

Tesis Doctoral

Estructura genética espacial en paisajes fragmentados: Un estudio en poblaciones naturales de curupay (Leguminosae: *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*)

Alejandra Lorena Goncalves

**Doctorado en Ciencias Naturales
Facultad de Ciencias Naturales y Museo
Universidad Nacional de La Plata**

Tesis Doctoral

Estructura genética espacial en paisajes fragmentados:

Un estudio en poblaciones naturales de curupay

(Leguminosae: *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*)

Lic. Alejandra Lorena Goncalves

Directora: Dra. María Victoria García

Co-Director: Dr. Rolando Rivera Pomar

Lugar de Realización:

Laboratorio de Genética de Poblaciones y del Paisaje.

Instituto de Biología Subtropical – Nodo Posadas (UNaM – CONICET)

**Doctorado en Ciencias Naturales
Facultad de Ciencias Naturales y Museo
Universidad Nacional de La Plata**

Marzo de 2019 – La Plata


Tesis Doctoral

Estructura genética espacial en paisajes fragmentados:

Un estudio en poblaciones naturales de curupay

(Leguminosae: *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*)

Lic. Alejandra Lorena Goncalves

 *a Marina y Raúl*

Agradecimientos:

Gracias a las Instituciones:

- A la Universidad Pública Argentina, en especial a la Universidad Nacional de Misiones y a la Universidad Nacional de la Plata, en las cuales he transitado mi formación de grado y de postgrado.
- A la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, mi segundo hogar. Exactas me abrió las puertas para encontrar mi vocación, y luego nuevamente para continuar en el camino de la docencia-investigación, acompañando a nuevos buscadores de vocación.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) porque me ha permitido la realización de todas las instancias de formación del Doctorado. Un especial reconocimiento a esta institución por su visión y el fortalecimiento de la formación de recursos humanos/personas para el desarrollo de la ciencia en nuestro país.
- Al Instituto de Biología Subtropical (IBS, UNaM - CONICET) por promover la generación de conocimiento científico en la región y respaldar mi trabajo y formación.
- A la Entidad Binacional Yacyretá (EBY) por permitirme el acceso a la Reserva Campo San Juan para la totalidad de las tareas de campo.
- Al *Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) – Biodiversité, Gènes et Communautés (BioGeCo)* de Cestas, Francia por darme la *bienvenue* para la realización de una parte de los análisis de datos de la presente tesis, así como por brindarme la posibilidad de crecer y aprender de otra cultura y forma de trabajo.

Gracias a las Personas de las Instituciones:

- A mi directora Dra. María Victoria García y a mi co-director Dr. Rolando Rivera Pomar, por haberme dado la oportunidad de emprender este camino de formación doctoral junto a ellos.
- Al Dr. Santiago César González-Martínez y a la Dra. Myriam Heuertz, por el tiempo dedicado a la elaboración de piezas esenciales en la construcción de este trabajo y la comunicación del mismo.
- Al comité evaluador conformado por las Dras. Cecilia Bessega, Paula Marchelli y Mónica Aulicino, porque sus aportes han enriquecido el trabajo.

- A Victoria, por esa combinación de insistencia y confianza, por construir la base de este trabajo y acompañarme en el camino de exploración. Gracias por compartir la pasión por esta elección que día a día nos presenta nuevos desafíos y nos propone nuevas metas.
- A Eugenia, por dejarme aprender de sus motivaciones y búsquedas. Por ser compañera guía y co-equiper en la cotidianeidad de este trabajo.
- Al equipo del Laboratorio de Genética de Poblaciones y del Paisaje, a quienes estuvieron y están: Victoria, Eugenia, Elena, Verónica, Daiana, Tamara, Marcelo, Carmen, Celia, Florencia, Andrea, Carla, Micaela y Camila con quienes he compartido y comparto los aprendizajes y esfuerzos de este camino, tanto “pescando” muestras a campo, como intentando que todo marche bien en el laboratorio, en el análisis e interpretación y en la comunicación.
- A todo el equipo del Laboratorio 22, Lourdes, Silvia, Liliana, Patricia, Claudia, Ayrin, Karina, Martín, Adriana, Marcelo y Carlos, con quienes aprendo y redescubro el ser docente, en conjunto con los numerosos alumnos que nos plantean nuevos desafíos clase a clase. Gracias por la calidez y la apertura que nos fortalece.

...Y Gracias:

- A la Naturaleza, de la cual parte somos.
- A Gabriela, Adriana y Daniela, por estar ahí desde hace tantos años.
- A Sabina, Mariana, Iván, Raúl, Liliana y Simón, por esa unidad y confianza que nos regocijan.
- A los peques: Sofía, Agustina, Luciana, Emilio y Martín porque llegan y transforman.
- A Myriam, Santiago, Helena y Flor, por permitirme ser una más de la familia, aprendiendo de un hogar multicultural.
- A Adriana e Inés, compañeras de diagonales aventuras.
- A toda mi parentela, por apoyarme en esta vocación.
- A Pablo, por ese cotidiano abrazo.
- A Mamá y a Papá, por alentarme siempre a ir en búsqueda de aquello que sueño.
- A mis hermanos, Fer y Mari, porque juntos conformamos un equipo que impulsa los pasos del caminar.
- Y a todas las personas que colaboraron directa o indirectamente en la construcción de este trabajo.

*¿Qué revelan los patrones espaciales acerca de
los procesos genético-poblacionales?*

Bryan K. Epperson
Geographical Genetics, 2003

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	XI
RESUMEN	1
SUMMARY	3
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Paisajes fragmentados.....	6
1.1.1. <i>La heterogeneidad de los paisajes fragmentados</i>	7
1.1.2. <i>Consecuencias genéticas en las poblaciones de paisajes fragmentados</i>	9
1.2. Distribución espacial de la variación genética	12
1.2.1. <i>Estructura genética espacial</i>	13
1.2.2. <i>Estructura genética espacial a escala fina</i>	17
1.3. Paisajes fragmentados en Sudamérica: El caso de los Bosques Secos Estacionales Neotropicales	21
1.4. <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> : Especie paradigmática de los Bosques Secos Estacionales Neotropicales	24
1.4.1. <i>Ubicación taxonómica de la especie</i>	24
1.4.2. <i>Características morfológicas de la especie</i>	25
1.4.3. <i>Fenología de la especie</i>	27
1.4.4. <i>Distribución y hábitat de la especie</i>	28
1.4.5. <i>Antecedentes de estudios poblacionales en la especie</i>	29
2. HIPÓTESIS.....	35
3. OBJETIVOS.....	36
3.1. Objetivo general	36
3.2. Objetivos específicos	36
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
4.1. Área de estudio: Reserva Campo San Juan.....	38
4.2. Sistema de estudio y metodología de muestreo.....	40
4.3. Genotipificación de los individuos	44
4.3.1. <i>Extracción de ADN</i>	45
4.3.2. <i>Obtención de amplicones y genotipificación</i>	46
4.4. Caracterización de la diversidad genética de adultos y renovales	51
4.5. Análisis de la estructura genética poblacional y determinación de sus posibles cambios entre estadios	54

4.6.	Caracterización de la estructura genética espacial a escala fina	59
4.7.	Determinación del tamaño de vecindario y de la estructura familiar.....	62
4.8.	Identificación de posibles eventos demográficos recientes	65
5.	RESULTADOS	71
5.1.	Genotipificación de los individuos	71
5.2.	Caracterización de la diversidad genética de adultos y renovales	71
5.3.	Análisis de la estructura genética poblacional y determinación de sus posibles cambios entre estadios	75
5.4.	Caracterización de la estructura genética espacial a escala fina.....	80
5.5.	Determinación del tamaño de vecindario y de la estructura familiar.....	84
5.6.	Identificación de posibles eventos demográficos recientes	89
6.	DISCUSIÓN	93
6.1.	Diversidad genética de las diferentes cohortes	93
6.2.	Estructura genética poblacional	95
6.3.	Estructura genética espacial a escala fina	101
6.4.	Tamaño del vecindario y estructura familiar	105
6.5.	Eventos demográficos recientes.....	111
6.6.	Consideraciones finales	113
7.	CONCLUSIONES	116
8.	BIBLIOGRAFÍA	119
ANEXOS		133
ANEXO I	Frecuencias alélicas globales de los <i>loci</i> SSR analizados.....	133
ANEXO II	Análisis de eventos demográfico-históricos mediante análisis de aproximación Bayesiana (ABC).....	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Poblaciones en paisajes fragmentados adaptado desde Zucchi *et al.* (2017). a) Bosque continuo; b) Disminución de los niveles de flujo génico; c) Incremento de la acción local de la deriva genética en fragmentos poblacionales pequeños y extinción local de poblaciones aisladas. 11

Figura 2. Estructura genética espacial (EGE). a) Eventos demográficos y procesos microevolutivos que moldean la EGE y b) EGE de poblaciones en paisajes fragmentados en función del tiempo (t) y el flujo génico entre fragmentos (proporcional al tamaño de las flechas bidireccionales). 14

Figura 3. Estructura genética espacial a escala fina (EGEF) en distintos estadios del ciclo de vida en el complejo espacio-tiempo. Se indica: tiempo (t) y distancia (d). 20

Figura 4. Bosques Secos Estacionales Neotropicales (BSEN) actuales en América del Sur según Särkinen *et al.* (2011). 22

Figura 5. Características morfológicas de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*. Se indica: a) tronco, b) rama con frutos, c) inflorescencia y flor, d) semilla y embrión, e) nectarios extraflorales (NEF) y nectarios sustitutivos (NS), f) insectos polinizadores. 26

Figura 6. Distribución de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan en los Bosques Secos Estacionales Neotropicales (BSEN). Se indican los núcleos: Caatinga (CA), Misiones (MI), Chiquitanía (CH) y Pedemontano Subandino (PS). 30

Figura 7. Reserva Campo San Juan. a) Ubicación de la reserva en la provincia de Misiones, b) delimitación de la reserva, c) fragmento de bosque estudiado y d) paisaje del área de estudio. 39

Figura 8. Vista de ejemplares a) adultos y b) renovales de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* en la Reserva Campo San Juan. 41

Figura 9. Individuos adultos y renovales a lo largo de las cuatro transectas definidas en el fragmento estudiado en la reserva Campo San Juan. 42

Figura 10. Método de genotipificación mediante el sistema de tres cebadores. a) cebadores empleados; b) delimitación del amplicón; c) amplicón obtenido con la incorporación de la secuencia complementaria al cebador M13; d) adición del cebador M13 marcado a la mezcla de reacción; e) obtención del amplicón etiquetado con el fluoróforo. 48

Figura 11. Frecuencias alélicas de los ocho *loci* SSR nucleares analizados en adultos y renovales de *A. colubrina* var. *cebil*. 73

Figura 12. Probabilidad posterior de asignación de individuos a K clusters en a) adultos y b) renovales y aplicación del método *ad hoc* propuesto por Evanno *et al.* (2005) para la identificación del número real de clusters en c) adultos y d) renovales de *A. colubrina* var. *cebil*. 77

Figura 13. Asignación de los individuos a los diferentes clusters mediante análisis bayesiano en los dos estadios: a) adultos ($K=3$) y b) renovales ($K=5$). 78

Figura 14. Correlogramas de estructura genética espacial a escala fina (EGEF) a) en adultos y b) en renovales del fragmento poblacional estudiado. 83

Figura 15. Distancias lineales entre a) progenitor-progenie, b) adultos hermanos completos/medio-hermanos y c) renovales hermanos completos/medio-hermanos. 88

Figura 16. Distribución *a priori* del conjunto de datos observados en relación al conjunto de datos simulados para cada escenario mediante análisis de componentes principales. 90

Figura 17. Comparación de los modelos demográficos mediante ABC. Escenario 1: tamaño poblacional constante, Escenario 2a: cambio reciente en el tamaño poblacional, y Escenario 2b: cambio histórico en el tamaño poblacional. 91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Geoposición de los individuos adultos y renovales a lo largo de las transectas en la reserva Campo San Juan.	43
Tabla 2. Descripción de los marcadores SSR específicos para <i>A. colubrina</i> var. <i>cebil</i> analizados.	47
Tabla 3. Condiciones de amplificación de los ocho <i>loci</i> SSR específicos de <i>A. colubrina</i> var. <i>cebil</i>	50
Tabla 4. Distribuciones <i>a priori</i> de los parámetros históricos y demográficos definidos para el análisis de aproximaciones bayesianas	68
Tabla 5. Validación del método de genotipificación mediante el sistema de tres cebadores.....	72
Tabla 6. Índices de diversidad genética en adultos y renovales en el fragmento poblacional de <i>A. colubrina</i> var. <i>cebil</i> estudiado.....	74
Tabla 7. Porcentajes de variación, índices de fijación y diferenciación alélica entre <i>clusters</i> de <i>A. colubrina</i> var. <i>cebil</i>	79
Tabla 8. Diversidad genética y rangos de distancia espacial entre pares de individuos de <i>A. colubrina</i> var. <i>cebil</i> a nivel de <i>clusters</i>	81
Tabla 9. Estructura genética espacial a escala fina (EGEF) en adultos y renovales de <i>A. colubrina</i> var. <i>cebil</i>	82
Tabla 10. Distancias de dispersión y tamaños de vecindario. Parámetros de distancia de dispersión estimados en función de diferentes densidades efectivas de individuos adultos.....	85
Tabla 11. Estructura familiar a partir de relaciones entre pares de individuos a) progenitor-progenie, b) adultos hermanos completos/medio-hermanos y c) renovales hermanos completos/medio-hermanos de <i>A. colubrina</i> var. <i>cebil</i> en el fragmento poblacional estudiado.....	87

RESUMEN

En poblaciones naturales los patrones espaciales de distribución de la diversidad genética son el resultado de la acción de diversos procesos que operan en el complejo espacio-tiempo. Bajo aislamiento por distancia, la variación genética entre individuos presenta una correlación negativa con la distancia espacial que los separa. Por ello, la estructura genética espacial a escala fina (EGEF) queda definida por la distribución no aleatoria de genotipos en el espacio, la cual en general se encuentra asociada a la formación de estructuras familiares producto de dispersión alélica restringida.

Los paisajes fragmentados del Sur de Misiones, proveen un marco apropiado para desarrollar estudios de la estructura genética espacial de las poblaciones arbóreas que lo habitan, lo cual en conjunto con las características de distribución de la especie forestal nativa *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Leguminosae), permitió la búsqueda de respuesta a las siguientes preguntas: ¿Se refleja la fragmentación del paisaje del Sur de Misiones en la estructuración genética de un fragmento poblacional de esta especie? ¿Existen diferencias en la estructuración genética poblacional entre estadios? ¿Es posible detectar evidencias genéticas de cambios demográficos recientes en un fragmento poblacional de *A. colubrina* var. *cebil*? Mientras que la hipótesis de trabajo establece que el fragmento poblacional estudiado presenta estructura genética espacial. Siendo el objetivo general, evaluar la estructura genética espacial en un fragmento poblacional de *A. colubrina* var. *cebil* en paisajes fragmentados del Sur de Misiones.

Se analizó un fragmento de bosque de ~20ha en la reserva Campo San Juan. Se trazaron cuatro transectas paralelas, a lo largo de las cuales se colectaron hojas jóvenes de 60 adultos y 59 renovales. Se genotipificó la totalidad de individuos mediante ocho *loci* microsatélites nucleares específicos aplicando un sistema de tres cebadores. Se caracterizó la diversidad genética y se determinaron las diferencias entre la estructura genética poblacional de adultos y renovales. Para caracterizar los patrones de intercambio alélico en la población, se determinó la EGEF, el tamaño de vecindario, las escalas espaciales de la dispersión alélica y la estructura familiar. Por su parte, para responder si existen evidencias genéticas de cambios demográficos recientes, se identificó la ocurrencia de posibles variaciones en el tamaño poblacional que pudieran haber influido sobre la estructura genética espacial en el fragmento poblacional estudiado.

Se detectó una elevada diversidad genética, riqueza alélica y elevada proporción de alelos a baja frecuencia mantenidos por los niveles de flujo génico mediado por polen

dentro del fragmento poblacional estudiado. A pesar de la elevada diversidad genética, se detectaron elevados niveles de endogamia en ambos estadios ($F_{IS} = 0,40$ y $0,34$), los cuales serían consecuencia de un sistema de apareamiento mixto en *A. colubrina* var. *cebil*, que incluiría fecundación cruzada entre individuos emparentados y una proporción significativa de autofecundación en el fragmento poblacional estudiado. La distribución espacial de la variación genética queda explicada por la presencia de *clusters* genéticos diferenciados en ambas cohortes, como consecuencia de apareamiento por proximidad, en tanto que la estructura genética y la diferenciación alélica más elevadas en renovales ($F_{ST} = 0,14$; D de Jost = $0,70$) que en adultos ($F_{ST} = 0,06$; D de Jost = $0,31$), estarían determinadas por dispersión alélica restringida mediada por semillas, la cual genera una distribución espacial agrupada de los renovales y una fuerte estructura familiar en el fragmento poblacional.

La EGEF detectada ($S_p \approx 0,01$) fue consecuencia de niveles restringidos de flujo génico efectivo, un sistema de fecundación mixto con alta frecuencia de autopolinización, una limitada movilidad de los propágulos, una baja densidad de árboles donantes de semilla y el establecimiento de plántulas que comparten progenitores, agrupadas en el espacio en el fragmento estudiado. Se delimitó un tamaño de vecindario explicado por una baja densidad de adultos ($Nb = 108-138$) con una dispersión alélica restringida ($\sigma_g = 5-17m$) y un bajo solapamiento de las áreas de dispersión. Esto definió una estructura familiar en la cual los renovales implicados en relaciones de hermanos completos o medio-hermanos se distribuyeron de forma agrupada en el espacio. En relación a la detección de eventos demográficos, la población estudiada no evidenció cuellos de botella recientes, sino más bien indicios de una expansión poblacional que se remontaría al Pleistoceno tardío, hace aproximadamente 18.000 años atrás.

SUMMARY

In natural populations, the spatial patterns of distribution of genetic diversity results from the action of space-time processes. Under isolation by distance, the genetic variation is negatively correlated by spatial distance between individuals. Therefore, the fine-scale spatial genetic structure (FSGS) is defined by the non-random spatial distribution of genotypes, which is generally associated with local pedigree structures as a result of limited gene dispersal.

The fragmented landscapes of the southern Misiones, provide a framework that allows to develop studies of the spatial genetic structure of the forest tree populations. This landscape together with the distribution of the native forest tree species *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Leguminosae), enabled the search for answer to the following questions: Is landscape fragmentation from southern Misiones reflected in the genetic structure of a population fragment? Are there differences in genetic structure between stages? Is it possible to detect genetic evidence of recent demographic changes in a population fragment of *A. colubrina* var. *cebil*? The hypothesis establishes that the studied population fragment shows spatial genetic structure. Therefore, the main aim of this work was to evaluate the spatial genetic structure in a population fragment of *A. colubrina* var. *cebil* in fragmented landscapes of southern Misiones.

A forest patch of ~20ha from Campo San Juan reserve was analyzed. Four parallel transects were established and young leaves were collected from 60 adults and 59 saplings. All individuals were genotyped using eight specific nuclear microsatellite loci by mean a three-primer system. The genetic diversity of population fragment was characterized. Also, differences between population genetic structure of adults and saplings were determined. The FSGS, the neighborhood size, the spatial scales of gene dispersal, and the family structure were determined to characterize the patterns of gene exchange in the population. Also, to find out about genetic evidence of recent demographic changes, the possible variation in population size – that could has influenced on spatial genetic structure – was identified in the studied population fragment.

High genetic diversity, allelic richness and high proportion of low frequency alleles were detected, that are maintained by levels of gene flow by pollen within the population fragment. Despite the high genetic diversity, high levels of inbreeding were detected in both life stages ($F_{IS} = 0.40$ and 0.34), which would be the result of a mixed mating system in *A. colubrina* var. *cebil*. This mating system included cross-fertilization

between related individuals and a significant proportion of self-fertilization. The spatial distribution of genetic variation is explained by the presence of differentiated genetic clusters in both cohorts, as a consequence of assortative mating in the studied population fragment. Genetic structure and allelic differentiation were higher in saplings ($F_{ST} = 0.14$; Jost's $D = 0.70$) rather than in adults ($F_{ST} = 0.06$; Jost's $D = 0.31$) probably due to restricted gene dispersal by seeds, which generated a clumped spatial distribution of saplings and a stronger pedigree structure in the population fragment.

The FSGS detected ($S_p \approx 0.01$) was consequence of restricted effective gene flow, mixed mating system with high frequency of self-pollination, limited mobility of propagules, low density of seed trees, and the establishment of clumped related saplings in the studied fragment. A neighborhood size was defined, explained by a low density of adults ($N_b = 108-138$) with a restricted gene dispersal ($\sigma_g = 5-17m$) and low overlap of dispersal areas. Thus, family structures were defined by full-sib or half-sib saplings spatially clumped. The studied population did not show any evidence of recent genetic bottleneck while demographic analyses suggested an ancient population expansion in the late Pleistocene ($\sim 18,000$ years BP).

Introducción



1. INTRODUCCIÓN

Los bosques son ampliamente reconocidos como un reservorio de biodiversidad de gran importancia en nuestro planeta. Uno de los cimientos de tal biodiversidad es la diversidad genética, la cual constituye la materia prima del cambio evolutivo. En el estudio de las masas boscosas se considera a las poblaciones como las unidades fundamentales para analizar los cambios en los patrones de diversidad genética de las especies arbóreas (Finkeldey y Hattemer, 2007).

Los bosques constituyen ecosistemas que varían a diferentes escalas espaciales, por lo cual resulta poco frecuente que los individuos que conforman las poblaciones se encuentren distribuidos de forma homogénea en el espacio. La heterogeneidad ambiental puede conducir a la subdivisión de las poblaciones de una especie debido a que áreas poco favorables pueden intercalarse con áreas que presenten condiciones propicias para la presencia de la especie (Hartl y Clark, 2007). La subdivisión poblacional puede dar origen a estructuración o diferenciación genética entre las subpoblaciones, es decir, que las frecuencias alélicas entre ellas difieran estadísticamente. Cuán relacionadas se encuentran la estructura genética y la fragmentación del paisaje constituye una pregunta que aborda el grado de influencia de los factores que varían en el paisaje espacialmente heterogéneo sobre la distribución de la variabilidad genética en las poblaciones.

1.1. Paisajes fragmentados

El paisaje puede ser definido como un área espacialmente heterogénea que forma parte de un sistema intrincado de patrones y procesos ecológicos que operan a diferentes escalas (Turner, 2005), de manera tal que la estructura y la composición del paisaje influyen sobre los procesos que operan a nivel poblacional en las especies que lo habitan (Balkenhol *et al.*, 2016). Los paisajes fragmentados pueden definirse como áreas caracterizadas por un fuerte contraste entre los parches de bosque y su matriz circundante (McIntyre y Hobbs, 1999), cubriendo estos fragmentos entre el 10 y el 60% del área considerada (Fischer y Lindenmayer, 2007). La Genética del Paisaje constituye un marco de referencia para el estudio de la variación genética a nivel poblacional en un contexto espacial explícito (Schoville *et al.*, 2012; Balkenhol *et al.*, 2016), el cual debe ser considerado en el estudio de las poblaciones, dado que los procesos operan en un espacio-tiempo determinado definiendo los patrones de la variación genética (Epperson, 2003).

Los bosques nativos son ecosistemas naturales compuestos predominantemente por especies arbóreas maduras y por diversas especies asociadas que conforman una trama interdependiente con características propias y múltiples funciones. Tales especies, en conjunto con el medio que las rodea, constituyen un sistema en equilibrio dinámico. La ruptura de este equilibrio como resultado de eventos de fragmentación de los bosques, puede generar un impacto pronunciado sobre la sostenibilidad y la conservación en estos ecosistemas (Aguilar *et al.*, 2006), especialmente en las regiones neotropicales en las cuales se ha experimentado un rápido crecimiento demográfico de las poblaciones humanas durante las últimas décadas (Abdullah y Nakagoshi, 2007).

En especies vegetales, la fragmentación del bosque puede incrementar los efectos de la dispersión restringida de polen y semillas, alterando los niveles de diversidad genética de las poblaciones (Murawski *et al.*, 1994; Ghazoul, 2005). Así, el grado de conectividad entre poblaciones locales de especies vegetales se ve amenazada por la fragmentación del hábitat causada por fluctuaciones climáticas y/o por cambios de origen antrópico del paisaje lo cual, en conjunto, puede conducir a una pérdida de diversidad genética en poblaciones aisladas a una tasa mayor que en poblaciones continuas (Sork y Smouse, 2006). Además, la interacción de factores tales como la pérdida y la degradación del hábitat, el aislamiento de los fragmentos poblacionales, los cambios en la biología de la especie y en las interacciones intra- e interespecíficas, pueden llevar a una reducción del tamaño poblacional (Fischer y Lindenmayer, 2007).

La dificultad de detectar los efectos de la fragmentación reciente en las poblaciones de árboles puede deberse a que esta fragmentación ha ocurrido en un lapso corto de tiempo (entre 100 y 200 años) en relación al tiempo generacional de las especies arbóreas (Escudero *et al.*, 2003). Si bien la longevidad de los individuos, la elevada diversidad dentro de las poblaciones naturales y las elevadas tasas potenciales de flujo génico les confieren a las especies de árboles la capacidad de afrontar las consecuencias negativas de la fragmentación, es crítico el conocimiento y la cuantificación de la diversidad genética existente, como así también su distribución espacial para un diagnóstico acabado del estado y de las posibilidades de viabilidad de las poblaciones remanentes de los bosques nativos (Escudero *et al.*, 2003).

1.1.1. La heterogeneidad de los paisajes fragmentados

La fragmentación del paisaje, es decir, la división del hábitat en fracciones de menor superficie, puede ser el resultado de la acción conjunta de diversos factores naturales, como las fluctuaciones climáticas y las variaciones en la disponibilidad de recursos, así

como también puede originarse por el impacto antrópico reciente, dado por cambios en el uso del suelo, el avance de la frontera agrícola, la urbanización y la deforestación (Haddad *et al.*, 2015).

Estudios acerca de los posibles efectos sinérgicos entre las variables naturales que podrían originar la fragmentación del paisaje, han detectado que, en áreas donde la conectividad entre los fragmentos se encuentra por debajo de un nivel crítico, la expansión de los rangos de distribución de las poblaciones se ve fuertemente restringida (Opdam y Wascher, 2004).

Por otro lado, la expansión de las poblaciones humanas podría continuar reduciendo áreas naturales con la consecuente fragmentación de los paisajes (Haddad *et al.*, 2015). La pérdida de área, el aumento del aislamiento y una mayor exposición a diferentes usos del suelo a lo largo de los bordes de los fragmentos, son algunos de los principales factores que pueden iniciar cambios en la estructura y función del ecosistema de los fragmentos remanentes (Lindenmayer *et al.*, 2006).

A nivel poblacional, la pérdida de hábitat y la fragmentación pueden crear discontinuidades en la distribución de los recursos y en las condiciones del entorno local. La fragmentación del hábitat abarca dos grandes procesos: por un lado, la reducción en el área total del hábitat disponible y por otro, la generación de fragmentos con cierto grado de aislamiento entre sí. En otras palabras, la fragmentación del hábitat conduce a una reducción en el tamaño poblacional y a una reducción en los niveles de flujo génico entre los fragmentos generados (Frankham *et al.*, 2002). Esta fragmentación, además de disminuir la tasa de intercambio o flujo génico entre las subpoblaciones podría dar lugar a una disminución en la eficacia biológica de los individuos en detrimento del tamaño poblacional debido a la acción local de la selección natural. Por lo tanto, el intercambio alélico entre los fragmentos remanentes es clave para el mantenimiento a largo plazo de las poblaciones de las especies que habitan paisajes fragmentados (Hanski, 1998), siendo de relevancia la distancia espacial entre los fragmentos poblacionales que presenten grados de aislamiento parcial o total.

Además, la fragmentación puede modificar las funciones del ecosistema al disminuir la biomasa y alterar los ciclos de nutrientes (Haddad *et al.*, 2015). Los efectos de la fragmentación pueden ir magnificándose con el paso del tiempo (Young *et al.*, 2000; Haddad *et al.*, 2015). Esto se debe a que poblaciones que ocupan hábitats continuos presentan un área probable de distribución mayor que aquellas que ocupan hábitats fragmentados ya que, potencialmente, pueden albergar mayor diversidad genética. Los fragmentos poblacionales pequeños se encuentran a su vez expuestos, en mayor medida,

a los efectos de borde. Un análisis reciente de la cubierta forestal a nivel mundial (Haddad *et al.*, 2015) reveló que la mayor parte de los bosques presentan gran parte de su área cercana a los bordes de los fragmentos, es decir que las poblaciones de especies arbóreas que habitan estos bosques estarían expuestas a los efectos negativos de la fragmentación.

Hamrick (2004) clasifica a los efectos de la fragmentación sobre las poblaciones naturales de las especies arbóreas en efectos a corto plazo y efectos a largo plazo. Los primeros, ocurren durante la fragmentación en sí misma o en las primeras dos generaciones posteriores al evento, mientras que los efectos a largo plazo se manifiestan luego de varias generaciones posteriores al evento de fragmentación.

Las consecuencias de la fragmentación sobre la diversidad genética dependen, en gran medida, de los niveles de flujo génico que puedan mantenerse entre los fragmentos, los cuales, según lo propuesto por Frankham *et al.* (2002), pueden variar en función de una serie de factores tales como: el número de subpoblaciones, la distribución de los tamaños poblacionales, la distribución geográfica y los patrones espaciales, la distancia entre fragmentos, la capacidad dispersiva de la especie, las tasas de migración, la matriz ambiental entre los fragmentos y su influencia sobre los procesos de dispersión, así como el tiempo transcurrido desde el evento de fragmentación.

1.1.2. Consecuencias genéticas en las poblaciones de paisajes fragmentados

La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) reconoce a la diversidad genética como una de las tres formas de biodiversidad que deben ser conservadas (Reed y Frankham, 2003). Niveles elevados de diversidad genética constituyen un factor decisivo para la supervivencia de las poblaciones a largo plazo (Sork y Smouse, 2006). Diversos estudios del impacto de la fragmentación sobre la diversidad genética de especies arbóreas han proporcionado información valiosa para la conservación de los bosques (Bacles *et al.*, 2006; Jump y Peñuelas, 2006; Hamilton, 2011). De esta manera, la pérdida de diversidad genética en los ecosistemas de bosques, debido a la creciente fragmentación del paisaje y al cambio climático global, constituye un foco de atención por parte de la comunidad científica.

La subdivisión poblacional producto de eventos de fragmentación, tiene como consecuencia la diferenciación genética entre las subpoblaciones por lo cual, las frecuencias alélicas entre los fragmentos poblacionales se tornan diferentes (White *et al.*, 2007). Esta distribución no aleatoria de las frecuencias alélicas entre subpoblaciones define la estructura genética poblacional (Hartl y Clark, 2007). Los niveles de diversidad

y estructura genética de las poblaciones son el resultado de distintas fuerzas microevolutivas que operan a través del tiempo y el espacio (Zhao y Gong, 2011). Evaluar la variación de estos niveles permite realizar inferencias acerca de cuáles son los procesos microevolutivos que pudieron haber originado tales patrones de variación, ya que procesos tales como mutación y migración pueden incrementar la variación genética dentro de las poblaciones, mientras que la deriva genética y la selección natural pueden reducirla (Templeton, 2006; White *et al.*, 2007). El flujo génico también puede ser considerado una fuerza microevolutiva cuando ocurre entre poblaciones que presentan acervos génicos distintos (Templeton, 2006). Debido a que los efectos del flujo génico y de la deriva genética son opuestos, el balance entre estos dos procesos es el principal determinante de la estructura genética poblacional. Las fuerzas evolutivas operan dentro de las limitaciones impuestas por esta estructura poblacional, por lo tanto, toda inferencia evolutiva debe ser considerada en este contexto (Templeton, 2006; Hartl y Clark, 2007).

La heterogeneidad espacial de los ecosistemas podría influir sobre los niveles de estructura genética poblacional, en función del grado de co-variación entre los procesos microevolutivos que operan sobre las poblaciones y los factores que varían en el hábitat de las mismas. En general, las poblaciones tienen historias complejas que consisten en fases de expansión y retracción, y los patrones de flujo génico entre ellas pueden fluctuar en tiempo y espacio (Corander *et al.*, 2008). Cuando los fragmentos de una población se vuelven relativamente aislados unos de otros, las fuerzas estocásticas modelan su composición genética a lo largo de las generaciones (Corander *et al.*, 2008). Por ello, las consecuencias genéticas de la fragmentación son el incremento de la estructura genética poblacional debido a la reducción de los niveles de flujo génico y el aumento de la acción de la deriva genética (Jump y Peñuelas, 2006; Dick *et al.*, 2008) (Figura 1).

Las poblaciones naturales de especies arbóreas se distribuyen en paisajes heterogéneos, en hábitats que cubren áreas de dimensiones variables y con distintos grados de aislamiento entre sí. Así, la fragmentación del bosque puede conducir a erosión genética de las poblaciones, la cual podría tener como consecuencia una reducción en la resiliencia de las poblaciones a largo plazo (Figura 1). La pérdida de diversidad genética como promotora de extinción local ha sido tema de discusión en diversos estudios teóricos, experimentos de laboratorio y a campo, estudios empíricos de

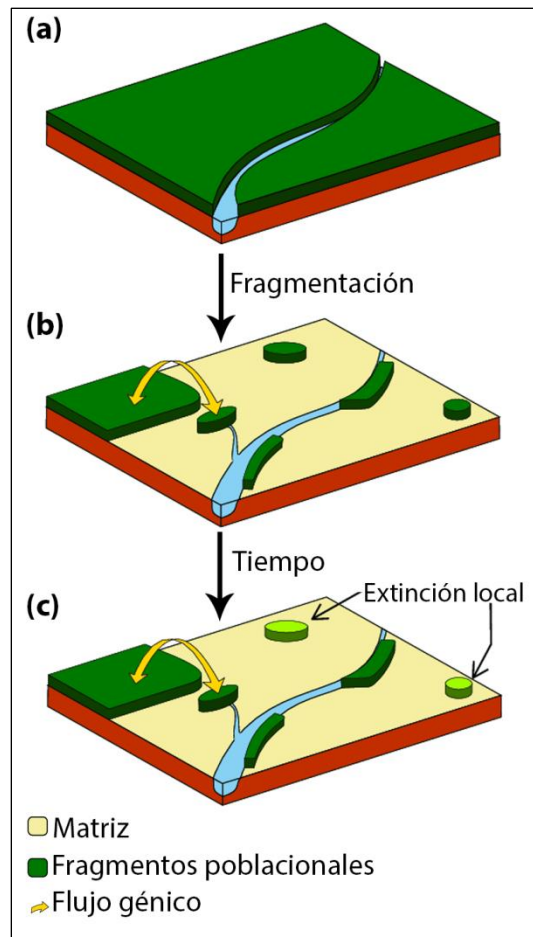


Figura 1. Poblaciones en paisajes fragmentados adaptado desde Zucchi *et al.* (2017). a) Bosque continuo; b) Disminución de los niveles de flujo génico; c) Incremento de la acción local de la deriva genética en fragmentos poblacionales pequeños y extinción local de poblaciones aisladas.

la dinámica de poblaciones naturales y meta-análisis (Frankham, 1999). La disminución de la diversidad genética puede incrementar el riesgo de extinción local de una especie a través de un aumento en los niveles de endogamia y una reducción en el potencial adaptativo de las poblaciones (Reed y Frankham, 2003; Frankham, 2005). Por lo general, la pérdida de heterocigosis puede darse de forma lenta ante un evento de fragmentación, sin embargo luego de una serie de generaciones posteriores a la fragmentación es posible detectar un aumento en los niveles de endogamia tomando como referencia la población continua inicial (Aguilar *et al.*, 2008). En plantas, esto podría deberse a un incremento en las restricciones al flujo de polen, al aumento de la autopolinización y a cruzamientos entre parientes y/o a un menor número efectivo de donantes de polen en poblaciones pequeñas y aisladas (Robledo-Arnuncio *et al.*, 2004). Estos factores en conjunto, podrían dar lugar a distintos patrones espaciales no aleatorios de la variación genética (Epperson, 2003).

