

Tesis Doctoral

Dispersión de semillas de pindó (*Syagrus romanzoffiana*) en la Selva Paranaense: efectos ecológicos y genéticos de la interacción con su principal dispersor y del disturbio humano del hábitat

Giombini, Mariano Ignacio

2013

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Giombini, Mariano Ignacio. (2013). Dispersión de semillas de pindó (*Syagrus romanzoffiana*) en la Selva Paranaense: efectos ecológicos y genéticos de la interacción con su principal dispersor y del disturbio humano del hábitat. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Giombini, Mariano Ignacio. "Dispersión de semillas de pindó (*Syagrus romanzoffiana*) en la Selva Paranaense: efectos ecológicos y genéticos de la interacción con su principal dispersor y del disturbio humano del hábitat". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Ecología, Genética y Evolución

# **Dispersión de semillas de pindó (*Syagrus romanzoffiana*) en la Selva Paranaense: efectos ecológicos y genéticos de la interacción con su principal dispersor y del disturbio humano del hábitat**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área Ciencias Biológicas

**Mariano Ignacio Giombini**

Directora de tesis: Dra. Susana Patricia Bravo

Directora Asistente: Dra. Daniela Sandra Tosto

Consejero de Estudios: Dr. Esteban Rubén Hasson

Lugar de Trabajo: - Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires (IEGEB, CONICET-UBA), Departamento Ecología, Genética y Evolución, FCEyN, UBA;

- Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA-Castelar.

Buenos Aires, 2013.



# **Dispersión de semillas de pindó (*Syagrus romanzoffiana*) en la Selva Paranaense: efectos ecológicos y genéticos de la interacción con su principal dispersor y del disturbio humano del hábitat**

## **RESUMEN**

La dispersión de semillas es un proceso de enorme relevancia para la ecología y evolución de las comunidades jugando un papel determinante sobre la regeneración y el flujo genético de las plantas. En los bosques tropicales y subtropicales la mayoría de las plantas son dispersadas por animales. El disturbio del hábitat frecuentemente implica la defaunación y la consecuente desaparición de las interacciones planta-animal. La Selva Paranaense ha sido reducida a menos del 8% de su extensión original. Nuestro objetivo general fue evaluar posibles efectos ecológicos y genéticos de la defaunación para especies dispersadas por vertebrados. En particular, estudiamos algunos aspectos de la dispersión de semillas de la palmera pindó (*Syagrus romanzoffiana*), una especie clave como fuente de alimento para la comunidad de frugívoros en la Selva Paranaense. El pindó mostró una alta dominancia entre los frutos consumidos por el tapir en el Parque Nacional Iguazú, y un alto nivel de reclutamiento de juveniles fue hallado en las letrinas generadas por este frugívoro. El reclutamiento fue mayor en las letrinas que debajo de la copa de palmeras adultas y sitios al azar dentro del Parque. Para estudiar los efectos genéticos de la dispersión de semillas por tapires y de la defaunación transferimos microsátélites a pindó de otras especies de palmera, y comparamos los patrones de reclutamiento y variación genética de juveniles entre el Parque y un área defaunada. En el Parque, la mayoría de los juveniles reclutados en letrinas no estaban emparentados entre sí, ni con la palmera adulta más cercana, sino que provenían de diversas madres, a diferencia del patrón observado debajo de palmeras adultas. En el área defaunada, hallamos una mayor cantidad de juveniles reclutados debajo de palmeras adultas, y la proporción de juveniles provenientes de semillas dispersadas fue menor respecto al Parque. Además, en el área defaunada los juveniles de pindó presentaron una riqueza alélica significativamente menor y una tendencia a una mayor estructuración genética espacial respecto a aquellos reclutados en sitios con letrinas dentro del Parque. Concluimos que, a través de este mutualismo, el tapir contribuye significativamente al reclutamiento de juveniles y al flujo génico en el pindó. La defaunación puede producir pérdida de variabilidad genética y aumento de la estructuración genética espacial en aquellas plantas dispersadas por los vertebrados que son más sensibles al disturbio.

**Palabras clave:** dispersión de semillas, mutualismo, disturbio del hábitat, Selva Atlántica, *Tapirus terrestris*, microsátélites, flujo génico, parentesco, estructura genética espacial.



# **Seed dispersal of pindó (*Syagrus romanzoffiana*) in the Paranaense Forest: ecological and genetic effects of the interaction with its main disperser and of human-induced habitat disturbance**

## **ABSTRACT**

Seed dispersal is of great relevance for the ecology and evolution of communities playing a critical role on the regeneration and gene flow in plants. In tropical and subtropical forests most plants are dispersed by animals. Habitat disturbance often involves defaunation and the consequent loss of plant-animal interactions. The Paranaense Forest has been reduced to less than 8% of its original extension. Our main goal was to evaluate possible ecological and genetic consequences of defaunation for species dispersed by vertebrates. In particular, we studied some aspects of pindó palm (*Syagrus romanzoffiana*) seed dispersal, a keystone species heavily used as a feeding resource by the community of frugivores in the Paranaense Forest. Pindó showed a high prevalence among fruits eaten by tapirs in the Iguazú National Park, and a high level of juvenile recruitment was found in the latrines produced by this frugivore. Recruitment was higher in latrines than beneath palm crowns and random sites within the Park. To study the genetic effects of seed dispersal by tapirs and of defaunation we transferred microsatellites from other palm species to pindó, and compared the patterns of recruitment and genetic variation of juveniles between the Park and a defaunated area. Within the Park, most of the juveniles recruited in latrines were unrelated to each other and to the nearest adult palm, and came from several mothers, in contrast to the pattern observed around adult palms. In the defaunated area, we found a greater amount of juveniles recruited under adult palms and the proportion of juveniles coming from dispersed seeds was lower with respect to the Park. In addition, juveniles from the defaunated area exhibited a significantly lower allelic richness and a trend toward a stronger spatial genetic structure than those recruited in sites containing latrines within the Park. We concluded that, by means of this mutualism, the tapir significantly contributes both to pindó recruitment and gene flow. Defaunation may produce the loss of genetic variation and the increase of spatial genetic structure in plants dispersed by those vertebrates more sensitive to human disturbance.

**Key words:** seed dispersal, mutualism, habitat disturbance, Atlantic Forest, *Tapirus terrestris*, microsatellites, gene flow, kinship, spatial genetic structure.



## Agradecimientos

*Quiero agradecer profundamente a todas aquellas personas que desinteresadamente, y en distintos ámbitos, me han tendido una mano, me han brindado algo –o mucho– de su tiempo, de su esfuerzo, y/o de su cariño durante el largo período del doctorado.*

*También deseo hacer una mención de agradecimiento a aquellas instituciones que me han permitido desarrollar mi formación y realizar el trabajo que concluyó en la presente tesis. Éstas son: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); Instituto de Biotecnología de INTA-Castelar; Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones; Administración de Parques Nacionales; Ministerio de Ecología y Recursos Naturales Renovables de Misiones.*





# ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
<b>1. La dispersión de semillas en el marco ecológico y evolutivo .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Diversidad biológica y adaptaciones .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Ventajas ecológicas de la dispersión .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Interacciones mutualistas y coevolución difusa .....</b>	<b>7</b>
<b>1.4. Efectos de la dispersión a nivel de las comunidades .....</b>	<b>8</b>
<b>2. La dispersión de semillas y el disturbio humano .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. La destrucción global del hábitat .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2. Fragmentación y defaunación .....</b>	<b>10</b>
<b>3. La dispersión de semillas y el flujo génico .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1. El movimiento de los genes en las poblaciones vegetales .....</b>	<b>11</b>
<b>3.2. Los efectos del disturbio sobre el flujo génico .....</b>	<b>13</b>
<b>4. La gran ecorregión de la Selva Atlántica, la Selva Paranaense y la situación ambiental .....</b>	<b>15</b>
.....	15
<b>OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO I - UN FRUGÍVORO AMENAZADO Y UNA ESPECIE ARBÓREA CLAVE: LA INTERACCIÓN ENTRE EL TAPIR Y EL PINDÓ .....</b>	<b>23</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>23</b>
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>25</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>28</b>
<b>Discusión .....</b>	<b>33</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO II - TRANSFERENCIA DE MICROSATÉLITES PARA EL PINDÓ: UNA HERRAMIENTA MOLECULAR PARA EVALUAR EL FLUJO GÉNICO ASOCIADO A LA DISPERSIÓN DE SEMILLAS .....</b>	<b>43</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>43</b>
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>46</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>51</b>
<b>Discusión .....</b>	<b>57</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>58</b>

CAPÍTULO III - DISPERSIÓN DE SEMILLAS Y FLUJO GÉNICO CONTEMPORÁNEO: EFECTOS DEL TAPIR SOBRE LA VARIACIÓN GENÉTICA DEL PINDÓ EN ESTADIOS TEMPRANOS .....	59
<b>Introducción</b> .....	59
<b>Materiales y Métodos</b> .....	63
<b>Resultados</b> .....	71
<b>Discusión</b> .....	76
<b>Conclusiones</b> .....	81
CAPÍTULO IV - EFECTOS DE LA DEFAUNACIÓN SOBRE EL RECLUTAMIENTO Y LA VARIACIÓN GENÉTICA DEL PINDÓ EN ESTADIOS TEMPRANOS .....	83
<b>Introducción</b> .....	83
<b>Materiales y Métodos</b> .....	86
<b>Resultados</b> .....	95
<b>Discusión</b> .....	105
<b>Conclusiones</b> .....	110
CONSIDERACIONES FINALES .....	111
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	115
APÉNDICE 1.....	145
APÉNDICE 2.....	147

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1. La dispersión de semillas en el marco ecológico y evolutivo

#### 1.1. Diversidad biológica y adaptaciones

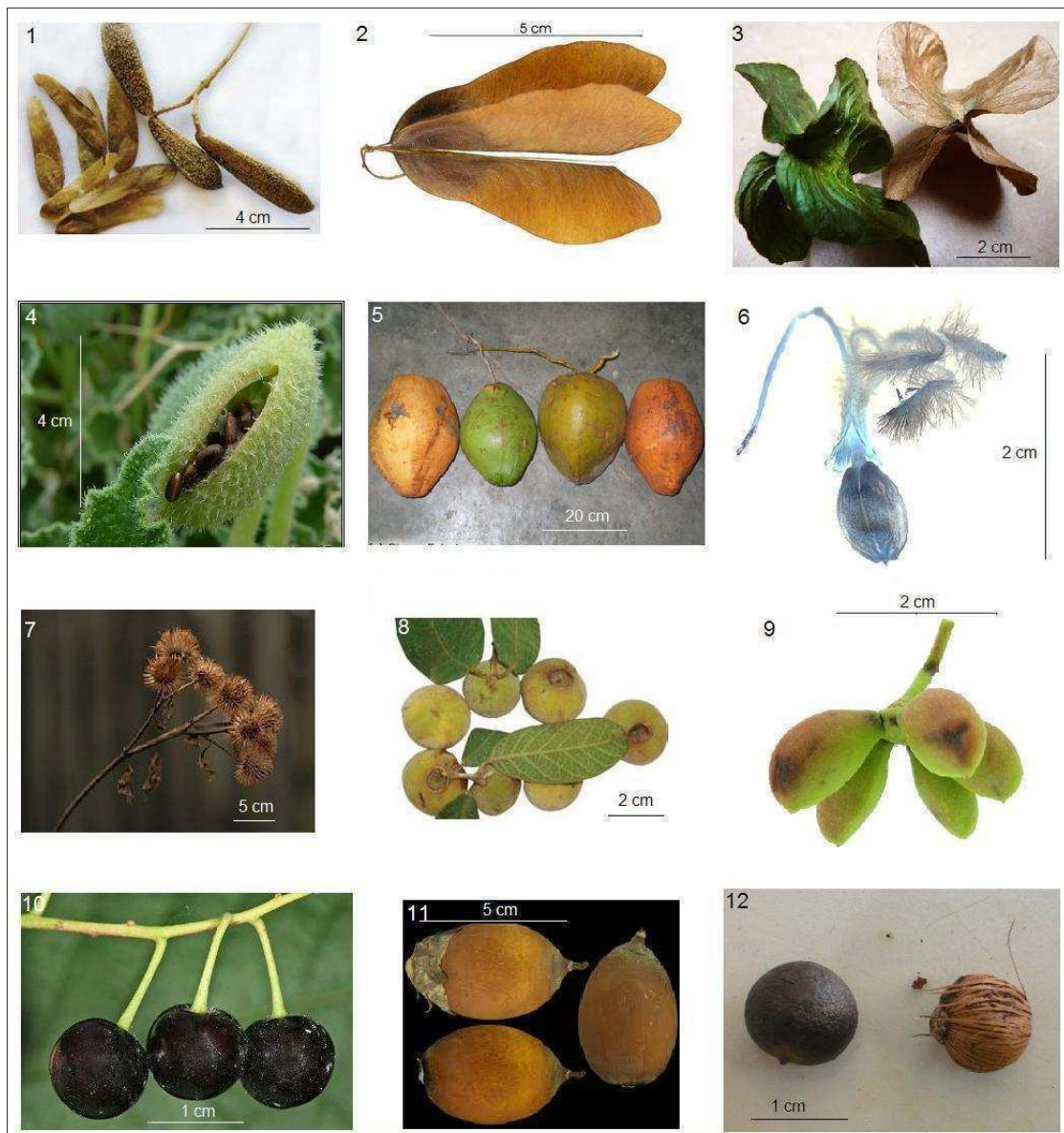
La dispersión de semillas se define actualmente como un ciclo que involucra el alejamiento de las semillas del entorno materno, la supervivencia y germinación de las mismas, y el reclutamiento efectivo de nuevas plántulas y posteriormente adultos, que producirán nuevas semillas (Wang y Smith 2002). A su vez, representa uno de los procesos constituyentes del ciclo reproductivo de las plantas. La dispersión de semillas provee el único mecanismo de movilidad de las plantas vasculares con semilla (Spermatophyta), puesto que luego de la fase dispersiva pasan a ser organismos sésiles (exceptuando algunas plantas acuáticas flotantes). La unidad dispersiva se denomina *diáspora* o *propágulo*; términos más apropiados que semilla, ya que frecuentemente la entidad que es dispersada contiene varias semillas y/u otras estructuras anatómicas. La dispersión de semillas es un proceso realmente complejo si se tienen en cuenta detalladamente los múltiples factores involucrados desde que una semilla deja la planta madre hasta que se establece en un sitio definitivo (ver revisión de Chambers y MacMahon 1994; Wang y Smith 2002).

Existe una vastísima diversidad biológica de los sistemas de dispersión de semillas, relacionada a las interacciones con animales y/o con factores abióticos (Figura 1). Como puede apreciarse en la Tabla 1 (Howe y Smallwood 1982) y Figura 1, usualmente existe una notable asociación de estructura-función, según la cual el tipo de agente dispersor puede inferirse de la morfología de la diáspora o “síndrome dispersivo”. Esta observación sugiere un fuerte rol de la selección natural sobre los modos de dispersión (Janson 1983). Las adaptaciones son variadas y pueden involucrar procesos selectivos convergentes o divergentes (Howe y Smallwood 1982). Así, un mismo modo de dispersión, que pudo haberse desarrollado independientemente en múltiples ocasiones en la historia evolutiva, sugiere convergencia adaptativa, mientras que la divergencia daría cuenta de los casos en que los síndromes dispersivos varían ampliamente dentro de grupos filogenéticamente acotados (Tomback y Linhart 1990, Benkman 1995). Por ejemplo, en las semillas podemos encontrar estructuras aladas similares que se originan a partir de tejidos diferentes (Van der Pijl 1972) y/o que han surgido más de una vez en especies dispersadas por viento (*e.g.*, algunas leguminosas; Augspurger 1989). A su vez, pueden observarse estructuras que varían entre especies de una misma familia dependiendo del tipo de agente dispersor. Por ejemplo algunas especies de la familia Lecythidaceae pueden presentar semillas rodeadas de un arilo

grueso y carnosos, o aplanado en forma de ala, dependiendo si la especie es dispersada por vertebrados o por viento, respectivamente (Prance y Mori 1978).

De todas maneras, cabe señalar que los síndromes dispersivos no deben ser usados como evidencia unívoca del modo de dispersión, pues muchas veces el tipo de dispersión real (y actual) difiere de lo que indicaría en apariencia dicho síndrome. Éste es el caso, por ejemplo, de semillas adaptadas a la dispersión por animales actualmente extintos (Janzen y Martin 1982, Guimarães *et al.* 2008). Más aún, las interpretaciones adaptacionistas de los síndromes dispersivos como resultado de la interacción entre la planta y el agente dispersor han sido controvertidas, ya que históricamente estuvieron basadas en estudios comparativos fuera del contexto filogenético (Fischer y Chapman 1993, Herrera 1992, Jordano 1995, Lord *et al.* 1995). De hecho, en algunos estudios comparativos que han considerado la falta de independencia filogenética entre las especies analizadas (ver Felsenstein 1985) no se han obtenido evidencias de que los rasgos de los frutos evolucionen como respuesta al tipo de dispersor (Fischer y Chapman 1993, Herrera 1992, Jordano 1995). En principio, esta observación induce a plantear la siguiente paradoja: la actividad dispersora de los frugívoros influye sensiblemente en la aptitud (*fitness*) de las plantas, pero no parece ejercer una presión de selección que afecte la evolución de los rasgos de los frutos. Sin embargo, en un trabajo reciente, Lomáscolo *et al.* (2010) mostraron que los frutos de numerosas especies de *Ficus* presentan rasgos claramente correlacionados con el tipo de dispersor (aves o murciélagos) mediante un análisis que permite controlar la falta de independencia filogenética entre las especies estudiadas. Su trabajo apoya fuertemente la hipótesis de los síndromes dispersivos como producto evolutivo de la dependencia entre planta y dispersor, y el probable rol de estos mutualismos no sólo en el mantenimiento, sino también en la generación de biodiversidad, al menos en las especies de *Ficus*.

**Figura 1.** Diversidad morfológica de las diásporas de 12 especies vegetales con distintos modos de dispersión pertenecientes a 10 familias de angiospermas.



Dispersión por viento (anemocoria): 1, *Aspidosperma polyneuron* (Apocynaceae); 2, *Thinouia myriantha* (Sapindaceae); 3, *Balfourodendron riedelianum* (Rutaceae). Dispersión mediante autopropulsión por presión hidrostática (balocoria): 4, *Ecballium elaterium* (Cucurbitaceae). Dispersión por agua (hidrocoria): 5, *Cocos nucifera* (Arecaceae). Dispersión por animales (zoocoria): por hormigas (mirmecocoria): 6, *Leucospermum conocarpodendron* (Proteaceae); por adhesión a la superficie de animales (ecto- o epizoocoria): 7, *Arctium lappa* (Asteraceae); por ingestión y regurgitación o defecación por vertebrados (endozoocoria): 8, *Campomanesia guazumifolia* (Myrtaceae); 9, *Simarouba amara* (Simaroubaceae); 10, *Prunus mahaleb* (Rosaceae); 11, *Attalea maripa* (Arecaceae); 12, *Euterpe edulis* (Arecaceae). Notar las diferentes escalas entre imágenes. Todas las imágenes fueron tomadas de *internet*, excepto 1 (Semillas y frutos de la selva misionera. Revista *Biodiversidad*, Nro. 6, abril 2013) y 12 (foto del autor).

**Tabla 1.** Síndromes dispersivos generales de frutos y semillas<sup>†</sup>

Agente dispersor	Adaptaciones		Comentarios
	Generalidades	Modificación estructural	
animal	tejido acuoso rico en nutrientes	arilo, pericarpo, pulpa	dispersión por vertebrados
	atrayentes químicos	eleosoma	dispersión por hormigas
	estructuras adhesivas	ganchos o material pegajoso	adhesión a pelaje o plumas
	mimetismo	exocarpo coloreado	comidas por aves
viento	reducción del tamaño	semillas diminutas como polvo	millones por planta
	alta relación superficie/volumen	alas, plumas, glóbulos	glóbulos raras veces
	“malezas” rodantes	brotos quebradizos	semillas esparcidas
agua	resistencia al hundimiento	pelos (fibras), cubierta mucilaginosa	se transportan parcialmente sumergidas
	uso de tensión superficial	semillas pequeñas e impermeables	flotan hasta mojarse
	baja densidad relativa *	material poroso, aceitoso	flotan largas distancias
autodispersión	frutos eyectores o “explosivos”	muy variadas	con dispersión secundaria frecuente
	diásporas reptadoras	cerdas higroscópicas	funcionan con humedad variable

<sup>†</sup> Modificada de Howe y Smallwood (1982).

\* También llamada gravedad específica; se define como el cociente entre la densidad de un cuerpo o sustancia y la de otro/a de referencia (usualmente agua pura).

## 1.2. Ventajas ecológicas de la dispersión

En el marco de la ecología se han propuesto tres hipótesis generales para intentar responder cuál es la ventaja adaptativa, si es que la hay (ver Howe y Miriti 2000), que confiere la dispersión de las semillas a las plantas. Comúnmente en la literatura, estas hipótesis se conocen como *hipótesis de escape* o *de Janzen-Connell*, *de colonización*, y *de dispersión direccionada* (Howe y Smallwood 1982, Wenny 2001).

La hipótesis de escape, originalmente propuesta por Janzen (1970) y Connell (1971), postula que la dispersión permite escapar de la alta mortalidad en las cercanías de la planta materna causada por factores que son dependientes de la distancia a la planta madre o denso-dependientes. La sombra de semillas (*i.e.*, la distribución espacial de las semillas dispersadas de una planta; Nathan y Muller-Landau 2000), normalmente descrita por una curva del número de semillas en función de la distancia a la planta madre, suele presentar un patrón leptokúrtico con un pico de densidad de semillas en torno al parental (Willson 1993, Nathan y Muller-Landau 2000,

Willson y Traveset 2000). La hipótesis de Janzen-Connell predice una mortalidad correlacionada negativamente con la distancia al parental o positivamente correlacionada con la densidad de conoespecíficos. En cambio, la ocurrencia de un patrón de mortalidad no creciente respecto a la densidad de plantas hermanas o a la cercanía al progenitor aportaría evidencia para rechazar la hipótesis. Los factores de mortalidad denso-dependientes de las semillas o plántulas pueden estar dados por la depredación por insectos o roedores (Janzen 1970, Connell 1971), el ataque por patógenos (Augspurger y Kelly 1984, Bell *et al.* 2006) y/o la competencia intraespecífica (Connell 1971, Harper 1977). En la época en que fue planteada, esta hipótesis fue ampliamente aceptada aún sin el apoyo empírico necesario, e incluso con evidencias contrarias (Howe y Smallwood 1982). Posteriormente la hipótesis fue adquiriendo más sustento (Clark y Clark 1984, Howe 1986) aunque algunos estudios continuaron aportando resultados opuestos (Cintra 1997). Más recientemente se ha demostrado el efecto predominante de mortalidad denso-dependiente que tiene lugar entre los estadios de semillas y plántulas para 53 especies en una selva tropical (Harms *et al.* 2000). Estos resultados apoyan convincentemente la validez de la hipótesis de Janzen-Connell, al menos para un número considerable de especies (Howe y Miriti 2000).

La hipótesis de colonización propone que la ventaja de la dispersión radica en que algunas semillas puedan llegar, en forma impredecible en tiempo y espacio, a sitios particulares, escasos y/o efímeros, muchas veces generados por perturbaciones como caídas de árboles o incendios, que presentan condiciones favorables para el establecimiento y desarrollo de la planta reclutada (Hartshorn 1978, Brokaw 1985). Esta hipótesis parece ser más adecuada para aquellas especies que producen diásporas o plántulas con capacidad de dormición o supresión del crecimiento, respectivamente, y que pueden permanecer latentes hasta que se forme una abertura del dosel que induzca su germinación o rápido crecimiento. Dado que esa hipótesis presume que los sitios favorables son impredecibles, la estrategia de la planta madre sería diseminar sus semillas tan ampliamente como sea posible (sin preferencias espaciales), para que al menos algunas encuentren condiciones favorables (*e.g.*, ambientes sin competencia) o puedan esperar a que éstas se generen.

La hipótesis de dispersión direccionada plantea que los agentes dispersores, o algunos de ellos, pueden depositar diferencialmente una cantidad de semillas mayor en ciertos sitios donde la probabilidad de que la semilla sobreviva y se transforme en un adulto reproductivo es mayor (Howe y Smallwood 1982, Schupp *et al.* 1989, Wenny 2001). La dispersión direccionada implica entonces la acumulación diferencial de semillas y la supervivencia en sitios no aleatorios y predecibles. Si una planta realmente obtiene ventajas por dispersión direccionada, la selección debería promover la producción de diásporas con características que aumenten la dispersión por aquellos agentes que contribuyen a su direccionamiento hacia los destinos favorables. La idea de



la dispersión direccionada sugiere la importancia de identificar y examinar microhábitats particulares (micrositios) con alta llegada de semillas como sitios de reposo o perchas de uso recurrente de aves, *leks*, dormitorios de primates, letrinas, plantas “nodrizas”, etc. (Wenny 2001). La hipótesis de dispersión direccionada ha encontrado apoyado, entre otros sistemas (ver Wenny 2001), en ciertas nueces y frutos consumidos por aves (Vander Wall y Balda 1977, Vander Wall 1992, Thompson y Willson 1978, Wenny y Levey 1998) y diásporas transportadas por hormigas hacia sus montículos (Davidson y Morton 1981) o a troncos en descomposición (Thompson 1980). También se han hallado resultados a favor de esta hipótesis para algunos vertebrados que generan letrinas donde la llegada de semillas y el reclutamiento de individuos es particularmente elevado. Este fenómeno se ha reportado, por ejemplo, para las letrinas producidas por monos aulladores bajo sus dormitorios (Julliot 1997, Pouvelle *et al.* 2009, Bravo 2009, 2012), y para las letrinas de tapires (Fragoso 1997, Fragoso *et al.* 2003) y de rinocerontes (Dinerstein y Wemmer 1988).

Otra hipótesis que ha sido propuesta como ventaja para la dispersión es un aumento del poder germinativo de la semilla luego de sufrir escarificación al pasar por el tracto digestivo del dispersor (Noble 1975, Lieberman *et al.* 1979). Un caso emblemático sobre esta idea ha sido el supuesto mutualismo obligado entre una especie arbórea (*Sideroxylon grandiflorum*) de la isla Mauricio y un ave frugívora (*Raphus cucullatus*), según el cual la germinación de la semilla requería necesariamente el paso por el tracto digestivo del ave dispersora (Temple 1977). Sin embargo, la mayoría de las especies puede germinar sin necesidad de la manipulación por un dispersor (Howe y Smallwood 1982, y referencias allí citadas). En particular, el sistema presentado por Temple (1977) como mutualismo obligado y los supuestos efectos causados por la extinción del ave dispersora han sido refutados (Owadally 1979, Witmer y Cheke 1991). No obstante la hipótesis del beneficio germinativo ha sido apoyada en varios estudios (Traveset 1998, Bravo 2009), lo que sugiere que dicho efecto puede representar realmente una ventaja asociada a la dispersión.

Por último, en el caso de la endozoocoria, se ha postulado también que el pasaje por el tracto digestivo de los dispersores confiere un beneficio al matar las larvas de insectos (Miller 1994, Or y Ward 2003, Bravo 2008) o limpiar las semillas de agentes infecciosos y sustancias químicas que atraen a los depredadores (Fricke *et al.* 2013), reduciendo así la tasa de mortalidad de las semillas.

Como es evidente, las hipótesis expuestas en los párrafos anteriores no son mutuamente excluyentes, y presentan dificultades conceptuales y metodológicas para distinguir sus efectos (Howe y Smallwood 1982, Wenny 2001). Estas alternativas pueden representar factores que

operan conjuntamente pero con impactos diferentes en el ciclo de dispersión de una especie. Por ejemplo, la demostración de mortalidad denso-dependiente en torno a una planta madre apoyaría la hipótesis de escape, pero no excluiría la posibilidad de que las plántulas requieran parches con mayor llegada de luz para el crecimiento. Asimismo, en una especie dispersada por numerosos agentes (situación más frecuente), la dispersión direccionada puede ser un proceso efectivo promovido por algunos dispersores, mientras que otros pueden generar ventajas por colonización. Suponiendo endozoocoria, cualquiera de estos ejemplos hipotéticos admitiría además los posibles efectos de un aumento del poder germinativo o de la limpieza de la semilla. En suma, el ciclo dispersivo de las plantas es un proceso complejo que involucra una multiplicidad de factores operando conjuntamente e interactuando entre sí.

Schupp 1993 ha propuesto un marco conceptual, denominado *Efectividad de la Dispersión de Semillas* (*Seed Dispersal Effectiveness*; revisado en Schupp *et al.* 2010) para abordar los estudios que involucran endozoocoria (aunque sería aplicable a otros sistemas). Este marco pone el énfasis en la evaluación de los componentes que determinan finalmente la efectividad de la dispersión generada por los distintos agentes, definiendo *efectividad* como el producto de la cantidad y calidad de la dispersión asociada. La cantidad, a su vez, depende del número de visitas a la fuente de semillas que efectúan los dispersores y del número de semillas dispersadas en cada visita, en tanto que la calidad depende de los efectos sobre la viabilidad de la semilla producidos por el tratamiento de los dispersores y la probabilidad de que las semillas lleguen a producir un nuevo adulto. Al igual que las hipótesis mencionadas sobre las ventajas de la dispersión, y otros modelos cuantitativos (Nathan y Muller-Landau 2000, Nathan 2007), este marco conceptual nos permite orientar las preguntas hacia aspectos potencialmente relevantes del ciclo dispersivo en los estudios concretos de cada sistema, como puede ser la identificación y cuantificación de factores preponderantes de mortalidad de las semillas o de agentes dispersores que contribuyen diferencialmente al reclutamiento de plántulas.

### **1.3. Interacciones mutualistas y coevolución difusa**

Por lo expuesto anteriormente es evidente que la interacción entre las plantas y sus dispersores o polinizadores aporta beneficios recíprocos, dando lugar a relaciones de mutualismo. Wheelwright y Orians (1982) compararon las características de la interacción planta-dispersor versus planta-polinizador fundamentando las probables causas que conducen a relaciones de mutualismo menos estrechas en el primer caso. Entre dichas causas destacan la mayor presión selectiva dada por la especificidad requerida del sitio de deposición del polen respecto al de las semillas: el grano de polen se pierde si no alcanza el estigma de un conoespecífico, mientras que las

semillas pueden establecerse en sitios de características ampliamente más variables y menos predecibles. Además, la capacidad de las plantas para manipular el comportamiento del vector animal es mayor sobre los polinizadores que sobre los dispersores (sin embargo, ver Vander Wall 2010). Mientras que normalmente la planta condiciona el beneficio nutricional que obtiene el polinizador a que éste deposite el polen que acarrea en el estigma durante las sucesivas visitas a las flores, la planta que ofrece frutos no puede condicionar el transporte de semillas hacia los sitios más favorables para el reclutamiento, quedando sujeta entonces al “pago por adelantado” (*i.e.*, otorga el beneficio nutricional al frugívoro independientemente del destino que tenga posteriormente la semilla).

La enorme mayoría de las plantas dispersadas principalmente por animales posee más de un agente dispersor, y en general, varios. Recíprocamente, los animales dispersores generalmente consumen frutos o semillas de varias especies vegetales. La visión actual de la dispersión de semillas por animales se enmarca, entonces, dentro del paradigma coevolutivo de mutualismos difusos (Wheelwright y Orians 1982, Herrera 1985, Thompson 1989, Wenny 2001) donde las interacciones planta-dispersor no son especie-específicas (sin embargo, ver Youngsteadt *et al.* 2009), sino que forman parte de una red más compleja (Bascompte *et al.* 2006). Los mutualismos difusos implican presiones selectivas recíprocas relativamente débiles entre los organismos involucrados, y por lo tanto, las adaptaciones resultantes no suelen estar tan finamente moldeadas como en mutualismos específicos.

#### **1.4. Efectos de la dispersión a nivel de las comunidades**

La dispersión de semillas tiene una notable influencia sobre la estructura y dinámica de las poblaciones y comunidades vegetales (Clark y Ji 1995, Schupp y Fuentes 1995, Nathan y Muller-Landau 2000, Willson y Traveset 2000, Wang y Smith 2002). La dispersión tiene implicancias en fenómenos como la colonización de nuevos hábitats (Cain *et al.* 2000), la expansión de plantas invasoras (Bartuszevige y Gorchov 2006), la regeneración (Beckage y Clark 2003, Martínez-Garza y Howe 2003), el flujo génico (Hamrick *et al.* 1993, Bacles *et al.* 2006), las sucesiones (Ingle 2002, Howe y Miriti 2004), el mantenimiento de la diversidad (Terborgh *et al.* 2002, Bascompte *et al.* 2006), e incluso en la diversificación de las angiospermas (Fleming y Lips 1991, Tiffney y Mazer 1995, Lengyel *et al.* 2009, Lomáscolo *et al.* 2010).

Asimismo, cuando se trata de endozoocoria, el proceso involucra la interacción mutualista con animales, y por lo tanto también tiene un amplio impacto sobre las comunidades de frugívoros y otros organismos (Bascompte y Jordano 2007). Muchas poblaciones de vertebrados dependen de la alimentación con frutos carnosos para la migración (Howe y De Steven 1979), la cría de su

progenie o el mantenimiento durante ciertas épocas del año (Tergborgh 1986, Rey 1995). Además, la actividad de los vertebrados frugívoros puede alterar la distribución de insectos frugívoros que a su vez producen efectos positivos o negativos sobre la reproducción de las plantas (Herrera 1984, Traveset 1992, Guix y Ruiz 1997, Bravo 2008). En definitiva, las redes complejas de interacción que se establecen en virtud de los mutualismos entre plantas y dispersores, tienen efectos notorios y muy diversos sobre la biodiversidad de comunidades animales y vegetales (Bascompte y Jordano 2007). Por lo tanto, la comprensión de estos aspectos es de sumo interés desde el punto de vista de la conservación.

## **2. La dispersión de semillas y el disturbio humano**

### **2.1. La destrucción global del hábitat**

El ser humano se caracteriza, entre otras cosas y a lo largo de su historia, por una creciente capacidad de modificar su entorno mediante la implementación de tecnología. La incidencia humana en la destrucción del medio ambiente ha ido aumentando notablemente junto con la expansión de la agricultura, el desarrollo industrial y las subsiguientes explosiones demográficas (Eldredge 1998, Laurance 2010). Se estima que en los últimos tres siglos el área total de selvas se ha reducido a la mitad de la cobertura terrestre original (Skole y Tucker 1993), y actualmente, algunas selvas tropicales se están perdiendo a una tasa equivalente a 50 canchas de fútbol por minuto (Laurance 2010). La drástica modificación del ambiente que ha ejercido el hombre en tiempos recientes nos sitúa en un escenario global preocupante, donde la pérdida de muchos recursos naturales y el impacto sobre las condiciones climáticas son evidentes (Laurance 1998, Dirzo y Raven 2003). Todos aquellos procesos que contribuyen al daño o destrucción del hábitat, como la deforestación, la fragmentación de los bosques, la defaunación, la contaminación de las aguas, o el calentamiento global, representan una seria amenaza para la supervivencia de las especies (Ledig 1992, Whitmore 1997, Dirzo y Raven 2003, Cahill *et al.* 2013). Sin dudas, la desaparición del hábitat es la principal causa de la extinción de especies (Pimm y Raven 2000). Si bien la tasa actual de extinción de especies es extremadamente difícil de determinar con suficiente precisión (Stork 2010), algunas estimaciones han sugerido la posibilidad de una pérdida del 50% de la biota total de la tierra durante la primera mitad del siglo XXI, en caso de que no se tomen medidas de conservación adecuadas (Sih *et al.* 2000).

## 2.2. Fragmentación y defaunación

La destrucción del hábitat a gran escala es un fenómeno evidente. No obstante, pocos hábitats han sido destruidos por completo. Muy frecuentemente ocurre una reducción de sus extensiones y un proceso de fragmentación, dejando pequeñas “islas” del hábitat original en una matriz degradada (Laurance 2010). La fragmentación causa una disminución del tamaño efectivo de las poblaciones que depende del tamaño de los fragmentos y del grado de aislamiento. Al igual que la pérdida del hábitat, la fragmentación es una amenaza grave para las especies (Laurance *et al.* 2002, Hanski *et al.* 2013). Los fragmentos remanentes quedan sometidos a un “efecto de borde” acentuado y a una fuerte presión de cacería (Cullen Jr. *et al.* 2000). La extinción de una especie trae aparejada la desaparición de las interacciones ecológicas en las que dicha especie participa (Janzen 1974). Este efecto puede tener lugar incluso a escala local conduciendo a una degradación paulatina de los ambientes remanentes debido al impacto indirecto sobre aquellas especies con las que interactuaba la especie desaparecida. En este sentido, las plantas dispersadas por animales, que son especialmente abundantes en las selvas tropicales o subtropicales (Howe y Smallwood 1982), pueden ser sensiblemente afectadas por la defaunación en los fragmentos boscosos (Bond 1994, Dennis *et al.* 2007).

Numerosas investigaciones han revelado consecuencias diversas de la extinción o escasez de los dispersores sobre la dispersión, regeneración y persistencia de las poblaciones de plantas dependientes de dichos animales (Wright S. J. 2003, Muller-Landau 2007, Peres y Palacios 2007, Stoner *et al.* 2007, Brodie *et al.* 2009). Algunos estudios sugieren que la eliminación de los dispersores podría incluso llevar a las plantas hasta la extinción. Éste es el caso, por ejemplo, de varias plantas endémicas en el sur de África ante la desaparición de hormigas dispersoras nativas (Bond 1994). Webb y Peart (2001) han estimado que la remoción de los dispersores en una selva tropical de Borneo (Indonesia) produciría una pérdida del 60% de la riqueza específica de plántulas. En una zona de Tanzania se observó que el reclutamiento de plántulas y juveniles de 31 especies de plantas dispersadas por animales era tres veces superior en selva continua o fragmentos grandes (> 30 ha) que en fragmentos pequeños (< 10 ha), mientras que el reclutamiento de ocho especies arbóreas dispersadas por gravedad o viento no difería (Cordeiro y Howe 2001). Además, la diferencia en el reclutamiento entre fragmentos grandes y pequeños se acrecentaba considerablemente para especies endémicas (Cordeiro y Howe 2001). En contraste con estos hallazgos de un impacto negativo en el reclutamiento, Valdivia y Simonetti (2007) observaron que los niveles de reclutamiento de una especie arbórea de los bosques de Chile eran

superiores en fragmentos boscosos respecto a un área continua, pese a los beneficios en la germinación conferidos por los dispersores.

Como es esperable, el efecto del disturbio humano no afecta a todas las especies de animales por igual. Los vertebrados de mayor tamaño son generalmente los más afectados y los primeros en desaparecer en las áreas perturbadas, ya que suelen tener bajas tasas reproductivas, requieren mayores territorios, y son más preciados como presas de caza (Bodmer *et al.* 1997). A su vez, el tamaño de los vertebrados frugívoros está correlacionado positivamente con las distancias de dispersión y con el tamaño, diversidad y cantidad de semillas movilizadas (Wheelwright 1985, Peres y Palacios 2007, Galetti *et al.* 2008, Wotton y Kelly 2012). Por lo general, los vertebrados de mayor tamaño son los principales dispersores de especies con semillas grandes (Foster y Janson 1985, Hammond y Brown 1995). Por consiguiente, se espera que las especies vegetales con semillas más grandes sufran un impacto mayor por el efecto del disturbio humano (Peres y Van Roosmalen 2002, Cramer *et al.* 2007, Peres y Palacios 2007, Markl *et al.* 2012). Sin embargo esta idea es aún motivo de debate ya que el disturbio podría tener efectos distintos sobre otras etapas del ciclo dispersivo de las plantas si se consideran otros factores postdispersivos. Por ejemplo, en áreas perturbadas las semillas grandes podrían tener una supervivencia mayor respecto a las pequeñas, en tanto la fauna afectada involucre mayormente a los depredadores de semillas grandes (Dirzo *et al.* 2007, Wright *et al.* 2007). Por otro lado, se postula que la desaparición de ciertos dispersores podría ser compensada por la permanencia de otros que posean una función ecológica suficientemente redundante (Walker 1992, Alves-Costa y Eterovick 2007, Moore y Swihart 2007). Sin embargo, para especies de semilla grande la redundancia en los dispersores no parece ser frecuente, por lo que dicha compensación no se lograría fácilmente (Campos-Arceiz *et al.* 2012, Bueno *et al.* 2013).

### **3. La dispersión de semillas y el flujo génico**

#### **3.1. El movimiento de los genes en las poblaciones vegetales**

La dispersión de semillas y el flujo de polen constituyen los dos componentes del flujo génico en las plantas con semilla (Levin y Kerster 1974, Ennos 1994, Hamilton 1999, Dick *et al.* 2008). El flujo génico potencial se refleja directamente en la capacidad dispersiva del polen y las semillas, mientras que el flujo génico efectivo implica la fecundación exitosa por el grano de polen o la germinación de la semilla dispersada (Levin y Kerster 1974). En las poblaciones naturales, el flujo génico contrarresta los efectos de la endogamia y la deriva génica, impidiendo así la erosión de la variabilidad genética (Slatkin 1987, Ellstrand 1992, Hedrick 2005). Por ende,

el flujo polínico y la dispersión de semillas son procesos de vital importancia para el mantenimiento de la conectividad y diversidad genética dentro de cada población y entre poblaciones distantes (Sork y Smouse 2006). La contribución al flujo génico dada por cada uno de los componentes depende tanto de la ploidía como de las distancias de dispersión de cada tipo de propágulo (polen o semilla). El flujo de polen implica la dispersión de gametas haploides y requiere la existencia de conoespecíficos receptores. La dispersión de semillas, en cambio, corresponde al movimiento de propágulos diploides, por lo que cada evento efectivo contribuye el doble que un grano de polen dispersado en lo que respecta al flujo génico (Epperson 2007), y puede dar lugar a la fundación de nuevas poblaciones y colonización de nuevos hábitats (Cain *et al.* 2000, Hamrick y Trapnell 2011). Sin embargo, en algunos sistemas las distancias de polinización pueden superar a las de dispersión de semillas resultando en una preponderancia del flujo génico vía polen (Petit *et al.* 2005, Bittencourt y Sebbenn 2007).

El marco conceptual que permite indagar sobre el efecto de los componentes del flujo génico en la estructura genética de las plantas no es reciente (Levin y Kerster 1974, Levin 1981, Crawford 1984), y desde entonces se ha intentado examinar empíricamente esa relación (Beattie y Culver 1979, Waser *et al.* 1982, Loveless y Hamrick 1984, Furnier *et al.* 1987, Ennos 1994, Williams y Guries 1994, Gibson y Wheelwright 1995, McCauley *et al.* 1995, Peakall y Beattie 1995, Alvarez-Buylla *et al.* 1996). No obstante, el desarrollo creciente de las técnicas de marcadores moleculares hipervariables y de métodos estadísticos específicos ha permitido avances notables en el ámbito de la ecología molecular (Sork y Smouse 2006, Ashley 2010, Jordano 2010, Hamrick y Trapnell 2011). En este sentido el análisis de la estructura genética espacial de escala fina (en inglés: *fine-scale spatial genetic structure*), basado en métodos de autocorrelación espacial (Smouse y Peakall 1999, Epperson 2004, Vekemans y Hardy 2004), y los métodos para la inferencia de parentescos (Meagher y Thompson 1986, 1987, Devlin y Ellstrand 1990, Marshall *et al.* 1998, Smouse *et al.* 2001, Milligan 2003, Wang 2004, Jones *et al.* 2010) han jugado un rol central.

Los estudios genéticos de flujo de polen han sido claramente más abundantes que los de dispersión de semillas. Es probable que dicho sesgo no se deba necesariamente a una mayor importancia relativa sobre el flujo génico, sino más bien a la mayor simplicidad metodológica en cuanto a diseño de muestreo y poder resolutivo de los marcadores moleculares requeridos para estudiar el flujo de polen (Smouse y Sork 2004, Sork y Smouse 2006, Ashley 2010). La importancia relativa del flujo polínico y la dispersión de semillas, y la predominancia de uno u otro componente en la contribución al flujo génico total, varía entre las distintas especies de plantas dependiendo de los sistemas de polinización y dispersión, y de factores ambientales

(Ennos 1994, McCauley 1997, Latta *et al.* 1998, Hamilton y Miller 2002, Bacles *et al.* 2004, Bacles *et al.* 2006, Hardesty *et al.* 2006, García *et al.* 2007, Isagi *et al.* 2007, Dick *et al.* 2008, Nakanishi *et al.* 2009, Freeland *et al.* 2012). Más allá de la variación existente, tanto los patrones dispersivos del polen como los de las semillas influyen considerablemente sobre la estructura genética de las poblaciones vegetales (Hamrick y Nason 1996, Sork y Smouse 2006, Epperson 2007, Dick *et al.* 2008).

### **3.2. Los efectos del disturbio sobre el flujo génico**

La genética de poblaciones permite hacer predicciones sobre las consecuencias genéticas de la fragmentación en tanto que dicha perturbación puede implicar una restricción del flujo génico (Templeton 1990, Barret y Kohn 1991). Las causas y consecuencias de la disminución del flujo génico pueden tener lugar a distintas escalas espaciales (Linhart y Grant 1996). Por ejemplo, el surgimiento de una barrera geográfica que impida o reduzca el intercambio de genes entre dos sectores de una población puede ocasionar el surgimiento de dos subpoblaciones diferenciadas. En forma análoga, la limitación de la dispersión de los genes dentro de una población puede generar una estructuración en núcleos de individuos físicamente cercanos y emparentados genéticamente, aún cuando la distribución de los individuos sea continua en la población (Heywood 1991). Ante la existencia de un proceso genético-evolutivo denominado *aislamiento por distancia* (Malécot 1946, Wright 1946, Hardy y Vekemans 1999) se espera que las poblaciones continuas exhiban un patrón de estructuración tal que el grado de parentesco de los individuos decrece con la distancia física entre los mismos. Esencialmente, el aislamiento por distancia resulta de la acción antagónica entre la deriva génica, que tiende a reducir localmente el número de alelos que se transmiten a la generación siguiente, y la dispersión de alelos (flujo génico intrapoblacional), que tiende a mantener las variantes alélicas dentro del acervo génico de la población (Hardy y Vekemans 1999). El modelo de aislamiento por distancia predice el avance hacia un estado de equilibrio deriva-dispersión en las sucesivas generaciones. En el estado de equilibrio se espera observar un declive lineal del parentesco con la distancia física, o con el logaritmo de la distancia (en el modelo en dos dimensiones), entre individuos (Rousset 1997, Vekemans y Hardy 2004).

Sin considerar efectos selectivos, la genética de poblaciones predice que una disminución del flujo génico aumenta la estructuración de las poblaciones y causa una reducción del tamaño poblacional efectivo (Hedrick 2005). Bajo estas condiciones, se espera que las poblaciones fragmentadas sufran una erosión de la variabilidad genética y una diferenciación entre subpoblaciones (fragmentos) debido al incremento de la endogamia o deriva génica en cada fragmento, y a la disminución del intercambio de genes entre fragmentos (Young *et al.* 1996,



Hedrick 2005, Lowe *et al.* 2005). En el corto término (una o pocas generaciones luego del disturbio) las poblaciones pequeñas pueden sufrir *depresión por endogamia* (Charlesworth y Charlesworth 1987, Hedrick y Kalinowski 2000). Este fenómeno se produce como consecuencia de un aumento del apareamiento entre individuos emparentados, lo cual genera un incremento de la homocigosis y por ende un aumento de la frecuencia de genotipos que usualmente poseen una menor aptitud. A largo plazo, la pérdida generalizada de variabilidad puede limitar la capacidad de la población para responder adaptativamente a cambios del entorno que ejerzan nuevas presiones de selección (Ellstrand y Elam 1993, Young *et al.* 1996, Hedrick 2001).

Los estudios de poblaciones fragmentadas y/o degradadas han mostrado resultados diversos, y no siempre han detectado los efectos deletéreos previstos por la genética de poblaciones (Lowe *et al.* 2005). Algunos trabajos que analizaron genéticamente poblaciones vegetales degradadas han encontrado un incremento de los niveles de endogamia (*e.g.*, Jump y Peñuelas 2006), de la tasa de autofecundación (*e.g.*, Murawski *et al.* 1994, Dick *et al.* 2003), y de la estructuración genética espacial (*e.g.*, De-Lucas *et al.* 2009, Wang *et al.* 2011). Sin embargo, otros estudios han mostrado que en fragmentos remanentes la diversidad genética de algunos árboles puede ser similar o mayor a la de áreas continuas (*e.g.*, Young *et al.* 1993, Collevati *et al.* 2001). En efecto, mediante análisis de parentesco se ha demostrado que el flujo polínico efectivo, mediado por polinizadores nativos o exóticos pueden aumentar en paisajes fragmentados (Dick 2001, White *et al.* 2002, Dick *et al.* 2003), contrarrestando la reducción del tamaño efectivo de la población y la consecuente pérdida de variabilidad. Estos resultados indicarían que no siempre la fragmentación va acompañada de aislamiento genético y de las consecuencias perjudiciales que podrían suponerse (Lowe *et al.* 2005, Kramer *et al.* 2008; sin embargo ver Jump y Peñuelas 2006, Aguilar *et al.* 2008, Dubreuil *et al.* 2010). Cabe señalar también que un aumento del flujo génico no necesariamente es beneficioso, pues podría generar *depresión por exogamia* si la población afectada contiene un sistema genético adaptado localmente y recibe genes foráneos provenientes de un acervo diferente (Waser y Price 1994, Lowe *et al.* 2005, Leimu y Fischer 2010).

Otro aspecto que ha sido señalado respecto a la aplicación de los modelos clásicos de la genética de poblaciones para evaluar los efectos del disturbio del hábitat es el referido a las escalas temporales (Kramer *et al.* 2008, Oddou-Moratorio y Klein 2008, Zellmer y Knowles 2009, Sork y Waits 2010). Tradicionalmente, los métodos para evaluar el flujo génico (“métodos indirectos”) se basaron en la estimación de un parámetro ( $N_e m$ ; donde  $N_e$  es el tamaño poblacional efectivo y  $m$ , la tasa de migración efectiva) directamente relacionado al grado de diferenciación ( $F_{st}$ ) de las frecuencias alélicas entre (sub)poblaciones, y que de algún modo resume el resultado de los procesos poblacionales históricos (Slatkin y Barton 1989, Neigel 1997). Las predicciones

derivadas de esos modelos genético-evolutivos requieren varios supuestos relevantes, como por ejemplo condiciones de equilibrio deriva-migración y tamaños efectivos constantes, y conciernen generalmente al mediano o largo plazo (normalmente  $> 10$  generaciones) (Ouborg *et al.* 1999, Sork *et al.* 1999). En contraste, el interés de la ecología por los efectos del disturbio del hábitat sobre el flujo génico mediado por polen y semillas concierne a procesos más recientes. El principal desafío en el contexto ecológico es poder evaluar cambios agudos del flujo génico contemporáneo asociados a la perturbación relativamente reciente del hábitat, y su impacto en la variabilidad genética (Sork *et al.* 1998). Normalmente los estudios ecológicos involucran, explícita o implícitamente, sólo a dos generaciones: las plantas adultas productoras de polen o semillas y los individuos reclutados de la siguiente generación. Como ya mencionamos antes, algunos métodos de análisis desarrollados recientemente han sido fundamentales, ya que permiten analizar los efectos del flujo polínico y la dispersión de semillas en escalas de tiempo y/o espacio más finas. Concretamente, dichos métodos ofrecen la posibilidad de obtener medidas más directas del flujo génico contemporáneo (Ouborg *et al.* 1999, Smouse y Sork 2004, Grivet *et al.* 2005, Sork y Smouse 2006, García *et al.* 2007, Grivet *et al.* 2009) y permiten analizar la estructura genética en términos del grado de parentesco entre individuos en microescalas espaciales (Williams 1994, Kalisz *et al.* 1999, Wells y Young 2002, Alberto *et al.* 2005). Mediante la aplicación de estas herramientas podemos responder preguntas difíciles o imposibles de contestar de otra manera, y que resultan fundamentales tanto para el conocimiento del proceso de dispersión (*e.g.*, determinar la distribución de distancias de las plántulas a sus parentales), como para evaluar los efectos de la fragmentación del paisaje sobre el flujo génico contemporáneo (Ouborg *et al.* 1999, Sork *et al.* 1999, Sork y Smouse 2006, Bittencourt y Sebben 2007, Ashley 2010, García y Grivet 2011, Hamrick y Trapnell 2011, Wang *et al.* 2011).

#### **4. La gran ecorregión de la Selva Atlántica, la Selva Paranaense y la situación ambiental**

La Selva Atlántica es un complejo de quince ecorregiones que se extiende mayormente a lo largo de la costa atlántica de Brasil y hacia el oeste alcanzando la región oriental de Paraguay y el noreste de Argentina (Placci y Di Bitetti 2006). Este complejo de ecorregiones alberga los bosques tropicales y subtropicales lluviosos más amenazados del planeta, reteniendo no más de un 16% de los 150 millones de hectáreas de su extensión original (Ribeiro *et al.* 2009). La Selva Atlántica contiene una notable heterogeneidad de condiciones ambientales que sin duda han favorecido la generación de una altísima diversidad biológica (Ribeiro *et al.* 2009). Los factores de variación ambiental están asociados a su amplio rango latitudinal ( $\sim 29^\circ$ ) extendiéndose a través de regiones tropicales y subtropicales. Asimismo la amplitud longitudinal está asociada a un marcado

gradiente de precipitaciones. El régimen de lluvias puede variar entre 4000 mm/año en las zonas costeras y 1000 mm/año en las zonas interiores donde puede darse una marcada estacionalidad con períodos secos de entre 5 y 6 meses. Por último, la geografía presenta gradientes altitudinales que oscilan entre 0 y 2700 msnm, contribuyendo también a la heterogeneidad ambiental. La Selva Atlántica ha sido identificada como uno de los 25 núcleos (*hotspots*) de biodiversidad más importantes del mundo, conteniendo un 1 – 8% de la biota total de la tierra (Myers *et al.* 2000, Metzger 2009). Esta gran ecorregión alberga aproximadamente unas 20 mil especies de plantas y 1360 vertebrados terrestres que incluyen 620 aves, 260 mamíferos, 200 reptiles y 280 anfibios (Myers *et al.* 2000). Además la Selva Atlántica presenta un notable nivel de endemismo en los diversos grupos taxonómicos, lo cual resalta la importancia de su conservación (Metzger 2009). Alrededor de 8000 árboles, 200 aves, 70 mamíferos, 90 reptiles y 290 anfibios son endémicos de la Selva Atlántica (Myers *et al.* 2000).

En un estudio reciente, se ha determinado que en Brasil la extensión total de Selva Atlántica remanente, incluyendo las áreas de bosque secundario y fragmentos menores a 100 ha, representa un 11 – 16% de la cobertura original (Ribeiro *et al.* 2009). La porción remanente se encuentra altamente fragmentada, con fragmentos distanciados considerablemente (1440 m en promedio) y sujetos a un fuerte efecto de borde. Más del 80% de los fragmentos tienen menos de 50 ha. De la superficie total remanente, sólo un 9% se encuentra protegida en reservas (Ribeiro *et al.* 2009).

