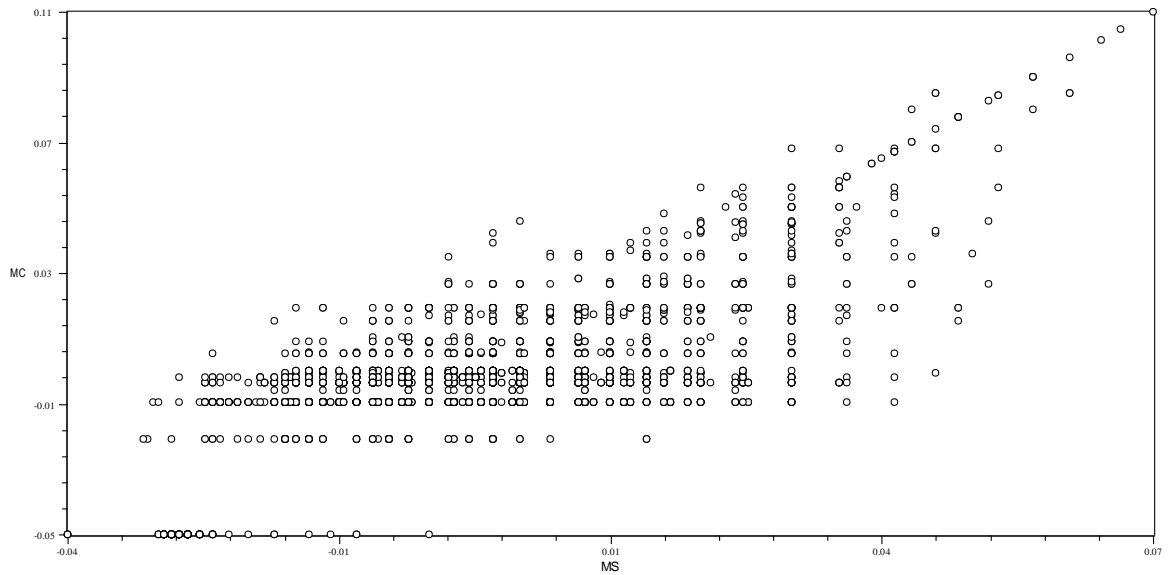


Figura 12: Correlación entre la Matriz de Similitud (MS) y la Matriz Cofenética (MC), obtenida a partir del fenograma, en función de los marcadores co-dominantes.

En la Figura 13 se puede ver claramente que el análisis permitió la discriminación de la totalidad de los individuos analizados. Se observaron dos agrupamientos por composición de las poblaciones, para la mayoría de los individuos de la población Fraile Pintado (resaltado en naranja) y para la mayoría de los individuos de la población Piquirenda (resaltado en azul). El Índice de Similitud promedio (ISm), para la totalidad de individuos analizados presentó un valor de 0,28 ($ds = 0,1$).

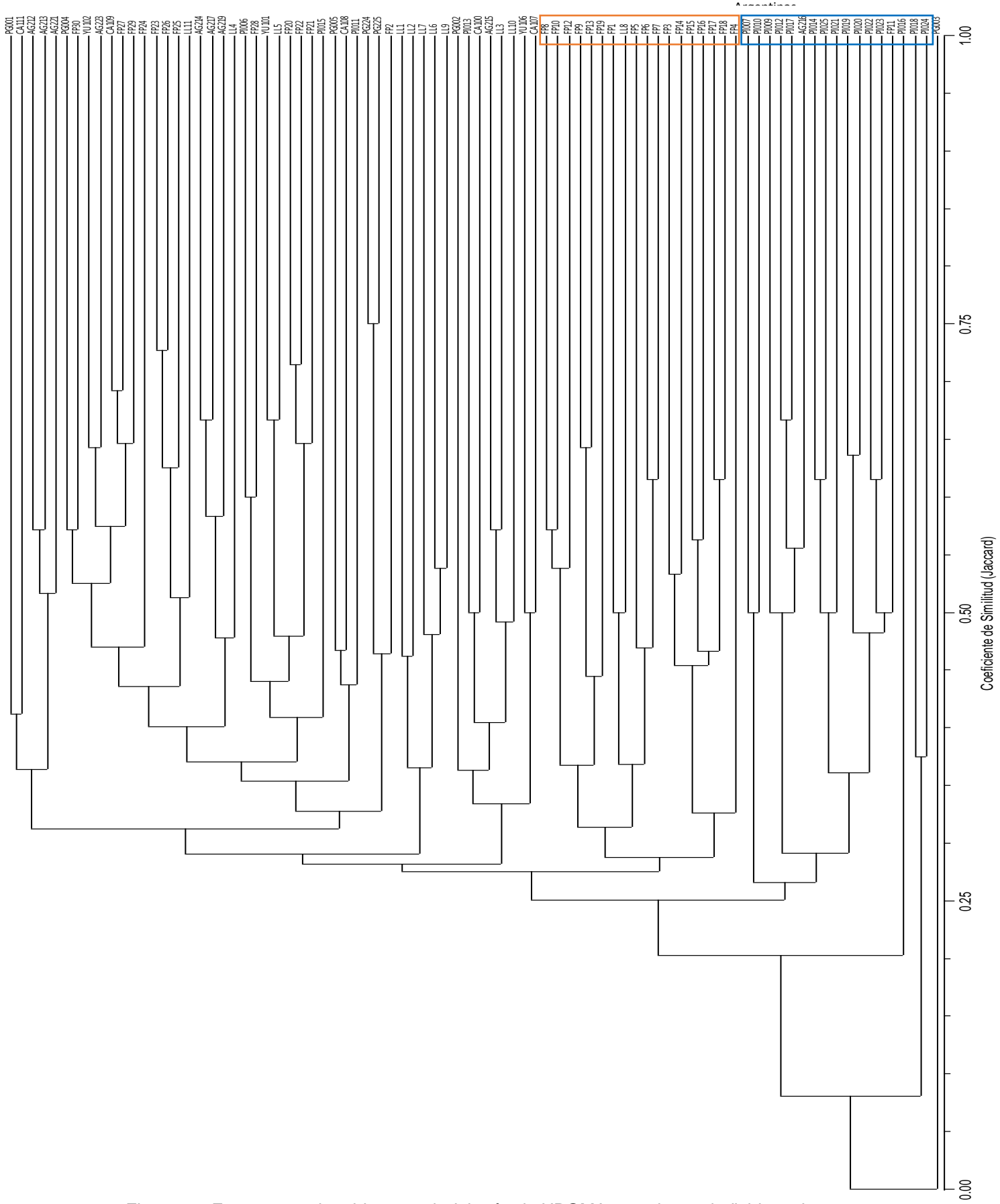


Figura 13: Fenograma obtenido, a partir del método UPGMA, para los 84 individuos de *A. cearensis* analizados mediante los marcadores SSRs.

Por último, las distancias genéticas entre los pares de poblaciones (Nei, 1978), fueron bajas. En la Figura 14 se puede ver el fenograma obtenido y el grado de ajuste del mismo. Los valores máximos de distancia se obtuvieron para la población Piquirenda, con una distancia máxima de 0,087 respecto del resto de las poblaciones. También se observó una separación de la población Fraile Pintado, con una distancia de 0,078. El resto de las poblaciones (Yuchán, Calilegua Aserradero, Pocoy Ganadero, Aguay y La Lucrecia), no presentaron grandes distancias entre ellas.