1.2. Distribución espacial de la variación genética

Los patrones geográficos y espaciales de la variación genética son el resultado de la acción conjunta de procesos que operan en el complejo espacio-tiempo (Epperson, 2003). Así, las poblaciones deben ser consideradas en su contexto espacial debido a que la distancia genética entre las mismas presenta una correlación positiva con la distancia geográfica que las separa (Wright, 1943). En este marco, el Aislamiento por Distancia (*Isolation by distance* - IBD) queda definido por las diferencias estadísticamente significativas de las frecuencias de alelos de *loci* selectivamente neutros entre poblaciones locales, las cuales no reflejan las frecuencias alélicas de la población global (Wright 1950).

El IBD puede originarse por la acción de dos procesos que operan de forma antagónica: la deriva genética, la cual tiende a reducir localmente y de forma aleatoria el número de alelos que se transmiten a la siguiente generación y, por otro lado, el flujo génico restringido (Hardy y Vekemans, 1999). El incremento en los efectos de la acción de la deriva genética y la disminución del intercambio alélico entre las poblaciones con el incremento de la distancia, favorecerá la pérdida de alelos al azar (Heywood, 1991) con la consecuente disminución de la diversidad genética y el aumento de la diferenciación entre poblaciones distantes.

1.2.1. Estructura genética espacial

La estructura genética espacial (EGE) (*Spatial genetic structure* - SGS) en poblaciones naturales queda definida por la distribución no aleatoria de los genotipos en el espacio y puede resultar de la acción conjunta de diversos procesos que incluyen tanto las presiones de selección como los eventos demográfico-históricos (Vekemans y Hardy, 2004). En poblaciones naturales de especies arbóreas, la EGE puede ser caracterizada a través del análisis conjunto de los niveles de diversidad genética y de las ubicaciones geográficas de los individuos y sus relaciones de parentesco (Epperson, 1992).

En un contexto espacial explícito, las tasas de dispersión y de diferenciación genética entre pares de individuos dependen de la distancia geográfica que los separa. En especies arbóreas, la distancia a la cual se dispersan las semillas y el polen dentro de las poblaciones determina el grado de parentesco entre individuos cercanos (Epperson, 2003).

El estudio de la EGE a diferentes escalas permite cuantificar los efectos de la composición del paisaje, los eventos demográficos que configuran los fragmentos y los procesos microevolutivos que operan sobre las poblaciones (Epperson, 2003; Vekemans y Hardy, 2004; Balkenhol *et al.*, 2016) (Figura 2a). Para evaluar las consecuencias de la fragmentación sobre la distribución espacial de la variación genética poblacional se deben tener en cuenta los niveles de flujo génico entre las subpoblaciones y el grado de EGE de la población previa a la fragmentación (Figura 2b). De esta manera, altas tasas de flujo génico y una baja EGE previa resultarán en una baja heterogeneidad entre los fragmentos manteniéndose los niveles de diversidad genética (Hamrick, 2004). En contraparte, si los niveles de flujo génico son bajos y la EGE pre-fragmentación es elevada, los efectos serán un rápido incremento de diferenciación genética entre fragmentos y una disminución de la diversidad genética dentro de los fragmentos poblacionales (Hamrick, 2004) (Figura 2b). Además, en especies forestales, si el número de árboles parentales es bajo, las frecuencias genotípicas pueden verse modificadas y los niveles de endogamia pueden incrementarse dentro de los fragmentos (Hamrick, 2004), debido a que aumentaría la probabilidad de que dos alelos en un individuo provengan de un único alelo de un individuo ancestral (Charlesworth y Willis, 2009).

La EGE de las poblaciones se configura en función de los eventos demográfico-históricos y los procesos microevolutivos en el complejo espacio-tiempo (Figura 2a). Los eventos demográfico-históricos tales como fragmentación, cuellos de botella, efecto fundador o expansión implican un cambio en el tamaño poblacional, mediante el cual se

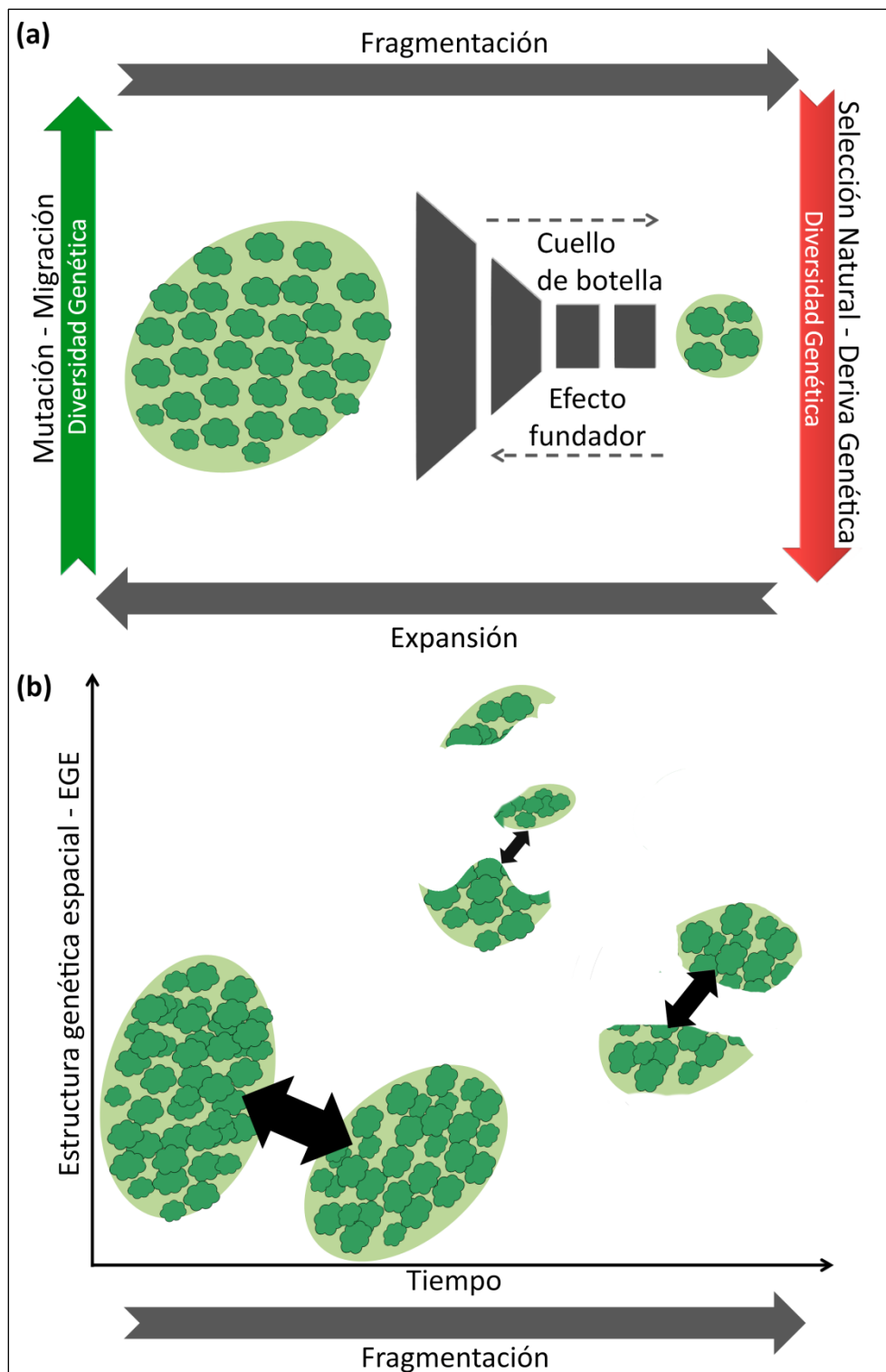


Figura 2. Estructura genética espacial (EGE). a) Eventos demográficos y procesos microevolutivos que moldean la EGE y b) EGE de poblaciones en paisajes fragmentados en función del tiempo (t) y el flujo génico entre fragmentos (proporcional al tamaño de las flechas bidireccionales).

reordena la diversidad genética poblacional en los genotipos de los individuos que conformen la población *a posteriori* del evento demográfico. Al mismo tiempo, los procesos microevolutivos modifican los niveles de diversidad genética poblacional, incrementándola (mutación y migración) o disminuyéndola (selección natural y deriva genética). Es por ello, que la acción concertada de los eventos demográfico-históricos y de los procesos microevolutivos, moldea la EGE de las poblaciones a través del tiempo (Figura 2a).

La historia demográfica de las poblaciones genera y modifica los patrones espaciales de distribución de los individuos (Barot *et al.*, 1999). El análisis de los patrones de diversidad genética actual y de la EGE permite inferir cuáles han sido los eventos determinantes de la historia demográfica poblacional que pudieron haber moldeado tales patrones de diversidad.

Las subpoblaciones resultantes de eventos de fragmentación del bosque pueden atravesar una significativa reducción en el tamaño poblacional. Las poblaciones naturales de especies arbóreas que han experimentado un proceso de cuello de botella incluyendo la pérdida de alelos que se encuentran a baja frecuencia ($\leq 0,05$), la reducción en el tamaño efectivo poblacional y el incremento de los efectos de la acción local de la deriva genética, pueden experimentar un incremento en los niveles de endogamia y de estructura familiar luego de dos o tres generaciones posteriores al mismo (Manoel *et al.*, 2011). Así, una población que atravesase un cuello de botella puede presentar distintos niveles de flujo génico, los cuales podrían mitigar los efectos del aislamiento físico entre los fragmentos poblacionales remanentes. Sin embargo, algunos autores postulan que en especies anemófilas, es probable que la fragmentación aumente las distancias de dispersión de polen por el viento a través del paisaje, manteniendo los niveles de diversidad genética en fragmentos pequeños y aislados (Young *et al.*, 2000; Ortego *et al.*, 2010).

Si en lugar de un cuello de botella producto de un evento de fragmentación poblacional, la historia demográfica de las poblaciones incluyera un efecto fundador y se produjera una expansión poblacional, el panorama sería distinto. Los eventos de expansión espacial en las poblaciones generalmente van acompañados de un marcado aumento en el tamaño poblacional (Excoffier *et al.*, 2009). En general, las poblaciones en expansión se encuentran menos expuestas a los efectos de la deriva genética que las poblaciones de tamaño efectivo poblacional constante o estacionarias, presentando por lo tanto, frecuencias alélicas relativamente estables (Excoffier *et al.*, 2009). Sumado a ello, tales poblaciones presentan por lo general un exceso de alelos que se encontraban a baja

frecuencia en la población previa a la expansión, bajas tasas mutacionales, y un exceso de homocigosis en relación al número de alelos observados (Excoffier *et al.*, 2009). Sin embargo, la observación de estos patrones en poblaciones en expansión también depende de los niveles de flujo génico reciente e histórico entre las subpoblaciones (Excoffier, 2004; Ray *et al.*, 2003).

Las poblaciones de especies vegetales están constituidas por organismos sésiles cuyo movimiento depende de la movilidad de sus propágulos (gametas y cigotos), es decir que es dependiente del flujo génico mediado por polen y por semillas. De esta manera, el flujo génico en las plantas actúa como una fuerza cohesiva, conectando individuos en unidades evolutivas (Ellstrand, 2014). Los niveles de flujo génico se encuentran sujetos a presiones ambientales, pudiendo presentar cambios microevolutivos, con una disminución o aumento a lo largo del tiempo (Ellstrand, 2014). Por lo tanto, es relevante considerar todos los mecanismos potenciales de flujo génico cuando se realizan análisis de los factores determinantes de la EGE (Freeland *et al.*, 2011).

Dos características importantes en la determinación de la EGE de las poblaciones de especies vegetales son la extensión del flujo génico mediado tanto por polen como por semillas y el sistema de fecundación que predomine en tales poblaciones. La mayoría de las especies de árboles presentan niveles moderados a elevados de flujo génico (Ellstrand, 1992). El flujo de polen es importante en bosques fragmentados o en poblaciones pequeñas, debido a que puede alcanzar niveles suficientes para contrarrestar los efectos de la deriva genética, previniendo la pérdida de diversidad y el aumento de la EGE (Pakkad *et al.*, 2008). En árboles, el sistema de fecundación cruzada, es decir alogamia, es una fuente importante de dispersión de polen, la cual representa el principal componente del flujo génico debido a que por lo general, cubre un área mayor que el flujo génico mediado por semillas (Smouse y Sork, 2004; Robledo-Arnuncio y Gill, 2005). Aún así, el flujo génico mediado por semillas cobra relevancia en la determinación del tamaño efectivo poblacional y en los niveles de subdivisión de la población, debido a que las semillas contienen los genomas biparentales mientras que los granos de polen portan sólo el genoma paterno (Hamilton y Miller, 2002; García C *et al.*, 2007), influyendo sobre los patrones espaciales de diversidad genética poblacional mediante fenómenos tales como la colonización de nuevos hábitats, la regeneración y las sucesiones (Hamrick *et al.*, 1993).

Por otro lado, los patrones de fecundación varían de acuerdo a la biología reproductiva y a la estructura espacial de una especie influyendo, en forma conjunta, sobre la diversidad genética y la EGE generación tras generación. En este contexto, la

biología de la especie y, en particular, su sistema de fecundación son clave en la configuración espacial de unidades familiares y en la determinación de la dinámica demográfico-evolutiva de toda especie vegetal (Gillet *et al.*, 2005). Se ha demostrado que los árboles presentan, predominantemente, fecundación cruzada aunque en algunas especies se han detectado diferentes grados de autofecundación (Boshier, 2000). En estas especies, las cuales por lo general presentan flores hermafroditas, la autofecundación se encuentra asociada a cambios en la estructura genotípica de la progenie, debido a que se trata del tipo de endogamia con mayores efectos a nivel poblacional. De esta manera, la fragmentación de las masas boscosas puede tener implicancias considerables sobre el sistema de fecundación de una especie, el cual queda determinado tanto por factores genéticos como por condiciones ambientales (Finkeldey y Hattemer, 2007). Así, el sistema de fecundación puede variar a nivel espacial y temporal en los paisajes fragmentados (Finkeldey y Hattemer, 2007), de manera que si el tamaño poblacional de los fragmentos remanentes es pequeño y el grado de aislamiento entre los mismos es elevado, los efectos de la endogamia podrán ser significativos (Manoel *et al.*, 2011).

1.2.2. Estructura genética espacial a escala fina

La caracterización de la EGE, de los niveles de flujo génico mediado por polen y por semillas y del grado de parentesco entre pares de individuos a través del espacio y del tiempo, constituye información valiosa para el estudio de los procesos que configuran la estructura genética de las poblaciones de árboles en paisajes fragmentados. Los análisis de la EGE en poblaciones de plantas a diferentes escalas proveen una aproximación inicial hacia los interrogantes relacionados con la influencia del flujo génico, la selección natural y la deriva genética, de forma integrada, sobre la distribución de la variabilidad genética (Loiselle *et al.*, 1995). El estudio de los procesos que operan a distintas escalas espaciales puede ser abordado mediante inferencias estadísticas que describan el comportamiento de una variable a través del espacio (Hardy y Vekemans, 1999). Luego, los patrones observados en un subconjunto de poblaciones pueden estar conectados a los patrones y procesos del sistema en el cual se encuentran inmersas tales poblaciones (Epperson, 2003).

En el marco de los procesos que operan bajo IBD se espera que poblaciones continuas exhiban un patrón de estructura genética espacial en el cual, el grado de parentesco entre individuos decrece con el aumento de la distancia geográfica entre los mismos (Hardy y Vekemans, 1999; Vekemans y Hardy, 2004). En el contexto de IBD, la acción concertada de la deriva genética y del flujo génico en las sucesivas generaciones tiende a

un estado de equilibrio dispersión-deriva, en el cual se espera detectar una disminución lineal de los niveles de parentesco entre los individuos con el aumento de la distancia física, o con el logaritmo de la distancia en un modelo bidimensional (Loiselle *et al.*, 1995; Rousset, 1997, Vekemans y Hardy 2004). Así, la dispersión limitada produce correlaciones genéticas negativas significativas entre poblaciones con el incremento de la distancia física entre ellas (Epperson, 2003).

A escala local, la distribución no aleatoria de genotipos en el espacio frecuentemente es el resultado de la formación de estructuras familiares producto de flujo génico restringido, definiendo la estructura genética espacial a escala fina (EGEF) (*Fine-scale spatial genetic structure* – FSGS) (Vekemans y Hardy, 2004). La EGEF es modelada por la acción conjunta de procesos microevolutivos, el sistema de fecundación y la historia demográfica de las poblaciones (Epperson, 2003; Dick *et al.*, 2008; Hampe *et al.*, 2010; Addisalem *et al.*, 2016) y ha sido descrita en un gran número de especies (Vekemans y Hardy 2004; Dick *et al.*, 2008; ej. Troupin *et al.*, 2006; Hardy *et al.*, 2006; Buzzati *et al.*, 2012; Berens *et al.*, 2014; Ewédjè *et al.*, 2017). Por lo tanto, la comprensión de los eventos que conforman la historia demográfica de las poblaciones es esencial para determinar qué mecanismos son los responsables de generar la dinámica temporal de la EGEF (Jones y Hubbell, 2006).

En poblaciones de especies arbóreas, los posibles cambios en la EGEF a través del tiempo pueden ser estudiados desde una perspectiva demográfica que incluya el análisis de la estructura en dos o más estadios del ciclo de vida. Estudios previos en especies arbóreas han revelado que la EGEF puede interpretarse como resultado de la interacción de una serie de factores tales como la dispersión limitada de polen y de semillas (Hardy *et al.*, 2006), la estructura por edades de la población (Hampe *et al.*, 2010), la densidad de individuos adultos (Hardy *et al.*, 2006), la heterogeneidad ambiental a escala fina (Troupin *et al.*, 2006) y la distribución agrupada de renovales por la conjunción de dispersión limitada y requerimientos de micro-hábitat (Collevatti *et al.*, 2014). Hamrick *et al.* (1993) examinaron diferentes estadios de vida en poblaciones de varias especies arbóreas revelando que la densidad de los individuos adultos y el modo de dispersión de las semillas interactúan para determinar los niveles de estructura genética espacial en renovales, debido a que una baja densidad de los árboles adultos y una dispersión limitada de las semillas constituirían las causas que generan la mayor parte de la EGEF en renovales. Las especies cuyas semillas son dispersadas por autocoria, consecuentemente, en las cercanías de la planta madre presentan por lo general una EGEF mayor que las especies cuyas semillas se dispersan por zoocoria o

anemocoria (Hamrick *et al.*, 1993). Por lo tanto, las distancias de dispersión de las semillas influyen de manera significativa sobre el establecimiento de renovales cercanos, lo cual tiene importantes implicancias sobre los procesos demográficos y reproductivos de las poblaciones desde un punto de vista espacial y genético (Hamrick *et al.*, 1993).

En poblaciones naturales, aspectos demográficos tales como la magnitud y la forma de los correlogramas de parentesco en función de la distancia, pueden ser particularmente informativos sobre la EGEF (Epperson, 2003). Con frecuencia, la disminución de la estructura familiar observada a lo largo de estadios de vida sucesivos en las poblaciones es explicada a partir de la mortalidad denso-dependiente (Chung y Nason, 2007; Hampe *et al.*, 2010). Además, la eficacia biológica de los individuos en muchas especies de plantas podría disminuir debido a un incremento en los niveles de endogamia, los cuales afectarían sus tasas de fertilidad, supervivencia y crecimiento (Charlesworth y Willis, 2009).

De acuerdo con sus patrones de mortalidad y reclutamiento, los individuos tendrán una distribución espacial agregada, aleatoria o regular (Epperson, 2003). Si los niveles de competencia son elevados, es probable que el patrón espacial a lo largo del tiempo sea regular (Figura 3). Por su parte, los factores de mortalidad dependientes de la densidad de las semillas, plántulas o renovales pueden estar dados por depredación mediada por insectos o roedores, infección por organismos patógenos y/o por competencia intraespecífica (Janzen, 1970; Connell, 1971).

Los patrones de EGEF en poblaciones de árboles y el grado de agrupamiento entre individuos que comparten ciertos grados de parentesco entre sí, con frecuencia resultan de dos grandes procesos: la asociación a la heterogeneidad del hábitat y la dispersión limitada (Hardy *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2010). En este contexto, y en el marco de modelos de IBD, asumiendo condiciones de equilibrio dispersión-deriva, el número de individuos que conforman la unidad de reproducción aleatoria o unidad panmíctica define el tamaño de vecindario (*sensu* Wright, 1943; 1946). Los niveles de flujo génico constituyen el factor principal en la regulación del tamaño de vecindario, dado que este refleja la extensión espacial alrededor de un individuo en una población, dentro de la cual todos los cruzamientos presentan la misma probabilidad de ocurrencia. Además, debido a que las estimaciones de dispersión alélica son una función de la densidad efectiva poblacional, el tamaño de vecindario proporciona una medida de los eventos de dispersión que se traducen en éxito reproductivo, entendido como el movimiento exitoso de alelos a través del espacio, a lo largo del tiempo (Sumner *et al.*, 2001). Dado que las

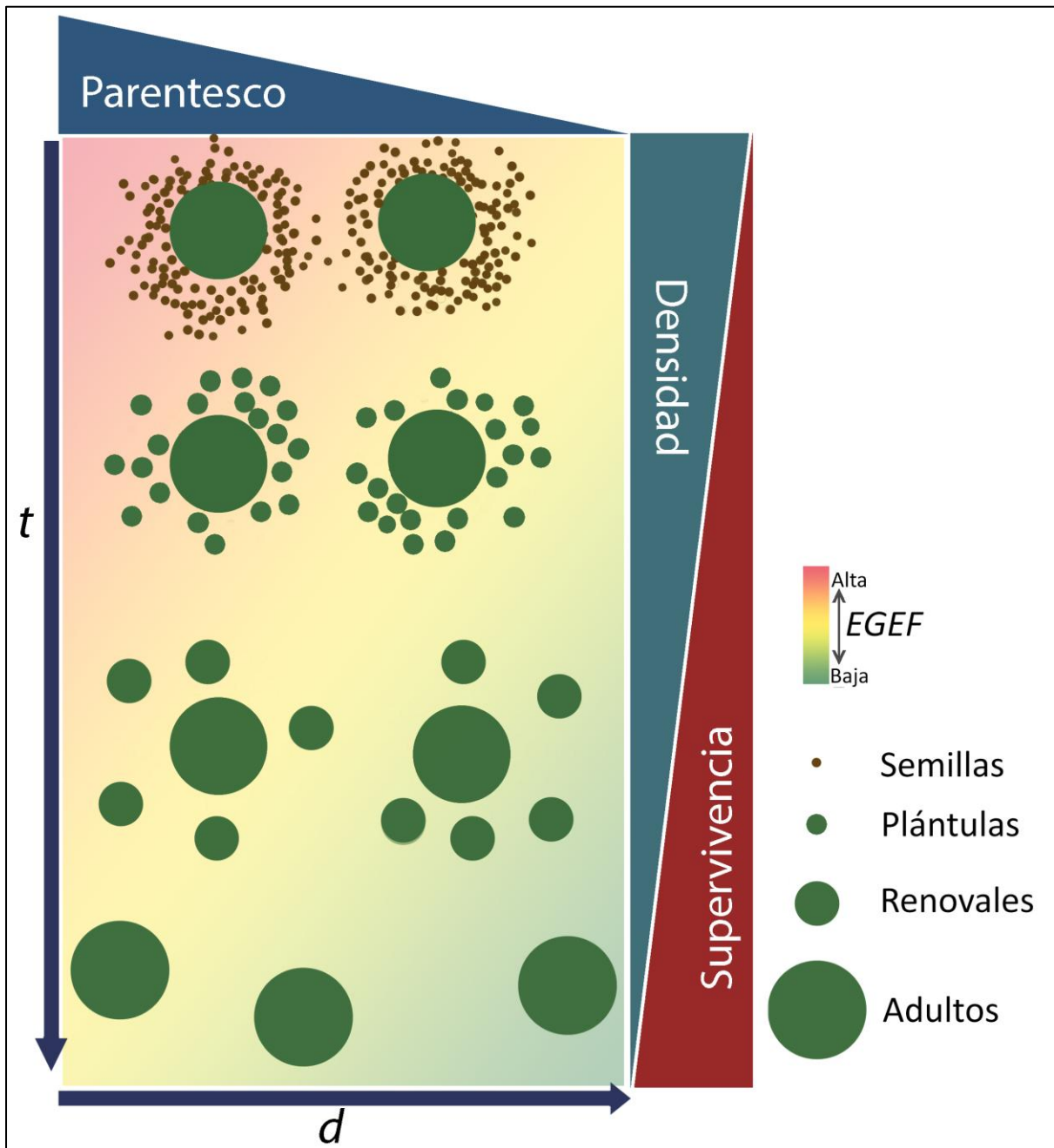


Figura 3. Estructura genética espacial a escala fina (EGEF) en distintos estadios del ciclo de vida en el complejo espacio-tiempo. Se indica: tiempo (t) y distancia (d).

distancias de dispersión alélica de la mayoría de las especies arbóreas son sustancialmente menores que sus rangos espaciales de distribución, es de esperar que los individuos cercanos sean genéticamente más parecidos que los individuos distantes. Por ello, cuando la mayor parte de los eventos de fecundación ocurren entre vecinos cercanos, las poblaciones presentarán una fuerte correlación entre las distancias de dispersión mediada por polen con respecto a las distancias de dispersión de semillas (Hardy *et al.*, 2006).

1.3. Paisajes fragmentados en Sudamérica: El caso de los Bosques Secos Estacionales Neotropicales

Los Bosques Secos Estacionales Neotropicales (BSEN) constituyen un bioma que presenta una distribución amplia y fragmentada desde Méjico hasta Argentina, incluyendo el Caribe (DRYFLOR, 2016) (Figura 4). Estos bosques forman un arco alrededor de la cuenca Amazónica, con su extremo Este en el dominio Caatinga en el Noreste de Brasil y su extremo Oeste posicionado en las costas del Caribe en Colombia y Venezuela. Entre estos dos extremos, los BSEN se presentan como núcleos aislados en la periferia del Dominio Chaqueño, en el Pedemonte Subandino, en los valles interandinos y en las costas del Pacífico (Caetano *et al.*, 2008), representando fragmentos disyuntos dispersos a lo largo del Neotrópico (Prado y Gibbs, 1993; Pennington *et al.*, 2000; Prado, 2000; Werneck *et al.*, 2011; Mogni *et al.*, 2015) (Figura 4).

En sentido amplio, los BSEN constituyen una formación dominada por árboles que, en general, conforman un dosel cerrado en suelos fértiles (Pennington *et al.*, 2009; DRYFLOR, 2016) donde dominan especies vegetales de la familia Leguminosae, la cual presenta la mayor riqueza específica en estos bosques y se encuentra acompañada por especies de las familias Bignoniaceae y Anacardiaceae mientras que en el sotobosque se encuentran abundantes especies de Cactaceae y Bromeliaceae, en tanto que las especies de gramíneas son escasas (Pennington *et al.*, 2009; Oakley y Prado, 2011; Mogni *et al.*, 2015). A pesar de los elevados niveles de biodiversidad, se piensa que la mayor parte de los elementos florísticos de los BSEN constituyen unidades filogenéticas (Pennington *et al.*, 2009). Los vínculos florísticos detectados entre las áreas disyuntas de estos bosques permitieron postular una distribución histórica continua en el pasado (Prado y Gibbs, 1993).

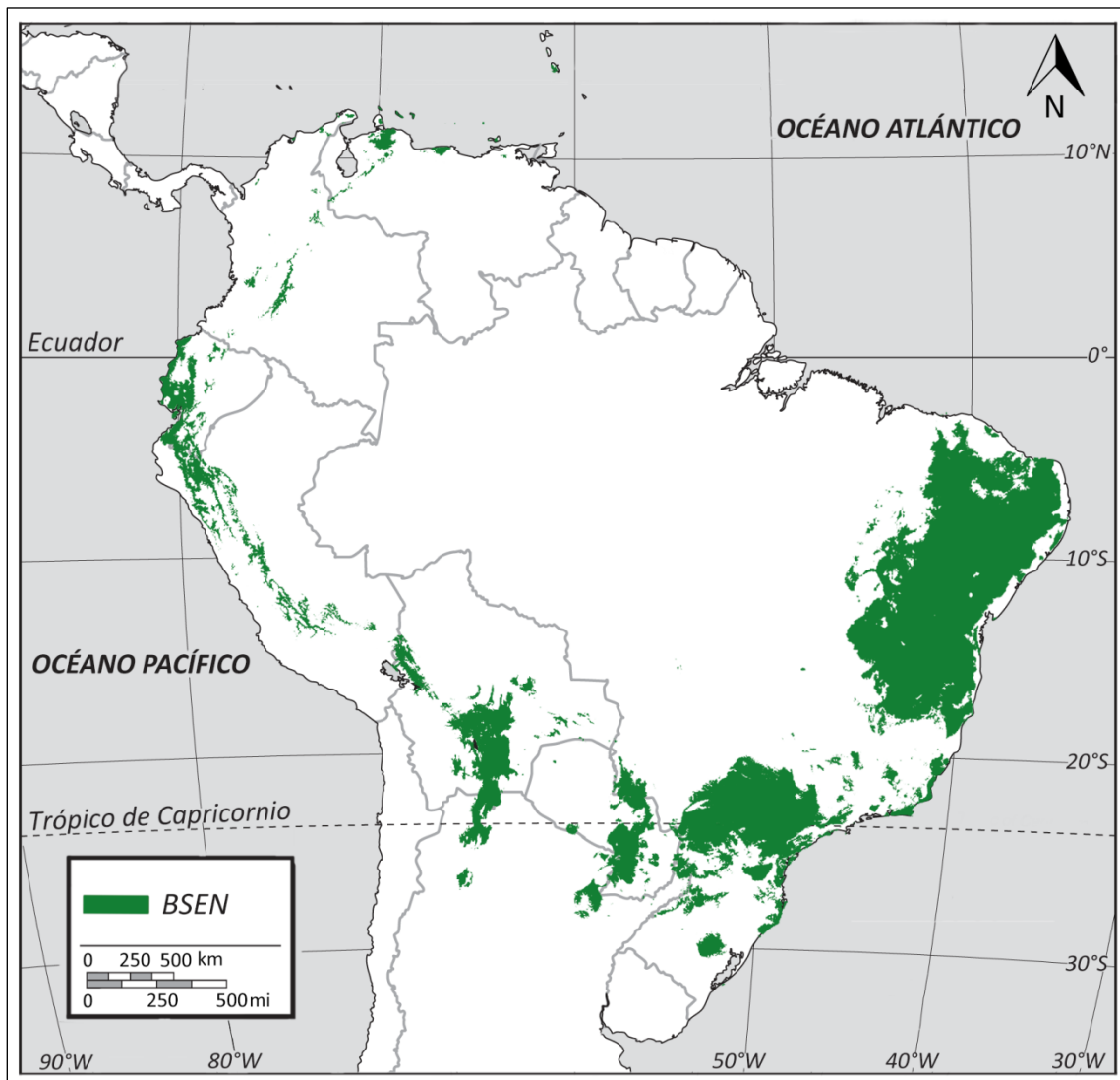


Figura 4. Bosques Secos Estacionales Neotropicales (BSEN) actuales en América del Sur según Särkinen *et al.* (2011).

La influencia de las fluctuaciones climáticas del pasado sobre la distribución actual de los BSEN ha merecido diferentes interpretaciones. Por un lado, Prado y Gibbs (1993) sobre la base de un registro de más de 80 especies distribuidas a lo largo de estos bosques y de antecedentes climatológicos que señalan un clima frío y seco en Sudamérica durante el Pleistoceno, postularon la hipótesis del Arco Pleistocénico, la cual sostiene que su distribución actual representa remanentes fragmentarios de un bosque que durante el Pleistoceno presentó una distribución extensa y continua. Mientras que Werneck *et al.* (2011) sostienen que los BSEN habrían experimentado una expansión en el Pleistoceno Temprano o en el Terciario, seguida de una fragmentación hace ~21.000 años en el último máximo glacial (LGM – *Last Glacial Maximum*), pasando luego por una expansión secundaria en el Holoceno hace aproximadamente 6.000 años. Entre las especies arbóreas involucradas en los ciclos de expansión y retracción durante estas fluctuaciones climáticas, *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* ha sido descrita como la más paradigmática (Prado y Gibbs, 1993).

En cuanto a la situación actual, la biodiversidad de los BSEN se encuentra amenazada a múltiples escalas e intensidades por la creciente fragmentación inducida por actividades antrópicas (DRYFLOR, 2016). Miles *et al.* (2006) analizaron el estado de conservación de los ecosistemas de los bosques secos tropicales e indicaron que la mayor parte de los BSEN se encuentran fragmentados y dispersos encontrándose en estado crítico debido a que sólo una pequeña proporción de las áreas remanentes se encuentran protegidas.

En relación a la inferencia de las respuestas de los BSEN a los cambios futuros se prevé que, como consecuencia del cambio climático, su estructura y función se verán modificadas a medida que aumente tanto la frecuencia y severidad de las sequías, como la variabilidad en los regímenes de precipitaciones (Allen *et al.*, 2017). La regeneración natural de un gran número de especies forestales de los BSEN ocurre en la estación húmeda, por lo cual, si la precipitación aumenta, es probable que estas especies se vean afectadas negativamente (Carón *et al.*, 2018). En este marco, las poblaciones ubicadas en los límites de la distribución deberían ser objeto de estudio desde el punto de vista de la conservación, debido a que un bajo número de individuos fundadores, pioneros en las nuevas áreas, serán portadores de parte de la variabilidad genética total.

1.4. *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*: Especie paradigmática de los Bosques Secos Estacionales Neotropicales

Anadenanthera colubrina var. *cebil* es una especie forestal nativa sudamericana que se distribuye a lo largo de los cuatro grandes núcleos de los BSEN (Prado, 2000). En el Núcleo Misiones, su distribución define los límites entre el Dominio de los BSEN y el Dominio Amazónico (Oakley y Prado, 2011). Se encuentra con mayor frecuencia en bosques, por lo general nuevos o que han sufrido perturbaciones temporales (Guzmán, 1997). Es una planta pionera y heliófita con requerimientos de iluminación elevados, principalmente en los primeros estadios del desarrollo, por lo cual es frecuente su presencia en claros de bosques, siendo una especie recomendable para la recuperación de la cubierta boscosa en áreas degradadas (Guzmán, 1997, Justiniano y Fredericksen, 1998).

Anadenanthera colubrina var. *cebil* es una especie de usos múltiples que ha sido ampliamente utilizada por el hombre, especialmente para extracción de madera y extracción de taninos para la curtiembre de cueros (Luckow, 2005; Queiroz, 2009), como combustible (leña), en la elaboración de carbón vegetal y lejía (jabón natural) y como material de construcción rural y civil (Justiniano y Fredericksen, 1998; Tortorelli, 2009). Además, *A. colubrina* var. *cebil* es considerada una especie apícola, suministrando polen y néctar para la entomofauna nativa (Kiill y Almeida da Silva, 2016), en tanto que sus semillas han sido utilizadas por numerosas poblaciones indígenas desde la antigüedad debido a su poder alucinógeno (Nazar *et al.*, 2013; de Souza *et al.*, 2014).