La Selva Paranaense, también denominada Selva Atlántica Interior, Selva Atlántica Semi-decidua, o Bosque Atlántico del Alto Paraná, es la ecorregión más extensa (47 millones ha) de aquellas que integran el complejo de la Selva Atlántica (Placci y Di Bitetti 2006). La Selva Paranaense se extiende desde el oeste de la Serra do Mar en Brasil, hasta el este de Paraguay y la provincia de Misiones en Argentina (Figura 2). La Selva Paranaense ha sido drásticamente reducida a un 7 – 8% de la superficie original, con tasas de deforestación notablemente elevadas a partir de la segunda mitad del siglo XX hasta la actualidad (Figura 2). De la superficie original que se extendía en cada uno de los tres países en los que esta ecorregión está representada, en Brasil apenas queda el 2,7% (771.098 ha), en Paraguay el 13,4% (1.152.790 ha), y en Argentina el 51% (1.130.304 ha) (Holz y Placci 2003). En los últimos años la tasa de deforestación en Paraguay ha sido la más alta de América Latina.

La expansión de la agricultura ha sido el factor más importante, aunque no el único, que ha contribuido a la deforestación y fragmentación de la Selva Paranaense. Los principales cultivos desarrollados en esta región incluyen algunos anuales como soja, caña de azúcar, maíz, trigo, algodón, y tabaco, y cultivos perennes como café, té, yerba mate, cítricos y plantaciones forestales (pino y eucalipto principalmente) (Placci y Di Bitetti 2006). La ganadería también ha sido una

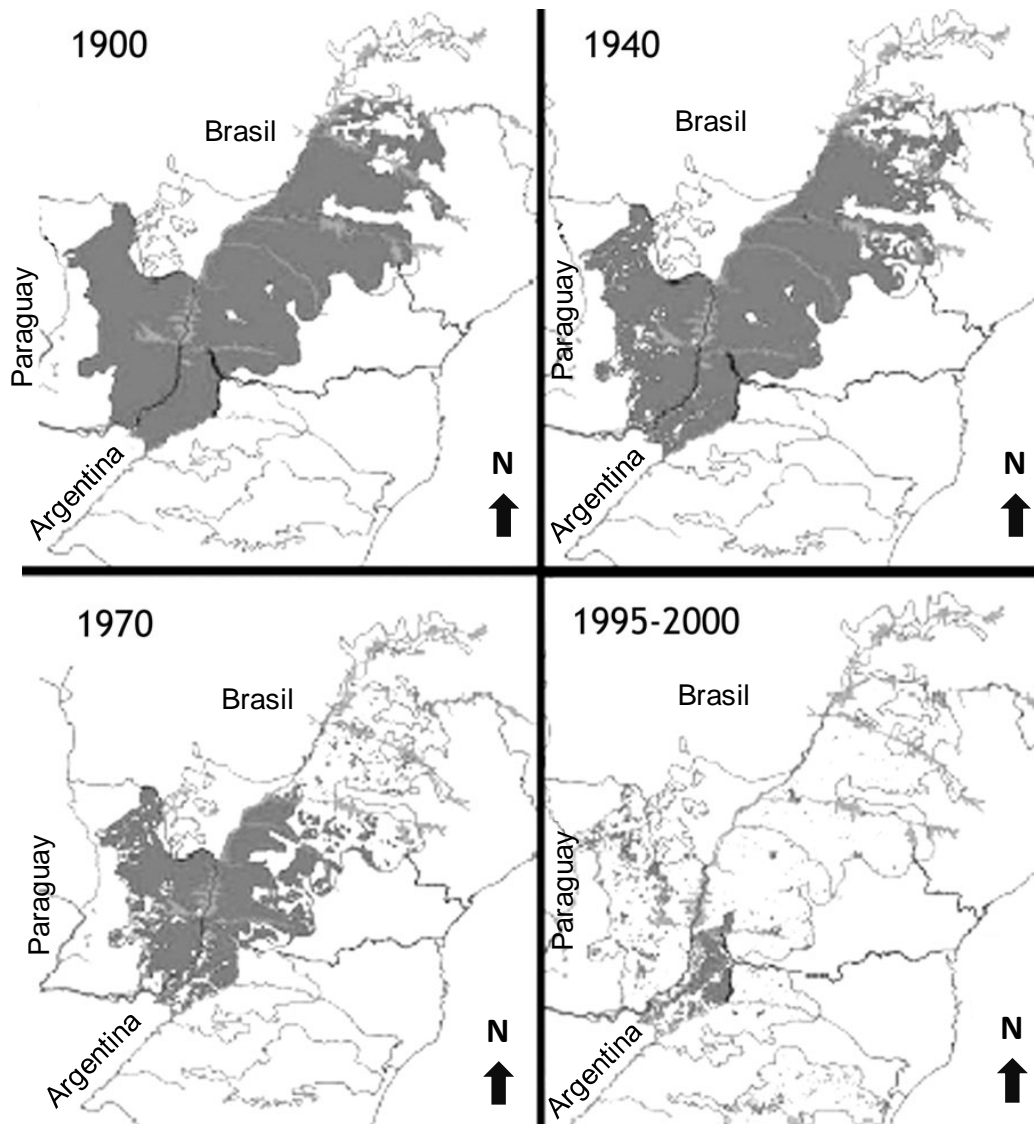
actividad económica importante en la ecorregión implicando la conversión del bosque nativo en pastizales para el pastoreo. El impacto de cada uno de los cultivos, como de las demás actividades productivas, difiere a nivel regional de acuerdo a los patrones históricos de desarrollo de los tres países involucrados (Laclau 1994, Holz y Placci 2003). Las plantaciones de soja han tenido un impacto notable en los estados del sur de Brasil y el este de Paraguay, pero no así en la provincia de Misiones (Argentina). Las plantaciones de tabaco están concentradas en el estado de Santa Catarina, Brasil (Hodge *et al.* 1997), y en la porción este de la provincia de Misiones. En la región norte de Paraguay las plantaciones de marihuana también han reemplazado una porción apreciable de los bosques nativos. En la provincia de Misiones, los monocultivos forestales, principalmente de pino, constituyen la mayor actividad económica (Placci y Di Bitetti 2006). La producción de madera, proveniente de cultivos forestales o de explotación del bosque nativo, representa el 50 – 65% del PBI de la provincia dependiendo del período que se considere (Mac Donagh y Rivero 2005). Entre otras cosas, la explotación sustractiva de madera del bosque nativo ha producido el empobrecimiento de los bosques, cambios en la estructura del mismo y en la composición del suelo.

Además existen otros factores relevantes que han tenido un claro impacto sobre la ecorregión. La caza ilegal está muy difundida en la ecorregión del Alto Paraná donde se han diezmado las poblaciones de muchas de las especies cazadas, llegando incluso a la extinción local de varias de ellas (Cullen *et al.* 2000, 2001, Paviolo *et al.* 2009). Los organismos de control no han ejercido una función eficiente para evitar la caza furtiva, en parte debido a la carencia de recursos técnicos y financieros que permitan la aplicación efectiva de las leyes vigentes (Cinto y Bertolini 2003). Además, la caza tiene raíces culturales muy profundas, acompañadas muchas veces de serias necesidades económicas (Giraud y Abramson 1998). Por otro lado, ciertas obras de infraestructura también han tenido un impacto ambiental notable. La construcción de grandes represas hidroeléctricas como Itaipú , Yacyretá y Uruguái, ha producido la inundación de grandes superficies de tierra aumentando el grado de fragmentación del bosque e imponiendo barreras dispersivas para ciertas especies de flora y fauna (Chebez y Hilgert 2003, Fahey y Langhammer 2003). Asimismo, la construcción de rutas y caminos dentro de zonas protegidas o áreas lindantes ha incrementado la erosión del suelo y los efectos de borde, ha facilitado el acceso a los cazadores, y ha redundado en frecuentes accidentes letales entre los vehículos y la fauna. Por ejemplo, en el Parque Nacional Iguazú, los vehículos atropellan un promedio de 200 animales cada año incluyendo especies claramente vulnerables como tapires y jaguares (Chebez y Hilgert 2003).

Como ha sido señalado (Placci y Di Bitetti 2006), el uso de la tierra para cultivos y ganadería, la explotación maderera de especies nativas, la caza ilegal y la construcción de infraestructura,

pueden ser consideradas como las "causas próximas" del tremendo disturbio que ha sufrido la ecorregión. No obstante, existen también "causas últimas" entre las que se destacan: la profunda crisis económica de la región, la falta de alternativas económicas mediante prácticas de uso sustentable, la falta de capacidad de los organismos gubernamentales para desarrollar y aplicar las leyes apropiadas (falta de idoneidad de funcionarios, mala administración de recursos, corrupción generalizada), la subestimación del bosque nativo por la población colonizadora, que ha sido visto como un impedimento para el desarrollo, y falta de concientización de la población sobre los problemas ecológicos de la región (Laclau 1994, Holz y Placci 2003, Placci y Di Bitetti 2006). A su vez, muchos de estos factores están asociados a un sistema de desigualdad económica donde la tierra y sus recursos ha quedado concentrada en las manos de unos pocos, se ha marginado a una gran proporción de la población y se la ha privado de sus necesidades más básicas (Placci y Di Bitetti 2006).

Pese al enorme impacto que ha sufrido la Selva Paranaense, la provincia de Misiones aún preserva áreas extensas de bosque continuo (Figura 2) con un considerable potencial para la conservación. El conjunto de áreas protegidas compuesto por el Parque Nacional do Iguazu en Brasil, el Parque Nacional Iguazú, al Parque Provincial Urugua-í y otras ocho reservas más pequeñas en Argentina, representa la superficie continua de bosque (340.800 ha) bajo protección estricta más extensa de la ecorregión (Di Bitetti *et al.* 2003). En el año 1999 se sancionó en Misiones una ley provincial, denominada "Corredor Verde de Misiones" (Ley 3631, decreto 218/99), destinada a proteger una superficie aproximada de 1 millón ha como área de conservación y desarrollo sustentable y a mantener la conectividad entre las principales áreas protegidas. Esta ley provee de un marco formal propicio para el intento de preservación de los remanentes de Selva Paranaense en Argentina. No obstante, el desmonte ilegal, la caza furtiva y la contaminación representan aún importantes amenazas que frecuentemente no son controladas. Asimismo, los intereses económicos de sectores influyentes sin perspectivas de conservación generan presiones constantes que sólo pueden ser contrarrestadas con una aplicación eficiente de políticas estratégicas adecuadas (Placci y Di Bitetti 2006). En este sentido, la producción de conocimiento científico sobre aspectos ecológicos, o biológicos en general, puede ayudar a identificar los aspectos más relevantes a tener en cuenta para el manejo y preservación del medio ambiente.

**Figura 2.** Reducción de la cobertura boscosa de la Selva Paranaense durante el siglo XX

Nota: Las áreas sombreadas en gris corresponden a la cobertura de bosque. La imagen fue tomada (y modificada) de Placci y Di Bitetti (2006).



## OBJETIVO GENERAL

---

Evaluar posibles consecuencias de la defaunación sobre la dispersión de semillas y el flujo génico asociado para especies dispersadas por vertebrados en la Selva Paranaense (Misiones, Argentina).

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

### • CAPÍTULO I

a) Evaluar la composición de semillas medianas y grandes en heces de tapir en el Parque Nacional Iguazú, y los patrones espaciales de defecación.

b) Evaluar si en la Selva Paranaense la dispersión por tapires es efectiva para el reclutamiento de plántulas y juveniles de especies con semillas grandes.

c) Determinar una especie de planta que represente un modelo de estudio relevante para evaluar los efectos de la pérdida de dispersores sobre el proceso de dispersión de semillas y sus posibles consecuencias.

---

### • CAPÍTULO II

Desarrollar marcadores moleculares polimórficos para el pindó que permitan estudiar la diversidad y estructura genética en relación con el flujo génico mediado por la dispersión de semillas.

---

### • CAPÍTULO III

Determinar los efectos de la dispersión por tapires sobre la variabilidad y estructura genética de los juveniles de pindó en la Selva Paranaense.

---

### • CAPÍTULO IV

Evaluar los efectos producidos por la defaunación sobre la variabilidad y estructura genética de las nuevas cohortes de pindó en la Selva Paranaense.





## CAPÍTULO I

UN FRUGÍVORO AMENAZADO Y UNA ESPECIE ARBÓREA CLAVE: LA INTERACCIÓN ENTRE EL  
TAPIR Y EL PINDÓ**Introducción**

Los vertebrados desempeñan un papel fundamental en la dispersión de semillas en las selvas tropicales y subtropicales (Willson *et al.* 1989). De hecho, en algunas regiones del neotrópico más del 90% de las especies arbóreas del dosel o subdosel son dispersadas por vertebrados (Howe y Smallwood 1982). La amplia diversidad de vertebrados que es posible encontrar en las selvas se ve también reflejada en la notable diversidad de lluvias de semillas que éstos producen de acuerdo a sus diferentes características físicas y comportamentales. Las lluvias de semillas resultantes están fuertemente influenciadas por el tamaño corporal, el tipo de digestión, el rango territorial y el patrón de defecación de los dispersores (Janzen 1983, Bodmer 1991, Wenny 2000, Stoner *et al.* 2007, Bravo 2009).

Los tapires (Perissodactyla, Tapiridae, *Tapirus*) son herbívoros-frugívoros con características relevantes respecto a su gran potencial como dispersores de semillas. En el neotrópico se encuentran tres (*T. terrestris*, *T. bairdii* y *T. pinchaque*) de las cuatro especies de tapires existentes en la actualidad, y son los únicos sobrevivientes de la megafauna que se extinguió a fines del pleistoceno (Martin y Klein 1984, Lessa y Fariña 1996). *Tapirus terrestris* (L. 1758), conocido como tapir amazónico o de tierras bajas, alcanza un peso máximo en la adultez de aproximadamente 250-300kg, y es, después de *T. bairdii*, el mayor vertebrado terrestre de las selvas neotropicales. Se han registrado más de 300 especies de plantas, pertenecientes a no menos de 71 familias, cuyos frutos son consumidos por el tapir amazónico (Hibert *et al.* 2011, Barcelos *et al.* 2013 y referencias allí citadas), de las cuales unas 109 al menos podrían ser efectivamente dispersadas por este ungulado (Barcelos *et al.* 2013). El tapir es capaz de ingerir cantidades considerables de frutos grandes como las drupas de palmeras (Bodmer 1990, Fragoso 1997, Galetti *et al.* 2001). Posee tiempos largos de retención digestiva sin afectar la viabilidad de las semillas de numerosas especies (Olmos *et al.* 1999, Fragoso y Huffman 2000, Bizerril *et al.* 2005, Barcelos 2013). Además, utiliza normalmente territorios extensos que abarcan cientos o algunos miles de hectáreas, moviéndose alrededor de 5 km diarios, y pudiendo realizar largos desplazamientos en línea recta que superan los 20 km de distancia (Fragoso *et al.*, 2003, Noss *et*

al. 2003). Todos estos atributos sugieren que el tapir puede promover con frecuencia la dispersión de larga distancia de semillas viables.

Una característica relevante del tapir, desde el punto de vista de la dispersión de semillas, es el hábito de defecar en forma recurrente en determinadas áreas, dando lugar a la formación de letrinas donde se acumula una abundante cantidad de semillas (Fragoso 1997, Olmos *et al.* 1999, Quiroga-Castro y Roldán 2001). Este patrón de defecación ha sido bien descrito para una región de la selva amazónica de Brasil, donde la mayoría de las letrinas se caracterizaba por tener grandes cantidades de semillas y juveniles de la palmera *Attalea maripa* (Fragoso 1997, Fragoso y Huffman 2000, Fragoso *et al.* 2003).

El tapir amazónico se encuentra amenazado en la mayor parte de su rango de distribución y localmente extinto en muchas áreas debido a la destrucción del hábitat y la caza desmedida (Brooks *et al.* 1997, Noss y Cuellar 2008). Su situación es particularmente crítica en Argentina, donde su área de distribución se redujo aproximadamente a un 50% de la extensión original (Chalukian *et al.* 2008, Taber *et al.* 2008). La Selva Paranaense en la provincia de Misiones (Argentina) alberga en la actualidad el mayor remanente de bosque continuo (~10.000 km<sup>2</sup>) de esta ecorregión, donde persiste una proporción importante de los tapires remanentes en el país (Giraud y Povedano 2003). En contraste, fuera de las áreas protegidas la selva está fragmentada y degradada (ver Introducción General), y el tapir se encuentra localmente extinto en los fragmentos (Placci 2000, Giraud y Povedano 2003).

En la Selva Paranaense del sur de Brasil se ha registrado la presencia de abundantes semillas medianas y grandes en las heces de tapir, entre las que se cuentan algunas palmeras como *Syagrus romanzoffiana* y *Euterpe edulis*, varias mirtáceas, y otras especies como *Jacaratia spinosa*, y *Enterolobium contortisiliquum* (Rodrigues *et al.* 1993, Olmos *et al.* 1999, Galetti *et al.* 2001, Tófoli 2006). En particular, Rodrigues *et al.* (1993) y Olmos *et al.* (1999) observaron que una proporción considerable de semillas de *E. edulis* y de *S. romanzoffiana* halladas en las heces mantenían la viabilidad, lo que sugería que el tapir es un potencial dispersor de estas especies. No obstante, el reclutamiento natural de juveniles no fue evaluado en dichos trabajos, dejando abierta la posibilidad de que la dispersión no sea tan efectiva si, por ejemplo, las semillas no son depositadas en sitios propicios para el establecimiento y supervivencia de las plántulas. En este sentido algunos autores (Janzen 1982, Bodmer 1991, Salas y Fuller 1996, Quiroga-Castro y Roldán 2001) han cuestionado la eficacia del tapir como dispersor debido a que frecuentemente la defecación es realizada en sitios inundables. Así, la eficacia de la dispersión podría depender tanto de la especie consumida como de la región geográfica y época del año.

Aquellas plantas con semillas grandes que dependen de la dispersión efectiva por vertebrados de gran porte, típicamente sensibles al disturbio, representan objetos de estudio de sumo interés para evaluar el impacto del disturbio humano sobre el ciclo dispersivo y regeneración de las plantas. Por lo tanto, nos planteamos los siguientes objetivos específicos: a) evaluar la composición de semillas medianas y grandes en heces de tapir y los patrones espaciales de defecación de este vertebrado en la Selva Paranaense de Argentina (Parque Nacional Iguazú), b) evaluar si en la Selva Paranaense la dispersión por tapires es efectiva para el reclutamiento de juveniles de especies con semillas grandes, c) determinar una especie de planta que represente un modelo de estudio relevante para evaluar los efectos de la pérdida de dispersores sobre el proceso de dispersión de semillas y sus posibles consecuencias.

### **Materiales y Métodos**

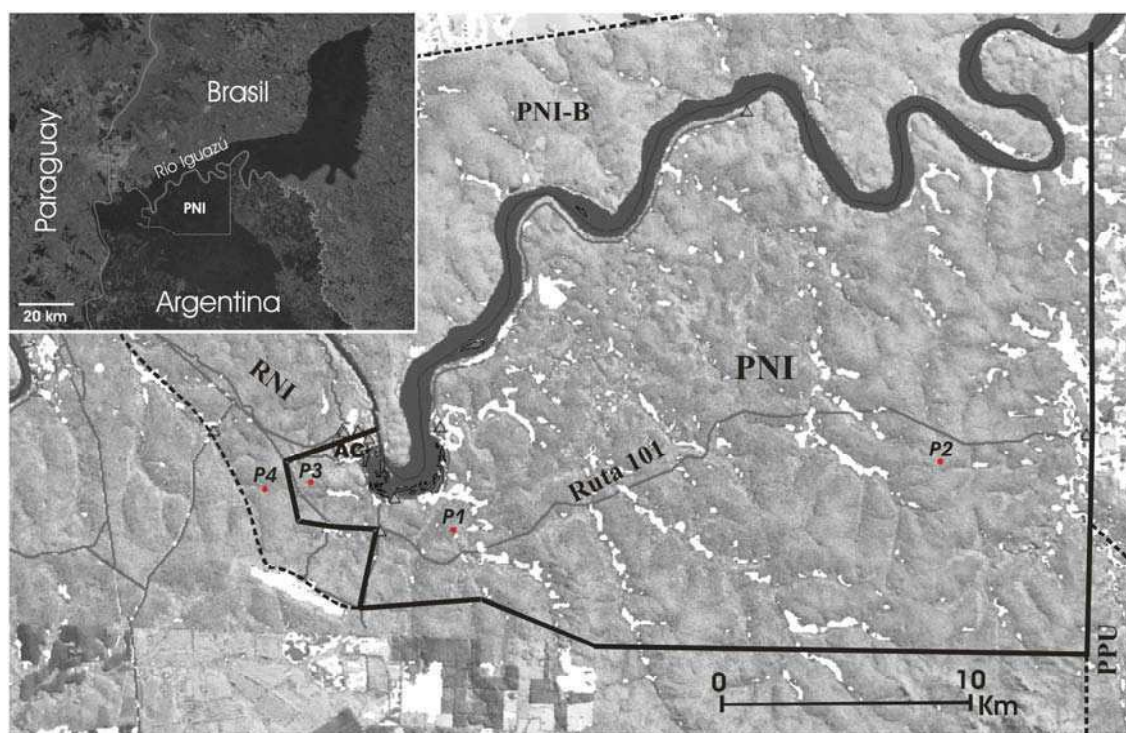
**Área de estudio.** El Parque Nacional Iguazú (25°31'-43' S, 54°08'-32' O), creado en 1934, está situado en el norte de la provincia de Misiones, Argentina (Figura 3). Se encuentra ubicado en la región sur de la Selva Paranaense (Di Bitetti *et al.* 2003, Carpinetti *et al.* 2009). Abarca una superficie aproximada de 58.600 ha, correspondiendo unas 51.500 ha a la categoría de manejo de Parque Nacional propiamente dicha, y unas 7.100 ha a la categoría de Reserva Nacional (Srur *et al.* 2009). El Parque forma parte de un extenso territorio protegido de 11.000 km<sup>2</sup>, denominado Corredor Verde de Misiones, creado por una ley provincial en 1999 (Carpinetti 2009, ver Introducción General). En su extremo oeste el Parque limita con la Reserva Natural Iguazú que funciona como un área de amortiguación. En el norte se conecta, a través del Río Iguazú (frontera internacional), con el Parque Nacional do Iguazú de Brasil (185.000 ha), y en el sudeste, con el Parque Provincial Urugua-í (84.000 ha) a través de una estrecha franja (Figura 3). Por fuera de estos bordes de conectividad, el Parque limita con fragmentos de selva alternados con áreas de cultivo y zonas pobladas.

El clima en la región es subtropical húmedo. La temperatura media anual oscila entre 16 °C y 22 °C, con un promedio de 15 °C en invierno y 25 °C en verano. Entre los meses de junio y agosto pueden registrarse heladas, especialmente en las zonas más elevadas. Las precipitaciones medias anuales varían entre 1000-1200 mm, pudiendo llegar en ocasiones hasta los 2000 mm. El régimen de precipitaciones a lo largo del año no presenta una estacionalidad muy marcada, aunque suele existir un declive entre los meses de Julio y Agosto (Dimitri 1974, Placci *et al.* 1994, Di Bitetti *et al.* 2003).

Pese a la notable degradación global de la Selva Paranaense (ver Introducción General), el Parque Nacional Iguazú exhibe un buen estado de conservación, preservando una alta riqueza

faunística que incluye, entre otros, a la gran mayoría de mamíferos nativos de esta ecorregión, como tapires, pecaríes y grandes felinos (Paviolo *et al.* 2010, Cruz 2012). Numerosos detalles y una descripción más completa de aspectos biológicos y de conservación del Parque pueden encontrarse en Carpinetti *et al.* (2009).

**Figura 3.** Ubicación geográfica del área y parcelas de estudio.



Los límites del Parque Nacional Iguazú (PNI) se indican en trazo recto y continuo. El trazo discontinuo corresponde a algunos tramos de los límites de las áreas protegidas lindantes (RNI: Reserva Natural Iguazú, PPU: Parque Provincial Uruguái, PNI-B: Parque Nacional do Iguazú en Brasil). Además se muestra (puntos rojos) la ubicación de las cuatro parcelas de estudio (P1, P2, P3, P4) y del área turística de las cataratas (AC). Los mapas de ambas escalas están trazados sobre imágenes satelitales.

**Colecta de datos y análisis estadísticos.** El muestreo fue realizado entre julio y septiembre de 2007 en 4 parcelas rectangulares (300-500 m de largo y 50 m de ancho) establecidas en los dos tipos de selva más comunes dentro del Parque Nacional Iguazú (Figura 3), y sujetas a distintos niveles de impacto humano: Parcela 1 (1,5 ha), situada en las proximidades del arroyo Ñandú, en un área intangible donde el acceso de personas está altamente restringido. Las especies arbóreas más abundantes en esta área son el laurel (*Nectandra megapotamica*, Lauraceae) y el guatambú (*Balfourodendron riedelianum*, Rutaceae). Parcela 2 (2,5 ha), también ubicada en un área de acceso restringido pero con presencia ocasional de cazadores dada su cercanía a la Ruta 101. El estrato arbóreo del bosque se caracteriza por una alta dominancia de palmito y, en menor medida, de palo rosa (*Aspidosperma polyneuron*, Apocynaceae). Parcela 3 (2

ha), localizada muy cerca del camino de acceso al Parque y no lejos del área turística. Presenta una composición arbórea similar a la Parcela 1 (dominancia de laurel y guatambú). Parcela 4 (2,5 ha), también cercana a la entrada del Parque y al tramo de ruta que va desde la localidad de Puerto Iguazú al aeropuerto internacional, de manera que el acceso de cazadores y cosechadores de palmito (“palmiteros”) es relativamente fácil y frecuente. Al igual que en la Parcela 2, el palmito es la especie dominante, pero el palo rosa es mucho menos abundante posiblemente debido a la extracción histórica de madera. Las cuatro parcelas fueron establecidas sin conocimiento previo de la ocurrencia de heces de tapir. La separación entre parcelas varió entre 1,2 km a 26 km de distancia en línea recta (Figura 3).

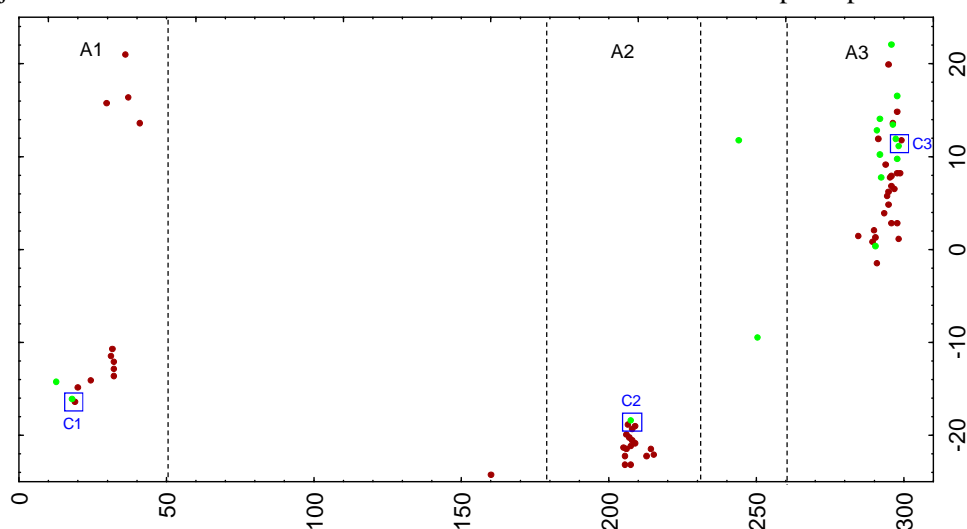
En cada parcela realizamos una inspección cuidadosa en busca de heces de tapir (y eventualmente de otros vertebrados) para las cuales determinamos si contenían semillas o plántulas y registramos su posición espacial. En 38 heces colectadas en las parcelas o halladas ocasionalmente en sitios cercanos, identificamos y contabilizamos el número de semillas medianas y grandes ( $\geq 1$  cm).

Analizamos la distribución espacial de las heces en las parcelas aplicando la función de Ripley estandarizada (Fortin y Dale 2005) (las heces halladas fortuitamente fuera de las parcelas lógicamente no se incluyeron en este análisis). La función estandarizada de Ripley,  $L(r)$ , depende del número promedio de elementos (heces en nuestro caso) hallados dentro de un área circular de radio  $r$ , centrada en cada uno de dichos elementos. El test de Ripley compara el patrón observado, resumido en términos de  $L(r)$ , con el patrón esperado bajo una completa aleatoriedad espacial. Si los elementos evaluados muestran tendencia a estar agrupados, el estadístico toma valores negativos, mientras que valores positivos indican repulsión (Fortin y Dale 2005). Este análisis fue realizado con el programa PASSaGE 2 (Rosenberg y Anderson 2011). Los efectos de borde sobre  $L(r)$  fueron corregidos mediante una ponderación inversamente proporcional a la fracción de la circunferencia incluida dentro de la parcela (Fortin y Dale 2005). Los límites de confianza del 95% fueron estimados mediante 1000 ensayos de aleatorización (Rosenberg y Anderson 2011).

Por otro lado, evaluamos el reclutamiento de la especie que resultó más abundante en las heces (*S. romanzoffiana*) en tres tipos de sitios de deposición de semillas diferentes (bajo la copa de adultos, en letrinas de tapir, y en sitios control). Para evaluar el reclutamiento establecimos cuadrados de 2 m x 2 m debajo de la copa de 12 palmeras (*S. romanzoffiana*) adultas, sobre 11 letrinas de tapir conteniendo juveniles y en 12 sitios control (ni letrinas, ni debajo de conespecíficos adultos) elegidos al azar en las parcelas, y en cada cuadrado contabilizamos el número de juveniles reclutados. La mayoría de los individuos hallados en estos sitios (de aquí en más denominados "juveniles") correspondieron a estadios superiores a plántulas (según Bewley y

Black 1994) con más de una hoja y tallos bien definidos, aunque no lignificados. Todos estos individuos tuvieron una altura menor o igual a 1,3 m. Además utilizamos una correlación no paramétrica de Spearman (Sokal y Rohlf 1995) para determinar si los niveles de reclutamiento en las letrinas (n = 11) estaban asociados a la frecuencia de uso del área por el tapir. La frecuencia de uso de cada área en la que se encontraba la letrina evaluada fue estimada a partir del número de heces halladas en una sub-parcela de 50 m x 50 m conteniendo al cuadrado de 2 m x 2 m ubicado sobre la letrina focal (ver ejemplo en Figura 4). Para realizar la correlación de Spearman utilizamos el programa STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc. 2001).

**Figura 4.** Ejemplo esquemático del muestreo realizado para evaluar el reclutamiento de juveniles en las letrinas en relación a la frecuencia de uso del área por tapires



Nota: el dibujo representa una parcela, las sub-parcelas de 50 m x 50 m (A1, A2, A3) cuyos límites interiores se indican en trazo discontinuo, y los cuadrados de 2 m x 2 m (C1, C2, C3) indicados con color azul. Los puntos verdes o marrones representan heces con o sin juveniles, respectivamente. Los valores para ambas dimensiones de la parcela (notar la diferencia de escala) están expresados en metros. La ubicación de los cuadrados es sólo esquemática y los mismos no están graficados en escala.

## Resultados

Hallamos un total de 127 heces de tapir dentro de las parcelas o en sus inmediaciones (Tabla 2). El 64% de las heces fue hallado dentro (54%) o en las cercanías (10%) de la Parcela 1, localizada en el área de menor disturbio; un 24% fue registrado en la Parcela 2, y el 12% restante en la Parcela 3. No encontramos heces de tapir en la Parcela 4, situada en el área más perturbada. Además observamos algunas heces de mamíferos de menor tamaño como pecaríes, corzuelas, y agutíes, pero en ningún caso contenían semillas medianas o grandes que pudiesen ser detectadas a ojo desnudo en el campo.

**Tabla 2.** Número de heces de tapir y de semillas de *S. romanzoffiana* depositadas por defecación.

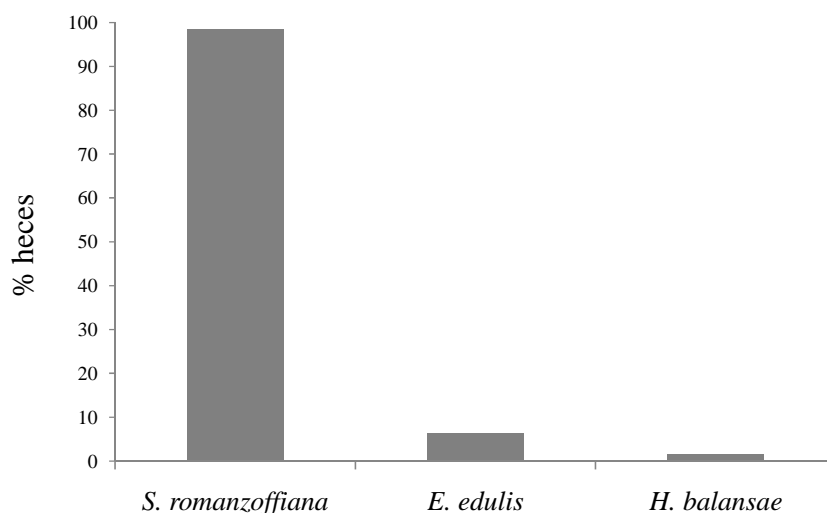
Sitio	Area (ha)	Número de heces	Número de semillas por defecación: Media $\pm$ EE (rango; n)
Parcela 1	1,5	81 (12 <sup>a</sup> )	284 $\pm$ 76 (8-952; 14)
Parcela 2	2,5	31 (1 <sup>a</sup> )	262 $\pm$ 76 (40-1024; 13)
Parcela 3	2	15	121 $\pm$ 30 (0-257; 11)
Parcela 4	2,5	0	-

EE: error estándar; n: número de heces utilizadas para contabilizar las semillas.

<sup>a</sup>Número de heces halladas fuera de la parcela.

En todas las parcelas que contenían heces las semillas de *S. romanzoffiana* (pindó) mostraron una alta predominancia respecto a las otras especies de semillas medianas y grandes registradas (Figura 5). El 98% de las heces contenía semillas de pindó, frecuentemente germinadas, y/o juveniles de esta especie (Figuras 5 y 6). No observamos indicios de daño por masticación en ninguna semilla de pindó. De las 38 heces tomadas para cuantificar el número de semillas, 22 (63%) contenían más de 100 semillas de pindó, y sólo una no contenía semillas de esta especie u otra semilla grande. El número de semillas de pindó en cada defecación individual fue en promedio muy elevado (Tabla 2), aunque ampliamente variable entre distintas heces ( $X_{\text{media}} \pm$  error estándar =  $236 \pm 41$ , en un rango entre 1 y  $>1000$ ; excluyendo la única defecación sin semillas). También hallamos semillas de palmito (*Euterpe edulis*, Arecaceae) y de alecrín (*Holocalyx balansae*, Fabaceae) en la Parcela 2, aunque con un porcentaje de ocurrencia mucho menor (Figura 5) y en cantidades sustancialmente más bajas respecto a pindó. En 8 heces (6% del total) registramos un total de 39 semillas de palmito, la mayoría de las cuales estaba vacía o dañada, mientras que en 2 heces ( $< 2\%$ ) hallamos 26 semillas de alecrín, de las cuales 11 estaban germinadas (Figura 6, panel I).

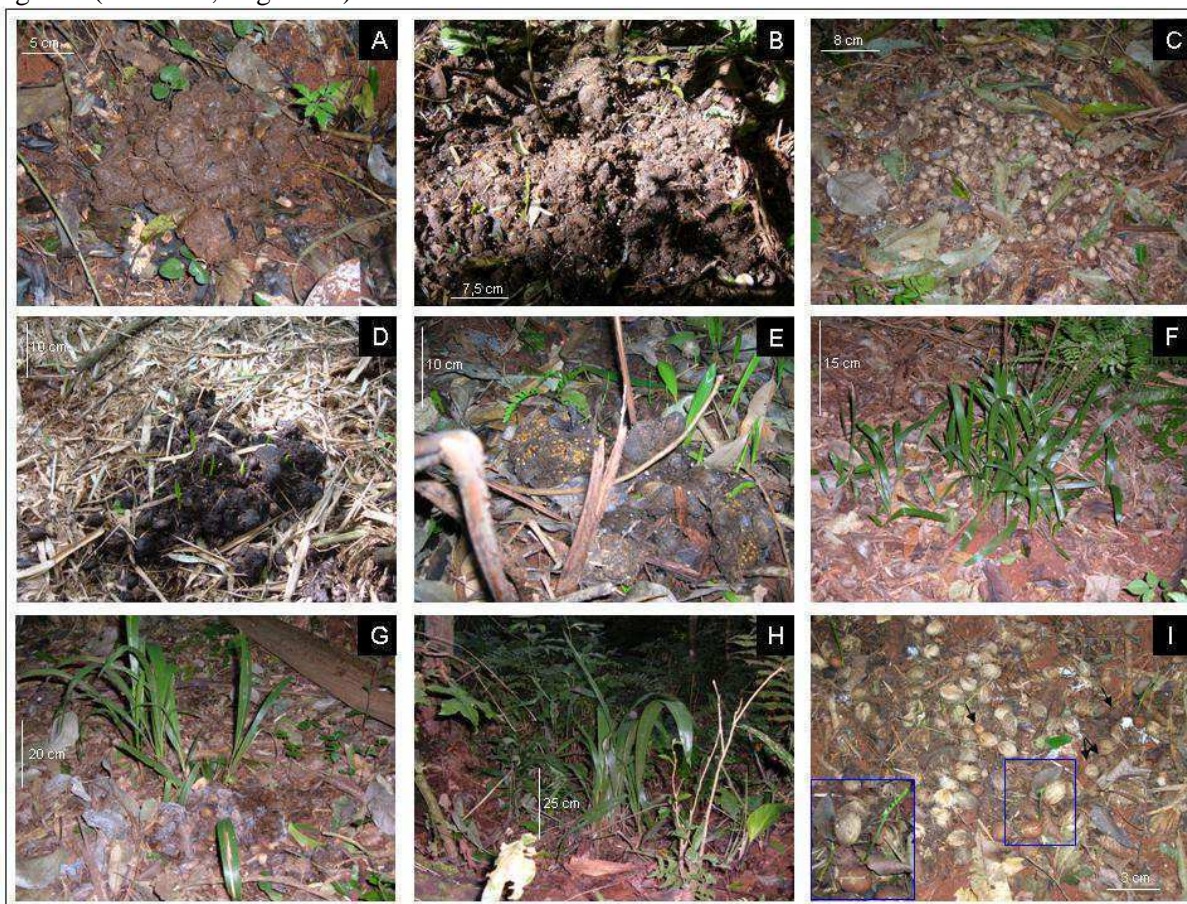


**Figura 5.** Cantidad de heces de tapir conteniendo distintas especies de semillas medianas o grandes

En las tres parcelas que contenían heces la distribución espacial de las mismas mostró un patrón de agrupamiento significativo (Figura 7) que resultaba evidente en las observaciones a campo. El patrón de agrupamiento fue corroborado por valores significativamente negativos de  $L_{(r)}$  para todo el rango de distancias de radio evaluadas (Figura 7).

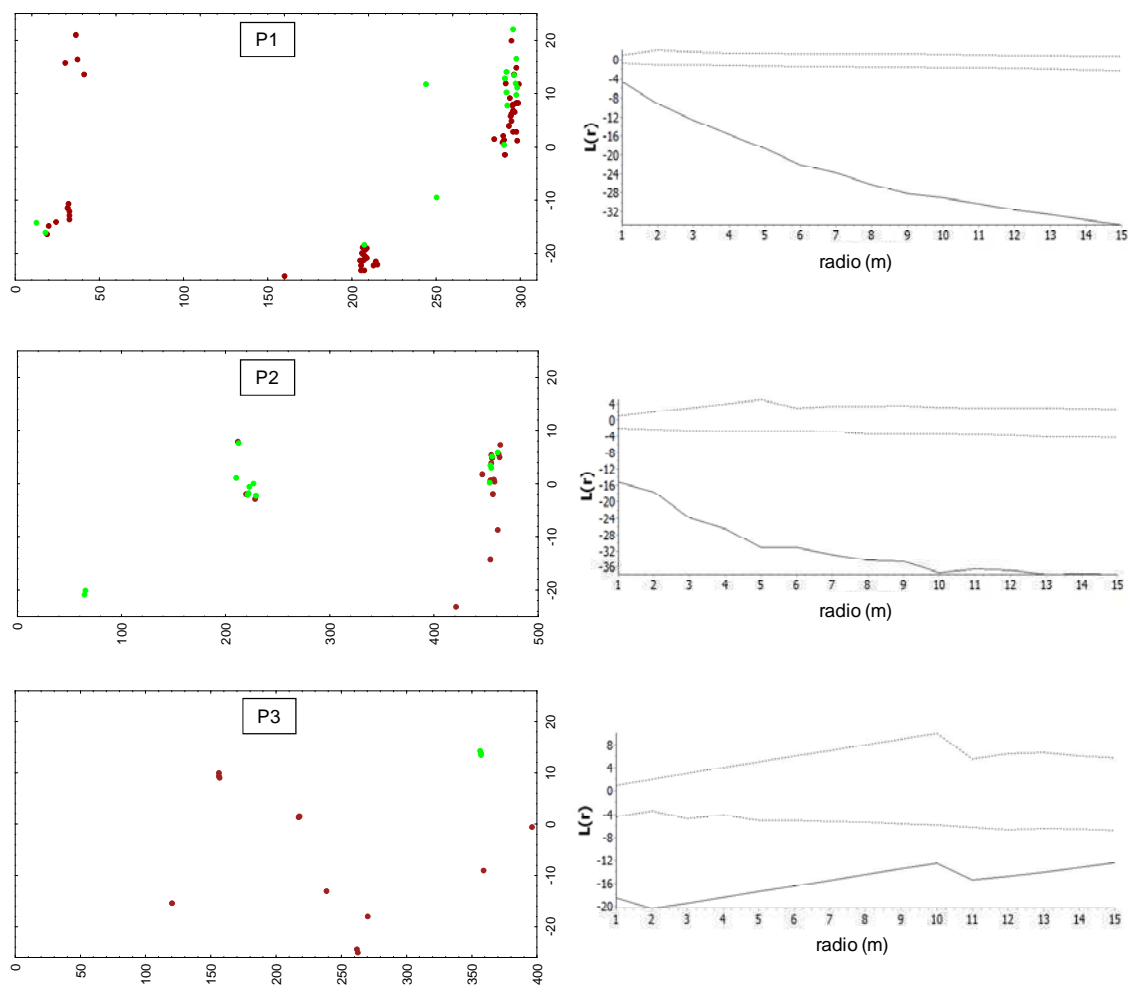
El 28% de las heces contenían juveniles de pindó. En los cuadrados (2 m x 2 m) colocados sobre las letrinas los juveniles fueron 21 veces más abundantes que en las muestras tomadas debajo de los adultos, y 500 veces más abundantes que en sitios al azar. Del total de juveniles contabilizados con este muestreo, el 95% (928 juveniles) pertenecía a las muestras tomadas en las letrinas. A su vez, el número de juveniles reclutados en las letrinas estuvo correlacionado con la frecuencia de uso del área correspondiente ( $r_s = 0,77$ ;  $n = 11$ ,  $p = 0,005$ ; Figura 8).

**Figura 6.** Semillas, plántulas y juveniles hallados en letrinas de tapir en el Parque Nacional Iguazú (Misiones, Argentina).



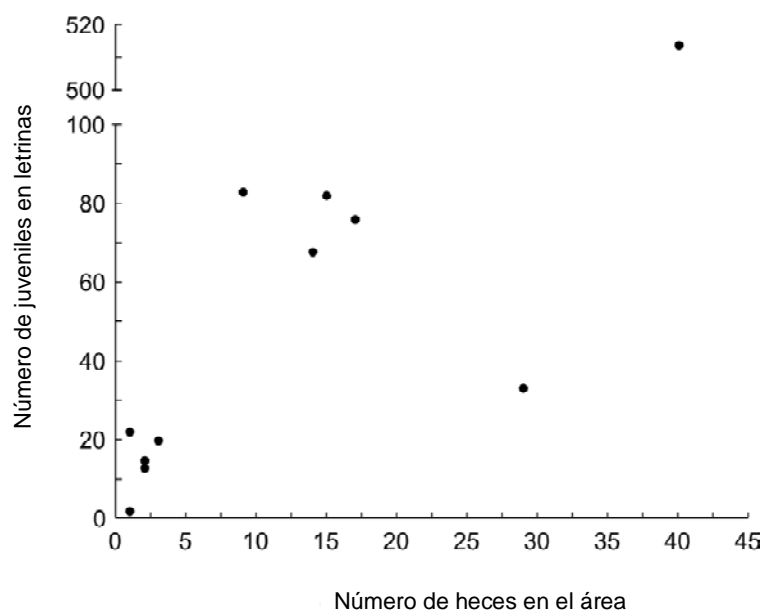
A-C: tres deposiciones distintas con abundantes semillas de *S. romanzoffiana*, en orden de menor a mayor tiempo estimado desde la defecación. D-H: plántulas (D, E) y juveniles (F-H) de *S. romanzoffiana* reclutadas en letrinas. Notar la presencia de materia fecal en las deposiciones más recientes (D, E) y en una deposición relativamente reciente superpuesta sobre juveniles reclutados previamente (G), y la pérdida del rastro de la defecación en la letrina más vieja con juveniles más desarrollados (H). I: defecación algo erosionada con presencia de semillas de *E. edulis* (señaladas con flechas negras) y *H. balansae* ya germinadas (ver ejemplo en la ampliación del recuadro azul), además de las de *S. romanzoffiana* (gran mayoría).

**Figura 7.** Esquema y análisis del patrón espacial de defecación del tapir mediante la función estandarizada de Ripley en las tres parcelas que contenían heces: Parcela 1 (P1), Parcela 2 (P2), Parcela 3 (P3).



Nota: En los paneles de la izquierda se indican las heces de tapir con puntos verdes y marrones, dependiendo si contenían o no juveniles de pindó, respectivamente. Los valores para ambas dimensiones de cada parcela (notar la diferencia de escala) están expresados en metros. En los paneles de la derecha está graficada la función de Ripley ( $L(r)$ ) versus la distancia del radio. Las líneas de trazo más oscuro corresponden a los valores observados de  $L(r)$ , y las líneas más claras representan los límites de confianza del 95% bajo distribución espacial aleatoria.

**Figura 8.** Correlación entre el reclutamiento de juveniles de *S. romanzoffiana* en las letrinas y la frecuencia de uso del área por tapires



Nota: el reclutamiento en las letrinas fue estimado por el número de juveniles en cuadrados de 2 m x 2 m establecidos sobre las letrinas, y el número total de heces en el área (sub-parcela de 50 m x 50 m) fue tomado como un estimador de la frecuencia de uso del área por el tapir.

## Discusión

En las tres parcelas en que hallamos heces de tapir un alto porcentaje de las mismas contenía abundantes ( $> 100$ ) semillas de pindó, lo que sugiere fuertemente que en la Selva Paranaense de Argentina esta palmera provee el componente principal de los ítems de fruta en la dieta del tapir, al menos durante el invierno. Resultados similares fueron obtenidos por Galetti *et al.* (2001) en la Selva Paranaense del sudeste de Brasil. Todas las parcelas utilizadas en nuestro estudio estaban ubicadas en áreas no inundables. Este hecho, en conjunto con las evidencias empíricas presentadas por Fragoso y Huffman (2000), indica que la baja calidad como dispersor atribuida al tapir por su supuesto hábito de defecar en cursos de agua o áreas regularmente inundables (Janzen 1982, Bodmer 1991, Salas y Fuller 1996, Quiroga-Castro y Roldán 2001), está lejos de reflejar un escenario general. Por el contrario, nuestros resultados muestran que en el caso del pindó, el reclutamiento está fuertemente asociado a las letrinas de tapir en tierras no inundables, lo cual también fue observado para la palmera *A. maripa* en la amazonia brasilera (Fragoso 1997). El patrón espacial de defecación produce un agrupamiento de los juveniles reclutados en las letrinas. A pesar de que las semillas (y juveniles) depositadas en grupos densos por los tapires probablemente sean susceptibles a una alta mortalidad denso-dependiente (Augspurger 1984, Augspurger y Kitajima 1992, Bell *et al.* 2006), el enorme número de semillas

que llegan a las áreas de letrinas podrían saturar a los factores de mortalidad dejando un saldo positivo en el reclutamiento de individuos en estadios superiores (Herrera *et al.* 1994, Rey y Alcántara 2000, Russo y Augspurger 2004).

En función de estos resultados concluimos que el tapir es un dispersor efectivo e importante de *S. romanzoffiana*. Nuestros resultados también sugieren su potencial rol como dispersor de otras especies de semillas grandes, como el caso de *H. balansae*, para el que verificamos la presencia de semillas germinadas en las heces. Existen muchos otros frugívoros que también se alimentan de los frutos del pindó (Tabla 3). Muchos de ellos, por ejemplo monos caí (*Cebus* spp.), zarigüeyas (*Didelphis* spp.), corzuelas (*Mazama* spp.), y tapetíos (*Sylvilagus brasiliensis*), usualmente consumen la pulpa y descartan la semilla debajo o cerca de la palmera adulta (Tabla 3). En otros casos, tales como coatíes (*Nasua nasua*), zorros de monte (*Cerdocyon thous*) y algunas aves grandes (e.g., *Penelope* spp., *Rhamphastos* spp.), la semilla puede ser ingerida, por lo que estos vertebrados podrían actuar como dispersores (Tabla 3). No obstante, hasta el momento no existe evidencia empírica sobre la efectividad de estos frugívoros como dispersores de pindó. De cualquier modo, en toda el área estudiada no hallamos ninguna otra evidencia de sitios de alto reclutamiento de pindó, atribuible a la actividad dispersora de animales, que fuesen comparables a las letrinas de tapir. Por consiguiente, podemos concluir que el tapir es el principal dispersor del pindó y, a su vez, el pindó es la especie de semilla grande más dispersada por el tapir en el Parque Nacional Iguazú.

Los tapires son muy sensibles a la presión de caza y al disturbio del hábitat (Bodmer *et al.* 1997, Cullen *et al.* 2000). En la Selva Paranaense de Argentina se ha encontrado que la frecuencia de avistamiento de tapires disminuye con el grado de perturbación del área y con la cercanía a posibles vías de acceso de cazadores (Paviolo *et al.* 2009). Asimismo, nuestros resultados sugieren que el nivel de disturbio del bosque, incluso dentro de áreas relativamente protegidas, puede afectar la frecuencia de uso por los tapires, lo cual podría reflejar la gran sensibilidad de estos vertebrados a cualquier signo de presencia humana. Además nuestros resultados indican una correlación entre la frecuencia de uso del área y la cantidad de juveniles reclutados en las letrinas, lo cual puede explicarse en función de que las letrinas tienden a hacerse más densas al aumentar la recurrencia en el uso. Todas estas observaciones nos conducen a hipotetizar que el nivel de reclutamiento del pindó se verá más limitado al disminuir el grado de protección de las distintas áreas de bosque.

Por otro lado, el nivel de reclutamiento de juveniles de pindó fue mayor en las letrinas de tapir que debajo de los adultos, y es interesante indagar sobre los factores que conducen a este resultado. En el sur de Brasil se ha observado que las ardillas (*Sciurus ingrami*) y las larvas de

coleópteros son probablemente los principales depredadores de semillas de pindó (Galetti *et al.* 1992, Olmos *et al.* 1999, Alves-Costa y Knogge 2005). El mayor reclutamiento de juveniles en las letrinas podría ser el resultado de la evitación de dichos factores de mortalidad, y distintos mecanismos, no excluyentes, podrían estar involucrados. Este efecto de evitación de la depredación podría explicarse por distintos mecanismos no excluyentes: (1) las letrinas podrían ser sitios menos predecibles para depredadores como ardillas o pecaríes (Olmos *et al.* 1999); (2) las semillas dispersadas escaparían del entorno de la palmera adulta donde se supone que la actividad de los coleópteros es mayor (Fragoso *et al.* 2003); (3) la materia fecal podría imponer una barrera física que impida el acceso de las larvas de coleóptero a las semillas (Quiroga-Castro y Roldán 2001, Fragoso *et al.* 2003, Ríos y Pacheco 2006).

Algunos resultados sugieren que las letrinas no serían sitios impredecibles para posibles vertebrados depredadores de semillas. En este sentido, Gallardo *et al.* (2008) mostraron que en el Parque Nacional Iguazú la cantidad de semillas removidas por roedores era mayor cuando éstas habían sido cubiertas con heces. También se ha reportado la remoción de semillas de las heces de tapir por roedores en la región amazónica (Fragoso 1997). Estas observaciones indican que las heces pueden ser fácilmente detectables, constituyendo evidencia en contra de la hipótesis del primer mecanismo. Los otros dos mecanismos propuestos, que involucran el efecto de la depredación por coleópteros, parecen ser más plausibles. Fragoso *et al.* (2003) demostraron experimentalmente un efecto de escape de los coleópteros para semillas de *A. maripa* depositadas lejos de las palmeras adultas respecto a aquellas colocadas en su entorno, y un efecto de protección de las heces sobre semillas colocadas cerca del entorno de adultos. A su vez, Ríos y Pacheco (2006) hallaron evidencias convincentes de que la materia fecal de los tapires obstaculiza el acceso de los coleópteros reduciendo la infestación de semillas de *Attalea phalerata* en el norte de Bolivia. Sin embargo, a diferencia de *A. phalerata* (Ríos y Pacheco 2006) y *A. maripa* (Silvius y Fragoso 2002), las semillas de *S. romanzoffiana* son frecuentemente infestadas por larvas del coleóptero *Revena rubiginosa* (Curculionidae) en la fase predispersiva, es decir mientras aún están en el árbol madre (Guix y Ruiz 1995, Olmos *et al.* 1999, Alves-Costa 2004, Alves-Costa y Knogge 2005). Esto significa que muchas semillas de pindó ya se encuentran infestadas al momento de ser ingeridas por los tapires. No obstante, las semillas no infestadas podrían beneficiarse por la dispersión al evitar el efecto de una segunda ronda de infestación debajo del árbol parental por otros coleópteros (Bruchidae) que también pueden atacar la semilla (Martins 2010, Ranzani de Luca 2010). Cualquiera sea el mecanismo asociado a la dispersión por tapir, el resultado final es un saldo positivo en el reclutamiento de juveniles en las letrinas.