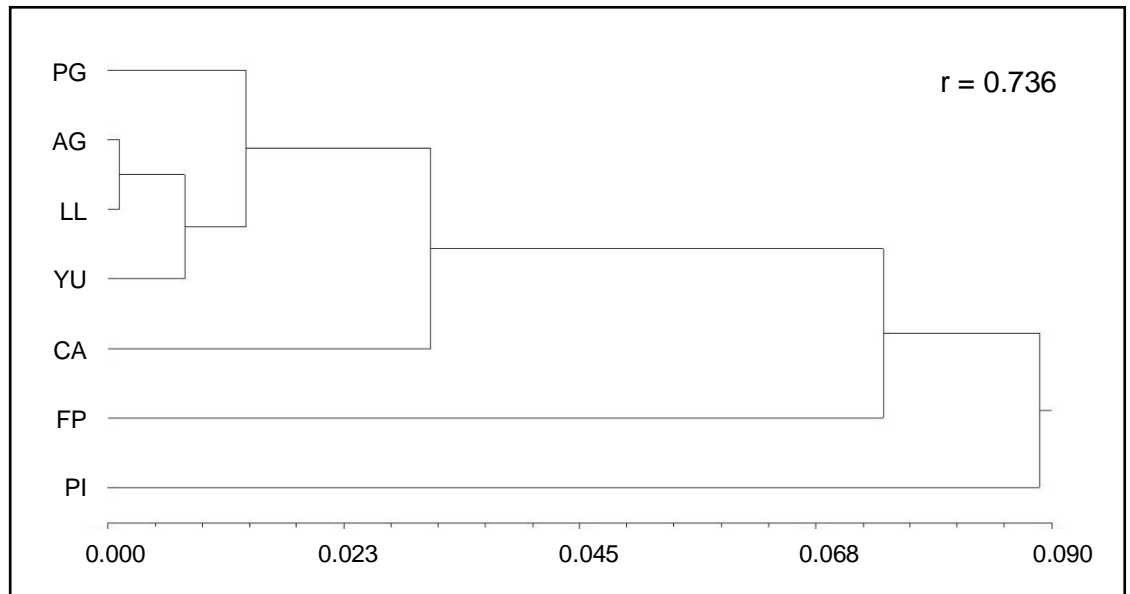


Figura 14: Fenograma obtenido a partir de las distancias genéticas existentes entre las 7 poblaciones de *A. cearensis*.

5. DISCUSIÓN

5.1 VALIDACION DE SSRs

En esta tesina se pretendió caracterizar y cuantificar los niveles y distribución de la variabilidad genética molecular en 7 poblaciones naturales de *Amburana cearensis*, con el fin de complementar acciones dirigidas a la adecuada conservación de la especie, en largo plazo. Se utilizó como herramienta de base un conjunto de 7 marcadores SSRs desarrollados para la especie en estudio, que previamente habían sido caracterizados y evaluados respecto del equilibrio Hardy Weinberg, pero utilizando como material de base poblaciones de la especie naturales de Brasil (Seleme, 2014; Barral, 2018). Estos trabajos no evidenciaron presencia de desvíos del equilibrio en el set de marcadores elegidos para el trabajo. Sin embargo, al trabajar con material de orígenes diferentes, se realizó la validación de los 7 marcadores seleccionados en este trabajo a través de la frecuencia de alelos nulos, desequilibrio de ligamiento y el coeficiente de endogamia. Todos estos factores pueden incidir en la desviación del Equilibrio de Hardy-Weinberg (Soldati et al., 2012; Moreno Amores, 2014; Contreras et al., 2021).

Los alelos nulos son alelos que resultan recesivos a los marcadores co-dominantes sin ningún efecto sobre el fenotipo de los individuos. La falta de amplificación de un SSR puede estar dado por un mal “annealing” de los cebadores, fallas en la reacción de amplificación, variaciones en las secuencias de nucleótidos en la región flanqueante, lo que evita que los cebadores hibriden con el ADN molde, etc. La presencia de estos alelos nulos en estudios de genética poblacional, puede llevar a subestimar la variabilidad presente en las poblaciones y pueden puede sesgar la estimación de los genotipos y de las frecuencias alélicas (Dowling et al., 1997; Chapuis y Estoup, 2006; Jahnke et al., 2022). Los resultados obtenidos en este trabajo, permitieron indicar que, si bien los marcadores seleccionados presentaron alelos nulos en su totalidad, ninguno lo hizo con frecuencias mayores a 0,05. Este valor representa el parámetro de referencia en relación a frecuencias de alelos nulos elevadas, que indica que los mismos sean rechazados para análisis de genética poblacional (Chapuis y Estoup, 2006).

Por otro lado, se evaluó la presencia de desequilibrio de ligamiento (DL) entre los 7 loci evaluados. El DL, entendido como la asociación no aleatoria de alelos y la segregación no independiente de los marcadores (Castells, 2006), no estuvo

presente en los loci analizados. Por último, se descartó un desvío en el Equilibrio Hardy-Weinberg que pudiera estar causado por procesos endogámicos o de apareamiento consanguíneo (Castells, 2006), ya que los valores obtenidos de F_{is} fueron en mayor o menor medida, cercanos a 0 (- 0,040 a 0,054), indicando ausencia de endogamia.

El exceso de heterocigotas puede indicar una selección sobredominante o puede ser el efecto de una reproducción cruzada obligada. Por el contrario, el defecto de heterocigotas puede deberse a la presencia de alelos nulos y/o a la consanguinidad (Castells, 2006). Cuando la heterocigosidad, que puede variar entre 0 y 1, es tomada como parámetro de evaluación de marcadores, se la puede utilizar para determinar la capacidad discriminatoria de los mismos (Mathias et al., 2006). Cuanto más cercano a 1 sea el valor, mayor será esta capacidad. Pudimos observar que los marcadores utilizados en este trabajo presentaron valores variables para este parámetro (0,340 a 0,816). Tal como fue mencionado en los resultados, el marcador con el menor poder discriminativo fue el marcador AC 5. Este resultado puede ser explicado por la mayor presencia de AN manifestada por el marcador.

5.2 DIVERSIDAD GENETICA

La diversidad genética de una especie depende de varias características, algunas propias de la especie, como su forma y ciclo de vida, la distribución que tiene, como se reproduce, la densidad de sus ejemplares, entre otras. Al mismo tiempo, la diversidad genética de las especies, particularmente vegetales, se ve afectada por los procesos que afecten al área en la que se encuentren las poblaciones y ejemplares estudiados, como por ejemplo las condiciones ambientales, la deforestación, el uso del suelo y el avance de la frontera agropecuaria (Vellend, 2004; Vellend, 2006).

Los resultados obtenidos a partir del análisis realizado con siete marcadores SSRs permitieron detectar un total de 63 alelos, con un promedio de 9 alelos por población, en un rango de entre 5 a 13 alelos. Resultados para este parámetro, similares o algo mayores, fueron encontrados en otras especies forestales distribuidas en las Yungas del NOA. Por ejemplo, para *Cedrela balansae* se encontraron en promedio 8,85 alelos en un número similar de poblaciones y para

Anadenanthera colubrina se observaron 13,7 alelos en un número menor de individuos (Soldati et al, 2012; García et al., 2014). En relación a los alelos exclusivos, se obtuvieron en promedio 3, distribuidos en 5 de las 7 poblaciones. Estos resultados son mayores a los presentados por Zelener y colaboradores (2021) para *C. balansae* (Yungas), pero mucho menores que los presentados por los mismos autores para *C. fissilis* (Selva Paranaense).