Las poblaciones naturales de *A. colubrina* var. *cebil* se presentan en bosques densos asociados a suelos arcillosos y fértiles, tales como las zonas de afloramientos basálticos (Lorenzi, 1992; Justiniano y Fredericksen, 1998). El hábitat de esta especie puede abarcar una topografía variable, pudiendo tornarse dominante en condiciones topográficas de altura como cimas, laderas altas y pendientes, con respecto a otras condiciones topográficas tales como fondos de laderas y arroyos (Justiniano y Fredericksen, 1998).

1.4.1. *Ubicación taxonómica de la especie*

Anadenanthera colubrina var. *cebil* pertenece al orden Fabales y a la familia Leguminosae (Lewis *et al.*, 2005; Yahara *et al.*, 2013), la cual presenta importancia tanto ecológica como económica y ha sido el foco de numerosos análisis filogenéticos recientes a nivel de subfamilia, tribu y género (LPWG, 2017). Pertenece a la subfamilia Caesalpinioideae (ex Mimosoideae, LPWG 2017) y al género *Anadenanthera* Speg.,

etimológicamente “sin glándulas en las anteras”. Este género es endémico de América y está constituido por dos especies: *A. colubrina* y *A. peregrina* (Luckow, 2005), las cuales se diferencian, según lo indicado por von Alstchul (1964), en la posición de las brácteas del involucreo en el pedúnculo de la inflorescencia y en que en *A. peregrina* la superficie del fruto es verrucosa y las anteras carecen de glándula apical. *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan presenta, a su vez, dos variedades: *cebil* y *colubrina*. *A. colubrina* var. *cebil* es la más frecuente, tornándose dominante en algunas áreas de los BSEN. Esta especie es conocida en el Noreste argentino y en Paraguay como curupay o kurupa’y, que proviene del guaraní y significa “cáscara sarnosa”, haciendo referencia a la morfología de la corteza; cebil o cebil colorado en el Noroeste argentino, en Perú es conocida como wilka o vilca nombre que proviene del Quechua y significa sagrado, en referencia a los usos rituales de sus semillas, mientras que en Brasil es conocida como angico (von Altschul, 1964; Cialdella, 2000; Tortorelli, 2009).

1.4.2. Características morfológicas de la especie

Anadenanthera colubrina var. *cebil* generalmente ocupa el dosel superior del bosque llegando hasta alturas de 25-30m, tornándose en muchos casos en emergente, presentando un tronco de entre 50cm y 1m de diámetro (Justiniano y Fredericksen, 1998; Tortorelli, 2009). La corteza del tronco de *A. colubrina* var. *cebil* presenta “mamelones” en forma de erupciones dispuestas de forma irregular y en número variable (Figura 5a), las cuales constituyen la manifestación de la acción de un hongo (Justiniano y Fredericksen, 1998). Presenta hojas compuestas bipinnadas (Figura 5b), raquis y raquillas pubescentes o casi glabras (von Altschul, 1964). Las hojas presentan una glándula alargada y prominente de color rojo característico en la cara superior de la base del pecíolo y 1-3 glándulas similares más pequeñas presentes en la inserción de los dos o tres pares de pinnas terminales (Figura 5e). Estas glándulas se denominan nectarios extraflorales y pueden atraer una gran diversidad de hormigas (Campos *et al.*, 2006), aunque von Altschul (1964) atribuyó a estas glándulas la función de exudar una sustancia atractiva para insectos polinizadores.

Las flores hermafroditas de color blanco amarillento están dispuestas en cabezuelas globosas, las cuales determinan las inflorescencias racimosas (Figura 5c) y presentan un aroma dulce e intenso el cual atrae a los polinizadores (Figura 5f) (Justiniano y Fredericksen, 1998; Borges *et al.*, 2017). La producción de néctar en el área superior de la corola y la liberación del mismo a través de tricomas secretores en el ápice de los pétalos constituirían lo que se conoce como nectarios sustitutivos (Figura 5e) (Borges *et*

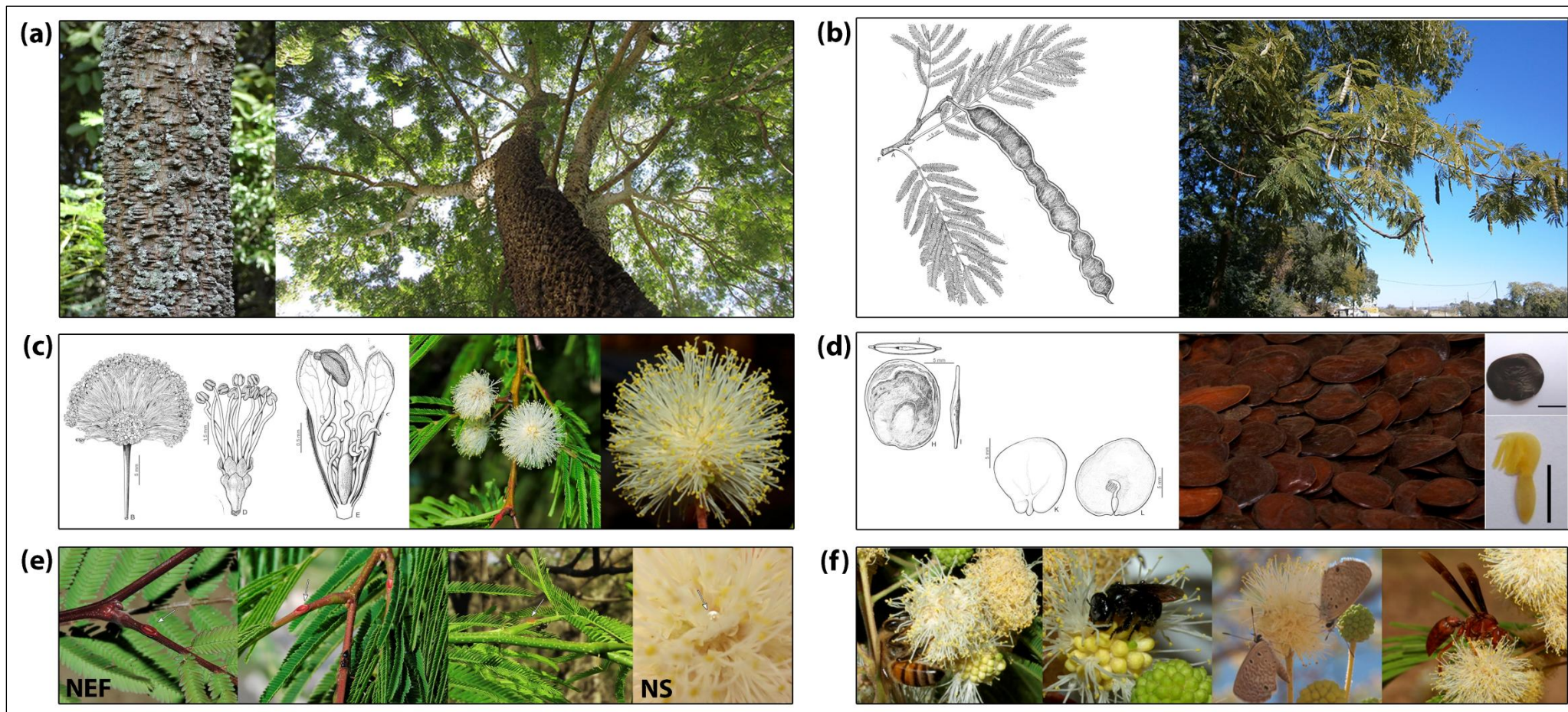


Figura 5. Características morfológicas de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*. Se indica: a) tronco, b) rama con frutos, c) inflorescencia y flor, d) semilla y embrión, e) nectarios extraflorales (NEF) y nectarios sustitutos (NS), f) insectos polinizadores.

Ilustraciones de Museo Botánico (FCEFyN - UNC) tomadas de Flora Argentina, Plantas Vasculares de la República Argentina (www.floraargentina.edu.ar). Se incluyen fotografías de autoría propia y tomadas de Queiroz (2012) (www.rubens-plantasdobrasil.blogspot.com), Borges *et al.* (2017) y Nery *et al.* (2018).

al., 2017). Cada inflorescencia presenta flores perfectas y flores estaminadas, constituyendo inflorescencias heteromórficas andromonoicas (Borges *et al.*, 2017). La ocurrencia de andromonoecia en las mimosoideas está probablemente relacionada con la transformación de la inflorescencia en la unidad de polinización (Borges *et al.*, 2017). Esto es característico de la subfamilia (Luckow, 2005) y fue corroborado por Borges *et al.* (2017) quienes observaron que en general, en individuos de *A. colubrina* var. *cebil*, un solo fruto por inflorescencia alcanza el estado maduro. Los frutos son folículos largos, angostos y achatados, de color castaño rojizo brillante (Figura 5b) con semillas discoidales y aplanadas de color café-negruzco de rápida germinación (von Altschul, 1964; Justiniano y Fredericksen, 1998; Queiroz, 2009; Tortorelli, 2009). Las semillas de *A. colubrina* var. *cebil* son circulares a subcirculares, comprimidas lateralmente, lisas, marrón lustrosas, con una línea fisural en forma de herradura en ambas caras y presentan tegumentos delgados y débiles (Varela y Albornoz, 2013) (Figura 5d). Las semillas presentan un elevado porcentaje de viabilidad (~90%) e incrementan notablemente su masa durante las primeras horas de hidratación cuando comienza a desarrollarse el embrión (Varela y Albornoz, 2013; Nery *et al.*, 2018) (Figura 5d). De acuerdo con las características de las semillas, esta especie es clasificada como planta pionera, debido a que presenta semillas con alta permeabilidad, alta germinación, corta longevidad y dispersión autocórica-anemocórica (Justiniano y Fredericksen, 1998).

1.4.3. Fenología de la especie

La floración de *A. colubrina* var. *cebil* generalmente ocurre al final de la estación seca e inicio de la húmeda (Justiniano y Fredericksen, 1998; Borges *et al.*, 2017). Esta especie es decidua o caducifolia y el período de brote de nuevas hojas ocurre, por lo general, luego de las primeras precipitaciones de la estación húmeda con la concomitante producción de flores, lo cual ocurre de forma masiva y durante aproximadamente tres semanas. Un comportamiento semejante ha sido observado por Digilio y Legname (1996) en el núcleo Pedemontano Subandino en Argentina, por Justiniano y Fredericksen (1998) en la Chiquitanía boliviana y por Machado *et al.* (1997) y Borges *et al.* (2017) en la Caatinga brasileña. Los frutos dispersan las semillas aproximadamente nueve meses después de la floración mediante la apertura por una de sus suturas (Justiniano y Fredericksen, 1998).

El patrón de floración masiva de *A. colubrina* var. *cebil* atrae a diversos insectos polinizadores (Figura 5f). Las abejas *Trigona spinipes* y *Tetragonisca angustula*, dos de los principales polinizadores autóctonos de *A. colubrina* var. *cebil* presentan un pequeño

rango de vuelo (~840m) (Araújo *et al.*, 2004), lo cual promueve altas tasas de geitonogamia (polinización entre distintas flores del mismo individuo) (Borges *et al.*, 2017). *A. colubrina* var. *cebil* presenta niveles de autoincompatibilidad (~0,1), por lo cual depende de vectores que medien el flujo de polen (Flores y Sanchez, 2010; Borges *et al.*, 2017).

La dispersión de semillas se produce en la época seca por un período largo que dura alrededor de tres y cuatro meses (Mostacedo *et al.*, 2001). Las semillas se precipitan al suelo por gravedad y, debido a que se trata de semillas livianas, delgadas y planas, el viento ayuda a la dispersión de las mismas a relativamente cortas distancias (De Noir *et al.*, 2002), impulsando las semillas por medio del movimiento de los frutos o siendo transportadas por hormigas cortadoras de hojas, según observaciones de Fredericksen *et al.* (1999). De esta manera, el mayor número de semillas dispersadas ocupa el área de influencia de la copa del árbol madre (Justiniano y Fredericksen, 1998). En la estación húmeda, las precipitaciones constituirían un factor clave para la regeneración de las plántulas (Varela y Albornoz, 2013; Humano, 2014).

Las semillas de *A. colubrina* var. *cebil* son altamente permeables y germinan directamente sin un período de inactividad, presentando una elevada capacidad de germinación, crecimiento rápido, alta tasa de regeneración y elevados porcentajes de viabilidad (Mostacedo y Fredericksen, 2001; Varela y Albornoz, 2013; Humano, 2014). En paisajes en los cuales manchones de bosque se encuentran en matrices de pastizales con presencia de ganado, el establecimiento de renovales no se ve restringido por el consumo de las plántulas debido a la toxicidad de sus hojas (Monteiro *et al.*, 2006; Humano, 2014). La germinación de las semillas ocurre aproximadamente dentro de los tres días posteriores a las primeras lluvias, presentando una alta capacidad de germinación (~82%) (Justiniano y Fredericksen, 1998). Las plántulas de *A. colubrina* var. *cebil* generalmente son abundantes, siendo características de importancia la presencia de rebrotes y el rápido crecimiento (Mostacedo y Fredericksen, 2001).

1.4.4. Distribución y hábitat de la especie

A. colubrina var. *cebil* presenta una distribución a lo largo de los BSEN (Prado, 2000) que abarca el Centro de Perú; Centro, Este y Sur de Bolivia; Norte de Argentina; Noroeste de Paraguay y Este de Brasil (Justiniano y Fredericksen, 1998). En el marco de la hipótesis del Arco Pleistocénico pueden definirse cuatro núcleos en la distribución de esta especie: 1) el núcleo Caatinga, en el Noreste de Brasil, donde se presenta con una frecuencia elevada, 2) el núcleo Misiones, a lo largo de los sistemas de los ríos Paraguay

y Paraná en el Noreste de Argentina, Este de Paraguay y Sudeste de Brasil, 3) el núcleo Pedemontano Subandino, en el Sudoeste de Bolivia y Noroeste de Argentina y 4) el núcleo Chiquitanía en Bolivia (Figura 6) (Prado y Gibbs, 1993).

En Argentina, la distribución geográfica de esta especie se restringe al Norte del país, presentando una distribución disyunta (Figura 6) (Cialdella, 2000) comprendida principalmente en las provincias fitogeográficas Paranaense y de las Yungas (Cabrera, 1976). Se ha descrito su presencia en las provincias de Misiones, Corrientes, Chaco, Formosa, Jujuy, Salta, Tucumán, Santiago del Estero, Catamarca y Córdoba, en ambientes contrastantes: en el Noroeste se encuentra sobre suelos rocosos, en laderas de serranías y en llanuras y planicies pedemontanas sobre sustrato rocoso mientras que, en el Noreste, esta especie se encuentra sobre suelos altos y limosos o ferralíticos (Martinez *et al.*, 2013).

Las poblaciones naturales de *A. colubrina* var. *cebil* se caracterizan por colonizar claros (Guzmán, 2001) y generar condiciones ambientales adecuadas para el inicio de la sucesión de plantas (Varela y Albornoz, 2013). El alto poder germinativo de las semillas, la elevada frecuencia de individuos de clases diamétricas pequeñas (Guzmán, 2001) y el rápido crecimiento, promueven el reclutamiento de plántulas e individuos renovales en bosques bien iluminados y sitios alterados (Varela y Albornoz, 2013).

1.4.5. Antecedentes de estudios poblacionales en la especie

El estudio de los niveles de variabilidad genética, diversidad y estructura genética poblacional de *A. colubrina* var. *cebil* ha sido abordado desde diferentes enfoques empleando marcadores moleculares del genoma cloroplástico y del genoma nuclear.

A nivel del genoma cloroplástico, las poblaciones de *A. colubrina* var. *cebil* presentaron niveles reducidos de diversidad genética citoplasmática y una marcada estructuración genética, encontrándose variantes haplotípicas fijadas en algunas poblaciones de esta especie en las provincias fitogeográficas Paranaense y Yungas del Norte argentino (Barrandeguy *et al.*, 2011; Barrandeguy *et al.*, 2014). En cuanto a la distribución y la representatividad de la variabilidad genética cloroplástica analizada mediante marcadores cpPCR-RFLP y cpSSR, las poblaciones de la provincia Paranaense resultaron las más representativas de la variación genética total (Goncalves *et al.*, 2014).

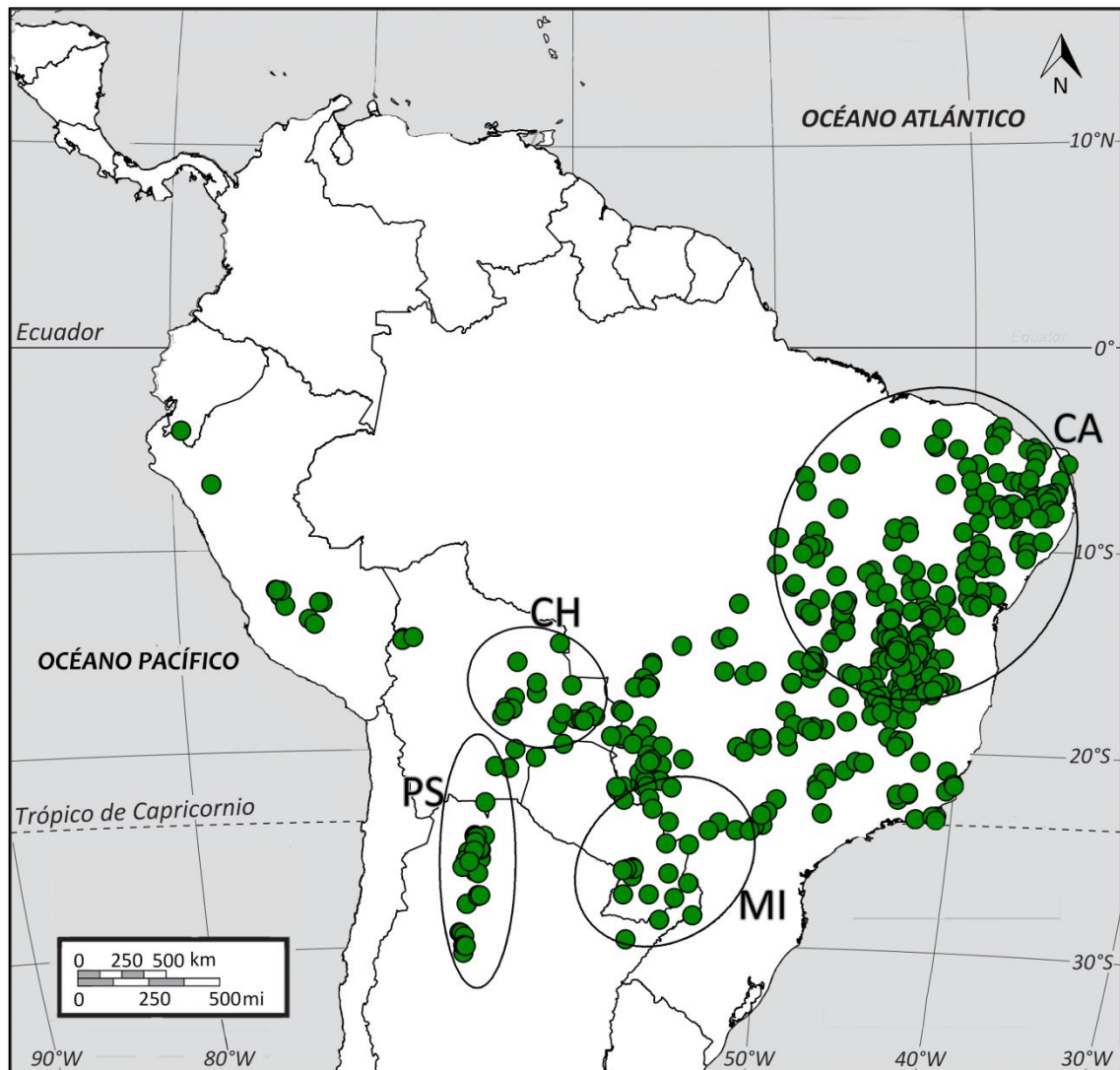


Figura 6. Distribución de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan en los Bosques Secos Estacionales Neotropicales (BSEN). Se indican los núcleos: Caatinga (CA), Misiones (MI), Chiquitanía (CH) y Pedemontano Subandino (PS).

Registros de la especie tomados de la base de datos DryFlor disponible en: <http://www.dryflor.info/data>.

La presencia de haplotipos ancestrales y de diversidad genética cloroplástica antigua en la provincia Paranaense explicarían la mayor diversidad y la menor estructuración genética de sus poblaciones, en relación a las poblaciones de la provincia de las Yungas, en las cuales la presencia de diferentes variantes haplotípicas fijadas, debido a la ausencia de flujo génico mediado por semillas y la acción de la deriva genética, indicaría procesos de colonización antiguos (Barrandeguy *et al.*, 2014). Además, en la provincia Paranaense, los haplotipos se corresponderían con una región estable del núcleo Misiones en tanto que, en las Yungas, la distribución de los haplotipos se correspondería con una región inestable del Núcleo Pedemontano Subandino de los BSEN (Barrandeguy *et al.*, 2016). Así, a nivel histórico la deriva genética ha tenido mayor relevancia que el flujo génico y la distribución contemporánea de los haplotipos en ambas regiones sería consecuencia de eventos demográfico-históricos (Barrandeguy *et al.*, 2014; Goncalves *et al.*, 2014).

Los análisis demográficos a partir de marcadores moleculares del genoma cloroplástico en *A. colubrina* var. *cebil* permitieron analizar el desarrollo histórico de los BSEN en Argentina desde diferentes escalas (Barrandeguy *et al.*, 2016). Desde una visión general, la fragmentación que condujo a la disyunción de estos bosques sería el principal evento demográfico-histórico, mientras que en cada núcleo los fragmentos poblacionales de *A. colubrina* var. *cebil* habrían desarrollado su propia historia demográfica de manera independiente (Barrandeguy *et al.*, 2016). A partir de estudios demográfico-históricos mediante secuencias de una región intrónica del genoma cloroplástico en poblaciones de *A. colubrina* var. *cebil* se detectó que las diferencias genéticas observadas resultarían de una divergencia histórica asociada a diferentes eventos de expansión-fragmentación ocurridos durante la evolución de los BSEN (Calonga Solís *et al.*, 2014; Barrandeguy *et al.*, 2016). Tal divergencia fue estimada entre los núcleos Misiones y Pedemontano Subandino y se posicionó temporalmente en el Pleistoceno tardío (Calonga Solís *et al.*, 2014) lo cual coincide con la teoría del Arco Pleistocénico propuesta por Prado y Gibbs (1993). De esta manera, la distribución contemporánea de haplotipos cloroplásticos de *A. colubrina* var. *cebil* retiene evidencias de la fragmentación histórica entre los núcleos de los BSEN reflejada en la marcada estructuración genética cloroplástica (Barrandeguy *et al.*, 2014). Las poblaciones del núcleo Pedemontano Subandino habrían experimentado una expansión posterior a su llegada a la región debido a la presencia de haplotipos raros, mientras que las poblaciones del núcleo Misiones habrían presentado estabilidad histórica dado los niveles de variación haplotípica de sus poblaciones (Barrandeguy *et al.*, 2016).

En las poblaciones fragmentadas de *A. colubrina* var. *cebil*, empleando marcadores SSR nucleares y cloroplásticos, los niveles de diversidad genética nuclear fueron mayores mientras que la estructuración genética poblacional fue menor en relación a lo detectado a nivel del genoma cloroplástico (Barrandeguy *et al.*, 2014). Esto se debe a las diferencias en el balance entre los roles del flujo génico y la deriva genética y a las diferencias en el tamaño efectivo en ambos genomas (Barrandeguy *et al.*, 2014). El impacto antrópico en la provincia Paranaense sería responsable de la mayor estructuración genética de sus poblaciones, en tanto que los niveles superiores de flujo génico entre las poblaciones de las Yungas habrían mantenido mayor diversidad y menor estructuración genética de sus poblaciones a nivel del genoma nuclear (Barrandeguy *et al.*, 2014).

Por su parte, Feres *et al.* (2012) detectaron una elevada diversidad genética nuclear y moderada estructura genética en poblaciones fragmentadas de *A. colubrina* por el avance de la frontera agrícola en el Sudeste de Brasil. En el Noroeste argentino, de Viana *et al.* (2014) detectaron similitudes entre árboles de diferentes regiones en base a caracteres morfológicos como “peso de frutos”, “peso de las semillas” y “viabilidad de las semillas” en poblaciones naturales de *A. colubrina* var. *cebil*, mientras que Ciaccio *et al.* (2017) caracterizaron la diversidad genética de las poblaciones estudiadas por de Viana *et al.* (2014) mediante el análisis de la variación a nivel de secuencia en regiones de ADN ribosómico. El alto grado de polimorfismo a nivel de las secuencias ITS-ADNr y las distancias genéticas detectadas entre regiones podrían ser consecuencia del posible aislamiento entre las poblaciones estudiadas en la provincia de Salta y la acción de la deriva genética a escala local (Ciaccio *et al.*, 2017). Sin embargo, en el Norte argentino, la variación fenotípica de las poblaciones de *A. colubrina* var. *cebil* no evidenció reducción de los valores fenotípicos medios indicando ausencia de depresión por endogamia para los caracteres poligénicos analizados, bajos niveles de coancestría y elevados tamaños efectivos poblacionales (Mazo *et al.*, 2014).

Además, una elevada variabilidad genética fue detectada en un análisis conjunto de caracteres moleculares y cuantitativos. Las poblaciones de las Yungas, localizadas en áreas protegidas, presentaron mayor diversidad genética que las poblaciones de la provincia Paranaense, las cuales se verían más afectadas por el impacto antrópico (García *et al.*, 2014). Sin embargo, las poblaciones de la provincia Paranaense presentaron elevada variabilidad fenotípica y un mayor número promedio de semillas por fruto, lo cual constituye información relevante en la aplicación de estrategias de manejo y recuperación de bosques en la provincia Paranaense (García *et al.*, 2014).

Por ello, mediante el presente trabajo se evalúan los niveles y patrones actuales de diversidad genética y su origen en un fragmento poblacional de *A. colubrina* var. *cebil* localizado al Sur de Misiones en la provincia fitogeográfica Paranaense, donde los bosques nativos se caracterizan por presentar diferentes grados de fragmentación. En particular, el presente estudio aborda el análisis de la estructura genética espacial a escala fina de individuos adultos y renovales de esta especie, con miras a detectar la influencia de posibles cambios recientes en la configuración del paisaje sobre la estructura genética en un contexto espacial explícito. Así, a partir de la inferencia de los procesos microevolutivos y de los eventos demográficos recientes e históricos subyacentes a los posibles patrones de estructura genética, se busca comprender la distribución espacial de la variación genética en un fragmento poblacional de *A. colubrina* var. *cebil* en bosques fragmentados.

Hipótesis y Objetivos



2. HIPÓTESIS

La estructura genética espacial a escala fina, es decir la disminución del parentesco entre pares de individuos con el incremento de la distancia que los separa, es consecuencia de una compleja interrelación entre procesos microevolutivos, eventos demográficos, sistemas de fecundación y dispersión, los cuales operan de manera concertada dando forma a la distribución espacial de la variación genética dentro de las poblaciones naturales.

El presente estudio pretende dar respuesta a las siguientes preguntas:

- ¿Se refleja la fragmentación del paisaje del Sur de Misiones en la estructuración genética de un fragmento poblacional de *A. colubrina* var. *cebil*?
- ¿Existen diferencias en la estructuración genética poblacional de *A. colubrina* var. *cebil* entre estadios?
- ¿Es posible detectar evidencias genéticas de cambios demográficos recientes en un fragmento poblacional de *A. colubrina* var. *cebil*?

Mientras que la hipótesis de trabajo establece que el fragmento poblacional estudiado de *A. colubrina* var. *cebil* presenta estructura genética espacial.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Evaluar la estructura genética espacial en un fragmento poblacional de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* en paisajes fragmentados del Sur de Misiones.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar la diversidad genética de un fragmento poblacional de *A. colubrina* var. *cebil*.
- Analizar la estructura genética poblacional en individuos adultos y en renovales como estrategia para determinar posibles cambios temporales en la misma.
- Caracterizar la estructura genética espacial a escala fina de un fragmento poblacional de *A. colubrina* var. *cebil*.
- Determinar el tamaño de vecindario e identificar la posible direccionalidad del intercambio alélico.
- Identificar la posible ocurrencia de eventos demográficos recientes que influyan sobre la estructura genética espacial en un fragmento poblacional de *A. colubrina* var. *cebil*.

Materiales y Métodos



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Área de estudio: Reserva Campo San Juan

El presente trabajo se desarrolló en la Reserva Campo San Juan (CSJ) localizada en el núcleo Misiones de los Bosques Secos Estacionales Neotropicales. La reserva se encuentra ubicada en el municipio de Santa Ana, departamento de Candelaria, al Sur de la provincia de Misiones (27°25'S, 55°38'O) (Figura 7a). El predio queda delimitado hacia el Noroeste por el río Paraná; hacia el Noreste y Sudoeste por los arroyos Santa Ana y San Juan, respectivamente; y hacia el Sudeste por la Ruta Nacional N°12 (Figura 7b). Abarca una superficie aproximada de 5.160ha. Actualmente se encuentra en proceso de transición entre la gestión como reserva compensatoria de la Entidad Binacional Yacyretá (EBY) y la Administración de Parques Nacionales (APN).

Desde un punto de vista fitogeográfico, según la clasificación propuesta por Cabrera (1971), la reserva CSJ se encuentra dentro del Dominio Amazónico, en la Provincia Fitogeográfica Paranaense, en la zona límite entre el Distrito de las Selvas Mixtas y el Distrito de los Campos en el Noreste argentino (Falguera *et al.*, 2015). En tanto que, desde un punto de vista fisonómico, considerando las unidades de paisaje (geomorfología, hidrología, suelos y vegetación) y en función de variables climáticas, de biodiversidad y de características ecológicas, la reserva CSJ se ubica dentro de la ecorregión Campos y Malezales (Burkart *et al.*, 1999; Brown y Pacheco, 2006), la cual se caracteriza por la presencia de pastizales de lomada o bajos, a menudo formando un paisaje de sabana en zonas de contacto con la selva paranaense (Burkart *et al.*, 1999) (Figura 7d).

Aproximadamente el 90% de la reserva está cubierto por pastizales y bosques nativos en similares proporciones, mientras que los humedales se encuentran asociados principalmente con el Río Paraná y los arroyos Santa Ana y San Juan (Falguera *et al.*, 2015). La temperatura media anual es de alrededor de 20-22°C, mientras que la precipitación media anual es de aproximadamente 1.300-1.800mm por año (Viglizzo *et al.*, 2006). Los suelos son bien drenados, ácidos, con baja dotación de nutrientes en tanto que el clima es cálido y húmedo, con precipitaciones durante todo el año. El área de estudio, dentro de la reserva CSJ, comprendió un parche de bosque en el centro del paisaje fragmentado que se extiende dentro de la matriz de pastizales (Figura 7c).

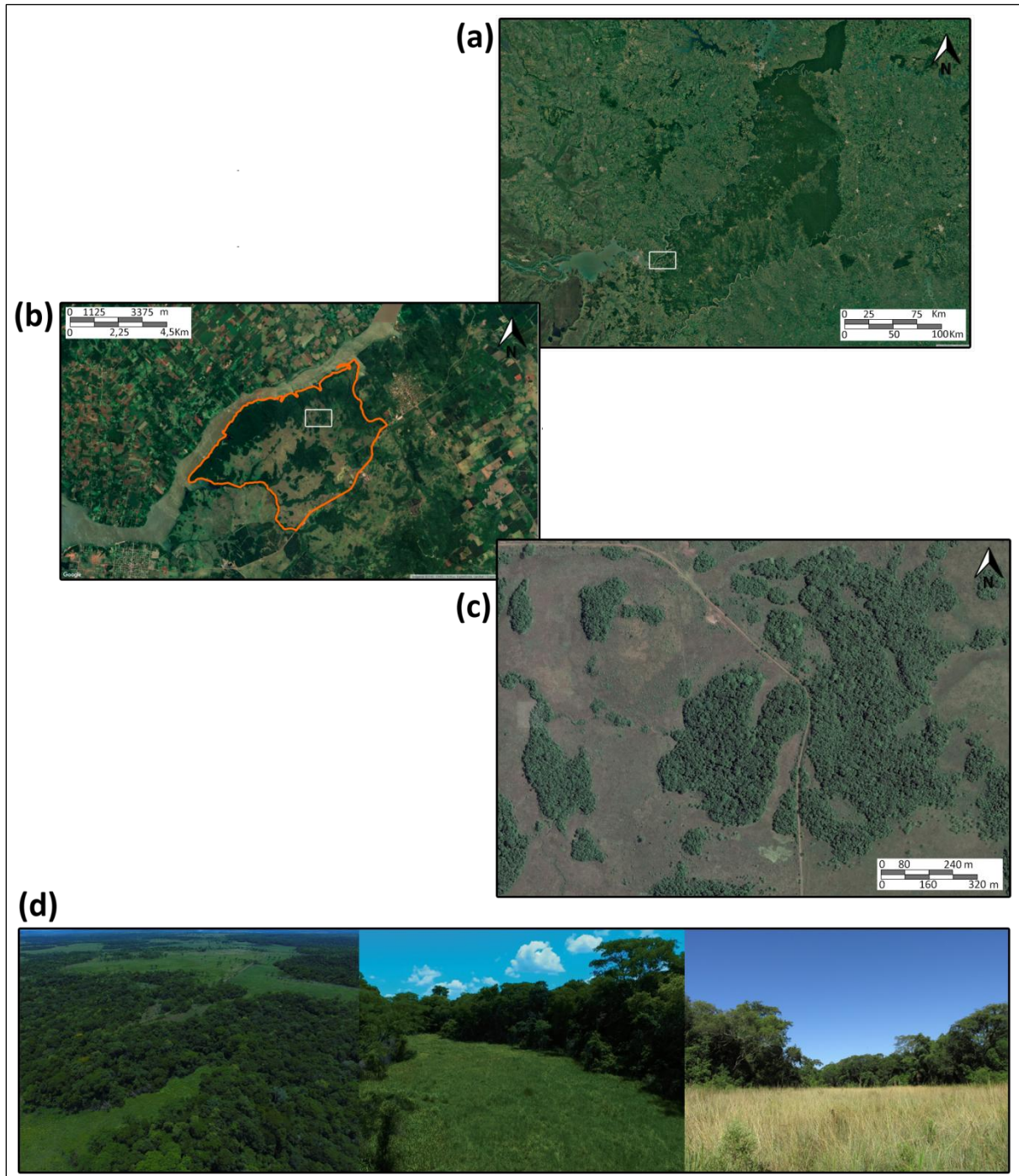


Figura 7. Reserva Campo San Juan. a) Ubicación de la reserva en la provincia de Misiones, b) delimitación de la reserva, c) fragmento de bosque estudiado y d) paisaje del área de estudio.

4.2. Sistema de estudio y metodología de muestreo

El área de estudio abarcó una superficie de ~20ha, donde los individuos de *A. colubrina* var. *cebil* conforman el estrato arbóreo junto con *Myracrodruon balansae* (urunday), *Handroanthus heptaphyllus* (lapacho negro), *Cedrela fissilis* (cedro misionero), *Peltophorum dubium* (yvyrá-pytá) y *Parapiptadenia rigida* (anchico). El fragmento seleccionado presentó una distribución y densidad de individuos adecuada para la evaluación de la estructura genética espacial a escala fina.