Los frutos de numerosas palmeras son consumidos por los tapires amazónicos en diferentes regiones de Sudamérica (Tabla 4). Comúnmente los tapires defecan las semillas ingeridas, o más raramente pueden escupirlas como en el caso de *Mauritia flexuosa* (Tabla 4). La información recabada de distintos estudios muestra que la cantidad de drupas de palmera ingeridas varía ampliamente entre especies. Además, de un total de 25 palmeras cuyos frutos han sido registrados en la dieta de *Tapirus terrestris*, sólo se ha confirmado fehacientemente la viabilidad de las semillas dispersadas para ocho especies, y en sólo tres casos se han reportado plántulas o juveniles en las heces (Tabla 4). Estos datos indican que las palmeras son componentes frecuentes en la dieta del tapir, aunque la efectividad en la dispersión, en términos de cantidad y calidad, puede diferir considerablemente para las distintas especies. También cabe señalar que los registros de semillas rotas por masticación son minoritarios frente a los de semillas intactas, lo que sugiere que el número de palmeras dispersadas efectivamente por el tapir es mayor.

El caso particular del palmito merece ser analizado en este contexto, y a la luz de los resultados que obtuvimos. Las semillas de esta especie han sido encontradas en heces de tapir (Rodrigues *et al.* 1993, Galetti *et al.* 2001, Bachand *et al.* 2009, Bueno *et al.* 2013, y el presente estudio) y, en efecto, la viabilidad de un 45% de las semillas pudo ser inferida a partir de experimentos de germinación inducida artificialmente (Rodrigues *et al.* 1993). No obstante, la importancia del tapir para la dispersión del palmito es dudosa. En nuestro caso, y al igual que Galetti *et al.* (2001), hallamos una cantidad de semillas de palmito notablemente menor respecto a la de pindó, y no observamos indicios de germinación en las letrinas. Llamativamente, este patrón fue observado incluso en la Parcela 2, donde el palmito es la especie ampliamente dominante. De hecho, debido a la alta densidad de palmito en esta área, en algunos casos era difícil determinar si la presencia de semillas de palmito en las heces se debía realmente a la endozoocoria, o si habían caído posteriormente desde los adultos circundantes. En principio, la marcada escasez de palmito en las heces podría deberse a un cambio dietario en sintonía con los estados fenológicos de fructificación correspondientes. Sin embargo esta explicación es muy improbable, ya que la predominancia de pindó fue invariante en heces recientes y viejas, y ambas especies de palmera presentaban frutos maduros durante el período de estudio y habían estado fructificando desde varios meses antes. En cambio, nuestros resultados sugieren que *E. edulis* no es un componente tan importante en la dieta del tapir, al menos en la Selva Paranaense argentina. Además, al igual que Bachand *et al.* (2009), observamos que muchas de las semillas de palmito presentes en las heces estaban severamente dañadas, probablemente como consecuencia de la masticación, lo cual afectaría negativamente la efectividad de la dispersión.

Como ya hemos mencionado, los tapires han sido conducidos a la extinción local en gran parte de su rango de distribución histórico (Brooks *et al.* 1997). Éste es el caso de las zonas aledañas al Parque Nacional Iguazú (Giraudó y Povedano 2003). En la actualidad el tapir ha sido catalogado como "vulnerable" según la *Lista Roja de Especies Amenazadas* (IUCN 2013). Probablemente ningún otro frugívoro remanente sea capaz de compensar la extinción del tapir respecto a su rol esencial en la dispersión de semillas grandes en el neotrópico. En la Selva Paranaense los frutos del pindó son consumidos por una gran variedad de mamíferos y aves, especialmente durante el invierno cuando esta especie es de las pocas que ofrecen frutos maduros (Alves-Costa 2004, Keuroghlian y Eaton 2008, 2009; Tabla 3). En consecuencia, la disrupción del mutualismo entre el tapir y el pindó podría afectar globalmente a la comunidad de vertebrados en el largo término.

### **Conclusiones**

La alta predominancia de pindó en las heces indica que esta especie provee un componente esencial entre los frutos consumidos por el tapir en la Selva Paranaense. Las áreas de letrinas son sitios con altos niveles de reclutamiento de juveniles. Además, la mayor frecuencia de uso de un área por parte de los tapires, promueve una mayor cantidad de juveniles reclutados. Estos resultados demuestran que la dispersión es efectiva y que la regeneración del pindó está asociada a la actividad dispersora del tapir. Por ende, el pindó y el tapir presentan una fuerte interacción planta-dispersor.

Dado que el tapir es una especie ausente en áreas perturbadas y que el pindó depende en gran medida de su actividad para la dispersión, siendo además una especie clave para la comunidad de frugívoros, esta palmera resulta ser el modelo biológico más relevante para nuestro estudio.



**Tabla 3.** Especies de vertebrados que consumen los frutos (o semillas) de *S. romanzoffiana*.

Grupo		Especie	Familia	Tipo de manipulación <sup>a</sup>	Referencias	
Mamíferos	Carnívoros	<i>Cerdocyon thous</i>	Canidae	R	[3], [4], [8], [18], [24], [25], [26]	
		<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Canidae	R	[20]	
		<i>Eira barbara</i>	Mustelidae	C / ¿R?	[3]	
		<i>Nasua nasua</i>	Procyonidae	C / R	[1], [2], [3], [8], [15], [18], [27]	
			<i>Procyon cancrivorus</i>	Procyonidae	C / R	[18], [29]
	Edentados	<i>Dasypus novencinctus</i>	Dasypodidae	C	[1]	
	Lagomorfos	<i>Sylvilagus brasiliensis</i>	Leporidae	C	[1], [33]	
	Marsupiales		<i>Didelphis albiventris</i>	Didelphidae	C / ¿R?	[6], [18], [27]
			<i>Didelphis aurita</i>	Didelphidae	C / ¿R?	[3], [4], [7], [8]
			<i>Didelphis</i> sp.	Didelphidae	C	[33]
Primates		<i>Alouatta guariba</i> ( <i>A. fusca</i> )	Atelidae	C / R	[1], [10]	
		<i>Cebus apella</i>	Cebidae	C	[1], [10], [12], [18]	
		<i>Cebus nigritus</i>	Cebidae	C	[3]	
		<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	Cebidae	C	[1], [16], [18]	
Quirópteros	<i>Artibeus lituratus</i>	Phyllostomidae	C / ¿R?	[2]		
Roedores		<i>Cuniculus paca</i> ( <i>Agouti paca</i> )	Cuniculidae	C / D / ¿R?	[1], [18]	
		<i>Dasyprocta azarae</i>	Dasyproctidae	C / D / R	[1], [4], [8], [27], [33]	
		<i>Euryoryzomys russatus</i>	Cricetidae	C / ¿R?	[3], [8]	
		¿?	Cricetidae	C / ¿D?	[4]	
		<i>Sciurus ingrami</i> ( <i>S. aestuans</i> )	Sciuridae	D / R	[1], [5], [10], [18], [21], [23], [33]	
Ungulados		<i>Mazama</i> sp.	Cervidae	C	[33]	
		<i>Pecari tajacu</i> ( <i>Tayassu tajacu</i> )	Tayassuidae	C / R / ¿D?	[1], [17], [18], [21]	
		<i>Tapirus terrestris</i>	Tapiridae	R <sup>b</sup>	[1], [11], [18], [21], [28], [31], [32], [33]	
		<i>Tayassu pecari</i>	Tayassuidae	C / R	[1], [17], [18]	

Tabla 3. Continuación

Aves	<i>Brotogeris chiriri</i>	Psittacidae	C	[22]
	<i>Brotogeris tirica</i>	Psittacidae	C / R	[30]
	<i>Coereba flaveola</i>	Coerebidae	C	[4], [8]
	<i>Cyanocorax caeruleus</i>	Corvidae	R	[3], [4], [8]
	<i>Cyanocorax chrysops</i>	Corvidae	R	[33]
	<i>Euphonia violacea</i>	Thraupidae	C	[8]
	<i>Ortalis guttata</i>	Cracidae	R	[3], [4], [8]
	<i>Parula pitiayumi</i>	Parulidae	C	[4], [8]
	<i>Penelope obscura</i>	Cracidae	R	[14], [27]
	<i>Penelope superciliaris</i>	Cracidae	R	[1], [14]
	<i>Pionus maximiliani</i>	Psittacidae	C	[4]
	<i>Ramphastos dicolorus</i>	Ramphastidae	R	[4], [8], [13]
	<i>Ramphastus vitellinus</i>	Ramphastidae	R	[3], [8]
	<i>Ramphocelus bresilius</i>	Thraupidae	C	[8]
<i>Turdus rufiventris</i>	Turdidae	C	[13]	
Peces	<i>Pterodoras granulosus</i>	Doradidae	R	[9]
Reptiles	<i>Tupinambis merianae</i> ( <i>T. teguixin</i> )	Teiidae	R	[19]

<sup>a</sup> Categorías: C: consumo de la pulpa *in situ*, D: depredación de la semilla, R: remoción de la semilla (implica el alejamiento de la semilla que puede o no ser ingerida, y no necesariamente conduce a la dispersión efectiva). Algunas especies realizan más de un tipo de manipulación. Los signos de interrogación indican incerteza en el taxón o tipo de manipulación. <sup>b</sup> dispersión efectiva confirmada.

Referencias: [1]: Alves-Costa 2004, [2]: Alves-Costa 2007, [3]: Klier 2009, [4]: Beghini 2008, [5]: Bordignon *et al.* 1996, [6]: Cáceres 2002, [7]: Cáceres *et al.* 2009, [8]: da Silva *et al.* 2011, [9]: de Souza-Steveaux *et al.* 1994, [10]: Galetti *et al.* 1992, [11]: Galetti *et al.* 2001, [12]: Galetti y Pedroni 1994, [13]: Guix y Ruiz 1995, [14]: Guix y Ruiz 1997, [15]: Hirsch 2009, [16]: Keuroghlian 1990, [17]: Keuroghlian y Eaton 2008, [18]: Keuroghlian y Eaton 2009, [19]: Mercolli y Yanosky 1994, [20]: Motta-Junior y Martins 2002, [21]: Olmos *et al.* 1999, [22]: Paranhos *et al.* 2007, [23]: Paschoal y Galetti 1995, [24]: Pedó *et al.* 2006, [25]: Rocha *et al.* 2008, [26]: Rodríguez-Mazzini y Molina Espinosa 2000, [27]: Roman *et al.* 2010, [28]: Santos *et al.* 2005, [29]: Santos y Hartz 1999, [30]: Sazima 2008, [31]: Talamoni y Assis 2009, [32]: Tófoli 2006, [33]: observación personal.

**Tabla 4.** Diversidad de palmeras (Arecaceae) cuyos frutos son consumidos por el tapir amazónico en diferentes regiones de Sudamérica. Para algunas especies se indica entre paréntesis el nombre científico que fue usado en algunas de las referencias citadas. En la tercera columna se indica si la viabilidad de la semilla fue confirmada mediante germinación en condiciones de laboratorio (in vitro) u observación de plántulas en las heces (in vivo).

Especie	Áreas de estudio	¿Germinación verificada?	Referencias
<i>Acrocomia aculeata</i>	Selva Paranaense ▪ S de Brasil	No	Tófoli 2006
	Pantanal ▪ SO de Brasil	No	Zorzi 2009
<i>Allagoptera leucocalyx</i>	Pantanal ▪ SO de Brasil	No	Zorzi 2009
<i>Astrocaryum aculeatum</i>	Selva Amazónica ▪ NO de Brasil	Sí (in vitro)	Barcelos <i>et al.</i> 2013
<i>Astrocaryum jauari</i>	Selva Amazónica ▪ NO de Brasil	Sí (in vitro)	Barcelos <i>et al.</i> 2013
<i>Astrocaryum murumuru</i>	Selva Amazónica ▪ SE de Perú	No	Tobler <i>et al.</i> 2010
<i>Astrocaryum paramaca</i>	Selva Amazónica ▪ Guayana Francesa	No	Hibert <i>et al.</i> 2011
<i>Astrocaryum</i> sp.	Selva Amazónica ▪ NO de Brasil	No	Fragoso y Huffman 2000
	▪ Guayana Francesa	No	Henry <i>et al.</i> 2000
	▪ Guayana Francesa	No	Hibert <i>et al.</i> 2011
<i>Attalea attaleoides</i>	Selva Amazónica ▪ Guayana Francesa	No	Hibert <i>et al.</i> 2011
<i>Attalea maripa</i> ( <i>Maximiliana maripa</i> )	Selva Amazónica ▪ NO de Brasil	Sí (in vivo)	Fragoso 1997
	▪ NO de Brasil	No	Fragoso y Huffman 2000
<i>Attalea phalerata</i>	Sabana y humedales del Beni ▪ N de Bolivia	Sí (in vitro)	Quiroga-Castro y Roldán 2001
	Pantanal ▪ SO de Brasil	No	Donatti <i>et al.</i> 2007
	▪ SO de Brasil	No	Zorzi 2009
<i>Attalea</i> sp. ( <i>Scheelea</i> sp.)	Selva Amazónica ▪ NE de Perú	No	Bodmer 1990
	▪ NE de Perú	No	Bodmer 1991
	▪ NE de Perú	No	Montenegro 2004
<i>Bactris cf. hirta</i>	Selva Amazónica ▪ SE de Perú	No	Tobler <i>et al.</i> 2010
<i>Barcella odora</i>	Selva Amazónica ▪ NO de Brasil	No	Barcelos <i>et al.</i> 2013

Tabla 4. Continuación

<i>Butia capitata</i>	Selva Atlántica Costera ▪ S de Brasil	No	Santos <i>et al.</i> 2005
<i>Copernicia alba</i>	Pantanal ▪ SO de Brasil	No	Zorzi 2009
<i>Elaeis guineensis</i>	Selva Atlántica Costera NE de Brasil	Sí (in vivo)	Bachand <i>et al.</i> 2009
<i>Euterpe edulis</i>	Selva Paranaense ▪ SE de Brasil	Sí (in vitro)	Rodrigues <i>et al.</i> 1993
	▪ SE de Brasil	No	Galetti <i>et al.</i> 2001
	▪ NE de Argentina	No	el presente estudio
<i>Euterpe oleracea</i>	Selva Atlántica Costera ▪ NE de Brasil	No	Bachand <i>et al.</i> 2009
	▪ SE de Brasil	No	Bueno <i>et al.</i> 2013
	Selva Amazónica ▪ Guayana Francesa	No	Hibert <i>et al.</i> 2011
<i>Mauritia flexuosa</i> <sup>a</sup>	Selva Atlántica Costera ▪ NE de Brasil	No	Bachand <i>et al.</i> 2009
	Selva Amazónica ▪ NE de Perú	No	Bodmer 1990
	▪ NE de Perú	No	Bodmer 1991
	▪ NO de Brasil	No	Fragoso y Huffman 2000
	▪ Guayana Francesa	No	Henry <i>et al.</i> 2000
	▪ NE de Perú	No	Montenegro 2004
	▪ SE de Perú	No	Tobler <i>et al.</i> 2010
▪ NO de Brasil	No	Barcelos <i>et al.</i> 2013	
<i>Mauritiella aculeata</i>	Selva Amazónica ▪ NO de Brasil	Sí (in vitro)	Barcelos <i>et al.</i> 2013
<i>Oenocarpus bacaba</i>	Selva Amazónica ▪ S de Venezuela	No	Salas y Fuller 1996
	▪ NO de Brasil	No	Fragoso y Huffman 2000
<i>Oenocarpus bataua</i> ( <i>Jessenia bataua</i> )	Selva Amazónica ▪ NE de Perú	No	Bodmer 1990 <sup>b</sup>
	▪ NE de Perú	No	Bodmer 1991
	▪ S de Venezuela	No	Salas y Fuller 1996
	▪ Guayana Francesa	No	Henry <i>et al.</i> 2000
	▪ NE de Perú	No	Montenegro 2004
	▪ NO de Brasil	No	Morais 2006
	▪ SE de Perú	No	Tobler <i>et al.</i> 2010
▪ Guayana Francesa	No	Hibert <i>et al.</i> 2011	

**Tabla 4.** Continuación

<i>Oenocarpus mapora</i>	Selva Amazónica		
	▪ SE de Perú	No	Tobler <i>et al.</i> 2010
<i>Syagrus oleracea</i>	Selva Paranaense		
	▪ SE de Brasil	No	Galetti <i>et al.</i> 2001
	Selva Paranaense		
	▪ SE de Brasil	No	Olmos <i>et al.</i> 1999
	▪ SE de Brasil	No	Galetti <i>et al.</i> 2001
<i>Syagrus romanzoffiana</i>	▪ SE de Brasil	No	Alves-Costa 2004
	▪ S de Brasil	Sí (in vitro)	Tófoli 2006
	▪ SE de Brasil	No	Keuroghlian y Eaton 2009
	▪ NE de Argentina	Sí (in vivo)	el presente estudio
	Selva Atlántica Costera		
	▪ SE de Brasil	No	Santos <i>et al.</i> 2005
	Selva Atlántica - Cerrado		
▪ SE de Brasil	No	Talamoni y Assis 2009	

S: Sur; N: Norte; SE: Sudeste; SO: Sudoeste; NE: Nordeste; NO: Noroeste

<sup>a</sup> Según reportaron todos los autores citados, la mayoría de las semillas son escupidas luego de ser consumida la pulpa.

<sup>b</sup> El autor reportó semillas de *Jessenia* sp. probablemente refiriéndose a *O. bataua*, como fue luego determinado en su trabajo de 1991.

## CAPÍTULO II

TRANSFERENCIA DE MICROSATÉLITES PARA EL PINDÓ: UNA HERRAMIENTA MOLECULAR  
PARA EVALUAR EL FLUJO GÉNICO ASOCIADO A LA DISPERSIÓN DE SEMILLAS**Introducción**

La utilización de marcadores genéticos moleculares, tradicionalmente empleados por los genetistas para estudiar la variabilidad genética en las poblaciones (Lewontin y Hubby 1966), ha provisto de una herramienta sumamente útil para la ecología (Avice 2004, Lowe *et al.* 2004). En muchas ocasiones, el análisis de marcadores moleculares aporta información que es extremadamente difícil, sino imposible, de obtener por métodos de observación directa. Por ejemplo, las técnicas moleculares han permitido detectar la poligamia reproductiva en especies animales aparentemente monógamas (Birkhead *et al.* 1990), o inferir distancias de polinización en plantas con flor muy superiores a las esperadas (Nason y Hamrick 1997, Ahmed *et al.* 2009, Yu *et al.* 2010). El análisis de la variación genética de poblaciones naturales mediante marcadores moleculares permite una integración sólida del conocimiento de los procesos ecológicos, genéticos y evolutivos (Avice 2004).

Las técnicas moleculares brindan una herramienta fundamental para inferir aspectos de la polinización y la dispersión de semillas, y para evaluar sus efectos sobre la variabilidad genética en las plantas (Dow y Ashley 1996, Ouborg *et al.* 1999, Streiff *et al.* 1999, Ashley 2010). Usualmente, el estudio del flujo génico contemporáneo implica la reconstrucción de las relaciones de parentesco entre individuos a partir de sus genotipos, y mediante distintas técnicas estadísticas (Blouin 2003, Jones *et al.* 2010). Dependiendo del interés particular de cada estudio, las inferencias involucran la identificación de uno o ambos parentales de un cierto individuo, y/o el análisis del pedigrí de un conjunto de semillas o plantas reclutadas (Dow y Ashley 1996, Wang 2004, Burczyk *et al.* 2006, Jones *et al.* 2010). Mediante la determinación del parentesco es posible identificar a las semillas dispersadas o plántulas reclutadas que provienen de una cierta planta adulta, determinar distancias de dispersión y/o estimar la proporción de semillas o individuos inmigrantes en un área delimitada. Mientras que los estudios de flujo polínico típicamente requieren identificar el genotipo de los adultos donantes de polen (padres), disponiendo de la información genética de la progenie putativa y de la madre, las inferencias sobre la dispersión de semillas implican la identificación genética de la planta madre sin disponer de información sobre

ninguno de los dos parentales (Smouse y Sork 2004, Ashley 2010). En las especies dioicas, el sistema presenta la ventaja de que los adultos masculinos pueden ser descartados a priori como fuentes de semillas (*e.g.*, Schnabel *et al.* 1998, Hardesty *et al.* 2006), pero en las especies monoicas no existe tal información. En principio, esta dificultad podría sortearse utilizando marcadores moleculares de herencia materna localizados en el genoma mitocondrial o cloroplástico (Hamilton 1999). No obstante los niveles de variabilidad de estos marcadores son casi siempre insuficientes para distinguir individuos y realizar análisis de parentesco en general (Ouborg *et al.* 1999, Petit *et al.* 2005). Otra estrategia notablemente ingeniosa para realizar una inferencia directa y unívoca del genotipo de la planta madre, ha sido la extracción de ADN a partir del tejido materno (pericarpo del fruto) que queda adherido a la semilla dispersada (Godoy y Jordano 2001, Ziegenhagen *et al.* 2003, Grivet *et al.* 2005, Jones *et al.* 2005). Sin embargo, no siempre es posible obtener ADN en cantidad y calidad suficientes para la aplicación de los marcadores moleculares a partir de semillas recolectadas en el campo (*e.g.*, Hanson *et al.* 2007; ver también Scofield *et al.* 2010).

Otro aspecto esencial de las herramientas moleculares es la calidad de los marcadores utilizados. Este aspecto se torna más relevante cuando no contamos con ventajas inherentes al sistema de estudio ni es posible aplicar las estrategias experimentales mencionadas en el párrafo anterior. Por ejemplo, si no es posible utilizar tejido materno de las semillas para inferir los genotipos de las madres, y éstos deben ser inferidos a partir de la progenie, una alta capacidad resolutive de los marcadores, junto a un método estadístico apropiado, puede ayudar a mitigar dicha adversidad. Los marcadores moleculares difieren en el nivel de variabilidad que permiten revelar, en la practicidad de la técnica, y en el requerimiento de un desarrollo específico u optimización para la especie de estudio (Awise 2004). Actualmente la secuenciación del ADN y los microsatélites proveen los métodos más resolutivos dado que pueden detectar gran cantidad de variación genética en las poblaciones. Probablemente debido a la mayor simplicidad en el procesamiento de los datos obtenidos, los microsatélites se han convertido en los marcadores por excelencia para el análisis de parentesco, y para un gran número de estudios de ecología molecular (Ellegren 2004, Jones *et al.* 2010).

Los microsatélites fueron originalmente identificados a principios de la década de 1980 (Miesfeld *et al.* 1981, Hamada *et al.* 1982, Tautz y Renz 1984). Se los denomina también *SSRs* (de *Simple Sequence Repeats*) o *STRs* (de *Short Tandem Repeats*) ya que corresponden a regiones relativamente cortas del genoma que contienen secuencias repetidas en tándem con motivos de repetición de entre 2 y 6 nucleótidos (Ellegren 2004). Los microsatélites son marcadores codominantes ya que permiten distinguir individuos heterocigotas y homocigotas, y además son

abundantes y ubicuos en los genomas de eucariotas (Tautz y Renz 1984, Morgante y Olivieri 1993). Frecuentemente se localizan en regiones no-codificantes, por lo que no suelen estar sometidos a fuertes presiones selectivas que restrinjan las mutaciones durante su evolución. Al poseer secuencias repetitivas y ser evolutivamente neutros, estos marcadores normalmente exhiben una amplia variación del número de repeticiones que da lugar a numerosos alelos de diferentes tamaños en la población (Ellegren 2004). De esta forma, el patrón genético provisto por los microsatélites revela una suerte de huella digital molecular de cada individuo, definida por la combinación particular de alelos en distintos loci que posea el individuo en cuestión. En los últimos años, la técnica experimental de genotipificación de *SSRs* se ha optimizado notablemente mediante el empleo de fluoróforos acoplados químicamente a los oligonucleótidos cebadores y la electroforesis capilar con equipos de secuenciación.

Si bien el uso de microsatélites presenta las ventajas mencionadas, también requiere de información previa o un desarrollo específico en cada especie para realizar la amplificación por PCR. Básicamente, existen dos estrategias para la obtención de microsatélites en las especies de interés. Una es el desarrollo *de novo* de estos marcadores a partir de la construcción de genotecas enriquecidas en secuencias repetitivas que correspondan a posibles microsatélites (Zane *et al.* 2002 y Squirrel *et al.* 2003). La otra alternativa es obtener microsatélites por transferencia o “amplificación cruzada” desde especies emparentadas filogenéticamente (Barbará *et al.* 2007). La transferencia consiste sencillamente en lograr, bajo condiciones adecuadas, la amplificación por PCR del locus en cuestión en la especie de interés, usando los oligonucleótidos diseñados originalmente para la especie emparentada. El procedimiento experimental para el desarrollo *de novo* es sustancialmente más laborioso; no obstante, el éxito en la transferencia suele ser limitado, disminuyendo en la medida en que la distancia evolutiva entre las especies sea mayor. Por último cabe mencionar que en la actualidad algunas empresas biotecnológicas ofrecen el desarrollo *de novo* de microsatélites para la especie de interés a costos no tan elevados (Zane *et al.* 2002) y que probablemente se irán reduciendo en un futuro próximo.

Los resultados expuestos en el Capítulo I nos permitieron identificar a la palmera pindó (y su interacción con el tapir) como un interesante sistema de estudio para evaluar los posibles efectos del disturbio sobre el ciclo de dispersión de semillas y el flujo génico asociado. El pindó es una especie monoica y, hasta el momento, no disponíamos de microsatélites diseñados previamente para poder estudiar aspectos genéticos de la dispersión de semillas. Por otro lado, pese al empleo de numerosos protocolos de extracción, no logramos obtener ADN de suficiente calidad para realizar amplificaciones por PCR a partir del tejido materno de semillas dispersadas. Los protocolos de extracción ensayados incluyeron tres métodos que utilizan el detergente CTAB



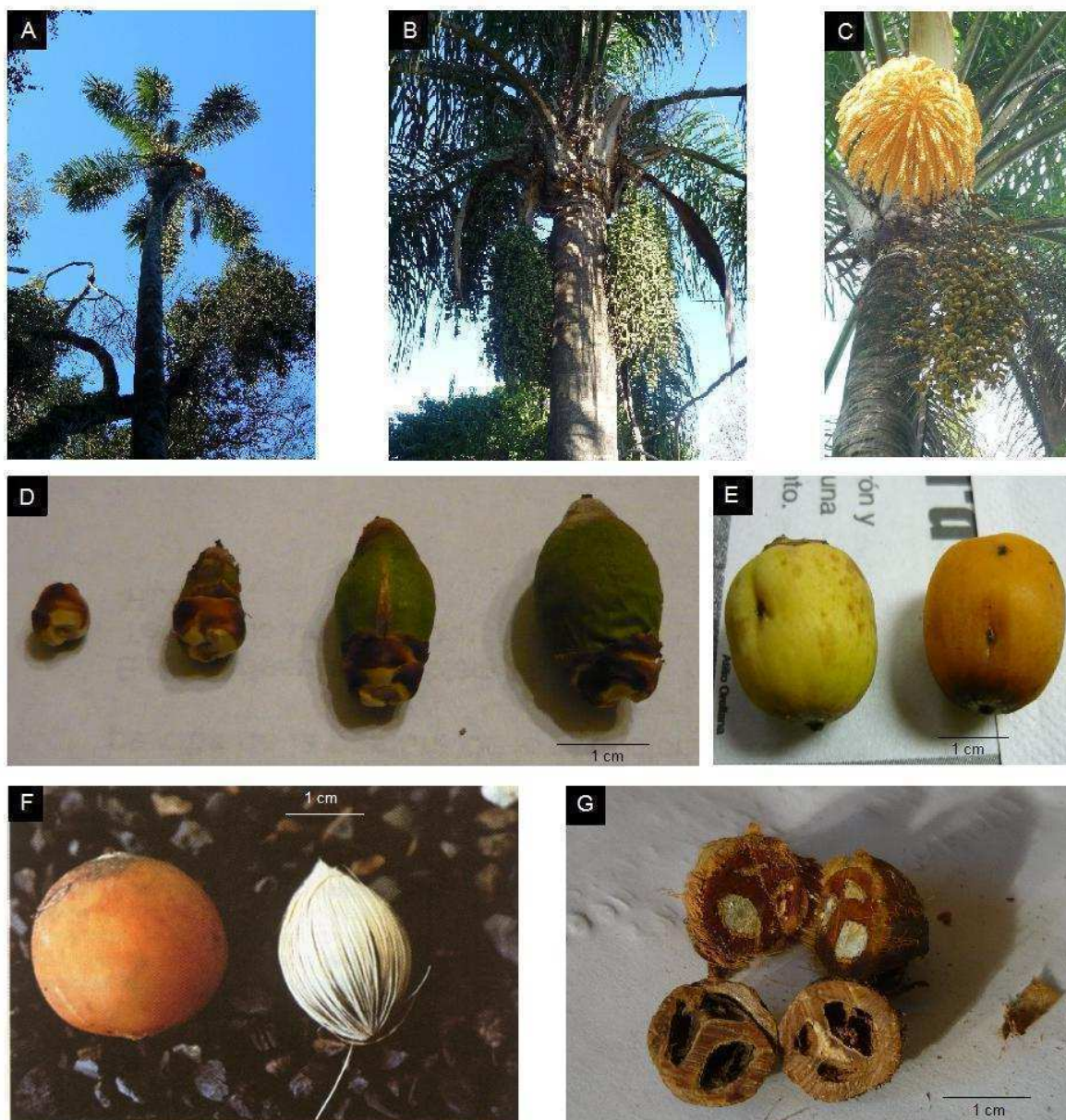
como agente principal de lisis: uno convencional (Doyle y Doyle 1990), uno optimizado específicamente para la extracción a partir del pericarpo de frutos de un cerezo silvestre (Jordano y Godoy 2005) y uno desarrollado para remover potenciales inhibidores como polisacáridos y polifenoles (Porebski *et al.* 1997), y tres kits comerciales: *NucleoSpin 96 Plant II* (Macherey-Nagel, Düren, Alemania), *DNAeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN, Valencia, EE.UU.) *Illustra Nucleon PhytoPure Genomic DNA Extraction Kit* (GE Healthcare, Pasadena, EE.UU.). Además, efectuamos pruebas realizando varias modificaciones de dichos métodos con el objetivo de eliminar posibles inhibidores de la PCR (*e.g.*, uso de polivinilpirrolidona [PVP], proteinasa K, y/o incubación a 100 °C luego de la lisis, etc.), como así también de las condiciones utilizadas para la reacción de amplificación (*e.g.*, uso de distintas cantidades de templado y temperaturas de apareamiento de los oligonucleótidos, ADN-Polimerasa y soluciones reguladoras de distintos proveedores, etc.). Ante la imposibilidad de efectuar una inferencia genética directa de la maternidad de las semillas, requeríamos marcadores de suficiente poder resolutivo para los análisis de parentesco. Por lo tanto, nos propusimos como objetivo específico desarrollar marcadores moleculares polimórficos para el pindó que permitiesen estudiar la diversidad y estructura genética en relación con el flujo génico mediado por la dispersión de semillas.

### **Materiales y Métodos**

**Especie de estudio.** *Syagrus romanzoffiana* (Chamisso) Glassman, localmente conocida como pindó en Argentina, es una palmera ampliamente distribuida en el sudeste de América del Sur y es un componente ubicuo de la Selva Paranaense. Su rango de distribución abarca el centro y sur de Brasil, Paraguay, Bolivia, Uruguay y el nordeste de Argentina (Lorenzi *et al.* 2004). En la Selva Paranaense los ejemplares adultos alcanzan 10 – 25 m de altura y suelen encontrarse en densidades cercanas a 15 – 20 adultos/ha (Galetti *et al.* 1992). Esta palmera es bastante resistente a temperaturas relativamente bajas, y se usa con fines ornamentales en muchas ciudades de clima templado, inclusive fuera de su rango de distribución nativo. Dado que los individuos fructifican más de una vez y en forma asincrónica, la fructificación se extiende a lo largo de la mayor parte del año (Keuroghlian y Eaton 2008). Excepto en cortos períodos, esta planta provee un recurso abundante para la comunidad de frugívoros, y se torna indispensable en las épocas en que la mayoría de las especies no ofrece frutos maduros (Keuroghlian y Eaton 2008). Por estos motivos se ha sugerido que el pindó desempeña un rol fundamental en el ecosistema, y puede considerársela una especie clave (Terborgh 1986, Keuroghlian y Eaton 2008). Durante la época de fructificación, cada palmera adulta puede exhibir simultáneamente entre 1 y 4 infrutescencias con distinto grado de maduración, conteniendo entre 500 y 1000 frutos cada una (Galetti *et al.* 1992;

Figura 9). El fruto del pindó es una drupa ovoide de unos 2 – 3 cm de largo, que presenta un pericarpio carnoso con fibras y pulpa de color anaranjado cuando madura (Figura 9, paneles E y F), de sabor agradable y rica en azúcares. Cada drupa contiene una sola semilla de 1,5 – 2,5 cm de largo. El endocarpo se lignifica durante la maduración (Alves-Costa y Knogge 2005) hasta adquirir un espesor de aproximadamente 3 mm y una dureza notable (Guimarães *et al.* 2005; Figura 9, panel G).

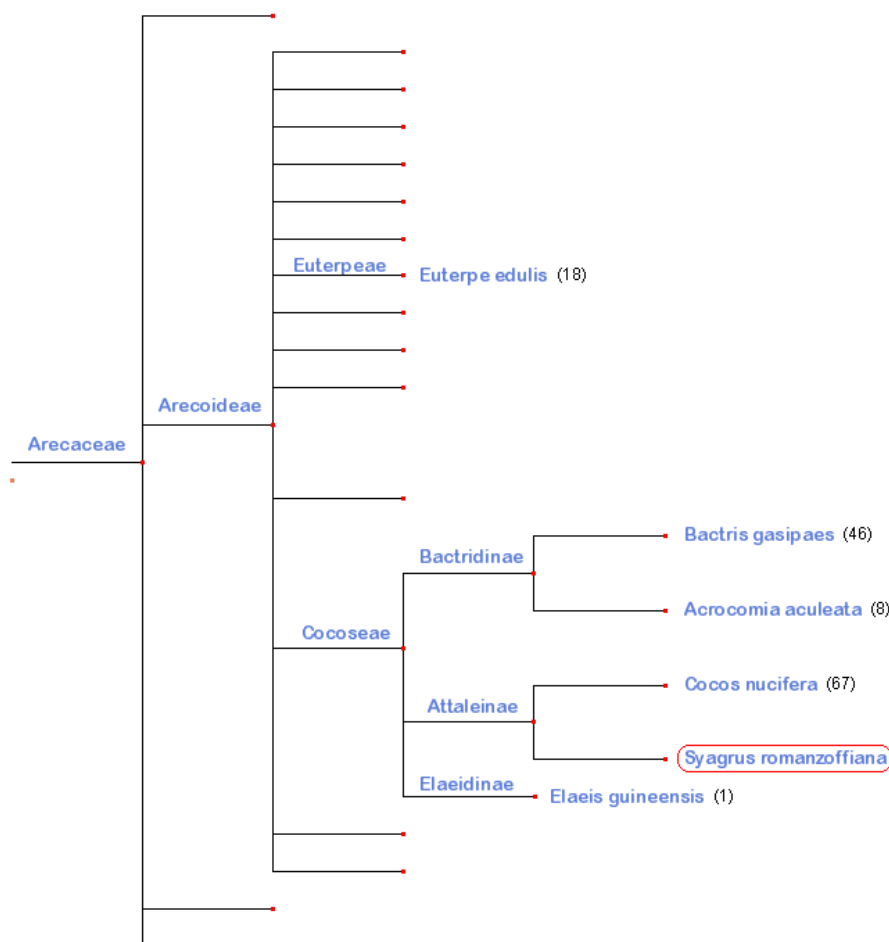
**Figura 9.** Rasgos fisionómicos de ejemplares adultos de *S. romanzoffiana* y de sus frutos.



A-C: ejemplares adultos. A: ejemplar en el Parque Nacional Iguazú. B: ejemplar ornamental (provincia de Buenos Aires) con tres infrutescencias (una menos visible detrás del plano focal) con frutos verdes. C: ejemplar con inflorescencia madura e infrutescencia semi-madura (Parque Nacional Iguazú). D-E: frutos en distinto grado de desarrollo dispuestos en orden temporal de izquierda a derecha, desde el comienzo de su formación (extremo izquierdo, panel D) hasta su maduración (extremo derecho, panel E). F: fruto maduro entero (izquierda) y cuya pulpa ha sido removida (*e.g.*, luego de la dispersión) (derecha). G: corte transversal de endocarpo y semilla (nótese la presencia o ausencia de endosperma en las semillas de arriba o abajo, respectivamente).

**Microsatélites candidatos.** Los SSRs elegidos provinieron de cinco especies de palmera relacionadas filogenéticamente con el pindó a niveles de la subtribu Attaleinae: *Cocos nucifera*, de la tribu Cocoseae: *Acrocomia aculeata*, *Bactris gasipaes*, *Elaeis guineensis*, y de la subfamilia Arecoideae: *Euterpe edulis*, de acuerdo a los estudios filogenéticos de Dransfield *et al.* (2005), Asmussen *et al.* (2006), Baker *et al.* (2009), Meerow *et al.* (2009), y Baker *et al.* (2011) (Figura 10). En particular, se ha identificado recientemente a *Syagrus* como el grupo hermano de *Cocos* (Meerow *et al.* 2009).

**Figura 10.** Esquema de las relaciones filogenéticas entre *S. romanzoffiana* y las especies emparentadas de las que se tomaron los SSRs candidatos para ser transferidos.



**Nota:** en la filogenia se omiten las ramas de los taxa inferiores al nivel de subfamilia o tribu, excepto para aquellos que incluyen a las especies de interés. A continuación del nombre de cada especie se indica entre paréntesis el número de SSRs candidatos probados en los ensayos de transferencia.

En total, se probaron 140 pares de oligonucleótidos: 67 provenientes de *C. nucifera* (ocho de Perera *et al.* 1999, 38 de Rivera *et al.* 1999, 20 pares adicionales provistos por R. L. Rivera mediante comunicación personal, y uno de Mauro-Herrera *et al.* 2006); 46 provenientes de *B. gasipaes* (18 de Martínez *et al.* 2002, 18 de Billotte *et al.* 2004, y diez de Rodrigues *et al.* 2004); ocho provenientes de *A. aculeata* (Nucci *et al.* 2008); uno proveniente de *E. guineensis*, para el

cual se había encontrado que amplificaba una región repetitiva en otra especie de *Syagrus* (Billotte *et al.* 2001); y 18 provenientes de *E. edulis* (Gaiotto *et al.* 2001).

**Ensayos de transferencia.** En primer lugar efectuamos ensayos de amplificación cruzada en muestras de ADN genómico de tres individuos diferentes de *S. romanzoffiana* utilizando cada par de oligonucleótidos sin marca fluorescente. Cada reacción de PCR fue realizada en un volumen final de 12  $\mu$ l conteniendo: 0,5 U de ADN-Polimerasa *GoTaq* y la correspondiente solución reguladora (*buffer*) en concentración 1X (Promega, Madison, EE.UU.), 0,2  $\mu$ M de cada oligonucleótido, dNTPs 0,2 mM, y 10-70 ng de ADN genómico extraído mediante el método con CTAB (Doyle y Doyle 1990) y utilizando 2% de PVP en la solución de lisis, a partir de hojas previamente mantenidas en sílica. Para la amplificación del marcador CNZ26, utilizamos una variante de la mezcla de reactivos que contenía ADN-Polimerasa *Taq-Platinum* y su correspondiente solución reguladora (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) con  $MgCl_2$  1,5 mM.

Los programas de ciclado utilizados consistieron en 5 minutos de desnaturalización inicial a 94 °C, 40 ciclos de: 1 minuto a 94 °C (desnaturalización), 1 minuto a 50 °C (apareamiento de los oligonucleótidos) y 40 segundos a 72 °C (elongación), y un paso final para la elongación de fragmentos incompletos de 5 minutos a 72 °C. Utilizamos una temperatura de apareamiento ( $t_a$  = 50 °C) casi siempre menor a aquella empleada para la amplificación de los marcadores en las especies originales. De esta manera se favoreció el apareamiento de los oligonucleótidos provenientes de las distintas especies que presumiblemente presentaban algún grado de divergencia de secuencia con el pindó.

Los fragmentos amplificados fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa 2% y revelados en un transiluminador Typhoon Trio Imager (Amersham Biosciences, Piscataway, EE.UU.). Para aquellos marcadores que mostraron amplificación positiva, adquirimos los correspondientes oligonucleótidos con un fluoróforo acoplado en el extremo 5', y optimizamos la amplificación, cuando fue necesario, ajustando las temperaturas de apareamiento (Tabla 5).

**Secuenciación y control de homología.** Obtuvimos la secuencia de cada uno de los fragmentos amplificados para determinar si se trataba de una región repetitiva (microsatélite). Para aquellos marcadores cuya secuencia estaba disponible en bases de datos de acceso público, verificamos si el producto de amplificación cruzada realmente correspondía al locus homólogo en pindó. Las secuencias fueron obtenidas luego de clonar los fragmentos amplificados por PCR utilizando el sistema de *pGEM-T easy vector* (Promega, Madison, EE.UU.). Los plásmidos que contenían fragmentos insertados fueron sometidos a secuenciación en ambos sentidos usando oligonucleótidos de las regiones flanqueantes al sitio de clonado (*promotor T7* y *SP6*). El equipo de secuenciación utilizado fue un *ABI XL 3130* (Applied Biosystems, Vienna, Austria).

Realizamos el alineamiento con el algoritmo de ClustalW y la comparación de las secuencias usando el programa MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011). Las secuencias de los marcadores transferidos a pindó fueron depositadas en GenBank con códigos de acceso: JQ087377 - JQ087388, JQ890315 - JQ890322 y JX075189 - JX075198.

**Caracterización de los SSRs.** Evaluamos la variabilidad de cada SSR transferido mediante la genotipificación de 31 – 34 individuos muestreados al azar en el Parque Nacional Iguazú y en fragmentos boscosos fuera del Parque (ver Figura 18, Capítulo IV). Los genotipos fueron determinados usando un secuenciador *ABI XL 3130* y el programa GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems, Vienna, Austria) con el patrón estándar de tamaños GeneScan 500(-250)ROX.

Usando el programa Cervus 3.0.3 (Kalinowski *et al.* 2007) estimamos la riqueza alélica (*i.e.*, el número de alelos diferentes presentes en la muestra), el rango de tamaños alélicos, la heterocigosidad esperada (*i.e.*, la probabilidad de que dos alelos tomados al azar sean diferentes), la heterocigosidad observada (*i.e.*, la proporción observada de individuos heterocigotas), la probabilidad de identidad genotípica (*i.e.*, la probabilidad de que dos individuos tomados al azar tengan genotipos idénticos) y la probabilidad de exclusión del primer parental (*i.e.*, la potencia para descartar la relación parental-hijo entre un par de individuos no relacionados tomados al azar sin conocer el genotipo de uno de los parentales). Además evaluamos la deficiencia de heterocigotas respecto a las proporciones esperadas bajo equilibrio de Hardy-Weinberg mediante el test exacto (Rousset y Raymond 1995) implementado en Genepop 4.1 (Rousset 2008). También evaluamos el desequilibrio de ligamiento entre todos los pares de marcadores utilizando el método y parámetros por defecto implementados en Genepop 4.1. Las significancias de las pruebas múltiples de ajuste a Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento fueron posteriormente corregidas por el procedimiento secuencial de Bonferroni (Holm 1979, Rice 1989) y re-evaluadas a un nivel global de significancia de  $\alpha = 0,05$ . Para realizar dicha corrección utilizamos el programa SGoF+ (Carvajal-Rodríguez y de Uña-Álvarez 2011). La presencia potencial de alelos nulos (Dakin y Avise 2004) en algunos marcadores fue inferida a partir de un exceso significativo de homocigotas y/o fallas repetidas de amplificación en varios individuos (*i.e.*, homocigotas putativos para el alelo nulo). En tales casos, la frecuencia del alelo nulo fue estimada mediante el estimador de Brookfield en el que se asume que la ausencia de amplificación corresponde a un homocigota para el alelo nulo (Brookfield 1996). Esta estimación fue realizada con el programa MICRO-CHECKER (Van Oosterhout *et al.* 2004).

## Resultados

Veinticinco pares de oligonucleótidos de los *SSRs* candidatos produjeron amplificación cruzada en pindó. Exceptuando Bg46 (Martínez *et al.* 2002), cuya amplificación cruzada produjo un fragmento sin región repetitiva ni homología con la secuencia original, todas las secuencias analizadas presentaron una alta identidad nucleotídica (86 – 100%) con aquellas de las especies originales (Figura 11), incluyendo las de los *SSRs* transferidos de la especie menos emparentada (*E. edulis*). Estos resultados indicaron que los productos de la amplificación cruzada eran homólogos a los loci originales. Además, sugirieron fuertemente la homología de los *SSRs* transferidos del género hermano *Cocos*, para los cuales sólo pudimos verificar la coincidencia del motivo de repetición dado que la secuencia completa no ha sido publicada.

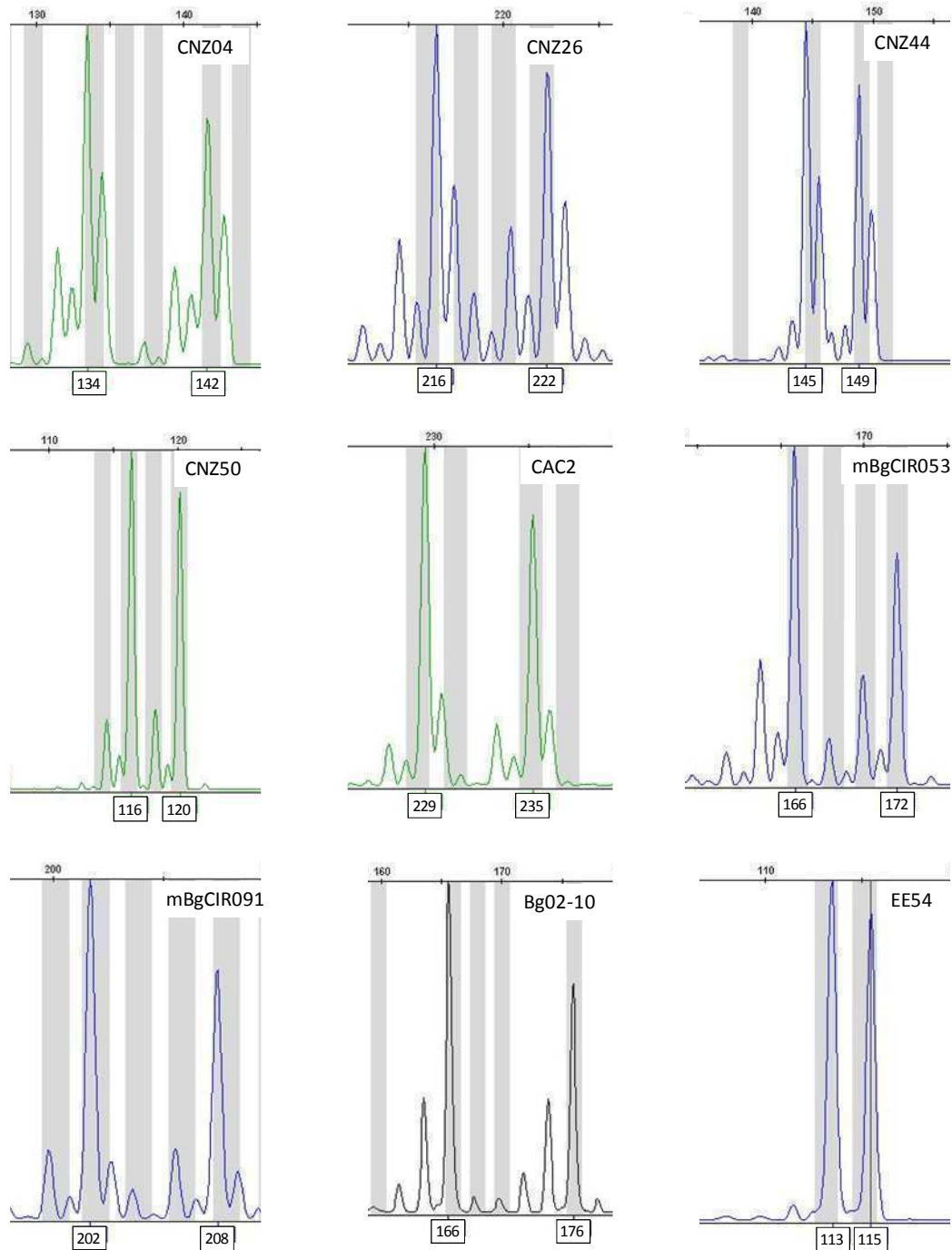
Luego de analizar la secuencia nucleotídica de los marcadores EE15, EE32 y EE45 (Gaiotto *et al.* 2001) en dos individuos diferentes, no proseguimos con la evaluación de la variabilidad ya que EE15 y EE32 no presentaban variación en el largo del fragmento, y la amplificación cruzada de EE45 produjo un fragmento corto de 60 pb que no incluía la región repetitiva (Figura 11). Por otro lado, mEgCIR0230 (Billotte *et al.* 2001) mostró variación en el número de repeticiones (dinucleótidos) para dos alelos secuenciados, pero la amplificación con oligonucleótidos fluorescentes produjo perfiles complejos de picos múltiples, resultando en un marcador no confiable para la determinación de los tamaños alélicos.

Finalmente, logramos amplificar y determinar el tamaño de los alelos de 19 *SSRs* polimórficos (Tabla 5) y uno monomórfico (Bg02-04, Rodrigues *et al.* 2004). Estos 20 *SSRs* produjeron perfiles de fluorescencia bien definidos y repetibles, según mostraron los electroferogramas. En la Figura 12 se muestran los perfiles para nueve *SSRs* a modo de ejemplo. En los loci polimórficos el número de alelos y la heterocigosidad esperada variaron entre dos y nueve, y entre 0,03 – 0,74, respectivamente (Tabla 6). Con estos 19 *SSRs* las probabilidades de exclusión parental e identidad genotípica fueron de  $P_{EX} = 0,91$  y  $P_{ID} = 4,6 \times 10^{-9}$ . Ninguno de los pares posibles de estos marcadores presentó desequilibrio de ligamiento luego de la corrección para pruebas múltiples. La potencial ocurrencia de alelos nulos fue detectada en CNZ03 y CNZ10 (Tabla 6) por una deficiencia significativa de heterocigotas ( $p < 0,05$ , luego del ajuste por el método de Bonferroni) y amplificación nula reiterada en 12 y ocho individuos, respectivamente. Asimismo, la falla repetida de amplificación de EE41 en ocho individuos también sugirió la ocurrencia de alelos nulos en este locus (Tabla 6).







**Figura 12.** Ilustración de los electroferogramas de nueve SSRs transferidos a *S. romanzoffiana*

Nota: cada panel corresponde a un SSR distinto cuya identificación se indica en la región superior derecha. El tamaño exacto de cada alelo se indica debajo del pico de fluorescencia correspondiente (en todos los casos la muestra proviene de individuos heterocigotas). Fluoróforos: FAM en trazo azul, HEX en trazo verde, NED en trazo negro.

**Tabla 5.** Referencias de los 19 SSRs polimórficos transferidos a *S. romanzoffiana* desde distintas especies emparentadas

Especie	Locus	Acceso GenBank	T <sub>a</sub>	Oligonucleótidos (5'-3')	Fluoróforo	Referencia bibliográfica
<i>Cocos nucifera</i>						
	CNZ03	JX075189	50	F: CATCTTTCATCATTAGCTCT R: AAACCAAAGCAAGGAGAAGT	FAM	Rivera <i>et al.</i> 1999 <sup>a</sup>
	CNZ04	JX075190	50	F: TATATGGGATGCTTAGTGGA R: CAAATCGACAGACATCCTAAA	HEX	—.
	CNZ10	JX075191	50	F: CCTATTGCACCTAAGCAATTA R: AATGATTTTCGAAGAGAGGTC	FAM	—.
	CNZ13	JX075192	50	F: TATGCTATTCACCTATTTTCG R: ACTCTGTTTCACGATCAAAAA	FAM	—.
	CNZ23	JX075193	50	F: ATCAAAACATGACACCGTAAC R: CTGATAGATGACAAGGTGTGG	HEX	—.
	CNZ26	JX075194	48	F: CTAGGCTCCCCATGTGTTTTT R: CACTGCTGTTGTACACCTCCA	FAM	—.
	CNZ44	JX075195	50	F: CATCAGTTCCACTCTCATTTC R: CAACAAAAGACATAGGTGGTC	FAM	—.
	CNZ50	JX075196	50	F: TCGACTAAGTGTTGTCCATTTC R: ATCCATCCAGGATCCCAATAT	HEX	<sup>a</sup>
	CNZ51	JX075197	50	F: CTTTAGGGAAAAAGGACTGAG R: ATCCATGAGCTGAGCTTGAAC	FAM	<sup>a</sup>
	CNZ57	JX075198	50	F: AGTGACAGCTCAAAGCAGTAT R: GTGGAGTACACAACCTATGGA	FAM	<sup>a</sup>
	CAC2	JQ890315	50	F: AGCTTTTTTCATTGCTGGAAT R: CCCCTCAATACATTTTTTC	HEX	Perera <i>et al.</i> 1999
<i>Bactris gasipaes</i>						
	mBgCIR053	JQ890316	50	F: GTTCAGTTAAGACCACCTATCA R: ACGAAGAAATCGAACCATAC	FAM	Billotte <i>et al.</i> 2004
	mBgCIR058	JQ890317	46	F: TTTGATACCCAGAGAGA R: AGCGAGAAACACGAATAC	FAM	—.
	mBgCIR066	JQ890318	50	F: GCATGTGCTTACTGACTA R: GAATCCTGGTTTCTAGATACT	HEX	—.
	mBgCIR091	JQ890319	50	F: CAAGAACAGGCTCAGTCTA R: TGCAATCAACCAAGAT	FAM	—.
	Bg02-09	JQ890321	48	F: CGCAGCAGCAGCAATAAATA R: TCCAGCAACTTTCAGTCGAG	NED	Rodrigues <i>et al.</i> 2004
	Bg02-10	JQ890322	48	F: GATTGGGTCCAGATCCTCTTT R: GTGGCACACATGGGGTTC	NED	—.
<i>Euterpe edulis</i>						
	EE41	JQ087381 <sup>b</sup>	50	F: CCTTGCAGTTTATGGCTACG R: CCATTGAGAGGGAATGAGGT	HEX	Gaiotto <i>et al.</i> 2001
	EE54	JQ087385 <sup>b</sup>	48	F: CATGTATCTAAGGAACAAGG R: CTGTGCTCTCATTCTCA	FAM	—.

T<sub>a</sub>: temperatura de apareamiento en °C. <sup>a</sup> Las secuencias de los oligonucleótidos fueron obtenidas por solicitud al autor correspondiente; <sup>b</sup> Otro alelo secuenciado fue depositado en GenBank con un código de acceso consecutivo; —.: referencia igual a la de la fila precedente.

**Tabla 6.** Características de variabilidad genética de 19 *SSRs* polimórficos transferidos a *S. romanzoffiana* evaluada en una muestra de 31 – 34 individuos colectados en el norte de la provincia de Misiones, Argentina.