Al analizar la diversidad genética presente en las poblaciones argentinas de *A. cearensis*, se pudieron determinar valores promedio de $He = 0,592$ ($ds = 0,027$) y $UHe = 0,642$ ($ds = 0,029$). Estos resultados constituyen el primer estudio genético sobre la especie en nuestro país. Adicionalmente. Existen muy pocos estudios sobre la diversidad genética de *A. cearensis*. Se pueden destacar los estudios realizados Barral en 2018, en donde se evaluaron 9 poblaciones brasileras de la especie con ocho marcadores SSR, obteniéndose valores moderados de diversidad genética ($He = 0,509$). Por otro lado, también destacan los resultados de Catelan y colaboradores (2004), los cuales obtuvieron una diversidad genética más alta ($He = 0,79$) para poblaciones de la especie con distribución en Brasil. Esta diferencia en los valores de diversidad puede deberse a que en dicho trabajo se utilizó un mayor número de marcadores SSR y a una mayor cantidad de individuos analizados, en un rango de distribución mayor, lo que facilitaría en cierta medida el hecho de encontrar mayores niveles de diversidad genética en las poblaciones. Al mismo tiempo, la cercanía al centro de origen de la especie (Seleme et al., 2015), podría ser otro de los factores que influyen en los niveles de diversidad observados.

Como se ha mencionado antes, *A. cearensis* pertenece a la familia Fabaceae, subfamilia Papilionoideae (Lorenzi, 1992; Mello et al., 2013). Forma parte del clado *Amburana*, junto con distintas especies forestales de los géneros *Cordyla*, *Myrospermum* y *Myroxylon* (Cardoso et al., 2012). Para estos dos últimos géneros existen numerosos estudios de diversidad genética, que permiten hacer una comparación con los resultados obtenidos en este trabajo. En *Myroxylon peruiferum* se encontraron valores de diversidad genética ($He = 0,460$; $He = 0,430$) ligeramente menores que los encontrados en *A. cearensis* (Aguiar Silvestre et al., 2018; Zucchi et al., 2018). Adicionalmente, Santos de Santana y colaboradores (2022) encontraron para esa misma especie valores de He (0,530) comparables con aquellos obtenidos para *A. cearensis*.

Por otro lado, cuando se contrastan los resultados obtenidos, con otras especies con similares hábitos de vida, densidad por hectárea, localizadas en el mismo ambiente y en un rango de distribución similar, los resultados son variables. Por ejemplo, para *C. balansae* (Soldati, 2013) se obtuvieron valores de diversidad moderados ($U_{He} = 0,620$) y un menor número de alelos exclusivos (1,4 en promedio). Por otra parte, García y colaboradores (2014) analizaron la diversidad de *Anadenanthera columbrina* var. *cebil* y observaron una diversidad genética mucho más alta ($He = 0,85$; un $Ho = 0,75$). Esta diferencia que se observa si se la contrasta con las poblaciones de *A. cearensis* puede deberse a que *A. columbrina* posee alta germinación y un crecimiento más rápido, lo que permitiría una mejor adaptación a las perturbaciones ambientales (Justiniano y Fredericksen, 1998).

Se sabe que existe una disminución general de los niveles de diversidad biológica hacia el sur de las selvas neotropicales (Beck et al., 2008). Las Yungas de nuestro país se encuentran en el extremo sur de los Bosques Nublados del Neotrópico, por lo cual es esperable que la diversidad biológica en este ecosistema sea menor que en otros puntos de distribución (Brown et al., 2001; Soldati et al., 2012). De la Sota (1972) se refiere a esta región como el extremo empobrecido de las Yungas. Hillebrand (2004), plantea un gradiente de disminución de la biodiversidad en relación al aumento de la latitud, al igual que Juárez et al. (2007), los cuales plantean para el NOA una disminución de la biodiversidad taxonómica en función del aumento de la latitud. También es necesario tener en cuenta que las poblaciones muestreadas en este trabajo de *A. cearensis* tienen una distribución marginal, representando el extremo sur de distribución de la especie en el mundo (Seleme et al., 2015). Es esperable entonces que los valores de diversidad genética obtenidos en este trabajo sean representativos de esa ubicación marginal. Se ha demostrado que los niveles de He son menores cuando se evalúan poblaciones forestales en extremos de distribución (Maguire et al., 2002). Adicionalmente, hay que tener en cuenta que las poblaciones marginales suelen expresar variantes alélicas únicas, propias de las condiciones extremas en las que se han desarrollado (Hardie y Hutchings, 2010). Esto se pone de manifiesto en los 21 alelos exclusivos, encontrados en 5 de las poblaciones de *A. cearensis* evaluadas en este trabajo.

Otro de los factores que juega un rol importante en la variabilidad genética de las especies forestales en la intervención antrópica. La deforestación y el avance de

la frontera agropecuaria constituyen fenómenos que tienen una gran influencia sobre procesos genéticos a los cuales se ven sometidos las poblaciones (selección, deriva y flujo génico) (Lowe et al., 2005; Lander et al., 2011; Haddad et al., 2015; Browne y Karubian, 2018). Se sabe que las poblaciones de *A. cearensis* en el pedemonte de las yungas han prácticamente desaparecido por la presión antrópica (Fomes, 2021). El efecto de disminución de la diversidad genética debido al aprovechamiento forestal, ha sido observado en algunas especies del clado *Amburana*. Por ejemplo, para *M. peruiferum* se ha observado una reducción significativa en sus tamaños poblacionales, causada principalmente por la explotación forestal, lo que ha comprometido la diversidad genética de la especie e incrementado su estado de vulnerabilidad (Mamede et al., 2007). Es importante destacar que las poblaciones muestreadas de *A. cearensis*, se distribuyen en la Selva Pedemontana, el piso de menor altitud en las Yungas y el cual ostenta el record de transformación del 70-80% de la superficie boscosa original en campos agrícolas (Brown y Malizia, 2004; SAyDS, 2007). Al mismo tiempo, ninguna de las poblaciones ensayadas se localiza dentro de áreas protegidas y se observa un alto grado de disturbio en la gran mayoría de las poblaciones. Se puede inferir entonces que el conjunto de poblaciones de *A. cearensis* estudiadas puede considerarse como una representación adecuada del actual estado de vulnerabilidad del recurso genético.

5.3 DIFERENCIACION GENETICA

La variabilidad genética de las especies, así como la estructuración de dicha variabilidad, está íntimamente relacionada con diversos factores biológicos inherentes a la especie en estudio. Sin embargo, es importante también destacar que existen otros factores que pueden ayudar a explicar la distribución de esta variabilidad: su historia evolutiva y los procesos de intervención antrópica a los que se ve sujeta la especie (Tang et al, 2008).

El patrón de distribución de la variabilidad obtenido para *A. cearensis*, en relación a tres componentes de la varianza (entre poblaciones, dentro de las poblaciones y dentro de los individuos), presentó una mayor variación genética distribuida dentro de los individuos (81%) o dentro de las poblaciones (94%), con los menores niveles de variación correspondientes a la diferenciación entre las poblaciones

estudiadas (6%). Este patrón es coincidente con lo que se espera para especies perennes, leñosas, longevas y de distribuciones amplias, las cuales tienden a presentar mayor proporción de la variación genética distribuida dentro de las poblaciones (Hamrick et al., 1992; Acheré et al., 2005; Tang et al., 2008).

Los valores obtenidos en este trabajo fueron algo menores que los encontrados en poblaciones de *A. cearensis* de Brasil (Barral, 2018), donde el *Fst* presentó un valor de 0,115 (11%). Sin embargo, los resultados muestran la misma tendencia de diferenciación entre las poblaciones, reflejando una diferencia genética moderada (Hartl y Clark, 1997). Por otro lado, para *M. peruiferum*, especie del clado *Amburana*, se obtuvieron valores similares de diferenciación entre poblaciones en diferentes estudios (12% y 13% en las publicaciones de Santana et al., 2022 y Schwarcz, 2018), nuevamente reflejando una diferenciación genética moderada.

Contrariamente, cuando se compararon los resultados obtenidos en este trabajo con otros realizados en especies con similares características de vida e igual rango de distribución en las Yungas, encontramos diferencias notorias. Soldati (2010), obtuvo para 8 poblaciones de *C. balansae* un 19% de diferenciación entre las poblaciones utilizando siete marcadores SSR.