En el fragmento estudiado se trazaron cuatro transectas paralelas en dirección Sudoeste-Noreste. Las transectas presentaron, aproximadamente, 340m de longitud x 50m de ancho, separadas entre sí por 50m. De esta manera, el fragmento de bosque fue dividido en 4 unidades de muestreo de ~1,7ha, dispuestas en parcelas rectangulares no solapadas. Se aplicó un método de muestreo sistemático para obtener una distribución uniforme de las unidades de muestreo (Scott, 1998) dada la distribución espacial agrupada de los individuos. La toma de muestras se realizó entre Octubre de 2014 y Marzo de 2015 considerando el período de foliación.

En las transectas se colectaron hojas jóvenes de la totalidad de adultos (Figura 8a) y de ~60% de renovales, es decir individuos jóvenes con una altura mínima de 70cm (Figura 8b). Se colectó material de 119 individuos, de los cuales 60 fueron adultos y 59 renovales (Figura 9). Todos los individuos fueron localizados con sus datos de geoposición por medio del Sistema de Posicionamiento Global (*Global Positioning System* - GPS) e identificados mediante un código individual según transecta, estadio y número de individuo (Tabla 1). En condiciones de campo, se midieron diámetro a 1,30m de altura o diámetro a altura de pecho (DAP) para cada uno de los adultos y altura total (AT) de los renovales. Estos datos morfométricos fueron tomados como variables de interés, dado que permiten obtener una aproximación a la variación en edades de los individuos considerados. En base a los valores de DAP y las tasas de incremento anual estimadas por de Mattos y Seitz (2005) para *A. colubrina* var. *cebil*, se estableció que los individuos adultos presentan aproximadamente entre 50 y 70 años de edad. En tanto que, por la altura de los renovales, se estableció que la mayoría constituyen un mismo pulso de regeneración presentando alrededor de un año de edad.

Las muestras de cada individuo se conservaron en bolsas herméticas conteniendo cloruro de sodio (ClNa) hasta su posterior procesamiento en el laboratorio, siguiendo el protocolo de conservación propuesto por Carrió y Roselló (2013).



Figura 8. Vista de ejemplares a) adultos y b) renovales de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* en la Reserva Campo San Juan.

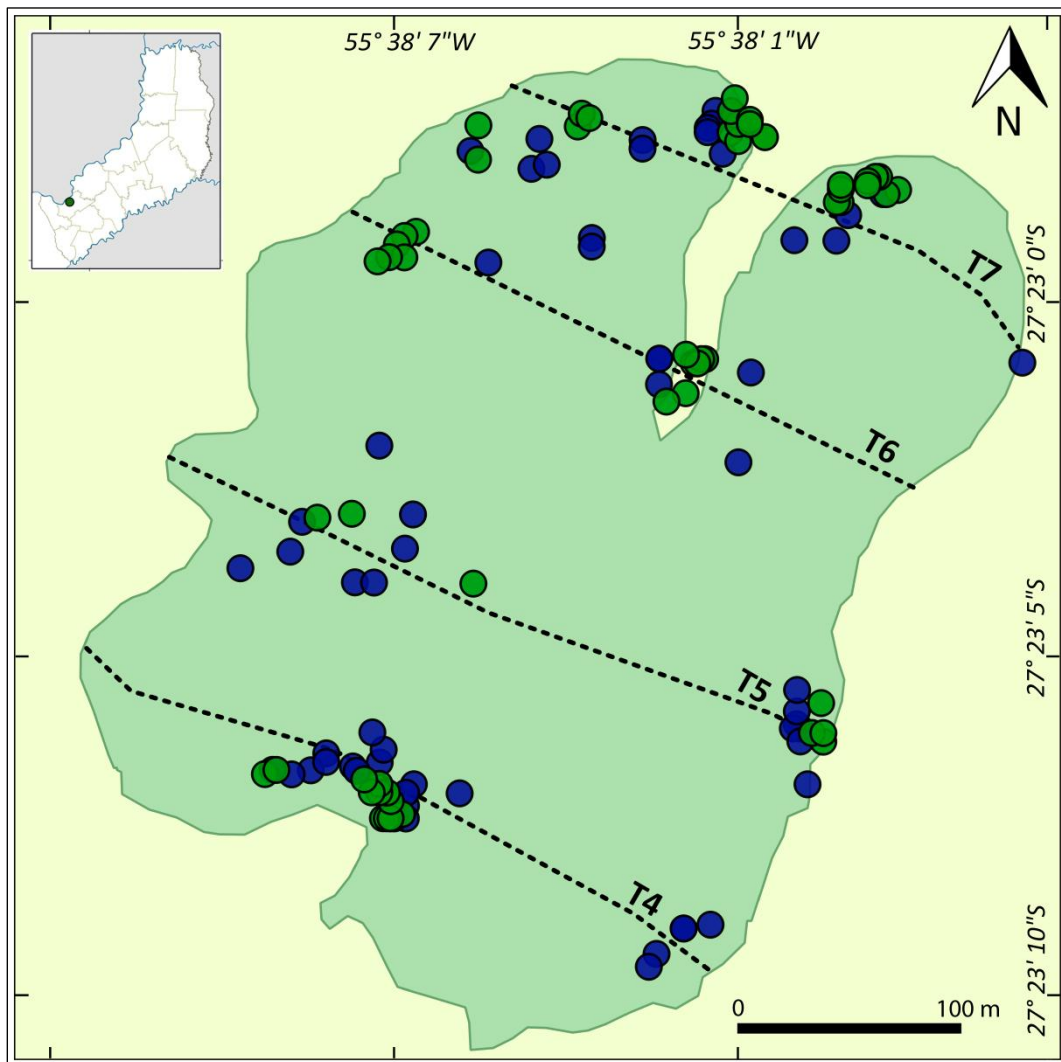


Figura 9. Individuos adultos (●) y renovales (●) a lo largo de las cuatro transectas definidas en el fragmento estudiado en la reserva Campo San Juan. Se indican las transectas T4, T5, T6 y T7.

Tabla 1. Geoposición de los individuos adultos y renovales a lo largo de las transectas en la reserva Campo San Juan.

	Individuo	Longitud	Latitud	Altitud (m)		Individuo	Longitud	Latitud	Altitud (m)
1	T4A1	-55,6339500	-27,3858830	154	61	T4R1	-55,635183	-27,385450	146
2	T4A2	-55,6339500	-27,3858830	154	62	T4R2	-55,635267	-27,385467	148
3	T4A3	-55,6338330	-27,3858670	145	63	T4R3	-55,635233	-27,385467	144
4	T4A4	-55,6340670	-27,3859830	149	64	T4R4	-55,635250	-27,385467	144
5	T4A5	-55,6341000	-27,3860333	149	65	T4R5	-55,635233	-27,385467	145
6	T4A6	-55,6351667	-27,3854167	146	66	T4R6	-55,635233	-27,385400	147
7	T4A7	-55,6354000	-27,3852667	145	67	T4R7	-55,635250	-27,385367	145
8	T4A8	-55,6349333	-27,3853667	145	68	T4R8	-55,635283	-27,385367	143
9	T4A9	-55,6351667	-27,3854667	148	69	T4R9	-55,635283	-27,385333	142
10	T4A10	-55,6351333	-27,3853333	151	70	T4R10	-55,635317	-27,385367	146
11	T4A11	-55,6351667	-27,3853667	143	71	T4R12	-55,635350	-27,385317	147
12	T4A12	-55,6352167	-27,3854667	140	72	T4R13	-55,635783	-27,385300	148
13	T4A13	-55,6352833	-27,3852500	147	73	T4R14	-55,635733	-27,385283	147
14	T4A14	-55,6352667	-27,3852000	146	74	T5R1	-55,633361	-27,385000	147
15	T4A15	-55,6353167	-27,3851333	145	75	T5R2	-55,633350	-27,385150	151
16	T4A16	-55,6353833	-27,3852833	150	76	T5R3	-55,633400	-27,385117	147
17	T4A17	-55,6355167	-27,3852167	142	77	T5R4	-55,633350	-27,385117	154
18	T4A18	-55,6355833	-27,3852833	139	78	T5R5	-55,635567	-27,384300	140
19	T4A19	-55,6356667	-27,3853000	139	79	T5R6	-55,634883	-27,384550	143
20	T4A20	-55,6355167	-27,3852500	146	80	T5R7	-55,635417	-27,384283	145
21	T4A21	-55,6357500	-27,3852833	148	81	T6R1	-55,633967	-27,383800	132
22	T5A1	-55,6334500	-27,3851000	160	82	T6R2	-55,634050	-27,383833	141
23	T5A2	-55,6334667	-27,3850833	158	83	T6R3	-55,635150	-27,383183	134
24	T5A3	-55,6334833	-27,3851000	154	84	T6R4	-55,635200	-27,383200	139
25	T5A4	-55,6334667	-27,3850333	152	85	T6R5	-55,635233	-27,383233	141
26	T5A5	-55,6340833	-27,3836667	152	86	T6R6	-55,635200	-27,383283	136
27	T5A6	-55,6334667	-27,3849500	155	87	T6R7	-55,635267	-27,383283	139
28	T5A7	-55,6334500	-27,3851500	159	88	T6R8	-55,635317	-27,383300	140
29	T5A8	-55,6334167	-27,3853167	156	89	T6R9	-55,633933	-27,383683	140
30	T5A9	-55,6354000	-27,3845500	142	90	T6R10	-55,633917	-27,383700	141
31	T5A10	-55,6353167	-27,3845500	149	91	T6R11	-55,633883	-27,383667	155
32	T5A11	-55,6351500	-27,3842833	148	92	T6R12	-55,633900	-27,383667	151
33	T5A12	-55,6351833	-27,3844167	149	93	T6R13	-55,633917	-27,383683	152
34	T5A13	-55,6356833	-27,3844333	136	94	T6R14	-55,633967	-27,383650	140
35	T5A14	-55,6356333	-27,3843167	159	95	T7R1	-55,633050	-27,383000	170
36	T6A1	-55,6353000	-27,3840170	147	96	T7R2	-55,633100	-27,383017	144
37	T6A2	-55,6337333	-27,3840667	156	97	T7R3	-55,633133	-27,382950	136
38	T6A3	-55,6336833	-27,3837167	151	98	T7R4	-55,633150	-27,382950	141
39	T6A4	-55,6340833	-27,3837667	160	99	T7R5	-55,633183	-27,382967	144
40	T6A5	-55,6340833	-27,3836667	147	100	T7R6	-55,633183	-27,382983	141
41	T6A6	-55,6348333	-27,3833000	143	101	T7R7	-55,633300	-27,383050	144
42	T7A1	-55,6325000	-27,3836667	147	102	T7R8	-55,633317	-27,383050	145
43	T7A2	-55,6331167	-27,3830167	170	103	T7R9	-55,633300	-27,383000	147
44	T7A3	-55,6333167	-27,3832000	145	104	T7R10	-55,633300	-27,382983	146
45	T7A4	-55,6332667	-27,3831000	145	105	T7R11	-55,634883	-27,382767	137
46	T7A5	-55,6335000	-27,3832000	144	106	T7R12	-55,634883	-27,382900	134
47	T7A6	-55,6349167	-27,3828667	142	107	T7R13	-55,634450	-27,382767	141
48	T7A7	-55,6346500	-27,3829333	156	108	T7R14	-55,634433	-27,382717	145
49	T7A8	-55,6345833	-27,3829167	141	109	T7R15	-55,634400	-27,382733	148
50	T7A10	-55,6346167	-27,3828167	151	110	T7R16	-55,633783	-27,382783	148
51	T7A12	-55,6341667	-27,3828167	148	111	T7R17	-55,633750	-27,382817	142
52	T7A13	-55,6341667	-27,3828500	149	112	T7R18	-55,633767	-27,382717	150
53	T7A15	-55,6339000	-27,3827500	143	113	T7R19	-55,633750	-27,382750	149
54	T7A16	-55,6338500	-27,3827000	147	114	T7R20	-55,633783	-27,382700	147
55	T7A17	-55,6338667	-27,3827500	149	115	T7R21	-55,633767	-27,382650	155
56	T7A18	-55,6343833	-27,3832000	152	116	T7R22	-55,633633	-27,382800	142
57	T7A19	-55,6343833	-27,3832333	153	117	T7R23	-55,633633	-27,382800	145
58	T7A20	-55,6338833	-27,3827667	147	118	T7R24	-55,633700	-27,382733	150
59	T7A21	-55,6338833	-27,3827833	136	119	T7R25	-55,633700	-27,382750	146
60	T7A22	-55,6338167	-27,3828667	145					

Se indican los individuos ordenados por estadio y transecta. T: Transecta; A: Adultos; R: Renovales.

4.3. Genotipificación de los individuos

Se genotipificó a la totalidad de los individuos mediante el uso de marcadores moleculares del tipo microsatélites. Los microsatélites se caracterizan por ser secuencias de ADN simples con una evolución compleja (Ellegren, 2004). Se trata de secuencias simples repetitivas (*Simple Sequence Repeat* - SSR) ampliamente representadas en el genoma de los organismos eucariotas (Tautz y Renz, 1984). Los *loci* SSR se encuentran tanto en el genoma nuclear como en los genomas citoplásmicos (Tautz y Renz, 1984) permitiendo evaluar los patrones de variación genética dentro y entre poblaciones (Finkeldey y Hattermer, 2007) y detectar la acción de procesos microevolutivos y eventos demográficos que operan o han operado sobre las poblaciones a través del tiempo y el espacio (Templeton, 2006).

Los SSR se localizan, generalmente, en regiones de ADN no codificante como las regiones intergénicas o intrónicas, por lo cual se asume que la variación ocurre por evolución neutral (diRienzo *et al.*, 1994). Por esta razón los SSR se han convertido, probablemente, en uno de los marcadores moleculares más ampliamente utilizados en la detección de polimorfismos, siendo uno de los tipos de secuencias de ADN más variables del genoma (Ellegren, 2004).

Cada locus SSR consiste en motivos cortos de ADN repetidos (en general, di- tri- o tetranucleotídicos) dispuestos en *tándem*. El polimorfismo en los SSR deriva principalmente de la variabilidad en la longitud más que en la secuencia primaria, presentando variación en el número de repeticiones, lo cual da lugar a un elevado número de alelos distinguibles dentro de una población (Awise, 2004). La característica de marcadores hipervariables está dada por el proceso mutacional. Se han planteado una serie de modelos mutacionales para explicar la dinámica evolutiva de los SSR (Ellegren, 2004), cuya amplia mayoría deriva del modelo mutacional por pasos (*stepwise mutation model* - SMM) propuesto por Ohta y Kimura (1973). Este modelo postula que una mutación altera la longitud de los SSRs a través de la adición o remoción de una unidad repetitiva a una tasa fija, siendo los pasos aleatorios independientes de la longitud de la unidad (Ellegren, 2004). Por esta razón, las secuencias de ADN resultantes pueden presentar un número de unidades de repetición distinto a las secuencias parentales (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Por otro lado, el modelo de alelos infinitos (*infinite allele model* - IAM) postula que cada evento mutacional crea un alelo nuevo que no estaba presente en la población (Kimura, 1971). Los modelos IAM y SMM constituyen los extremos de un rango de posibles modelos mutacionales (Chakraborty y Jin, 1992). Por su parte, el modelo TPM (*two-phase model*) se basa en la combinación de

dos tipos de SMM: Un modelo simple que solo implica cambios de un paso y un modelo que implica cambios de varios pasos (Ellegren, 2004). Para estudios basados en SSRs, cobra relevancia el modelo mutacional que mejor explique la variación en los *loci* analizados, debido a que ciertos estadísticos que parten de estimaciones de las frecuencias alélicas dependen de un modelo mutacional explícito (Selkoe y Toonen, 2006). Además, para el análisis de datos SSRs se debe considerar que la presencia de mutaciones en las regiones flanqueantes a las unidades repetitivas, en los sitios de unión de los cebadores, puede dar lugar a alelos nulos, es decir amplificación de solo uno de los alelos del locus.

4.3.1. Extracción de ADN

Se extrajo ADN genómico total a partir de hojas deshidratadas mediante el protocolo de extracción ROSE (*Rapid One-Step Extraction*) (Steiner *et al.*, 1995) modificado por García MV *et al.* (2007).

El material fue molido de manera mecánica con la adición de Nitrógeno líquido. La extracción se inició a partir de 10mg de tejido molido, al cual se añadió 600µl de *buffer* de extracción ROSE precalentado a 60°C. Este *buffer* está compuesto por: 10mM de Tris-HCl pH 8; 312,5mM de EDTA, 1% SDS, 1% PVP y 0,7% β-Mercaptoetanol (Steiner *et al.*, 1995). Se incubó el material en el *buffer* de extracción a 90°C durante 20 min, mezclando con *vortex* a los 10 min del inicio de la incubación. Se colocó la mezcla en hielo durante 5 min y posteriormente se centrifugó a velocidad máxima durante 10 min. Se tomó la fase acuosa o sobrenadante, la cual fue trasvasada a otro tubo.

Se realizaron dos lavados del sobrenadante con Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico (25:24:1), cada uno seguido de centrifugación a velocidad máxima durante 5 min. Posteriormente, se realizó un lavado con Cloroformo, luego del cual se centrifugó la mezcla a velocidad máxima durante 10 min. Estos lavados con solventes orgánicos desnaturalizan las proteínas y las separan del ADN.

Se precipitó el ADN con un volumen de Alcohol Isopropílico y 10% de Acetato de Sodio 3M (Sambrook y Russell, 2001) durante 8 h a -20°C. Luego, se centrifugó a velocidad máxima durante 20 min, se descartó el sobrenadante y se procedió al lavado del precipitado de ADN con Etanol 70%. Finalmente, el precipitado se resuspendió en TE 1X a pH 8. La calidad del ADN extraído se verificó en geles de agarosa al 1% y se lo semicuantificó empleando diferentes concentraciones de ADN del fago λ (5, 10, 25 y 50ng/µl) como patrón.

4.3.2. Obtención de amplicones y genotipificación

Se emplearon ocho *loci* SSR nucleares específicos para *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*: Ac34.3, Ac48.1, Ac11.2, Ac28.3, Ac157.1, Ac41.1, Ac172.1 y Ac162.1 (Barrandeguy *et al.*, 2012) (Tabla 2). Los SSRs fueron amplificados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la obtención de los amplicones fue verificada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%. Las condiciones de amplificación descritas en Barrandeguy *et al.* (2012) fueron modificadas en el presente trabajo para la incorporación del cebador universal marcado con fluorescencia, necesario para la genotipificación de los individuos.

Para la genotipificación se empleó un sistema de tres cebadores (Steffen *et al.*, 1993) como método alternativo al método de genotipificación convencional, el cual emplea un cebador marcado con un fluoróforo por locus SSR. La técnica de genotipificación mediante el sistema de tres cebadores se basa en la incorporación de la secuencia complementaria a un cebador universal en los productos de amplificación específicos y el empleo de un único cebador universal marcado con fluorescencia (Oetting *et al.*, 1995) es decir que de los tres cebadores, dos son específicos del genoma estudiado flanqueantes a la región de ADN repetitivo (*forward* y *reverse*), mientras que el tercero es inespecífico y se encuentra marcado con un fluoróforo. En el procedimiento de síntesis de cebadores, se incorpora la secuencia nucleotídica del cebador M13 (18pb) al extremo 5' de uno de los cebadores SSR específicos y se incorpora el cebador universal M13 marcado con un fluoróforo en su extremo 5' (Figura 10).

Es condición necesaria para el éxito del sistema de tres cebadores el empleo de diferentes temperaturas de hibridación para los cebadores SSR específicos y el cebador universal. Sumado a ello, debido a la posible existencia de homologías entre los cebadores M13 y el genoma de la especie de estudio, así como la elevada probabilidad de formación de dímeros entre cebadores, se recomienda la adición de los cebadores universales marcados inmediatamente antes de los ciclos finales de hibridación para reducir la amplificación inespecífica (Arruda *et al.*, 2010).

Se efectuó la puesta a punto del sistema de tres cebadores para la genotipificación de *A. colubrina* var. *cebil*, para lo cual, inicialmente se testaron las probabilidades de formación de dímeros y bucles entre y dentro de cada uno de los tres cebadores por reacción (Tabla 2), empleando el programa AutoDimer (Vallone y Butler, 2004) disponible en:

<https://strbase.nist.gov/AutoDimerHomepage/AutoDimerProgramHomepage.htm>.

Mediante este análisis se determinaron los posibles tipos de interacción cebador-

Tabla 2. Descripción de los marcadores SSR específicos para *A. colubrina* var. *cebil* analizados.

Locus	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Motivo de repetición	Tamaño (bp)	T_A (°C)
Ac34.3	M13-F: <u>tgtaaaacgacggccagt</u> ccattctacaacacgcaagtg R: cctccaattctccaactcc	(CT) ₂₁ (GT) ₃	171-203	TD 61 - 55°C
Ac172.1	M13-F: <u>tgtaaaacgacggccagt</u> tctaaattacgtggagaaaacgaa R: tgacaggacctcaccatgt	(A) ₅ G(A) ₄ (CT) ₁₉	87-122	
Ac48.1	M13-F: <u>tgtaaaacgacggccagt</u> gagaccaaccacacagagt R: ggtgtaattccataactctctctctg	(GA) ₃₀	129-171	TD 59 - 55°C
Ac11.2	M13-F: <u>tgtaaaacgacggccagt</u> caagcgttctctgatatttattg R: ttgccatttcttatttagtatga	(GT) ₁₁	110-124	
Ac28.3	M13-F: <u>tgtaaaacgacggccagt</u> gagcagccatgtttggagta R: cccacttctgccttgctatt	(GAA) ₄ X ₃₅ (GA) ₂₅	207-277	65°C
Ac157.1	M13-F: <u>tgtaaaacgacggccagt</u> ccaccctccattttatttatct R: cagaaagaaaccacggcaac	(CT) ₁₅ (CA) ₃ (CT) ₆ (CA) ₁₀	106-201	
Ac41.1	M13-F: <u>tgtaaaacgacggccagt</u> acgagctccacattcatgc R: gagccagtttcgtttgaagg	(TC) ₁₀ (AC) ₇	125-158	TD 63 - 55°C
Ac162.1	M13-F: <u>tgtaaaacgacggccagt</u> tgtatgtgtgaatatggaagttgc R: gcagtgcattgtgaccacctt	(GA) ₂₄	114-170	
(*)-M13	(*)-tgtaaaacgacggccagt			

Se indica subrayada la secuencia M13 en los cebadores M13-*forward*; (*): Fluoróforo FAM/HEX; T_A : Temperatura de hibridación; TD: *Touchdown*

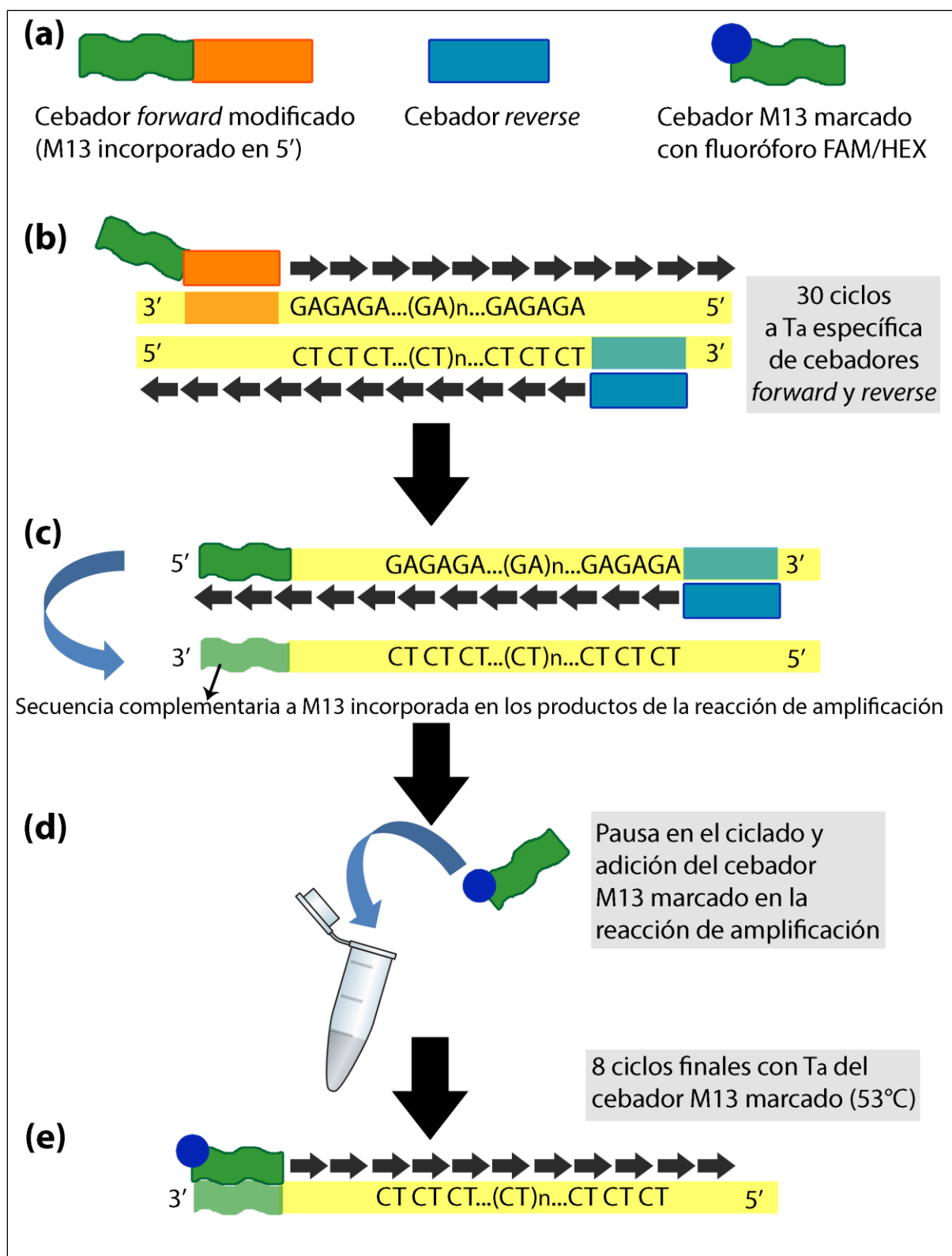


Figura 10. Método de genotipificación mediante el sistema de tres cebadores. a) cebadores empleados; b) delimitación del amplicón; c) amplicón obtenido con la incorporación de la secuencia complementaria al cebador M13; d) adición del cebador M13 marcado a la mezcla de reacción; e) obtención del amplicón etiquetado con el fluoróforo. Adaptado desde Arruda *et al.* (2010).

cebador. La aplicabilidad del sistema de tres cebadores fue verificada considerando siete como valor umbral, según lo recomendado por Vallone y Butler (2004). La puntuación de cada par de cebadores analizados se determinó mediante la sumatoria del número de pares de bases con alta probabilidad de formación de puentes de hidrógeno por complementariedad de bases (+1) y el número de pares de bases que no participarían de la interacción (-1), considerando todas las combinaciones posibles (Vallone y Butler, 2004).

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 14µl empleando 0,5ng/µl de ADN genómico; 1x de *buffer* Hot Start; 2,5mM de Cl₂Mg; 0,175mM de cada dNTP; 0,75U de enzima ADN polimerasa Hot Start; 0,20pmol de cebador M13-*forward*; 0,33pmol de cebador *reverse* y 0,33pmol de cebador universal M13 marcado con un fluoróforo FAM (azul) o HEX (verde). Los cebadores *forward*, *reverse* y M13 se utilizaron en una proporción 0,6:1,0:1,0 respectivamente. La importancia de que los cebadores *forward* se encuentren en menor concentración radica en que son fragmentos largos de ADN los cuales presentan mayor probabilidad de formar dímeros o bucles.

Las condiciones de ciclado se realizaron en dos etapas: 30 ciclos empleando la temperatura de hibridación (T_A) específica de los cebadores SSR y 8 ciclos empleando la T_A del cebador universal M13 (Tabla 3). Se procedió a la adición de los cebadores M13 marcados antes del inicio de los últimos ocho ciclos. Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un termociclador con gradiente de temperatura (Biometra TProfessional Standard) empleando programas de tipo *touchdown* ($\Delta T_A = -1^\circ\text{C}/\text{ciclo}$) o a temperatura de hibridación fija dependiendo del locus SSR (Tabla 2; Tabla 3).

Los productos de amplificación fueron resueltos en geles de agarosa al 1,5% teñidos con Gel Red[®] y se verificó que los tamaños de los fragmentos amplificados se correspondieran con el rango esperado mediante comparación con un marcador de peso molecular de 100pb como referencia.

La genotipificación de todos los individuos se llevó a cabo por medio de electroforesis capilar. Los diferentes alelos fueron identificados a partir del tamaño de los fragmentos, el cual fue asignado empleando un secuenciador analizador de fragmentos ABI Prism[®] 3100 (Applied Biosystems) mediante el empleo del programa PeakScanner[™] v1.0 (Applied Biosystems[®]) y un marcador de peso estándar 400HD-ROX[™] (Applied Biosystems[®]). Además, se realizó co-electroforesis de los productos de amplificación combinando dos o tres sistemas de cebadores con variantes alélicas no solapadas y/o marcadas con distintos fluoróforos.

Tabla 3. Condiciones de amplificación de los ocho *loci* SSR específicos de *A. colubrina* var. *cebil*.

(a)	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de Ciclos
Desnaturalización inicial	95	4 min	
Desnaturalización	95	45 seg	Nº ciclos =
Hibridación	$\Delta T_A = -1^\circ\text{C}/\text{ciclo}$	30 seg	Nº de diferentes
Extensión	72	45 seg	temperaturas del rango ΔT_A
Desnaturalización	95	45 seg	c.s.p. un total de 30 ciclos
Hibridación	Menor T_A del rango ΔT_A	30 seg	
Extensión	72	45 seg	
Desnaturalización	95	45 seg	8 ciclos
Hibridación	53	30 seg	
Extensión	72	45 seg	
Extensión final	72	20 min	

(b)	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de Ciclos
Desnaturalización inicial	95	4 min	
Desnaturalización	95	45 seg	30 ciclos
Hibridación	T_A	30 seg	
Extensión	72	45 seg	
Desnaturalización	95	45 seg	8 ciclos
Hibridación	53	30 seg	
Extensión	72	45 seg	
Extensión final	72	20 min	

Se indican las condiciones de amplificación: a) tipo *touchdown* y b) temperatura de hibridación (T_A) fija.

4.4. Caracterización de la diversidad genética de adultos y renovales

Los patrones de diversidad genética poblacional son el resultado de la acción conjunta de los procesos microevolutivos y los eventos demográfico-históricos (Hartl y Clark, 2007). Para caracterizar la diversidad genética, inicialmente se realizó una prueba global de déficit de heterocigotas entre *loci* en la población estudiada, para detectar desvíos del equilibrio de Hardy-Weinberg (*Hardy-Weinberg Equilibrium* - HWE) con los siguientes parámetros: dememorización = 10.000; lotes = 100; iteraciones = 5.000, empleando el programa GENEPOP 4.2.2 (Rousset, 2008) disponible en: <http://genepop.curtin.edu.au/>.

Los alelos nulos son frecuentes en el análisis de *loci* marcadores microsatélites (Avisé, 2004) y, dado que pueden conducir a una subestimación de los niveles de heterocigosis, cobra relevancia identificar su presencia y frecuencia para diversos análisis genético-poblacionales, así como despejar sus efectos de las causas biológicas de las desviaciones del HWE (van Oosterhout *et al.*, 2006, Wagner *et al.*, 2006; Chapuis y Estoup, 2007). Chakraborty *et al.* (1994) y Brookfield (1996), desarrollaron métodos para estimar la frecuencia de alelos nulos a partir de un aparente déficit de heterocigosis. La frecuencia de alelos nulos (r) fue estimada mediante la ecuación de Brookfield (1996), en la cual, a diferencia de la ecuación de Chackraborty (1992), la detección de datos perdidos por la ausencia de amplificación de los *loci* marcadores en los individuos genotipificados, es considerada en la estimación, maximizándose la probabilidad de heterocigotas y homocigotas aparentes.

Dada una proporción N de la muestra que corresponde al número de individuos homocigotas aparentes con un alelo nulo, la sumatoria de las frecuencias alélicas \hat{p}_i para los alelos detectados no será igual a uno, sino a $1 - N$. Luego, la heterocigosis esperada (H_E), puede ser calculada como:

$$H_E = \sum_{i \neq j} \hat{p}_i \hat{p}_j / (1 - N)^2$$

mientras que la heterocigosis observada (H_O), corresponde al número de heterocigotas detectados en la muestra, dividido por el tamaño total de la muestra.

Se define entonces $A = H_E(1 + N) - H_O$, y $B = 4N(1 - H_E^2)$, para estimar la máxima verosimilitud de r , la cual queda definida como:

$$r = \frac{A + \sqrt{A^2 + B}}{2(1 + H_E)}$$

Si $N = 0$, la ecuación anterior será equivalente a: $r = (H_E - H_O)/(1 + H_E)$ (Brookfield, 1996). Los dos métodos de estimación de r , asumen que el déficit de heterocigosis es

causado por la presencia de alelos nulos y no por errores de genotipificación o desviaciones de la panmixia. Van Oosterhout *et al.* (2004) desarrollaron algoritmos que permiten identificar errores de genotipificación explicados por presencia de alelos nulos, subestimación por presencia de alelos de gran tamaño no amplificados y errores de lectura dados por el tartamudeo de la polimerasa. De esta manera, la presencia de alelos nulos y errores de genotipificación fue estimada para cada locus empleando el programa MicroChecker (van Oosterhout *et al.*, 2004) disponible en: <http://www.nrp.ac.uk/nrp-strategic-alliances/elsa/software/microchecker/>.

La diversidad genética de los adultos y de los renovales se caracterizó por medio de las siguientes estimaciones:

- Número promedio de alelos por locus (N_A), corresponde al promedio de los distintos alelos identificados para cada locus y puede ser estimado de la siguiente manera:

$$N_A = \frac{1}{m} \sum_{k=1}^m n_k$$

donde m es el número de *loci* considerados y n_k el número de alelos en el locus k (Gillet *et al.*, 2005).

- Número efectivo de alelos (N_E), permite determinar el número de alelos prevalentes, es decir alelos presentes en elevada frecuencia.

$$N_E = \left[\sum_{i=1}^{n_k} (p_i^k)^2 \right]^{-1}$$

donde p_i es la frecuencia del *i-ésimo* alelo para el locus k (Gillet *et al.*, 2005).

- Número promedio de alelos únicos (N_{AU}), corresponde al promedio de los alelos detectados en una única población para cada locus (Gillet *et al.*, 2005). Se estimó como el número promedio de alelos únicos por locus detectados en cada estadio.

- Riqueza alélica (R), permite predecir la multiplicidad alélica esperada si las muestras fueran de igual tamaño (Gillet *et al.*, 2005). Mediante el método de rarefacción se ponderan los niveles de riqueza alélica en función del tamaño muestral y de las frecuencias alélicas. La riqueza alélica $\hat{r}(g)$ puede ser estimada como el número esperado de alelos en una segunda muestra de g alelos seleccionados al azar a partir de una primera muestra de N alelos y N_i copias del *i-ésimo* alelo (Petit *et al.*, 1998):

$$\hat{r}(g) = \sum_{i=1}^m \left[1 - \binom{N - N_i}{g} / \binom{N}{g} \right]$$

Las estimaciones de riqueza alélica permiten independizarse del sesgo que puede introducir el tamaño de la muestra ya que N_A , N_E y N_{AU} dependen del tamaño de la

muestra (Gillet *et al.*, 2005). La estimación de $\hat{r}(g)$ es utilizada para comparar el número de alelos de muestras que difieren en tamaño, lo cual es frecuente en estudios genético-poblacionales de especies forestales (Gillet *et al.*, 2005).