Locus (n)	Rango de tamaños (pb)	A	$H_e$	$H_o$	H-W valor p	Frecuencia del alelo nulo	$P_{ID}$	$P_{EX}$
CNZ03 <sup>a</sup> (34)	132 - 140	2	0,41	0,09	0,001	0,643	0,44	0,08
CNZ04 (34)	128 - 158	9	0,74	0,71	0,018 <sup>b</sup>	0,011	0,11	0,34
CNZ10 <sup>a</sup> (34)	129 - 169	5	0,52	0,08	0,000	0,572	0,28	0,14
CNZ13 (34)	138 - 178	3	0,11	0,12	1,000	0,000	0,79	0,01
CNZ23 (34)	133 - 163	3	0,14	0,15	1,000	0,000	0,75	0,01
CNZ26 (34)	216 - 240	8	0,53	0,50	0,201	0,015	0,25	0,16
CNZ44 (34)	139 - 151	4	0,33	0,32	0,426	0,004	0,47	0,06
CNZ50 (34)	114 - 120	4	0,34	0,38	1,000	0,000	0,46	0,06
CNZ51 (34)	138 - 150	2	0,03	0,03	-	0,000	0,94	0,00
CNZ57 (34)	99 - 105	4	0,19	0,21	1,000	0,000	0,66	0,02
CAC2 (34)	229 - 243	6	0,42	0,44	0,731	0,000	0,37	0,09
mBgCIR053 (34)	148 - 176	8	0,69	0,65	0,204	0,022	0,14	0,28
mBgCIR058 (33)	243 - 289	8	0,35	0,39	1,000	0,000	0,43	0,07
mBgCIR066 (33)	253 - 257	2	0,22	0,18	0,381	0,026	0,64	0,02
mBgCIR091 (34)	200 - 212	6	0,68	0,65	0,446	0,012	0,16	0,26
Bg02-09 (32)	170 - 174	3	0,35	0,34	0,462	0,000	0,46	0,06
Bg02-10 (31)	150 - 176	7	0,72	0,58	0,042 <sup>b</sup>	0,075	0,12	0,31
EE41 <sup>a</sup> (34)	114 - 122	4	0,44	0,42	0,076	0,422	0,36	0,10
EE54 (32)	113 - 115	2	0,51	0,47	0,466	0,021	0,38	0,13

n: número de individuos genotipificados, A: riqueza alélica,  $H_e$ : heterocigosidad esperada,  $H_o$ : heterocigosidad observada, H-W: test de ajuste a proporciones de Hardy-Weinberg,  $P_{ID}$ : probabilidad de identidad genotípica,  $P_{EX}$ : probabilidad de exclusión del primer parental.

<sup>a</sup> Probable ocurrencia de alelos nulos; <sup>b</sup> No significativo luego de la corrección por pruebas múltiples.

## Discusión

La transferencia de *SSRs* representa una alternativa al desarrollo *de novo*, el cual involucra un procedimiento experimental más arduo y costoso (Dayanandan *et al.* 1997, Barbará *et al.* 2007). Considerando los *SSRs* candidatos para los que logramos amplificar una región repetitiva en pindó, obtuvimos un porcentaje de transferibilidad del 16,4%. Y si tomamos solamente aquellos marcadores variables para los cuales hallamos al menos dos individuos heterocigotas en la muestra, la tasa de transferibilidad fue del 13,1%. Estos resultados contrastan con la aparente tendencia a muy bajas transferibilidades de *SSRs* entre diferentes géneros, dentro de familias, reportada para muchas especies de monocotiledóneas (Barbará *et al.* 2007). Los resultados obtenidos sugieren que la transferibilidad puede diferir ampliamente para familias distintas. Además, a la luz de estos resultados, es probable que muchos de los marcadores obtenidos puedan a su vez ser transferidos a otras especies del género *Syagrus*, para el cual aún no se han desarrollado microsátélites.

Generalmente la elección de los *SSRs* implica la evaluación de tres atributos esenciales: el nivel de variabilidad, la independencia en la segregación y la presencia/ausencia de alelos nulos. En particular, la ocurrencia de alelos nulos parece ser una característica bastante frecuente en los *SSRs* y sus efectos en los análisis de parentesco pueden ser considerables (Callen *et al.* 1993, Pemberton 1995, Dakin y Avise 2004, Lemer *et al.* 2011). Los alelos nulos normalmente generan una deficiencia de heterocigotas respecto a la frecuencia esperada bajo equilibrio de Hardy-Weinberg y fallas en la amplificación de algunos individuos. En virtud de dichos efectos, su detección es relativamente sencilla. La detección de alelos nulos y la estimación de su frecuencia es relevante para evaluar la conveniencia de incluir o no un cierto *SSR* en el conjunto de marcadores a utilizar. Incluso se ha demostrado que es posible evitar la ocurrencia de alelos nulos ajustando la secuencia de los oligonucleótidos empleados, aunque este procedimiento requiere mayor esfuerzo experimental (Lemer *et al.* 2011). En nuestro caso obtuvimos indicios claros de la ocurrencia de alelos nulos (deficiencia de heterocigotas y/o fallas en la amplificación) para tres (CNZ03, CNZ10 y EE41) de los 19 *SSRs* polimórficos que pudieron ser transferidos a pindó. El hecho de que no hayamos observado una deficiencia significativa de heterocigotas para el resto de los marcadores nos indica que en los individuos de la muestra utilizada no existían efectos apreciables de endogamia y/o estructuración, las cuales hubieran producido una deficiencia de heterocigotas en todos o la mayoría de los *SSRs*. Para el marcador EE41 obtuvimos fallas repetidas en la amplificación en varios individuos pero no observamos una deficiencia significativa de heterocigotas. Una explicación posible es que dicho marcador se encuentre asociado a un locus bajo selección equilibradora (Hedrick 2005), la cual aumentaría la proporción

de heterocigotas compensando el efecto de los alelos nulos. En cualquier caso, el uso de los marcadores CNZ03, CNZ10 y EE41 debe ser preferentemente evitado para el análisis de variación genética en pindó.

Para fines prácticos, es posible seleccionar convenientemente un subconjunto de los 19 *SSRs* polimórficos que logramos transferir a pindó de acuerdo a los tres atributos mencionados. Por ejemplo, se podrían escoger los marcadores CNZ04, CNZ26, CNZ50, CAC2, mBgCIR053, mBgCIR058, mBgCIR091, Bg02-09, Bg02-10 y EE54, que no presentan desequilibrio de ligamiento ni alelos nulos, y poseen heterocigosidades de 0,34 – 0,74 (Tabla 6). Tomando estos 10 marcadores se conseguirían probabilidades de identidad y exclusión parental con valores de aproximadamente  $9,9 \times 10^{-7}$  y 0,86, respectivamente.

### **Conclusiones**

Transferimos exitosamente un conjunto de *SSRs* polimórficos a *S. romanzoffiana* que son apropiados para cualquier estudio que requiera el análisis de la variación genética a nivel intraespecífico. En particular y en función de nuestros objetivos, este conjunto de marcadores nos permite estudiar la estructura genética en el pindó y el flujo génico contemporáneo mediado por la dispersión de semillas.

## CAPÍTULO III

DISPERSIÓN DE SEMILLAS Y FLUJO GÉNICO CONTEMPORÁNEO: EFECTOS DEL TAPIR SOBRE  
LA VARIACIÓN GENÉTICA DEL PINDÓ EN ESTADIOS TEMPRANOS**Introducción**

El flujo génico en las plantas con semilla ocurre a través de la dispersión efectiva del polen y de las semillas (Levin y Kerster 1974, Jordano 2010). Por lo tanto, ambos procesos influyen considerablemente sobre la distribución de la variación genética en las poblaciones vegetales (Epperson 2007). Algunos estudios comparativos realizados con plantas de distintas características biológicas han sugerido una relación entre el modo de dispersión de semillas y el patrón espacial de variación genética de las poblaciones (Hamrick *et al.* 1992, Hamrick *et al.* 1993, Williams 1994, Williams y Guries 1994, Vekemans y Hardy 2004, Hardy *et al.* 2006, Dick *et al.* 2008). Por ejemplo, se ha observado una tendencia hacia mayor estructuración genética en especies dispersadas por gravedad, niveles intermedios para especies dispersadas por viento, y menor estructuración en aquellas dispersadas por animales (Hamrick *et al.* 1992, Williams y Guries 1994, Vekemans y Hardy 2004, Fuchs y Hamrick 2010). En particular, las especies arbóreas tropicales dispersadas por roedores diseminadores-acumuladores (del inglés *scatter-hoarders*) presentan una estructura genética espacial más marcada que aquellas dispersadas por animales con rangos de desplazamiento más amplios como aves, murciélagos y monos. Asimismo los árboles tropicales dispersados por gravedad o con semillas relativamente pesadas dispersadas por viento exhiben mayor estructuración que las especies con semillas más livianas dispersadas por viento (Hardy *et al.* 2006, Dick *et al.* 2008). Estas tendencias resultan similares para especies de clima templado (Dick *et al.* 2008). Los resultados de estos estudios parecen concordar, en líneas generales, con la expectativa de una menor estructuración genética (o mayor flujo génico) en correlación con el potencial dispersivo de los agentes dispersores. Sin embargo, estos estudios no han logrado obtener conclusiones generales ni definitivas. Esto probablemente se deba a la multiplicidad de factores que actúan conjuntamente sobre la estructura genética, siendo el sistema reproductivo (Loveless y Hamrick 1984, Hamrick *et al.* 1993) y la densidad de adultos (Hamrick *et al.* 1993, Vekemans y Hardy 2004, Hamrick y Trapnell 2011) algunos de los más relevantes. Además, las categorías de los modos de dispersión que se utilizaron en la mayoría de los estudios mencionados pueden ser una simplificación excesiva para un proceso de tal complejidad, que

generalmente depende de varios agentes con efectos disímiles sobre la cantidad y calidad de la dispersión.

Las ideas expuestas en el párrafo anterior conciernen a la comprensión de un aspecto fundamental en ecología molecular: ¿cómo intervienen los dispersores (y polinizadores) en el movimiento de genes en las poblaciones de plantas con semilla y en la estructura genética resultante?, o dicho de otro modo, ¿cuál es la relación funcional entre la actividad de los dispersores (y polinizadores) y los patrones de variación genética de las plantas?

En este sentido, los estudios que disponían de una descripción más detallada sobre la planta y su sistema dispersivo han ayudado a comprender mejor algunos aspectos y mecanismos por los que la dispersión influye sobre la estructuración genética (ver revisiones de Ashley 2010, García y Grivet *et al.* 2011, Hamrick y Trapnell 2011). Por ejemplo, para la especie arbustiva *Ilex leucoclada* se ha demostrado que el patrón de estructuración genética puede explicarse en gran medida por la dispersión correlacionada de múltiples semillas contenidas en cada fruto, y por ende provenientes de una misma madre (Torimaru *et al.* 2007). En otras especies los análisis de parentesco han revelado también que una proporción apreciable de plántulas pueden no ser hijas del adulto más cercano, aún cuando se encuentren en el entorno físico inmediato. Este patrón parece ser relativamente frecuente en especies dispersadas por animales (Pacheco y Simonetti 2000, Hardesty *et al.* 2006, Wang *et al.* 2007, Grivet *et al.* 2009). Por otro lado, y pese a la tendencia general observada para muchas especies (Ennos 1994, Petit *et al.* 2005), se ha encontrado que en algunos sistemas la dispersión de semillas puede alcanzar distancias y niveles de flujo génico comparables o incluso superiores al flujo polínico (Bacles *et al.* 2006, Hardesty *et al.* 2006, Pospíšková y Šálková 2006, Sato *et al.* 2006, García *et al.* 2007, Born *et al.* 2008, Freeland 2012). Estos trabajos han permitido comprender mejor la complejidad del proceso dispersivo poniendo en evidencia la notable idiosincrasia de los sistemas planta-dispersores en relación al flujo génico asociado.

Un abordaje interesante, que permite integrar aspectos ecológicos y genéticos de la dispersión, es el análisis de diversidad genética y parentesco en sitios particulares que reciben una elevada proporción de semillas dispersadas (ver García y Grivet *et al.* 2011, y referencias allí citadas). La dispersión de semillas a sitios particulares (aberturas de la vegetación, sitios de reposo o de cortejo de aves, letrinas, plantas “nodrizas”, etc.) puede determinar la efectividad de la dispersión (Schupp *et al.* 2010) y es una de las premisas que sustenta la hipótesis de dispersión direccionada (Wenny *et al.* 2001). La evaluación de las relaciones de parentesco entre semillas depositadas o plantas reclutadas en estos sitios particulares es una forma de considerar explícitamente el movimiento de genes asociado a la actividad de los dispersores y su efecto en la estructura genética espacial. Más

precisamente, el grado de correlación materna entre las semillas o plántulas agrupadas en dichos sitios está directamente relacionado con los patrones de forrajeo de los dispersores (Hamrick *et al.* 1993, Grivet *et al.* 2005, García *et al.* 2009, Karubian *et al.* 2010, García y Grivet *et al.* 2011, Scofield *et al.* 2012). Además, la efectividad de la dispersión puede depender de la composición de genotipos de las semillas o plántulas representados en estos sitios. Por ejemplo, la mortalidad por patógenos o la competencia intraespecífica podrían ser mayores si los genotipos son más homogéneos (Maynard Smith 1978, Price y Waser 1982, Antonovics y Ellstrand 1984, Ellstrand y Antonovics 1985, Schmitt y Antonovics 1986, Crawford y Whitney 2010). Alternativamente, la selección de parentesco podría favorecer grupos de individuos emparentados (Nakamura 1980, Wilson *et al.* 1987, Schuster y Mitton 1991). Así, tanto el patrón espacial como el microambiente genético producidos por la dispersión pueden afectar la supervivencia de las semillas o plántulas, y en consecuencia, la efectividad de la dispersión.

Los estudios que han analizado el parentesco entre semillas o individuos agrupados en sitios particulares son relativamente escasos y, en su mayoría, recientes. Dichos estudios han considerado diferentes sistemas planta-dispersor y tipos de sitio en los que se depositan las semillas, entre los que se cuentan: conjuntos de pinos (*Pinus flexilis*) adultos estrechamente agrupados debido a la dispersión por aves, y cuyos troncos terminan fusionándose durante el desarrollo (Schuster y Mitton 1991), semillas de una hierba (*Trillium grandiflorum*) acarreadas por hormigas y depositadas en sus nidos o alrededor de éstos (Kalisz *et al.* 1999), semillas de roble (*Quercus* spp.) almacenadas por pájaros carpinteros en árboles “graneros” (Grivet *et al.* 2005, Scofield *et al.* 2010, 2011, 2012), semillas de un cerezo silvestre (*Prunus mahaleb*) transportadas por diversos vertebrados frugívoros hacia parches de vegetación de composición florística variable (García *et al.* 2009), semillas y plántulas de roble (*Q. lobata*) reclutadas bajo la copa de adultos o agrupadas en sitios abiertos debido a la dispersión por aves o roedores (Grivet *et al.* 2009), semillas de una especie arbórea (*Myrica rubra*) contenidas en las heces de primates (Terakawa *et al.* 2009), y semillas de una palmera (*Oenocarpus bataua*) regurgitadas por un ave en sus sitios de cortejo (*leks*) (Karubian *et al.* 2010, Scofield *et al.* 2012). Estos estudios demuestran que los diferentes patrones de forrajeo y comportamiento de los dispersores pueden producir escenarios contrastantes en cuanto a la estructura de parentesco generada: por un lado, sitios con una alta correlación materna debido al agrupamiento de semillas provenientes de una o pocas madres contribuyentes (Schuster y Mitton 1991, Kalisz *et al.* 1999, Grivet *et al.* 2005, Grivet *et al.* 2009, Scofield *et al.* 2012), y por el otro, agrupamientos con una diversidad elevada de madres representadas (Terakawa *et al.* 2009, Karubian *et al.* 2010, Scofield *et al.* 2012). Para una misma especie de planta, los patrones de microestructuración genética pueden diferir



ampliamente en los distintos sitios de deposición de semillas (García *et al.* 2009, Scofield *et al.* 2010, 2011, 2012). Es esperable que la estructura genética generada por los agentes dispersores en los sitios con alta llegada de semillas, afecte el patrón de estructura genética resultante en escalas espaciales mayores. Si bien se ha observado frecuentemente que la estructura genética en los estadios tempranos es más acentuada que en los adultos simplemente como producto de la reducción demográfica (Epperson 1992, Epperson y Álvarez-Buylla 1997, Schnabel *et al.* 1998, González-Martínez *et al.* 2002, Choo *et al.* 2012), el rastro de estructura genética puede persistir en los adultos y las sucesivas generaciones (Hamrick *et al.* 1993, Epperson y Álvarez-Buylla 1997). Por lo tanto, los dispersores pueden desempeñar un papel importante al establecer el patrón inicial de estructuración de los individuos reclutados (Trapnell y Hamrick 2011).

El mutualismo planta-dispersor entre el pindó y el tapir representa un sistema muy adecuado para estudiar el flujo génico mediado por la dispersión de semillas. Nuestros resultados (ver Capítulo I) indicaron que el tapir es el principal dispersor del pindó y que la regeneración de esta palmera está asociada a la formación de letrinas. Las letrinas generadas por el comportamiento de defecación recurrente de los tapires representan sitios particulares evidentes, con abundante llegada de semillas y alto reclutamiento de plántulas. Por ende, el análisis de la microestructura genética de los juveniles de pindó reclutados en las letrinas es una forma de considerar explícitamente el efecto de su principal dispersor sobre el flujo génico mediado por la dispersión de semillas. El tapir puede recorrer grandes distancias diariamente (Fragoso *et al.*, 2003, Noss *et al.* 2003), el tiempo de retención de las semillas en el tracto digestivo es muy prolongado (generalmente más de dos días; Janzen 1981, Olmos *et al.* 1999, Clauss *et al.* 2010, Campos-Arcseiz *et al.* 2012) y, como demostramos en el Capítulo I, consume y dispersa grandes cantidades de frutos de pindó en el área de estudio. Dado que el pindó es una especie muy abundante en la Selva Paranaense, es probable que a lo largo del día los tapires se alimenten de frutos de pindó de numerosos individuos adultos, algunos de los cuales podrían estar situados a distancias considerables. Este patrón de forrajeo produciría una mezcla heterogénea de genotipos entre los juveniles reclutados en cada letrina.

Como objetivo específico, nos propusimos determinar el efecto de la dispersión de semillas por tapires sobre la variabilidad genética y estructura de parentesco de los juveniles de pindó reclutados en letrinas en la Selva Paranaense. Teniendo en cuenta el escenario descrito en el párrafo anterior, planteamos las siguientes hipótesis relativas al efecto del tapir: H<sub>1</sub>) los juveniles reclutados en letrinas de tapir contienen una mayor riqueza de alelos que aquellos reclutados bajo palmeras adultas; H<sub>2</sub>) los juveniles reclutados en las letrinas no son hijos de la palmera adulta más cercana; H<sub>3</sub>) los juveniles reclutados en las letrinas están menos emparentados que aquellos

reclutados debajo de palmeras adultas (dentro del Parque), y provienen de una mayor diversidad de madres contribuyentes.

### Materiales y Métodos

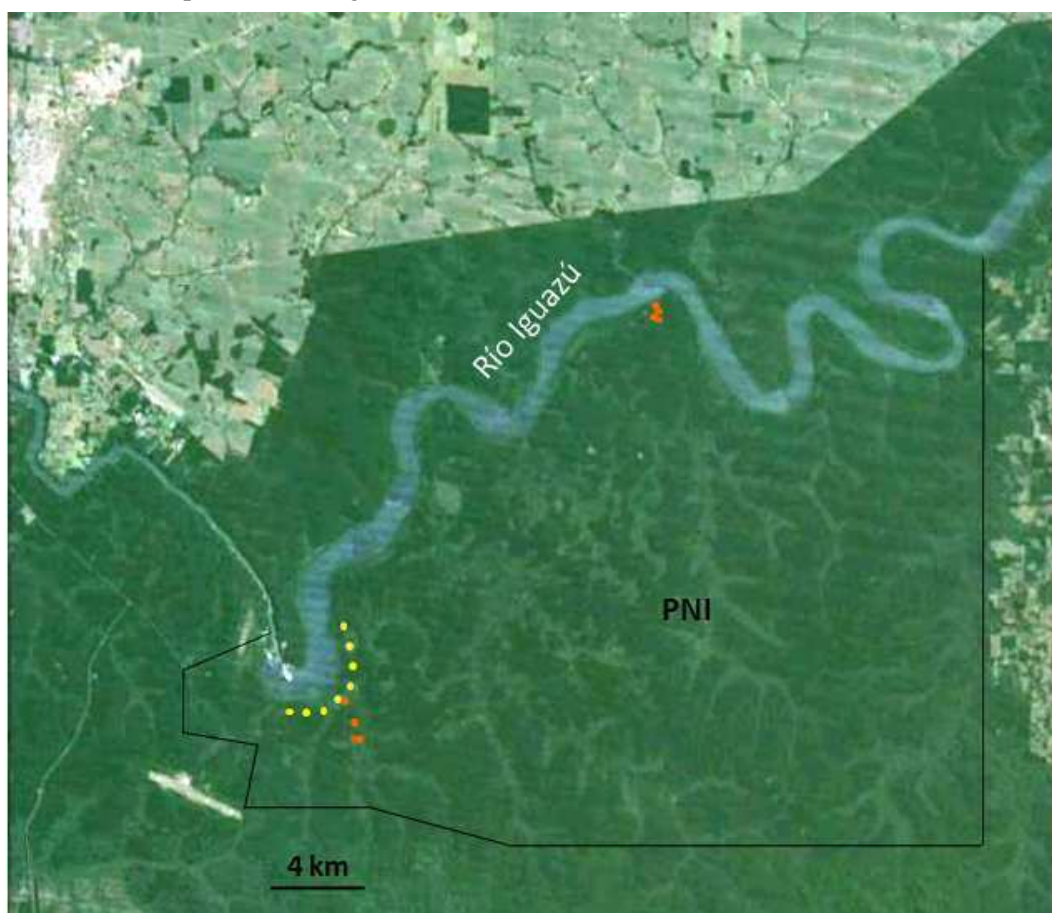
**Área de estudio y toma de muestras.** El trabajo fue realizado en el Parque Nacional Iguazú, cuyas características ya fueron descritas en el Capítulo I. Tomamos muestras de tejido de hasta 16 juveniles en parcelas circulares de 3 m de radio establecidas bajo la copa de ocho palmeras adultas y sobre ocho letrinas de tapir. Las ubicaciones aproximadas de las palmeras adultas y letrinas están indicadas en la Figura 13. Las parcelas circulares fueron centradas en el estípite de la palmera adulta correspondiente o en un punto arbitrario de la letrina. Las palmeras adultas elegidas estuvieron distanciadas entre sí a no menos de 350 m. También colectamos tejido del adulto más cercano a cada "sitio focal" (debajo de adulto o letrina). En el caso de las letrinas, la distancia al adulto más cercano varió entre 9 – 53 m. Además estimamos el número aproximado de defecaciones individuales en cada letrina a partir de los montículos de materia fecal y/o grupos de juveniles que eran distinguibles en cada una. Bajo la copa de algunas palmeras adultas el número de juveniles hallados (y colectados) fue menor a 16. En la Tabla 7 se resumen los datos relativos al muestreo en los sitios focales.

**Tabla 7.** Resumen del muestreo de juveniles de *S. romanzoffiana* bajo la copa de palmeras adultas y en letrinas de tapir en el Parque Nacional Iguazú

Bajo adulto	Letrina	
	n ( $d \leq 3$ m)	n      d (m)
A1	14	L1      16      17
A2	14	L2      16      53
A3	14	L3      16      12
A4	16	L4      16      10
A5	16	L5      16      20
A6	16	L6      16      17
A7	10	L7      16      16
A8	8	L8      16      9

n: número de juveniles genotipificados; d: distancia al adulto focal.

**Figura 13.** Ubicación aproximada de los sitios focales escogidos para el muestreo dentro del Parque Nacional Iguazú (PNI)



La ubicación aproximada de los ocho adultos y letrinas focales se indica con puntos amarillos y naranjas, respectivamente.

**Extracción de ADN y marcadores moleculares.** Realizamos la extracción de ADN genómico de cada individuo con el *kit* de extracción en placas *NucleoSpin 96 Plant II* (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) y partiendo de 10 – 35 mg de hojas preservadas en sílica-gel.

Para los análisis genéticos empleamos un conjunto de nueve microsatélites (CNZ04, CNZ26, CNZ44, CNZ50, CAC2, mBgCIR053, mBgCIR091, Bg02-10, EE54) obtenidos previamente (Capítulo II). Estos nueve marcadores fueron seleccionados por su mayor variabilidad, y por no presentar desvíos respecto a las proporciones de Hardy-Weinberg u otros indicios de alelos nulos, ni desequilibrio de ligamiento (Tabla 6). Las características de variabilidad de estos nueve *SSRs* en el conjunto total de individuos genotipificados fueron similares a los obtenidas anteriormente en la muestra de 34 individuos (Tabla 6, Apéndice 1). Las probabilidades multilocus de exclusión del primer parental y de identidad genotípica fueron  $P_{EX} = 0,86$  y  $P_{ID} = 2,6 \times 10^{-6}$ , respectivamente.

La amplificación por PCR se realizó en duplas para los siguientes pares de *SSRs*: CNZ04 | mBgCIR091, CNZ44 | CNZ50 y Bg02-10 | EE54, e individualmente para los tres marcadores restantes (CNZ26, CAC2, mBgCIR053). Posteriormente, la genotipificación en el secuenciador

fue realizada a partir de muestras conteniendo las siguientes combinaciones de *SSRs*: CNZ04 | mBgCIR091, CNZ26 | Bg02-10 | EE54, CNZ44 | CNZ50 y CAC2 | mBgCIR053. En todas estas combinaciones las diferencias de tamaños alélicos y color de los fluoróforos acoplados permitieron distinguir fácilmente los alelos de cada marcador. El resto de procedimientos e instrumentos utilizados para la genotipificación fue igual al descrito anteriormente en el Capítulo II.

Tomamos los siguientes recaudos para mejorar la calidad de nuestra base de datos genéticos. En primer lugar, la amplificación fue repetida para todos aquellos productos de PCR fallidos o con perfiles de fluorescencia dudosos. De esta forma limitamos los errores de genotipificación y redujimos el porcentaje de individuos sin dato genotípico para cada locus a menos del 1%. Además realizamos un análisis de identidad genotípica utilizando el programa Cervus 3.0.3 (Kalinowski *et al.* 2007) para detectar genotipos duplicados que pudiesen provenir de artefactos durante la manipulación experimental (contaminaciones, errores de pipeteo, etc.) o del procesamiento de la base de datos. Los genotipos idénticos fueron descartados (9 casos) cuando correspondían a individuos cuyas muestras de ADN se encontraban en pocillos contiguos de la microplaca.

### **Análisis de datos genéticos**

**Estimación y comparación de la variabilidad genética en los sitios focales.** Evaluamos los niveles de variación genética de los juveniles reclutados bajo la copa de palmeras adultas y en las letrinas en términos de la heterocigosidad esperada o diversidad génica ( $H_e$ ) (*i.e.*, la probabilidad de que dos alelos tomados al azar sean diferentes) y la riqueza alélica ( $A$ ) (*i.e.*, el número de alelos diferentes presentes en la muestra). Ambos estadísticos son estimadores clásicos de variabilidad de uso muy frecuente y típicamente reportados en la literatura (Weir 1996, Hedrick 2005). La diversidad génica fue calculada con el programa Cervus 3.0.3 (Kalinowski *et al.* 2007) según el estimador insesgado de Nei (1987). Dado que la riqueza alélica depende sensiblemente del número de individuos muestreados (El Mousadik y Petit 1996, Petit *et al.* 1998, Leberg 2002), aplicamos el método de rarefacción (Heck *et al.* 1975, Tipper 1979, Gotelli y Colwell 2001) para estimar los valores en función de los tamaños muestrales utilizando el programa HP-RARE 1.1 (Kalinowski 2004, 2005). De esta forma, el tamaño muestral de los sitios focales fue estandarizado para las comparaciones de riqueza alélica.

Las propiedades de variabilidad, como  $A$  y  $H_e$ , son dependientes del locus en cuestión y normalmente los valores difieren entre los distintos *SSRs* debido a características intrínsecas o efectos particulares (*e.g.*, tasa de mutación, posibles efectos selectivos). En consecuencia, cuando

se pretende comparar niveles de variabilidad genética entre distintas muestras es conveniente tener en cuenta el factor locus como fuente de variación calculando la diferencia entre muestras para cada uno de los loci analizados y evaluando la concordancia entre los distintos loci (*e.g.*, Kalinowski 2004, Hanson *et al.* 2008). Por lo tanto, la comparación de variabilidad entre los tratamientos (*i. e.* debajo de adultos vs letrinas) fue realizada con el test no paramétrico de Wilcoxon para muestras pareadas (Sokal y Rohlf 1995). Utilizamos el programa STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc. 2001) para efectuar dicha prueba.

**Análisis de parentesco en los sitios focales.** La mayoría de los métodos que empleamos para determinar las relaciones o coeficientes de parentesco entre individuos requieren una estimación de las frecuencias alélicas en la población de referencia, la cual se obtiene usualmente a partir de una muestra de individuos adultos (población parental) o directamente de la muestra de individuos cuyas relaciones de parentesco se pretenden inferir (Hardy 2003, Kalinowski *et al.* 2006, Wagner *et al.* 2006). En nuestro caso, utilizamos como referencia las frecuencias alélicas estimadas del total de individuos genotipificados que analizamos en los Capítulos II, III y IV de la presente tesis. Esta "muestra global" se compone de 811 individuos distribuidos en distintos sitios de las áreas de estudio (ver Figuras 13 y 18) y las frecuencias alélicas correspondientes se especifican en el Apéndice 2. Muy probablemente estas frecuencias de referencia sean más representativas de la población global de pindó en las áreas de estudio que cualquier sub-muestra proveniente de algún sitio particular. De esta forma evitamos el efecto de la circularidad en la inferencia de parentescos, el cual tiende a producir una subestimación general del grado de parentesco entre los individuos.

Para evaluar la proporción de juveniles provenientes de semillas dispersadas en los sitios focales (*i.e.*, que no eran hijos del adulto más cercano) realizamos un análisis de exclusión utilizando tres métodos distintos: i) análisis de exclusión cruda (con dos variantes), ii) determinación del parentesco entre pares de individuos (adulto focal - juvenil) por máxima verosimilitud, iii) reconstrucción simultánea del parentesco del conjunto de individuos (juveniles y adulto) en cada sitio focal por máxima verosimilitud. En principio el tercer método es más confiable y resuelve las relaciones de parentesco con mayor exactitud que los otros dos; sin embargo preferimos emplear los tres para evaluar la consistencia de los resultados.

El primer método consiste simplemente en detectar la incompatibilidad de alelos para al menos un locus entre cada individuo juvenil y la madre candidata (Jones *et al.* 2010). Este método tiende a ser conservativo ya que sólo excluye a la madre candidata cuando se viola el principio de segregación mendeliana (*i.e.*, ningún alelo es compartido entre juvenil y adulto) sin considerar la probabilidad esperada de los genotipos bajo el supuesto de que sean madre-hijo. Por otro lado el

método no considera errores de genotipificación (o mutación), lo que puede dar lugar a falsas exclusiones (error de tipo II). Este error puede controlarse exigiendo la incompatibilidad de más de un locus para la exclusión, lógicamente a costa de disminuir la potencia. Pese a las limitaciones mencionadas, este método es simple y requiere pocos supuestos. Utilizamos el programa WHICHPARENTS 1.0 (Eichert y Hedgecock, Bodega Bay Marine Laboratory, U. C. Davis, California; disponible en [www.bml.ucdavis.edu/whichparents.html](http://www.bml.ucdavis.edu/whichparents.html)) para el análisis de exclusión cruda basado en la incompatibilidad de al menos uno o al menos dos *SSRs*.

El segundo método, implementado con el programa ML-RELATE (Kalinowski *et al.* 2006), se basa en asignar aquella relación de parentesco (parental-hijo, hermanos completos, medio-hermanos, o no relacionados) para pares de individuos que maximice la probabilidad de obtener los genotipos observados. Las distintas relaciones de parentesco se describen por tres coeficientes que representan las probabilidades de compartir dos, uno y ningún alelo (Thompson 1975, Blouin 2003). Cada tipo de relación implica valores distintos de dichos coeficientes, lo cual permite asignar los parentescos con el criterio de máxima verosimilitud (Milligan 2003, Wagner *et al.* 2006). En nuestro caso realizamos el análisis de todos los pares posibles madre candidata - juvenil para identificar y contabilizar aquellos juveniles que no eran asignados a una relación de parental-hijo con el adulto focal. El método asume la ausencia de endogamia y, al igual que el anterior, tampoco permite considerar errores de genotipificación (aunque sí puede corregir el efecto de alelos nulos). Este método es más potente que la exclusión cruda ya que tanto la incompatibilidad de alelos (exclusión categórica) como la baja verosimilitud (exclusión probabilística) contribuyen a la exclusión total. Para el cálculo de la verosimilitud usamos las frecuencias alélicas de referencia estimadas de la muestra global (ver Apéndice 2).

Como tercer método utilizamos la reconstrucción simultánea de las relaciones de parentesco del conjunto de individuos (juveniles y adulto) en cada sitio focal por máxima verosimilitud (Wang 2004). Este método fue implementado mediante el programa COLONY2 (Wang y Santure 2009, Jones y Wang 2010) que considera a los individuos en conjunto y no de a pares aislados como en los casos anteriores. El método presenta una serie de ventajas respecto a los anteriores. En primer lugar, optimiza el uso de la información genética al considerar a los individuos en conjunto aumentando el poder resolutivo y evitando inconsistencias de parentesco (Wang 2004, 2007). Además permite incorporar errores de genotipificación (o efectos de mutación) en el modelo de máxima verosimilitud y así aumentar la confianza de las inferencias (Wang 2004). Por último, resulta muy versátil ya que admite sistemas reproductivos y de apareamiento diversos: especies monoicas y dioicas, endogamia biparental y autofecundación, y poligamia para uno o ambos sexos (Wang 2004, Wang y Santure 2009). Recientemente se ha demostrado la

superioridad de este método respecto a otros abordajes (Wang y Santure 2009, Wang 2012), aunque lógicamente requiere tiempos de cómputo mucho mayores. A continuación indicamos las condiciones y parámetros más relevantes del modelo que utilizamos para realizar la reconstrucción de las relaciones de parentesco en cada sitio focal. La búsqueda de la configuración genealógica más probable fue realizada con el algoritmo de verosimilitud total (*Full-likelihood method*) y un nivel alto de exhaustividad (*Long run*) en la exploración de configuraciones. Las frecuencias alélicas de referencia fueron estimadas de la muestra global (ver Apéndice 2). Para la descripción del sistema reproductivo y de apareamiento especificamos que la especie de estudio era monoica, con posibilidad de endogamia, y con ambos sexos polígamos (implica que en la progenie puede haber medio-hermanos por parte de madre o padre). Consideramos errores de genotipificación de clase I y clase II (Wang 2004) con tasas de 0,005 en ambos casos y para todos los loci. Las probabilidades a priori de que el adulto focal fuese el padre o la madre de al menos un juvenil reclutado bajo su copa fueron establecidas en 0,1 y 0,95, respectivamente. En el caso de las letrinas estas probabilidades fueron establecidas en 0,1 y 0,5 respectivamente. Para controlar el efecto que pudiese tener la diferencia de los valores de dichas probabilidades sobre el índice de exclusión también implementamos la inferencia con probabilidades de 0,1 y 0,95 para las letrinas, haciendo que las condiciones de reconstrucción de parentescos fuesen completamente iguales en los distintos tipos de sitios focales. No obstante, los análisis subsiguientes de las letrinas (ver abajo) están basados en las reconstrucciones de parentesco obtenidas con probabilidades de 0,1 y 0,5 que consideramos más apropiadas. Más detalles sobre el rol de los distintos parámetros en el modelo pueden obtenerse de Wang (2004), Wang y Santure (2009) y el manual para el usuario de COLONY2. Cabe mencionar que el método resulta notablemente robusto frente a la variación de la mayoría de los parámetros mencionados, excepto cuando los marcadores son muy poco informativos (Wang y Santure 2009). En particular el método es robusto frente a tasas de error de genotipificación ampliamente superiores a las asumidas en el modelo para realizar la reconstrucción genealógica (Wang 2004).

Además de evaluar la proporción de juveniles excluidos respecto a la madre candidata, realizamos una asignación categórica de parentescos entre pares de juveniles en cada sitio focal a partir de la reconstrucción del pedigrí obtenida con COLONY2. De esta forma estimamos la proporción de hermanos completos (comparten padre y madre), medio-hermanos (comparten solamente un parental), e individuos no relacionados. Comparamos la proporción de juveniles no relacionados reclutados debajo de adultos y en letrinas con una prueba de Mann-Whitney de 1 cola (Sokal y Rohlf 1995) usando el programa STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc. 2001).

La proporción de individuos no relacionados provee información (indirecta) respecto a la cantidad de madres diferentes representadas en los sitios focales. No obstante, para obtener una estimación más directa del número de madres contribuyentes y evaluar la hipótesis  $H_3$ , efectuamos una reconstrucción del pedigrí mediante el COLONY2 asumiendo que los juveniles medio-hermanos sólo podían estar vinculados a través de la madre. Dado que el pindó es una especie monoica, sin utilizar este supuesto no sería posible determinar cuál de los genotipos parentales inferidos corresponde a la madre y cuál al padre para los juveniles hallados en las letrinas. Además, la utilización de este supuesto se justifica por los siguientes argumentos: i) las semillas que ingiere un tapir bajo la copa de una palmera adulta deberían ser mayoritariamente hijas de dicha palmera y, por consiguiente, medio-hermanas (o hermanas completas) entre sí. Obviamente el tapir podría también ingerir semillas medio-hermanas por parte del padre al alimentarse bajo distintos adultos-madre que han sido fecundados por un mismo adulto-padre, pero esta probabilidad debería ser menor siempre que el tapir ingiera varias semillas debajo de cada palmera adulta; ii) en cualquier caso, nuestro supuesto conduce a una estimación conservativa del número de madres contribuyentes ya que para cualquier par o conjunto de juveniles para los que se infiera un solo parental en común, éste será identificado como la madre. Esta condición fue implementada en el modelo de reconstrucción genealógica (COLONY2) restringiendo la posibilidad de poligamia al sexo femenino. La comparación de la cantidad de madres representadas en letrinas y debajo de adultos fue hecha en términos del número de madres diferentes ( $N_m$ ), que representa una medida de riqueza, y del número *efectivo* de madres ( $N_{em}$ ), que representa un índice de diversidad. El  $N_{em}$  fue calculado como  $N_{em} = PMI^{-1}$ , donde  $PMI$  es la probabilidad de identidad materna (promedio ponderado) según el estimador de Scofield *et al.* (2011), basado en Nielsen *et al.* (2003) y Grivet *et al.* (2005). Dado que la cantidad de juveniles difería entre algunos sitios focales, las estimas de  $N_m$  fueron corregidas con los métodos de rarefacción y extrapolación utilizando el programa EstimateS 9.0 (Colwell *et al.* 2012, Colwell 2013). Este programa fue diseñado originalmente para analizar la diversidad de especies en estudios ecológicos o afines (Colwell 2013) pero puede ser adaptado a otros propósitos, como en nuestro caso. Empleamos el análisis correspondiente a un diseño basado en el muestreo de individuos (“*individual-based abundance data*”; Colwell 2013) para corregir el número estimado de madres representadas en cada sitio focal en función del número de juveniles genotificados, de manera de equiparar los tamaños muestrales en la comparación de riquezas. Comparamos los valores de  $N_m$  y  $N_{em}$  entre letrinas y bajo adultos con una prueba de Mann-Whitney empleando el programa STATISTICA 6.0. Además, evaluamos si el número de madres diferentes representadas



en cada letrina estaba correlacionado positivamente con el número estimado de defecaciones individuales mediante una correlación de Spearman.

Finalmente, estimamos los coeficientes de parentesco medio observados bajo adultos y en letrinas y los comparamos contra aquellos obtenidos aleatorizando las muestras de cada tratamiento, es decir, mezclando los genotipos de los juveniles reclutados bajo distintos adultos focales o en distintas letrinas. Este análisis provee una medida de la estructuración o diferenciación genética entre los grupos de juveniles reclutados en los sitios focales. Para ello utilizamos el programa SPAGeDi 1.4 (Hardy y Vekemans 2002). Usamos el estimador ( $\rho_{ij}$ ) del coeficiente de parentesco entre individuos propuesto por Loiselle *et al.* (1995) y las frecuencias alélicas de referencia estimadas de la muestra global de individuos (ver Apéndice 2). El promedio multilocus y el intervalo de confianza del coeficiente de parentesco observado fueron estimados con el procedimiento de remuestreo de *Jackknife* sobre los distintos loci, excluyendo un locus por vez (Hardy y Vekemans 2002). Los valores del coeficiente de parentesco para las muestras aleatorizadas, y sus intervalos de confianza, fueron obtenidos a partir de 1000 permutaciones. Por último, para comparar directamente los valores del coeficiente de parentesco con aquellos esperados en función de las relaciones entre individuos asignadas en los pedigrís reconstruidos, ajustamos los valores ( $\rho \rightarrow \rho^P$ ) según Hardy (2003). Como referencia del valor del coeficiente para individuos no relacionados (Hardy 2003) utilizamos el coeficiente de parentesco medio calculado entre juveniles pertenecientes a las distintas muestras de cada tratamiento. Para obtener información más detallada de estos análisis puede consultarse el manual de uso del SPAGeDi 1.4.

## Resultados

**Estimación y comparación de la variabilidad genética.** La riqueza alélica promediada sobre todos los loci fue levemente mayor en las letrinas que debajo de adultos (Tabla 8), pero esta relación no fue consistente entre los distintos loci según indicó el test de Wilcoxon para muestras pareadas ( $Z_{\text{Wilcoxon}} = 0,89$ ,  $p = 0,374$ ), por lo que las diferencias no pueden ser consideradas significativas. El valor promedio de diversidad génica fue esencialmente igual para los juveniles en los dos tipos de sitios focales (Tabla 8) ( $Z_{\text{Wilcoxon}} = 1,13$ ,  $p = 0,260$ ).

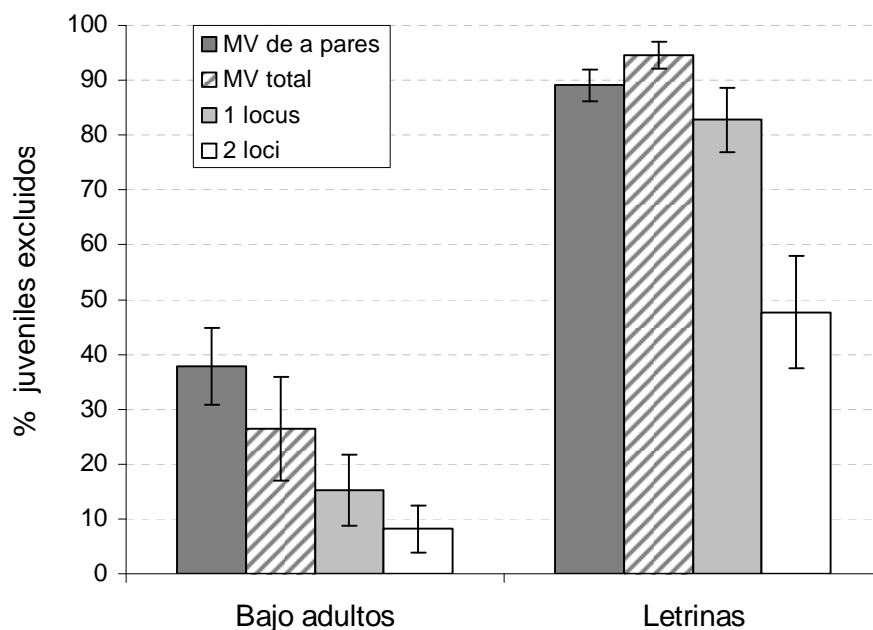
**Tabla 8.** Resumen de variabilidad genética de juveniles de *S. romanzoffiana* reclutados bajo adultos y en letrinas de tapir en el Parque Nacional Iguazú

	mBgCIR091	CNZ04	mBgCIR053	CAC2	Bg02-10	EE54	CNZ26	CNZ44	CNZ50	media
<b>Bajo adultos</b>	$A = 4,16$	3,47	4,36	2,19	4,31	2,00	2,98	1,93	2,89	3,14
	$H_e = 0,68$	0,58	0,63	0,28	0,70	0,42	0,33	0,19	0,44	0,47
<b>Letrinas</b>	4,24	3,17	5,10	1,86	4,31	2,00	3,19	1,93	3,22	3,23
	0,71	0,58	0,70	0,11	0,70	0,49	0,38	0,16	0,51	0,48

A: riqueza alélica media (valores corregidos por rarefacción),  $H_e$ : diversidad génica media.

**Análisis de parentesco en los sitios focales.** Los resultados del análisis de exclusión de maternidad para los juveniles y adultos en los sitios focales estuvieron de acuerdo con las expectativas. Tanto el método de exclusión cruda basado en la incompatibilidad de al menos un locus como los dos métodos de máxima verosimilitud, mostraron que la gran mayoría (83 – 95%) de los juveniles reclutados en las letrinas de tapir no provenía de la palmera adulta más cercana (Figura 14). Solamente el método más conservativo, correspondiente a la exclusión cruda requiriendo incompatibilidades de alelos para más de un locus, indicó un porcentaje menor (50%) de juveniles excluidos en las letrinas (Figura 14). No obstante, según el método de máxima verosimilitud total implementado en COLONY2, la proporción de juveniles excluidos se mantuvo por encima del 85% aún utilizando una probabilidad a priori de 0,95 de que el adulto más cercano fuese el parental de algún juvenil de la letrina. En contraste, bajo la copa de palmeras adultas la proporción de juveniles excluidos como hijos del adulto focal fue de 26% según el método de máxima verosimilitud total.

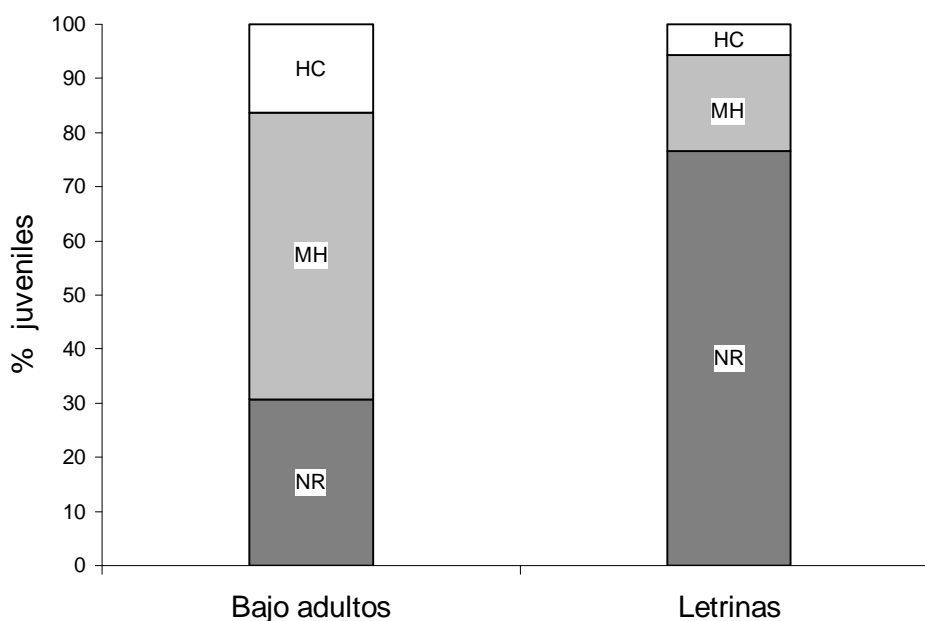
**Figura 14.** Análisis de exclusión materna de juveniles de *S. romanzoffiana* reclutados bajo adultos y en letrinas de tapir en el Parque Nacional Iguazú



MV de a pares: método de máxima verosimilitud entre pares de individuos (implementado en ML-RELATE); MV total: método de máxima verosimilitud para el conjunto total de individuos (implementado en COLONY2); 1 locus, 2 loci: métodos de exclusión cruda por incompatibilidad de alelos en al menos uno o dos loci, respectivamente (implementados en WHICHPARENTS 1.0). Las barras indican el error estándar.

El análisis de parentesco entre juveniles mostró que la proporción de individuos no emparentados (*i.e.*, pares de individuos que no comparten ningún parental) fue significativamente mayor en las letrinas (77%) que debajo de los adultos (31%) (Figura 15;  $U_{\text{Mann-Whitney}} = 4$ ,  $p = 0,0009$ ). Este resultado refleja que mientras la mayoría de los juveniles reclutados debajo de los adultos están relacionados entre sí a través de dicho adulto (medio-hermanos por parte de la madre; Figura 14), los juveniles reclutados en las letrinas provienen de una mayor diversidad de madres contribuyentes.

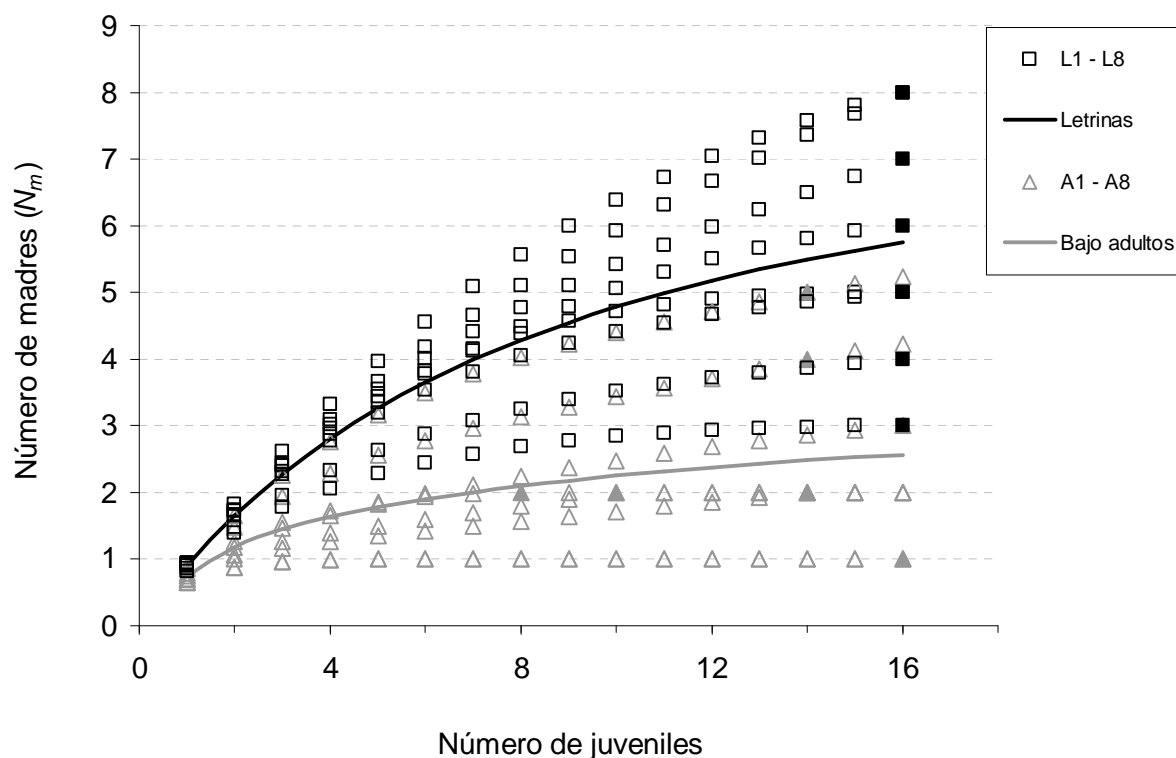
**Figura 15.** Asignación categórica de parentescos entre juveniles de *S. romanzoffiana* reclutados bajo adultos y en letrinas de tapir en el Parque Nacional Iguazú



HC: hermanos completos, MH: medio-hermanos, NR: no relacionados.

El número promedio de madres distintas representadas en las letrinas para muestras de ocho y 16 juveniles fue de  $N_{m(n=8)} = 4,29$  y  $N_{m(n=16)} = 5,75$ , mientras que debajo de los adultos estos valores fueron de  $N_{m(n=8)} = 2,10$  y  $N_{m(n=16)} = 2,56$  (Tabla 9, Figura 16). Las diferencias de  $N_m$  entre los dos tratamientos, para ambos tamaños de muestra, fueron ampliamente significativas según las pruebas de Mann-Whitney ( $U = 3$ ,  $p = 0,001$  y  $U = 6,5$ ,  $p = 0,005$ , respectivamente). El número efectivo de madres contribuyentes también resultó significativamente mayor en las letrinas ( $N_{em} = 4,38$ ) que debajo de los adultos ( $N_{em} = 1,4$ ) (Tabla 9;  $U = 4$ ,  $p = 0,002$ ). Por último, el número de madres diferentes representadas en las letrinas presentó una correlación significativamente positiva con el número estimado de defecaciones individuales (correlación de Spearman:  $r_s = 0,75$ ;  $n = 8$ ,  $p = 0,032$ ).

**Figura 16.** Riqueza de madres contribuyentes al reclutamiento de juveniles de *S. romanzoffiana* bajo adultos y en letrinas de tapir en el Parque Nacional Iguazú



Los cuadrados y triángulos indican los valores de riqueza de madres estimados para cada letrina (L1 - L8) y bajo adulto (A1 - A8), respectivamente. Las líneas continuas (negra y gris) indican los promedios correspondientes. Los marcadores rellenos corresponden a los valores observados, mientras que los vacíos corresponden a los valores estimados por rarefacción o extrapolación.