Los resultados obtenidos en este trabajo son consistentes con las observaciones que presentaron Kageyama y colaboradores (2003) para *C. fissilis*, quienes plantearon que las especies secundarias, con ciclo de vida largo y menor densidad poblacional, como también es el caso de *A. cearensis*, suelen presentar niveles moderados de diferenciación (5% - 15%) entre sus poblaciones. Al mismo tiempo, se sabe que los árboles tienden a presentar una diferenciación poblacional significativamente menor cuando su polinización y dispersión están mediadas por insectos grandes, vertebrados y viento (Gamba and Muchhala, 2020).

El número de “clusters” o grupos genéticos obtenidos para el material de *A. cearensis* analizado fue de $K = 2$. Se observaron claras diferencias en la distribución de los grupos genéticos de las poblaciones de Piquirenda y Fraile Pintado, estando la primera ubicada al norte de Salta y la segunda al sur de Jujuy. Esta distribución heterogénea de grupos genéticos puede estar relacionada a la historia de uso de cada una de las poblaciones. Sin embargo, hay que destacar que las 5 poblaciones restantes presentan cierta homogeneidad en la distribución

de los grupos genéticos, lo que sugiere que dichas poblaciones podrían comportarse como una unidad genética más homogénea.

Cuando se comparan los resultados obtenidos en este trabajo, con los resultados obtenidos para poblaciones de Brasil (Barral, 2018), se evidencia un menor número de grupos genéticos en las poblaciones argentinas. En dicho trabajo se obtuvo un $K = 4$ utilizando 8 SSRs. Sin embargo, este número de “clusters” puede estar sesgado ya que, entre los individuos de Brasil, se sumó un individuo de Argentina y uno de Perú, pudiendo ser estos los causantes del aumento de grupos genéticos debido a la lejanía de las poblaciones.

Por último, el flujo genético histórico (Nm) se estimó en un valor moderado / alto (2,6). Es importante destacar que fue mayor a 1, valor propuesto por Young y colaboradores (1996) como el nivel mínimo de flujo génico requerido para disminuir la ocurrencia de estructuración genética por efecto de la deriva (Kageyama et al. 2003). Sin embargo, hay que tomar este dato con cautela, ya que la estimación del flujo génico realizada en este trabajo es indirecta y el flujo génico que se estima es histórico. Esta estimación podría no estar reflejando los efectos actuales de las amenazas que sufren las poblaciones, lo que en el futuro podría llevar a menores valores de Nm con incrementos asociados de la diferenciación poblacional. La deforestación, explotación, fragmentación y degradación de hábitat, introducción de especies vegetales invasoras y animales afecta la selección, el flujo genético, la deriva genética y la mutación (Ledig, 1992). Estas modificaciones de los hábitats naturales, podrían afectar los patrones de polinización, llevando a un incremento de la estructura observado en dos de las poblaciones (Spira et al., 2001; Ward et al., 2005).

Adicionalmente, es importante tener en cuenta que las poblaciones analizadas en este trabajo se encuentran en un rango corto de distancia geográfica (~ 200 km) lo que podría indicar que las poblaciones aún se encuentran dentro de un área de potencial contacto reproductivo (Cavers et al., 2003; Soldati et al., 2012).

Otro punto a tener en cuenta es la existencia de barreras geográficas entre las poblaciones de *A. cearensis* analizadas. Una de las barreras geográficas más importantes es el Río Bermejo, situado al norte de la provincia de Salta, pudiendo ser el causante de no permitir la dispersión de semillas entre las poblaciones de Salta y Jujuy. Por otro lado, en Jujuy se encuentra el Río San Lorenzo, separando las poblaciones de Fraile Pintado, Yuchan y La Lucrecia con las de Calilegua Aserradero, y el Río Ledesma, que separa a Yuchan de Fraile Pintado y La Lucrecia. Estas barreras podrían explicar las diferencias genéticas observadas entre estas zonas.

Como se ha mencionado anteriormente, un factor importante es la viabilidad de las semillas que, en el caso de *A. cearensis*, pierden rápidamente la viabilidad (Ayarde, 2006; López et al., 1987), pudiendo evitar la dispersión de estas a sitios más alejados. Por otro lado, la polinización llevada a cabo por abejas y polillas (Dias et al., 2007), se puede ver afectada por la distancia en la que se encuentran las poblaciones de la provincia de Salta y Jujuy.

5.4 DISTANCIAS GENÉTICAS

El fenograma obtenido mediante UPGMA presentó un ajuste moderado ($r = 0,684$), indicando que la representación gráfica de los datos es adecuada (Maguire et al., 2002; Belletti et al., 2008). Al mismo tiempo, se pudieron discriminar la totalidad de los individuos evaluados, con un índice de similitud promedio de 0,280. Por esta razón, los patrones genéticos de identificación genética (“fingerprinting”) aquí obtenidos constituyen una herramienta que puede ser empleada para el adecuado diseño de poblaciones de producción.

Mediante este análisis se detectaron dos agrupamientos marcados, para gran parte de los individuos de la población de Fraile Pintado, por un lado, y para gran parte de los individuos de la población Piquirenda, por el otro. Estos dos grandes grupos se separaron con una similitud máxima de 0,260. El resto de los individuos no presentó un agrupamiento definido.

Cuando se evaluaron las distancias genéticas a nivel poblacional, el dendrograma obtenido ($r = 0,736$) evidenció nuevamente una separación para las poblaciones de Piquirenda y Fraile pintado. Si bien las distancias entre las poblaciones fueron

bajas, los agrupamientos fueron claros, sosteniendo la tendencia de separación de dichas poblaciones.

Una posible explicación a estos agrupamientos puede estar relacionada a la distribución de los “clusters” que manifestó cada una de estas poblaciones. Por otro lado, se podrían mencionar las precipitaciones como un rasgo climático que permita explicar el agrupamiento encontrado, principalmente para Piquirenda. Es esa zona, las precipitaciones varían de 801 – 1400 mm anuales (Bianchi et al., 2005), siendo mayores que para el resto de las poblaciones. Observaciones realizadas hace algunos años, indican que cuando las precipitaciones son más escasas o cuando se dan esporádicamente, se produce un número mayor de semillas abortivas por el incremento de la temperatura (26°C a 27.2°C), lo que podría impactar en los niveles de diversidad de las poblaciones (Ruíz, 2015). Eso podría explicar el por qué la población Piquirenda presenta mayores niveles de diversidad y consecuentemente se separa más claramente del resto de las poblaciones. Al mismo tiempo, hay estudios que comprueban una mayor diferenciación para poblaciones sometidas a mayores precipitaciones medias anuales, lo que también podría explicar el comportamiento de la población Piquirenda (Avolio et al., 2009; Boshier et al., 1997; Lowe et al., 2003).

6. CONCLUSIONES

- Se obtuvo un set de siete marcadores SSR para su uso en poblaciones naturales de *A. cearensis* en Argentina, en función de una buena resolución de los patrones de identificación genética, de su capacidad de discriminación y de su validación respecto a la ausencia de posibles desvíos del Equilibrio de Hardy-Weinberg.
- Los marcadores seleccionados han permitido estimar con éxito los niveles de diversidad y estructura genética, así como también las relaciones entre los individuos de *A. cearensis* a lo largo de su distribución natural en Argentina.
- Las poblaciones de *A. cearensis* estudiadas en este trabajo, manifestaron en conjunto niveles moderados de diversidad y diferenciación genética. Las poblaciones de Piquirenda y Fraile Pintado presentaron los mayores niveles de diversidad genética intrapoblacional (U_{He} y A_e). Al mismo tiempo, presentaron características contrastantes en cuanto a la distribución de los dos grupos genéticos detectados en la especie. Estas dos poblaciones pueden ser adecuadas para su incorporación en los programas de conservación de la especie.
- Los marcadores permitieron la identificación genética inequívoca de la totalidad de individuos analizados. Se destacaron dos agrupamientos de individuos para las poblaciones de Piquirenda y Fraile Pintado.