Por su parte, para caracterizar la distribución de las frecuencias genotípicas se partió de las frecuencias relativas $P_{ij} = N_{ij}/N$ de cada genotipo, donde N_{ij} es el número de individuos con genotipo A_iA_j ($i \leq j$) y N el número total de individuos de la población:

- Heterocigosis observada (H_O), corresponde a la frecuencia promedio de heterocigotas para el conjunto de *loci* analizados, la cual es equivalente a la heterocigosis media observada de los individuos (Gillet *et al.*, 2005):

$$H_O = \frac{1}{m} \cdot \sum_{i=1}^{n_k} \sum_{j=1}^{n_k} \left[\sum_{k=1}^m P_{ij}^{(k)} \right]$$

- Heterocigosis esperada (H_E), corresponde al índice de diversidad génica de Nei $h = 1 - \sum_1^n x_i^2$; donde x_i corresponde a las frecuencias alélicas (Gillet *et al.*, 2005). Permite conocer la proporción de *loci* esperada en equilibrio de Hardy-Weinberg para los cuales los individuos son heterocigotas:

$$H_E = \frac{N}{N-1} \cdot \left[1 - \sum_{i=1}^{n_k} p_i^2 \right]$$

La heterocigosis esperada puede tomar valores entre 0 y 1 ($0 \leq H_E \leq 1$). Si $H_E = 0$ la población es monomórfica para el locus considerado, mientras que $H_E = 1$ indica infinitos alelos presentes una sola vez en la población estudiada (Gregorius, 1978).

El número de alelos, número efectivo de alelos y número de alelos únicos fueron establecidos mediante la implementación del programa GenAlEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2006) disponible en: <http://biology-assets.anu.edu.au/GenAlEx/Welcome.html>. En tanto que la riqueza alélica y las heterocigosis observada y esperada fueron obtenidas empleando el programa SPAGeDi 1.5a (Hardy y Vekemans, 2002) disponible en: <http://ebe.ulb.ac.be/ebe/SPAGeDi.html>. Para determinar la significancia estadística de las diferencias pareadas de la riqueza alélica y las heterocigosis observada y esperada entre estadios, se implementó un procedimiento de permutaciones (10.000 iteraciones) en FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 1995) disponible en: <https://www2.unil.ch/popgen/software/fstat.htm>.

La configuración de los patrones de diversidad genotípica poblacional queda definida, en buena medida por el sistema de fecundación y las distancias de dispersión alélica dentro de las poblaciones. En este sentido, puede definirse la endogamia como el aumento en los niveles de homocigosis de alelos idénticos por descendencia en los

individuos como producto de autofecundación o apareamiento entre individuos emparentados. Por ello, se estimó el índice de endogamia (F_{IS}) como [$F_{IS} = (H_E - H_O)/H_E$], relación que refleja el incremento de la homocigosis por cruzamientos entre individuos con un grado de parentesco mayor que la media de la población (Hartl y Clark, 2007). El coeficiente de endogamia fue estimado mediante la implementación del programa SPAGeDi 1.5a (Hardy y Vekemans 2002). Además, se realizó un análisis bayesiano denominado modelo de endogamia individual (*Individual Inbreeding Model - IIM*), para particionar la influencia de los alelos nulos en los valores F_{IS} mediante el programa INest (Chybicki y Burczyk, 2009) disponible en: https://www.ukw.edu.pl/pracownicy/strona/igor_chybicki/software_ukw/.

4.5. Análisis de la estructura genética poblacional y determinación de sus posibles cambios entre estadios

El índice de fijación F_{ST} (Wright, 1951) es ampliamente utilizado como una medida de la estructura genética poblacional. Para calcular este índice, en primera instancia se deben definir los grupos de individuos que conforman las poblaciones y luego analizar la varianza en las frecuencias alélicas entre y dentro de los grupos definidos (Excoffier *et al.*, 1992). Por lo tanto, la definición de las poblaciones constituye un prerequisite fundamental para la determinación de la estructura genética poblacional (Pritchard *et al.*, 2000). Esta definición generalmente se basa en el origen geográfico de los individuos, sin embargo, la estructura no necesariamente se ve reflejada en grandes distancias geográficas entre grupos de individuos (Evanno *et al.*, 2005). Tal es así, que poblaciones que no se encuentran discretamente distribuidas pueden estar genéticamente estructuradas, debido por ejemplo, a la ocurrencia de flujo génico restringido (Evanno *et al.*, 2005).

Se analizó la estructura genética poblacional mediante un análisis Bayesiano empleando únicamente información genética, sin la incorporación de información espacial al análisis para discriminar si los patrones de estructura genética concuerdan con lo esperado bajo los supuestos del modelo de aislamiento por distancia (IBD). El análisis sin información espacial *a priori* puede fallar en la detección de grupos genéticos cuando la estructura es débil, sin embargo, al incluir información espacial el número de grupos puede ser sobreestimado debido a la influencia de IBD (Schwartz y McKelvey, 2009; François y Durand, 2010). De esta manera, las poblaciones que presentan estructuración genética, pueden ser representadas en varios grupos o *clusters*, que difieran estadísticamente entre las variantes de los *loci* considerados (Corander *et al.*, 2008).

Mediante análisis Bayesiano se determinó el número más probable de *clusters* genéticos, es decir el número de agrupamientos a los cuales los individuos son asignados en función de sus frecuencias alélicas. Este método basado en modelos requiere de dos etapas: la primera consiste en la selección del modelo y en la determinación de un rango de posibles números de *clusters* genéticos (K) para la interpretación de los datos, en tanto que la segunda consiste en el análisis de la asignación de los individuos dentro de cada *cluster* (Pritchard *et al.*, 2000).

Este análisis parte de los vectores multidimensionales X (genotipos multilocus de los individuos), Z (*clusters* de origen de los individuos) y P (frecuencias alélicas en todos los *clusters*). Dado que el análisis abarca segmentos de ADN recombinante, los individuos fueron asignados a los *clusters* definidos empleando un modelo de tipo *admixture* (*admixture ancestry model*), el cual asume que la constitución genética de un individuo puede originarse desde diferentes *clusters* y se consideró que las frecuencias alélicas son independientes (*Independent frequency model*). Para ello, se define un vector Q que denota las proporciones *admixture* de cada individuo, con lo cual, el vector Z se redefine como el conjunto de *clusters* de origen de los alelos de los individuos genotipificados. De esta manera, dado un conjunto de genotipos observados, X , el conocimiento acerca de Z , P y Q se basa en la distribución posterior $Pr(Z, P, Q|X) \propto Pr(Z)Pr(P)Pr(Q)Pr(X|Z, P, Q)$. A partir del método de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), el cual se basa en simulaciones para generar muestras de las distribuciones *a posteriori*, es posible obtener una muestra aproximada de $Pr(Z, P, Q|X)$ definida como $(Z^{(1)}, P^{(1)}, Q^{(1)}), (Z^{(2)}, P^{(2)}, Q^{(2)}), \dots, (Z^{(M)}, P^{(M)}, Q^{(M)})$. Luego, la inferencia de Z , P y Q puede basarse en estadísticos de resumen obtenidos a partir de esta muestra (Pritchard *et al.*, 2000).

Para estimar el número más probable de *clusters* se fijaron valores de K entre 1 y 8 con 10 iteraciones independientes para cada valor de K . Se estimó el valor de K *a posteriori* mediante MCMC de 750.000 iteraciones luego de un período de *burn-in* de 500.000 iteraciones. Para la determinación de la longitud del período de *burn-in* (m) se estimó el $\text{Log}[Pr(X|P^m, Q^m)]$ en una serie de ensayos, empleando distintos valores de m , hasta establecer el tiempo requerido por la cadena para alcanzar un estado aproximadamente estacionario. Cuando no se detectaron diferencias sustanciales entre distintas corridas para el mismo valor de K se consideró estar en condiciones de obtener estimaciones precisas. Para el desarrollo de este análisis se empleó el programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) disponible en: <http://web.stanford.edu/group/pritchardlab/home.html>.

Para estimar el número real de K se implementó el método de Evanno, el cual consiste en una medida *ad hoc* ΔK , la cual representa la tasa de cambio de segundo orden del $\ln[Pr(X|K)]$ con respecto a K y provee un estimador del número de agrupamientos o *clusters* (Evanno *et al.*, 2005). Mediante estudios de simulación, Evanno *et al.* (2005) demostraron que la estimación de K a partir de la probabilidad *a posteriori* $Pr(X|K)$, a menudo no coincide con el número real de K , por el contrario el valor de K que presentó el mayor ΔK coincidió con el valor real de K . En el presente estudio, el número real de K fue obtenido mediante la estimación de los valores de ΔK para los diferentes valores de K ($1 \leq K \leq 8$). Para ello, a partir de los resultados obtenidos mediante 10 corridas independientes para cada valor de K del programa STRUCTURE 2.3.4 se estimó ΔK empleando la aplicación web STRUCTURE HARVESTER versión 0.6.92 (Earl y vonHoldt, 2012) disponible en <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>.

La distribución de la variación genética dentro y entre los *clusters* genéticos definidos mediante el análisis Bayesiano, fue descrita por un Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), mediante el cual también se testó la significancia estadística de la distribución jerárquica de la variación. El AMOVA, refleja la correlación de la diversidad haplotípica a diferentes niveles de subdivisión jerárquica (Excoffier *et al.*, 1992). Este análisis también puede ser implementado con datos resultantes de marcadores moleculares codominantes de genotipos diploides multilocus (Michalakis y Excoffier, 1996). El AMOVA parte de la hipótesis nula de ausencia de estructuración de la población (Stewart y Excoffier, 1996) y se basa en una matriz de distancias cuadráticas entre todos los pares de genotipos construida aplicando el índice métrico Euclidiano (Huff *et al.*, 1993).

Se consideraron como fuentes de variación los componentes de la diversidad “entre individuos dentro de cada *cluster*” (EI/DC), y “entre *clusters*” (EC). La significancia estadística de los componentes de la covarianza asociados con los diferentes niveles de estructura genética, fueron testados empleando un enfoque no paramétrico basado en permutaciones, eliminando así, el supuesto de normalidad de los datos, que es inadecuado para datos moleculares (Excoffier *et al.*, 1992).

El modelo lineal del análisis implementado es:

$$p_{ji} = p + a_i + b_{ji}$$

donde p_{ji} indica el j -ésimo individuo ($j = 1, \dots, N_i$) en el i -ésimo *cluster* ($i = 1, \dots, I$), y p es la esperanza no conocida de p_{ji} . Los efectos son a para *clusters* y b para individuos

dentro de *clusters*. Se asume que los efectos son aditivos, aleatorios, no correlacionados, y tienen componentes de la varianza asociados (desvíos cuadráticos esperados) σ_a^2 y σ_b^2 , respectivamente.

Para una distribución jerárquica de N individuos, se puede particionar la suma total de los desvíos cuadráticos $SSD_{(Total)}$ en sus componentes de variación de la siguiente forma:

$$SSD_{(Total)} = SSD_{(EC)} + SSD_{(EI/DC)}$$

donde, SSD es el desvío cuadrático esperado y los subíndices indican: (EC) entre *clusters*, (EI/DC) entre individuos dentro de *clusters*. Por lo cual, le corresponde el siguiente diseño de AMOVA:

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados (SSD)	Componentes de la varianza
Entre <i>clusters</i>	$C - 1$	$SSD_{(EC)}$	$\sigma_b^2 + n \sigma_a^2$
Entre individuos dentro de <i>clusters</i>	$N - C$	$SSD_{(EI/DC)}$	σ_b^2
Total	$N - 1$	$SSD_{(Total)}$	σ_T^2

En la tabla, n representa el número promedio de individuos por *cluster*, teniendo en cuenta los tamaños de muestra desiguales. Se presentan además, los componentes de la varianza asociados a los efectos de *clusters* (σ_a^2) e individuos dentro de *clusters* (σ_b^2), así como la varianza total (σ_T^2).

El AMOVA permite testar la significancia estadística de los índices de fijación usando información de las variantes alélicas de los genotipos y sus frecuencias reflejando la correlación de la diversidad genética a diferentes niveles jerárquicos de subdivisión (Excoffier *et al.*, 1992). De esta manera, a partir del AMOVA se testó la significancia estadística de la estructura genética poblacional y se estimó el índice F_{ST} (Hartl y Clark, 2007):

$$F_{ST} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}{\sigma_T^2}$$

Este índice tiene un mínimo teórico de 0, que indica ausencia de estructuración genética y un máximo teórico de 1, que indica frecuencias alélicas estadísticamente diferentes.

La significancia estadística de F_{ST} fue testada con un valor de p obtenido mediante 10.000 permutaciones de los genotipos dentro y entre *clusters* para el 95% de confianza ($p < 0,05$). Estos análisis fueron desarrollados utilizando el programa Arlequin 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010) disponible en: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>.

Además, se estimaron los valores de F_{ST} y los intervalos de confianza (IC) por medio del método de corrección por exclusión de alelos nulos (*Excluding Null Allele* - ENA) mediante la implementación del programa FreeNA (Chapuis y Estoup, 2007) disponible en: <http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/software/FreeNA/>.

Dada la naturaleza de los marcadores moleculares hipervariables, los *loci* SSRs generalmente detectan un gran número de alelos a elevadas frecuencias, implicando un alto grado de polimorfismo en las poblaciones (Nauta y Weising, 1996; Chambers y MacAvoy, 2000) y niveles de heterocigosis que pueden influir sobre la estimación del índice F_{ST} (Meirmans y Hedrick, 2011). Por ello, se evaluó la estructura genética poblacional a partir de los niveles de diferenciación alélica entre los *clusters* definidos mediante el análisis Bayesiano. Este enfoque complementario del análisis de la estructura genética poblacional (Jost *et al.*, 2018) fue abordado mediante la estimación del índice D de Jost (Jost, 2008), el cual está basado en el número efectivo de alelos y pondera la diversidad genética mediante el cuadrado de las frecuencias alélicas, es decir parte del mismo tipo de ponderación que las estimaciones de heterocigosis (Jost *et al.*, 2018).

Aunque el índice D de Jost no está basado directamente en la heterocigosis (Meirmans y Hedrick, 2011), este índice puede ser expresado como una función de la distribución de la heterocigosis dentro y entre *clusters* de la siguiente manera:

$$D = [(H_T - H_S)] \cdot [d/(d - 1)] = 1 - J_{entre} - J_{dentro} = 1 - \exp(-NGD)$$

donde d es el número de *clusters*, J es la identidad génica de Nei (Nei, 1973) y NGD es la distancia genética de Nei (Nei, 1972). El índice D de Jost equivale a la unidad cuando la totalidad de los alelos detectados en cada *cluster* constituyen alelos únicos, mientras que equivale a cero cuando todos los *clusters* son genéticamente idénticos, es decir, presentan los mismos alelos en las mismas frecuencias (Jost *et al.*, 2018).

La media armónica del índice D de Jost, la significancia estadística y los intervalos de confianza del 95% fueron estimados mediante un procedimiento de remuestreo de 1.000 *bootstraps* utilizando el paquete DEMETics v0.8.7 en el entorno R (Gerlach *et al.*, 2010) disponible en: <https://cran.r-project.org/web/packages/DEMETics/index.html>. Además, para analizar la posible relación entre el nivel de diferenciación genética y las distancias espaciales, se estimaron las distancias Euclidianas entre pares de individuos dentro de cada *cluster* empleando el programa SPAGeDi 1.5a (Hardy y Vekemans, 2002).

Una de las principales consecuencias de la estructura genética poblacional es la reducción en la proporción media de genotipos heterocigotas en relación a lo esperado bajo apareamiento aleatorio (Hartl y Clark, 2007). El efecto Wahlund y la

autofecundación influyen sobre los niveles de heterocigosis en las poblaciones de formas contrapuestas, afectando a la totalidad de los *loci* por igual y, en consecuencia, se podrían distinguir sus efectos de la influencia de los alelos nulos, los cuales afectan a cada locus de una manera particular (Séré *et al.*, 2017). El efecto Wahlund puede ser detectado cuando la endogamia a nivel poblacional se debe a la subestructura de la población (Hartl y Clark, 2007), por lo tanto, bajo la acción de un efecto Wahlund, el F_{IS} dentro de los *clusters* será menor que el F_{IS} de todo el fragmento poblacional. De esta manera, para evaluar la posible acción de un efecto Wahlund sobre la población, se estimaron los coeficientes de endogamia (F_{IS}), corregidos y no corregidos por la presencia de alelos nulos para cada *cluster* genético utilizando los métodos descritos anteriormente (Apartado 4.4.).

4.6. Caracterización de la estructura genética espacial a escala fina

Los análisis de la estructura genética espacial a escala fina (EGEF) de las poblaciones proveen información de los patrones de dispersión alélica y de las relaciones de parentesco entre los individuos de una población (Loiselle *et al.*, 1995).

Cuando se estiman las distancias genéticas entre individuos debe asumirse que el flujo génico es inversamente proporcional a la distancia (Vekemans y Hardy, 2004). En poblaciones naturales de plantas, el análisis conjunto de la información proveniente de los genotipos multilocus y de la geoposición de cada individuo, provee un marco de referencia espacialmente explícito para el estudio de los niveles de flujo génico en las poblaciones, así como para la interpretación de los patrones de dispersión alélica que configuran las relaciones de parentesco entre individuos dentro de una población (Sork *et al.*, 1999; Rousset, 2000). Los métodos de autocorrelación espacial permiten evaluar la relación entre el grado de parentesco y la distancia física entre individuos (Sokal y Rohlf, 1995; Hardy y Vekemans, 1999; Epperson, 2003), ya que bajo modelos de IBD, el flujo génico restringido genera una distribución espacial no aleatoria de los genotipos (Hardy y Vekemans, 1999).

Vekemans y Hardy (2004) propusieron un estadístico que permite cuantificar la EGEF dentro de las poblaciones mediante la estimación de coeficientes de parentesco entre pares de individuos. Este enfoque se basa en predicciones de los modelos de IBD para un espacio bidimensional, tales como: población en equilibrio dispersión-deriva y distancias comprendidas en el rango $\sigma_g < d_{ij} < c.20\sigma_g$.

La EGEF poblacional fue analizada mediante la estimación del coeficiente promedio de coancestría o parentesco (F_{ij}) entre todos los pares de adultos y entre todos los pares de renovales de forma independiente. El coeficiente F_{ij} mide la extensión de la similitud relativa entre los individuos i y j en relación a la similitud genética promedio entre una muestra aleatoria de individuos (Vekemans y Hardy, 2004).

Dado que se trata de marcadores moleculares codominantes, para evaluar la EGEF mediante genotipos SSRs, se estimó el coeficiente de parentesco F_{ij} basado en el estimador ρ_{ij} propuesto por Loiselle *et al.* (1995), el cual es un estimador relativamente potente para detectar EGEF, y el sesgo es menor que para otros estimadores ante la presencia de alelos a baja frecuencia (Vekemans y Hardy, 2004). Este estimador se basa en la correlación entre las frecuencias de alelos homólogos p_i y p_j de un locus en pares de individuos i y j , y queda definido como:

$$\hat{\rho}_{ij} = \frac{\sum_{ij}(p_i - \bar{p})(p_j - \bar{p})}{kp(1 - \bar{p})} + \frac{2}{(8k + 1)^{0.5} - 1}$$

donde el primer término es el valor esperado de ρ_{ij} y $k = n(n - 1)/2$ es el número total de comparaciones de a pares posible entre n individuos separados, unos de otros, por un número discreto de unidades de mapa de distancia. El segundo término ajusta el sesgo atribuible al tamaño de muestra finito. El estimador ρ_{ij} toma un valor esperado de cero cuando los individuos de una población presentan apareamiento aleatorio (Loiselle *et al.*, 1995).

Para el análisis de datos provenientes de genotipos multilocus codominantes, el coeficiente de parentesco F_{ij} es el más apropiado (Vekemans y Hardy, 2004), por lo cual se extendió la aproximación del estimador ρ_{ij} para caracterizar la EGEF de la siguiente manera:

Para cada alelo k y cada par de individuos i y j se define

$$F_{ij} = \frac{(p_i - \bar{p}_k)(p_j - \bar{p}_k)}{\bar{p}_k(1 - \bar{p}_k)} + \frac{1}{(2n - 1)}$$

donde p_i y p_j son las frecuencias del alelo k en los individuos i y j (tomando los valores 0, 0,5 ó 1) y \bar{p}_k es la frecuencia alélica promedio del alelo k en la población de referencia con un tamaño de muestra n . El coeficiente de parentesco promedio multialélico (multilocus) puede ser estimado entonces mediante un F_{ij} ponderado para cada alelo k por medio del índice de polimorfismo $\bar{p}_k(1 - \bar{p}_k)$ (Heuertz *et al.*, 2003).

La EGEF fue analizada por medio de los coeficientes de parentesco F_{ij} estimados en una muestra de individuos genotipificados, por lo cual la estimación se basa en la

probabilidad de que un alelo del individuo i tomado al azar sea idéntico a un alelo del individuo j también tomado al azar y, según lo propuesto por Vekemans y Hardy (2004) queda definido como:

$$F_{ij} \equiv (Q_{ij} - \bar{Q}) / (1 - \bar{Q})$$

donde Q representa las probabilidades de identidad por estado entre alelos: Q_{ij} para los alelos tomados de forma aleatoria entre los individuos i y j , y \bar{Q} para los alelos tomados de forma aleatoria dentro de una muestra de la población de referencia (Fenster *et al.*, 2003).

Se obtuvieron las pendientes de regresión b_d y b_{Ld} a través de la regresión de los valores del coeficiente de parentesco (F_{ij}) y la distancia espacial entre los individuos d_{ij} , y su logaritmo natural $\ln(d_{ij})$, respectivamente. Para determinar si la EGEF se ajusta a un modelo de aislamiento por distancia de dos dimensiones, es decir que los niveles de parentesco disminuyen linealmente con el logaritmo de la distancia, se graficó $F_{(d)}$ en relación a los intervalos de distancia geográfica considerados. El coeficiente $F_{(d)}$ se obtuvo a partir del promedio de los coeficientes de parentesco (F_{ij}) para los intervalos de distancia considerados.

Se analizó la EGEF mediante la estimación del coeficiente de parentesco F_{ij} a lo largo de ocho intervalos de distancia. Los intervalos (I_i) para el análisis de los autocorrelogramas fueron definidos de la siguiente manera: I_1 : 0 – 10m, I_2 : >10 – 20m, I_3 : >20 – 50m, I_4 : >50 – 100m, I_5 : >100 – 150 m, I_6 : >150 – 200m, I_7 : >200 – 300m, I_8 : >300 – 500m para asegurar un elevado número de comparaciones entre pares de individuos en la configuración de los autocorrelogramas. Los coeficientes de parentesco (F_{ij}) fueron estimados de forma independiente para adultos y renovales por medio de las comparaciones de a pares en las clases de distancia definidas. Los tamaños de las muestras por clase de distancia fueron: 40, 42, 136, 190, 251, 270, 593, 247 en adultos y 99, 84, 55, 208, 330, 188, 432, 314 en renovales. Para cada intervalo de distancia se estimó la significancia estadística mediante la prueba de Wilcoxon y se evaluó si los valores medios observados excedían los límites del intervalo de confianza del 95% resultante de las 10.000 permutaciones. Los errores estándar para los coeficientes de parentesco fueron estimados mediante el procedimiento de Jackknife, el cual consiste en remover información de un locus por cada permutación (Sokal y Rohlf, 1995).

Para comparar la extensión de la EGEF entre estadios se estimó el estadístico Sp . Este estadístico queda definido como:

$$Sp = -b / (1 - F_1)$$

donde F_1 corresponde al coeficiente F_{ij} medio entre pares de individuos en la primera clase de distancias y b corresponde a la pendiente de regresión en base al logaritmo de las distancias en un espacio bidimensional (Vekemans y Hardy, 2004). El estadístico Sp es un parámetro que resume la intensidad de la EGEF y depende principalmente de la tasa de decrecimiento de los coeficientes de parentesco de a pares. Por ello, los valores de Sp pueden ser comparados entre diferentes especies, poblaciones o estadios de vida (Hardy *et al.*, 2006). Los niveles de significancia estadística de la pendiente fueron estimados por medio de 10.000 permutaciones aleatorias y un procedimiento de Jackknife para el conjunto de *loci* analizados, lo cual permitió obtener los errores estándar para las estimaciones multilocus.

La estimación de todos los parámetros para el análisis de la EGEF se llevó a cabo empleando el programa SPAGeDi 1.5a (Hardy y Vekemans, 2002).

4.7. Determinación del tamaño de vecindario y de la estructura familiar

Las tasas de dispersión y la densidad poblacional influyen sobre la dimensión espacial del vecindario el cual ha sido definido como una función de la varianza de la dispersión progenitor-progenie (Crawford, 1984). El tamaño de vecindario (N_b) fue definido por Wright (1969) y es comúnmente interpretado como el tamaño de la unidad de apareamiento aleatorio o unidad panmíctica.

Los estudios de EGEF en general asumen que para diferentes distribuciones de dispersión, la estructura genética esperada es una función del tamaño de vecindario. Las estimaciones indirectas de la dispersión alélica histórica a partir de la EGEF deben distinguirse de su caracterización propiamente dicha debido a que los métodos indirectos de estimación de dispersión se basan en la suposición de que la EGEF observada corresponde a una población en equilibrio dispersión-deriva bajo los supuestos de IBD (Hardy *et al.*, 2006). De esta manera, a una escala espacial apropiada, los parámetros de dispersión pueden ser inferidos a partir de la regresión de la diferenciación genética frente a la distancia geográfica entre los individuos de la población (Luximon *et al.*, 2014).

La estimación del tamaño de vecindario de Wright se basa en la siguiente relación:

$$N_b \equiv 4\pi D_e \sigma_g^2$$

en la cual, el rol relativo de la deriva genética y de la dispersión no son considerados por separado. Por su parte, en la estimación de las distancias históricas de dispersión alélica (σ_g), se requiere una estimación independiente de la deriva genética, la cual es una

variable que depende de la densidad efectiva (D_e). A su vez, esta relación es válida solo en el rango de detección de parentesco entre σ_g y $\sigma_g/(2\mu)^{1/2}$, donde μ es la tasa de mutación (Rousset, 1997). En este sentido, asumiendo que $\mu \cong 10^{-3}$ para *loci* SSRs, el límite superior de este rango es $\sim 20\sigma_g$ (Heuertz *et al.*, 2003).

La extensión de la dispersión alélica puede ser estimada entonces, a partir de la pendiente de regresión, definiendo el tamaño de vecindario de Wright de la siguiente manera:

$$\hat{N}_b = -(1 - F_1)/b_r$$

donde b_r es la pendiente de regresión restringida de F_{ij} en relación al $\ln(d_{ij})$ en el rango $\sigma_g > d_{ij} > 20\sigma_g$. El coeficiente F_1 es considerado una aproximación a F_N (coeficiente de parentesco entre individuos cercanos). Dado que en general $F_1 \ll 1$ (en especies alógamas por ejemplo $F_1 \sim 0,1$; Vekemans y Hardy, 2004), el término $(1 - F_1)$ no causaría un sesgo sustancial. Una dificultad de esta fórmula es que la pendiente b_r depende de la distancia σ_g , la cual es un parámetro a estimar. Por esta razón, para la estimación de N_b se empleó el procedimiento iterativo sugerido por Vekemans y Hardy (2004):

(i) N_b fue estimado a partir de la pendiente de regresión global de F_{ij} en función del $\ln(d_{ij})$ de la siguiente manera:

$$\hat{N}_b = -(1 - F_1)/b$$

(ii) σ_g fue estimado a partir del \hat{N}_b inferido y la densidad efectiva D_e :

$$\sigma_g = \sqrt{\hat{N}_b/(4\pi D_e)}$$

(iii) N_b fue re-estimado a partir de la pendiente de regresión en el rango $\sigma_g < d_{ij} < 20\sigma_g$:

$$\hat{N}_b = -(1 - F_1)/b$$

Los pasos (ii) y (iii) fueron repetidos hasta que las sucesivas estimaciones de N_b fueron convergentes. Para aplicar este procedimiento, se asume que D_e es conocido. Sin embargo, D_e no es simplemente la densidad poblacional de individuos adultos, sino que también depende de la varianza de los eventos reproductivos entre individuos (densidad efectiva). De manera tal que $D_e \cong D \cdot N_e/N$, donde D es la densidad de la población y N_e/N el tamaño efectivo poblacional en función del tamaño censal (Vekemans y Hardy, 2004). Estudios demográficos sugieren que la proporción N_e/N en poblaciones de árboles adultos con frecuencia se encuentra comprendida en el rango 0,1-0,5 (Frankham, 1995). Por ello, para estimar la distancia de dispersión y el tamaño de vecindario se consideró la proporción $N_e/N=0,4$, valor promedio entre las proporciones estimadas por Frankham

(1995) y se aplicó el procedimiento iterativo para cuatro valores de D_e estimados a partir de diferentes valores de densidad censal. De acuerdo a estudios previos en especies forestales neotropicales, Hardy *et al.* (2016) sugirieron que las aproximaciones $D/2$ y $D/10$ pueden ser empleadas para estimar los límites máximo y mínimo de la D_e , respectivamente. En el presente trabajo, la densidad poblacional fue definida como $D = 15\text{ind/ha}$ de acuerdo a la distribución espacial de los individuos. La densidad efectiva fue estimada empleando un rango de diferentes proporciones de la densidad censal (D ; $D/2$; $D/4$; $D/8$; $D/10$). Este análisis se llevó a cabo empleando el programa SPAGeDi 1.5a (Hardy y Vekemans, 2002).

La estructura familiar fue determinada a partir de las relaciones entre pares de individuos progenitor-progenie y entre pares de hermanos de *A. colubrina* var. *cebil* en el fragmento poblacional estudiado. En este sentido, los elevados niveles de polimorfismo en términos del número de alelos, posiciona a los marcadores SSR entre los principales marcadores moleculares para el análisis de la estructura familiar (Manoel *et al.*, 2011). En base a los datos de los genotipos multilocus y métodos de probabilidad de asignación de los individuos a relaciones genealógicas, la mejor configuración de unidades familiares fue inferida mediante el método de MCMC y el algoritmo de recocido simulado (*simulated annealing*), en el cual la presencia de alelos nulos y errores de genotipificación son incorporados en el análisis (Wang, 2004). La forma general de la función de probabilidad para un grupo familiar con una estructura genética R puede ser estimada de la siguiente manera:

$$L = \Pr(R) \sum_g \Pr(G|g, R) \Pr(g|R)$$

donde $\Pr(R)$ es la probabilidad *a priori* de R , G es el vector de los genotipos observados para todos los miembros del grupo y g es el vector de los genotipos no observados. La suma se realiza para todas las combinaciones genotípicas posibles (Wang y Santure, 2009). De esta manera, los grupos familiares se estimaron en función de la probabilidad de cada par de individuos adulto-renoval de ser asignado a un grupo progenitor-progenie (PP) y la probabilidad de cada par de adultos o de renovales de ser asignado a grupos de hermanos. Los pares de hermanos, a su vez, fueron clasificados como medio-hermanos, es decir individuos con un parental en común (*Half sibs* - HS) o hermanos completos, es decir individuos con los dos parentales en común (*Full sibs* - FS). Luego, la probabilidad de asignación de cada par de individuos fue estimada como el promedio de la asignación al grupo PP o HS/FS, mediante 10 corridas independientes con 10 iteraciones cada una. Fueron considerados los resultados correspondientes a la mejor configuración, definida

por la probabilidad de asignación. Los pares de individuos fueron identificados como PP, FS o HS con una probabilidad promedio mayor o igual a 0,75 en base a lo sugerido por Wang y Santure (2009). Los análisis se llevaron a cabo asumiendo poligamia masculina y femenina, endogamia permitida, tasa general de error de genotipificación igual a 0,05, probabilidad de que un padre sea incluido dentro de la muestra de padres candidatos igual a 0,5, y probabilidad de que una madre sea incluida dentro de la muestra de madres candidatas igual a 0,75. La diferencia en las probabilidades de inclusión de posibles padres y madres en las muestras de parentales candidatos se encuentra relacionada con las distancias de dispersión de polen y semillas en la especie de estudio. El análisis de estructura familiar fue realizado empleando el programa COLONY (Jones y Wang, 2010) disponible en: <https://www.zsl.org/science/software/colony>. La distancia Euclidiana entre pares de PP, FS y HS se estimó empleando el programa SPAGeDi 1.5a (Hardy y Vekemans, 2002) y fue mapeada utilizando el programa QGIS versión 2.18.13 (Quantum GIS Development Team, 2017) disponible en: <https://www.qgis.org/es/site/>.

4.8. Identificación de posibles eventos demográficos recientes

En el marco de la teoría de coalescencia es posible interpretar la distribución de las frecuencias alélicas desde una perspectiva genealógica, lo cual permite realizar inferencias sobre los eventos demográficos que ha atravesado una población recientemente como cuellos de botella (Cornuet y Luikart, 1996) o en un pasado histórico como expansiones-retracciones poblacionales (Beaumont, 1999).

La inferencia bayesiana proporciona un marco de referencia para realizar estimaciones en un contexto de incertidumbre, así como para cuantificar en qué medida pueden variar las estimaciones a la luz de nuevas evidencias. Sin embargo, para un gran número de modelos complejos y problemas de inferencia, solamente pueden obtenerse respuestas cuantitativas aproximadas. Las aproximaciones bayesianas (*Approximate Bayesian Computation* - ABC) hacen referencia a una familia de algoritmos para la inferencia aproximada que parten de un conjunto mínimo de suposiciones requeridas para que el muestreo de un modelo sea posible (Lintusaari *et al.*, 2017). El método ABC, en Genética de Poblaciones, es una aproximación flexible para estimar simultáneamente el soporte de un modelo y los parámetros del mismo. Se evalúan distintos escenarios evolutivos, los cuales son caracterizados por modelos históricos y pueden ser descriptos como una sucesión en el tiempo de eventos y períodos entre eventos (Cornuet *et al.*, 2008). Por medio del enfoque ABC, el criterio de verosimilitud es reemplazado por el criterio de similitud entre conjuntos de datos simulados y observados (Cornuet *et al.*,

2008). A partir del escenario más probable se infieren los parámetros y procesos enmarcados en los modelos históricos que pudieron haber dado forma a los patrones actuales.

En la práctica, el enfoque ABC puede ser resumido en tres pasos sucesivos:

- i. Generación de los datos simulados.
- ii. Selección del conjunto de datos simulados más cercano al conjunto de datos observados.
- iii. Estimación de las distribuciones posteriores de los parámetros a través de un procedimiento de regresión lineal.

De esta manera, el enfoque ABC provee una forma de comparar diferentes escenarios demográfico-históricos que pueden explicar los datos observados.

Se empleó el método ABC para estimar el soporte estadístico relativo para cada uno de los escenarios definidos. Este análisis incluyó todas las muestras de adultos. Se definieron dos escenarios demográficos basados en el conocimiento histórico del área de estudio, los cuales se compararon con un modelo nulo de tamaño poblacional constante (Tabla 4). Se consideró un tiempo de generación de semilla a semilla (*sensu* Petit y Hampe, 2006), el cual en *A. colubrina* var. *cebil* fue definido en ~50 años. El primer escenario asumió un cambio demográfico reciente de una a cinco generaciones atrás, correspondiente a una transformación del hábitat debido a la actividad humana conocida en la región (Bauni *et al.*, 2013). El segundo escenario reflejó un cambio demográfico de entre 100 y 500 generaciones atrás, asociado a la dinámica de expansión y contracción descrita para los BSEN (Prado y Gibbs, 1993; Pennington *et al.*, 2000; Werneck *et al.*, 2011).