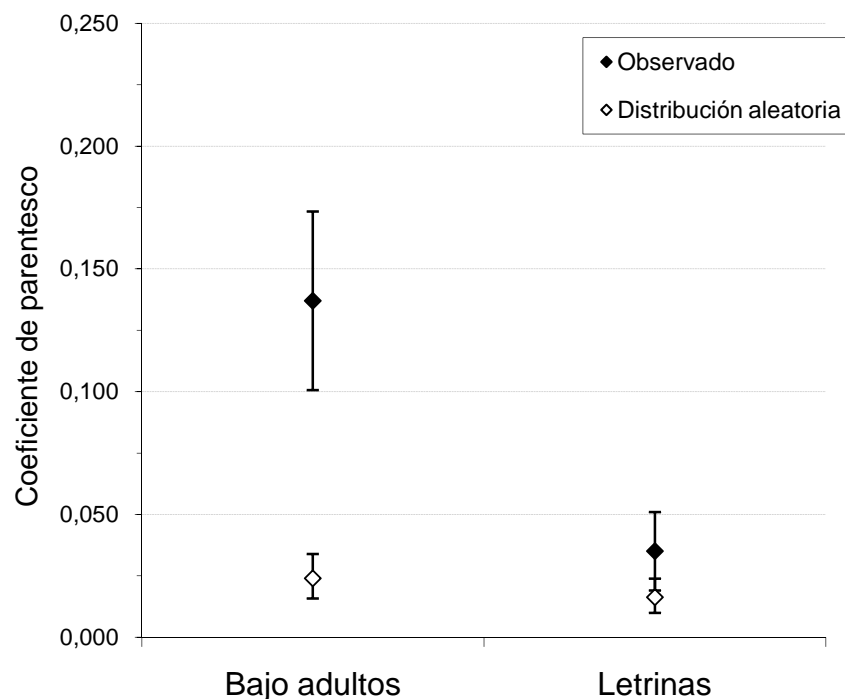
**Tabla 9.** Diversidad de madres contribuyentes al reclutamiento de juveniles de *S. romanzoffiana* bajo adultos y en letrinas de tapir en el Parque Nacional Iguazú

	Bajo adultos			Letrinas			
	$N_m(n=8)$	$N_m(n=16)$	$N_{em}$		$N_m(n=8)$	$N_m(n=16)$	$N_{em}$
A1	1,57	2,00	1,16	L1	4,38	5,00	6,05
A2	3,13	4,23	2,87	L2	4,78	7,00	6,05
A3	4,02	5,23	4,60	L3	3,25	4,00	2,81
A4	1,00	1,00	1,00	L4	5,11	8,00	6,05
A5	2,25	3,00	1,51	L5	4,05	5,00	4,65
A6	1,00	1,00	1,00	L6	5,56	8,00	9,30
A7	1,80	2,00	1,24	L7	4,49	6,00	4,65
A8	2,00	2,00	1,70	L8	2,69	3,00	2,28
<b>Media</b>	<b>2,10</b>	<b>2,56</b>	<b>1,41</b>	<b>Media</b>	<b>4,29</b>	<b>5,75</b>	<b>4,38</b>

$N_m(n=x)$ : riqueza de madres estimada para un tamaño muestral de  $x$  individuos (juveniles) mediante rarefacción o extrapolación;  $N_{em}$ : número efectivo de madres.

Conforme a nuestras expectativas y a la reconstrucción de los pedigrís, el nivel medio de parentesco entre juveniles hallados en letrinas fue claramente menor que el observado debajo de palmeras adultas (Figura 17). Los coeficientes medios de parentesco de los juveniles reclutados bajo adultos ( $\rho = 0,137$ ) y en letrinas ( $\rho = 0,035$ ) no se modificaron cualitativamente luego de corregirlos a valores relativos al pedigrí ( $\rho^P = 0,130$  y  $\rho^P = 0,021$ , respectivamente). La estimación del coeficiente de parentesco debajo de adultos concuerda con el valor esperado para un pedigrí con mayoría de juveniles medio-hermanos (MH) y algunos hermanos completos (HC) ( $\rho^{MH} = 0,125 < \rho^P < \rho^{HC} = 0,250$ ), en congruencia con las asignaciones categóricas de parentesco (Figura 15). El valor estimado en las letrinas resultó más cercano a cero reflejando la predominancia de juveniles no emparentados. La diferencia entre el coeficiente de parentesco observado y el valor esperado en ausencia de estructuración (permutación de individuos entre réplicas de cada tratamiento) fue notablemente menor en las letrinas que debajo de los adultos (Figura 17). Este resultado indica que la estructuración genética de los juveniles en las letrinas es mucho menos acentuada, y refleja la mayor diversidad de progenitores contribuyentes. No obstante, el coeficiente de parentesco observado en letrinas también excedió el límite superior del intervalo de confianza del 95% estimado para la distribución aleatoria de individuos (Figura 17). Esta observación indica que, aunque en mucho menor grado que debajo de los adultos, existe un cierto grado de estructuración de parentesco de los juveniles reclutados en las letrinas, y nuevamente resulta consistente con la presencia de una cierta proporción de hermanos inferida mediante la reconstrucción del pedigrí (Figura 15).

**Figura 17.** Niveles globales de parentesco entre juveniles de *S. romanzoffiana* reclutados bajo adultos y en letrinas de tapir en el Parque Nacional Iguazú



Nota: los coeficientes de parentesco no están relativizados a valores de pedigrí. Las barras indican el intervalo de confianza del 95% estimado por remuestreo (*Jackknife*) para el valor observado y mediante 1000 permutaciones para el valor obtenido bajo distribución aleatoria.

## Discusión

Utilizando marcadores moleculares evaluamos cuáles son los efectos de la dispersión de semillas por tapires sobre la variabilidad y estructura genética de los juveniles de pindó reclutados en las letrinas. Los juveniles reclutados en las letrinas presentaron una riqueza media de alelos superior a la de juveniles reclutados bajo la copa de palmeras adultas, pero esta diferencia no fue significativa. Por lo tanto, más allá de una tendencia sugerente, no hallamos apoyo estadístico en favor de la hipótesis  $H_1$ . Por otro lado, los resultados obtenidos mediante el análisis de parentesco en los sitios focales corroboraron las hipótesis  $H_2$  y  $H_3$  relativas a la estructura de pedigrí y origen materno de juveniles reclutados en letrinas y bajo adultos. En primer lugar verificamos que los juveniles reclutados en letrinas no representan la progenie de la palmera adulta más cercana ( $H_2$ ). En rigor, esto fue corroborado para un 95% de los juveniles según el método más confiable para la determinación de parentescos (implementado con COLONY2). No obstante, es muy probable que la no exclusión del 5% restante simplemente se deba a la limitación de la capacidad resolutoria del método y los marcadores usados. Incluso es interesante notar que la proporción de juveniles excluidos fue superior a lo esperado según la potencia de exclusión (estándar) estimada para el

conjunto de marcadores ( $P_{EX} = 0,86$ ). La “potencia adicional” probablemente se debe a que el método implementado en COLONY2 usa la información del conjunto de individuos analizados simultáneamente (ver Wang 2007) mientras que la  $P_{EX}$  (estimada con Cervus 3.0.3) se refiere a la capacidad de exclusión para un par aislado de individuos. Respecto a la hipótesis  $H_3$ , nuestros resultados indicaron claramente que la proporción de individuos relacionados (hermanos completos y medio-hermanos) y el coeficiente de parentesco medio son mucho menores en las letrinas que debajo de palmeras adultas. Además, la riqueza y el número efectivo de madres contribuyentes al reclutamiento de juveniles fueron significativamente superiores en las letrinas. La mayor diversidad de madres contribuyentes en las letrinas explica el menor grado de parentesco de los juveniles respecto a aquellos reclutados bajo los adultos. Si bien la diversidad de padres donantes de polen también puede ser mayor en las letrinas (no nos es posible hacer una estimación confiable a partir de nuestros datos), la misma no es independiente de la diversidad materna, pues la heterogeneidad de padres representados en los sitios focales está positivamente correlacionada con el número de madres contribuyentes (Grivet *et al.* 2009). En este sentido, una mayor diversidad de padres representados en las letrinas, que contribuyese a la menor estructuración de parentesco observada, también sería en parte atribuible a la actividad dispersora de los tapires.

Evidentemente la diversidad de madres contribuyentes en las letrinas está estrechamente relacionada con los patrones de forrajeo y defecación del tapir. Según nuestras estimaciones la riqueza media y el número efectivo de madres por letrina fueron de  $N_m \pm DE = 5,75 \pm 1,83$  y  $N_{em} \pm DE = 4,38 \pm 2,20$ , respectivamente. La estimación del número de madres contribuyentes en las letrinas debería corresponder a un valor mínimo debido al supuesto de que todos los medio-hermanos se vinculaban a través de la madre. De hecho, el número de madres estimado sin aplicar esta restricción ascendió a  $N_m \pm DE = 6,63 \pm 1,60$ , aunque esta estimación está obviamente sujeta a una asignación arbitraria de parentales femeninos y masculinos, y como tal, sólo representa un valor posible del número de madres (mayor o menor al número real). Los resultados no dejan duda de que cada letrina contiene más de una madre representada, como se espera si el tapir se alimenta bajo la copa de varias palmeras adultas previamente a cada defecación. Si bien también hallamos más de una madre contribuyente debajo de la mayoría de las palmeras adultas (en este caso el número de madres prácticamente no se vio afectado al relajar el supuesto de medio-hermanos únicamente por parte de la madre), es probable que el tapir generalmente no ingiera las semillas manipuladas previamente (*e.g.*, semillas enterradas o cuya pulpa haya sido removida) al alimentarse bajo las palmeras adultas. Así, es razonable pensar que en cada defecación el tapir



deposita las semillas provenientes de las diversas madres que ha "visitado" durante las rondas de alimentación previas a la defecación. Además, la diversidad materna podría incrementarse por la acumulación de defecaciones en cada letrina. Si bien la estimación del número de defecaciones individuales puede resultar imprecisa debido a que el rastro se va disipando con el paso del tiempo, la correlación positiva entre el número de madres diferentes y el número estimado de defecaciones individuales sugiere que la acumulación de defecaciones contribuye a aumentar la diversidad materna en cada letrina. Asimismo cabe notar que aún en aquellas letrinas en las que sólo era evidente la presencia de una defecación ( $n = 3$  letrinas) hallamos 4 – 5 madres contribuyentes. En conjunto, estos resultados sugieren que tanto el patrón de forrajeo previo a cada defecación, como el número de defecaciones acumuladas con el tiempo, determinan la diversidad de madres representadas en las letrinas. Además, al igual que la cantidad de juveniles reclutados, es esperable que la diversidad de genotipos maternos esté positivamente correlacionada con la frecuencia de uso del área por los tapires.

El estudio de otros sistemas ha revelado algunos efectos del comportamiento, frecuentemente estereotipado, de los dispersores sobre la diversidad de madres representadas en los sitios focales asociados a la dispersión (García y Grivet *et al.* 2011). Por ejemplo, el número efectivo promedio de madres contribuyentes en los "graneros" donde el pájaro carpintero *Melanerpes formicivorus* acumula bellotas de roble ha sido estimado en valores de  $N_{em} = 2 - 2,4$  (Grivet *et al.* 2005, Scofield *et al.* 2010, Scofield *et al.* 2012), pudiendo alcanzar un valor más elevado ( $N_{em} = 5,8$ ) en ciertos sitios geográficos (Scofield *et al.* 2011). También se ha encontrado (Grivet *et al.* 2009) que las plántulas de roble (*Q. lobata*) agrupadas en sitios abiertos fuera del bosque como producto de la dispersión por diversos agentes provienen de un número efectivo de madres mayor que aquellas plántulas reclutadas bajo la copa de robles adultos ( $N_{em} = 2,7$  vs  $N_{em} = 1,1$ , respectivamente). Dicho estudio (Grivet *et al.* 2009) demostró además que la diversidad de padres de las plántulas dispersadas también era mayor que bajo la copa de los adultos debido al efecto indirecto de contribuciones maternas más heterogéneas. Una diversidad de madres contribuyentes notablemente más elevada ( $N_{em} = 26 - 27$ ), y superior a la estimada en sitios localizados al azar, ha sido reportada para las semillas (ya germinadas) de la palmera *O. bataua* depositadas por el ave *Cephalopterus penduliger* en sus sitios de cortejo (*leks*) (Karubian *et al.* 2010, Scofield *et al.* 2012).

Asimismo, los resultados de los estudios mencionados en el párrafo anterior indican que el grado de estructuración de parentesco en los sitios focales también depende de los distintos patrones de forrajeo de los dispersores. Por ejemplo, se ha observado típicamente que, además de

la baja diversidad de madres contribuyentes, los graneros de *M. formicivorus*, poseen una baja superposición materna (*i.e.*, la probabilidad de que dos semillas de distintos graneros compartan un origen materno). Este patrón de estructuración marcada refleja el hecho de que estas aves suelen recolectar las bellotas de unos pocos árboles adultos cercanos a sus graneros dentro del territorio que defienden (Grivet *et al.* 2005, Scofield *et al.* 2011, 2012). En contraste, la estructuración espacial de parentesco de las semillas de palmera en los sitios de cortejo de *C. penduliger* es mucho menos acentuada, indicando que la dispersión por esta ave tiende a mezclar y homogeneizar los genotipos maternos de las semillas en el espacio (Karubian *et al.* 2010).

Nuestros resultados sugieren fuertemente que la dispersión por tapires produce sitios (letrinas) de alto reclutamiento de juveniles que provienen de una diversidad considerable de madres contribuyentes. Esta conclusión debe interpretarse teniendo en cuenta algunos factores que discutimos a continuación. En primer lugar, la estimación del número efectivo de madres contribuyentes en las letrinas ( $N_{em} = 4,4$ ) está hecha para los juveniles ya reclutados, lo cual tiene dos implicancias: i) la inferencia indirecta de los genotipos maternos por reconstrucción genealógica a partir de los genotipos de los juveniles probablemente haya conducido a una subestimación de la diversidad materna (ver fundamentación en Materiales y Métodos); ii) la diversidad de madres representadas en los juveniles probablemente sea menor que en las semillas debido a la pérdida de individuos que naturalmente ocurre entre ambos estadios. Por ende, una asignación directa de los genotipos maternos (Godoy y Jordano 2001, Ziegenhagen *et al.* 2003) de las semillas acumuladas en las letrinas probablemente revelaría un mayor número efectivo de madres. En segundo lugar, es importante considerar que la estima de diversidad materna (y de diversidad genética en general) está obviamente sujeta a la dimensión espacial del muestreo realizado. En nuestro caso hemos tomado una delimitación de los sitios focales estudiados (bajo adultos y letrinas) netamente operativa y funcional a nuestros propósitos. La escala de agrupamiento espacial de heces en sitios con actividad de tapires sin duda excede el tamaño de  $\sim 28 \text{ m}^2$  definido operativamente para cada letrina (ver por ejemplo la distribución de heces recientes en parcelas dentro del Parque; Figura 19, Capítulo IV). Es evidente que al ampliar el tamaño de las letrinas, la diversidad de genotipos maternos debería aumentar; sobre todo cada vez que se incluyan otras defecaciones individuales.

En base a estas consideraciones, nuestros resultados indican que, en términos comparativos, las letrinas de tapir contienen claramente una mayor diversidad de madres representadas que los graneros de *M. formicivorus*. En el caso de los sitios de cortejo de *C. penduliger* la diversidad materna fue estimada a partir de semillas en parcelas circulares de 10 m de diámetro ( $\sim 79 \text{ m}^2$ )

(Karubian *et al.* 2010). Así, la comparación sugiere que la diversidad de madres en las letrinas de tapir no llega a ser tan elevada como en los sitios de cortejo de dicha ave, aún si se equiparasen las áreas definidas para ambos sitios focales (Letrinas:  $N_{em} = 4,4$  en  $28 \text{ m}^2$  vs *Leks*:  $N_{em} = 26$  en  $79 \text{ m}^2$ ); salvo que una ampliación del área de letrina aumentase en forma desproporcionada el número efectivo de madres contribuyentes. Por otro lado, si bien nosotros no analizamos la superposición materna (*sensu* Grivet *et al.* 2005) como medida de similitud/diferenciación entre juveniles reclutados en distintas letrinas o bajo distintos adultos, la estimación del coeficiente medio de parentesco respecto al valor esperado en ausencia de estructuración (*i.e.*, distribución aleatoria de los genotipos) provee una información similar. El grado de diferenciación genética entre juveniles de distintas letrinas es notablemente menos acentuado que para juveniles reclutados bajo adultos, y difiere mucho menos (aunque significativamente) respecto a lo esperado en ausencia de estructuración (Figura 17). Este patrón refleja una mayor mezcla de genotipos en las letrinas y sugiere un efecto de homogeneización genética semejante al producido en los sitios de cortejo de *C. penduliger* (Karubian *et al.* 2010), y es contrastante con la marcada estructuración en los graneros de *M. formicivorus* (Grivet *et al.* 2005, Scofield *et al.* 2010, 2011, 2012). Finalmente, cabe mencionar que la permanencia del "rastros" de estructura genética asociado a la dispersión por estos vertebrados dependerá de la contribución de las semillas dispersadas al reclutamiento de estadios sucesivos. Por lo tanto, si bien la diversidad de madres estimada para las semillas depositadas en sitios focales refleja con mayor precisión los patrones comportamentales de los dispersores, el análisis de la diversidad en estadios post-germinación puede ser más relevante para evaluar los efectos de la dispersión efectiva sobre la estructura genética de la población vegetal en cuestión. Por ejemplo, la marcada estructuración materna de las semillas acumuladas en los graneros de *M. formicivorus* podría tener un impacto insignificante sobre la estructura genética de la población de robles dado que la mayoría de las bellotas dispersadas no logran germinar (Scofield *et al.* 2012). En cambio, en el caso de la dispersión de pindó por tapires, sabemos en principio que la cantidad de individuos reclutados en estadios tempranos es mayor en las áreas de letrinas que en cualquier otro sitio (Capítulo I), lo cual permite presuponer algún efecto sobre la estructura genética emergente de la población.

La estimación de las distancias de dispersión efectiva para semillas de pindó resultantes de la actividad dispersora del tapir permanece aún como un desafío. Hasta el momento no es posible abordar esta cuestión con métodos moleculares, al menos en áreas continuas de bosque donde se requeriría el muestreo exhaustivo de un número excesivamente grande de madres candidatas dada la escala espacial en la que normalmente se desplazan los tapires. No obstante, en virtud de las

extensiones de territorio usualmente utilizadas por este frugívoro y el tiempo prolongado de retención en el tracto digestivo, podemos suponer que dichas distancias son de una magnitud considerable (en el orden de varios cientos y probablemente miles de metros).

### **Conclusiones**

Los juveniles de pindó reclutados en cada letrina de tapir no presentan relaciones de parentesco cercano en su mayoría, y provienen de diversas madres contribuyentes. La diversidad de madres representadas en cada letrina muy probablemente esté determinada tanto por el patrón de forrajeo de los tapires (cantidad de palmeras adultas visitadas) como por la frecuencia de uso de la letrina. Todas estas características, en conjunto con las evidencias acerca del efecto de este dispersor sobre los niveles de reclutamiento (Capítulo I), nos permiten concluir que el tapir realiza una contribución significativa al flujo génico contemporáneo mediado por la dispersión de semillas en las poblaciones de pindó. Ante la extinción del tapir, las poblaciones de pindó perderían un componente fundamental del flujo génico (además del considerable aporte al reclutamiento de juveniles que provee este frugívoro; ver Capítulo I).



## CAPÍTULO IV

EFECTOS DE LA DEFAUNACIÓN SOBRE EL RECLUTAMIENTO Y LA VARIACIÓN GENÉTICA DEL  
PINDÓ EN ESTADIOS TEMPRANOS**Introducción**

El interés por comprender los efectos del disturbio humano sobre el flujo génico y la variabilidad genética de las poblaciones vegetales ha sido motivo de numerosos trabajos en las últimas dos décadas (*e.g.*, Templeton *et al.* 1990, Barret y Kohn 1991, Ellstrand y Elam 1993, Young y Merriam 1994, Young *et al.* 1996, Hamrick 2004, Lowe *et al.* 2005). La fragmentación y/o defaunación del hábitat pueden alterar los patrones dispersivos del polen y las semillas al restringir el movimiento de los agentes dispersores o provocar su desaparición. Así, podría esperarse que el disturbio del hábitat tenga un impacto directo en el flujo génico y, consecuentemente, en la diversidad y estructura genética de las plantas (Young *et al.* 1996). Si el flujo génico disminuye, es esperable un aumento de la estructuración genética y de la endogamia, una pérdida de diversidad genética, y posteriores efectos perjudiciales para las poblaciones vegetales (Charlesworth y Charlesworth 1987, Young *et al.* 1996, Hedrick 2005, Lowe *et al.* 2005, Hirao 2010; ver sección 3.2 de la Introducción General para más referencias).

Llamativamente, muchos de los estudios que han comparado áreas boscosas degradadas con áreas continuas no han encontrado indicios claros de las consecuencias genéticas que se esperan frente a la interrupción del flujo génico (ver revisiones de Lowe *et al.* 2005, Sork y Smouse 2006, y Kramer *et al.* 2008; sin embargo ver Aguilar *et al.* 2008). En general no se ha detectado disminución de la diversidad genética en términos de heterocigosidad esperada, aunque en varios casos se ha reportado pérdida de riqueza alélica (*e.g.*, Hall *et al.* 1996, Dayanandan *et al.* 1999, White *et al.* 1999, Young *et al.* 1999, Jump y Peñuelas 2006). La diferencia entre ambos estimadores de la variabilidad genética concuerda con la expectativa teórica de que la reducción del tamaño de la población (cuello de botella) afecta en forma inmediata al número de alelos y no a la heterocigosidad (Nei *et al.* 1975, Young *et al.* 1996, Luikart y Cornuet 1998, Lowe *et al.* 2005). Al igual que la riqueza alélica, se espera que el nivel de endogamia ( $F_{is}$ ) sea sensible a perturbaciones recientes (Lowe *et al.* 2005), y de acuerdo a estas expectativas, se ha detectado un aumento de la endogamia en algunas poblaciones fragmentadas (Aldrich y Hamrick 1998, Jump y Peñuelas 2006, Dubreuil *et al.* 2010). Sin embargo, este efecto tampoco ha sido observado

consistentemente (Lowe *et al.* 2005, Kramer *et al.* 2008). En algunos estudios la ausencia total de diferencias significativas en las variables genéticas utilizadas para comparar áreas continuas versus fragmentadas ha sido notable (*e.g.*, Collevatti *et al.* 2001, Moreira *et al.* 2009). En suma, las evidencias que apoyan las predicciones de efectos perjudiciales por reducción del flujo génico han sido relativamente escasas, en algunos casos ambiguas, y en otros, aparentemente contradictorias. No obstante, hay dos factores principales que pueden dar cuenta de estos resultados inesperados: i) con frecuencia la premisa de una reducción del flujo génico vía dispersión de polen o semillas en áreas fragmentadas no se cumple (*e.g.* Nason y Hamrick 1997, Dick *et al.* 2001, White *et al.* 2002, Bacles *et al.* 2006, Bittencourt y Sebbenn 2007, Hanson *et al.* 2007, Hanson *et al.* 2008, Vanden-Broeck *et al.* 2011); ii) la mayor parte de la fragmentación de selvas es reciente (20 – 200 años) y las especies arbóreas suelen ser longevas (> 50 años), por lo cual muchos de los individuos muestreados representan más bien el acervo génico pre-disturbio (Aldrich *et al.* 1998, Collevatti *et al.* 2001, Lowe *et al.* 2005, Kramer *et al.* 2008). Este último aspecto explica por qué los efectos genéticos esperados frente al disturbio se han detectado más frecuentemente en las progenies, y señala la importancia de analizar la variación genética en las cohortes más recientes (Aguilar *et al.* 2008).

En la gran mayoría de los estudios citados en el párrafo anterior se han analizado los efectos del flujo génico total o se ha hecho énfasis en la contribución del polen, pero en ninguno de estos trabajos se ha evaluado específicamente el impacto de la disrupción de los mutualismos planta-dispersor sobre la estructura genética de las plantas. Un efecto inmediato de la defaunación, y consecuente pérdida de los dispersores, debería ser la acumulación de semillas y plántulas debajo del árbol materno en las áreas defaunadas. Algunos trabajos han encontrado que en ambientes de selva degradada con menor abundancia de vertebrados respecto a las áreas prístinas, la disminución de la dispersión producía una acumulación de semillas debajo de los árboles adultos (Guariguata 2002, Forget y Jansen 2007, Cramer *et al.* 2007b, Wang *et al.* 2007). Asimismo, en otros estudios se ha verificado que la densidad de juveniles reclutados en torno a los adultos aumentaba en las áreas defaunadas (Wright y Duber 2001, Cordeiro y Howe 2003). No obstante, la demostración de una acumulación de semillas o plántulas debajo del árbol materno como producto de la defaunación requiere tanto de la cuantificación de las semillas o plántulas bajo los adultos conespecíficos, como del análisis genético para determinar el parentesco respecto a dichos adultos. En este sentido, los estudios que han determinado el origen materno de las semillas o plántulas reclutadas debajo de árboles adultos son mucho más escasos.

En una zona boscosa de Bolivia, Pacheco y Simonetti (2000) compararon la estructura genética de *Inga ingoides*, una especie arbórea dispersada principalmente por monos araña (*Ateles*

*paniscus*), entre un área donde el dispersor estaba presente y otra donde estaba localmente extinto debido a la caza. Los autores hallaron que debajo de la copa de adultos la proporción de plántulas provenientes de semillas dispersadas (*i.e.*, que no eran hijas del adulto en cuestión) era mayor en el área donde el dispersor estaba presente. Asimismo observaron un mayor grado de parentesco en los grupos de plántulas en el área donde el dispersor estaba ausente. Por otro lado, el grado de diferenciación genética entre subgrupos de individuos separados por distancias similares a las que suele desplazarse el dispersor (~1 km) fue significativamente menor en el área donde estaba el dispersor, conforme a lo que se esperaba por mayor nivel de flujo génico mediado por la dispersión de semillas. Sin embargo, este último resultado no fue consistente en el segundo año de estudio. En otro estudio realizado en Camerún con una especie arbórea (*Antrocaryon klaineianum*), usualmente dispersada por elefantes y diversos primates, Wang *et al.* (2007) compararon la proporción de semillas dispersadas bajo la copa de árboles adultos en un área de selva protegida y otra con intensa presión de caza. En concordancia con el trabajo de Pacheco y Simonetti (2000), la proporción de semillas dispersadas bajo la copa de adultos conoespecíficos fue notablemente menor en el área defaunada.

Ante el inminente disturbio humano de los ecosistemas en gran parte del planeta, la comprensión de los efectos de la fragmentación y defaunación sobre el flujo génico mediado por la dispersión de semillas (y polen) y la estructura genética de las plantas resulta de vital importancia. La notable degradación que ha sufrido la Selva Paranaense (ver Introducción General), involucrando en muchos casos la desaparición de animales dispersores de semillas, provee un contexto adecuado para evaluar dichos efectos. En particular, la comparación de la variación genética de las nuevas cohortes de pindó entre áreas que preservan su ensamble completo de dispersores y áreas defaunadas, donde el tapir se encuentra localmente extinto, debería aportar información relevante sobre los efectos recientes de la defaunación.

La ausencia de dispersores, y en particular de tapires, fuera de áreas protegidas y suficientemente extensas debería restringir el movimiento de los genes (y genotipos) en la población, y por consiguiente debería tener un efecto notable en la variabilidad y estructuración genética de las nuevas cohortes de pindó. Es esperable que en las áreas defaunadas se reclute una mayor proporción de juveniles en el entorno de la planta madre, y que este efecto incremente el nivel de estructuración genética espacial (*i.e.*, correlación entre parentesco y distancia física). Asimismo, en áreas defaunadas la contribución de variantes alélicas que pudiesen provenir de semillas dispersadas debería estar restringida, resultando en una menor riqueza alélica representada en los juveniles. En contraste, una mayor abundancia de dispersores, y sobre todo la actividad de los tapires que, según demostramos en el Capítulo III, produce la mezcla de genotipos



no emparentados en los sitios de mayor reclutamiento (letrinas), deberían contribuir a disminuir la estructura genética espacial e incrementar la riqueza alélica de los juveniles reclutados en áreas protegidas.

Como objetivo específico, nos propusimos evaluar los efectos producidos por la defaunación sobre la variabilidad y estructura genética de las nuevas cohortes de pindó en la Selva Paranaense. Teniendo en cuenta los aspectos desarrollados en los párrafos anteriores, planteamos las siguientes hipótesis relativas al efecto de la defaunación: H<sub>1</sub>) el número de juveniles reclutados bajo la copa de palmeras adultas es mayor en áreas defaunadas respecto a áreas protegidas; H<sub>2</sub>) la proporción de juveniles provenientes de semillas dispersadas bajo la copa de palmeras adultas es mayor en áreas protegidas respecto a áreas defaunadas; H<sub>3</sub>) en las áreas defaunadas la riqueza alélica de los juveniles es menor que en sitios que contienen el ensamble completo de dispersores, mientras que la diversidad génica (*i.e.*, heterocigosidad esperada) no se ve afectada; H<sub>4</sub>) la estructura genética espacial de juveniles reclutados en las áreas defaunadas es más acentuada que en sitios que contienen el ensamble completo de dispersores.

### **Materiales y Métodos**

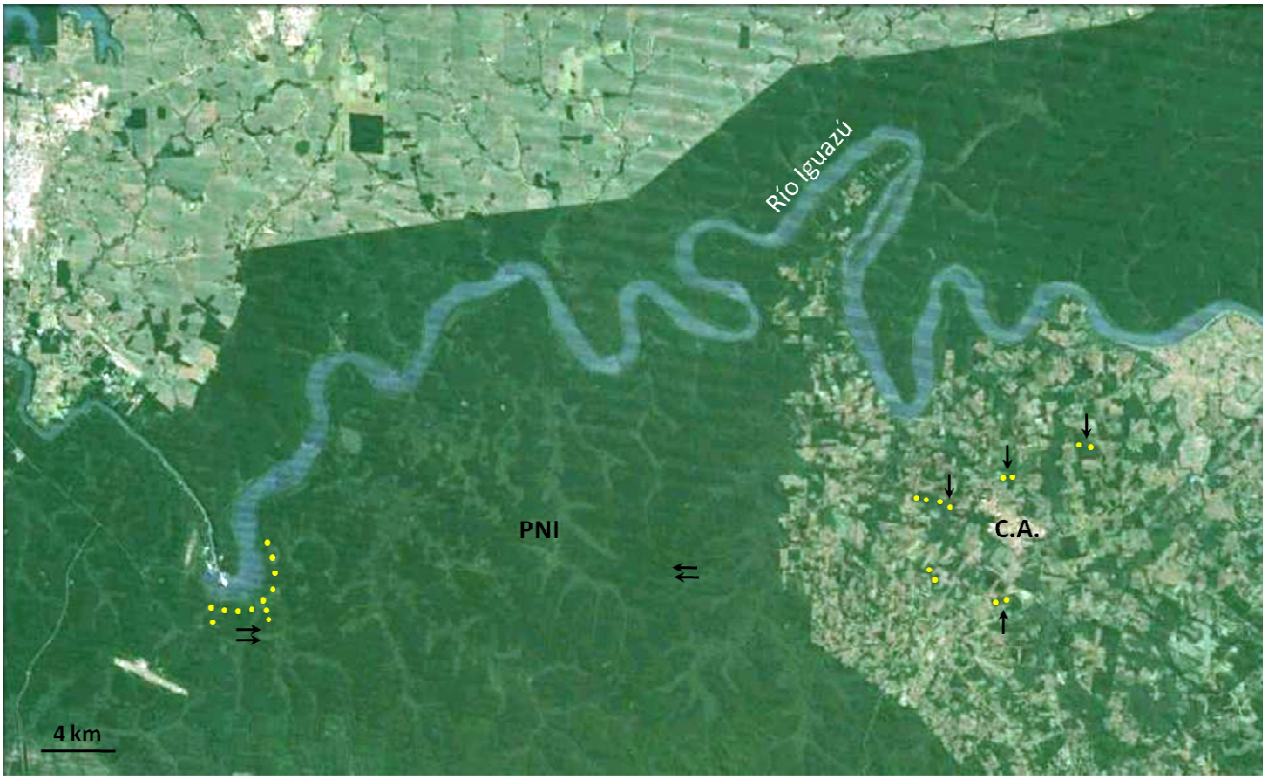
**Áreas de estudio.** El trabajo fue realizado en el Parque Nacional Iguazú, cuyas características ya fueron descriptas (ver Capítulo I), y en el área degradada de los alrededores de la localidad de Comandante Andresito (-25°40'S -54°02'O), Departamento de General Manuel Belgrano. Dicha localidad está situada a unos 11 km al este del Parque Nacional Iguazú (Figura 18). Hasta la década de 1970 esta zona mantuvo una baja densidad de población. Sin embargo la población se fue incrementando y en la década de 1990 la localidad pasó a ser la más importante del Departamento, albergando a más de 14.000 habitantes (INDEC 2001). Los alrededores de Andresito presentan un claro impacto ambiental debido al poblamiento humano y a las actividades económicas que allí se realizan. La región se caracteriza por retener fragmentos boscosos inmersos en una matriz de campos de cultivo y ganadería (Figura 18). Los cultivos más frecuentes son la yerba mate, el té y el tabaco. También son abundantes los cultivos forestales como el pino, el pino paraná, el cedro australiano, y el paraíso. Los tipos de selva que pueden hallarse representados en los fragmentos de bosque remanentes son equivalentes a aquellos presentes en el Parque Nacional Iguazú. Muchos de estos fragmentos mantienen más o menos bien preservada la estructura vegetal, pero han sufrido una intensa presión de caza<sup>†</sup> que ha reducido las poblaciones de

---

<sup>†</sup> Durante el trabajo a campo en la zona tuvimos oportunidad de observar apostaderos de cazadores, saleros, e incluso la persecución de una corzuela por perros.

mamíferos y otros vertebrados, llegando incluso a la extinción local de algunas especies como en el caso del tapir (Giraudo y Abramson 2000, Giraudo y Povedano 2003).

**Figura 18.** Áreas de estudio y ubicación aproximada de los sitios focales y parcelas de muestreo



PNI: Parque Nacional Iguazú; C.A.: Comandante Andresito. Nótese la pérdida de cobertura boscosa y el alto grado de fragmentación fuera del Parque. La ubicación aproximada de los 12 adultos focales dentro del Parque y en los fragmentos boscosos de los alrededores de C. Andresito se indica con puntos amarillos. Las flechas negras apuntan a la ubicación aproximada de las parcelas de 100 m x 10 m.

**Evaluación a campo y toma de muestras.** Evaluamos el reclutamiento de juveniles debajo de 12 adultos situados en seis fragmentos boscosos del área degradada y debajo de 12 adultos dentro del Parque Nacional Iguazú (Figura 18). Los fragmentos boscosos estaban situados a 2,5 – 5,5 km del casco de la localidad de C. Andresito (Figura 18) y tenían un área de entre 20 y 150 ha. En todos los casos los adultos focales estuvieron distanciados entre sí a no menos de 350 m. Debajo de cada adulto focal establecimos una parcela circular de 3 m de radio centrada en el estípite de dicho adulto y contabilizamos a todos los juveniles presentes. Además colectamos tejido de ocho adultos y de 16 juveniles reclutados bajo sus copas en el área defaunada para analizar la variación genética y la estructura de parentescos y compararla con el patrón observado bajo los adultos dentro del Parque (Capítulo III).

Para estimar la variabilidad genética (riqueza alélica y diversidad génica) y el nivel de estructura genética espacial de los juveniles tomamos muestras de 50 juveniles en cuatro parcelas de 100 m de largo y 10 m de ancho establecidas en el área defaunada (D1 – D4) y dentro del

Parque (P1 – P4). En el área defaunada las parcelas fueron establecidas en cuatro fragmentos boscosos (Figura 18) y en el Parque fueron establecidas en aquellas porciones de las parcelas de 500 m x 50 m (*Parcelas 1 y 2*, Figura 3; Figura 18) en las que habíamos registrado letrinas de tapir y mayor número de juveniles (ver Capítulo I). En aquellos sitios donde la densidad de la vegetación no permitía el relevamiento de algún tramo, la dimensión mayor de la parcela se extendió algo más de 100 m para compensar la extensión del área muestreada. Todos los juveniles presentes en las parcelas fueron contabilizados, y la posición de cada juvenil fue referenciada a un sistema de coordenadas  $X,Y$  (distancia longitudinal, distancia transversal) establecido en cada parcela (Figura 19) a partir de mediciones hechas con una cinta métrica. El tejido colectado de cada juvenil fue identificado con un rótulo y preservado en sílica-gel. Dado que la densidad local de árboles adultos (posibles madres contribuyentes) puede influir sobre el nivel de estructuración genética espacial de los juveniles (Hamrick *et al.* 1993, Vekemans y Hardy 2004), contamos el número de palmeras adultas circundantes extendiendo las parcelas a 140 m de largo y 40 m de ancho (Figura 19).

Los procedimientos experimentales y marcadores moleculares usados para el análisis genético fueron los mismos que se detallaron en el Capítulo III.

### **Análisis de datos**

#### **Reclutamiento, variabilidad genética y parentesco de juveniles bajo los adultos focales.**

Para evaluar la hipótesis  $H_1$  comparamos el reclutamiento de juveniles de pindó debajo de palmeras adultas entre el área degradada y el Parque Nacional Iguazú. La comparación fue realizada mediante una prueba de Mann-Whitney de 1 cola (Sokal y Rohlf 1995) utilizando el programa STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc. 2001).

Los datos genéticos de los adultos focales y juveniles reclutados bajo sus copas en el Parque son los mismos que aquellos analizados en el Capítulo III. La estimación de la diversidad génica ( $H_e$ ) y riqueza alélica ( $A$ ), y los análisis de exclusión materna, parentesco entre juveniles y diversidad de madres contribuyentes en el área defaunada fueron realizados siguiendo los métodos detallados en el Capítulo III. Para evaluar específicamente la hipótesis  $H_2$ , comparamos la proporción de juveniles excluidos (*i.e.*, provenientes de semillas dispersadas) debajo de los adultos focales entre el área defaunada y el Parque con una prueba de Mann-Whitney de 1 cola utilizando el programa STATISTICA 6.0.

**Variabilidad y estructura genética espacial.** Para evaluar la hipótesis  $H_3$  comparamos la riqueza alélica y la diversidad génica de los juveniles muestreados en las parcelas mediante el test no paramétrico de Wilcoxon para muestras pareadas (Sokal y Rohlf 1995), conforme a la

fundamentación expuesta en el Capítulo III acerca de la comparación de variabilidad con múltiples marcadores. Utilizamos el programa STATISTICA 6.0 para efectuar dicha prueba.

Para analizar la estructura genética espacial y evaluar la hipótesis  $H_4$  utilizamos dos programas, SPAGeDi 1.4 (Hardy y Vekemans 2002) y GenAlEx 6.5 (Peakall y Smouse 2006, 2012), que implementan métodos con algunas diferencias y pueden ser usados complementariamente. Este tipo de análisis está basado en métodos de autocorrelación y nos permite examinar la relación entre el grado de parentesco (similitud genética) y la distancia física entre individuos, la cual es considerada explícitamente a partir de los datos espaciales (Sokal *et al.* 1997, Hardy y Vekemans 1999, Epperson 2004).

En el análisis realizado con SPAGeDi 1.4 estimamos el coeficiente de parentesco entre individuos utilizando el estimador  $\rho_{ij}$  propuesto por Loiselle *et al.* (1995). Preferimos este estimador ya que no asume equilibrio de Hardy-Weinberg, es relativamente potente para detectar estructuración genética espacial, y sufre menos sesgo que otros estimadores ante la presencia de alelos de baja frecuencia (Vekemans y Hardy 2004). Además ha sido utilizado frecuentemente en otros trabajos para estudiar estructura genética espacial (*e.g.*, Heuertz *et al.* 2003, Pardini y Hamrick 2008, De-Lucas *et al.* 2009). Para calcular  $\rho_{ij}$  utilizamos las frecuencias alélicas de referencia estimadas de la muestra global de individuos (ver Apéndice 2) por las razones expuestas anteriormente (Capítulo III). La significancia estadística de la autocorrelación (parentesco vs logaritmo de la distancia entre individuos) se determinó evaluando si el valor observado de la pendiente ( $b_\rho$ ) era menor al límite inferior del intervalo de confianza del 95% (prueba de 1 cola) obtenido para una distribución espacial aleatoria de los individuos luego de realizar 1000 permutaciones de la posición de los juveniles en la parcela. Esta prueba equivale al test de Mantel (Mantel 1967, Vekemans y Hardy 2004). La significancia de  $b_\rho$ , evaluada en cada una de las ocho parcelas, fue ajustada con el procedimiento secuencial de Bonferroni mediante el programa SGoF+ (Carvajal-Rodríguez y de Uña-Álvarez 2011) para mantener un nivel de error global de tipo I de  $\alpha = 0,05$ . Además calculamos los límites de confianza del 95% del valor de  $b_\rho$  estimado en cada sitio como  $b_\rho \pm 2DE$ , donde  $DE$  corresponde al desvío estándar calculado mediante el procedimiento de remuestreo de *Jackknife* sobre los distintos loci. Los intervalos de distancia ( $I_i$ ) para el análisis de los autocorrelogramas fueron definidos (en escala logarítmica) de la siguiente forma:  $I_1$ : 0 – 5 m,  $I_2$ : >5 – 10 m,  $I_3$ : >10 – 20 m,  $I_4$ : >20 – 40 m,  $I_5$ : >40 – 80 m,  $I_6$ : >80 – distancia máxima. De esta forma aseguramos un número elevado de comparaciones (>100) entre pares de individuos para la mayoría de los intervalos de distancia en todos los autocorrelogramas, y que la estimación de  $\rho_1$  (ver abajo) fuese hecha a partir de los juveniles

vecinos en un radio  $\leq 5$  m. Para cada intervalo de distancia determinamos la significancia de  $\rho$  evaluando si los valores medios observados excedían los límites del intervalo de confianza del 95% resultante de las 1000 permutaciones (prueba de 2 colas). Finalmente, siguiendo las recomendaciones de Vekemans y Hardy (2004), cuantificamos el nivel global de estructuración mediante el estadístico  $Sp = -b\rho/(1-\rho_1)$ , donde  $\rho_1$  corresponde al coeficiente de parentesco medio entre los vecinos más cercanos. El estadístico  $Sp$  es una medida resumida de la intensidad de la estructuración y tiene la ventaja de ser muy poco sensible al esquema de muestreo (*i.e.*, escala espacial, densidad de individuos muestreados, etc). Por ende, el valor de  $Sp$  puede ser comparado entre distintas especies, poblaciones, o sitios, como en nuestro caso (Hardy *et al.* 2006, Zeng *et al.* 2010). Las características de estos métodos de análisis se explican detalladamente en Vekemans y Hardy (2004) y en el manual de uso de SPAGeDi 1.4.

Mediante el programa GenAlEx 6.5 realizamos pruebas de heterogeneidad de los perfiles de autocorrelación con el método desarrollado por Smouse *et al.* (2008). Este método está basado en un coeficiente ( $r$ ) de correlación o afinidad genética entre individuos, análogo al coeficiente de parentesco  $\rho$ . El coeficiente  $r$  no incluye información de las frecuencias alélicas de la población, sino que depende sólo de la proporción de alelos compartidos entre el par de genotipos comparados (Smouse y Peakall 1999, Smouse *et al.* 2008). No obstante, ambos coeficientes, al igual que otros estimadores de parentesco o similitud genética, proveen información muy similar y deberían conducir generalmente a los mismos resultados (Smouse *et al.* 2008). Utilizamos el mismo conjunto de intervalos de distancia que en el análisis anterior. Mediante las pruebas de heterogeneidad evaluamos específicamente: i) si los autocorrelogramas de los distintos sitios (parcelas) en cada área (defaunada o Parque) eran homogéneos (estadístico  $\omega_E$  para los correlogramas en cada área), ii) si los autocorrelogramas resultantes (*i.e.*, combinación de correlogramas de los sitios) en cada área presentaban un perfil “plano” en el cual  $r = 0$  para todos los intervalos de distancia (estadístico  $\omega_D$  en cada área), iii) si el correlograma resultante en el área defaunada difería estadísticamente del correlograma resultante en el Parque (estadístico  $\omega_E$  para comparación del área defaunada vs Parque), y iv) qué intervalos de distancia presentaban valores más divergentes de  $r$  entre los correlogramas resultantes (estadístico  $t^2$  para cada intervalo). Al igual que para el análisis implementado con SPAGeDi 1.4, las significancias estadísticas fueron evaluadas realizando 1000 permutaciones de las posiciones de los individuos. En el manual de uso de GenAlEx 6.5 y en Smouse *et al.* (2008) puede encontrarse información más detallada sobre estos métodos de análisis.

**Análisis de variables genéticas relacionadas al sistema de apareamiento y al flujo de polen.** Estimamos el nivel de endogamia, la tasa de autofecundación y la diversidad de donantes efectivos de polen para los adultos focales. La comparación de estas estimaciones entre el área defaunada y el Parque nos permitió considerar los posibles efectos de estos factores sobre los patrones observados de variabilidad y estructura genética.

El coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) fue estimado a partir de los juveniles muestreados en las parcelas de 100 m x 10 m en el área defaunada y en el Parque. Este coeficiente es afectado tanto por la tasa de autofecundación como por la reproducción entre individuos emparentados (endogamia biparental), y representa una medida de la desviación respecto al apareamiento aleatorio de los individuos (Hardy 2003, Hedrick 2005). En el contexto de una muestra de individuos para los que no se tiene información de su genealogía (pedigrí), el coeficiente  $F_{is}$  estima la probabilidad de identidad entre dos genes homólogos (alelos) tomados del mismo individuo respecto a la probabilidad de identidad entre dos alelos tomados al azar de la muestra o población de referencia (Rousset 2002, Hardy 2003, Vekemans y Hardy 2004). Utilizamos el programa SPAGeDi 1.4 (Hardy y Vekemans 2002) para estimar el  $F_{is}$  como el coeficiente de parentesco entre alelos de un mismo individuo, según el estimador ( $\rho_{ij}$ ) de Loiselle *et al.* (1995). Las frecuencias alélicas de referencia requeridas para el cálculo de  $F_{is}$  fueron estimadas a partir de la muestra global (ver Apéndice 2). La significancia estadística de  $F_{is}$  fue evaluada comparando el valor observado con el intervalo de confianza (95%) bajo la hipótesis nula (apareamiento aleatorio) luego de realizar 1000 permutaciones de los alelos entre todos los individuos de la muestra.

Por otro lado, estimamos la diversidad de padres (donantes de polen) de los juveniles reclutados bajo los adultos focales en el área defaunada y en el Parque, y la tasa de autofecundación ( $s$ ). Estas estimaciones fueron realizadas a partir de la reconstrucción de los pedigrís de los juveniles efectuada con COLONY2 (Jones y Wang 2010), en los cuales se infiere la identidad (genotipo) de los parentales (Wang y Santure 2009, Wang *et al.* 2012). Para estimar la diversidad de padres donantes de polen descartamos a aquellos juveniles que habían sido excluidos como hijos de cada adulto focal, para los cuales resultaría imposible distinguir entre su parental femenino y masculino. Esta misma restricción (*i.e.*, el descarte de juveniles provenientes de semillas dispersadas) también fue utilizada para una de las estimaciones de  $s$ . De esta forma obtuvimos un diseño análogo a las colecciones de progenies (Ritland 2002) en el que la identidad de la madre (adulto focal) es conocida facilitando la determinación de los padres. Calculamos  $s$  como la proporción de juveniles para los cuales el adulto focal fue asignado como madre y padre (Wang *et al.* 2012). Dado que el método para estimar  $s$  propuesto por Wang *et al.* (2012) no

requiere necesariamente el muestreo de progenies de madres conocidas, sino simplemente una muestra de individuos de la población,  $s$  también fue estimada sin descartar a los juveniles provenientes de semillas dispersadas, y a partir de los juveniles muestreados en las parcelas. La diversidad de padres donantes de polen fue cuantificada en términos de la riqueza ( $N_p$ ) y del número efectivo de padres ( $N_{ep}$ ) en forma análoga a la cuantificación de la diversidad de madres en los sitios focales realizada en el Capítulo III. Comparamos  $N_p$  y  $N_{ep}$  entre el Parque y los fragmentos con una prueba de Mann-Whitney empleando el programa STATISTICA 6.0.

**Figura 19.** Esquema espacial de las parcelas de muestreo de juveniles de *S. romanzoffiana* en el área defaunada (parcelas D1 – D4; panel A) y en el Parque Nacional Iguazú (parcelas P1 – P4; panel B).

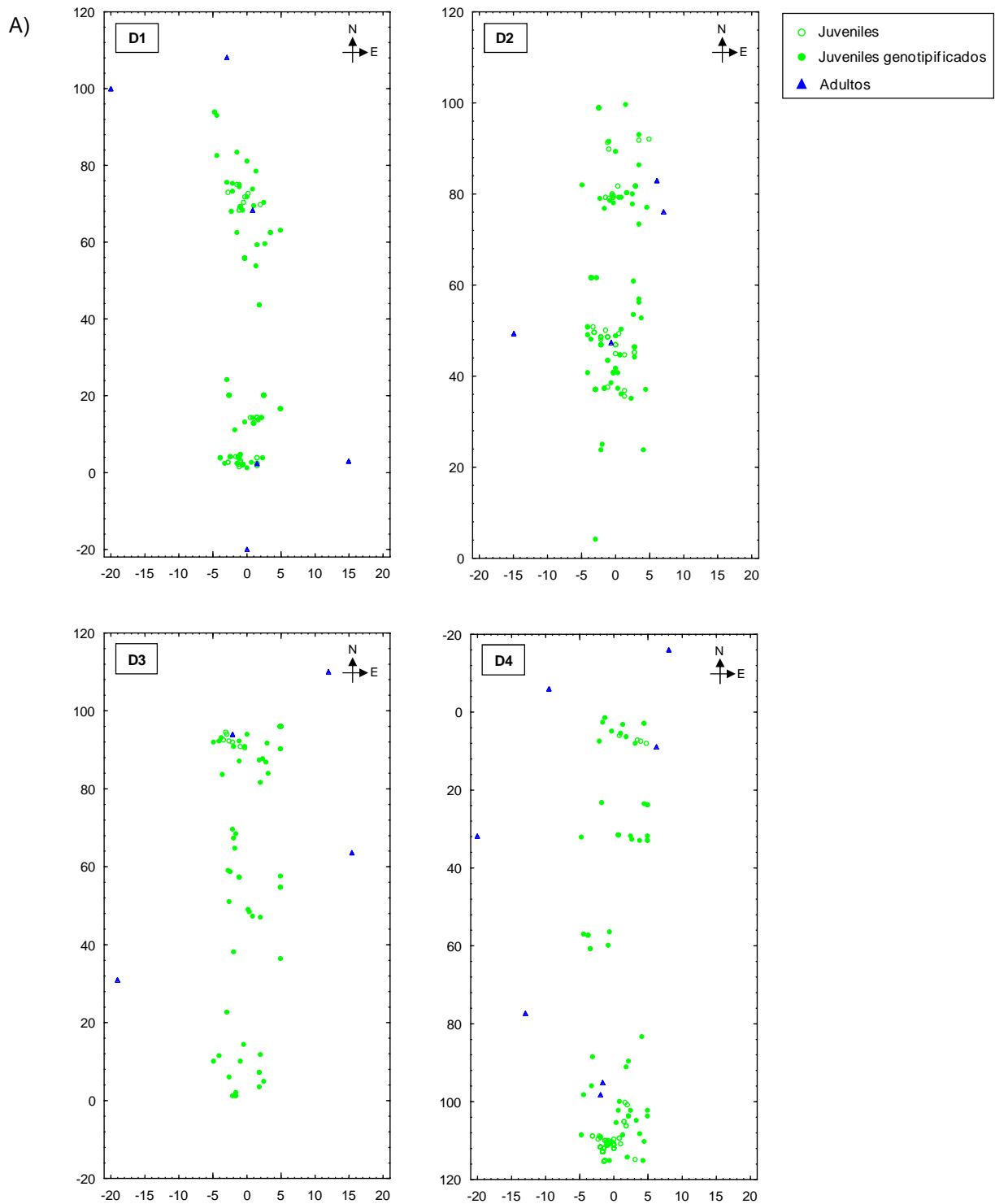
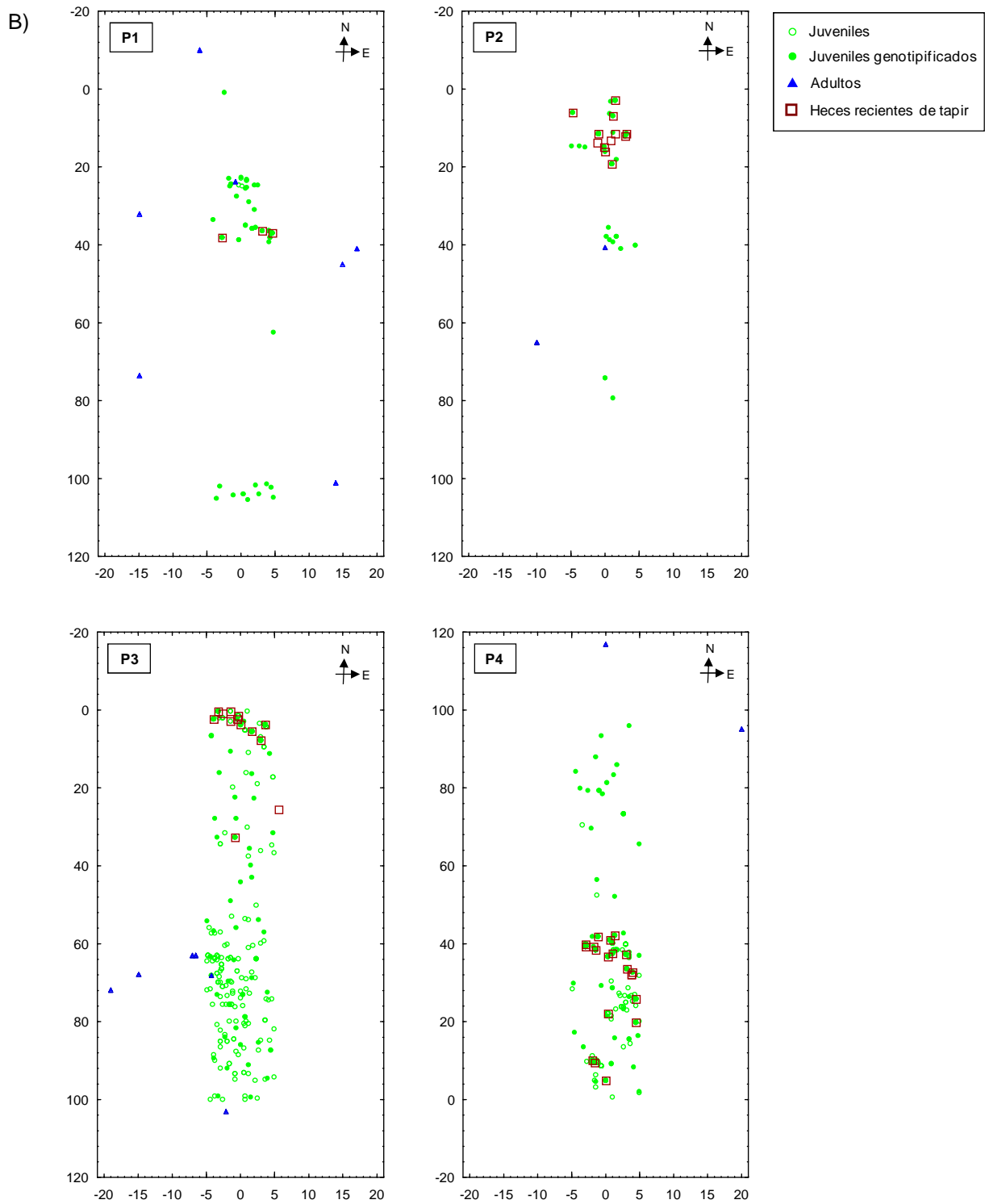




Figura 19. (Continuación)



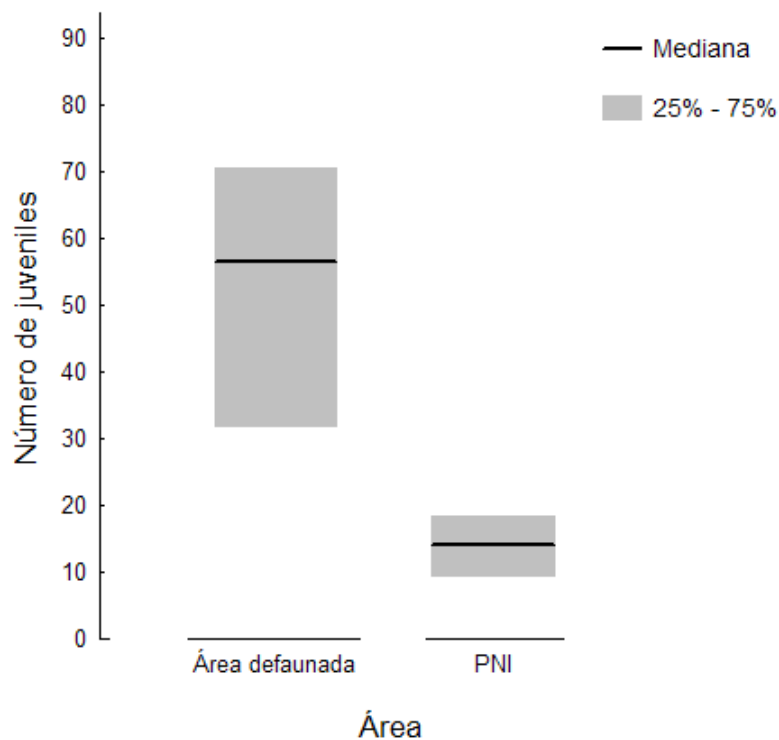
Nota: los valores en los ejes X e Y de los gráficos espaciales están expresados en metros. Cada círculo verde puede representar más de un juvenil, por lo cual el número de círculos observables no indica en forma directa el total de juveniles.