7. PROPUESTAS

- Incrementar el número de marcadores microsatélites para la caracterización del material. Al mismo tiempo, incrementar y equiparar los tamaños poblacionales, para obtener datos más robustos sobre la totalidad de las poblaciones estudiadas.
- Incrementar el número de poblaciones muestreadas, haciendo hincapié principalmente en la zona de transición del rango ya evaluado (límite entre Salta y Jujuy), con el fin de analizar la variabilidad genética en dicha zona y determinar si existen diferencias significativas o si, por el contrario, existe una transición homogénea en los niveles de variabilidad de la especie en el país.
- Establecer contacto con investigadores de Brasil, Bolivia y Paraguay con el fin de realizar análisis genéticos conjuntos en la especie, abarcando la totalidad del rango de distribución.
- Desarrollar programas de conservación y mejoramiento en la especie en base a los resultados obtenidos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Achard, F.; DeFries, R.; Eva, H.; Hansen, M.; Mayaux, P.; Stibig, H. J., (2007). Pan-tropical monitoring of deforestation. *Environmental Research Letters* 2:045022.
- Acheré, V.; Favre, J.; Besnard, G.; Jeandroz, S., (2005). Genomic organization of molecular differentiation in Norway spruce (*Picea abies*), *Molecular Ecology* 14: 3191-3201.
- Arturi, M. F.; Grau, H. R.; Aceñolaza, P. G.; & Brown, A. D., (1998). Estructura y sucesión en bosques montanos del Noroeste de Argentina. *Revista de Biología Tropical*, 46(3), 525-532.
- Avolio, M.; Beaulieu, J.; Smith, M., (2009). Altered precipitation patterns increase the genetic diversity of a dominant species, The 94th ESA Annual Meeting, Poster COS 101-5.
- Ayarde, H. R., (2006). Germinación y viabilidad de semillas de *Amburana cearensis* (Fabaceae). *Lilloa*, 43(1-2), 23–28.
- Balvanera, P., (2012). Los servicios ecosistémicos que ofrecen los bosques tropicales. *Ecosistemas* 21(1): 136-147.
- Barral, E. C., (2018). Biología reproductiva, ecología de populações e filogeografía de *Amburana cearensis*, leguminosae ameaçada de extinção.
- Beck, E., et al. 2008. Gradients in a Tropical Mountain Ecosystem - a Synthesis. En E. Beck, J. Bendix, I. Kottke, F. Makeschin, and R. Mosandl, editors. *Gradients in a tropical mountain ecosystem of Ecuador*. Ecological Studies 198, Berlin, Heidelberg. Pp: 451-463
- Beckmann, J. S.; Weber, J. L., (1992). "Survey of human and rat microsatellites." *Genomics* 12: 627–631.
- Belletti, P.; Monteleone, I.; Ferrazzini, D., (2008). A population genetic study in a scattered forest species, wild service tree (*Sorbus torminalis* L. Crantz), using RAPD markers, *European Journal Forest Research* 127: 103-114.
- Benbouza, H.; Jacquemin, J. M.; Baudoin, P. J.; Mergeai, G., (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* Pp: 77-81.
- Berg M. E. V. D., (1986). Formas atuais e potenciais de aproveitamento das espécies nativas exóticas do Pantanal Mato-Grossense. In: Simpósio sobre recursos naturais e sócio econômicos do pantanal, Corumbá,

Embrapa – UFMS. Anais, Brasília, (EMBRAPA-CPAC. Documentos, 5). P. 131-136.

- Bianchi, A. R.; Yañez, C. E.; Acuña, L. R., (2005). Base de datos mensuales de precipitaciones del Noroeste argentino. Proyecto Riesgo Agropecuario (Convenio Específico N° 3 al Convenio N° 141 INTA-SAGPYA).
- Boshier, D. H.; Lamb, A. T., (1997). Mating system, population structure and gene flow. *Cordia alliodora* - genetics and tree improvement, Tropical Forest Papers 36: 29–36.
- Brown A. D.; Malizia L. R., (2004). Las selvas Pedemontanas de las Yungas. *CienciaHoy*, 14(83), 53-63.
- Brown, A. D., (2009). Selva pedemontana de las Yungas, historia natural, ecología y manejo de un ecosistema en peligro. En: Manejo sustentable y conservación de la biodiversidad de un ecosistema prioritario del noroeste argentino. Fundación proYungas Capítulo 1:13-37.
- Brown, A. D.; Grau A., (1995). Las Selvas de Montaña del Noroeste Argentino. Problemas ambientales e importancia de su conservación. Investigación, conservación y desarrollo en las selvas subtropicales de montaña. Laboratorio de Investigaciones Ecológicas de las Yungas. UNT, 9-18.
- Brown, A. D.; Grau, H. R.; Malizia, L. R.; Grau, A., (2001). Argentina, en Bosques Nublados del neotrópico, 19: 623-659, Eds. INBio.
- Brown, A. D.; Pacheco, S.; Lomáscolo, T.; Malizia, L. R., (2006). La situación ambiental argentina 2005. En: Situación ambiental de los Bosques Andinos Yungueños. Eds: Brown, A., U. Martinez Ortiz, M. Acerbi y J. Corcuera. 53-61, Fundación Vida Silvestre Argentina.
- Brown, A.D.; Grau A.; Lomáscolo T.; Gasparri N. I., (2002). Una estrategia de conservación para las selvas subtropicales de montaña (yungas) de argentina. Ed: Saber Ula. *Ecotropicos* 15(2):147-159
- Browne, L.; Karubian, J., (2018). Habitat loss and fragmentation reduce effective gene flow by disrupting seed dispersal in a neotropical palm. *Mol Ecol* 27:3055–3069.
- Burkart, A. E., (1952), Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas (2.ed.). Buenos Aires: Acme.

- Cabrera, A., (1976). Regiones fitogeográficas de la República Argentina. Enciclopedia de Agricultura, Jardinería y Fruticultura. Capítulo 2: 1-85. Acme Buenos Aires.
- Calzón, M. E.; PALMA, R. M, (2008). El roble criollo. XXIII Jornadas Forestales de Entre Ríos, Octubre 2008. Concordia, Entre Ríos, Argentina
- Cardoso, D.; de Queiroz, L. P.; Pennington, R. T.; de Lima, H. C.; Fonty, E. Wojciechowski, M. F.; Lavin, M., (2012). Revisiting the phylogeny of papilionoid legumes: new insights from comprehensively sampled early-branching lineages. *American Journal of Botany*.
- Castells, J. C., (2006). Brújula para botánicos desorientados en la genética de poblaciones, Exegen ediciones.
- Catelan, R. C.; Nakasu, E. Y .T.; Ciampi, A. Y., (2004). Desenvolvimento e aplicação de marcadores microsatélite na avaliação da diversidade genética de *Amburana cearensis*.
- Cavers, S., (2003). Fine-scale genetic structure and gene flow within Costa Rican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), *Heredity* 90: 268-275.
- Cayuela, L.; Granzow-de la Cerda, I., (2012). Biodiversidad y conservación de bosques neotropicales: Ecosistemas, 21(1-2).
- Chapuis, M. P.; Estoup, A., (2006). Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation, *Molecular Biology and Evolution*, Oxford Journals, 24(3): 621-631.
- Chen, C. X.; Zhou, P.; Choi, Y. A.; Huang, S.; Gmitter, F. G., (2006). "Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs." *Theor. Appl. Genet* 112: 1248-1257.
- Collard, B. C.; Jahufer, M. Z.; Brouwer, J. B.; Pang, E. C., (2005), An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts, *Euphytica* 142: 169-196.
- Contreras, R.; Carevic F.; Aburto M. A.; Mamani, W. H.; Martin, D. B., (2021). Desarrollo de nuevos loci de microsatélites para *Geoffroea decorticans* (Gillies ex Hook. & Arn.) Burkart. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 56(4), 532-545.
- Cortés, Ó.; Lucero, C. E, (2021). Marcadores moleculares de ADN. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/20.500.12324/36998>.