Para hacer inferencias acerca de los parámetros en el modelo simulado, se definieron los siguientes estadísticos de resumen: número de alelos, diversidad genética, varianza media en el tamaño poblacional y M promedio de Garza-Williamson. En base a estos índices se generaron conjuntos de datos simulados con atributos similares a los del conjunto de datos observados. La probabilidad *a posteriori* de cada escenario se estimó mediante regresión logística (Cornuet *et al.*, 2008). Para las simulaciones mediante ABC se consideraron modelos simples en dos ventanas temporales de cambio en el tamaño poblacional. Para el análisis se incluyó un amplio rango de valores de los parámetros para el tamaño poblacional actual (N_0), el tamaño de población ancestral (N_1) y el tiempo (t) (Tabla 4). Los análisis ABC se realizaron empleando el programa DIYABC v1.0.4.46beta (Cornuet *et al.*, 2008) disponible en: <http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/diyabc/>

Una población que atraviese eventos de cuello de botella experimenta una reducción en el tamaño efectivo poblacional (N_e), derivando en cambios en las frecuencias genotípicas. En el marco de condiciones de equilibrio mutación-deriva, tanto la tasa de mutación como el tamaño efectivo poblacional son parámetros que definen el número de alelos y la distribución de frecuencias alélicas de *loci* selectivamente neutros. Cuando ocurre un evento de cuello de botella, el N_e se reduce significativamente, lo cual causa una progresiva reducción del número de alelos y de la heterocigosis. Sin embargo, la diversidad alélica se reduce a una tasa mayor que la heterocigosis durante un cuello de botella (Nei *et al.*, 1975; Cornuet y Luikart, 1996). Como consecuencia, se produce un déficit transitorio en el número de alelos en relación a la heterocigosis observada, es decir, el número observado de alelos en la muestra es menor que el número de alelos esperado a partir de la heterocigosis observada bajo la asunción de que la población se encuentra en equilibrio mutación-deriva (Cornuet y Luikart, 1996). Los métodos para la detección de cuellos de botella recientes a partir de datos de las frecuencias alélicas se valen de los elevados niveles de polimorfismo detectable a partir de los SSRs, así como de las teorías desarrolladas sobre los efectos de los cuellos de botella en relación a la pérdida de alelos y a la reducción de la heterocigosis en *loci* neutrales (Nei *et al.*, 1975; Allendorf, 1986).

Se evaluó la historia demográfica del fragmento estudiado para la detección de eventos de cuello de botella recientes en la población. Esta estimación se llevó a cabo mediante el cálculo del estadístico T_2 (Cornuet y Luikart, 1996). El análisis se basó en un modelo mutacional TPM, el cual incluyó un 95% de SMM simple y un 5% de SMM múltiple (con una varianza de 12 entre los pasos múltiples) según lo recomendado por Piry *et al.* (1999) para *loci* SSRs. El estadístico T_2 fue calculado mediante 10.000 iteraciones y su significancia estadística se testó usando una prueba de Wilcoxon para un intervalo de confianza del 95% empleando el programa Bottleneck 1.2.02 (Cornuet y Luikart 1996; Piry *et al.*, 1999) disponible en: <http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/software/Bottleneck/bottleneck.html>. Este método es adecuado para detectar cuellos de botella recientes de baja magnitud (Williamson-Natesan, 2005). Los valores positivos de T_2 indican un exceso de heterocigosis, el cual puede estar asociado con cuellos de botella demográficos, mientras que los valores negativos (déficit de heterocigosis) son consistentes con expansiones recientes de la población (Piry *et al.*, 1999).

Tabla 4. Distribuciones *a priori* de los parámetros históricos y demográficos definidos para el análisis de aproximaciones bayesianas

Escenarios	Parámetros	Distribución <i>a priori</i>
Cambio reciente en el tamaño poblacional	N_0	Uniforme (10-10.000)
	t	Uniforme (1-5)
	N_1	Uniforme (10-10.000)
	μ	Log (1×10^{-3} - 1×10^{-2})
	P	Uniforme (0,1-0,5)
Cambio histórico en el tamaño poblacional	N_0	Uniforme (10-10.000)
	t	Uniforme (100-500)
	N_1	Uniforme (10-10.000)
	μ	Log (1×10^{-3} - 1×10^{-2})
	P	Uniforme (0,1-0,5)

N_0 : Tamaño poblacional actual; t : tiempo generacional; N_1 : tamaño poblacional histórico; μ : tasa media de mutación de los SSRs; P : parámetro medio de la distribución geométrica.

Por otro lado, y de manera complementaria al cálculo del estadístico T_2 , se estimó la proporción M de Garza-Williamson, la cual puede definirse como la proporción media entre el número de alelos y el rango de tamaños de los alelos para cada locus (Garza y Williamson, 2001). Un valor de M <0,68 estaría asociado con señales de cuello de botella antiguas y severas (Garza y Williamson, 2001; Williamson-Natesan, 2005). La proporción M se calculó empleando el programa Arlequin 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010).

Resultados



5. RESULTADOS

5.1. Genotipificación de los individuos

Se verificó la aplicabilidad del sistema de tres cebadores para la totalidad de los *loci* analizados mediante la estimación del número de coincidencias y la puntuación, la cual en todos los casos resultó menor al umbral. En la Tabla 5 se presentan los resultados de la validación del método de genotipificación tomando el cebador M13-*forward* como referencia, debido a que por su longitud la probabilidad de formación de dímeros y bucles es elevada en relación a la de los cebadores *reverse* y M13*.

5.2. Caracterización de la diversidad genética de adultos y renovales

En el análisis estadístico de los datos se contempló la aplicación de índices para las estimas de diversidad considerando la totalidad de los alelos o la exclusión de alelos nulos en el cálculo. Dado que no se detectaron errores de genotipificación, el exceso de homocigosis detectado puede ser atribuido a la presencia de alelos nulos, resultando en un déficit de heterocigosis estadísticamente significativo ($p < 0,05$) tanto en adultos como en renovales para los ocho *loci* SSRs analizados.

Se caracterizó la diversidad genética poblacional mediante la estimación de distintos parámetros por locus y de manera global para cada estadio. Los ocho *loci* SSR analizados presentaron entre 20 y 53 alelos por locus de manera global (Anexo I). Del total de alelos detectados, 67 (23,1%) estuvieron presentes únicamente en adultos, 63 (21,7%) únicamente en renovales, mientras que 160 alelos (55,2%) estuvieron presentes en ambos estadios (Figura 11).

Mediante la ecuación de Brookfield se detectó una elevada frecuencia de alelos nulos ($r = 0,19$). En conjunto para todos los *loci* la H_0 fue significativamente menor que la H_E evidenciando un déficit de heterocigotas, pudiendo ser esto en parte atribuible al elevado coeficiente de endogamia detectado tanto en adultos como en renovales ($F_{IS} = 0,41$ y $0,40$, respectivamente) (Tabla 6). Elevados niveles de F_{IS} podrían ser explicados por la presencia de alelos nulos. Sin embargo, a pesar de la alta frecuencia de los mismos, un significativo déficit de heterocigosis fue detectado aún luego de la corrección. Los valores de F_{IS} corregidos fueron similares a los estimados sin corrección, siendo $F_{IS}(IIM) = 0,39$ (IC: 0,35 - 0,44) en adultos y $F_{IS}(IIM) = 0,34$ (IC: 0,28 - 0,42) en renovales. La superposición de los intervalos de confianza del 95% indicó que los alelos nulos se distribuyeron de forma uniforme entre estadios.

Tabla 5. Validación del método de genotipificación mediante el sistema de tres cebadores

Locus	Secuencia del cebador <i>M13-forward</i>	Número promedio de coincidencias		Puntuación
		Entre cebadores	Dentro de cebadores	
		M13-F	M13-F	
Ac34.3	<u>tgtaaacgacggccag</u> tccattctacaacacgcaagtg	4,67	5,00	2
Ac48.1	<u>tgtaaacgacggccag</u> tgagaccaaccacacgagtt	5,00	0,00	2
Ac28.3	<u>tgtaaacgacggccag</u> tgagcagccatgttggagta	3,00	0,00	2
Ac172.1	<u>tgtaaacgacggccag</u> ttctaaattacgtggagaaaacgaa	4,00	5,00	2
Ac11.2	<u>tgtaaacgacggccag</u> tcaagcgttctctgataatttattg	4,00	0,00	2
Ac41.1	<u>tgtaaacgacggccag</u> tacgagetccacattcatgc	4,00	0,00	2
Ac157.1	<u>tgtaaacgacggccag</u> tccacctccattttatttatet	4,00	0,00	2
Ac162.1	<u>tgtaaacgacggccag</u> ttgtatgtgtgaatatggaagttgc	7,00	8,00	3

Se indica subrayada la secuencia M13.

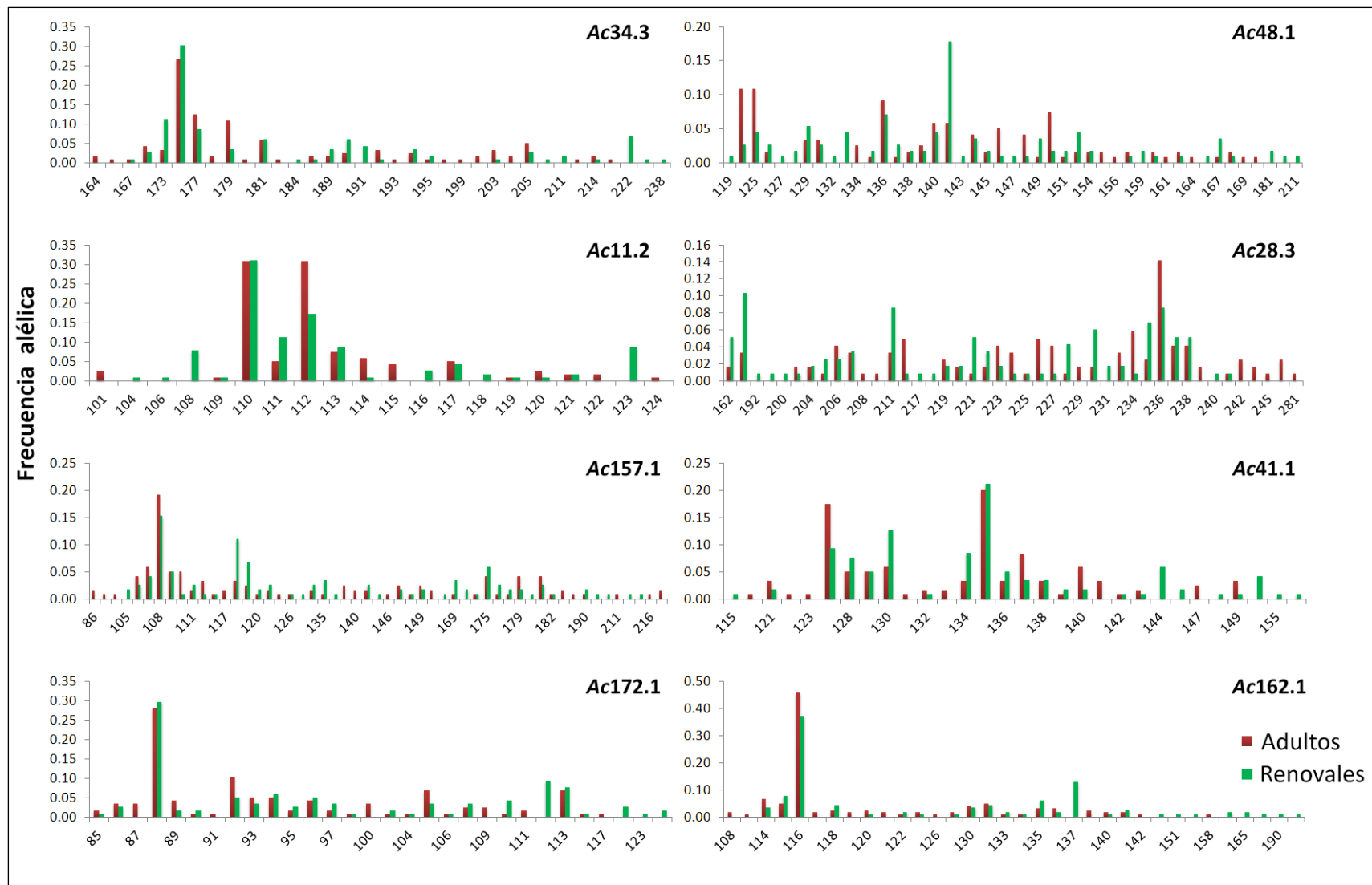


Figura 11. Frecuencias alélicas de los ocho *loci* SSR nucleares analizados en adultos y renovales de *A. colubrina* var. *cebil*.

Tabla 6. Índices de diversidad genética en adultos y renovales en el fragmento poblacional de *A. colubrina* var. *cebil* estudiado

Locus	Adultos										Renovales									
	<i>N</i>	<i>N_A</i>	<i>N_E</i>	<i>N_{AU}</i>	<i>R</i>	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>F_{IS}</i>	<i>r</i>	<i>F_{IS}</i> (IIM)	<i>N</i>	<i>N_A</i>	<i>N_E</i>	<i>N_{AU}</i>	<i>R</i>	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>F_{IS}</i>	<i>r</i>	<i>F_{IS}</i> (IIM)
Ac34.3	60	28	8,82	12	27,83	0,550	0,887	0,387	0,178		58	23	7,63	7	22,69	0,534	0,869	0,392	0,179	
Ac48.1	60	33	17,48	6	32,83	0,517	0,943	0,459	0,219		56	38	17,00	12	38,00	0,536	0,941	0,438	0,209	
Ac11.2	60	14	4,81	4	13,95	0,450	0,792	0,439	0,191		58	16	6,13	5	15,79	0,466	0,837	0,451	0,202	
Ac28.3	60	36	20,69	9	35,85	0,550	0,952	0,429	0,206		58	34	18,85	8	33,51	0,672	0,947	0,298	0,141	
Ac157.1	60	42	16,44	14	41,70	0,800	0,939	0,156	0,072		59	39	17,19	11	38,17	0,661	0,942	0,306	0,145	
Ac41.1	60	23	10,21	7	22,90	0,333	0,902	0,636	0,299		59	23	10,28	7	22,58	0,424	0,903	0,537	0,252	
Ac172.1	59	26	8,85	6	26,00	0,644	0,887	0,282	0,129		59	24	8,26	4	23,69	0,525	0,879	0,409	0,188	
Ac162.1	60	25	4,39	9	24,88	0,417	0,772	0,467	0,201		58	25	5,79	9	24,62	0,517	0,827	0,382	0,170	
Media	59,88	28	11,46	8	28,24	0,533	0,884	0,405	0,187	0,393	58,13	28	11,39	8	27,38	0,542	0,893	0,400	0,186	0,344
SE	0,13	3	2,14	1	3,02	0,051	0,024	0,050	0,023	0,015	0,35	3	1,91	1	2,89	0,030	0,017	0,028	0,013	0,024

N: Tamaño poblacional; *N_A*: Número promedio de alelos por locus; *N_E*: Número efectivo de alelos; *N_{AU}*: Número promedio de alelos únicos; *R*: Riqueza alélica; *H_O*: Heterocigosis observada; *H_E*: Heterocigosis esperada; *F_{IS}*: coeficiente de endogamia; *r*: frecuencia estimada de alelos nulos; *F_{IS}* (IIM): coeficiente de endogamia corregido por la presencia de alelos nulos. SE: Error estándar.

En ambos estadios los valores de N_A y N_{AU} fueron coincidentes tanto para el locus *Ac41.1* como para el locus *Ac162.1*. Los ocho *loci* SSRs resultaron altamente polimórficos tanto en adultos como en renovales (Figura 11; Tabla 6). Para un tamaño total de 60 adultos y 59 renovales se detectó un promedio de 28 alelos por locus, de los cuales el número efectivo estuvo comprendido en el rango entre 4 y 21 alelos por locus con una media $N_E \cong 11$ en ambos estadios (Tabla 6). Además, se detectó un elevado número de alelos únicos por locus, tanto en los adultos como en los renovales. En conjunto, el bajo N_E en relación al N_A , así como el valor del N_{AU} , indicaron la presencia de un elevado número de alelos a baja frecuencia en ambos estadios. En promedio, el número de alelos únicos por locus ($N_{AU} = 8$) detectado en cada estadio, revela la presencia de alelos únicos en los ocho *loci* que difieren entre adultos y renovales (Tabla 6). Entre estadios no se evidenciaron diferencias significativas en las estimaciones de riqueza alélica (R : $p = 0,12$), heterocigosis observada (H_O : $p = 0,57$) y heterocigosis esperada (H_E : $p = 0,27$). El locus *Ac11.2* presentó el menor valor de R , siendo este cercano a la mitad del valor de R promedio en ambos estadios, mientras que el locus *Ac157.1* presentó el mayor valor de R en ambos estadios. El elevado valor de R a nivel del locus *Ac157.1*, sería consecuencia del amplio rango de variación en el tamaño de sus alelos. El locus *Ac41.1* presentó el mayor déficit de heterocigosis observada conjuntamente con el mayor coeficiente de endogamia y la mayor frecuencia de alelos nulos (r) (Tabla 6).

5.3. Análisis de la estructura genética poblacional y determinación de sus posibles cambios entre estadios

Se infirió la estructura genética poblacional mediante algoritmos de agrupamiento bayesiano para determinar el número más probable de agrupamientos o *clusters* empleando un modelo de tipo *admixture* de forma independiente para cada estadio. Se estimó el número más probable de *clusters* en función de la distribución ΔK vs. K , el cual fue $K = 3$ en adultos y $K = 5$ en renovales (Figura 12). El número real de *clusters* presentó soporte en base a la probabilidad posterior de asignación de individuos a los *clusters* genéticos [$\text{LnP}(D | K)$]. En adultos, $K=3$ fue determinado por la tasa de cambio ΔK , la cual resultó marcadamente superior a los demás valores de K . En tanto que la probabilidad posterior $\text{LnP}(D | K=3)$, no presentó marcadas diferencias con las demás probabilidades. Por su parte, los renovales presentaron una distribución bimodal de ΔK vs. K con un valor de ΔK ligeramente superior para $K=5$ y una elevada probabilidad posterior de asignación de individuos a 5 *clusters* (Figura 12). Dentro de cada estadio los

individuos fueron asignados a distintos *clusters* indicando una fuerte estructuración genética dentro de cohortes (Figura 13).

El análisis de varianza molecular (AMOVA) permitió estudiar la distribución de la variabilidad genética entre los distintos *clusters*, así como la significancia estadística de la estructura genética detectada. Las fuentes de variación fueron definidas en base a la asignación de los individuos mediante el análisis bayesiano a tres *clusters* en adultos y cinco en renovales. El AMOVA reveló diferencias estadísticamente significativas a un nivel de $p < 0,05$. La mayor parte de la variación total se encuentra distribuida principalmente dentro de *clusters*, sin embargo en el nivel entre *clusters* se encuentra el 6% de la variación total en adultos y el 14% de la variación total en renovales (Tabla 7). Estos porcentajes de variación resultan informativos dada la corta distancia entre los individuos asignados a los distintos *clusters*. Sumado a ello, el índice de fijación F_{ST} resultó estadísticamente significativo a un nivel del 95% ($p < 0,05$), y se detectó una moderada estructuración genética en adultos ($F_{ST} = 0,06$) y estructura genética relativamente elevada en renovales ($F_{ST} = 0,14$) (Tabla 7). Por su parte, los índices de fijación estimados con exclusión de alelos nulos mediante el método ENA fueron $F_{ST} = 0,05$ (IC: 0,03 – 0,07) en adultos y $F_{ST} = 0,12$ (IC: 0,09 – 0,15) en renovales, indicando que la presencia de alelos nulos tendría un bajo efecto en las estimaciones del índice de fijación.

La media armónica del índice D de Jost permitió evaluar la diferenciación alélica relativa dentro y entre *clusters*. Este parámetro resultó estadísticamente significativo para ambos estadios, siendo más elevado en renovales ($D = 0,70$) que en adultos ($D = 0,31$) (Tabla 7). Esto se traduce en que los renovales de diferentes *clusters* presentan una marcada diferenciación alélica con un bajo número de alelos compartidos entre *clusters*, mientras que los individuos adultos asignados a cada uno de los tres *clusters* comparten más de la mitad de sus alelos (Tabla 7).

Dentro de cada *cluster*, la distancia euclidiana entre pares de individuos estuvo comprendida en el rango $d = [1,7 - 361,7m]$ con un promedio $\bar{d} = 153m$ (Tabla 8). Las menores distancias fueron registradas entre pares de renovales (Tabla 8), revelando que el agrupamiento de individuos en función de sus genotipos multilocus y sus frecuencias alélicas condice con cortas distancias espaciales entre estos individuos, los cuales a su vez presentaron un patrón de distribución espacial agregada a diferencia de los adultos de un mismo *cluster* que se presentaron distribuidos de manera más heterogénea en el fragmento poblacional estudiado (Figura 13).

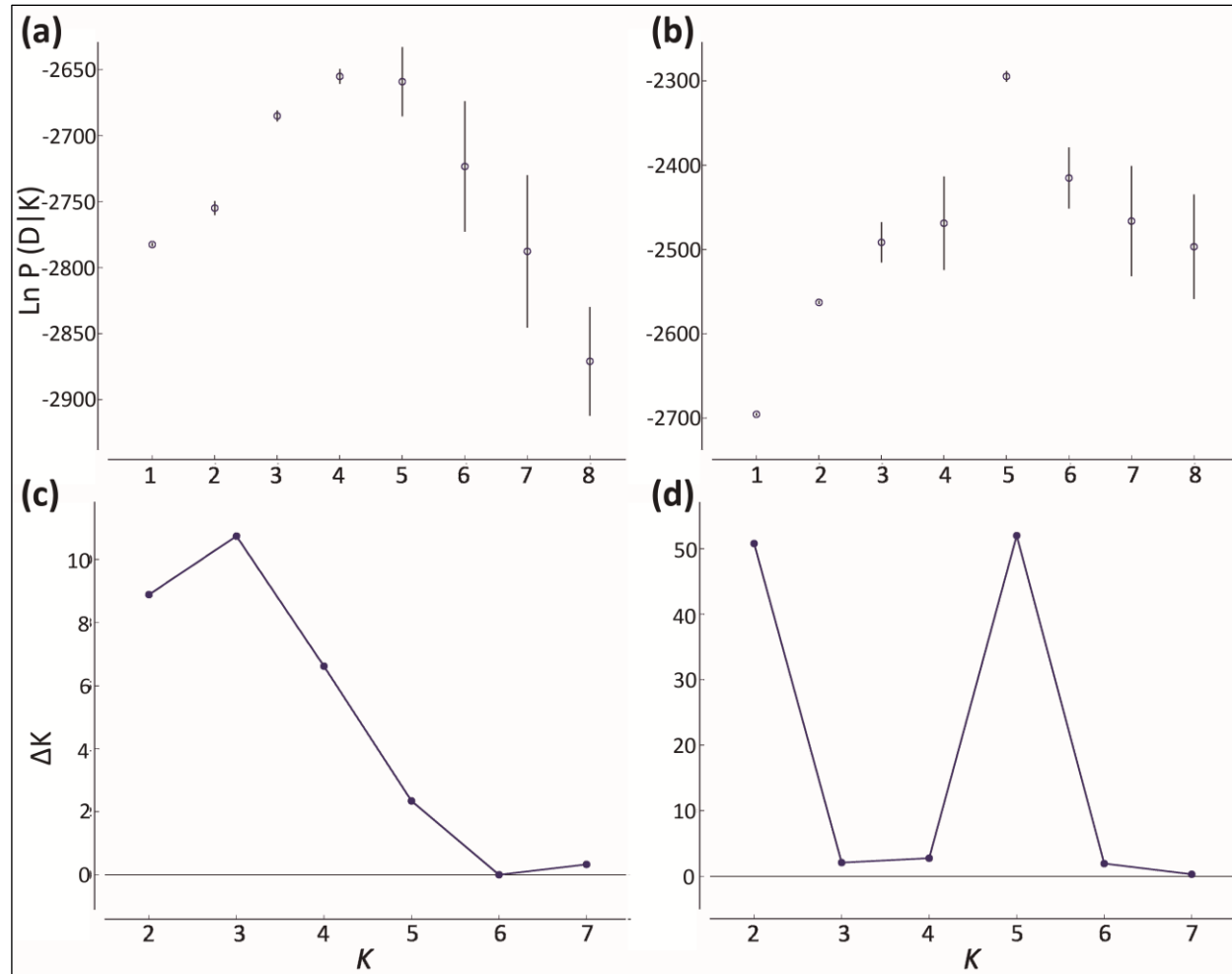


Figura 12. Probabilidad posterior de asignación de individuos a K clusters en a) adultos y b) renovales y aplicación del método *ad hoc* propuesto por Evanno *et al.* (2005) para la identificación del número real de clusters en c) adultos y d) renovales de *A. colubrina* var. *cebil*.

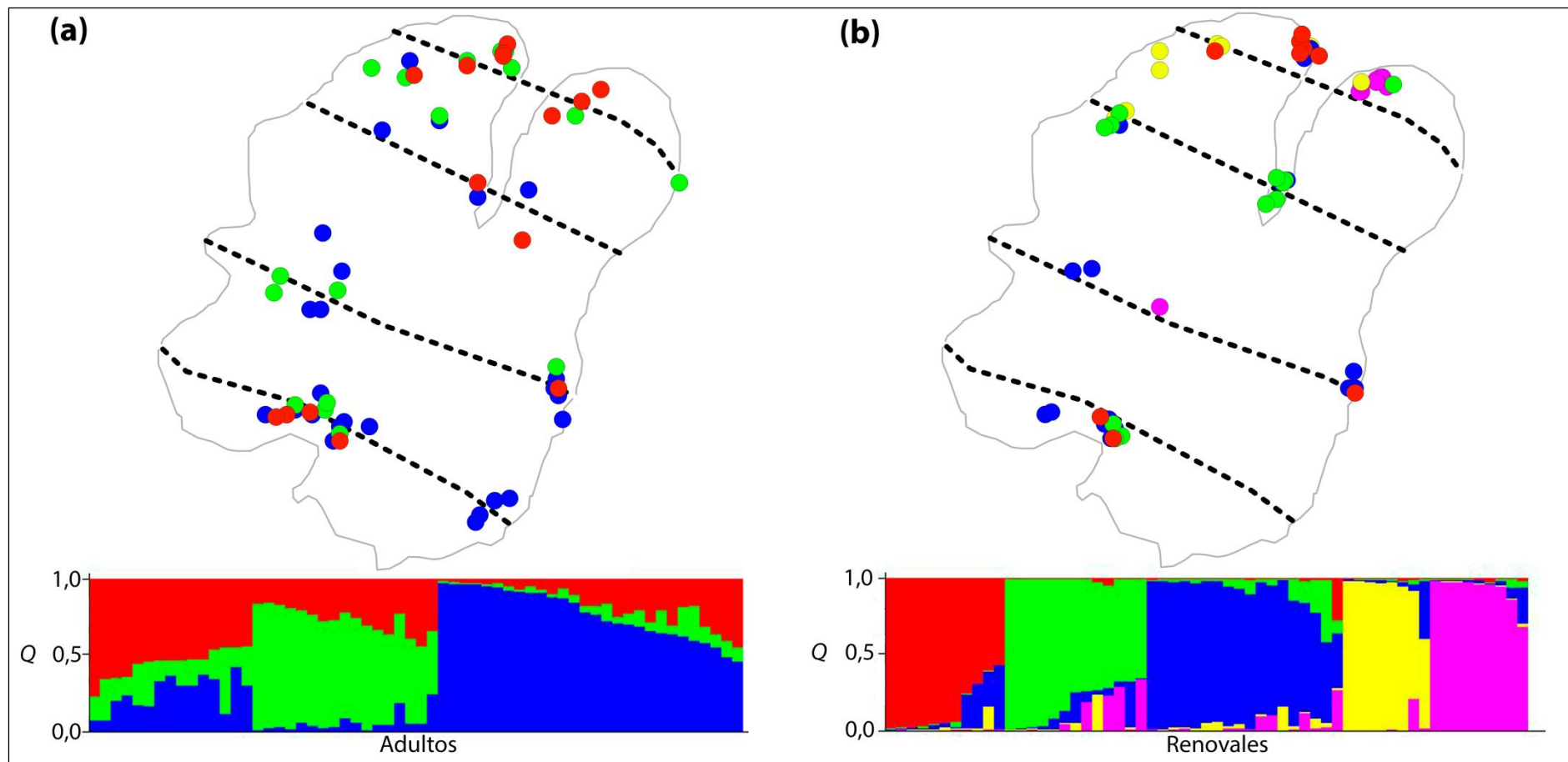


Figura 13. Asignación de los individuos a los diferentes *clusters* mediante análisis bayesiano en los dos estadios: a) adultos ($K=3$) y b) renovales ($K=5$). Se indica mapas de la asignación a *clusters* y diagramas de barra ordenados en función de las proporciones de asignación *admixture* (Q) de cada individuo a los *clusters*.

Tabla 7. Porcentajes de variación, índices de fijación y diferenciación alélica entre *clusters* de *A. colubrina* var. *cebil*

		<i>Adultos (K = 3)</i>	<i>Renovales (K = 5)</i>
Porcentajes de Variación	Entre <i>clusters</i>	5,716	14,164
	Dentro de <i>clusters</i>	94,284	85,836
Índices de fijación	$F_{ST}^{(1)}$	0,057*	0,142*
	$F_{ST}^{(2)}$	0,045 [0,025-0,067]	0,119 [0,090-0,147]
Diferenciación alélica	D (Jost)	0,309* [0,245-0,380]	0,698* [0,621-0,771]

⁽¹⁾Todos los alelos incluidos. ⁽²⁾Alelos nulos excluidos. Valores seguidos por * fueron estadísticamente significativos a un nivel de $p < 0,05$; los intervalos de confianza al 95% (IC) se indican entre corchetes.

A nivel de los agrupamientos definidos mediante el análisis bayesiano, la diversidad genética fue elevada para cada estadio dentro de *clusters*, mientras que la riqueza alélica entre *clusters* dentro de cada estadio no presentó marcadas diferencias (Tabla 8). La mayor riqueza alélica fue detectada en el *cluster* 3 de adultos y en el *cluster* 3 de renovales ($R=6,63$ y $6,14$, respectivamente), presentando ambos *clusters* el mayor número de individuos asignados y un elevado número de alelos prevalentes, lo cual se vio reflejado en niveles de heterocigosis elevada en relación a los otros *clusters*. Los adultos asignados al *cluster* 1 se distribuyeron por todo el fragmento (Figura 13), alcanzando las mayores distancias euclidianas entre individuos dentro de *cluster* (Tabla 8). Estos individuos presentaron orígenes compartidos con los adultos asignados a los otros dos *clusters* (Figura 13) y un menor coeficiente de endogamia en relación al detectado en los *clusters* 2 y 3 de adultos (Tabla 8). Por su parte, los niveles de endogamia resultaron elevados dentro de cada uno de los *clusters* tanto para adultos como para renovales (Tabla 8), respaldando los resultados obtenidos en la caracterización de la diversidad genética para cada estadio y permitiendo descartar la presencia de un efecto Wahlund como causante de las diferencias en los niveles de endogamia detectados en la población estudiada con respecto a lo esperado en poblaciones con apareamiento aleatorio.

5.4. Caracterización de la estructura genética espacial a escala fina

A escala local, en concordancia con los modelos de aislamiento por distancia (IBD), se detectó una significativa disminución lineal de los coeficientes de parentesco estimados con el incremento de la distancia geográfica entre individuos. La estructura genética espacial fue analizada de forma independiente en adultos y renovales, detectándose EGEF significativa para ambos estadios dentro de la población con elevados niveles de parentesco o coancestría, los cuales fueron mayores en renovales ($F_{ij} = 0,107$) que en adultos ($F_{ij} = 0,044$). Los árboles vecinos, separados por cortas distancias, estuvieron altamente relacionados presentando elevados niveles de parentesco tanto en renovales como en adultos. En el primer intervalo de distancia (hasta 10m), los renovales presentaron niveles de parentesco cinco veces mayores a los niveles detectados en adultos ($F_1 = 0,328$; $F_1 = 0,059$, respectivamente), siendo además superiores a los valores esperados para hermanos completos (es decir, $F_1 = 0,25$) (Tabla 9; Figura 14).

Los renovales presentaron un marcado decrecimiento en los valores de F_{ij} con el incremento de la distancia, particularmente en el tercer intervalo de distancias ($I_3: >20$ –

Tabla 8. Diversidad genética y rangos de distancia espacial entre pares de individuos de *A. colubrina* var. *cebil* a nivel de *clusters*

	<i>Clusters</i>	<i>N</i>	<i>N_A</i>	<i>N_E</i>	<i>R</i>	<i>H_E</i>	<i>H_O</i>	<i>F_{IS}</i>	<i>F_{IS} (IIM)</i>	\bar{d}	<i>d</i> (mín. – máx.)
Adultos	1	15	10,75	6,69	4,94	0,807	0,539	0,34	0,270 [0,06-0,38]	188,80	(2,48 – 361,70)
	2	17	10,13	7,01	4,75	0,762	0,485	0,37	0,311 [0,13-0,46]	179,19	(4,04 – 340,22)
	3	28	22,13	19,70	6,63	0,942	0,558	0,41	0,378 [0,30-0,45]	157,33	(2,47 – 348,59)
Total		60	28,38	12,90	6,02	0,892	0,533	0,41	0,393 [0,35-0,43]	175,11	(3,00 – 350,17)
Renovales	1	11	7,75	7,15	4,46	0,710	0,510	0,29	0,144 [0,03-0,28]	153,83	(2,48 – 344,12)
	2	13	8,25	5,53	4,50	0,749	0,519	0,32	0,267 [0,13-0,39]	162,21	(1,65 – 350,35)
	3	18	16,63	15,53	6,14	0,905	0,616	0,33	0,253 [0,13-0,36]	170,36	(1,65 – 349,67)
	4	8	6,63	5,96	4,70	0,791	0,391	0,52	0,295 [0,00-0,50]	97,50	(3,78 – 189,44)
	5	9	6,13	5,44	4,24	0,747	0,583	0,23	0,070 [0,00-0,21]	70,16	(1,65 – 283,35)
Total		59	27,75	12,80	6,07	0,901	0,542	0,40	0,344 [0,28-0,42]	130,81	(2,24 – 303,38)

N: Número de individuos por *cluster*; *N_A*: Número promedio de alelos por locus; *N_E*: Numero efectivo de alelos; *R*: Riqueza alélica; *H_E*: Heterocigosis esperada; *H_O*: Heterocigosis observada; *F_{IS}*: coeficiente de endogamia; *F_{IS} (IIM)*: coeficiente de endogamia corregido por la presencia de alelos nulos con sus correspondientes intervalos de confianza del 95%; \bar{d} : distancia euclidiana promedio expresada en metros y *d* (mín. – máx.): rango de distancias entre individuos.

Tabla 9. Estructura genética espacial a escala fina (EGEF) en adultos y renovales de *A. colubrina* var. *cebil*

	<i>N</i>	<i>F</i> ₁	<i>b</i>	<i>Sp</i>
Adultos	60	0,059* (0,028)	-8,7×10 ⁻³ * (2,9×10 ⁻³)	9,21×10 ⁻³ * (4,03×10 ⁻³)
Renovales	59	0,328* (0,148)	-15,4×10 ⁻³ * (2,8×10 ⁻³)	22,95×10 ⁻³ * (14,79×10 ⁻³)
Total	119	0,205* (0,082)	-7,4×10 ⁻³ * (0,9×10 ⁻³)	9,26×10 ⁻³ * (1,71×10 ⁻³)

N: Número de individuos; *F*₁: Coeficiente de parentesco de a pares en el primer intervalo de distancias (hasta los 10m); *b*: pendiente de regresión del coeficiente de parentesco de a pares en función del logaritmo de la distancia; *Sp*: estadístico *Sp*. Los valores seguidos por * fueron estadísticamente diferentes de cero ($p < 0,05$); Entre paréntesis se indica el error estándar (SE).