## Resultados

### Reclutamiento, variabilidad genética y parentesco de juveniles bajo los adultos focales.

El reclutamiento de juveniles de pindó debajo de los adultos fue significativamente mayor en el área defaunada que en el Parque Nacional Iguazú ( $U_{\text{Mann-Whitney}} = 16$ ,  $p = 0,00033$ ; Figura 20). En promedio, los juveniles reclutados bajo adultos en el área defaunada fueron 3,5 veces más abundantes que en el Parque. El número máximo de juveniles hallados bajo adultos en el Parque no superó los 26 individuos en ningún caso, mientras que alcanzó un valor de 93 individuos en el área defaunada.

**Figura 20.** Niveles de reclutamiento de juveniles de *S. romanzoffiana* debajo de adultos en el área defaunada y en el Parque Nacional Iguazú (PNI)



Los juveniles reclutados bajo adultos en el área defaunada presentaron una riqueza alélica promedio levemente menor respecto al Parque (Tabla 10), aunque esta diferencia no fue consistente entre los diferentes loci ( $Z_{\text{Wilcoxon}} = 0,30$ ,  $p = 0,767$ ). La diversidad génica promedio para los juveniles reclutados bajo adultos fue virtualmente idéntica entre ambas áreas (Tabla 10).

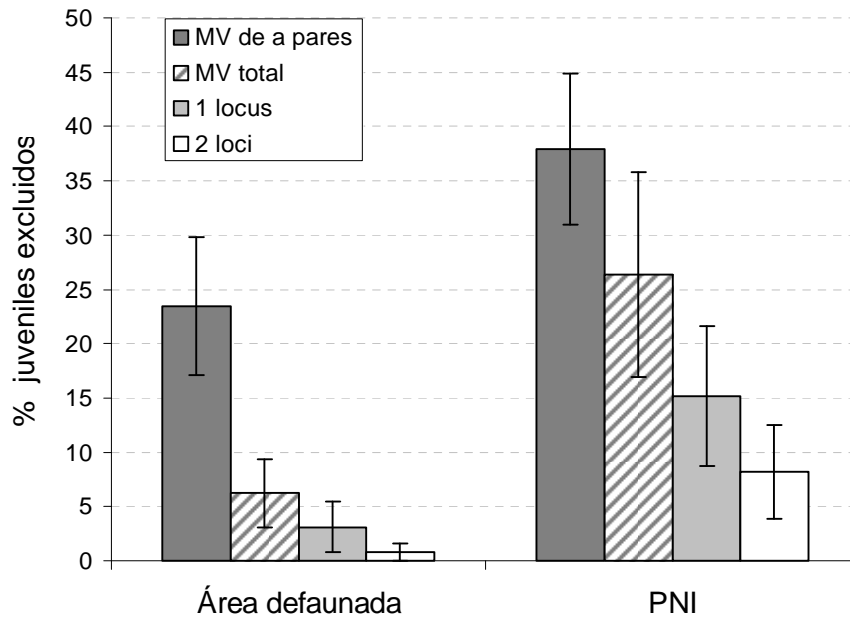
**Tabla 10.** Resumen de variabilidad genética de los juveniles de *S. romanzoffiana* reclutados bajo adultos en el área defaunada y en el Parque Nacional Iguazú (PNI)

	mBgCIR091	CNZ04	mBgCIR053	CAC2	Bg02-10	EE54	CNZ26	CNZ44	CNZ50	media
<b>Área defaunada</b>	$A = 3,90$	3,83	3,77	2,94	3,69	1,98	2,68	1,71	3,29	3,09
	$H_e = 0,58$	0,62	0,58	0,39	0,62	0,40	0,31	0,19	0,52	0,47
<b>PNI*</b>	4,16	3,47	4,36	2,19	4,31	2,00	2,98	1,93	2,89	3,14
	0,68	0,58	0,63	0,28	0,70	0,42	0,33	0,19	0,44	0,47

A: riqueza alélica media (valores corregidos por rarefacción),  $H_e$ : diversidad génica media. \* Los resultados correspondientes al PNI son los mismos que fueron presentados anteriormente en el Capítulo III.

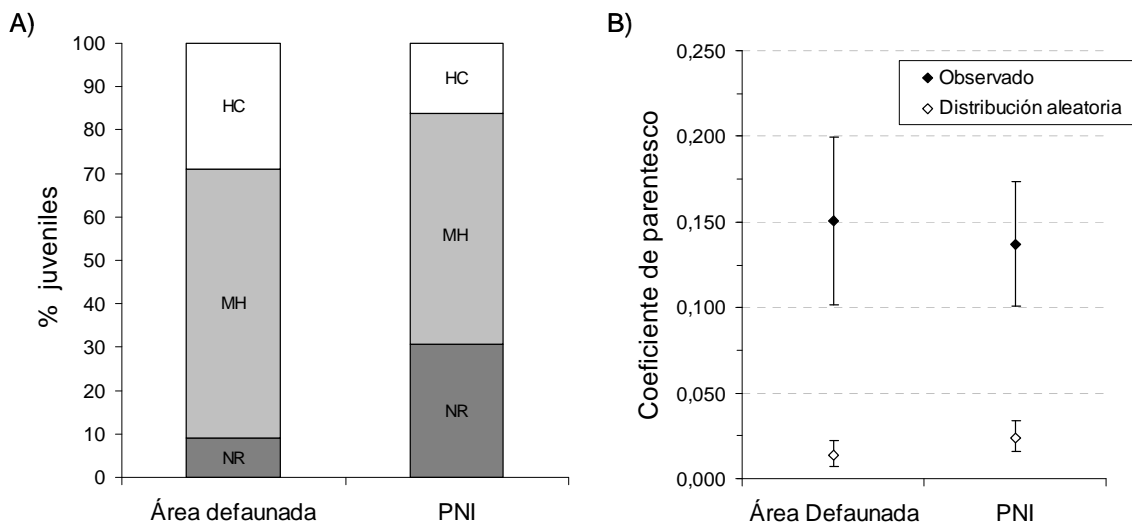
Todos los métodos de exclusión materna indicaron consistentemente que la proporción de juveniles provenientes de semillas dispersadas bajo la copa de palmeras adultas era menor en el área defaunada respecto al Parque Nacional Iguazú (Figura 21). Según el método de máxima verosimilitud total, el porcentaje de juveniles excluidos como hijos del adulto focal fue significativamente menor en el área defaunada (6%) que en el Parque (26%) ( $U_{\text{Mann-Whitney}} = 15$ ,  $p = 0,041$ ; Figura 21). Si bien los cuatro métodos de exclusión utilizados no son totalmente independientes, cabe destacar que los resultados fueron completamente congruentes en cuanto a las proporciones relativas de juveniles provenientes de semillas dispersadas bajo adultos en el área defaunada respecto al Parque (Figura 21). La menor proporción de individuos provenientes de semillas dispersadas bajo los adultos en el área defaunada fue reflejada en una mayor proporción de hermanos respecto al patrón observado en el Parque (91% vs 69%, respectivamente; Figura 22, panel A), y en un menor número de madres contribuyentes ( $N_{m(n=8)} = 1,22$  vs  $N_{m(n=8)} = 2,10$ , respectivamente) y número efectivo de madres contribuyentes ( $N_{em} = 1,09$  vs  $N_{em} = 1,41$ , respectivamente). El coeficiente medio de parentesco, y el valor ajustado a pedigrí ( $\rho^P$ ), fue levemente mayor en el área defaunada respecto al Parque ( $\rho^P = 0,154$  vs  $\rho^P = 0,130$ , respectivamente), consistentemente con la mayor proporción de individuos no relacionados en el área defaunada (Figura 22). Sin embargo la diferencia en los valores del coeficiente medio de parentesco no puede considerarse significativa teniendo en cuenta la amplitud de los intervalos de confianza de las estimaciones (Figura 22, panel B).

**Figura 21.** Análisis de exclusión materna de juveniles de *S. romanzoffiana* reclutados bajo adultos en el área defaunada y en el Parque Nacional Iguazú (PNI\*)



MV de a pares: método de máxima verosimilitud entre pares de individuos (implementado en ML-RELATE); MV total: método de máxima verosimilitud para el conjunto total de individuos (implementado en COLONY2); 1 locus, 2 loci: métodos de exclusión cruda por incompatibilidad de alelos en al menos uno o dos loci, respectivamente (implementados en WHICHPARENTS 1.0). Las barras indican el error estándar. \* Los resultados correspondientes al PNI son los mismos que fueron presentados anteriormente en el Capítulo III.

**Figura 22.** Estructura de parentesco de los juveniles de *S. romanzoffiana* reclutados debajo de adultos en el área defaunada y en el Parque Nacional Iguazú (PNI\*)



Panel A: asignación categórica de parentescos (HC: hermanos completos, MH: medio-hermanos, NR: no relacionados). Panel B: nivel medio de parentesco en términos del coeficiente  $\rho$  (Loiselle *et al.* 1995). Las barras indican el intervalo de confianza del 95% estimado por remuestreo (*Jackknife*) para el valor observado y mediante 1000 permutaciones para el valor obtenido bajo distribución aleatoria. \* Los resultados correspondientes al PNI son los mismos que fueron presentados anteriormente en el Capítulo III.

**Reclutamiento, variabilidad y estructura genética espacial en el área defaunada y en el Parque.** En promedio, el número de juveniles presentes en las parcelas de 100 m x 10 m fue más de dos veces superior en el Parque que en el área defaunada (~294 vs ~126 juveniles, respectivamente; Tabla 11), mientras que el número promedio de adultos circundantes fue similar (~4 vs ~5 adultos, respectivamente; Tabla 11). La comparación de variabilidad entre las parcelas del área defaunada y del Parque Nacional Iguazú mostró que la riqueza alélica de los juveniles era un 10% mayor dentro del Parque, mientras que la diversidad génica era la misma (Tabla 12). Un número mayor de alelos fue observado consistentemente para casi todos los loci en las parcelas del Parque ( $Z_{\text{Wilcoxon}} = 2,38$ ,  $p = 0,017$ ), excepto mBgCIR091 y EE54 para los que observamos un número menor e igual, respectivamente (Tabla 12). En particular, el locus EE54 no resultó informativo para comparar la riqueza alélica ya que presentó sólo dos alelos y en frecuencias similares, por lo que se espera un valor máximo de riqueza ( $A = 2$ ) en cualquier muestra aleatoria de individuos. La diversidad génica media para el conjunto de loci presentó valores idénticos en las parcelas del área defaunada y del Parque, y los signos de las diferencias para los distintos marcadores no fueron concordantes (Tabla 12;  $Z_{\text{Wilcoxon}} = 0,06$ ,  $p = 0,953$ ).

**Tabla 11.** Número de juveniles de *S. romanzoffiana* y adultos cercanos en parcelas situadas en distintos sitios del área defaunada y del Parque Nacional Iguazú (PNI)

Área	Parcela	N	n	Número de adultos cercanos <sup>1</sup>
Defaunada	D1	129	52	6
	D2	110	52	4
	D3	75	52	4
	D4	188	52	7
PNI	P1	77	52	7
	P2	116	52	2
	P3	421	51	6
	P4	560	51	2

N: número total de juveniles en la parcela de 100 m x 10 m; n: número de juveniles genotipificados. <sup>1</sup> corresponde al número de adultos situados en la parcela ampliada a 140 m x 40 m (ver Figura 19).

**Tabla 12.** Resumen de variabilidad genética de juveniles de *S. romanzoffiana* en las parcelas situadas en el área defaunada y en el Parque Nacional Iguazú (PNI).

	mBgCIR091	CNZ04	mBgCIR053	CAC2	Bg02-10	EE54	CNZ26	CNZ44	CNZ50	media
<b>Área defaunada</b>	$A = 6,22$	7,38	7,16	5,66	6,94	2,00	7,20	3,21	4,00	5,53
	$H_e = 0,67$	0,67	0,61	0,51	0,69	0,50	0,36	0,25	0,53	0,53
<b>PNI</b>	5,98	7,63	7,88	6,70	8,11	2,00	8,69	3,47	4,24	6,08
	0,70	0,67	0,65	0,37	0,75	0,49	0,49	0,16	0,53	0,53

A: riqueza alélica media,  $H_e$ : diversidad génica media.

El análisis de la estructura genética espacial mostró que el declive del parentesco ( $\rho$ ) con la distancia física entre juveniles tuvo una pendiente ( $b_\rho$ ) significativamente negativa en dos sitios del área defaunada y en un solo sitio dentro del Parque (Tabla 13). El valor promedio del estadístico  $Sp$  fue mayor para los juveniles del área defaunada ( $Sp = 0,018$  vs  $Sp = 0,010$ ; Tabla 13), sugiriendo un nivel más acentuado de estructuración respecto al Parque. No obstante los intervalos de confianza de  $b_\rho$ , cuyo valor es determinante sobre  $Sp$ , generalmente presentaron algún grado de superposición entre la mayoría de los sitios. El parentesco entre los juveniles del primer intervalo de distancia (0 – 5 m) resultó significativo en todos los sitios excepto D4 y P4 en los que no se detectó ningún indicio de estructuración (Tabla 13, Figura 23). En promedio, el grado de parentesco y de correlación genética ( $r$ ) entre los juveniles más cercanos (0 – 5 m) fue más elevado en el área defaunada que en el Parque (Tablas 13 y 14, Figura 23), aunque la diferencia, en términos de  $r$ , no fue significativa según la prueba de heterogeneidad para el primer intervalo de distancia ( $t^2 = 2,733$ ,  $p = 0,106$ ; Tabla 14). Llamativamente, para los juveniles reclutados en el Parque, el valor medio de  $\rho$  en el último intervalo de distancia fue superior al del primero ( $\rho_6 = 0,053$  vs  $\rho_1 = 0,048$ ; Tabla 13, Figura 23) y  $r$  fue significativamente mayor a cero ( $r_6 = 0,028$ ,  $p = 0,032$ ).

El análisis de heterogeneidad mostró que, en general, los autocorrelogramas de los distintos sitios eran significativamente diferentes tanto en el área defaunada ( $\omega_E = 52,56$ ,  $p = 0,001$ ) como en el Parque ( $\omega_E = 47,10$ ,  $p = 0,001$ ) (Tabla 14). Además, los autocorrelogramas resultantes (combinación de sitios) en cada área presentaron heterogeneidad en el grado de correlación genética para los distintos intervalos de distancia ( $\omega_D = 64,71$ ,  $p = 0,001$  y  $\omega_D = 66,96$ ,  $p = 0,001$ ; para el área defaunada y el Parque, respectivamente; Tabla 14). Por último, el perfil de autocorrelación resultante del área defaunada difirió significativamente con respecto al del Parque ( $\omega_E = 37,56$ ,  $p = 0,001$ ), exhibiendo una divergencia sustancial en los dos últimos intervalos de distancia (Tabla 14). En particular, la correlación genética de los juveniles en el área defaunada

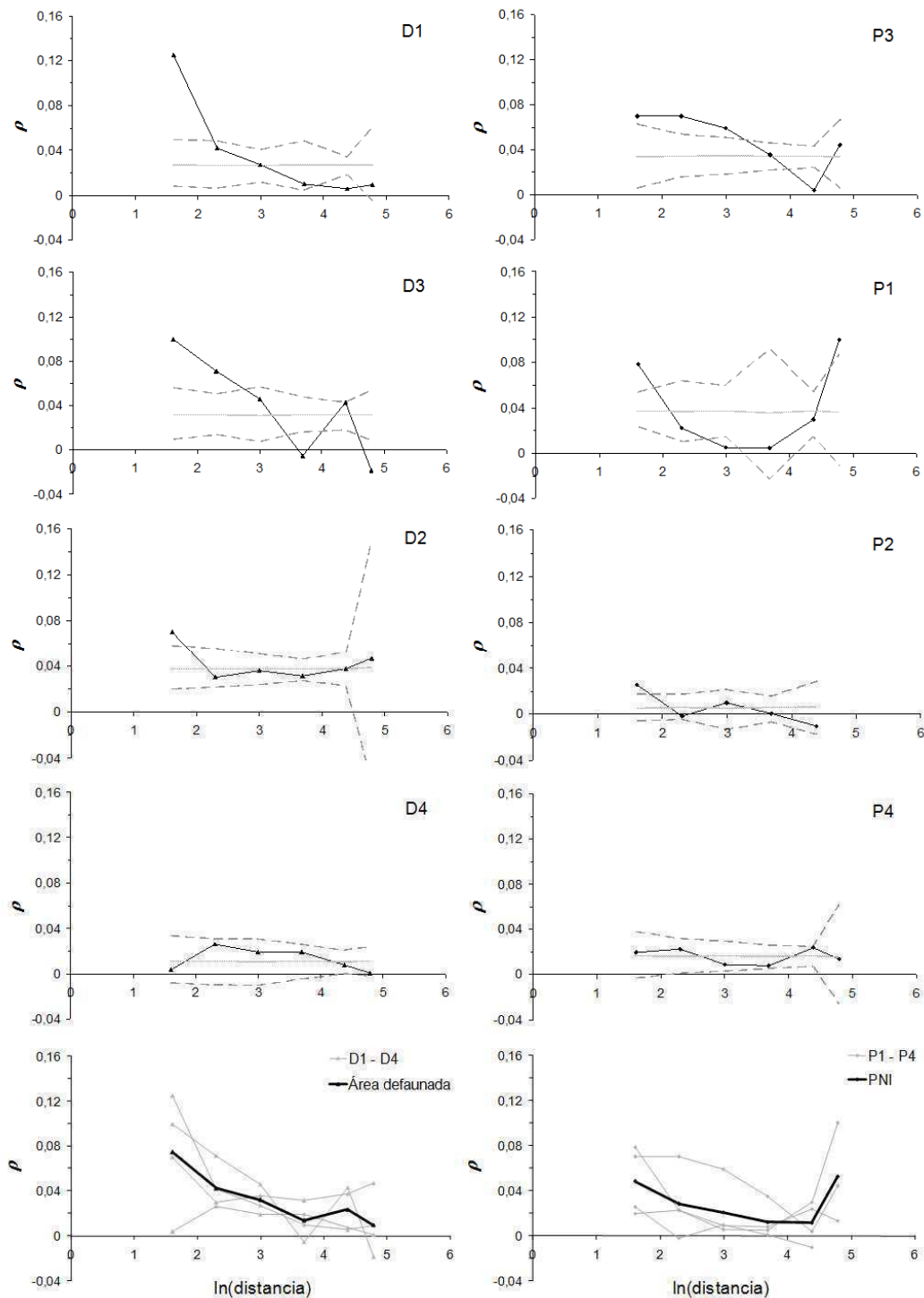
fue significativamente mayor respecto al Parque para el intervalo de 40 – 80 m ( $t^2 = 11,879$ ,  $p = 0,001$ ) y significativamente menor para el último intervalo de distancia ( $t^2 = 10,618$ ,  $p = 0,003$ ) (Tabla 14).

**Tabla 13.** Valores de autocorrelación entre parentesco ( $\rho$ ) y distancia física de juveniles de *S. romanzoffiana* muestreados en parcelas en el área defaunada y en el Parque Nacional Iguazú (PNI)

	Sitio	Intervalo de distancia (m)						Nivel global de autocorrelación	
		0 - 5	5 - 10	10 - 20	20 - 40	40 - 80	> 80	$b_\rho$	$Sp$
Área defaunada	D1	$\rho = 0,125$ (p = 0,000)	0,042 (0,159)	0,027 (0,960)	0,010 (0,135)	0,006 (0,000)	0,009 (0,277)	-0,027 (0,000)*	0,031
	D2	0,070 (0,003)	0,030 (0,373)	0,036 (0,774)	0,031 (0,195)	0,038 (0,990)	0,047 (0,864)	-0,008 (0,033)	0,008
	D3	0,100 (0,000)	0,071 (0,000)	0,046 (0,243)	-0,005 (0,000)	0,043 (0,057)	-0,019 (0,000)	-0,026 (0,000)*	0,029
	D4	0,004 (0,517)	0,026 (0,133)	0,019 (0,407)	0,019 (0,251)	0,008 (0,547)	0,001 (0,133)	-0,005 (0,062)	0,005
	<b>Promedio</b>	<b>0,075</b>	<b>0,042</b>	<b>0,032</b>	<b>0,014</b>	<b>0,024</b>	<b>0,010</b>	<b>-0,016</b>	<b>0,018</b>
PNI	P1	0,078 (0,000)	0,022 (0,251)	0,005 (0,007)	0,005 (0,263)	0,030 (0,375)	0,100 (0,015)	-0,009 (0,037)	0,009
	P2	0,025 (0,005)	-0,002 (0,187)	0,010 (0,630)	0,001 (0,383)	-0,010 (0,149)	- -	-0,008 (0,018)	0,008
	P3	0,070 (0,017)	0,070 (0,000)	0,059 (0,003)	0,035 (0,928)	0,004 (0,000)	0,044 (0,519)	-0,024 (0,000)*	0,026
	P4	0,020 (0,734)	0,023 (0,371)	0,009 (0,277)	0,008 (0,125)	0,024 (0,077)	0,013 (0,914)	0,002 (0,724)	-0,002
	<b>Promedio</b>	<b>0,048</b>	<b>0,028</b>	<b>0,021</b>	<b>0,012</b>	<b>0,012</b>	<b>0,053</b>	<b>-0,010</b>	<b>0,010</b>

Para cada intervalo de distancia se indica el valor del coeficiente de parentesco y, entre paréntesis, el valor p de significancia estadística. En la anteúltima columna de la derecha se muestra el valor de la pendiente de regresión ( $b_\rho$ ) de  $\rho$  versus el logaritmo natural de la distancia entre juveniles y el valor p de significancia se indica entre paréntesis. En la última columna se muestra el valor del estadístico  $Sp = -b_\rho/(1-\rho_1)$  como medida global del grado de estructuración genética espacial. \* valores significativos de  $b_\rho$  luego de la corrección secuencial de Bonferroni.

**Figura 23.** Autocorrelogramas (parentesco vs distancia) para los juveniles de *S. romanzoffiana* muestreados en parcelas situadas en el área defaunada y en Parque Nacional Iguazú (PNI)



En las cuatro primeras filas se ilustran los autocorrelogramas de cada sitio en el área defaunada (izquierda) y en el PNI (derecha), dispuestos en orden decreciente de estructuración genética espacial según valores de  $S_p$ . Las líneas en trazo fino negro conectan los valores observados del coeficiente medio de parentesco ( $\rho$ ) en cada intervalo de distancia; el trazo gris pálido representa el valor medio de  $\rho$  esperado bajo distribución espacial aleatoria de los genotipos; y el trazo gris discontinuo indica los límites inferior y superior de los intervalos de confianza del 95%. En la última fila se ilustran los valores observados de cada parcela (trazos grises) y los valores promedio (trazo grueso negro) del área defaunada y del PNI.



**Tabla 14.** Comparación global de los autocorrelogramas (correlación genética ( $r$ ) vs distancia física) obtenidos para los juveniles de *S. romanzoffiana* muestreados en parcelas situadas en el área defaunada y en Parque Nacional Iguazú (PNI)

Área	Intervalo de distancia (m)						Prueba de heterogeneidad	
	0 - 5	5 - 10	10 - 20	20 - 40	40 - 80	> 80	$\omega_D$	$\omega_E$
Área defaunada	$r = 0,090$	0,036	0,006	-0,030	-0,009	-0,043	64,71	52,56
	( $p = 0,001$ )	(0,001)	(0,254)	(0,000)	(0,034)	(0,000)	(0,001)	(0,001)
	$n = 513$	659	767	1165	1620	580		
PNI	0,067	0,023	-0,008	-0,021	-0,038	0,028	66,96	47,10
	(0,001)	(0,001)	(0,089)	(0,000)	(0,000)	(0,032)	(0,001)	(0,001)
	802	867	876	1113	1374	170		
Área defaunada vs PNI	$t^2 = 2,733$	0,866	1,554	0,979	11,879	10,618	-	37,56
	( $p = 0,106$ )	(0,335)	(0,199)	(0,330)	(0,001)	(0,003)	-	(0,001)

Nota: Los correlogramas de los distintos sitios del área defaunada y del PNI fueron combinados (según Smouse *et al.* 2008) dando un correlograma resultante para cada área.

$p$ : valor  $p$  de significancia estadística (indicado entre paréntesis) para el coeficiente  $r$ ;  $n$ : número de pares de individuos en cada intervalo de distancia;  $t^2$ : estadístico de la prueba de heterogeneidad de  $r$  entre los correlogramas resultantes para cada intervalo de distancia;  $\omega_D$ : estadístico de la prueba de heterogeneidad de  $r$  entre distintos intervalos de distancia del correlograma resultante (contra hipótesis nula de  $r = 0$  para todos los intervalos de distancia);  $\omega_E$ : estadístico de la prueba de heterogeneidad entre correlogramas enteros.

**Análisis de variables genéticas relacionadas al sistema de apareamiento y al flujo de polen.** No hallamos niveles significativos de endogamia para los juveniles de ninguno de los sitios del área defaunada o el Parque. Las estimaciones de los coeficientes  $F_{is}$  estuvieron siempre dentro del rango de valores esperados bajo la hipótesis nula de apareamiento aleatorio (Tabla 15). Los valores de  $F_{is}$  dentro del Parque fueron levemente mayores ( $F_{is}^{\text{medio}} = 0,040$ ; rango: 0,014 – 0,055) respecto a los del área defaunada ( $F_{is}^{\text{medio}} = 0,020$ ; rango: 0,007 – 0,050) pero en ningún caso fueron significativos (Tabla 15).

La diversidad de padres (donantes de polen) de los juveniles reclutados bajo los adultos en el área defaunada resultó similar a la del Parque. En promedio, el número efectivo de padres fue algo superior bajo los adultos dentro del Parque ( $N_{ep} = 3,94$  vs  $N_{ep} = 2,99$ ; Tabla 16) pero la diferencia no fue significativa ( $U_{\text{Mann-Whitney}} = 18$ ,  $p = 0,281$ ). El número promedio de padres diferentes fue también muy similar en el Parque y los fragmentos (Tabla 16, Figura 24). En efecto, la comparación estadística de la riqueza de padres representados en muestras de seis y 16 juveniles (Tabla 16) indicó que no existían diferencias significativas ( $U_{\text{Mann-Whitney}} = 17,5$ ,  $p = 0,232$  y  $U_{\text{Mann-Whitney}} = 24,5$ ,  $p = 0,694$ , respectivamente).

**Tabla 15.** Niveles de endogamia ( $F_{is}$ ) de juveniles de *S. romanzoffiana* en el área defaunada y en el Parque Nacional Iguazú (PNI)

	Sitio	$F_{is}$	IC (95%) / $H_0$
Área defaunada	D1	0,007	[-0,041 – 0,090]
	D2	0,005	[-0,022 – 0,106]
	D3	0,018	[-0,033 – 0,101]
	D4	0,050	[-0,050 – 0,079]
PNI	P1	0,053	[-0,019 – 0,097]
	P2	0,055	[-0,048 – 0,070]
	P3	0,040	[-0,025 – 0,096]
	P4	0,014	[-0,038 – 0,079]

Nota: en la última columna se indican los límites del intervalo de confianza del 95% del coeficiente  $F_{is}$  asumiendo ausencia de endogamia (1000 permutaciones).

**Tabla 16.** Diversidad de padres (donantes de polen) de los juveniles de *S. romanzoffiana* reclutados bajo los adultos focales y tasa de autofecundación de los adultos focales

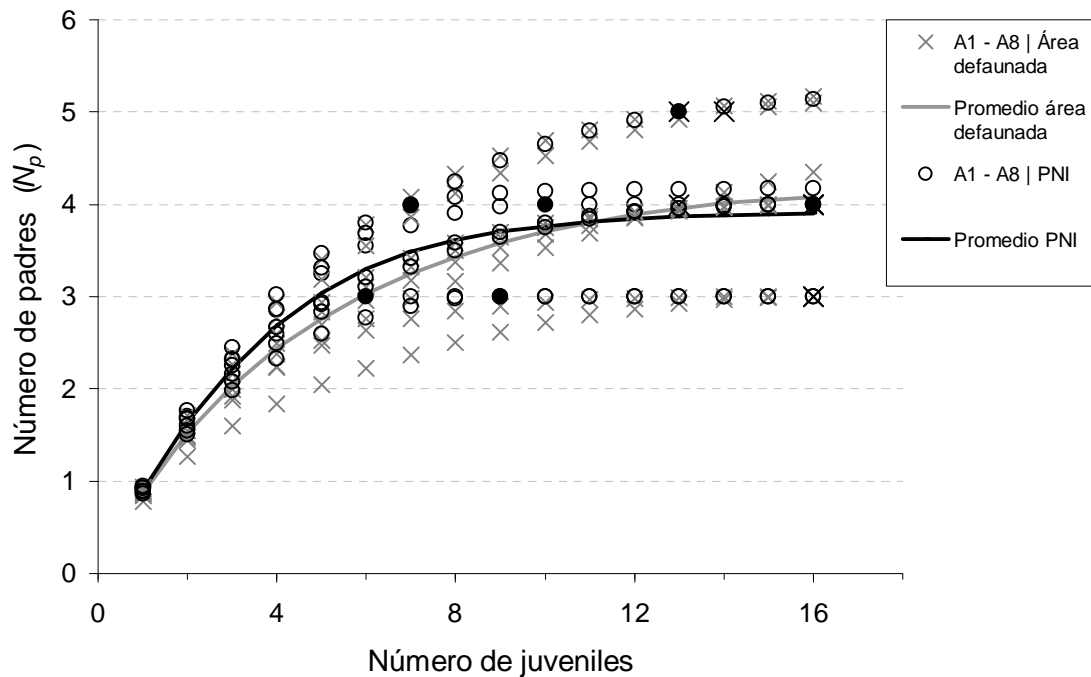
Área defaunada						PNI					
Adulto focal	$n'$	$N_p(n=6)$	$N_p(n=16)$	$N_{ep}$	$s$	Adulto focal	$n'$	$N_p(n=6)$	$N_p(n=16)$	$N_{ep}$	$s$
A1	16	3,10	4,00	3,36	0,000	A1	10	3,55	4,00	5,10	0,000
A2	13	2,76	4,35	2,47	0,071	A2	7	3,80	4,17	5,44	0,250
A3	16	2,64	3,00	2,88	0,000	A3	3	-	-	-	-
A4	13	3,78	5,17	5,64	0,000	A4	16	3,10	4,00	3,36	0,000
A5	14	3,55	5,10	4,38	0,000	A5	13	3,68	5,14	4,93	0,000
A6	16	2,22	3,00	1,75	0,000	A6	16	3,21	4,00	4,03	0,000
A7	16	2,96	4,00	2,88	0,000	A7	9	2,77	3,00	2,84	0,000
A8	16	3,21	4,00	4,03	0,000	A8	6	3,00	3,00	3,95	0,333
<b>Media</b>		<b>3,03</b>	<b>4,08</b>	<b>2,99</b>	<b>0,009</b>	<b>Media</b>		<b>3,30</b>	<b>3,90</b>	<b>3,94</b>	<b>0,083</b>

$n'$ : número de juveniles en la muestra sin considerar a los excluidos como hijos del adulto focal (para el adulto A3 dentro del Parque  $n'$  era igual a tres, por lo que esta réplica no fue considerada en las estimaciones);  $N_p(n=x)$ : número de padres diferentes estimados por rarefacción o extrapolación para un tamaño muestral de  $x$  individuos (juveniles);  $N_{ep}$ : número efectivo de padres;  $s$ : tasa de autofecundación.

La tasa de autofecundación media de los adultos focales, estimada a partir de los juveniles que no fueron excluidos como posibles miembros de sus progenies, resultó menor en el área defaunada que dentro del Parque ( $s = 0,009$  vs  $s = 0,083$ ; Tabla 16). No obstante, para la mayoría de los adultos del área defaunada y del Parque, la totalidad de los juveniles analizados fue identificada como producto de fecundaciones cruzadas ( $s = 0,000$ ; Tabla 16), y la media global para los 16 adultos fue de  $s = 0,044$ . En cambio, al incluir a los juveniles provenientes de semillas

dispersadas bajo los adultos, las estimaciones en el área defaunada y el Parque aumentaron a  $s = 0,016$  y  $s = 0,152$ , respectivamente, y a una media global de  $s = 0,084$ . Finalmente, las estimaciones de  $s$  hechas a partir de los juveniles muestreados en las parcelas, las cuales están basadas en un número mayor de individuos pero sin información previa de los parentales femeninos, fueron de  $s = 0,077$ ,  $s = 0,087$  y  $s = 0,082$ , para el área defaunada, Parque y media global, respectivamente. Más allá de las aparentes diferencias entre el área defaunada y el Parque, los valores globales obtenidos con cada uno de los métodos indicaron que la tasa de autofecundación generalmente es menor al 10%.

**Figura 24.** Riqueza de padres (donantes de polen) de los juveniles de *S. romanzoffiana* reclutados bajo los adultos focales (madres) en el área defaunada y en el Parque Nacional Iguazú (PNI)



Las cruces y los círculos indican los valores de riqueza de padres estimados debajo de cada adulto focal en el área defaunada y en el Parque, respectivamente. Las líneas continuas (gris y negra) indican los promedios correspondientes. Las cruces negras (trazo más oscuro) y los círculos rellenos corresponden a los valores observados, mientras que las cruces grises (trazo más claro) y los círculos vacíos corresponden a los valores estimados por rarefacción o extrapolación.

## Discusión

Conforme a nuestras expectativas, la comparación del reclutamiento y la variación genética de juveniles en el área defaunada respecto al Parque nos permitió evidenciar algunos efectos ecológicos y genéticos del disturbio atribuibles a la falta o escasez de dispersores.

En primer lugar, el nivel de reclutamiento de juveniles de pindó debajo de adultos fue significativamente superior en el área defaunada respecto al Parque Nacional Iguazú, lo cual es consistente con una menor actividad de dispersores en el área perturbada, y apoya la hipótesis H<sub>1</sub>. Una mayor agregación de juveniles alrededor de plantas adultas también ha sido registrada para otras especies en áreas perturbadas (Wright y Duber 2001, Cordeiro y Howe 2003). Este patrón podría representar un síndrome de lo que se ha denominado “selvas vacías” o “semi-vacías”, en referencia a áreas boscosas que mantienen la estructura vegetal más o menos intacta pero donde muchas especies animales están ausentes o son escasas (Redford 1992, Redford y Feinsinger 2001). De todas maneras, la interpretación de dicho patrón admite explicaciones alternativas ya que la acumulación de semillas viables y juveniles bajo los adultos depende también de la tasa de depredación de semillas. Así, una posible disminución de la abundancia de los insectos o vertebrados que actúan como depredadores de las semillas en el área defaunada también resultaría en un mayor reclutamiento bajo los adultos (Chacoff *et al.* 2004, Dirzo *et al.* 2007, Wright *et al.* 2007). Aunque no podemos descartar totalmente el potencial efecto de una menor depredación por coleópteros (*e.g.*, *R. rubiginosa*; Olmos *et al.* 1999) o por vertebrados (*e.g.*, *S. ingrani*; Galetti *et al.* 1992), los resultados obtenidos mediante el análisis de parentesco (ver abajo) apoyan efectivamente la interpretación de una menor actividad de dispersores en el área perturbada. Por último, cabe notar que mientras el nivel de reclutamiento debajo de adultos en el Parque fue menor que en el área defaunada, el reclutamiento observado en las parcelas fue mayor en el Parque. Si bien esta diferencia no puede ser evaluada estadísticamente debido al bajo número de réplicas, y el estudio de los niveles globales de reclutamiento excedía los objetivos del presente trabajo, esta observación sugiere tanto una reducción como una alteración del patrón espacial del reclutamiento en el área defaunada. Es decir que en el área defaunada se estaría limitando el reclutamiento y una mayor cantidad de juveniles quedaría asociada espacialmente a los adultos.

En segundo lugar, detectamos un porcentaje significativamente menor de juveniles provenientes de semillas dispersadas bajo la copa de palmeras adultas en el área defaunada (6%) respecto al Parque (26%), lo cual apoya la hipótesis H<sub>2</sub>. La diferencia en estos porcentajes muy probablemente refleja la diferencia en la abundancia de dispersores de pindó (y vertebrados en general) entre el Parque y el área defaunada. Es posible que las semillas dispersadas hayan sido depositadas por aves (*e.g.*, pavas de monte o tucanes) o bien por otros vertebrados terrestres (*e.g.*,

agutíes, zorros o coatíes), pero dicha dispersión no sería atribuible al tapir dado que en ningún caso hallamos rastros de este dispersor bajo la copa de los adultos muestreados. En estudios previos (Pacheco y Simonetti 2000, Hardesty *et al.* 2006, Wang *et al.* 2007, Grivet *et al.* 2009) se ha encontrado que una proporción apreciable de las semillas o plántulas halladas bajo la copa de adultos conespecíficos no corresponde a la progenie de dicho adulto, pese a lo que podría esperarse por la asociación espacial. En particular, en dos de esos estudios se ha demostrado que la proporción de semillas o plántulas dispersadas se ve reducida en las áreas donde los dispersores han sido extinguidos o notablemente afectados por la caza (Pacheco y Simonetti 2000, Wang *et al.* 2007). Todas estas evidencias sugieren que, al igual que la agregación de un mayor número de juveniles en torno a los adultos, la reducción del porcentaje de individuos "inmigrantes" reclutados bajo la copa de adultos puede representar un síndrome frecuente de las "selvas vacías" o "semi-vacías" (Redford 1992, Redford y Feinsinger 2001).

En tercer lugar, corroborando la hipótesis H<sub>3</sub>, hallamos una mayor riqueza alélica para los juveniles reclutados en las parcelas dentro del Parque respecto a aquellos provenientes del área defaunada, mientras que la diversidad génica fue virtualmente idéntica. Estos resultados indican que los juveniles muestreados dentro del Parque contenían un mayor número de alelos raros (*i.e.*, alelos de baja frecuencia) respecto a los fragmentos. Como ya hemos señalado, la riqueza alélica es una medida de variabilidad más sensible que la diversidad génica frente a alteraciones recientes de procesos genéticos y demográficos. Generalmente, la interpretación de una menor riqueza alélica en áreas perturbadas es que la fragmentación del paisaje o la disminución de la densidad de individuos produce cuellos de botella (*i.e.*, reducción abrupta del tamaño poblacional efectivo) que rápidamente ocasionan la pérdida de alelos raros (Taggart *et al.* 1990, White *et al.* 1999, Young *et al.* 1999).

La multiplicidad de variables y la complejidad de los procesos genético-poblacionales hacen que no sea sencillo discernir con certeza si la disminución de riqueza alélica que observamos en el área defaunada se debe a la falta de dispersores (*i.e.*, flujo génico contemporáneo mediado por la dispersión de semillas) o a otros efectos producidos por la fragmentación y asociados a una reducción del tamaño poblacional efectivo. Una reducción del flujo efectivo de polen en el área defaunada también podría ser responsable de la menor riqueza alélica. No obstante, nuestros resultados indican que el flujo polínico efectivo del pindó en el área defaunada no difiere apreciablemente respecto al Parque; al menos para las variables que pudimos analizar. Por ejemplo, la diversidad (riqueza y número efectivo) de donantes de polen estimada para los juveniles reclutados bajo los adultos no difirió significativamente. Además, no hallamos evidencias de un aumento en la tasa de autofecundación en el área defaunada, si bien varios

estudios han reportado este efecto para otras especies en áreas perturbadas (*e.g.*, Murawski *et al.* 1994, Dick *et al.* 2003, Aguilar *et al.* 2008). Por el contrario, las tasas medias de autofecundación fueron superiores dentro del Parque para cualquiera de las estimaciones que realizamos. Pese a los tamaños muestrales limitados (8 adultos focales en cada área, y un máximo de 16 juveniles asociados a cada adulto), los resultados relativos a la polinización sugieren entonces que el flujo efectivo de polen no estaría severamente limitado en el área perturbada de estudio. Por último, algunos estudios han hallado un incremento en los niveles de endogamia como producto de la fragmentación del hábitat (Jump y Peñuelas 2006, Aguilar *et al.* 2008, Dubreuil *et al.* 2010), lo cual también podría afectar los niveles de variabilidad y estructura genética espacial (ver abajo). Sin embargo, los niveles de endogamia en los juveniles de pindó no fueron significativos en ninguno de los sitios estudiados, e incluso el valor promedio de  $F_{is}$  fue algo superior en el Parque ( $F_{is} = 0,040$  vs  $F_{is} = 0,020$ ). Estos resultados son compatibles con las bajas tasas de autofecundación (superiores en el Parque) e indican además que en los fragmentos no ha habido una mayor tendencia al apareamiento entre individuos emparentados (endogamia biparental) respecto al Parque. Por lo tanto, resulta interesante notar que las variables genéticas relativas a la polinización y al sistema de apareamiento, no parecen estar afectadas en el área defaunada, al menos drásticamente. Ante estas evidencias, parece plausible pensar que la mayor riqueza de alelos en el Parque se debe a un mayor nivel de flujo génico contemporáneo mediado por la dispersión de semillas. Concretamente, dado que muchos de los juveniles reclutados dentro del Parque estaban asociados a las letrinas de tapir, es factible que el patrón observado refleje la contribución diferencial de variantes alélicas realizada por la dispersión de semillas por el tapir (y otros dispersores).

Como ya fue mencionado, numerosos estudios en especies arbóreas demuestran la ocurrencia de niveles considerables de flujo génico vía polen en fragmentos boscosos (Nason *et al.* 1996, Kaufman *et al.* 1998, Nason y Hamrick 1997, Bittencourt y Sebbenn 2007, O'Connell *et al.* 2007). Más aún, varios trabajos han encontrado que el flujo polínico mediado por insectos es mayor en paisajes fragmentados, cubriendo distancias similares, e incluso superiores, a las existentes entre los fragmentos de nuestro estudio (Young *et al.* 1993, Nason y Hamrick 1997, Dick *et al.* 2001, White *et al.* 2002, Dick *et al.* 2003, Hanson *et al.* 2008). Así, la persistencia o el aumento del flujo polínico efectivo ante la fragmentación de los bosques parece ser un fenómeno frecuente (Kramer *et al.* 2008) y posiblemente aplicable al pindó cuya polinización también ocurre por insectos (Thum y Costa 1998, Begnini 2008). En contraste, y hasta donde sabemos, no existen evidencias similares para el flujo génico mediado por dispersión de semillas en especies zoocóricas, aunque sí se ha observado un efecto similar en una especie dispersada por viento (Bacles *et al.* 2006). En

tanto los vertebrados dispersores estén extintos o sean escasos, una compensación o sobrecompensación del flujo génico mediado por la dispersión de semillas difícilmente pueda ocurrir en las áreas perturbadas.

Un cuarto indicio de los efectos genéticos del disturbio, acorde a la hipótesis H<sub>4</sub>, corresponde al mayor nivel de estructuración genética espacial en el área defaunada respecto al Parque, cuantificado por el valor promedio del estadístico  $Sp$ . Un valor mayor de  $Sp$  para los juveniles reclutados en el área defaunada es consistente con lo que se espera frente a una disminución de la dispersión de semillas. Este resultado podría explicarse por el contraste de presencia versus ausencia de tapires y otros dispersores en el Parque y en el área defaunada, respectivamente. Los patrones de estructura genética espacial hallados para los juveniles dentro del Parque representan sitios que contenían letrinas, y posiblemente existan diferencias respecto a sitios sin letrinas, sin embargo es importante notar que los sitios con letrinas y alto reclutamiento de juveniles son abundantes en el Parque, según indican los resultados del Capítulo I. De todos modos, los resultados obtenidos del análisis de la estructura genética espacial no pueden ser tomados como evidencia definitiva teniendo en cuenta que: i) el número limitado de réplicas en cada área ( $n = 4$ ) no nos permite comparar estadísticamente los valores de  $Sp$ , ii) la heterogeneidad de los autocorrelogramas entre sitios (parcelas) dentro de cada área también fue significativa (Figura 23, Tabla 14).

A partir de la recopilación de datos, Vekemans y Hardy (2004) estimaron los niveles de estructuración en especies arbóreas de distintas características observando valores de  $Sp \pm DE = 0,028 \pm 0,017$  en especies dispersadas por gravedad ( $n = 6$ ),  $Sp \pm DE = 0,012 \pm 0,012$  en especies dispersadas por viento ( $n = 5$ ), y  $Sp \pm DE = 0,009 \pm 0,005$  en especies dispersadas por animales ( $n = 8$ ). En una revisión posterior, Dick *et al.* (2008) hallaron diferencias significativas del nivel de estructuración entre especies arbóreas tropicales dispersadas por gravedad, viento y/o roedores ( $n = 9$ ) respecto a especies dispersadas por monos, aves o murciélagos ( $n = 6$ ), con valores medios de  $Sp = 0,023$  y  $Sp = 0,009$ , respectivamente. De-Lucas *et al.* (2009) compararon la estructura genética espacial entre poblaciones de pino fragmentadas y continuas, reportando valores de  $Sp = 0,026$  y  $Sp = 0,020$  para las primeras, y de  $Sp = 0,007$  y  $Sp = 0,010$  para las últimas. Todas estas estimaciones ofrecen un referencia respecto a la magnitud de los valores de  $Sp$  y de las diferencias asociadas al modo o potencial de dispersión y a los efectos del disturbio. Según estas referencias, y asumiendo que nuestras estimaciones no poseen un sesgo marcado, la diferencia que observamos entre el valor medio de  $Sp$  en el área defaunada ( $Sp = 0,018$ ) y en el Parque ( $Sp = 0,010$ ) parece ser de una magnitud considerable.

Es esperable que una mayor densidad local de adultos atenúe el nivel de estructuración debido a una mayor superposición de las sombras de semillas (Hamrick *et al.* 1993, Vekemans y Hardy 2004, Trapnell y Hamrick 2011). No obstante, este factor no sería una explicación muy plausible para dar cuenta de la diferencia del valor de  $S_p$  entre el Parque y el área defaunada, ya que el número de adultos circundantes fue similar. Más aún, no hallamos una correlación entre el número de adultos y el valor de  $S_p$  para los distintos sitios (correlación de Spearman:  $r_s = 0,27$ ,  $n = 8$ ,  $p = 0,518$ ). Por otro lado, al igual que una menor diversidad genética, la mayor estructuración genética espacial también podría deberse a la restricción del flujo polínico, mayores tasas de autofecundación y/o mayor endogamia biparental (Ohsawa *et al.* 1993, Doligez *et al.* 1998, Epperson 2007). Sin embargo, la ausencia de diferencias observada para las variables correspondientes en el área defaunada respecto al Parque sugiere que dichos factores no son responsables de la diferencia en el nivel de estructuración genética espacial. En concordancia con nuestros resultados, Wang *et al.* (2011) han reportado un incremento de la estructura genética espacial en una especie arbórea subtropical luego de una generación post-fragmentación, atribuible a la restricción de la dispersión de semillas y no del flujo de polen.

Como hemos señalado, los perfiles de autocorrelación no fueron homogéneos dentro de cada área. En particular los autocorrelogramas de las parcelas P3 y D4 fueron los más contrastantes con los resultados esperados, ya que el primero indicó una estructuración significativa con un valor relativamente elevado de  $S_p$  ( $= 0,026$ ), mientras que el segundo no mostró indicios de estructuración en ningún intervalo de distancia. De todos modos, en los estudios empíricos es frecuente hallar un nivel considerable de heterogeneidad en los patrones de autocorrelación genética espacial (*e.g.*, Gehring y Delph 1999, Kameyama *et al.* 2002, Smouse *et al.* 2008, De-Lucas *et al.* 2009). La heterogeneidad puede estar simplemente causada por la estocasticidad intrínseca del proceso deriva-dispersión (Slatkin y Arter 1991a, Hardy y Vekemans 1999) y/o por distintos factores determinísticos (genéticos y ecológicos) que influyen sobre el mismo (Doligez *et al.* 1998, Asuka *et al.* 2004, Vekemans y Hardy 2004, Epperson 2007). Por ende, los patrones de estructuración genética espacial deben ser interpretados cuidadosamente cuando se pretende vincularlos con los procesos subyacentes (Slatkin y Arter 1991a, b, Sokal y Oden 1991), a la vez que resulta evidente la importancia de trabajar con réplicas en este tipo de análisis (Smouse *et al.* 2008). En nuestro caso es posible que parte de la variación entre sitios se deba a tamaños muestrales limitados ( $n \approx 50$ ) en cada sitio (Epperson 2005, Anderson *et al.* 2010). No obstante, los coeficientes medios de parentesco (o correlación genética) para cada intervalo de distancia fueron estimados casi siempre a partir de 100 o más pares de individuos. Además, la combinación de los autocorrelogramas de las distintas réplicas mostró diferencias significativas en la



estructuración de los juveniles reclutados en el Parque respecto al área defaunada. En suma, el análisis de la estructura genética espacial mostró resultados compatibles con un efecto de distintos niveles de dispersión de semillas, aunque la notable heterogeneidad de los patrones sugiere la influencia de otros factores involucrados.

### **Conclusiones**

Hallamos evidencias significativas de los efectos de la interrupción del proceso dispersivo producida por la defaunación sobre el reclutamiento y variación genética de los juveniles de pindó. En el área defaunada detectamos un mayor reclutamiento de juveniles debajo de adultos conespecíficos y una menor proporción de juveniles provenientes de semillas dispersadas bajo dichos adultos, respecto al patrón observado en el Parque Nacional Iguazú. Además hallamos una menor riqueza alélica en el área defaunada y una estructura genética espacial más acentuada (en términos de un mayor valor de  $S_p$ ). El efecto de la defaunación (particularmente la ausencia del tapir) sobre la estructuración genética espacial debe ser corroborado con nuevas evidencias debido a la heterogeneidad de los patrones de autocorrelación observados y a la diversidad de factores que influyen sobre este atributo emergente. Por otro lado, no hallamos diferencias en los patrones de flujo polínico, la tasa de autofecundación y los niveles de endogamia que puedan explicar las diferencias en la riqueza de alelos y estructuración genética espacial de los juveniles de pindó reclutados en el Parque y el área defaunada. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que los patrones de riqueza alélica y estructura genética espacial observados en el área perturbada se deben a la falta de tapires y otros dispersores.

Las tasas globales de autofecundación estimadas en  $0 < s < 10\%$  nos permiten concluir que el pindó es una especie autocompatible de fecundación predominantemente cruzada, al igual que se ha reportado para otras palmeras neotropicales (Eguiarte *et al.* 1992, Gaiotto *et al.* 2003, Abreu *et al.* 2012, Nazareno y Reis 2012). El presente estudio constituye la primera aproximación a la caracterización genética del sistema de apareamiento del pindó.

---

## CONSIDERACIONES FINALES

Mediante nuestro estudio hemos aportado evidencias del mutualismo existente entre el tapir y el pindó en la Selva Paranaense. Los frutos del pindó son consumidos en abundancia por el tapir y un alto nivel de reclutamiento de juveniles de pindó tiene lugar en las letrinas generadas por el tapir. Estos resultados sugieren una interacción fuerte entre ambas especies. El tapir es un herbívoro-frugívoro cuya dieta de frutos puede incluir más de 300 especies diferentes. No obstante, en la Selva Paranaense, donde existe una marcada estacionalidad asociada a fuertes variaciones en la abundancia de frutos disponibles, la dependencia de frutos de pindó para el tapir puede acentuarse notablemente. A su vez, los frutos del pindó son utilizadas como recurso alimenticio por una gran diversidad de vertebrados (ver Tabla 3). Sólo algunos de estos vertebrados podrían ser dispersores efectivos del pindó, y nuestros resultados indican que la mayor parte de la regeneración de esta especie se asocia a las letrinas de los tapires. Por ende, en la Selva Paranaense parece existir un alto grado de reciprocidad en la interacción planta-dispersor entre el tapir y el pindó. Ambas especies presentan particularidades relevantes desde el punto de vista ecológico. Los tapires son los últimos representantes de la megafauna del Pleistoceno en el neotrópico. Sus características morfológicas y hábitos de vida particulares probablemente le confieran la exclusividad para ciertas funciones ecológicas como la dispersión de larga distancia de semillas grandes, la cual difícilmente pueda ser compensada por redundancia funcional con otros vertebrados (Bueno *et al.* 2013). Por su parte, el pindó resulta una especie clave como fuente de alimentos para la comunidad de frugívoros, tornándose un recurso crítico en los períodos de escasez de otros frutos en la Selva Paranaense (Keuroghlian y Eaton 2008).

Estas consideraciones nos permiten plantear un escenario ecológico de una amplia red de interacciones planta-frugívoro en las que participan una u otra especie, y donde el mutualismo entre el tapir y el pindó ocupa un lugar especial debido a una dependencia mutua relativamente fuerte (Bascompte y Jordano 2007). Bajo este escenario, se puede esperar que la desaparición de cualquiera de estas dos especies de la Selva Paranaense produzca importantes efectos directos e indirectos en la comunidad (Bascompte y Jordano 2007, Jordano *et al.* 2009). El pindó sigue siendo abundante en la mayor parte de los remanentes boscosos de la Selva Paranaense, pero el tapir ha sufrido una rápida reducción poblacional debido a la pérdida de hábitat y a la fuerte presión de caza, y ha desaparecido fuera de áreas protegidas suficientemente extensas.