- Costa-Lotufo, L. V.; Jimenez, P. C.; Wilke, D. V.; Leal, L. K. A. M.; Cunha, G. M. A.; Silveira, E. R.; Canuto, K. M.; Viana, G. S. B.; Moraes, M. E. A.; De Moraes, M. O., (2003). Antiproliferative Effects of Several Compounds Isolated from *Amburana cearensis* A.C. Smith.
- De la Sota, E. R., (1972). Sinopsis de las pteridófitas del Noroeste de Argentina, *Darwiniana* 17: 11-103
- de Vicente, M. C.; Fulton T., (2003). "Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity." [Online] IPGRI, Rome, Italy and Institute for Genetic Diversity, Ithaca, New York, USA.
- Dias, C. D. V.; Lúcio, A.; de Siqueira, K. M. M., (2007). Ecologia da polinização de *Amburana cearensis* (Fr. Allem.) AC Smith. na Reserva Legal do Projeto Salitre, Juazeiro, BA. En: Reunião nordestina de botânica,
- Dimitri, M. J., (1997). El nuevo libro del árbol: especies forestales de la Argentina occidental. ISBN: 9789500284677
- Dowling, T. E.; Moritz, C.; Palmer, J. D.; Rieseberg, L. H., (1997). Nucleic Acids III: Analysis of fragments and restriction sites, en: *Molecular Systematics*, Sinauer Association Inc., pp. 249-320, Eds: Hilli, D. M.; Moritz, C.; Mable, B. K.
- Doyle, J. J.; Doyle, J. L., (1990), Isolation of plant DNA from fresh tissue, *Focus*, 12(1): 13-15.
- Earl, D. A.; vonHoldt, B. M., (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* vol. 4 (2) pp. 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7
- Ellegren, H., (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 5(6):435-445.
- Falush, D.; Stephens M.; Pritchard, J. K., (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*.
- Farias, D. F.; Cavaleiro, M. G.; Viana, M .P.; Queiroz, V. A.; Rocha-Bezerra, L. C. B.; Vasconcelos, I. M.; Morais, S. M.; Carvalho, A. F. U., (2010). Water extracts of Brazilian leguminous seeds as rich sources of larvicidal compounds against *Aedes aegypti* L. *An. Acad. Bras. Cienc.* P.585–594.

- Fornes, L. F., (2021). Subtropical Rainforests: The Yungas and the Alto Paraná Rainforest. En: Low Intensity Breeding of Native Forest Trees in Argentina. Pp: 321- 342.
- Gagneux, P.; Boesch, C.; Woodruff, D. S., (1997). Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Mol Ecol.* 6:861–868. Grimaldi MC, Crouau-Roy B. 1997. Microsatellite allelic homoplasmy due to variable flanking sequences. *J Mol Evol.* 44:336– 340
- Galindez, G.; Malagrina, G.; Ceccato, D.; Ledesma, T.; Lindow-Lopez, L.; Ortega Baez, P., (2015). Dormición física y conservación ex situ de semillas de *Amburana cearensis* y *Myroxylon peruiferum* (Fabácea). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 50 (2): 153-161.
- Gamba, D.; Muchhala, N., (2020). Global patterns of population genetic differentiation in seed plants. *Mol Ecol.* 29; 3413– 3428.
- García, M. V.; Prinz, K.; Barrandeguy M. E.; Miretti, M.; Finkeldey, R., (2014). A unifying study of phenotypic and molecular genetic variability in natural populations of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* from Yungas and Paranaense biogeographic provinces in Argentina. Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Genética, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones.
- Gillies, A.; Cornelius, J.; Newton, A.; Navarro, C.; Hernández, M.; Wilson, J., (1997). Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species *Cedrela odorata* L., assessed using RAPDs, *Molecular Ecology* 6: 1133- 1145.
- Godagnone, R.; De la Fuente, J., (s/a). Regionalización ecológica del NOA. Informe técnicos del Instituto de Suelos CIRN-INTA
- Grau H.R.; Veblen T.; (2000). Rainfall variability, fire and vegetation dynamics in neotropical montane ecosystems in north-western Argentina. *Journal of Biogeography* 27: 1107-1121.
- Grau, H. R.; Aide, M., (2008). Globalization and Land-Use Transitions in Latin America, *Ecology and Society* (13) 2: 16
- Groombridge, B.; Jenkins, M. D., (2003). World atlas of biodiversity. University of California Press, Berkeley, California.

- Haddad, N. M.; Brudvig, L. A.; Clobert, J.; Davies, K. F.; Gonzalez, A.; Holt, R. D.; Townshend, J. R., (2015). Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems.
- Hamrick, J. L.; Godt, M.; Sherman-Broyles, S., (1992). Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species, *New Forests* 6: 95-124.
- Hamrick, J. L.; Linhart Y. B.; Mitton J. B., (1979). Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 10:173 – 200.
- Hardie, D. C.; Hatchings, J. A., (2010). Evolutionary ecology at the extremes of species' ranges. *Environ. Rev.* 18: 1-20.
- Hartl, D. L.; Clark, A. G., (1997). *Principles of population genetics* (3rd ed.), Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Hewitt, G.M. (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58, 247–276.
- Hillebrand, H., (2004). On the Generality of the Latitudinal Diversity Gradient, *The American Naturalist* 163(2): 129-211.
- Hilton-Taylor, C. (compiler), (2000). *IUCN Red List of Threatened Species*. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Jaccard, P., (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale: *Bulletin de la Societé Vandoise des Sciences Naturelles* 44:223-270.
- Jahnke, G.; Smidla, J.; Deák, T.; Oláh, R.; Szoke, Á.; Sárdy, D. A. N., (2022). The SSR Null Allele Problem, and Its Consequences in Pedigree Reconstruction and Population Genetic Studies in Viticulture. *Horticulturae*.
- Jarne, P.; Lagoda, P. J. L., (1996). "Microsatellites, from molecules to populations and back." *Trends in Ecol. Evol* 11: 424-429.
- Juárez A.; Ortega-Baes, P.; Sühling, S.; Martin, W.; Galíndez, G., (2007). Spatial patterns of dicot diversity in Argentina, *Biodiversity and Conservation* 16: 1669-1677
- Justiniano M. J. and Fredericksen T. S., (1998). *Ecología y Silvicultura de especies menos conocidas: Curupaú. Anadenanthera colubrina (Vell.) Benth. Mimosoideae. Proyecto de Manejo Forestal Sostenible.* pp. 1–30, Santa Cruz, Bolivia.
- Justiniano, M. J.; Fredericksen, T. S., (1998). *Ecología y Silvicultura de especies menos conocidas: Curupaú. Anadenanthera colubrina (Vell.)*

Benth. Mimosoideae. Proyecto de Manejo Forestal Sostenible. pp. 1–30, Santa Cruz, Bolivia.