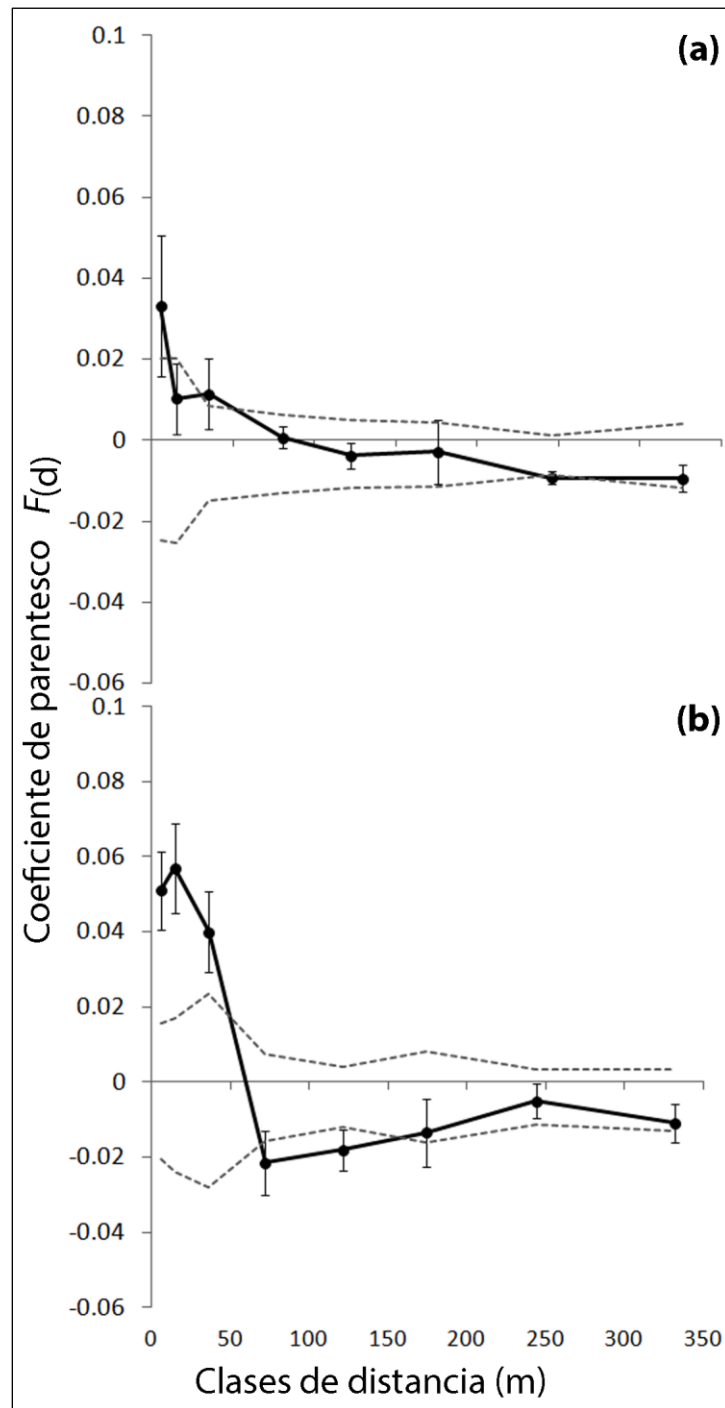


Figura 14. Correlogramas de estructura genética espacial a escala fina (EGEF) a) en adultos y b) en renovales del fragmento poblacional estudiado.

Se indican los coeficientes medios de parentesco multilocus [$F(d)$] para cada clase de distancia (d) y el intervalo de confianza del 95% (líneas punteadas) bajo la hipótesis nula de distribución aleatoria de genotipos obtenida mediante permutaciones de las ubicaciones espaciales de los individuos.

50m), a partir del cual los coeficientes F_{ij} presentaron valores menores a los esperados por azar. Esto podría estar relacionado con individuos emparentados agregados en el espacio, circunstancia que no fue observada a nivel del estadio adulto, en el cual, a partir del segundo intervalo de distancias (>10m) los valores de parentesco se encontraron dentro del rango esperado bajo la asunción de cruzamientos aleatorios en la población (Figura 14).

Los niveles de parentesco entre individuos tomados de a pares en función del logaritmo de la distancia espacial que los separa, fueron representados con una pendiente de regresión negativa significativa en ambos estadios, lo cual indica que las interpretaciones pueden realizarse en el marco de IBD. La pendiente de regresión fue más pronunciada en los renovales que en los adultos. Esto se vio reflejado en el estadístico Sp , que resultó 2,5 veces mayor en renovales que en adultos ($Sp = 0,023$ y $Sp = 0,009$, respectivamente), con una marcada EGEF detectada en renovales (Tabla 9).

5.5. Determinación del tamaño de vecindario y de la estructura familiar

Para la estimación de los parámetros que caracterizan la capacidad de dispersión de *A. colubrina* var. *cebil* en el fragmento poblacional estudiado, se asumió que la población se encuentra en equilibrio dispersión-deriva bajo los supuestos de IBD. Los niveles de dispersión alélica presentaron relación directa con la EGEF, debido a que su estimación se basa en la pendiente de la recta de regresión (b_{Ld} ; 0-500m) para la totalidad de los individuos adultos ($N = 60$), la cual a su vez es inversamente proporcional al tamaño de vecindario, es decir, que un menor tamaño de vecindario podrá ser esperado cuanto mayor sea la estructura genética espacial. El procedimiento empleado para la estimación de los parámetros de dispersión presentó convergencia para el rango de densidades efectivas considerando $D, D/4$ y $D/8$, mientras que no presentó convergencia empleando $D/2$ y $D/10$ (Tabla 10). La marcada EGEF detectada en adultos ($Sp \approx 0,01$) se vio reflejada en cortas distancias de dispersión alélica, siendo $\sigma_g = 5,3m$ y $\sigma_g = 17m$ las distancias de dispersión alélica alcanzadas considerando la mayor y menor densidad efectiva, respectivamente (Tabla 10).

El tamaño de vecindario (N_b) estimado a partir de la pendiente de regresión negativa significativa de los coeficientes de parentesco en función del logaritmo de la distancia entre pares de individuos, se encontró comprendido en el rango entre 108 y 138 individuos para una $De = 0,300$ y una $De = 0,038$, respectivamente (Tabla 10). De esta manera, la

Tabla 10. Distancias de dispersión y tamaños de vecindario. Parámetros de distancia de dispersión estimados en función de diferentes densidades efectivas de individuos adultos.

	<i>De</i> (ha⁻¹)	<i>N_b</i>	[95% IC]	SE	σ_g (m)	[95% IC]	SE
<i>De</i> = $D \cdot Ne/N$	<i>De</i> = 0,300	108	[95-145]	47,5	5,334	[5,027-6,198]	1,169
<i>De</i> = $D/2 \cdot Ne/N$	<i>De</i> = 0,150	NC	-	-	NC	-	-
<i>De</i> = $D/4 \cdot Ne/N$	<i>De</i> = 0,075	112	[106-118]	49,6	10,891	[10,593-11,190]	2,246
<i>De</i> = $D/8 \cdot Ne/N$	<i>De</i> = 0,038	138	[129-147]	43,4	16,995	[16,442-17,548]	2,786
<i>De</i> = $D/10 \cdot Ne/N$	<i>De</i> = 0,030	NC	-	-	NC	-	-
Promedio		119			11,073		

De: densidad efectiva, Número de individuos reproductivos por ha de una población en equilibrio dispersión-deriva en un espacio bidimensional bajo dispersión isotrópica. Estimación basada en la pendiente de regresión entre σ_g y $20\sigma_g$ mediante un procedimiento iterativo. *N_b*: Tamaño de vecindario. σ_g : Distancias de dispersión alélica. Se indican los intervalos de confianza del 95% y el error estándar (SE) obtenidos mediante la estimación de Jackknife para todos los *loci*. NC: sin convergencia.

dispersión alélica restringida, aumentaría las probabilidades de que se produzca apareamiento entre individuos emparentados traduciéndose en un bajo número de individuos conformando la unidad del vecindario.

La reconstrucción de la estructura familiar consistió en la detección de pares de individuos progenitor-progenie por un lado y pares de hermanos por otro. Los pares de individuos fueron asignados a los distintos grupos de estructura familiar con una probabilidad promedio mayor a 0,75. El análisis de parentesco permitió la identificación de dos pares de individuos implicados en relaciones progenitor-progenie con una distancia euclidiana promedio de 111,6m entre ellos (Tabla 11a; Figura 15a).

En cuanto a la detección de individuos asignados a grupos de hermanos, de un total de 3.600 comparaciones entre pares de adultos, un par de hermanos completos (FS ~ 0,06%) y cinco pares de medio-hermanos (HS ~ 0,28%) fueron identificados (Tabla 11b; Figura 15b), en tanto que, de un total de 3.481 comparaciones, cinco y catorce pares de renovales, estuvieron involucrados en las relaciones de hermanos completos (FS ~ 0,29%) y medio-hermanos (HS ~ 0,80%), respectivamente (Tabla 11c; Figura 15c).

Las distancias euclidianas entre adultos asignados a grupos de hermanos fueron mayores a las distancias detectadas entre renovales pertenecientes a grupos de hermanos. En adultos, la distancia promedio entre hermanos fue de 165,5m (Tabla 11b; Figura 15b), en tanto que, en renovales el rango de distancias varió entre ~1 y 15m entre FS, con un promedio de 7,5m, mientras que la distancia entre HS estuvo comprendida en un rango más amplio y varió entre 3,8 y 263,5m, con un promedio de 78,4m (Tabla 11c; Figura 15c).

Los renovales asignados a grupos de FS se localizaron en la zona del fragmento en la cual se encontró la mayor proporción de adultos HS (Figura 15), es decir que la probabilidad de detección de alelos idénticos por descendencia en los renovales sería mayor como producto del apareamiento entre individuos adultos emparentados.

Tabla 11. Estructura familiar a partir de relaciones entre pares de individuos a) progenitor-progenie, b) adultos hermanos completos/medio-hermanos y c) renovales hermanos completos/medio-hermanos de *A. colubrina* var. *cebil* en el fragmento poblacional estudiado

(a)	Progenitor	Progenie	Probabilidad	Distancia euclidiana
PP	T5A12	T4R12	0,763	101,06
	T5A13	T4R4	0,970	122,10
(b)	Adultos ID1	Adultos ID2	Probabilidad	Distancia euclidiana
FS	T4A6	T5A14	0,940	130,32
	T7A6	T7A15	0,916	76,49
	T7A2	T7A3	0,933	94,37
HS	T7A1	T7A5	0,864	156,52
	T5A1	T7A18	0,897	263,60
	T5A6	T7A7	0,802	271,73
(c)	Renovales ID1	Renovales ID2	Probabilidad	Distancia euclidiana
FS	T7R22	T7R23	0,958	1,01
	T6R12	T6R13	0,994	2,47
	T7R2	T7R3	0,998	8,09
	T7R19	T7R21	0,967	11,20
	T7R16	T7R22	0,969	14,95
HS	T6R10	T6R11	0,880	3,78
	T7R20	T7R21	0,768	5,78
	T7R2	T7R6	0,806	9,03
	T7R3	T7R7	0,880	19,86
	T7R2	T7R7	0,858	20,12
	T7R11	T7R14	0,938	44,85
	T7R13	T7R16	0,905	65,96
	T5R5	T5R6	0,881	73,12
	T7R13	T7R22	0,920	80,85
	T4R1	T6R2	0,890	104,46
	T7R3	T7R6	0,953	129,03
	T4R1	T6R4	0,832	136,45
	T6R7	T6R13	0,839	140,68
T5R6	T7R7	0,983	263,50	

Pares de individuos identificados como progenitor-progenie (PP), hermanos completos (FS) o medio-hermanos (HS) con una probabilidad > 0,75. Distancias expresadas en metros.

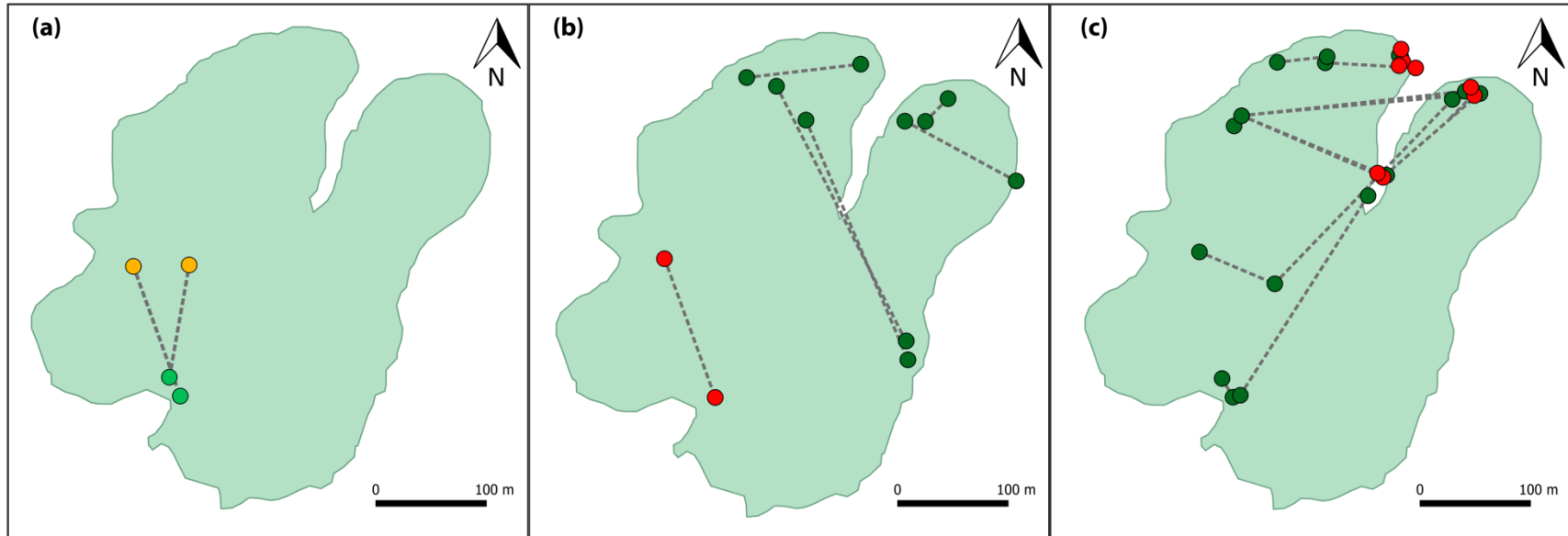


Figura 15. Distancias lineales entre a) progenitor-progenie, b) adultos hermanos completos/medio-hermanos y c) renovales hermanos completos/medio-hermanos.

Se indica en línea punteada las distancias lineales entre pares de progenitor - progenie (● - ●), medio-hermanos (●) y hermanos completos (●).

5.6. Identificación de posibles eventos demográficos recientes

Mediante el análisis bayesiano ABC se compararon diferentes escenarios demográficos que podrían explicar los patrones de diversidad genética observados en el fragmento poblacional estudiado y se estimó el soporte estadístico relativo para cada uno de los escenarios definidos. Mediante análisis de componentes principales a partir de los estadísticos de resumen y los rangos de parámetros definidos, se obtuvo la distribución *a priori* del conjunto de datos observados en relación al conjunto de datos simulados para cada escenario (Figura 16). En base a las probabilidades *a posteriori* de las comparaciones entre escenarios, se detectaron señales de una expansión histórica datada hace aproximadamente 18.000 años como el escenario demográfico más probable (Figura 17; Anexo II).

La distribución posterior de los parámetros y el intervalo de confianza del 95% para el escenario que presentó mayor probabilidad correspondió a un tamaño poblacional actual ~10 veces mayor que el tamaño poblacional ancestral. Un tamaño poblacional $N_0 = 7.110$ individuos (IC: 3.020 - 9.900) caracterizó a la población actual, en tanto que el tamaño poblacional ancestral fue $N_1 = 712$ individuos (IC: 48 - 4.360). El tiempo de expansión fue datado en $t = 357$ generaciones (IC: 110 - 676) (Figura 17; Anexo II).

En consonancia con los resultados obtenidos mediante el enfoque de inferencia bayesiana ABC, no se detectaron señales de cuello de botella recientes en adultos bajo el modelo TPM. Por el contrario, valores negativos estadísticamente significativos de T_2 (-8,385, $p < 0.05$) indicaron una expansión reciente. Por su parte, la estimación de la proporción M de Garza-Williamson, la cual detecta reducciones históricas en el tamaño poblacional, reveló una leve evidencia de cuellos de botella ($M = 0,37 \pm 0,12$) al considerar la diferencia entre los *clusters* de adultos como fuentes de variación.

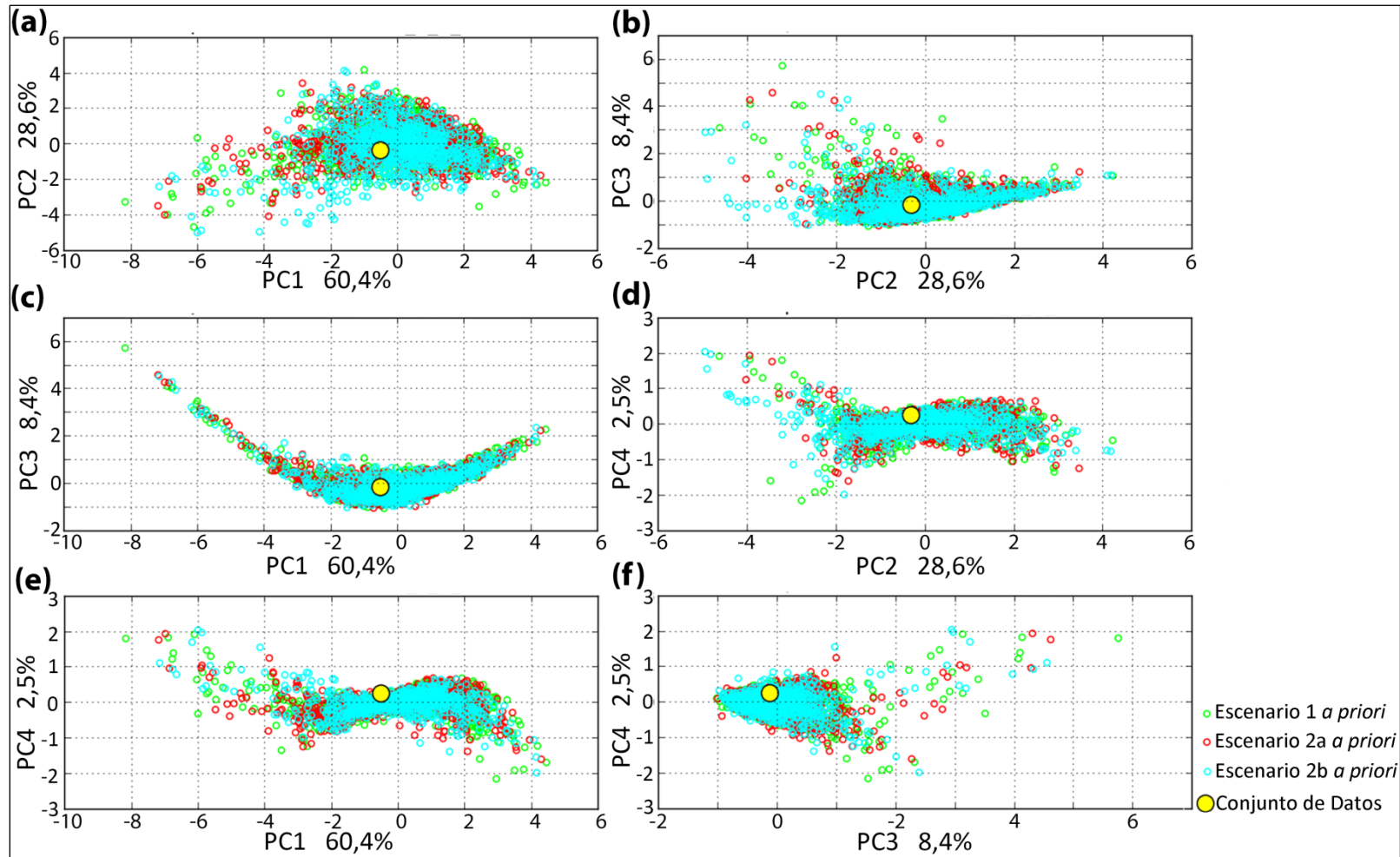


Figura 16. Distribución *a priori* del conjunto de datos observados en relación al conjunto de datos simulados para cada escenario mediante análisis de componentes principales.

Se indican las componentes correspondientes a los estadísticos de resumen: Número de alelos (PC1); Diversidad genética (PC2); Varianza media en el tamaño poblacional (PC3); M promedio de Garza-Williamson (PC4).

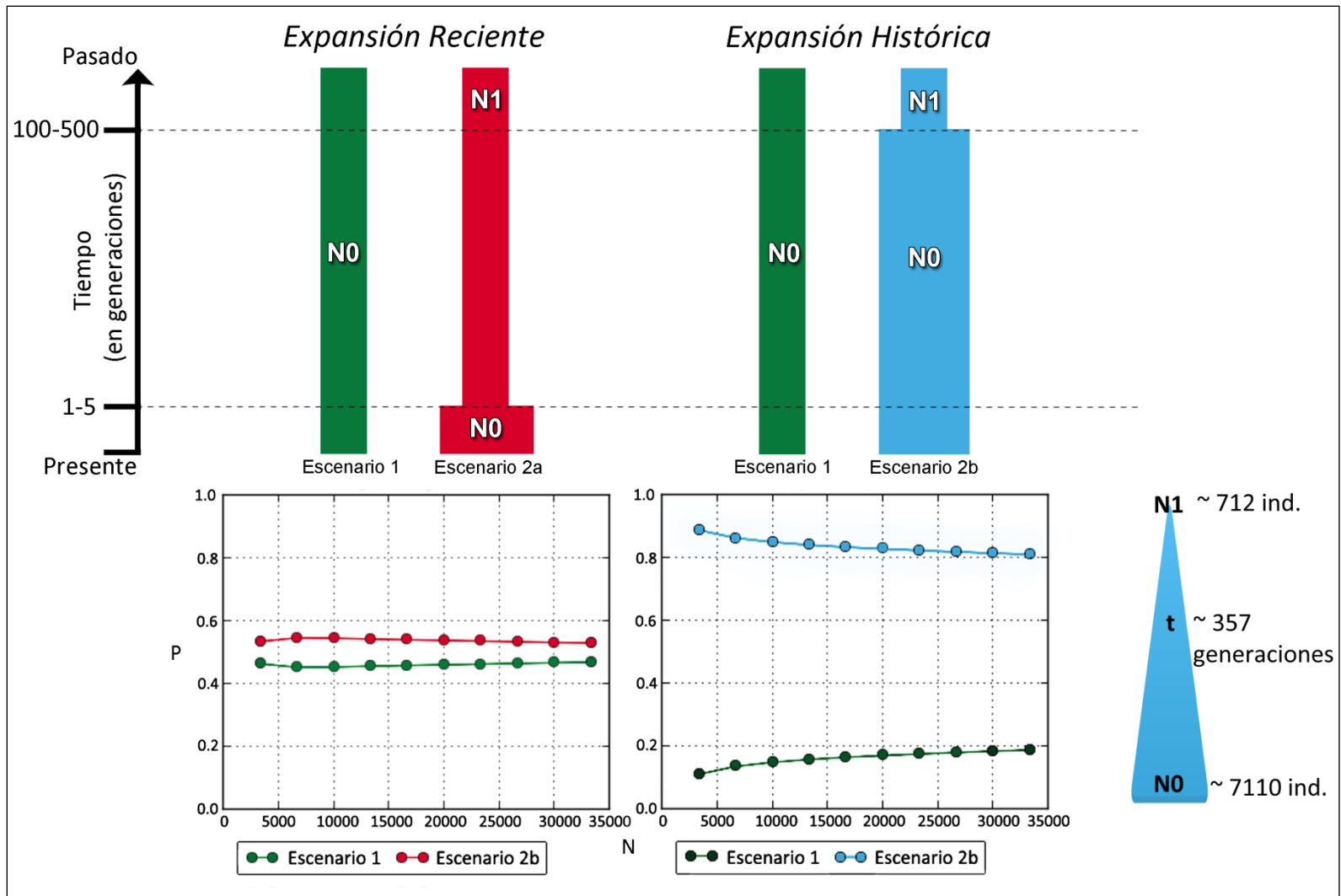
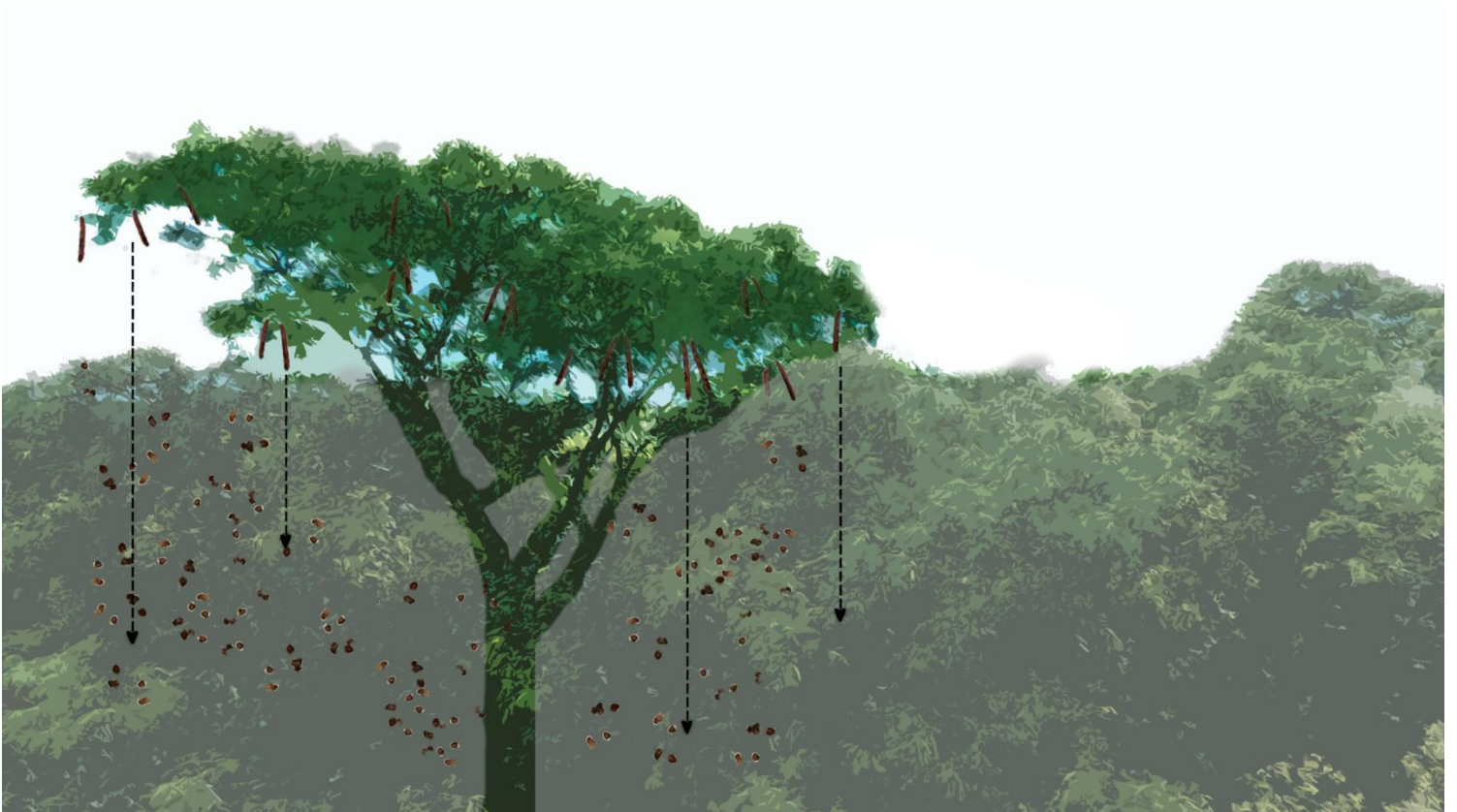


Figura 17. Comparación de los modelos demográficos mediante ABC. Escenario 1: tamaño poblacional constante, Escenario 2a: cambio reciente en el tamaño poblacional, y Escenario 2b: cambio histórico en el tamaño poblacional. Se indican las probabilidades *a posteriori* de las comparaciones entre escenarios (1 vs. 2a y 1 vs. 2b).

Discusión



6. DISCUSIÓN

En las poblaciones naturales, la distribución no aleatoria de los genotipos en el espacio puede resultar de la acción conjunta de diversos procesos que incluyen tanto las presiones de selección como los eventos demográfico-históricos, lo cual define la estructura genética espacial. En paisajes fragmentados, los patrones espaciales no aleatorios de la variación genética de las poblaciones de especies arbóreas, se encuentran relacionados con los niveles de flujo génico mediado por polen y por semillas y el grado de parentesco entre pares de individuos a través del espacio y del tiempo, permitiendo hacer inferencias acerca de cuáles han sido los procesos microevolutivos y eventos demográficos subyacentes a tales patrones de distribución espacial de la variación genética.

El paisaje fragmentado del Sur de Misiones provee un marco ideal para desarrollar estudios de análisis de la estructura genética espacial de las poblaciones arbóreas que lo habitan y las características de distribución que presenta *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*, permitió la búsqueda de respuesta a los interrogantes planteados al inicio de este trabajo.

6.1. Diversidad genética de las diferentes cohortes

La diversidad genética, base de todo cambio evolutivo (Templeton, 2006), a nivel poblacional consiste en la sumatoria de la variación genética presente en los individuos que conforman una población (Young *et al.*, 1996). Caracterizar tal diversidad genética permite hacer inferencias acerca de los procesos microevolutivos que han operado sobre las poblaciones (Gillet *et al.*, 2005; Templeton, 2006). Una de las primeras estimaciones de la diversidad genética dentro de una población es el número de variantes alélicas por locus o multiplicidad alélica (Gillet *et al.*, 2005). En el fragmento poblacional de *A. colubrina* var. *cebil* estudiado se detectó una elevada diversidad genética y riqueza alélica ($R = 6,05$), similares a los niveles detectados en trabajos previos en poblaciones de esta especie a escalas geográficas más amplias ($R = 6,75$) (Barrandeguy *et al.*, 2014) así como a la diversidad genética detectada en otras especies arbóreas de los BSEN ($R = 6,77-7,70$) (Collevatti *et al.*, 2014).

Diferentes estudios previos (Hamrick *et al.*, 1992; Loveless, 1992; White *et al.*, 2007; Berens *et al.*, 2014; Duminil *et al.*, 2016) han revelado que las especies arbóreas cuentan con una elevada variación genética, en mayor medida distribuida dentro de las poblaciones. Esto se debe a ciertos caracteres de la historia de vida de los árboles, tales

como la longevidad y los sistemas de fecundación en los cuales predominan las tasas de fecundación cruzada (Hamrick y Godt, 1996; Petit y Hampe, 2006). La elevada diversidad genética detectada puede ser interpretada como el resultado de la acción sinérgica de altos niveles de flujo génico entre poblaciones y altas tasas de mutación en los *loci* SSR. Elevados niveles de polimorfismo son esperables cuando se analiza la diversidad genética mediante marcadores SSR nucleares, dado que las tasas mutacionales en estos *loci* pueden variar entre 10^{-2} y 10^{-6} mutaciones por locus por generación (con un promedio de 5×10^{-4}), generando elevada multiplicidad alélica, clave en estudios genético-poblacionales de procesos que actúan a escalas de tiempo evolutivas (Schlötterer, 2000) y además, al tratarse de marcadores neutrales, sus frecuencias no se verían influidas por la acción de la selección natural (Avice, 2004). Si la elevada multiplicidad alélica es representada por alelos cuyas frecuencias se distribuyen de forma uniforme en la población, el número efectivo de alelos será igual al número promedio de alelos por locus (Gillet *et al.*, 2005). De esta manera, al detectarse un número efectivo de alelos menor al número promedio de alelos por locus, tanto en adultos como en renovales, se evidencia la existencia de alelos presentes a baja frecuencia.

El mayor déficit de heterocigosis detectado a nivel del locus *Ac41.1*, en conjunción con el mayor coeficiente de endogamia a nivel de este locus en ambos estadios, podría ser explicado por la elevada frecuencia de alelos nulos o bien ser atribuido a una posible desviación de la neutralidad. Varios estudios han presentado evidencias de ausencia de neutralidad en *loci* SSRs (Nielsen *et al.*, 2006; Lazrek *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2011). En estudios genético-poblacionales en *A. colubrina* var. *cebil* se testó la neutralidad de los ocho *loci* SSRs analizados en el presente trabajo y se sugirió que la selección diversificadora influiría sobre la diversidad genética a nivel del locus *Ac41.1* (García *et al.*, 2014). Sin embargo, el posible comportamiento no neutral de este locus no se vio reflejado en la distribución de la diversidad genética ($N_A = 23$; $N_E = 10,2$; $R = 22,8$) en el fragmento poblacional estudiado.

Por su parte, se detectaron alelos únicos en los dos estadios analizados, de forma similar a lo detectado en adultos y plántulas de *Dicorynia guianensis* (Leguminosae) (Latouché-Hallé *et al.*, 2003). El número de alelos únicos en adultos de *A. colubrina* var. *cebil*, podría proveer evidencias de una pérdida de alelos presentes a baja frecuencia por reducción del tamaño poblacional y acción local de la deriva genética o por el muestreo aleatorio de gametas del acervo génico que dio origen a las generaciones de renovales estudiadas, aunque también, los alelos únicos podrían estar representados en los

renovales que no se incluyeron en este estudio. En tanto que, la presencia de alelos únicos en los renovales, es decir alelos que no se encuentran representados en los individuos adultos genotipificados, podría ser consecuencia de un aumento de alelos nuevos originados por mutación, ser el resultado de flujo génico mediado por polen a partir de una fuente externa al fragmento poblacional estudiado, o bien, dado que la detección de alelos presentes a baja frecuencia está asociada al tamaño muestral, los alelos únicos en renovales podrían estar representados en individuos adultos no incluidos en el estudio.

La elevada diversidad genética y riqueza alélica, así como el elevado número de alelos presentes a baja frecuencia detectado en el fragmento poblacional serían el reflejo de flujo génico mediado por polen a partir de una fuente externa al fragmento poblacional estudiado. De esta manera, dado el tipo de dispersión autocórica de la especie, puede esperarse que la dispersión de polen dentro del fragmento sea responsable de mantener elevados niveles de diversidad genética en la población.

6.2. Estructura genética poblacional

En poblaciones naturales, la fragmentación o la heterogeneidad del hábitat y la presencia de barreras al flujo génico pueden subdividir a las poblaciones en grupos discretos que gradualmente pueden separarse y evolucionar de forma independiente (Schwartz y McKelvey, 2009). Debido a que el apareamiento por proximidad y el aislamiento por barreras pueden ocurrir simultáneamente dentro de las poblaciones, ambos factores deben ser considerados cuando se analizan agrupamientos de individuos y se efectúan comparaciones entre grupos de individuos que presentan distintos grados de aislamiento en un gradiente de distancias (Manel *et al.*, 2003; Musiani *et al.*, 2007).