En los últimos años se han realizado varios estudios sobre frugivoría y dispersión de semillas por tapires en distintas regiones de Sudamérica que resaltan su importancia como

dispersor (*e.g.*, Fragoso y Huffman 2000, Tobler *et al.* 2010, Barcelos *et al.* 2013, Bueno *et al.* 2013). Por ejemplo, en el amazonas brasilero también se ha reportado la ocurrencia de un mutualismo fuerte entre el tapir y la palmera *A. maripa*, y se ha mostrado cómo la estructuración espacial de dicha palmera puede explicarse en gran medida por la acción dispersora del tapir (Fragoso *et al.* 2003). Sin embargo, en ninguno de estos casos se ha abordado el estudio del flujo génico mediado por la dispersión de semillas por tapires. El presente trabajo de tesis aporta la primera contribución en este sentido, como así también, un conjunto de marcadores moleculares adecuado para futuras investigaciones sobre este sistema u otros aspectos relativos a la variación genética en pindó. Nuestros resultados muestran que la dispersión de semillas mediada por el tapir produce agrupamientos de juveniles de pindó mayoritariamente no emparentados. Además, tomando en cuenta la amplitud del territorio normalmente usado por los tapires, es altamente probable que las madres de dichos juveniles se encuentren a distancias considerables. Por lo tanto, el tapir puede contribuir sustancialmente al flujo génico en las poblaciones de pindó a través de la dispersión de semillas. Considerando las amplias distancias de dispersión, la gran cantidad de semillas transportadas, y el alto número de juveniles no emparentados reclutados en las letrinas de tapir, es muy factible que ningún otro dispersor pueda proveer una contribución semejante al flujo génico en el pindó.

La posibilidad y la relevancia de detectar los efectos genéticos producidos por los disturbios recientes del hábitat ha sido cuestionada recientemente (Kramer *et al.* 2008), en parte debido a la cantidad de evidencias contrapuestas halladas por numerosos estudios previos (sin embargo, ver Aguilar *et al.* 2008), y en parte porque se ha argumentado que en el corto término la degradación ecológica puede ser más importante que la degradación genética. Sin duda, los resultados han sido frecuentemente ambiguos e incluso, paradójicos. Como hemos mencionado en la introducción del Capítulo IV, el debate en torno a esta cuestión ha permitido identificar varios de los factores que explican tal paradoja. Además ha permitido corregir ciertos aspectos metodológicos (*e.g.*, tener en cuenta la información temporal para evaluar la variación genética en aquellos individuos de generaciones posteriores al disturbio) e identificar las variables genéticas más sensibles a los efectos de la degradación del hábitat (*e.g.*, riqueza alélica, relaciones de parentesco). El debate sobre los efectos genéticos del disturbio sigue vigente y reviste una gran importancia desde el punto de vista del manejo y la conservación del medio ambiente. El desafío más importante implica no sólo la detección de efectos tales como reducción de la variabilidad o aumento de la estructuración, sino también la inferencia de los procesos subyacentes.

En este sentido, consideramos que la presente tesis constituye un aporte importante sobre las consecuencias genéticas del disturbio, en este caso asociadas a la disrupción del proceso de

dispersión de semillas de pindó producida por la defaunación. Los fragmentos boscosos exhibieron una menor proporción de juveniles provenientes de semillas dispersadas debajo de la copa de palmeras adultas respecto al Parque, lo cual muy probablemente refleja la menor abundancia de dispersores en dichos fragmentos. La riqueza alélica de los juveniles muestreados en los fragmentos fue significativamente menor que la de juveniles reclutados dentro del Parque en áreas con letrinas de tapir. Este resultado es consistente con la contribución al flujo génico realizada por el tapir (y/u otros dispersores) al trasladar semillas de genotipos diversos que son depositadas en las letrinas. Finalmente, hallamos un índice de mayor estructuración genética espacial de los juveniles reclutados en el área defaunada, aunque esta diferencia no pudo ser evaluada estadísticamente y requiere de una corroboración más sólida a partir de muestras de mayor tamaño. Por lo pronto, la tendencia observada sugiere que en los sitios donde los dispersores están presentes, los genotipos se distribuyen más aleatoriamente en el espacio.

Es evidente que la contribución al reclutamiento y al flujo génico del pindó que realiza el tapir se pierde completamente en la mayor parte de remanentes boscosos de Selva Paranaense que no reúnen las condiciones de extensión y protección necesarias para sustentar a este vertebrado. La presencia del tapir en esta ecorregión suele estar limitada a fragmentos mayores a 10.000 ha (Paviolo *et al.* 2009). A la luz de las evidencias presentadas en esta tesis, es de esperar que el impacto ecológico y genético del disturbio sobre el reclutamiento y variación genética del pindó se acentúe en las próximas generaciones. Esta observación sin duda es relevante para el pindó, pero también podría serlo para muchas otras especies cuya dispersión depende, al menos en parte, del tapir. La dinámica de regeneración de la selva depende en gran medida de los sistemas dispersivos y de otras interacciones como la polinización y la herbivoría (Holl *et al.* 2000, Martínez-Garza y Howe 2003, Rodrigues *et al.* 2009). Algunos estudios han destacado la importancia de la preservación de fragmentos, e incluso árboles individuales, para propiciar la conectividad entre áreas distantes de bosque que permita el funcionamiento de procesos como la polinización y la dispersión de semillas (Valladares-Padua *et al.* 2002, Ribeiro *et al.* 2009). En este sentido, es posible que el flujo de polen pueda seguir siendo efectivo en el mosaico de fragmentos de la Selva Paranaense como sugieren los numerosos estudios que hemos mencionado en el Capítulo IV y nuestros resultados obtenidos en pindó. Sin embargo, el mantenimiento de la dispersión de ciertas semillas resulta claramente más difícil en la medida en que dependa de la actividad de los tapires u otros dispersores cuya permanencia en fragmentos pequeños sea improbable. Mientras que la preservación de los fragmentos remanentes puede lograrse con medidas de manejo bien implementadas, al menos en el corto término, el restablecimiento de un vertebrado como el tapir en dichos fragmentos representa un desafío mucho mayor dada la

vulnerabilidad de la especie en áreas no protegidas. Mientras tanto, la población de pindó remanente en las áreas fragmentadas, así como muchas otras especies de semilla grande, deberán entonces prescindir de los servicios ecológicos y genéticos de este singular dispersor.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, A.G., R.H.G. PRIOLLI, J.A. AZEVEDO-FILHO, S.M. NUCCI, M.I. ZUCCHI, R.M. COELHO, Y C.A. COLOMBO, 2012. The genetic structure and mating system of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Genet. Mol. Biol.* 35: p.119–121.
- AGUILAR, R., M. QUESADA, L. ASHWORTH, Y. HERRERIAS-DIEGO, Y J. LOBO, 2008. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Mol. Ecol.* 17: p.5177–5188.
- AHMED, S., S.G. COMPTON, R.K. BUTLIN, Y P.M. GILMARTIN, 2009. Wind-borne insects mediate directional pollen transfer between desert fig trees 160 kilometers apart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: p.20342–20347.
- ALBERTO, F., L. GOUVEIA, S. ARNAUD-HAOND, J.L. PÉREZ-LLORÉNS, C.M. DUARTE, Y E.A. SERRÃO, 2005. Within-population spatial genetic structure, neighbourhood size and clonal subrange in the seagrass *Cymodocea nodosa*. *Mol. Ecol.* 14: p.2669–2681.
- ALDRICH, P., Y J. HAMRICK, 1998. Reproductive dominance of pasture trees in a fragmented tropical forest mosaic. *Science* 281: p.103–105.
- ALDRICH, P.R., J.L. HAMRICK, P. CHAVARRIAGA, Y G. KOCHERT, 1998. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Mol. Ecol.* 7: p.933–944.
- ALVAREZ-BUYLLA, E.R., A.C. CHAOS, D. PIÑERO, Y A.A. GARAY, 1996. Demographic genetics of a pioneer tropical tree species: patch dynamics, seed dispersal, and seed banks. *Evolution* 50: p.1155–1166.
- ALVES-COSTA, C.P., 2004. *Efeitos da defaunação de mamíferos herbívoros na comunidade vegetal*. Universidade Estadual de Campinas.
- ALVES-COSTA, C.P., Y C. KNOGGE, 2005. Larval competition in weevils *Revena rubiginosa* (Coleoptera: Curculionidae) preying on seeds of the palm *Syagrus romanzoffiana* (Arecaceae). *Naturwissenschaften* 92: p.265–268.
- ALVES-COSTA, C.P., Y P.C. ETEROVICK, 2007. Seed dispersal services by coatis (*Nasua nasua*, Procyonidae) and their redundancy with other frugivores in southeastern Brazil. *Acta Oecologica* 32: p.77–92.
- ANDERSON, C.D., B.K. EPPERSON, M.-J. FORTIN, R. HOLDEREGGER, P.M.A. JAMES, M.S. ROSENBERG, K.T. SCRIBNER, Y S. SPEAR, 2010. Considering spatial and temporal scale in landscape-genetic studies of gene flow. *Mol. Ecol.* 19: p.3565–3575.
- ANTONOVICS, J., Y N.C. ELLSTRAND, 1984. Experimental studies of the evolutionary significance of sexual reproduction. I. A test of the frequency-dependent selection hypothesis. *Evolution* 38: p.103–115.
- ASHLEY, M. V., 2010. Plant parentage, pollination, and dispersal: how DNA microsatellites have altered the landscape. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 29: p.148–161.

- ASMUSSEN, C.B., J. DRANSFIELD, V. DEICKMANN, A.S. BARFOD, J.-C. PINTAUD, Y W.J. BAKER, 2006. A new subfamily classification of the palm family (Arecaceae): evidence from plastid DNA phylogeny. *Bot. J. Linn. Soc.* 151: p.15–38.
- ASUKA, Y., N. TOMARU, N. NISIMURA, Y. TSUMURA, Y S. YAMAMOTO, 2004. Heterogeneous genetic structure in a *Fagus crenata* population in an old-growth beech forest revealed by microsatellite markers. *Mol. Ecol.* 13: p.1241–1250.
- AUGSPURGER, C.K., 1984. Seedling survival of tropical tree species: Interaction of dispersal distance, light-gap, and pathogens. *Ecology* 65: p.1705–1712.
- AUGSPURGER, C.K., 1989. Morphology and aerodynamics of wind-dispersed legumes. *Adv. Legum. Biol.* 29: p.451–466.
- AUGSPURGER, C.K., Y C.K. KELLY, 1984. Pathogen mortality of tropical tree seedlings: experimental studies of the effects of dispersal distance, seedling density, and light conditions. *Oecologia* 61: p.211–217.
- AUGSPURGER, C.K., Y K. KITAJIMA, 1992. Experimental studies of seedling recruitment from contrasting seed distributions. *Ecology* 73: p.1270–1284.
- AVISE, J.C., 2004. *Molecular markers, natural history, and evolution*, 2da ed., Sunderland. EE.UU.: Sinauer Associates, Inc.
- BACHAND, M., O.C. TRUDEL, C. ANSSEAU, Y J. ALMEIDA-CORTEZ, 2009. Dieta de *Tapirus terrestris* Linnaeus em um fragmento de Mata Atlântica do Nordeste do Brasil. *Rev. Bras. Biociencias* 7: p.188–194.
- BACLES, C.F.E., A.J. LOWE, Y R.A. ENNOS, 2004. Genetic effects of chronic habitat fragmentation on tree species: the case of *Sorbus aucuparia* in a deforested Scottish landscape. *Mol. Ecol.* 13: p.573–584.
- BACLES, C.F.E., A.J. LOWE, Y R.A. ENNOS, 2006. Effective seed dispersal across a fragmented landscape. *Science* 311: p.628.
- BAKER, W.J., V. SAVOLAINEN, C.B. ASMUSSEN-LANGE, M.W. CHASE, J. DRANSFIELD, F. FOREST, M.M. HARLEY, N.W. UHL, Y M. WILKINSON, 2009. Complete generic-level phylogenetic analyses of palms (Arecaceae) with comparisons of supertree and supermatrix approaches. *Syst. Biol.* 58: p.240–256.
- BAKER, W.J., M. V NORUP, J.J. CLARKSON, T.L.P. COUVREUR, J.L. DOWE, C.E. LEWIS, J.-C. PINTAUD, V. SAVOLAINEN, T. WILMOT, Y M.W. CHASE, 2011. Phylogenetic relationships among arecoid palms (Arecaceae: Arecoideae). *Ann. Bot.* 108: p.1417–1432.
- BARBARÁ, T., C. PALMA-SILVA, G.M. PAGGI, F. BERED, M.F. FAY, Y C. LEXER, 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Mol. Ecol.* 16: p.3759–3767.
- BARCELOS, A.R., P.E.D. BOBROWIEC, T.M. SANAIOTTI, Y R. GRIBEL, 2013. Seed germination from lowland tapir (*Tapirus terrestris*) fecal samples collected during the dry season in the Northern Brazilian Amazon. *Integr. Zool.* 8: p.63–73.
- BARRET, S.C., Y J.R. KOHN, 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. En D. A. Falk y K. E. Holsinger (Eds.) *Genetics and Conservation of Rare Plants*. pp. 3–30, Oxford, Reino Unido: Oxford University Press.

- BARTUSZEVIĆ, A.M., Y D.L. GORCHOV, 2006. Avian seed dispersal of an invasive shrub. *Biol. Invasions* 8: p.1013–1022.
- BASCOMPTE, J., P. JORDANO, Y J.M. OLESEN, 2006. Asymmetric coevolutionary networks facilitate biodiversity maintenance. *Science* 312: p.431–433.
- BASCOMPTE, J., Y P. JORDANO, 2007. Plant-animal mutualistic networks: The architecture of biodiversity. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38: p.567–593.
- BEATTIE, A.J., Y D.C. CULVER, 1979. Neighborhood Size in *Viola*. *Evolution* 33: p.1226–1229.
- BECKAGE, B., Y J.S. CLARK, 2003. Seedling survival and growth of three forest tree species: the role of spatial heterogeneity. *Ecology* 84: p.1849–1861.
- BEGINI, R.M., 2008. *O Jerivá - Syagrus romanzoffiana (Cham.) Glassman (Arecaceae) - fenologia e interações com a fauna no Parque Municipal da Lagoa do Peri, Florianópolis, SC*. Universidade Federal de Santa Catarina.
- BELL, T., R.P. FRECKLETON, Y O.T. LEWIS, 2006. Plant pathogens drive density-dependent seedling mortality in a tropical tree. *Ecol. Lett.* 9: p.569–574.
- BENKMAN, C.W., 1995. Wind dispersal capacity of pine seeds and the evolution of different seed dispersal modes in pines. *Oikos* 73: p.221–224.
- BEWLEY, J.D., Y M. BLACK, 1994. *Seeds: physiology of development and germination*, 2da ed., New York, EE.UU.: Plenum Press.
- BILLOTTE, N., A.M. RISTERUCCI, E. BARCELOS, J.L. NOYER, P. AMBLARD, Y F.C. BAURENS, 2001. Development, characterisation, and across-taxa utility of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) microsatellite markers. *Genome* 44: p.413–425.
- BILLOTTE, N., T. COUVREUR, N. MARSEILLAC, P. BROTTIER, B. PERTHUIS, M. VALLEJO, J.-L. NOYER, J.-P. JACQUEMOUD-COLLET, A.-M. RISTERUCCI, Y J.-C. PINTAUD, 2004. A new set of microsatellite markers for the peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth); characterization and across-taxa utility within the tribe Cocoeae. *Mol. Ecol. Notes* 4: p.580–582.
- BIRKHEAD, T.R., T. BURKE, R. ZANN, F.M. HUNTER, Y A.P. KRUPA, 1990. Extra-pair paternity and intraspecific brood parasitism in wild zebra finches *Taeniopygia guttata*, revealed by DNA fingerprinting. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 27: p.315–324.
- DI BITETTI, M.S., L.G. PLACCI, Y L.A. DIETZ, 2003. *A biodiversity vision for the Upper Paraná Atlantic Forest eco-region: designing a biodiversity conservation landscape and setting priorities for conservation action*, Washington, EE.UU.: World Wildlife Fund.
- BITTENCOURT, J.V.M., Y A.M. SEBBENN, 2007. Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. *Heredity* 99: p.580–591.
- BIZERRIL, M.X., F.H.G. RODRIGUES, Y A. HASS, 2005. Fruit consumption and seed dispersal of *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae) by the lowland tapir in the cerrado of Central Brazil. *Braz. J. Biol.* 65: p.407–413.



- BLOUIN, M.S., 2003. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends Ecol. Evol.* 18: p.503–511.
- BODMER, R.E., 1990. Fruit patch size and frugivory in the lowland tapir (*Tapirus terrestris*). *J. Zool.* 222: p.121–128.
- BODMER, R.E., 1991. Strategies of seed dispersal and seed predation in Amazonian ungulates. *Biotropica* 23: p.255–261.
- BODMER, R.E., J. EISENBERG, Y K. REDFORD, 1997. Hunting and the likelihood of extinction of Amazonia mammals. *Conserv. Biol.* 11: p.460–466.
- BOND, W.J., 1994. Do mutualisms matter? Assessing the impact of pollinator and disperser disruption on plant extinction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 344: p.83–90.
- BORDIGNON, M., T.C.C. MARGARIDO, Y R.R. LANGE, 1996. Formas de abertura dos frutos de *Syagrus romanzoffiana* (Chamisso) Glassman efetuadas por *Sciurus ingrami* Thomas (Rodentia, Sciuridae). 13: p.821–828.
- BORN, C., O.J. HARDY, M.-H. CHEVALLIER, S. OSSARI, C. ATTÉKÉ, E.J. WICKINGS, Y M. HOSSAERT-MCKEY, 2008. Small-scale spatial genetic structure in the Central African rainforest tree species *Aucoumea klaineana*: a stepwise approach to infer the impact of limited gene dispersal, population history and habitat fragmentation. *Mol. Ecol.* 17: p.2041–2050.
- BRAVO, S.P., 2008. Seed dispersal and ingestion of insect-infested seeds by black howler monkeys in flooded forests of the Parana River, Argentina. *Biotropica* 40: p.471–476.
- BRAVO, S.P., 2009. Implications of behavior and gut passage for seed dispersal quality: the case of black and gold howler monkeys. *Biotropica* 41: p.751–758.
- BRAVO, S.P., 2012. The impact of seed dispersal by black and gold howler monkeys on forest regeneration. *Ecol. Res.* 27: p.311–321.
- BRODIE, J.F., O.E. HELMY, W.Y. BROCKELMAN, Y J.L. MARON, 2009. Bushmeat poaching reduces the seed dispersal and population growth rate of a mammal-dispersed tree. *Ecol. Appl.* 19: p.854–863.
- BROKAW, N.V.L., 1985. Gap-phase regeneration in a tropical forest. *Ecology* 66: p.682–687.
- BROOKFIELD, J.F., 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Mol. Ecol.* 5: p.453–455.
- BROOKS, D.M., R.E. BODMER, Y S. MATOLA, 1997. *Tapirs-Status Survey and Conservation Action Plan*, IUCN, Gland, Switzerland: IUCN/SSC Tapir Specialist Group.
- BUENO, R.S., R. GUEVARA, M.C. RIBEIRO, L. CULOT, F.S. BUFALO, Y M. GALETTI, 2013. Functional redundancy and complementarities of seed dispersal by the last Neotropical megafrugivores. *PLoS One* 8: p.e56252.
- BURCZYK, J., W.T. ADAMS, D.S. BIRKES, Y I.J. CHYBICKI, 2006. Using genetic markers to directly estimate gene flow and reproductive success parameters in plants on the basis of naturally regenerated seedlings. *Genetics* 173: p.363–372.

- CÁCERES, N.C., 2002. Food habits and seed dispersal by the white-eared opossum *Didelphis albiventris* in southern Brazil. *Stud. Neotrop. Fauna Environ.* 37: p.97–104.
- CÁCERES, N.C., L.Z. PRATES, I.R. GHIZONI-JR, Y M.E. GRAIPEL, 2009. Frugivory by the black-eared opossum *Didelphis aurita* in the Atlantic Forest of southern Brazil: Roles of sex, season and sympatric species. *Biotemas* 22: p.203–211.
- CAHILL, A.E., M.E. AIELLO-LAMMENS, M.C. FISHER-REID, X. HUA, C.J. KARANEWSKY, H.Y. RYU, G.C. SBEGLIA, F. SPAGNOLO, J.B. WALDRON, O. WARSI, Y J.J. WIENS, 2013. How does climate change cause extinction? *Proc. R. Soc. Biol. Sci.* 280: p.1–10.
- CAIN, M.L., B.G. MILLIGAN, Y A.E. STRAND, 2000. Long-distance seed dispersal in plant populations. *Am. J. Bot.* 87: p.1217–1227.
- CALLEN, D.F., A.D. THOMPSON, Y. SHEN, H.A. PHILLIPS, R.I. RICHARDS, J.C. MULLEY, Y G.R. SUTHERLAND, 1993. Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. *Am. J. Hum. Genet.* 52: p.922–7.
- CAMPOS-ARCEIZ, A., C. TRAEHOLT, R. JAFFAR, L. SANTAMARIA, R.T. CORLETT, Y L. SANTAMARÍA, 2012. Asian tapirs are no elephants when it comes to seed dispersal. *Biotropica* 44: p.220–227.
- CARPINETTI, B.N., 2009. El Parque Nacional Iguazú: Desafíos y oportunidades para la conservación de la selva paranaense de Argentina. En B. Carpinetti, M. Garciarena, y M. Almirón (Eds.) Parque Nacional Iguazú. Conservación y desarrollo de la Selva Paranaense de Argentina. pp. 23–32, Buenos Aires, Argentina: Administración de Parques Nacionales.
- CARVAJAL-RODRIGUEZ, A., Y J. DE UÑA-ALVAREZ, 2011. Assessing significance in high-throughput experiments by sequential goodness of fit and q-value estimation. *PLoS One* 6: p.e24700.
- CHACOFF, N., J. MORALES, Y M. VAQUERA, 2004. Efectos de la fragmentación sobre la aborción y depredación de semillas en el Chaco Serrano. *Biotropica* 36: p.109–117.
- CHALUKIAN, S.C., S. DE BUSTOS, D. VARELA, A. PAVIOLO, Y V. QUSE, 2009. Plan de acción para la conservación del tapir (*Tapirus terrestris*) en Argentina. En Grupo Especialista de Tapires, IUCN.
- CHAMBERS, J., Y J. MACMAHON, 1994. A day in the life of a seed: movements and fates of seeds and their implications for natural and managed systems. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25: p.263–292.
- CHARLESWORTH, D., Y B. CHARLESWORTH, 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: p.237–268.
- CHEBEZ, J.C., Y N. HILGERT, 2003. Brief history of conservation in the Paraná Forest. En C. Galindo-Leal y I. De Gusmão (Eds.) The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats and Outlook (State of the Hotspots, 1). Washington, EE.UU.: Center for Applied Biodiversity Science at Conservation International, Island Press.
- CHOO, J., T.E. JUENGER, Y B.B. SIMPSON, 2012. Consequences of frugivore-mediated seed dispersal for the spatial and genetic structures of a Neotropical palm. *Mol. Ecol.* 21: p.1019–1031.
- CINTO, J.P., Y M.P. BERTOLINI, 2003. Conservation capacity in the Paraná Forest. En C. Galindo-Leal y D. Gusmão Camara (Eds.) The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats and Outlook (State of the Hotspots, 1). pp. 227–244, Washington, EE.UU.: Center for Applied Biodiversity Science at Conservation International, Island Press.

- CINTRA, R., 1997. A test of the Janzen-Connell model with two common tree species in Amazonian forest. *J. Trop. Ecol.* 13: p.641–658.
- CLARK, D.A., Y D.B. CLARK, 1984. Spacing dynamics of a tropical rain forest tree: evaluation of the Janzen-Connell model. *Am. Nat.* 124: p.769–788.
- CLARK, J.S., Y Y. JI, 1995. Fecundity and dispersal in plant populations: implications on structure and diversity. *Am. Nat.* 146: p.72–111.
- CLAUSS, M., S. LANG-DEUERLING, D.W.H. MÜLLER, E. KIENZLE, P. STEUER, Y J. HUMMEL, 2010. Retention of fluid and particles in captive tapirs (*Tapirus* sp.). *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 157: p.95–101.
- COLLEVATTI, R.G., D. GRATTAPAGLIA, Y J.D. HAY, 2001. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Mol. Ecol.* 10: p.349–356.
- COLWELL, R.K., 2013. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 9. Manual del usuario y aplicación publicados en: <http://purl.oclc.org/estimates>.
- COLWELL, R.K., A. CHAO, N.J. GOTELLI, S. LIN, C.X. MAO, R.L. CHAZDON, Y J.T. LONGINO, 2012. Models and estimators linking individual-based and sample-based rarefaction, extrapolation and comparison of assemblages. *J. Plant Ecol.* 5: p.3–21.
- CONNELL, J.H., 1971. On the role of natural enemies in preventing competitive exclusion in some marine mammals and in rain forest trees. En P. J. Boer y G. Gradwell (Eds.) *Dynamics of Populations*. pp. 298–310, Wageningen: Centre for Agricultural Publications and Documentation.
- CORDEIRO, N.J., Y H.F. HOWE, 2001. Low recruitment of trees dispersed by animals in African forest fragments. *Conserv. Biol.* 15: p.1733–1741.
- CORDEIRO, N.J., Y H.F. HOWE, 2003. Forest fragmentation severs mutualism between seed dispersers and an endemic African tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: p.14052–14056.
- CRAMER, J.M., R.C.G. MESQUITA, Y G.B. WILLIAMSON, 2007. Forest fragmentation differentially affects seed dispersal of large and small-seeded tropical trees. *Biol. Conserv.* 137: p.415–423.
- CRAMER, J.M., R.C.G. MESQUITA, T.V. BENTOS, B. MOSER, Y G.B. WILLIAMSON, 2007. Forest fragmentation reduces seed dispersal of *Duckeodendron cestroides*, a Central Amazon endemic. *Biotropica* 39: p.709–718.
- CRAWFORD, K.M., Y K.D. WHITNEY, 2010. Population genetic diversity influences colonization success. *Mol. Ecol.* 19: p.1253–1263.
- CRAWFORD, T.J., 1984. The estimation of neighbourhood parameters for plant populations. *Heredity* 52: p.273–283.
- CRUZ, M.P., 2012. *Densidad, uso del hábitat y patrones de actividad diaria del tapir (Tapirus terrestris) en el Corredor Verde de Misiones*. Universidad de Buenos Aires.
- CULLEN JR., L., R.E. BODMER, Y C. VALLADARES PÁDUA, 2000. Effects of hunting in habitat fragments of the Atlantic forests, Brazil. *Biol. Conserv.* 95: p.49–56.

- CULLEN JR, L., E.R. BODMER, Y C. VALLADARES-PADUA, 2001. Ecological consequences of hunting in Atlantic forest patches, São Paulo, Brazil. *Oryx* 35: p.137–144.
- DAKIN, E.E., Y J.C. AVISE, 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93: p.504–509.
- DAVIDSON, D.W., Y S.R. MORTON, 1981. Competition for dispersal in ant-dispersed plants. *Science* 213: p.1259–61.
- DAYANANDAN, S., K.S. BAWA, Y R. KESSELI, 1997. Conservation of microsatellite among tropical trees (Leguminosae). *Am. J. Bot.* 84: p.1658–1663.
- DAYANANDAN, S., J. DOLE, K. BAWA, Y R. KESSELI, 1999. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). *Mol. Ecol.* 8: p.1585–1592.
- DE-LUCAS, A.I., S.C. GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, G.G. VENDRAMIN, E. HIDALGO, Y M. HEUERTZ, 2009. Spatial genetic structure in continuous and fragmented populations of *Pinus pinaster* Aiton. *Mol. Ecol.* 18: p.4564–4576.
- DENNIS, A.J., E.W. SCHUPP, R.J. GREEN, D.A. WESTCOTT, Y ET AL., 2007. *Seed dispersal: theory and its application in a changing world* A. J. Dennis, E. W. Schupp, R. J. Green, y D. A. Westcott (Eds.), Wallingford, Reino Unido: CAB International.
- DEVLIN, B., Y N.C. ELLSTRAND, 1990. The development and application of a refined method for estimating gene flow from angiosperm paternity analysis. *Evolution* 44: p.248–259.
- DICK, C.W., 2001. Genetic rescue of remnant tropical trees by an alien pollinator. *Proc. R. Soc. Biol. Sci.* 268: p.2391–2396.
- DICK, C.W., G. ETCHELECU, Y F. AUSTERLITZ, 2003. Pollen dispersal of tropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. *Mol. Ecol.* 12: p.753–764.
- DICK, C.W., O.J. HARDY, F.A. JONES, Y R.J. PETIT, 2008. Spatial scales of pollen and seed-mediated gene flow in tropical rain forest trees. *Trop. Plant Biol.* 1: p.20–33.
- DIMITRI, M.J., 1974. La flora arbórea del Parque Nacional Iguazú. *An. Parques Nac.* 12: p.1–180.
- DINERSTEIN, E., Y C.M. WEMMER, 1988. Fruits rhinoceros eat: dispersal of *Trewia nudiflora* (Euphorbiaceae) in lowland Nepal. *Ecology* 69: p.1768–1774.
- DIRZO, R., Y P.H. RAVEN, 2003. Global state of biodiversity and loss. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 28: p.137–167.
- DIRZO, R., E. MENDOZA, Y P. ORTIZ, 2007. Size-related differential seed predation in a heavily defaunated Neotropical rain forest. *Biotropica* 39: p.355–362.
- DOLIGEZ, A., C. BARIL, Y H.I. JOLY, 1998. Fine-scale spatial genetic structure with nonuniform distribution of individuals. *Genetics* 148: p.905–919.
- MAC DONAGH, P., Y L. RIVERO, 2006. ¿Es posible el uso sustentable de los bosques de la Selva Misionera? *In* A. Brown, U. Martínez Ortiz, M. Acerbi, y J. Corcuera (Eds.) *La Situación Ambiental Argentina 2005*. Buenos Aires, Argentina: Fundación Vida Silvestre Argentina.

- DONATTI, C.I., M. GALETTI, M.A. PIZO, P.R. GUIMARÃES JR, Y P. JORDANO, 2007. Living in the land of Ghosts: Fruit traits and the importance of large mammals as seed dispersers in the Pantanal, Brazil. En A. J. Dennis et al (Ed.) Seed dispersal: theory and its application in a changing world. CAB International.
- DOW, B.D., Y M. V. ASHLEY, 1996. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. Mol. Ecol. 5: p.615–627.
- DOYLE, J.J., Y J.L. DOYLE, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus (Madison). 12: p.13–15.
- DRANSFIELD, J., C.E. LEWIS, B. ASMUSSEN, J. BAKER, Y M. HARLEY, 2005. A new phylogenetic classification of the palm family, Arecaceae. Kew Bull. 60: p.559–569.
- DUBREUIL, M., M. RIBA, S.C. GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, G.G. VENDRAMIN, F. SEBASTIANI, Y M. MAYOL, 2010. Genetic effects of chronic habitat fragmentation revisited: Strong genetic structure in a temperate tree, *Taxus baccata* (Taxaceae), with great dispersal capability. Am. J. Bot. 97: p.303–310.
- EGUIARTE, L.E., N. PEREZ-NASSER, Y D. PIJERO, 1992. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. Heredity 69: p.217–228.
- ELDRIDGE, N., 1998. *Life in the Balance. Humanity and the Biodiversity Crisis*, Princeton, EE.UU.: Princeton University Press.
- ELLEGREN, H., 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nat. Rev. Genet. 5: p.435–45.
- ELLSTRAND, N.C., 1992. Gene flow by pollen: implications for plant conservation genetics. Oikos 63: p.77–86.
- ELLSTRAND, N.C., Y J. ANTONOVICS, 1985. Experimental studies of the evolutionary significance of sexual reproduction. II. A test of the density-dependent selection hypothesis. Evolution 39: p.657–666.
- ELLSTRAND, N.C., Y D.R. ELAM, 1993. Consequences of small population size: implications for plant conservation. Annu. Rev. Ecol. Syst. 24: p.217–242.
- ENNOS, R.A., 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. Heredity 72: p.250–259.
- EPPERSON, B.K., 1992. Spatial structure of genetic variation within populations of forest trees. New For. 6: p.257–278.
- EPPERSON, B.K., 2004. Multilocus estimation of genetic structure within populations. Theor. Popul. Biol. 65: p.227–237.
- EPPERSON, B.K., 2005. Estimating dispersal from short distance spatial autocorrelation. Heredity 95: p.7–15.
- EPPERSON, B.K., 2007. Plant dispersal, neighbourhood size and isolation by distance. Mol. Ecol. 16: p.3854–3865.
- EPPERSON, B.K., Y E.R. ÁLVAREZ-BUYLLA, 1997. Limited seed dispersal and genetic structure in life stages of *Cecropia obtusifolia*. Evolution 51: p.275–282.

- FAHEY, C., Y P.F. LANGHAMMER, 2003. The effects of dams on biodiversity in the Atlantic Forest. En C. Galindo-Leal y I. De Gusmão Camara (Eds.) *The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook (State of the Hotspots, 1)*. Washington, EE.UU.: Center for Applied Biodiversity Science at Conservation International, Island Press.
- FELSENSTEIN, J., 1985. Phylogenies and the comparative method. *Am. Nat.* 125: p.1–15.
- FISCHER, K.E., Y C.A. CHAPMAN, 1993. Frugivores and fruit syndromes: differences in patterns at the genus and species level. *Oikos* 66: p.472–482.
- FLEMING, T.H., Y K.R. LIPS, 1991. Angiosperm endozoochory: were pterosaurs cretaceous seed dispersers? *Am. Nat.* 138: p.1058–1065.
- FORGET, P.-M., Y P.A. JANSEN, 2007. Hunting increases dispersal limitation in the tree *Carapa procera*, a nontimber forest product. *Conserv. Biol.* 21: p.106–113.
- FORTIN, M.J., Y M.R.T. DALE, 2005. *Spatial analysis.*, Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.
- FOSTER, S.A., Y C.H. JANSON, 1985. The relationship between seed size and establishment conditions in tropical woody plants. *Ecology* 66: p.773–780.
- FRAGOSO, J.M. V., 1997. Tapir-generated seed shadows: scale-dependent patchiness in the Amazon Rain Forest. *J. Ecol.* 85: p.519.
- FRAGOSO, J.M. V., Y J.M. HUFFMAN, 2000. Seed-dispersal and seedling recruitment patterns by the last Neotropical megafaunal element in Amazonia, the tapir. *J. Trop. Ecol.* 16: p.369–385.
- FRAGOSO, J.M. V., K.M. SILVIUS, Y J.A. CORREA, 2003. Long-distance seed dispersal by tapirs increases seed survival and aggregates tropical trees. *Ecology* 84: p.1998–2006.
- FREELAND, J.R., P. BISS, Y J. SILVERTOWN, 2011. Contrasting patterns of pollen and seed flow influence the spatial genetic structure of sweet vernal grass (*Anthoxanthum odoratum*) populations. *J. Hered.* 103: p.28–35.
- FRICKE, E.C., M.J. SIMON, K.M. REAGAN, D.J. LEVEY, J.A. RIFFELL, T.A. CARLO, Y J.J. TEWKSBURY, 2013. When condition trumps location: seed consumption by fruit-eating birds removes pathogens and predator attractants. *Ecol. Lett.* 16: p.1031–1036.
- FUCHS, E.J., Y J.L. HAMRICK, 2010. Spatial genetic structure within size classes of the endangered tropical tree *Guaiacum sanctum* (Zygophyllaceae). *Am. J. Bot.* 97: p.1200–1207.
- FURNIER, G.R., P. KNOWLES, M.A. CLYDE, Y B.P. DANKIK, 1987. Effects of avian seed dispersal on the genetic structure of whitebark pine populations. *Evolution* 41: p.607–612.
- GAIOTTO, F.A., R.P. V. BRONDANI, Y D. GRATTAPAGLIA, 2001. Microsatellite markers for heart of palm — *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Arecaceae). *Mol. Ecol. Notes* 1: p.86–88.
- GAIOTTO, F.A., D. GRATTAPAGLIA, Y R. VENCOSKY, 2003. Genetic structure, mating system, and long-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). *J. Hered.* 94: p.399–406.
- GALETTI, M., M. PASCHOAL, Y F. PEDRONI, 1992. Predation on palm nuts (*Syagrus romanzoffiana*) by squirrels (*Sciurus ingrami*) in South-east Brazil. *J. Trop. Ecol.* 8: p.121–123.

- GALETTI, M., Y F. PEDRONI, 1994. Seasonal diet of capuchin monkeys (*Cebus apella*) in a semideciduous forest in South-east Brazil. *J. Trop.* 10: p.27–39.
- GALETTI, M., A. KEUROGHLIAN, L. HANADA, Y M.I. MORATO, 2001. Frugivory and seed dispersal by the lowland tapir (*Tapirus terrestris*) in Southeast Brazil. *Biotropica* 33: p.723–726.
- GALETTI, M., C.I. DONATTI, M.A. PIZO, Y H.C. GIACOMINI, 2008. Big fish are the best: seed dispersal of *Bactris glaucescens* by the pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*) in the Pantanal, Brazil. *Biotropica* 40: p.386–389.
- GALLARDO, A., L.F. MONTTI, Y S.P. BRAVO, 2008. Efectos del tacuarembó (*Chusquea ramosissima*, Poaceae) sobre el proceso de dispersión de semillas en la Selva Misionera. *Ecol. Austral* 18: p.347–356.
- GARCÍA, C., P. JORDANO, Y J.A. GODOY, 2007. Contemporary pollen and seed dispersal in a *Prunus mahaleb* population: patterns in distance and direction. *Mol. Ecol.* 16: p.1947–1955.
- GARCÍA, C., P. JORDANO, J.M. ARROYO, Y J.A. GODOY, 2009. Maternal genetic correlations in the seed rain: effects of frugivore activity in heterogeneous landscapes. *J. Ecol.* 97: p.1424–1435.
- GARCÍA, C., Y D. GRIVET, 2011. Molecular insights into seed dispersal mutualisms driving plant population recruitment. *Acta Oecologica* 37: p.632–640.
- GEHRING, J., Y L. DELPH, 1999. Fine-scale genetic structure and clinal variation in *Silene acaulis* despite high gene flow. *Heredity* 82: p.628–37.
- GIBSON, J.P., Y N.T. WHEELWRIGHT, 1995. Genetic structure in a population of a tropical tree *Ocotea tenera* (Lauraceae): Influence of avian seed dispersal. *Oecologia* 103: p.49–54.
- GIRAUDO, A.R., Y R.R. ABRAMSON, 1998. *Usos de la fauna silvestre por los pobladores rurales en la Selva Paranaense de Misiones: tipos de uso, influencia de la fragmentación y posibilidades de manejo sustentable. Boletín técnico N°42*, Buenos Aires, Argentina: Fundación Vida Silvestre Argentina.
- GIRAUDO, A.R., Y R.R. ABRAMSON, 2000. Diversidad cultural y usos de la fauna silvestre por lo pobladores de la selva misionera. Una alternativa de conservación? In C. Bertonatti y J. Corcuera (Eds.) *La Situación Ambiental Argentina 2000*. pp. 233–243, Buenos Aires, Argentina: Fundación Vida Silvestre Argentina.
- GIRAUDO, A.R., Y H. POVEDANO, 2003. Threats of extinction to flagship species in the Interior Atlantic Forest. En C. Galindo Leal y I. de Gusmão Camara (Eds.) *The Atlantic Forest of South America. Biodiversity status, threats, and outlook*. pp. 181–193, Washington: Island Press.
- GIRAUDO, A.R., H. POVEDANO, M.J. BELGRANO, E.R. KRAUCZUK, U. PARDIÑAS, A. MIQUELARENA, D. LIGIER, D. BALDO, Y M. CASTELINO, 2003. Biodiversity Status of the Interior Forest of Argentina. En C. Galindo Leal y I. de Gusmão Camara (Eds.) *The Atlantic Forest of South America. Biodiversity status, threats, and outlook*. pp. 160–180, Washington, EE.UU.: Island Press.
- GODOY, J.A., Y P. JORDANO, 2001. Seed dispersal by animals: exact identification of source trees with endocarp DNA microsatellites. *Mol. Ecol.* 10: p.2275–2283.

- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C., S. GERBER, T. CERVERA, M. MARTÍNEZ-ZAPATER, L. GIL, Y R. ALÍA, 2002. Seed gene flow and fine-scale structure in a Mediterranean pine (*Pinus pinaster* Ait.) using nuclear microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 104: p.1290–1297.
- GOTELLI, N., Y R. COLWELL, 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecol. Lett.* 4: p.379–391.
- GRIVET, D., P.E. SMOUSE, Y V.L. SORK, 2005. A novel approach to an old problem: tracking dispersed seeds. *Mol. Ecol.* 14: p.3585–3595.
- GRIVET, D., J.J. ROBLEDO-ARNUNCIO, P.E. SMOUSE, Y V.L. SORK, 2009. Relative contribution of contemporary pollen and seed dispersal to the effective parental size of seedling population of California valley oak (*Quercus lobata*, Née). *Mol. Ecol.* 18: p.3967–3979.
- GUARIGUATA, M., H. CLAIRE, Y G. JONES, 2002. Tree seed fate in a logged and fragmented forest landscape, northeastern Costa Rica. *Biotropica* 34: p.405–415.
- GUIMARÃES, P.R., P.F.M. LOPES, M.L. LYRA, Y A.P. MURIEL, 2005. Fleshy pulp enhances the location of *Syagrus romanzoffiana* (Arecaceae) fruits by seed-dispersing rodents in an Atlantic forest in south-eastern Brazil. *J. Trop. Ecol.* 21: p.109–112.
- GUIMARÃES, P.R., M. GALETTI, Y P. JORDANO, 2008. Seed dispersal anachronisms: rethinking the fruits extinct megafauna ate. *PLoS One* 3: p.e1745.
- GUIX, J.C., Y X. RUIZ, 1995. Toucans and thrushes as potential dispersers of seed-predatory weevil larvae in southeastern Brazil. *Can. J. Zool.* 73: p.745–748.
- GUIX, J.C., Y X. RUIZ, 1997. Weevil larvae dispersal by guans in southeastern Brazil. *Biotropica* 29: p.522–525.
- HALL, P., S. WALKER, Y K. BAWA, 1996. Effects of forest fragmentation on genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Pithecellobium elegans*. *Conserv. Biol.* 10: p.757–768.
- HAMADA, H., M.G. PETRINO, Y T. KAKUNAGA, 1982. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79: p.6465–6469.
- HAMILTON, M.B., 1999. Tropical tree gene flow and seed dispersal. *Nature* 401: p.129–130.
- HAMILTON, M.B., Y J.R. MILLER, 2002. Comparing relative rates of pollen and seed gene flow in the island model using nuclear and organelle measures of population structure. *Genetics* 162: p.1897–1909.
- HAMMOND, D.S., Y V.K. BROWN, 1995. Seed size of woody plants in relation to disturbance, dispersal, soil type in wet neotropical forests. *Ecology* 76: p.2544–2561.
- HAMRICK, J.L., 2004. Response of forest trees to global environmental changes. *For. Ecol. Manage.* 197: p.323–335.
- HAMRICK, J.L., M.J.W. GODT, Y S.L. SHERMAN-BROYLES, 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New For.* 6: p.95–124.
- HAMRICK, J.L., D.A. MURAWSKI, Y J.D. NASON, 1993. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. *Vegetatio* 107/108: p.281–297.



- HAMRICK, J.L., Y J.D. NASON, 1996. Consequences of dispersal in plants. En O. E. Rhodes, R. K. Chesser, y M. H. Smith (Eds.) *Population Dynamics in Ecological Space and Time*. pp. 203–236, Chicago, EE.UU.: University of Chicago Press.
- HAMRICK, J.L., Y D.W. TRAPNELL, 2011. Using population genetic analyses to understand seed dispersal patterns. *Acta Oecologica* 37: p.641–649.
- HANSKI, I., G.A. ZURITA, M.I. BELLOCQ, Y J. RYBICKI, 2013. Species-fragmented area relationship. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110: p.12715–12720.
- HANSON, T., S. BRUNSFELD, B. FINEGAN, Y L. WAITS, 2007. Conventional and genetic measures of seed dispersal for *Dipteryx panamensis* (Fabaceae) in continuous and fragmented Costa Rican rain forest. *J. Trop. Ecol.* 23: p.635–642.
- HANSON, T.R., S.J. BRUNSFELD, B. FINEGAN, Y L.P. WAITS, 2008. Pollen dispersal and genetic structure of the tropical tree *Dipteryx panamensis* in a fragmented Costa Rican landscape. *Mol. Ecol.* 17: p.2060–2073.
- HARDESTY, B.D., S.P. HUBBELL, Y E. BERMINGHAM, 2006. Genetic evidence of frequent long-distance recruitment in a vertebrate-dispersed tree. *Ecol. Lett.* 9: p.516–525.
- HARDY, O.J., 2003. Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterization of isolation-by-distance processes using dominant genetic markers. *Mol. Ecol.* 12: p.1577–1588.
- HARDY, O.J., Y X. VEKEMANS, 1999. Isolation by distance in a continuous population: reconciliation between spatial autocorrelation analysis and population genetics models. *Heredity* 83: p.145–154.
- HARDY, O.J., Y X. VEKEMANS, 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol. Ecol. Notes* 22: p.618–620.
- HARDY, O.J., L. MAGGIA, E. BANDOU, P. BREYNE, H. CARON, M.-H. CHEVALLIER, A. DOLIGEZ, C. DUTECH, A. KREMER, C. LATOUCHE-HALLÉ, V. TROISPOUX, V. VERON, Y B. DEGEN, 2006. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 neotropical tree species. *Mol. Ecol.* 15: p.559–571.
- HARMS, K.E., 2000. Pervasive density-dependent recruitment enhances seedling diversity in a tropical forest. *Nature* 404: p.493–495.
- HARPER, J.L., 1977. *Population biology of plants*, Londres, Reino Unido: Academic Press.
- HARTSHORN, G.S., 1978. Tree falls and tropical forest dynamics. En P. B. Tomlinson y M. H. Zimmerman (Eds.) *Tropical Trees as Living Systems*. pp. 617–638, Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.
- HECK, K.J., G. VAN BELLE, Y D. SIMBERLOFF, 1975. Explicit calculation of the rarefaction diversity measurement and the determination of sufficient sample size. *Ecology* 56: p.1459–1461.
- HEDRICK, P.W., 2001. Conservation genetics: where are we now? *Trends Ecol. Evol.* 16: p.629–636.
- HEDRICK, P.W., 2005. *Genetics of populations*, 3era ed., Sudbury, EE.UU.: Jones and Bartlett.
- HEDRICK, P.W., Y S.T. KALINOWSKI, 2000. Inbreeding depression in conservation biology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 31: p.139–162.

- HENRY, O., F. FEER, Y D. SABATIER, 2000. Diet of the Lowland Tapir (*Tapirus terrestris* L.) in French Guiana. *Biotropica* 32: p.364–368.
- HERRERA, C.M., 1984. Avian interference of insect frugivory: an exploration into the plant-bird-fruit pest evolutionary triad. *Oikos* 42: p.203–210.
- HERRERA, C.M., 1985. Determinants of plant-animal coevolution: the case of mutualistic dispersal of seeds by vertebrates. *Oikos* 44: p.132–141.
- HERRERA, C.M., 1992. Interspecific variation in fruit shape: allometry, phylogeny, and adaptation to dispersal agents. *Ecology* 73: p.1832–1841.
- HERRERA, C.M., P. JORDANO, L. LOPEZ-SORIA, Y J.A. AMAT, 1994. Recruitment of a mast-fruiting, bird-dispersed tree: Bridging frugivore activity and seedling establishment. *Ecol. Monogr.* 64: p.315–344.
- HEUERTZ, M., X. VEKEMANS, J.-F. HAUSMAN, M. PALADA, Y O.J. HARDY, 2003. Estimating seed vs. pollen dispersal from spatial genetic structure in the common ash. *Mol. Ecol.* 12: p.2483–2495.
- HEYWOOD, J.S., 1991. Spatial analysis of genetic variation in plant populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22: p.335–355.
- HIBERT, F., D. SABATIER, J. ANDRIVOT, C. SCOTTI-SAINTAGNE, S. GONZALEZ, M.-F. PRÉVOST, P. GRENAND, J. CHAVE, H. CARON, Y C. RICHARD-HANSEN, 2011. Botany, genetics and ethnobotany: A crossed investigation on the elusive tapir's diet in French Guiana. *PLoS One* 6: p.e25850.
- HIRAO, A.S., 2010. Kinship between parents reduces offspring fitness in a natural population of *Rhododendron brachycarpum*. *Ann. Bot.* 105: p.637–646.
- HIRSCH, B.T., 2009. Seasonal variation in the diet of ring-tailed coatis (*Nasua nasua*) in Iguazú, Argentina. *Oikos* 90: p.136–143.
- HODGE, S.S., M.H. DE QUEIROZ, Y A. REIS, 1997. Brazil's national Atlantic Forest policy: A challenge for state-level environmental planning. The case of Santa Catarina, Brazil. *J. Environ. Plan. Manag.* 40: p.335–348.
- HOLL, K.D., M.E. LOIK, E.H. V. LIN, Y I.A. SAMUELS, 2000. Tropical montane forest restoration in Costa Rica: Overcoming barriers to dispersal and establishment. *Restor. Ecol.* 8: p.339–349.
- HOLM, S., 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Stat.* 6: p.65–70.
- HOLZ, S., Y G. PLACCI, 2003. Socioeconomic roots of biodiversity loss in Misiones. En C. Galindo-Leal y I. De Gusmão Camara (Eds.) *The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats and Outlook (State of the Hotspots, 1)*. pp. 207–226, Washington, EE.UU.: Center for Applied Biodiversity Science at Conservation International, Island Press.
- HOWE, H.F., 1986. Seed dispersal by fruit-eating birds and mammals. En D. R. Murray (Ed.) *Seed Dispersal*. pp. 123–189, Sydney, Australia: Academic Press.
- HOWE, H.F., Y D. DE STEVEN, 1979. Fruit production, migrant bird visitation, and seed dispersal of *Guarea glabra* in Panama. *Oecologia* 39: p.185–196.
- HOWE, H.F., Y J. SMALLWOOD, 1982. Ecology of seed dispersal. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 13: p.201–228.

- HOWE, H.F., Y M.N. MIRITI, 2000. No question: seed dispersal matters. *Trends Ecol. Evol.* 15: p.434–436.
- HOWE, H.F., Y M.N. MIRITI, 2004. When seed dispersal matters. *Bioscience* 54: p.651–660.
- INDEC, 2001. Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas del año 2001. Disponible en: [http://www.indec.gov.ar/censo2001s2\\_2/ampliada\\_index.asp?mode=54](http://www.indec.gov.ar/censo2001s2_2/ampliada_index.asp?mode=54).
- INGLE, N.R., 2002. Seed dispersal by wind, birds, and bats between Philippine montane rainforest and successional vegetation. *Oecologia* 134: p.251–261.
- ISAGI, Y., D. SAITO, H. KAWAGUCHI, R. TATENO, Y S. WATANABE, 2007. Effective pollen dispersal is enhanced by the genetic structure of an *Aesculus turbinata* population. *J. Ecol.* 95: p.983–990.
- IUCN, 2013. IUCN Red List of Threatened Species. p. Versión 2013.1. Acceso el 8 de septiembre de 2013. Disponible en: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- JANSON, C., 1983. Adaptation of fruit morphology to dispersal agents in a Neotropical forest. *Science* 219: p.187–189.
- JANZEN, D.H., 1970. Herbivores and the number of the tree species in tropical forests. *Am. Nat.* 104: p.501–528.
- JANZEN, D.H., 1974. The deflowering of Central America. *Nat. Hist.* 83: p.49–53.
- JANZEN, D.H., 1981. Digestive seed predation by a costa rican baird's tapir. *Biotropica* 13: p.59–63.
- JANZEN, D.H., 1982. Seeds in tapir dung in Santa Rosa National Park, Costa Rica. *Brenesia* 19/20: p.129–135.
- JANZEN, D.H., 1983. Dispersal of seeds by vertebrate guts. En D. J. Futuyma y M. Slatkin (Eds.) *Coevolution*. pp. 232–262, Sunderland, EE.UU.: Sinauer Associates.
- JANZEN, D.H., Y P.S. MARTIN, 1982. Neotropical anachronisms: the fruits the gomphotheres ate. *Science* 215: p.19–27.
- JONES, A.G., C.M. SMALL, K.A. PACZOLT, Y N.L. RATTERMAN, 2010. A practical guide to methods of parentage analysis. *Mol. Ecol. Resour.* 10: p.6–30.
- JONES, F.A., J. CHEN, G.-J. WENG, Y S.P. HUBBELL, 2005. A genetic evaluation of seed dispersal in the neotropical tree *Jacaranda copaia* (Bignoniaceae). *Am. Nat.* 166: p.543–555.
- JONES, O.R., Y J. WANG, 2010. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Mol. Ecol. Resour.* 10: p.551–555.
- JORDANO, P., 1995. Angiosperm fleshy fruits and seed dispersers: a comparative analysis of adaptations and constraints in plant-animal interactions. *Am. Nat.* 145: p.163–191.
- JORDANO, P., 2010. Pollen, seeds and genes: the movement ecology of plants. *Heredity* 105: p.329–330.
- JORDANO, P., Y J.A. GODOY, 2005. Lab protocols for DNA extraction and genotyping of SSR microsatellites for *Prunus mahaleb* (Rosaceae) seeds and *Quercus* acorns. Versión 1.8. Disponible en: [http://ebd10.ebd.csic.es/pdfs/Prunus\\_Lab\\_Protocols.pdf](http://ebd10.ebd.csic.es/pdfs/Prunus_Lab_Protocols.pdf).