- Kageyama P. Y.; Sebbenn, A. M.; Ribas, L. A.; Gandara, F. B.; Castellen, M.; Percim, M. B.; Vencovsky, R., (2003). Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos, *Scientia Forestalis* 64:93-107.
- Kageyama, P. Y.; Sebbenn, A. M.; Ribas L. A.; Gandara, F. B.; Castellen, M.; Percim, M. B.; Vencovsky, R., (2003). Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. *Scientia Forestalis* 64:93-107.
- Kajita, T.; Ohashi, H.; Tateishi, Y.; Bailey, C .D. & Doyle J. J., (2001). *rbcl* and Legume Phylogeny, with Particular Reference to Phaseoleae, Millettieae, and Allies. *Syst. Bot.* P. 515-536.
- Kantety, R. V.; Rota, M. L.; Matthews, D. E.; Sorrells, M. E., (2002). “Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat.” *Plant Mol. Biol* 48: 501-510.
- Karp, A.; Edwards, K. J., (1997). DNA markers: a global overview. In: Caetano-Anollés, G.; Gresshoff, P. M. DNA markers: protocols, applications and overviews. Wiley-VCH. New York. Páginas: 1-13.
- Lander, T. A.; Bebbber, D.; Choy, T.L.; Harris, S. A.; Boshier, D. H., (2011). The circe principle explains how resource-rich land can waylay pollinators in fragmented landscapes. *Curr Biol* 21:1302–1307.
- Ledig, F. T., (1992). Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems, *Oikos* 63: 87-108.
- Lewis, G. P.; Schrire, B. D.; Mackinder, B. A.; Lock, J. M., (2005). *Leguminosae of the World*. Royal Botanic Gardens, Kew. P. 577
- Lewontin, R. C.; Kojima, K., (1960). The evolutionary dynamics of complex polymorphisms, *Evolution* 14: 458-472
- Lima Pereira, É. P.; Santos Souza, C.; Amparo, J.; Short Ferreira, R.; Nuñez-Figueroa, Y.; Gonzaga Fernandez, L.; Ribeiro, P. R.; Braga-de-Souza, S.; Amaral da Silva, V. D.; Lima Costa, S., (2017b). *Amburana cearensis* seed extract protects brain mitochondria from oxidative stress and cerebellar cells from excitotoxicity induced by glutamate. *J. Ethnopharmacol.* P.157–166.

- Liu, Z.J.; Cordes, J. F., (2004). "DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics." *Aquaculture* 238: 1-37
- Lomáscolo T., Brown A. D., Malizia L. R.; (2010). Reserva de biosfera de las Yungas. Capítulo 11: 12-46. Eds: Ediciones del Subtropico.
- López, J.; Little, E. L.; Ritz, G. F.; Rombold, J. S.; Hahn, W. J., (1987). Árboles comunes del Paraguay. Cuerpo de Paz, Washington,DC, USA.
- Lorenzi, H., (1992). Árvores Brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.
- Lowe, A. J.; Boshier, D.; Ward, M.; Bacles, C. F. E.; Navarro, C., (2005). Genetic resource loss following habitat fragmentation and degradation; reconciling predicted theory with empirical evidence. *Heredity* 95:255–273
- Lowe, A. J.; Jourde, B.; Breyne, P.; Colpaert, N.; Navarro, C.; Wilson, J.; Cavers, S., (2003). Fine-scale genetic structure and gene flow within Costa Rican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), *Heredity* 90: 268-275.
- Maguire, T.; Peakall, R.; Saenger, P., (2002). Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs, *Theor Appl Genetics* 104:388– 398.
- Malhi, Y.; Grace, J., (2000). Tropical forests and atmospheric carbon dioxide. *Trends in Ecology and Evolution* 15:332-337
- Malizia, L. R.; Pacheco, S.; Loiselle, B. A., (2009). Árboles de valor forestal en las Yungas de la Alta Cuenca del Río Bermejo. En: Brown A.D., Blendinger P.G., Lomáscolo T., García Bes, P. (eds.). *Selva Pedemontana de las Yungas: historia natural, ecología y manejo de un ecosistema en peligro*, pp. 105-120, Ediciones del Subtrópico, Fundación ProYungas. Tucumán, Argentina.
- Mamede, M. C. H.; Souza V. C.; Prado, J.; Barros, F.; Wanderley, M. G. L.; Rando, J. G., (2007). *Livro vermelho das espécies vegetais ameaçadas de extinção no Estado de São Paulo*. São Paulo: Imprensa Oficial.
- Mathias, M.; Sagredo, B.; Kalazich, J., (2006). Uso de marcadores SSR para identificación de germoplasma de papa en el programa de mejoramiento de INIA de Chile, *Agricultura Técnica (Chile)* 67(1): 1-15.
- Mello, V. S.; Santos, V.; Viera, A.; Miranda, A.; Pereira, D.; DINS; Teixeira, A.; Karsburg; Vera I., (2013). Genotoxicidade da infusão de *Amburana*

cearensis (Allemão) A.C. Smith. Pelo sistema teste Allium cepa. I seminário de biodiversidade e agroecossistemas amazônicos.

- Moreno Amores, J. E., (2014). Estudio de la diversidad genética de cebada *Hordeum vulgare* L. en la colección del INIAP usando marcadores moleculares SSR.
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H., (1986), Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction; *Quant. Biology* 51: 263–273.
- Newton, A.C., Allnutt, T.R., Gillies, A.C.M., Lowe, A.J. & Ennos, R.A. (1999) Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends in Ecology and Evolution*, 14, 140–145
- Peakall, R.; Smouse, P.E., (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research, *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Pereira, E. P. L.; Braga-De-Souza, S.; Santos, C. C.; Santos, L. O.; Cerqueira, M. D.; Ribeiro, P. R.; Fernandez, L.G.; Silva, V.D.A.; Costa, S.L., (2017a) *Amburana cearensis* seed extracts protect PC-12 cells against toxicity induced by glutamate. *Brazilian J. Pharmacogn. P.*199–205.
- Pereyra, F. X., (2012). Suelos de la Argentina, en *Geografía de suelos, factores y procesos formadores* Capítulo 2: 71-77, Eds. SEGEMAR-AACS-GAEA.
- Peri, P. L.; Pastur, G. M.; Schlichter T., (2021). Uso sostenible del bosque, Aportes desde la Silvicultura Argentina. Capítulo 7: 373-522.
- Picca, A.; Helguera, M.; Salomón, N. and Carrera, A., (2004). Marcadores Moleculares. *Biotecnología y Mejoramiento vegetal*. Capítulo 4. Páginas 61 a 68.
- Pinazo, M.; Gasparri, N., (2003). Cambios estructurales causados por el aprovechamiento selectivo en el bosque montano de Salta, Argentina, *Ecología Austral* 13:160-172.
- Polhill, R. M.; Raven, P. H.; Stirton, C. H., (1981). Evolution and Systematics of the Leguminosae. In: R.M. Polhill & P.H. Raven (eds.). *Advances in Legume Systematics 1*. Royal Botanic Gardens, Kew. P. 1-26.
- Politi, N.; Rivera, L.; Lizárraga, L.; Hunter, M.; Defossé, G., (2015). The dichotomy between protection and logging of the Endangered and valuable

timber species *Amburana cearensis* in north-west Argentina. *Oryx*, 49(1), 111-117.