- JORDANO, P., D. VÁZQUEZ, Y J. BASCOMPTE, 2009. Redes complejas de interacciones mutualistas planta-animal. En R. Medel, M. Aizen, y R. Zamora (Eds.) *Ecología y evolución de las interacciones planta-animal*. pp. 17–41, Santiago de Chile, Chile: Editorial Universitaria.
- JULLIOT, C., 1997. Impact of seed dispersal by red howler monkeys *Alouatta seniculus* on the seedling population in the understorey of tropical rain forest. *J. Ecol.* 85: p.431–440.
- JUMP, A.S., Y J. PEÑUELAS, 2006. Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: p.8096–8100.
- KALINOWSKI, S.T., 2004. Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. *Conserv. Genet.* 5: p.539–543.
- KALINOWSKI, S.T., 2005. HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Mol. Ecol. Notes* 5: p.187–189.
- KALINOWSKI, S.T., A.P. WAGNER, Y M.L. TAPER, 2006. ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Mol. Ecol. Notes* 6: p.576–579.
- KALINOWSKI, S.T., M.L. TAPER, Y T.C. MARSHALL, 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 16: p.1099–1106.
- KALISZ, S., F.M. HANZAWA, S.J. TONSOR, D.A. THIEDE, Y S. VOIGT, 1999. Ant-mediated seed dispersal alters pattern of relatedness in a population of *Trillium grandiflorum*. *Ecology* 80: p.2620–2634.
- KAMEYAMA, Y., Y. ISAGI, Y N. NAKAGOSHI, 2002. Relatedness structure in *Rhododendron metternichii* var. *hondoense* revealed by microsatellite analysis. *Mol. Ecol.* 11: p.519–527.
- KARUBIAN, J., V.L. SORK, T. ROORDA, R. DURÃES, Y T.B. SMITH, 2010. Destination-based seed dispersal homogenizes genetic structure of a tropical palm. *Mol. Ecol.* 19: p.1745–1753.
- KAUFMAN, S., P. SMOUSE, Y E. ALVAREZ-BUYLLA, 1998. Pollen-mediated gene flow and differential male reproductive success in a tropical pioneer tree, *Cecropia obtusifolia* Bertol. (Moraceae): a paternity analysis. *Heredity* 81: p.164–173.
- KEUROGHLIAN, A., 1990. *Observations on the behavioral ecology of the black lion tamarin (Leontopithecus chrysopygus) at Caetetus Reserve, São Paulo, Brasil*. University of West Virginia.
- KEUROGHLIAN, A., Y D.P. EATON, 2008. Fruit availability and peccary frugivory in an isolated Atlantic Forest fragment: effects on peccary ranging behavior and habitat use. *Biotropica* 40: p.62–70.
- KEUROGHLIAN, A., Y D.P. EATON, 2009. Removal of palm fruits and ecosystem engineering in palm stands by white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) and other frugivores in an isolated Atlantic Forest fragment. *Biodivers. Conserv.* 18: p.1733–1750.
- KLIER, V. DE A., 2009. *Frugivoría e dispersão de sementes de Syagrus romanzoffiana (Cham.) Glassman em Floresta Atlântica na unidade de conservação ambiental desterro, Ilha de Santa Catarina, SC*. Universidade Federal de Santa Catarina.
- KRAMER, A.T., J.L. ISON, M. V ASHLEY, Y H.F. HOWE, 2008. The paradox of forest fragmentation genetics. *Conserv. Biol.* 22: p.878–885.

- LACLAU, P., 1994. *La conservación de los recursos naturales y el hombre en la Selva Paranaense. Boletín Técnico N°20*, Buenos Aires, Argentina: Fundación Vida Silvestre Argentina.
- LATTA, R.G., Y.B. LINHART, D. FLECK, Y M. ELLIOT, 1998. Direct and indirect estimates of seed versus pollen movement within a population of ponderosa pine. *Evolution* 52: p.61–67.
- LAURANCE, W.F., 1998. A crisis in the making: responses of Amazonian forests to land use and climate change. *Trends Ecol. Evol.* 13: p.411–415.
- LAURANCE, W.F., 2010. Habitat destruction: death by a thousand cuts. En N. S. Sodhi y P. R. Ehrlich (Eds.) *Conservation biology for All*. pp. 73–87, Oxford, Reino Unido: Oxford University Press.
- LAURANCE, W.F., T. LOVEJOY, H. VASCONCELOS, E.M. BRUNA, R.K. DIDHAM, P.C. STOUFFER, C. GASCON, R.O. BIERREGAARD, S.G. LAURANCE, Y E. SAMPAIO, 2002. Ecosystem decay of Amazonian forest fragments: a 22-year investigation. *Conserv. Biol.* 16: p.605–618.
- LEBERG, P.L., 2002. Estimating allelic richness- effects of sample size and bottlenecks. *Mol. Ecol.* 11: p.2445–2449.
- LEDIG, F.T., 1992. Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems. *Oikos* 63: p.87–109.
- LEIMU, R., Y M. FISCHER, 2010. Between-population outbreeding affects plant defence. *PLoS One* 5: p.e12614.
- LEMER, S., E. ROCHEL, Y S. PLANES, 2011. Correction method for null alleles in species with variable microsatellite flanking regions, a case study of the black-lipped pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *J. Hered.* 102: p.243–246.
- LENGYEL, S., A.D. GOVE, A.M. LATIMER, J.D. MAJER, Y R.R. DUNN, 2009. Ants sow the seeds of global diversification in flowering plants. *PLoS One* 4: p.e5480.
- LESSA, E.P., Y R.A. FARIÑA, 1996. Reassessment of extinction patterns among the late Pleistocene mammals of South America. *Palaeontology* 39: p.651–662.
- LEVIN, D.A., 1981. Dispersal versus gene flow in plants. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 68: p.233–253.
- LEVIN, D.A., Y H.W. KERSTER, 1974. Gene flow in seed plants. *Evol. Biol.* 7: p.139–220.
- LEWONTIN, R.C., Y J.L. HUBBY, 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila Pseudoobscura*. *Genetics* 54: p.595–609.
- LIEBERMAN, D., J.B. HALL, M.D. SWAINE, Y M. LIEBERMAN, 1979. Seed dispersal by baboons in the Shai Hills, Ghana. *Ecology* 60: p.65–75.
- LINHART, Y.B., Y M.C. GRANT, 1996. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27: p.237–277.
- LOISELLE, B.A., V.L. SORK, J. NASON, Y C. GRAHAM, 1995. Spatial genetic structure of a tropical understorey shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *Am. J. Bot.* 82: p.1420–1425.
- LOMÁSCOLO, S.B., D.J. LEVEY, R.T. KIMBALL, B.M. BOLKER, Y H.T. ALBORN, 2010. Dispersers shape fruit diversity in *Ficus* (Moraceae). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: p.14668–14672.

- LORD, J., M. WESTOBY, Y M. LEISHMAN, 1995. Seed size and phylogeny in six temperate floras: constraints, niche conservatism, and adaptation. *Am. Nat.* 146: p.349–364.
- LORENZI, H., H.M. SOUZA, L.S.C. CERQUEIRA, J.T.M. COSTA, Y E. FERREIRA, 2004. *Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas*, Nova Odessa, Brazil: Instituto Plantarum de Estudos da Flora.
- LOVELESS, M.D., Y J.L. HAMRICK, 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 15: p.65–95.
- LOWE, A., S. HARRIS, Y P. ASHTON, 2004. *Ecological genetics: design, analysis, and application*, Oxford, Reino Unido: Blackwell Science Ltd.
- LOWE, A.J., D. BOSHIER, M. WARD, C.F.E. BACLES, Y C. NAVARRO, 2005. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity* 95: p.255–273.
- LUIKART, G., Y J.-M. CORNUET, 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conserv. Biol.* 12: p.228–237.
- MALÉCOT, G., 1946. La consanguinité dans une population limitée. *Comptes Rendus l'Académie des Sci.* 222: p.841–843.
- MANTEL, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27: p.209–220.
- MARKL, J.S., M. SCHLEUNING, P.M. FORGET, P. JORDANO, J.E. LAMBERT, A. TRAVESET, S.J. WRIGHT, Y K. BÖHNING-GAESE, 2012. Meta-analysis of the effects of human disturbance on seed dispersal by animals. *Conserv. Biol.* 26: p.1072–1081.
- MARSHALL, T.C., J. SLATE, L.E.B. KRUIK, Y J.M. PEMBERTON, 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7: p.639–655.
- MARTIN, P.S., Y R.G. KLEIN, 1984. *Quaternary Extinctions: A Prehistoric Revolution*, Tucson, EE.UU.: University of Arizona Press.
- MARTÍNEZ, A.K., E. GAITÁN-SOLÍS, M.C. DUQUE, R. BERNAL, Y J. TOHME, 2002. Microsatellite loci in *Bactris gasipaes* (Arecaceae): their isolation and characterization. *Mol. Ecol. Notes* 2: p.408–410.
- MARTÍNEZ-GARZA, C., Y H.F. HOWE, 2003. Restoring tropical diversity: beating the time tax on species loss. *J. Appl. Ecol.* 40: p.423–429.
- MARTINS, T.K., 2010. *Testemunhos em jerivá: Segregação de besouros endófagos em frutos de Syagrus romanzoffiana (Arecaceae)*. Trabajo realizado durante el curso de posgrado Ecología da Mata Atlántica, São Paulo, Brasil: Departamento de Ecologia - Universidade de São Paulo.
- MAURO-HERRERA, M., A.W. MEEROW, J.W. BORRONE, D.N. KUHN, Y R.J. SCHNELL, 2006. Ten informative markers developed from WRKY sequences in coconut (*Cocos nucifera*). *Mol. Ecol. Notes* 6: p.904–906.
- MAYNARD SMITH, J., 1978. *The Evolution of Sex*, Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.
- MCCAULEY, D.E., 1995. The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. *Trends Ecol. Evol.* 10: p.198–202.

- MCCAULEY, D.E., 1997. The relative contributions of seed and pollen movement to the local genetic structure of *Silene alba*. *J. Hered.* 88: p.257–263.
- MEAGHER, T.R., Y E.A. THOMPSON, 1986. The relationship between single parent and parent pair genetic likelihoods in genealogy reconstruction. *Theor. Popul. Biol.* 29: p.87–106.
- MEAGHER, T.R., Y E.A. THOMPSON, 1987. Analysis of parentage for naturally established seedlings of *Chamaelirium luteum* (Liliaceae). *Ecology* 68: p.803–812.
- MEEROW, A.W., L. NOBLICK, J.W. BORRONE, T.L.P. COUVREUR, M. MAURO-HERRERA, W.J. HAHN, D.N. KUHN, K. NAKAMURA, N.H. OLEAS, Y R.J. SCHNELL, 2009. Phylogenetic analysis of seven WRKY genes across the palm subtribe Attaleinae (Arecaceae) identifies *Syagrus* as sister group of the coconut. *PLoS One* 4: p.e7353.
- MERCOLLI, C., Y A.A. YANOSKY, 1994. The diet of adult *Tupinambis teguixin* (Sauria: Teiidae) in the eastern Chaco of Argentina. *Herpetol. J.* 4: p.15–19.
- METZGER, J.P., 2009. Conservation issues in the Brazilian Atlantic forest. *Biol. Conserv.* 142: p.1138–1140.
- MIESFELD, R., M. KRISTAL, Y N. ARNHEIM, 1981. A member of a new repeated sequence family which is conserved throughout eucaryotic evolution is found between the human  $\delta$ - and  $\beta$ - globin genes. *Nucleic Acids Res.* 9: p.5931–5947.
- MILLER, M.F., 1994. Large African herbivores, bruchid beetles and their interactions with *Acacia* seeds. *Oecologia* 97: p.265–270.
- MILLIGAN, B.G., 2003. Maximum-likelihood estimation of relatedness. *Genetics* 163: p.1153–1167.
- MONTENEGRO, O.L., 2004. *Natural licks as keystone resources for wildlife and people in Amazonia*. University of Florida.
- MOORE, J.E., Y R.K. SWIHART, 2007. Importance of fragmentation-tolerant species as seed dispersers in disturbed landscapes. *Oecologia* 151: p.663–674.
- MORAIS, A.A., 2006. *Dieta Frugívora de Tapirus terrestris e deposição de fezes: Contribuição para a dispersão de sementes e regeneração de florestas, Amazônia Central, AM*. Universidade Federal do Amazonas.
- MOREIRA, P.A., G.W. FERNANDES, Y R.G. COLLEVATTI, 2009. Fragmentation and spatial genetic structure in *Tabebuia ochracea* (Bignoniaceae) a seasonally dry Neotropical tree. *For. Ecol. Manage.* 258: p.2690–2695.
- MORGANTE, M., Y A.M. OLIVIERI, 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3: p.175–182.
- MOTTA-JUNIOR, J.C., Y K. MARTINS, 2002. The frugivorous diet of the maned wolf, *Cyrosocyon brachyurus*, in Brazil: Ecology and conservation. En D. J. Levey, W. R. Silva, y M. Galetti (Eds.) *Seed dispersal and frugivory: Ecology, evolution and conservation*. pp. 291–303, CAB International.
- EL MOUSADIK, A., Y R.J. PETIT, 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theor. Appl. Genet.* 92: p.832–839.

- MULLER-LANDAU, H.C., 2007. Predicting the long-term effects of hunting on plant species composition and diversity in tropical forests. *Biotropica* 39: p.372–384.
- MURAWSKI, D.A., I.A.U. NIMAL GUNATILLEKE, Y K.S. BAWA, 1994. The effects of selective logging in *Shorea megistophylla* (Dipterocarpaceae) on inbreeding from Sri Lanka. 8: p.997–1002.
- MYERS, N., R.A. MITTERMEIER, C.G. MITTERMEIER, G.A.B. FONSECA, Y J. KENT, 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: p.853–858.
- NAKAMURA, R.R., 1980. Plant kin selection. *Evol. Theory* 5: p.113–117.
- NAKANISHI, A., N. TOMARU, H. YOSHIMARU, T. MANABE, Y S. YAMAMOTO, 2009. Effects of seed- and pollen-mediated gene dispersal on genetic structure among *Quercus salicina* saplings. *Heredity* 102: p.182–189.
- NASON, J.D., E.A. HERRE, Y J.L. HAMRICK, 1996. Paternity analysis of the breeding structure of strangler fig for substantial populations: evidence wasp dispersal. *J. Biogeogr.* 23: p.501–512.
- NASON, J.D., Y J.L. HAMRICK, 1997. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: Two case studies of neotropical canopy trees. *J. Hered.* 88: p.264–276.
- NATHAN, R., 2007. Total dispersal kernels and the evaluation of diversity and similarity in complex dispersal systems. En A. J. Dennis, E. W. Schupp, R. J. Green, y D. A. Westcott (Eds.) *Seed dispersal: theory and its application in a changing world*. pp. 252–276, Wallingford, Reino Unido: CAB International.
- NATHAN, R., Y H. MULLER-LANDAU, 2000. Spatial patterns of seed dispersal, their determinants and consequences for recruitment. *Trends Ecol. Evol.* 15: p.278–285.
- NAZARENO, A.G., Y M.S. DOS REIS, 2012. Linking phenology to mating system: exploring the reproductive biology of the threatened palm species *Butia eriospatha*. *J. Hered.* 103: p.842–852.
- NEI, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*, New York, EE.UU.: Columbia University Press.
- NEI, M., T. MARUYAMA, Y R. CHAKRABORTY, 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29: p.1–10.
- NEIGEL, J.E., 1997. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28: p.105–128.
- NIELSEN, R., D.R. TARPY, Y H.K. REEVE, 2003. Estimating effective paternity number in social insects and the effective number of alleles in a population. *Mol. Ecol.* 12: p.3157–3164.
- NOBLE, J.C., 1975. The effects of emus (*Dromaius novaehollandiae* Latham) on the distribution of the nitre bush (*Nitraria Billardieri* DC.). *J. Ecol.* 63: p.979–984.
- NOSS, A.J., R.L. CUÉLLAR, J. BARRIENTOS, L. MAFFEI, E. CUÉLLAR, R. ARISPE, D. RÚMIZ, Y K. RIVERO, 2003. A camera trapping and radio telemetry study of lowland tapir (*Tapirus terrestris*) in bolivian dry forests. *Tapir Conserv. (Newsletter IUCN/SSC Tapir Spec. Group)* 12: p.24–32.
- NOSS, A.J., Y L. CUÉLLAR, 2008. La sostenibilidad de la cacería de *Tapirus terrestris* y de *Tayassu pecari* en la tierra comunitaria de origen isoso: el modelo de cosecha unificado. *Mastozoología Neotrop.* 15: p.241–252.



- NUCCI, S.M., J.A. AZEVEDO-FILHO, C.A. COLOMBO, R.H.G. PRIOLLI, R.M. COELHO, T.L. MATA, Y M.I. ZUCCHI, 2008. Development and characterization of microsatellites markers from the macaw. *Mol. Ecol. Resour.* 8: p.224–226.
- O'CONNELL, L.M., A. MOSSELER, Y O.P. RAJORA, 2007. Extensive long-distance pollen dispersal in a fragmented landscape maintains genetic diversity in white spruce. *J. Hered.* 98: p.640–645.
- ODDOU-MURATORIO, S., Y E.K. KLEIN, 2008. Comparing direct vs. indirect estimates of gene flow within a population of a scattered tree species. *Mol. Ecol.* 17: p.2743–2754.
- OHSAWA, R.Y.O., N. FURUYA, Y Y. UKAIL, 1993. Effect of spatially restricted pollen flow on spatial genetic structure of an animal-pollinated allogamous plant population. *Heredity* 71: p.64–73.
- OLMOS, F., R. PARDINI, R.L.P. BOULHOSA, R. BÜRGI, Y C. MORSELLO, 1999. Do tapirs steal food from palm seed predators or give them a lift? *Biotropica* 31: p.375–379.
- VAN OOSTERHOUT, C., W.F. HUTCHINSON, D.P.M. WILLS, Y P. SHIPLEY, 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4: p.535–538.
- OR, K., Y D. WARD, 2003. Three-way interactions between *Acacia*, large mammalian herbivores and bruchid beetles - a review. *Afr. J. Ecol.* 41: p.257–265.
- OUBORG, N.J., Y. PIQUOT, Y J.M. VAN GROENENDAEL, 1999. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *J. Ecol.* 87: p.551–568.
- OWADALLY, A.W., 1979. The dodo and the tambalacoque tree. *Science* 203: p.1363–1364.
- PACHECO, L.F., Y J.A. SIMONETTI, 2000. Genetic structure of a mimosoid tree deprived of its seed disperser, the spider monkey. *Conserv. Biol.* 14: p.1766–1775.
- PARANHOS, S.J., C. BARROS, D. ARAÚJO, Y L. OCTAVIO, 2007. Comportamento alimentar do Periquito-de-encontro-amarelo (*Brotogeris chiriri*) no interior do estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Bras. Ornitol.* 15: p.95–101.
- PARDINI, E.A., Y J.L. HAMRICK, 2008. Inferring recruitment history from spatial genetic structure within populations of the colonizing tree *Albizia julibrissin* (Fabaceae). *Mol. Ecol.* 17: p.2865–2879.
- PASCHOAL, M., Y M. GALETTI, 1995. Seasonal food use by the Neotropical squirrel *Sciurus ingrami* in southeastern Brazil. *Biotropica* 27: p.268–273.
- PAVIOLO, A., 2010. *Densidad de yaguareté (Panthera onca) en la selva Paranaense: su relación con la disponibilidad de presas, presión de caza y coexistencia con el puma (Puma concolor)*. Universidad Nacional de Córdoba (UNC).
- PAVIOLO, A., C.D. DE ANGELO, Y.E. DI BLANCO, I. AGOSTINI, E. PICIO, R. MELZEW, C. FERRARI, L. PALACIO, Y M. DI BITETTI, 2009. Efecto de la caza furtiva y el nivel de protección en la abundancia de los grandes mamíferos del Bosque Atlántico de Misiones. En B. N. Carpinetti, M. Garciarena, y M. Almirón (Eds.) Parque Nacional Iguazú. Conservación y desarrollo de la Selva Paranaense de Argentina. pp. 237–254, Buenos Aires, Argentina: Administración de Parques Nacionales.
- PEAKALL, R., Y A.J. BEATTIE, 1995. Does ant dispersal of seeds in *Sclerolaena diacantha* (Chenopodiaceae) generate local spatial genetic structure? *Heredity* 75: p.351–361.

- PEAKALL, R., Y P.E. SMOUSE, 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6: p.288–295.
- PEAKALL, R., Y P. SMOUSE, 2012. GenAIEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 1: p.1–3.
- PEDÓ, E., A.C. TOMAZZONI, S.M. HARTZ, Y A.U. CHRISTOFF, 2006. Diet of crab-eating fox, *Cerdocyon thous* (Linnaeus) (Carnivora, Canidae), in a suburban area of southern Brazil. *Rev. Bras. Zool.* 23: p.637–641.
- PEMBERTON, J.M., J. SLATE, D.R. BANCROFT, Y J.A. BARRETT, 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Mol. Ecol.* 4: p.249–252.
- PERERA, L., J.R. RUSSELL, J. PROVAN, Y W. POWELL, 1999. Identification and characterization of microsatellite loci in coconut (*Cocos nucifera* L.) and the analysis of coconut populations in Sri Lanka. *Mol. Ecol.* 8: p.335–346.
- PERES, C.A., Y M. VAN ROOSMALEN, 2002. Patterns of primate frugivory in Amazonia and the Guianan shield: Implications to the demography of large-seeded plants in overhunted tropical forests. En D. Levey, W. Silva, y M. Galetti (Eds.) *Seed dispersal and frugivory: Ecology, evolution and conservation*. pp. 407–423, Oxford, Reino Unido: CAB International.
- PERES, C.A., Y E. PALACIOS, 2007. Basin-wide effects of game harvest on vertebrate population densities in amazonian forests: implications for animal-mediated seed dispersal. *Biotropica* 39: p.304–315.
- PETIT, R.J., A. EL MOUSADIK, Y O. PONS, 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conserv. Biol.* 27: p.844–855.
- PETIT, R.J., J. DUMINIL, S. FINESCHI, A. HAMPE, D. SALVINI, Y G.G. VENDRAMIN, 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Mol. Ecol.* 14: p.689–701.
- VAN DER PIJL, L., 1972. *Principles of dispersal in higher plants*, 2da ed., New York, EE.UU.: Springer Verlag.
- PIMM, S.L., Y P. RAVEN, 2000. Extinction by numbers. *Nature* 403: p.843–845.
- PLACCI, L.G., 2000. El desmonte en misiones: impactos y medidas de mitigación. En C. Bertonatti y J. Corcuera (Eds.) *Situación ambiental Argentina 2000*. Buenos Aires, Argentina: Fundación Vida Silvestre Argentina.
- PLACCI, L.G., S.I. ARDITI, Y L.E. CIOTECK, 1994. Productividad de hojas, flores y frutos en el Parque Nacional Iguazú, Misiones. *Yvyrareta* 5: p.49–56.
- PLACCI, L.G., Y M. DI BITETTI, 2006. Situación ambiental en la ecorregión del Bosque Atlántico del Alto Paraná (Selva Paranaense). En A. Brown, U. Martínez Ortiz, M. Acerbi, y J. Corcuera (Eds.) *La Situación Ambiental Argentina 2005*. Buenos Aires, Argentina: Fundación Vida Silvestre Argentina.
- POREBSKI, S., L.G. BAILEY, Y B.R. BAUM, 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Report.* 15: p.8–15.

- POSPÍŠKOVÁ, M., Y I. ŠÁLKOVÁ, 2006. Population structure and parentage analysis of black poplar along the Morava River. *Can J. For. Res.* 36: p.1067–1076.
- POUVELLE, S., S. JOUARD, F. FEER, T. TULLY, Y J.-F. PONGE, 2009. The latrine effect: impact of howler monkeys on the distribution of small seeds in a tropical rain-forest soil. *J. Trop. Ecol.* 25: p.239–248.
- PRANCE, G.T., Y S.A. MORI, 1978. Observations on the fruits and seeds of Lecythidaceae. *Brittonia* 30: p.21–33.
- PRICE, M. V., Y N.M. WASER, 1982. Population structure, frequency-dependent selection, and the maintenance of sexual reproduction. *Evolution* 36: p.35–43.
- QUIROGA-CASTRO, V.D., Y A.I. ROLDÁN, 2001. The fate of *Attalea phalerata* (Palmae) seeds dispersed to a tapir latrine. *Biotropica* 33: p.472–477.
- RANZANI DE LUCA, J., 2010. *Seleção de frutos de jervá Syagrus romanzoffiana (Arecaceae) por besouros predadores de sementes*. Trabajo realizado durante el curso de posgrado Ecologia da Mata Atlântica, São Paulo, Brasil: Departamento de Ecologia - Universidade de São Paulo.
- REDFORD, K., 1992. The empty forest. *Bioscience* 42: p.412–422.
- REDFORD, K.H., Y P. FEISINGER, 2001. The half-empty forest: sustainable use and the ecology of interactions. En J. D. Reynolds, G. M. Mace, K. H. Redford, y J. G. Robinson (Eds.) *Conservation of exploited species*. pp. 370–399, Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.
- REY, P.J., 1995. Spatio-temporal variation in fruit and frugivorous bird abundance in olive orchards. *Ecology* 76: p.1625–1635.
- REY, P.J., Y J.M. ALCANTARA, 2000. Recruitment dynamics of a fleshy-fruited plant (*Olea europaea*): Connecting patterns of seed dispersal to seedling establishment. *J. Ecol.* 88: p.622–633.
- RIBEIRO, M.C., J.P. METZGER, A.C. MARTENSEN, F.J. PONZONI, Y M.M. HIROTA, 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biol. Conserv.* 142: p.1141–1153.
- RICE, W.R., 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: p.223–225.
- RIOS, R.S., Y L.F. PACHECO, 2006. The effect of dung and dispersal on postdispersal seed predation of *Attalea phalerata* (Arecaceae) by bruchid beetles. *Biotropica* 38: p.778–781.
- RITLAND, K., 2002. Extensions of models for the estimation of mating systems using  $n$  independent loci. *Heredity* 88: p.221–228.
- RIVERA, R., K.J. EDWARDS, J.H. BARKER, G.M. ARNOLD, G. AYAD, T. HODGKIN, Y A. KARP, 1999. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in *Cocos nucifera* L. *Genome* 42: p.668–675.
- ROCHA, V.J., L.M. AGUIAR, J.E. SILVA-PEREIRA, R.F. MORO-RIOS, Y F.C. PASSOS, 2008. Feeding habits of the crab-eating fox, *Cerdocyon thous* (Carnivora: Canidae), in a mosaic area with native and exotic vegetation in Southern Brazil. *Rev. Bras. Zool.* 25: p.594–600.

- RODRIGUES, D.P., C. VINSON, A.Y. CIAMPI, I.P. FARIAS, M.R. LEMES, S. ASTOLFI-FILHO, Y C.R. CLEMENT, 2004. Novel microsatellite markers for *Bactris gasipaes* (Palmae). Mol. Ecol. Notes 4: p.575–576.
- RODRIGUES, M., F. OLMOS, Y M. GALETTI, 1993. Seed dispersal by tapir in southeastern Brazil. Mammalia 57: p.460–461.
- RODRIGUES, R.R., R.A.F. LIMA, S. GANDOLFI, Y A.G. NAVE, 2009. On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. Biol. Conserv. 142: p.1242–1251.
- RODRÍGUEZ-MAZZINI, R., Y B. MOLINA ESPINOSA, 2000. *El zorro de monte (Cercocyon thous) como agente dispersor de semillas de palma. Estudios realizados en la Estación Biológica Potrerillo de Santa Teresa. Reserva de Biósfera Bañados del Este*, Rocha, Uruguay.
- ROMAN, C., L. TELLES NETO, Y N. CÁCERES, 2010. Fruit manipulation of the palm *Syagrus romanzoffiana* by vertebrates in southern Brazil. Neotrop. Biol. Conserv. 5: p.101–105.
- ROSENBERG, M.S., Y C.D. ANDERSON, 2011. PASSaGE: Pattern analysis, spatial statistics and geographic exegesis. Version 2. Methods Ecol. Evol. 2: p.229–232.
- ROUSSET, F., 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-Statistics under isolation by distance. Genetics 145: p.1219–1228.
- ROUSSET, F., 2002. Inbreeding and relatedness coefficients: what do they measure? Heredity 88: p.371–380.
- ROUSSET, F., 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. Mol. Ecol. Resour. 8: p.103–106.
- ROUSSET, F., Y M. RAYMOND, 1995. Testing heterozygote excess and deficiency. Genetics 140: p.1413–1419.
- RUSSO, S.E., Y C.K. AUGSPURGER, 2004. Aggregated seed dispersal by spider monkeys limits recruitment to clumped patterns in *Viola calophylla*. Ecol. Lett. 7: p.1058–1067.
- SALAS, L.A., Y T.K. FULLER, 1996. Diet of the lowland tapir (*Tapirus terrestris* L.) in the Tabaro River valley, southern Venezuela. Can. J. Zool. 74: p.1444–1451.
- SANTOS, L.G.R.O., L.C.P. MACHADO FILHO, M.A. TORTATO, D.B. FALKEMBERG, Y M.J. HÖTZEL, 2005. Diet of tapirs (*Tapirus terrestris*) introduced in a salt marsh area. Tapir Conserv. - Newsl. IUCN/SSC Tapir Spec. Group. 14/2: p.22–27.
- DOS SANTOS, M. DE F., Y S.M. HARTZ, 1999. The foods habits of *Procyon cancrivorus* (Carnivora, Procyonidae) in the Lami Biological Reserve, Porto Alegre, southern Brazil. Mammalia 63: p.525–530.
- SATO, T., Y. ISAGI, H. SAKIO, K. OSUMI, Y S. GOTO, 2006. Effect of gene flow on spatial genetic structure in the riparian canopy tree *Cercidiphyllum japonicum* revealed by microsatellite analysis. Heredity 96: p.79–84.
- SAZIMA, I., 2008. The parakeet *Brotogeris tirica* feeds on and disperses the fruits of the palm *Syagrus romanzoffiana* in Southeastern Brazil. Biota Neotrop. 8: p.231–234.

- SCHMITT, J., Y J. ANTONOVICS, 1986. Experimental studies of the evolutionary significance of sexual reproduction. IV. Effect of neighbor relatedness and aphid infestation on seedling performance. *Evolution* 40: p.830–836.
- SCHNABEL, A., J.D. NASON, Y J.L. HAMRICK, 1998. Understanding the population genetic structure of *Gleditsia triacanthos* L.: seed dispersal and variation in female reproductive success. *Mol. Ecol.* 7: p.819–832.
- SCHUPP, E.W., 1993. Quantity, quality and the effectiveness of seed dispersal by animals. *Vegetatio* 107/108: p.15–29.
- SCHUPP, E.W., H.F. HOWE, C.K. AUGSPURGER, Y D.J. LEVEY, 1989. Arrival and survival in tropical treefall gaps. *Ecology* 70: p.562–564.
- SCHUPP, E.W., Y M. FUENTES, 1995. Spatial patterns of seed dispersal and the unification of plant population ecology. *Ecoscience* 2: p.267–275.
- SCHUPP, E.W., P. JORDANO, Y J.M. GÓMEZ, 2010. Seed dispersal effectiveness revisited: a conceptual review. *New Phytol.* 188: p.333–353.
- SCHUSTER, W.S.F., Y J.B. MITTON, 1991. Relatedness within clusters of a bird-dispersed pine and the potential for kin interactions. *Heredity* 67: p.41–48.
- SCOFIELD, D.G., V.L. SORK, Y P.E. SMOUSE, 2010. Influence of acorn woodpecker social behaviour on transport of coast live oak (*Quercus agrifolia*) acorns in a southern California oak savanna. *J. Ecol.* 98: p.561–572.
- SCOFIELD, D.G., V.R. ALFARO, V.L. SORK, D. GRIVET, E. MARTINEZ, J. PAPP, A.R. PLUESS, W.D. KOENIG, Y P.E. SMOUSE, 2011. Foraging patterns of acorn woodpeckers (*Melanerpes formicivorus*) on valley oak (*Quercus lobata* Née) in two California oak savanna-woodlands. *Oecologia* 166: p.187–96.
- SCOFIELD, D.G., P.E. SMOUSE, J. KARUBIAN, Y V.L. SORK, 2012. Use of alpha, beta, and gamma diversity measures to characterize seed dispersal by animals. *Am. Nat.* 180: p.719–732.
- SIH, A., B. GUNNAR JONSSON, Y G. LUIKART, 2000. Habitat loss: ecological, evolutionary and genetic consequences. *Trends Ecol. Evol.* 15: p.132–134.
- DA SILVA, F.R., R.M. BEGNINI, B.C. LOPES, Y T.T. CASTELLANI, 2011. Seed dispersal and predation in the palm *Syagrus romanzoffiana* on two islands with different faunal richness, southern Brazil. *Stud. Neotrop. Fauna Environ.* 46: p.37–41.
- SILVIUS, K.M., Y J.M. V. FRAGOSO, 2002. Pulp handling by vertebrate seed dispersers increases palm seed predation by bruchid beetles in the northern Amazon. *J. Ecol.* 90: p.1024–1032.
- SKOLE, D.L., Y C.J. TUCKER, 1993. Tropical deforestation and habitat fragmentation in the Amazon: satellite data from 1978 to 1988. *Science* 260: p.1905–1910.
- SLATKIN, M., 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: p.787–792.
- SLATKIN, M., Y N.H. BARTON, 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43: p.1349–1368.

- SLATKIN, M., Y H.E. ARTER, 1991a. Spatial autocorrelation methods in population genetics. *Am. Nat.* 138: p.499–517.
- SLATKIN, M., Y H.E. ARTER, 1991b. Reply to Sokal and Oden. *Am. Nat.* 138: p.522–523.
- SMOUSE, P.E., Y R. PEAKALL, 1999. Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity* 82: p.561–573.
- SMOUSE, P.E., R.J. DYER, R.D. WESTFALL, Y V.L. SORK, 2001. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. I. Male gamete heterogeneity among females. *Evolution* 55: p.260–271.
- SMOUSE, P.E., Y V.L. SORK, 2004. Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. *For. Ecol. Manage.* 197: p.21–38.
- SMOUSE, P.E., R. PEAKALL, Y E. GONZALES, 2008. A heterogeneity test for fine-scale genetic structure. *Mol. Ecol.* 17: p.3389–3400.
- SMOUSE, P.E., V.L. SORK, D.G. SCOFIELD, Y D. GRIVET, 2012. Using seedling and pericarp tissues to determine maternal parentage of dispersed valley oak recruits. *J. Hered.* 103: p.250–259.
- SOKAL, R.R., Y N.L. ODEN, 1991. Spatial autocorrelation analysis as an inferential tool in population genetics. *Am. Nat.* 138: p.518–521.
- SOKAL, R.R., Y F.J. ROHLF, 1995. *Biometry*, 3era ed., New York, EE.UU.: W. H. Freeman and Company.
- SOKAL, R.R., N.L. ODEN, Y B.A. THOMSON, 1997. A simulation study of microevolutionary inferences by spatial autocorrelation analysis. *Biol. J. Linn. Soc.* 60: p.73–93.
- SORK, V.L., D. CAMPBELL, R. DYER, J. FERNANDEZ, J. NASON, R. PETIT, Y E. STEINBERG, 1998. *Proceedings from a workshop on gene flow in fragmented, managed, and continuous populations*, Santa Barbara, California. Disponible en: <http://www.nceas.ucsb.edu/nceas-web/projects/2057/nceas-paper3/geneflow.pdf>.
- SORK, V., J. NASON, D. CAMPBELL, Y J. FERNANDEZ, 1999. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. *Trends Ecol. Evol.* 14: p.219–224.
- SORK, V.L., Y P.E. SMOUSE, 2006. Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. *Landscape Ecol.* 21: p.821–836.
- SORK, V.L., Y L. WAITS, 2010. Contributions of landscape genetics - approaches, insights, and future potential. *Mol. Ecol.* 19: p.3489–3495.
- DE SOUZA-STEVAUX, M.C., R.R.B. NEGRELLE, Y V. CITADINI-ZANETTE, 1994. Seed dispersal by the fish *Pterodoras granulosus* in the Paraná River Basin, Brazil. *J. Trop. Ecol.* 10: p.621–626.
- SQUIRRELL, J., P.M. HOLLINGSWORTH, M. WOODHEAD, J. RUSSELL, A. J. LOWE, M. GIBBY, Y W. POWELL, 2003. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Mol. Ecol.* 12: p.1339–1348.
- SRUR, M., F. GATTI, V. BENESOVSKY, J. HERRERA, R. MELZEW, Y M. CAMPOSANO, 2009. Los tipos de vegetación y ambientes del Parque Nacional Iguazú y su distribución en el paisaje. En B. Carpinetti, M. Garcíarena, y M. Almirón (Eds.) Parque Nacional Iguazú. Conservación y desarrollo de la Selva

- Paranaense de Argentina. pp. 99–118, Buenos Aires, Argentina: Administración de Parques Nacionales.
- STATSOFT, INC, 2001. STATISTICA (data analysis software system). Version 6. Disponible en: [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- STONER, K.E., P. RIBA-HERNÁNDEZ, K. VULINEC, Y J.E. LAMBERT, 2007. The role of mammals in creating and modifying seedshadows in tropical forests and some possible consequences of their elimination. *Biotropica* 39: p.316–327.
- STORK, N.E., 2010. Re-assessing current extinction rates. *Biodivers. Conserv.* 19: p.357–371.
- STREIFF, R., A. DUCOUSSO, C. LEXER, H. STEINKELLNER, J. GLSSL, Y A. KREMER, 1999. Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. *Mol. Ecol.* 8: p.831–841.
- TABER, A., S.C. CHALUKIAN, M. ALTRICHTER, K. MINKOWSKI, L. LIZÁRRAGA, E. SANDERSON, D. RUMIZ, E. VENTINCINQUE, Y ET AL., 2008. *El destino de los arquitectos de los bosques neotropicales: Evaluación de la distribución y el estado de conservación de los pecaríes labiados y los tapires de tierras bajas.*, New York, EE.UU.: Grupo Especialista de la CSE/UICN en Cerdos, Pecaríes e Hipopótamos; Grupo Especialista de la CSE/UICN en Tapires; Wildlife Conservation Society; y Wildlife Trust.
- TAGGART, B., F. MCNALLY, Y M. SHARP, 1990. Genetic variability and differentiation among founder populations of the pitcher plant (*Sarracenia purpurea* L.) in Ireland. *Heredity* 64: p.177–183.
- TALAMONI, S.A., Y M.A.C. ASSIS, 2009. Feeding habit of the Brazilian tapir, *Tapirus terrestris* (Perissodactyla: Tapiridae) in a vegetation transition zone in south-eastern Brazil. *Zoologia* 26: p.251–254.
- TAMURA, K., D. PETERSON, N. PETERSON, G. STECHER, M. NEI, Y S. KUMAR, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: p.2731–2739.
- TAUTZ, D., Y M. RENZ, 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 12: p.4127–4138.
- TEMPLE, S.A., 1977. Plant-animal mutualism: coevolution with dodo leads to near extinction of plant. *Science* 197: p.885–886.
- TEMPLETON, A.R., K. SHAW, E. ROUTMAN, Y S.K. DAVIS, 1990. The genetic consequences of habitat fragmentation. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 77: p.13–27.
- TERAKAWA, M., Y. ISAGI, K. MATSUI, Y T. YUMOTO, 2009. Microsatellite analysis of the maternal origin of *Myrica rubra* seeds in the feces of Japanese macaques. *Ecol. Res.* 24: p.663–670.
- TERGBORGH, J., 1986. Community aspects of frugivory in tropical forests. En A. Estrada y T. H. Fleming (Eds.) *Frugivores and Seed Dispersal*. pp. 371–384, Lancaster, Reino Unido: Dr W. Junk.
- TERBORGH, J., N. PITMAN, M. SILMAN, H. SCHICHTER, Y V.P. NUNEZ, 2002. Maintenance of tree diversity in tropical forests. En D. J. Levey, W. R. Silva, y M. Galetti (Eds.) *Seed dispersal and frugivory: ecology, evolution, and conservation*. pp. 1–17, New York, EE.UU.: CAB International.

- THOMPSON, E.A., 1975. The estimation of pairwise relationships. *Ann. Hum. Genet.* 39: p.173–188.
- THOMPSON, J.N., 1980. Treefalls and colonization patterns of temperate forest herbs. *Am. Midl. Nat.* 104: p.176–184.
- THOMPSON, J.N., 1989. Concepts on coevolution. *Trends Ecol. Evol.* 4: p.179–183.
- THOMPSON, J.N., Y M.F. WILLSON, 1978. Disturbance and the dispersal of fleshy fruits. *Science* 200: p.1161–1163.
- THUM, A.B., Y E.C. COSTA, Entomofauna visitante das inflorescencias de *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassm. (PALMAE). *Rev. Fac. Zotec. Vet. Agro. Uruguiana* 5/6: p.43–47.
- TIFFNEY, B.H., Y S.J. MAZER, 1995. Angiosperm growth habit, dispersal and diversification reconsidered. *Evol. Ecol.* 9: p.93–117.
- TIPPER, J., 1979. Rarefaction and rarefaction- the use and abuse of a method in paleoecology. *Paleobiology* 5: p.423–434.
- TOBLER, M.W., J.P. JANOVEC, Y F. CORNEJO, 2010. Frugivory and seed dispersal by the lowland tapir *Tapirus terrestris* in the peruvian Amazon. *Biotropica* 42: p.215–222.
- TÓFOLI, C.F. DE, 2006. *Frugivoria e dispersão de sementes por Tapirus terrestris (Linnaeus, 1758) na paisagem fragmentada do Pontal do Paranapanema, São Paulo*. Universidade de São Paulo.
- TOMBACK, D.F., Y Y.B. LINHART, 1990. The evolution of bird-dispersed pines. *Evol. Ecol.* 4: p.185–219.
- TORIMARU, T., N. TANI, Y. TSUMURA, N. NISHIMURA, Y N. TOMARU, 2007. Effects of kin-structured seed dispersal on the genetic structure of the clonal dioecious shrub *Ilex leucoclada*. *Evolution* 61: p.1289–1300.
- TRAVERSE, A., 1992. Effect of vertebrate frugivores on bruchid beetles that prey on *Acacia farnesiana* seeds. *Oikos* 63: p.200–206.
- TRAVERSE, A., 1998. Effects of seed passage through vertebrate frugivores' guts on germination: a review. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 1/2: p.151–190.
- VALDIVIA, C.E., Y J. A. SIMONETTI, 2007. Decreased frugivory and seed germination rate do not reduce seedling recruitment rates of *Aristotelia chilensis* in a fragmented forest. *Biodivers. Conserv.* 16: p.1593–1602.
- VALLADARES-PADUA, C., S. PADUA, Y L. CULLEN, 2002. Within and surrounding the Morro do Diabo State Park: biological value, conflicts, mitigation and sustainable development alternatives. *Environ. Sci. Policy* 5: p.69–78.
- VANDEN-BROECK, A., R. GRUWEZ, K. COX, S. ADRIAENSSENS, I.M. MICHALCZYK, Y K. VERHEYEN, 2011. Genetic structure and seed-mediated dispersal rates of an endangered shrub in a fragmented landscape: a case study for *Juniperus communis* in northwestern Europe. *BMC Genet.* 12: p.73.
- VEKEMANS, X., Y O.J. HARDY, 2004. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Mol. Ecol.* 13: p.921–935.



- WAGNER, A P., S. CREEL, Y S.T. KALINOWSKI, 2006. Estimating relatedness and relationships using microsatellite loci with null alleles. *Heredity* 97: p.336–345.
- WALKER, B.H., 1992. Biodiversity and ecological redundancy. *Conserv. Biol.* 6: p.18–23.
- VANDER WALL, S.B., 2010. How plants manipulate the scatter-hoarding behaviour of seed-dispersing animals. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365: p.989–997.
- VANDER WALL, S.B., Y R.P. BALDA, 1977. Coadaptations of the Clark's nutcracker and the piñon pine for efficient seed harvest and dispersal. *Ecol. Monogr.* 47: p.89–111.
- WANG, B.C., Y T.B. SMITH, 2002. Closing the seed dispersal loop. *Trends Ecol. Evol.* 17: p.379–386.
- WANG, B.C., V.L. SORK, M.T. LEONG, Y T.B. SMITH, 2007. Hunting of mammals reduces seed removal and dispersal of the afroropical tree *Antrocaryon klaineianum* (Anacardiaceae). *Biotropica* 39: p.340–347.
- WANG, J., 2004. Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics* 166: p.1963–1979.
- WANG, J., 2007. Parentage and sibship exclusions: higher statistical power with more family members. *Heredity* 99: p.205–217.
- WANG, J., 2012. Computationally efficient sibship and parentage assignment from multilocus marker data. *Genetics* 191: p.183–194.
- WANG, J., Y A.W. SANTURE, 2009. Parentage and sibship inference from multilocus genotype data under polygamy. *Genetics* 181: p.1579–1594.
- WANG, R., S.G. COMPTON, Y X.-Y. CHEN, 2011. Fragmentation can increase spatial genetic structure without decreasing pollen-mediated gene flow in a wind-pollinated tree. *Mol. Ecol.* 20: p.4421–4432.
- WANG, J., Y.A. EL-KASSABY, Y K. RITLAND, 2012. Estimating selfing rates from reconstructed pedigrees using multilocus genotype data. *Mol. Ecol.* 21: p.100–116.
- WASER, N.M., R.K. VICKERY JR, Y M. V. PRICE, 1982. Patterns of seed dispersal and population differentiation in *Mimulus guttatus*. *Evolution* 36: p.753–761.
- WASER, N.M., Y M. V. PRICE, 1994. Crossing-distance effects in *Delphinium nelsonii*: outbreeding and inbreeding depression in progeny fitness. *Evolution* 48: p.842–852.
- WEBB, C.O., Y D.R. PEART, 2001. High seed dispersal rates in faunally intact tropical rain forest: theoretical and conservation implications. *Ecol. Lett.* 4: p.491–499.
- WEIR, B.S., 1996. *Genetic Data Analysis II*, Sunderland, EE.UU.: Sinauer Associates, Inc.
- WELLS, G.P., Y A.G. YOUNG, 2002. Effects of seed dispersal on spatial genetic structure in populations of *Rutidosia leptorrhynoidea* with different levels of correlated paternity. *Genet. Res.* 79: p.219–226.
- WENNY, D.G., 2000. Seed dispersal, seed predation, and seedling recruitment of a Neotropical montane tree. *Ecol. Monogr.* 70: p.331–351.
- WENNY, D.G., 2001. Advantages of seed dispersal: A re-evaluation of directed dispersal. *Evol. Ecol. Res.* 3: p.51–74.

- WENNY, D.G., Y D.J. LEVEY, 1998. Directed seed dispersal by bellbirds in a tropical cloud forest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: p.6204–6207.
- WHEELWRIGHT, N.T., 1985. Fruit size, gape width, and the diets of fruit-eating birds. *Ecology* 66: p.808–818.
- WHEELWRIGHT, N.T., Y G.H. ORIANI, 1982. Seed dispersal by animals: contrasts with pollen dispersal, problems of terminology, and constraints on coevolution. *Am. Nat.* 119: p.402–413.
- WHITE, G.M., D.H. BOSCHER, Y W. POWELL, 1999. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. *Mol. Ecol.* 8: p.1899–1909.
- WHITE, G.M., D.H. BOSCHER, Y W. POWELL, 2002. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: An example from *Swietenia humilis* Zuccarini. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: p.2038–2042.
- WHITMORE, T.C., 1997. Tropical forest disturbance, disappearance, and species loss. En W. F. Laurance y R. O. Bierregaard (Eds.) *Tropical forest Remnants: ecology, management, and conservation of fragmented communities*. pp. 3–12, Chicago, EE.UU.: University of Chicago Press.
- WILLIAMS, C.F., 1994. Genetic consequences of seed dispersal in three sympatric forest herbs. II. Microspatial genetic structure within populations. *Evolution* 48: p.1959–1972.
- WILLIAMS, C.F., Y R.P. GURIES, 1994. Genetic consequences of seed dispersal in three sympatric forest herbs. I. Hierarchical population-genetic structure. *Evolution* 48: p.791–805.
- WILLSON, M.F., 1993. Dispersal mode, seed shadows, and colonization patterns. *Vegetatio* 107/108: p.261–280.
- WILLSON, M.F., W.G. HOPPES, D.A. GOLDMAN, P.A. THOMAS, Y J.L. BOTHWELL, 1987. Sibling competition in plants: An experimental study. *Am. Nat.* 129: p.304–311.
- WILLSON, M.F., A.K. IRVINE, Y N.G. WALSH, 1989. Vertebrate dispersal syndromes in some Australian and New Zealand plant communities, with geographic comparisons. *Biotropica* 21: p.133–147.
- WILLSON, M.F., Y A. TRAVESET, 2000. The ecology of seed dispersal. En M. Fenner (Ed.) *Seeds: The ecology of regeneration in plant communities*. pp. 85–110, Wallingford, Reino Unido: CAB International.
- WITMER, M.C., Y A.S. CHEKE, 1991. The dodo and the tambalacoque tree: an obligate mutualism reconsidered. *Oikos* 61: p.133–137.
- WOTTON, D.M., Y D. KELLY, 2012. Do larger frugivores move seeds further? Body size, seed dispersal distance, and a case study of a large, sedentary pigeon. *J. Biogeogr.* 39: p.1973–1983.
- WRIGHT, S., 1946. Isolation by distance under diverse systems of mating. *Genetics* 31: p.39–59.
- WRIGHT S. J., 2003. The myriad consequences of hunting for vertebrates and plants in tropical forests. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 6: p.73–86.
- WRIGHT, S.J., Y H.C. DUBER, 2001. Poachers and forest fragmentation alter seed dispersal, seed survival, and seedling recruitment in the palm *Attalea butyracea*, with implications for tropical tree diversity. *Biotropica* 33: p.583–595.

- WRIGHT, S.J., A. HERNANDÉZ, Y R. CONDIT, 2007. The bushmeat harvest alters seedling banks by favoring lianas, large seeds, and seeds dispersed by bats, birds, and wind. *Biotropica* 39: p.363–371.
- YOUNG, A.G., H.G. MERRIAM, Y S.I. WARWICK, 1993. The effects of forest fragmentation on genetic variation in *Acer saccharum* Marsh. (sugar maple) populations. *Heredity* 71: p.277–289.
- YOUNG, A.G., Y H.G. MERRIAM, 1994. Effects of forest fragmentation on the spatial genetic structure of *Acer saccharum* Marsh. (sugar maple) populations. *Heredity* 72: p.201–208.
- YOUNG, A.G., T. BOYLE, Y T. BROWN, 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol. Evol.* 11: p.413–418.
- YOUNG, A.G., A.H.D. BROWN, Y F.A. ZICH, 1999. Genetic structure of fragmented populations of the endangered daisy *Rutidosia leptorrhynchoides*. *Conserv. Biol.* 13: p.256–265.
- YOUNGSTEADT, E., J.A. BACA, J. OSBORNE, Y C. SCHAL, 2009. Species-specific seed dispersal in an obligate ant-plant mutualism. *PLoS One* 4: p.e4335.
- YU, H., J.D. NASON, X. GE, Y J. ZENG, 2010. Slatkin's Paradox: when direct observation and realized gene flow disagree. A case study in *Ficus*. *Mol. Ecol.* 19: p.4441–4453.
- ZANE, L., L. BARGELLONI, Y T. PATARNELLO, 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol. Ecol.* 11: p.1–16.
- ZELLMER, A.J., Y L.L. KNOWLES, 2009. Disentangling the effects of historic vs. contemporary landscape structure on population genetic divergence. *Mol. Ecol.* 18: p.3593–3602.
- ZENG, L.-Y., L.-L. XU, S.-Q. TANG, T. TERSING, Y.-P. GENG, Y Y. ZHONG, 2010. Effect of sampling strategy on estimation of fine-scale spatial genetic structure in *Androsace tapete* (Primulaceae), an alpine plant endemic to Qinghai-Tibetan Plateau. *J. Syst. Evol.* 48: p.257–264.
- ZIEGENHAGEN, B., S. LIEPELT, V. KUHLENKAMP, Y M. FLADUNG, 2003. Molecular identification of individual oak and fir trees from maternal tissues of their fruits or seeds. *Trees* 17: p.345–350.
- ZORZI, B.T., 2009. *Frugivoría por Tapirus terrestris em tres regiões do Pantanal, Brasil*. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

**Apéndice 1.** Características de variabilidad genética de los nueve *SSRs* utilizados para los análisis genéticos descriptos en los capítulos III y IV. Los valores presentados corresponden a la muestra global de 811 individuos de *S. romanzoffiana* colectados en el norte de la provincia de Misiones, Argentina.

Locus	A	$H_e$	$H_o$	Frecuencia del alelo nulo	$P_{ID}$	$P_{EX}$
CNZ04	16	0,68	0,62	0,047	0,16	0,27
CNZ26	13	0,41	0,40	0,003	0,36	0,10
CNZ44	6	0,21	0,21	0,014	0,63	0,02
CNZ50	5	0,56	0,52	0,046	0,24	0,17
CAC2	12	0,39	0,38	0,027	0,39	0,08
mBgCIR053	18	0,68	0,68	-0,004	0,14	0,29
mBgCIR091	9	0,70	0,70	-0,006	0,14	0,29
Bg02-10	15	0,73	0,73	0,000	0,11	0,34
EE54	2	0,50	0,48	0,018	0,38	0,13

A: riqueza alélica,  $H_e$ : heterocigosidad esperada,  $H_o$ : heterocigosidad observada,  $P_{ID}$ : probabilidad de identidad genotípica,  $P_{EX}$ : probabilidad de exclusión del primer parental.



**Apéndice 2.** Frecuencias alélicas globales de los nueve SSRs utilizados para el conjunto de los 811 individuos de *S. romanzoffiana* genotificados (población de referencia) en las áreas de estudio en el norte de la provincia de Misiones. Para cada marcador, cuyo nombre está indicado en negrita, se muestra el número total de alelos (A), la identificación de cada alelo según tamaño en pares de bases (columna izquierda) y su frecuencia (columna derecha)

<b>CNZ04</b>	A = 16	<b>CNZ26</b>	A = 13	<b>CNZ44</b>	A = 6	<b>CNZ50</b>	A = 5	<b>CAC2</b>	A = 12	<b>mBgCIR-053</b>	A = 18	<b>mBgCIR-091</b>	A = 9	<b>Bg02-10</b>	A = 15	<b>EE54</b>	A = 2
128	0,0304	206	0,0012	139	0,0006	112	0,0012	223	0,0105	148	0,0167	192	0,0099	134	0,0093	113	0,4852
130	0,0167	212	0,0037	145	0,0956	114	0,2011	227	0,0006	150	0,0012	194	0,0062	144	0,0444	115	0,5148
134	0,3680	216	0,7639	149	0,8810	116	0,6157	229	0,7717	154	0,0087	200	0,0130	146	0,0062		
136	0,0347	218	0,0539	151	0,0173	118	0,1207	231	0,0124	156	0,0006	202	0,0756	150	0,2914		
138	0,0019	220	0,0322	153	0,0006	120	0,0613	233	0,0019	158	0,0006	204	0,1258	152	0,0006		
140	0,0019	222	0,0310	155	0,0049			235	0,0900	160	0,0043	206	0,4331	156	0,0012		
142	0,4207	226	0,0081					237	0,0155	162	0,0025	208	0,3017	158	0,0185		
144	0,0006	230	0,0043					239	0,0012	164	0,0074	210	0,0081	160	0,0049		
150	0,0012	232	0,0372					241	0,0006	166	0,0835	212	0,0266	162	0,0025		
152	0,0291	234	0,0062					243	0,0316	168	0,0705			166	0,1179		
153	0,0006	236	0,0428					245	0,0633	170	0,2184			168	0,4000		
154	0,0006	238	0,0050					247	0,0006	172	0,5074			170	0,0809		
156	0,0050	240	0,0105							174	0,0575			172	0,0019		
158	0,0719									176	0,0124			174	0,0160		
160	0,0112									178	0,0006			176	0,0043		
162	0,0056									182	0,0012						
										184	0,0056						
										188	0,0006						