- PRADO, D. E., (2000). Seasonally dry forests of tropical South America: from forgotten ecosystems to a new phytogeographic unit. *Edinburgh Journal of Botany*, 57, 437–461
- Pritchard, J. K., Stephens, M.; Donnelly, P., (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Quijas, S.; Schmid, B.; Balvanera, P., (2010). Plant diversity enhances provision of ecosystem services: a new synthesis. *Basic and Applied Ecology* 11:582–593.
- Ramadori, D. E., (1995). Investigación, conservación y desarrollo en las selvas subtropicales de montaña. Laboratorio de investigaciones Ecologicas de las Yungas, UNT. P. 205-214.
- Ramadori, D. E.; Brown A. D., (1997). Agricultura migratoria y sucesión secundaria en bosques nublados del noroeste de Argentina. P. 113.127.
- Rivera, L.; Politi, N.; Lizárraga, L.; Chalukian, S.; de Bustos S.; Ruiz de los Llanos E., (2014). Áreas prioritarias de conservación para especies amenazadas de las Yungas Australes de Salta y Jujuy. Fundación CEBio.
- Rohlf, F. J., (1998). NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate analysis System, Version 2.0, Exeter Software, Setauket., N.Y., E.E.U.U.
- Rousset, F., (2008). Genepop Version 4.0: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux, *Molecular Ecology Resources* 8: 103-106.
- Ruíz, W. A., (2015). Ecología y Silvicultura de “Ishpingo”, *Amburana cearensis* (Fr. Allem) A.C. Smith. Aprovechamiento Eficiente de Recursos Forestales y Fauna Silvestre. Instituto Nacional de Innovación Agraria.
- Sá, M. B.; Ralph, M. T.; Nascimento, D. C. O.; Ramos, C. S.; Barbosa, I. M. S.; Sá, F. B.; Lima-Filho, J. V., (2014). Phytochemistry and preliminary assessment of the antibacterial activity of chloroform extract of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm. against *klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing strains. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.*
- Santos de Santana, N.; Santos, A. So.; Borges, D. B.; França, D.; Reis, J. B. L.; Oliveira, F. A.; Barreto, M. A.; Corrêa, R. X.; Zucchi, M. I.; MArtins, K.; Melo, S. C. O.; Loguéricio, L. L.; Gaiotto, F. A., (2022). Genetic

resilience of Atlantic forest trees to impacts of biome loss and fragmentation.

- SAyDS, (2005). Primer Inventario Nacional de Bosques Nativos; Proyecto Bosques Nativos y Áreas Protegidas; Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación, Argentina.
- SAyDS, (2007). Primer Inventario Nacional de Bosques Nativos; Informe regional selva Tucumano-Boliviana, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación, Primera edición, Bs. As., Argentina.
- Seleme, E. P., (2014). Tesis doctoral: *Amburana Schwacke & Taub.* (Leguminosae, Papilionoideae): estudios taxonômicos e sistemáticos. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro Escola Nacional de Botânica Tropical Programa de Pós-Graduação.
- Seleme, E. P.; Gwilym L. P.; Stirton, C. H.; Sartori, A. L. B.; Mansano, V. F., (2015). A taxonomic review and a new species of the south american woody genus *Amburana* (leguminosae, papilionoideae).
- Shinde, D.; Lai, Y. L.; Sun, F. Z.; Arnheim, N., (2003). Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasilielihood analysis: (CA/GT)(n) and (A/T)(n) microsatellites. *Nucleic Acids Res.* 31:974–980
- Silvestre, E. A.; Schwarcz, K. D.; Grando, C.; de Campos, J. B.; Sujii, P. S.; Tambarussi, E. V.; Macrini, C. M. T.; Pinheiro, J. B.; Brancalion, P. H. S.; Zucchi, M. I., (2018). Mating System and Effective Population Size of the Overexploited Neotropical Tree (*Myroxylon peruiferum* L.f.) and Their Impact on Seedling Production. *The Journal of heredity*, 109(3), 264–271.
- Soldati, M. C., (2010). Evaluación de la diversidad genética de poblaciones naturales de Cedro Orán (*Cedrela balansae*) en la Selva Tucumano-Boliviana, mediante Marcadores moleculares neutros. Pp: 29.
- Soldati, M. C.; Fornes, L.; Van Zonneveld. M; Thomas, E.; Zelener, N., (2013). An assessment of the genetic diversity of *Cedrela balansae* C. DC. (Meliaceae) in Northwestern Argentina by means of combined use of SSR and AFLP molecular markers. *Biochemical Systematics and Ecology*.
- Spira, T. P., (2001). Plant-pollinator interactions: a threatened mutualism with implications for the ecology and management of rare plants, *Natural Areas Journal* 21:78–88.

- Tang, S.; Dai, W.; Li, M.; Zhang, Y.; Geng, Y.; Wang, L.; Zhong, Y., (2008). Genetic diversity of relictual and endangered plant *Abies ziyuanensis* (Pinaceae) revealed by AFLP and SSR markers, *Genetica* 133: 21-30.
- Van Rheenen, H.M.P.J.B. (2005) The Role of Seed Trees and Seedling Regeneration for Species Maintenance in Logged-over Forests. PROMAB, Riberalta, Bolivia.
- Vellend, M., (2004). Parallel effects of land-use history on species diversity and genetic diversity of forest herbs.
- Vellend, M., (2006). The consequences of genetic diversity in competitive communities.
- Ward M.; Dick, C. W.; Gribel, R.; Lowe, A. J., (2005). To self, or not self... A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees, *Heredity* 95:246-254.
- Weising, K.; Nybom, H.; Wolff, K.; Kahl, G., (2005). "Detecting DNA variation by molecular markers." In *DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications*, Ch. 2: 21-74. 2nd ed. Boca Raton, FL: Taylor and Francis
- Winter, P.; Kahl G., (1995). Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11: 438–448
- Wojciechowski, M. F.; Lavin, M.; Sanderson, M. J., (2004). A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany*. P. 1846-1862.
- Wright, S. J., (2010). The future of tropical forests. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1195:1-27.
- Young, A.; Boyle, T.; Brown, T., (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants, *Tree* 10:413-418.
- Zamora Petri, M., (2006). Influencia de la ganadería trashumante y la apertura de claros en la supervivencia y crecimiento de *Cedrela lilloi* en Tariquía, Bolivia, en *Ecología y Producción de cedro (género Cedrela) en las Yungas australes*, Capítulo 10: 131-142, Ediciones del Subtrópico.
- Zane, L., Bargelloni, L.; Patarnello, P., (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.
- Zelener, N.; Soldati, M. C.; Inza, M. V.; Gallo, A. L.; Fornes, L. F., (2021). Patterns of Neutral Genetic Variation for High-Value Cedar Species

from the Subtropical Rainforests of Argentina. En: Low Intensity Breeding of Native Forest Trees in Argentina. Pp: 373 - 394

- Zucchi, M. I.; Sujii, P. S.; Mori, G. M.; Viana, J. P. G.; Grando, C.; Silvestre. A. E., Schwarcz, K. D.; Macrini, C. M.; Bajay, M. M.; Araújo, F. L.; Siqueira, M. V. B. M.; Pereira, A. A.; Souza, A. P.; Pinheiro, J. B.; Rodrigues, R. R.; Brancalion, P. H. S., (2018). Genetic diversity of reintroduced tree populations in restoration plantations of the Brazilian Atlantic Forest. *Restoration Ecology*.

9. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el marco del Proyecto Nacional de INTA “Abordaje integral para la conservación, mejoramiento y rescate de especies de importancia para el SAAA (PE I113)”.

- En primer lugar, quiero agradecer al Instituto de Recursos Biológicos, INTA, por aceptarme, por haberme permitido realizar mi tesina de grado y brindarme todos los recursos necesarios.
- A la Lic. María Cristina Soldati por ser mi directora, por enseñarme y acompañarme en mis primeros momentos en el laboratorio, por la paciencia, consejos y buena predisposición ante cualquier situación.
- A la Lic. Patricia Peralta por aceptar ser mi codirectora, por enseñarme en todos los años de la carrera y acompañarme hasta en mis últimos pasos.
- A la Dra. Natalia Politi y al Ing. Ezequiel Balducci por proporcionarme el material vegetal y responder a todas las dudas.
- A todo el equipo del IRB por ayudarme en el manejo del laboratorio, contestar dudas y buena voluntad ante todo.
- A mis compañeras Mari y Giuli, por todos los años de cursada, estudiando juntas, alentándonos a seguir y por nunca soltarme la mano en los momentos más difíciles en finales.
- A mi familia, por apoyarme desde el día en que elegí la carrera, por el esfuerzo en hacer posible que pueda estudiar, por acompañarme en todo el trayecto y siempre haber confiado en que lo podía lograr, sin ellos no hubiera sido posible. Gracias.