Es posible caracterizar la distribución geográfica de la variación genética mediante diversos métodos de análisis de la estructura genética espacial (Epperson, 2003). Ha sido ampliamente probada la utilidad del análisis de varianza molecular (AMOVA) para evaluar la distribución espacial de la variación genética partiendo de un número conocido de poblaciones (Jombart *et al.*, 2008). Sin embargo, los análisis de varianza molecular se basan en el modelo de islas, el cual asume que las poblaciones se encuentran en equilibrio flujo génico-deriva genética, constituyendo un modelo nulo que puede presentar sesgos ante la presencia de aislamiento por distancia (IBD) por lo cual es necesario, en primera instancia, probar si un agrupamiento jerárquico es consecuencia de IBD (Meirmans *et al.*, 2012). Los patrones de IBD resultantes de dispersión restringida y de eventos demográfico-históricos, en general dan lugar a un

gradiente en las frecuencias alélicas en función de la distancia (Rousset, 1997). La detección de discontinuidades genéticas en ese gradiente puede ser abordado mediante la aplicación de análisis de inferencia bayesiana (Pritchard *et al.*, 2000). Mediante los métodos basados en modelos de agrupamiento bayesiano, la distribución aleatoria de individuos y de sus alelos en el espacio, permite delimitar a las poblaciones (Schwartz y McKelvey, 2009). Además, ante la presencia de gradientes consecuencia de apareamiento por proximidad, el análisis bayesiano (sensible a los patrones de IBD) detecta múltiples y diferentes números de *clusters* (Coulon *et al.*, 2006; Schwartz y McKelvey, 2009; Meirmans *et al.*, 2012). De esta manera, en este trabajo se adoptó un enfoque secuencial de detección de *clusters* genéticos y evaluación de IBD, seguidos por la aplicación de métodos no paramétricos de análisis de varianza basados en distancias genéticas, para inferir la acción de procesos microevolutivos y/o eventos demográficos sobre los posibles patrones de estructura genética espacial. Dado que existe un gran número de procesos ecológicos, geográficos, demográficos y estocásticos que afectan la distribución de la variación genética a diferentes escalas espaciales, el enfoque empleado incluyó la comparación de la estructura genética espacial entre diferentes estadios del ciclo de vida de *A. colubrina* var. *cebil* con el fin de analizar los factores subyacentes a las diferencias temporales en la estructura genética poblacional.

Mediante la aplicación de métodos basados en modelos, los individuos de *A. colubrina* var. *cebil* del fragmento poblacional estudiado fueron asignados a *clusters* genéticos diferenciados. Los adultos fueron asignados a tres *clusters*, en tanto que los renovales fueron asignados a cinco *clusters*. Si bien se considera que el tamaño de la muestra tanto de individuos como de *loci* puede influir sobre el rendimiento del análisis de estructura genética poblacional (Evanno *et al.*, 2005), las diferencias estadísticamente significativas detectadas entre *clusters* respaldaron su definición. La diversidad genética y la riqueza alélica dentro de *clusters* fue elevada, así como el nivel de alelos prevalentes, lo cual puede ser interpretado como una consecuencia de lo esperado bajo IBD al definir el patrón de estructura genética poblacional. El elevado número de alelos prevalentes, es decir alelos que presentan una alta probabilidad de ser transmitidos a las siguientes generaciones, permite esperar que el patrón de estructura genética poblacional detectado se mantenga bajo IBD.

La influencia de los procesos microevolutivos sobre la estructura genética de la variación dentro y entre *clusters* fue inferida a partir del índice F_{ST} revelando la diferenciación en las frecuencias alélicas entre grupos. La moderada estructuración genética detectada en adultos ($F_{ST} = 0,06$) y la estructura genética relativamente

elevada en renovales ($F_{ST} = 0,14$), dieron soporte a la existencia de diferenciación en las frecuencias alélicas entre *clusters*. Estos niveles de estructura genética también se vieron reflejados en los niveles de diferenciación alélica, con una proporción mayor a la mitad del total de alelos compartidos entre adultos de los tres *clusters* (D de Jost = 0,31) y una marcada diferenciación alélica con un bajo número de alelos compartidos entre renovales de los cinco *clusters* (D de Jost = 0,70). Así, a diferencia de los renovales, los individuos adultos asignados a un determinado *cluster*, en general presentaron orígenes compartidos con los adultos asignados a los otros *clusters*. El índice D de Jost se ajusta mejor a las estimaciones de la diferenciación alélica actual entre poblaciones, en tanto que F_{ST} constituye una mejor aproximación en la descripción de la influencia de eventos demográficos sobre la distribución de la variación genética. Por ello, la combinación de estos índices le otorga robustez a los análisis de estructura genética poblacional (Meirmans y Hedrick, 2011). Estos índices de estructura genética fueron cercanos a los obtenidos, a mayor escala espacial, en estudios previos de poblaciones naturales de *A. colubrina* var. *cebil* del Norte argentino ($F_{ST} = 0,11$; D de Jost = 0,37) (Barrandeguy, 2013; Barrandeguy *et al.*, 2014), en los cuales, a diferencia del presente estudio, las poblaciones fueron definidas *a priori* en función del origen geográfico de los individuos y no bajo criterio genético.

Los patrones de estructura genética espacial pueden reflejar autocorrelación espacial debida solo a IBD, o pueden además existir indicios de heterogeneidad genética espacial, es decir co-ocurrencia local de *clusters* genéticos diferenciados, resultantes de la acción de procesos históricos o contemporáneos, tales como múltiples oleadas de colonización/establecimiento poblacional o selección mediada por el hábitat (Torroba-Balmori *et al.*, 2017). De esta manera, la existencia de *clusters* genéticos diferenciados dentro del fragmento poblacional estudiado, sumada a la significativa estructura genética detectada, no puede ser explicada únicamente por la distribución en el espacio. La diferenciación genética entre *clusters* fue moderada, pero a la vez notable dada la corta distancia de separación entre los individuos asignados a los distintos *clusters* ($F_{ST} = 0,14$ en renovales y $F_{ST} = 0,06$ en adultos). Niveles similares de estructura genética poblacional, diferenciación genética a escala local y heterogeneidad genética espacial fueron detectados en otras especies de árboles neotropicales, tales como en poblaciones de *Dicorynia guianensis*, especie anemocórica en la cual los patrones de EGE fueron explicados por la segregación espacial de los individuos (Latouche-Hallé *et al.*, 2003). En el presente estudio, el fragmento de bosque estudiado es relativamente homogéneo y no se ha detectado evidencia de características del hábitat subyacente a los *clusters*

genéticos diferenciados. Este hecho, en conjunto con la débil segregación espacial de los *clusters*, sugiere que los apareamientos no aleatorios constituyen el origen de los *clusters* genéticos diferenciados en *A. colubrina* var. *cebil*, lo cual podría deberse, a diferencias fenológicas entre los adultos en el fragmento boscoso. Sin embargo, la diversidad genética y la riqueza alélica dentro de *clusters* también resultaron elevadas tanto para adultos como para renovales, y no fueron significativamente diferentes entre generaciones, lo cual sugiere la presencia de un considerable número de árboles reproductivos dentro de cada *cluster* contribuyendo al mantenimiento de los niveles de diversidad genética.

En poblaciones naturales de especies arbóreas, el agrupamiento de genotipos emparentados en el espacio a escala local, se origina por la compleja interacción de diferentes procesos microevolutivos (Epperson, 1990), procesos históricos de colonización (Ibrahim *et al.* 1996; Hewitt, 2000; Epperson y Chung, 2001; Jones *et al.*, 2006), perturbaciones de origen antrópico y/o de origen natural (Parker *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2002; Oddou-Muratorio *et al.*, 2004), así como diversas características biológicas intrínsecas de cada especie (Vekemans y Hardy, 2004; Troupin *et al.*, 2006). Dentro de poblaciones, el apareamiento entre individuos espacialmente cercanos genera patrones locales de autocorrelación genética, los cuales se ven reflejados en gradientes a través del paisaje y patrones de IBD, siendo de importancia analizar los patrones de autocorrelación a escala fina, dado que influyen sobre las discontinuidades genéticas espaciales (Schwartz y McKelvey, 2009; Meirmans *et al.*, 2012). El modo de dispersión de semillas por autocoria-anemocoria en *A. colubrina* var. *cebil* (Justiniano y Fredericksen, 1998) explicaría gran parte de la distribución agrupada de renovales asignados a un mismo *cluster*, los cuales se localizarían en el área de influencia de la copa del árbol madre. De esta manera, las diferencias en la estructura genética entre estadios podrían estar determinadas por el flujo génico restringido mediado por semillas, el agrupamiento espacial de los renovales, la acción local de la deriva genética y una fuerte estructura familiar.

El sistema de fecundación influye sobre las frecuencias alélicas y genotípicas modelando la estructura genética poblacional generación tras generación (Gillet *et al.*, 2005). Se ha demostrado que los árboles son predominantemente de fecundación cruzada, pero en algunas especies una variedad de condiciones puede conducir a un aumento de endogamia debido a apareamientos entre individuos emparentados y/o a cierto grado de autofecundación (Boshier, 2000). Se detectaron elevados niveles de endogamia en adultos y en renovales tanto a nivel poblacional como dentro de *clusters*,

aún luego de la corrección por alelos nulos [$F_{IS}(IIM) = 0,40$ y $0,34$, respectivamente]. Estos coeficientes de endogamia fueron marcadamente superiores a los detectados en otras especies de árboles polinizados por insectos, tales como *Dalbergia nigra* ($F_{IS} = 0,08$) principalmente polinizada por abejas (Buzatti *et al.*, 2012), *Cabranea canjerana* ($F_{IS} = 0,06$) polinizada por moscas (de Oliveira Melo *et al.*, 2014) o *Prunus africana* ($F_{IS} = 0,08 - 0,19$), cuyos principales polinizadores son himenópteros y dípteros (Berens *et al.*, 2014). Estudios previos han revelado un déficit de heterocigotas en poblaciones de *A. colubrina* var. *cebil* del norte argentino [$F_{IS}(IIM) = 0,03$] (Barrandeguy *et al.*, 2014), aunque no tan marcado como en el presente trabajo.

En especies arbóreas con flores hermafroditas, la frecuencia relativa de autofecundación entre todos los eventos de fecundación exitosos, tanto a nivel individual como poblacional, se define como la tasa de autofecundación, siendo su complemento la tasa de fecundación cruzada. La autofecundación, asociada a cambios en la estructura genotípica de la progenie, puede tener como consecuencia un rápido aumento en los niveles de endogamia en las poblaciones. Las tasas de autofecundación pueden ser estimadas en base a un modelo de apareamiento mixto partiendo del supuesto de que cada individuo de la progenie resulta de autofecundación o de fecundación cruzada aleatoria. Si bien en la naturaleza el apareamiento aleatorio es poco frecuente en árboles tropicales y subtropicales que se encuentren a baja densidad (Finkeldey y Hattemer, 2007), se espera que los resultados de las estimaciones a partir de un modelo de apareamiento mixto multilocus sean robustos frente a las restricciones de los supuestos del modelo (Ritland y Jain, 1981).

El apareamiento por proximidad constituye en las plantas una de las principales causas de endogamia, quedando en segundo lugar solo cuando las tasas de autofecundación son elevadas. La autofecundación es común en las leguminosas, y los estudios sobre la proporción de progenie resultado de autofecundación *versus* progenie resultado de fecundación cruzada en otras especies forestales de leguminosas neotropicales han revelado sistemas mixtos de apareamiento, por ejemplo en *Senna multijuga* (Ribeiro y Lovato, 2004), *Copaifera langsdorfii* (Tarazi *et al.*, 2013) y *Dipteryx alata* (Tambarussi *et al.*, 2017). En este contexto, es posible estimar la tasa de autofecundación aproximada a partir del coeficiente de endogamia utilizando $s = 2F_{IS} / (1 + F_{IS})$ (Hartl y Clark, 2007), lo cual sugiere un 51 - 56% de autofecundación en la población de *A. colubrina* var. *cebil* estudiada. Elevadas tasas de autofecundación y apareamiento preferencial entre árboles cercanos, tanto espacial como genéticamente, probablemente expliquen los altos coeficientes de endogamia detectados en *A. colubrina*

var. *cebil*. Además, en cuanto a los patrones de parentesco, los renovales presentaron una elevada proporción de hermanos completos y medio-hermanos. En conjunto, estos resultados sugieren que *A. colubrina* var. *cebil* presenta un sistema de apareamiento mixto que incluye fecundación cruzada y una proporción significativa de autopolinización.

Si se produce autofecundación o apareamiento entre individuos emparentados, los individuos posiblemente transmitirán una copia del mismo alelo, heredado a partir de un ancestro común, a su progenie, lo cual conduce a un aumento en la probabilidad de que dos alelos en la progenie sean idénticos por descendencia (Hedrick, 2000). La endogamia tiene como consecuencia un aumento de la homocigosis promedio en función del grado de parentesco entre los parentales. Cuando las especies evolucionan hacia altas proporciones de autofecundación, esto puede resultar en una disminución del tamaño efectivo poblacional y promover la acumulación de mutaciones deletéreas en detrimento de la adaptación (Charlesworth, 2003; Wright *et al.*, 2013). Las poblaciones pequeñas se tornan endogámicas más rápidamente que aquellas con mayor tamaño poblacional, lo cual se debe al sistema de fecundación y a los efectos de la deriva genética en poblaciones pequeñas (Ellstrand y Elam, 1993). Además de la autofecundación, el nivel de apareamiento entre parientes puede ser elevado en poblaciones pequeñas, lo cual en el caso del presente estudio también se vio reflejado en la heterogeneidad genética dentro del fragmento poblacional, probablemente asociada a apareamiento no aleatorio.

Así, la distribución geográfica de la variación genética sería explicada por la presencia de gradientes en las frecuencias alélicas y diferenciación genética entre *clusters* como consecuencia de apareamiento por proximidad. Además, el sistema de apareamiento mixto de *A. colubrina* var. *cebil*, el cual incluiría fecundación cruzada entre árboles espacial y genéticamente próximos, como también una proporción significativa de autopolinización, originarían los elevados niveles de endogamia detectados. Sin embargo, dentro de cada *cluster* la diversidad genética sería mantenida por la contribución al acervo génico poblacional por parte de un considerable número de adultos donantes de polen y semillas. Entre estadios las diferencias en la estructura genética estarían determinadas por el flujo génico restringido mediado por semillas, el cual genera una distribución espacial agrupada de los renovales y una fuerte estructura familiar.

6.3. Estructura genética espacial a escala fina

La diversidad genética moldeada por los procesos microevolutivos, en conjunto con el sistema de fecundación de la especie, ocurren en un espacio geográfico determinado. Considerar la influencia del contexto ecológico y de los caracteres de historia de vida sobre la estructura genética espacial a escala fina (EGEF), puede proveer información de relevancia para la interpretación de los patrones de distribución espacial de la variación genética, así como de los niveles de parentesco intrapoblacional de especies de árboles nativos. Los correlogramas de parentesco en función del logaritmo de la distancia pueden descomponerse en la pendiente y el componente de forma. La pendiente es informativa sobre los niveles de flujo génico global de acuerdo con las expectativas teóricas (Vekemans y Hardy, 2004), mientras que el componente de forma se correlaciona con la importancia relativa de la dispersión de semillas frente a la de polen (Heuertz *et al.*, 2003).

Los niveles de flujo génico efectivo en las poblaciones, dependen de factores tales como: el sistema de fecundación de la especie, la movilidad de los propágulos, la sincronización de los individuos en la reproducción; la densidad poblacional, el comportamiento de los vectores del flujo de polen y de la dispersión de semillas (sean bióticos o abióticos), así como de las condiciones para la germinación de las semillas y el establecimiento de las plántulas. La EGEF dentro de las poblaciones se encuentra fuertemente regulada por las distancias de dispersión de semillas y polen. La interacción de la dispersión restringida localmente con el aumento del apareamiento entre parientes, apareamiento correlacionado y/o autopolinización, en conjunto conducen a mayores niveles de parentesco a cortas distancias (Wells y Young, 2002), con el consecuente incremento de la EGEF en poblaciones de especies arbóreas de hábitats fragmentados. El aumento de la EGEF en fragmentos poblacionales ha sido detectado en un gran número de especies (Young y Merriam, 1994; Van Rossum y Triest, 2007; Yamagishi *et al.*, 2007). Sin embargo, estudios previos en poblaciones de especies arbóreas tales como *Aucoumea klaineana* (Born *et al.*, 2008) y *Prosopis alba* (Bessegga *et al.*, 2016), han revelado una EGEF más débil en poblaciones fragmentadas, lo cual reflejaría el efecto de compensación relacionado con mayores tasas de dispersión alélica en poblaciones de paisajes fragmentados que presenten baja densidad (Vekemans y Hardy, 2004; Born *et al.*, 2008). Por lo tanto, el grado de aislamiento y perturbación de los fragmentos son factores fundamentales que controlan la extensión de la EGEF mediante la interacción con el tamaño de la población y la densidad poblacional a escala local.

La cuantificación y comparación directa de la EGEF entre poblaciones puede ser realizada mediante la estimación del estadístico Sp , el cual depende de la pendiente de regresión de los coeficientes de parentesco entre todos los individuos con el logaritmo de la distancia en un espacio bidimensional, y se encuentra íntimamente ligado al sistema de fecundación, a los caracteres de historia de vida y a la densidad poblacional (Vekemans y Hardy, 2004). El sistema de fecundación de la especie tiene fuertes efectos sobre la EGEF, siendo las especies autógamas las que presentan los valores del estadístico Sp más elevados y, en promedio, las especies con apareamiento mixto presentan valores de Sp tres veces superiores ($Sp = 0,037$) a aquellas que solo presentan fecundación cruzada ($Sp = 0,013$) (Vekemans y Hardy, 2004). Altas tasas de fecundación cruzada han sido descriptas para un gran número de especies de árboles neotropicales (Loveless, 2002; Lowe *et al.*, 2005), incluida *A. colubrina* var. *cebil* (Cialdella, 2000). En el presente estudio se detectó que el estadístico Sp estimado para *A. colubrina* var. *cebil* ($Sp = 0,023$ y $0,009$, en renovales y adultos, respectivamente), fue cercano a los valores obtenidos en otras especies de árboles neotropicales, las cuales presentan sistemas de apareamiento mixto, por ejemplo, *Theobroma cacao* ($Sp = 0,018$) (Silva *et al.*, 2011) o *Dicorynia guianensis* ($Sp = 0,026$) (Hardy *et al.*, 2006). El apareamiento no aleatorio puede interactuar con la estructura espacial debido a que los individuos que participan del cruzamiento generalmente se encuentran dentro de un área determinada (Epperson, 2003). La pendiente de regresión fue significativamente diferente de cero, lo cual sugiere que las relaciones de parentesco entre individuos próximos son en gran parte las responsables de la pendiente de regresión global negativa dentro del fragmento poblacional estudiado. La detección de EGEF significativa mediante *loci* hipervariables como los microsatélites, reduce la probabilidad de sesgo en las estimaciones a pesar de realizar un muestreo a escalas geográficas pequeñas (Leblois *et al.* 2003; Vekemans y Hardy, 2004).

La extensión de la EGEF también es fuertemente regulada por las distancias de dispersión alélica. En *A. colubrina* var. *cebil* la marcada EGEF fue superior a la detectada en la especie arbórea tropical *Entandrophragma cylindricum* ($Sp = 0,0058$) (Monthe *et al.*, 2017) y *Milicia excelsa* ($Sp = 0,0063$) (Bisoux *et al.*, 2009), en las cuales las distancias de dispersión alélica superaron el kilómetro de distancia. El movimiento de polen y semillas configura y reconfigura los niveles de parentesco entre árboles vecinos moldeando los patrones de EGEF. En un reciente metanálisis que abarcó el estudio de distintas especies forestales neotropicales, Lowe *et al.* (2018) describieron que las especies pioneras y con dispersión abiótica de semillas, tales como *A. colubrina* var.

cebil, presentan una EGEF más marcada que las especies de sucesión tardía cuyas semillas son dispersadas por medio de vectores bióticos. Interpretar la superposición de la EGEF con los patrones ecológicos constituye un desafío en el análisis de los procesos que operan en el marco de IBD (Meirmans *et al.*, 2012). Por ello, para explicar las diferencias en la estructura genética y la diferenciación alélica entre estadios se debe considerar la posible influencia de factores demográficos locales, factores ecológicos y caracteres de historia de vida, tales como el éxito reproductivo diferencial entre los adultos y la mortalidad denso-dependiente de los renovales. Collevatti *et al.* (2014) detectaron una distribución espacial agrupada de individuos juveniles de especies arbóreas de los BSEN, sugiriendo que los patrones de dispersión de *Handroanthus chrysotrichus*, *H. impetiginosus*, *H. serratifolius* y *Tabebuia roseoalba*, pueden ser explicados por la dispersión restringida de semillas y por la distribución en parches de micro-hábitat más que por la mortalidad denso-dependiente.

En especies arbóreas, los cambios en el tamaño efectivo poblacional, es decir la variación en el número medio de individuos que contribuyen en la formación de la progenie de la siguiente generación, pueden ser lentos y difíciles de detectar. Más aún, dado que los procesos microevolutivos operan en unidades de tiempo de generaciones, se pueden introducir desfases temporales (*time-lags*) en la respuesta de los bosques a cambios en la configuración del paisaje, incluyendo los eventos de fragmentación (Wagner y Fortin, 2013). Los cambios del paisaje desfasados temporalmente de los cambios genéticos pueden variar en un rango entre unas pocas a varios miles de generaciones dependiendo del tipo de cambio en el paisaje y del tipo de parámetro genético estudiado (Epps y Keyghobadi, 2015). Por ello, la comparación entre diferentes estadios del ciclo de vida constituye una herramienta útil para estudiar los procesos ecológico-evolutivos en poblaciones de especies arbóreas (Petit y Hampe, 2006; ej. Berens *et al.*, 2014) en las cuales, por lo general los renovales se encuentran espacialmente agrupados, mientras que los individuos adultos se sitúan de forma más dispersa en el espacio. Así, la marcada EGEF en renovales ($Sp = 0,023$), la cual fue superior a la detectada en adultos ($Sp = 0,009$), sería consecuencia de una serie de factores. Si bien la dispersión de semillas condiciona la configuración espacial de los sitios disponibles para el establecimiento, el reclutamiento temprano de plántulas representa un importante filtro demográfico en el ciclo de vida de las plantas (Hampe *et al.*, 2010). Por lo tanto, la EGEF tiende a disminuir con la edad debido a la mortalidad dependiente de la densidad (Doligez *et al.*, 1998; Epperson, 2003; Leblois *et al.*, 2004) y a la constricción o reducción demográfica aleatoria (Hamrick *et al.*, 1993; Schroeder *et al.*, 2014), mediante las cuales

solo algunas plántulas sobreviven hasta llegar al estadio adulto. La distribución diamétrica de *A. colubrina* var. *cebil* sigue un patrón de “J invertida”, dada la elevada proporción de individuos en las categorías menores, la cual disminuye en las categorías diamétricas mayores (de Mattos y Seitz, 2005). Un patrón similar fue observado en cuatro especies de bignoniáceas de los BSEN, en las cuales también se detectó una disminución de la EGEF al comparar la estructura genética de renovales y adultos (Collevatti *et al.*, 2014).

A. colubrina var. *cebil* se caracteriza por la producción de un gran número de semillas con baja dormición, altas tasas de germinación (~70%) (Soldati y Albuquerque, 2010; de Souza *et al.*, 2014) y una elevada proporción de mortalidad de plántulas (~50%) debido a factores abióticos, competencia y microorganismos del suelo (de Medeiros *et al.*, 2016). Alternativamente, las condiciones del microhábitat podrían favorecer a grupos de individuos emparentados, de manera tal que el patrón espacial producto de la dispersión puede afectar la supervivencia de las semillas o plántulas, y en consecuencia, determinar la efectividad de la dispersión. En *A. colubrina* var. *cebil* altas tasas de autofecundación tendrían fuertes implicancias en la supervivencia (Borges *et al.*, 2017). Con lo cual, la elevada autofecundación según lo estimado en el presente trabajo (~51 - 56%), podría explicar la EGEF significativamente menor en el estadio adulto en comparación con los renovales, como consecuencia de mortalidad de individuos resultantes de autofecundación en etapas tempranas o de dispersión limitada que favorece grupos de individuos emparentados.

Por su parte, la hipótesis de Janzen-Connell predice una mortalidad de los individuos de la descendencia inversamente proporcional a la distancia al parental, mientras que la tasa de mortalidad de estos individuos aumentaría con la densidad de individuos de la misma especie (Clark y Clark, 1984; Comita *et al.*, 2014). La dependencia negativa de la densidad conespecífica hace referencia a una disminución en la eficacia biológica de individuos de la misma especie espacialmente cercanos entre sí (Janzen, 1970; Connell, 1971). Por ello, la mortalidad denso-dependiente se incrementaría cuanto menor sea la distancia entre las plántulas o los renovales (Hubbell *et al.*, 1990) y se explicaría como un mecanismo que ocurre entre los individuos vecinos debido a la competencia por los recursos (Janzen, 1970; Wright, 2002), considerándose potencialmente importante debido a que estaría implicado en la regulación de la estructura espacial de las poblaciones de árboles en los bosques subtropicales (Zhu *et al.*, 2010). Por lo tanto, los cambios no graduales de los niveles de parentesco en renovales a medida que aumenta la distancia entre pares de individuos, pueden estar relacionados con la inestabilidad

demográfica y la distribución espacial agregada de los mismos, con lo cual el patrón de distribución espacial más regular y la disminución de la EGEF al comparar los estadios tempranos del ciclo de vida con los individuos adultos, pudieron haberse originado por los efectos concertados de la mortalidad dependiente de la densidad, la reducción demográfica aleatoria y la depresión por endogamia.

De esta manera, la EGEF en el fragmento poblacional estudiado es modelada por niveles restringidos de flujo génico efectivo, un sistema de fecundación mixto con alta frecuencia de autopolinización, una limitada movilidad de los propágulos y una baja densidad de árboles donantes de semilla. Además, las condiciones del medio que regulan la germinación de las semillas y el establecimiento de plántulas agrupadas en el espacio que comparten progenitores, resultan en apareamientos por proximidad entre individuos, generando un marcado decrecimiento de los niveles de parentesco en función de la distancia dentro del fragmento poblacional estudiado.

6.4. Tamaño del vecindario y estructura familiar

Los modelos teóricos de IBD predicen que las relaciones de parentesco entre los individuos de una población decrecen de forma lineal en relación a la distancia en escala logarítmica, a una tasa inversamente proporcional a $Nb = 4\pi D_e \sigma_g^2$. Sin embargo, esta disminución no es uniformemente lineal en todo el rango de distancias, como se refleja en pendientes pronunciadas de regresión a corta distancia, y pendientes menos pronunciadas a distancias mayores. Ha sido demostrado que la relación lineal solo es válida cuando las relaciones de parentesco se observan dentro del intervalo de distancia $\sigma_g - \sigma_g(2\mu)^{1/2}$ (Rousset, 2000). Fuera de este rango de distancias, especialmente a distancias inferiores a σ_g , las desviaciones de la relación lineal dependen en gran medida de la contribución relativa de la dispersión de semillas *vs.* la dispersión de polen a las tasas de dispersión alélica total (Heuertz *et al.*, 2003). La dispersión de polen es a menudo el principal contribuyente al flujo génico, mientras que la EGEF es frecuentemente el resultado de una dispersión limitada de semillas (Schnabel *et al.*, 1998; Miyazaki e Isagi, 2000). En este sentido, una dispersión de semillas más restringida que la dispersión de polen produce una curvatura inicial cóncava hacia arriba (Heuertz *et al.*, 2003). El decrecimiento pronunciado del parentesco detectado a cortas distancias ($F_{(5.7m)}=0,033 - F_{(15m)}=0,010$), revela que la dispersión alélica en *A. colubrina* var. *cebil* es restringida en el fragmento poblacional analizado, similar a la observada en las especies arbóreas *Gleditsia triacanthos* (Schnabel *et al.*, 1991) y *Eurya*

emarginata (Chung y Epperson, 2000), las cuales también presentan polinización por insectos pequeños y dispersión de semillas por gravedad. De esta manera, la tasa de dispersión alélica limitada a unos pocos metros, se encuentra fuertemente vinculada a la dispersión restringida de semillas en las poblaciones de *A. colubrina* var. *cebil*, lo cual explica la subdivisión genética de la población, así como los elevados niveles de endogamia biparental.

Se estudió la escala espacial de la dispersión alélica y el tamaño del vecindario dentro del fragmento poblacional de *A. colubrina* var. *cebil* con el fin de evaluar la influencia de la dispersión en la configuración de la EGEF. Las cortas distancias de dispersión ($\sigma_g = 5\text{--}17\text{m}$) se vieron respaldadas por una fuerte EGEF ($Sp \approx 0,01$). Hardy *et al.* (2006) también han descrito una fuerte EGEF y bajas tasas de dispersión alélica en especies neotropicales, en las cuales la dispersión de semilla es por gravedad o por roedores, tales como *Vouacapoua americana* ($\sigma_g = 57\text{--}94\text{m}$), *Carapa procera* ($\sigma_g = 95\text{--}204\text{m}$) y *Moronobea coccinea* ($\sigma_g = 104\text{--}230\text{m}$). Por su parte, Monthe *et al.* (2017) detectaron EGEF relativamente baja ($Sp = 0,006$) en la especie arbórea *Entandrophragma cylindricum* con altas tasas de dispersión alélica ($\sigma_g = 1.078\text{--}1.500\text{m}$). Las estimaciones de σ_g combinan la dispersión alélica mediada por semillas y por polen, y en especies hermafroditas pueden ser descompuestas de la siguiente manera: $\sigma_g = 0,5t\sigma_p^2 + \sigma_s^2$, donde t es la tasa de fecundación cruzada y σ_s^2 , σ_p^2 , las varianzas de dispersión de semillas y polen, respectivamente (Crawford, 1984). Asumiendo que las tasas de dispersión de semillas en *A. colubrina* var. *cebil* puedan ser despreciables y $t = 0,50$, la dispersión alélica mediada por polen estaría comprendida en el rango entre 20 y 68m. Esta estimación es similar a los valores obtenidos en *Vouacapoua americana* ($51\text{m} \leq \sigma_p \leq 166\text{m}$), una leguminosa neotropical polinizada por insectos (Dutech *et al.*, 2005) y *Fraxinus excelsior*, la cual presentó flujo moderado de polen mediado por viento ($70\text{m} \leq \sigma_p \leq 140\text{m}$) (Heuertz *et al.*, 2003). De manera similar a lo observado en *A. colubrina* var. *cebil*, las poblaciones de estas especies presentaron elevada diversidad genética, la cual se mantiene a pesar de la marcada estructura familiar y los elevados niveles de parentesco, posiblemente reflejando diferentes factores ecológicos que han contrarrestado los efectos del apareamiento entre parientes.

Las distancias de dispersión de semillas, la densidad de árboles adultos y los patrones de apareamiento influyen de manera directa sobre los niveles de EGEF (Jones *et al.*, 2006) y sobre la dimensión espacial del vecindario, el cual se define como una función de la varianza de la distribución parental-progenie (Crawford, 1984). Generalmente se

asume que la progenie establecida se centra alrededor del árbol madre, sin embargo hay evidencias de poblaciones en paisajes naturales y perturbados, en los cuales esta suposición no sería realista (Hamrick y Trapnell, 2011), ya que la distribución de los sitios donde los individuos de la progenie pueden establecerse con éxito constituye un factor que debe ser considerado en la interpretación de los patrones de EGEF (Gonzales *et al.*, 2010). En *A. colubrina* var. *cebil* la conformación de sitios de establecimiento de plántulas podría verse favorecida ante la formación de claros en el bosque, dada la naturaleza heliófita de la especie. Además, un reciente estudio reportó que las tasas de regeneración de *A. colubrina* y de *Enterolobium contortisiliquum* pueden verse incrementadas ante condiciones de sequía y aumento en los niveles de irradiación (Carón *et al.*, 2018).

El tamaño de vecindario y la estructura familiar constituyen indicadores del intercambio alélico en la población. El cruzamiento entre individuos emparentados mayor a lo esperado por azar en los primeros intervalos de distancia, así como el tamaño de vecindario comprendido en el rango entre 108 y 138 individuos, podrían ser el reflejo de una baja densidad de árboles madre con cortas distancias de dispersión de semillas y un bajo solapamiento de las áreas de dispersión de las mismas entre árboles madre. El pequeño tamaño de vecindario en la población estudiada de *A. colubrina* var. *cebil* aumenta las probabilidades de que se produzcan cruzamientos entre individuos emparentados, lo cual a su vez se ve reflejado en un aumento de la EGEF en renovales. La interpretación de los parámetros del tamaño de vecindario en función de las distancias de dispersión debe realizarse con cautela, debido a que los correlogramas de parentesco dependen fuertemente de las distancias definidas entre pares de individuos.

En las plantas, los niveles de flujo génico en *loci* heredados de manera biparental es mayor a los niveles de flujo génico en *loci* de herencia materna debido a que los *loci* biparentalmente heredados se transmiten a través del polen y de las semillas, mientras que los *loci* de herencia materna se transmiten únicamente a través de las semillas (McCauley, 1997). Petit *et al.* (2005), a partir del análisis de la variación genética a nivel de los genomas cloroplástico, mitocondrial y nuclear de 183 especies vegetales, demostraron que en general el flujo génico mediado por polen es predominante frente al flujo por semillas. Estudios previos en poblaciones naturales de *A. colubrina* var. *cebil* revelaron una estructuración genética elevada a partir de *loci* microsátélites cloroplásticos, en tanto que la estructuración genética poblacional a partir de *loci* nucleares fue moderada, con niveles de flujo génico mediado por semillas ($Nm = 0,027$) marcadamente inferiores a los niveles de flujo génico mediado por polen y semillas (Nm

= 2,010) (Barrandeguy *et al.*, 2014). Cuando las tasas de dispersión de semillas son sustancialmente menores que las del polen, se produce una fuerte disminución del parentesco en distancias cortas y la dispersión alélica se ajusta a una distribución leptocúrtica (Heuertz *et al.*, 2003). Esto se debe a que, con el movimiento de las semillas, los alelos maternos y paternos se mueven a cortas distancias, mientras que los alelos paternos presentes en los granos de polen pueden moverse a distancias mayores. Las inflorescencias heteromórficas andromonoicas de *A. colubrina* var. *cebil* que constituirían la unidad de polinización (Borges *et al.*, 2017) se presentan en un tiempo de floración que dura aproximadamente tres semanas por individuo atrayendo a diversos insectos polinizadores pequeños (como las abejas sin aguijón), los cuales en general presentan rangos de vuelo restringido. Esto promueve altas tasas de geitonogamia, con lo cual los niveles de apareamiento por proximidad entre individuos que presenten sincronización en la floración estarían determinados por los vectores del flujo de polen. En *A. colubrina* var *cebil*, Borges *et al.* (2017) han interpretado que la elevada tasa de abortos de flores se encontraría relacionada con falta de polinización, autopolinización o geitonogamia, mientras que el aborto de los frutos, incluyendo algunos frutos resultantes de polinización cruzada, está probablemente ligado a ajustes entre los recursos disponibles y la selección de progenie llevada a cabo por la planta madre. De esta manera, las bajas tasas de dispersión alélica promedio de entre 5 y 17m no solo sería explicada por la dispersión de semillas por autocoria-anemocoria sino que también estaría regulada por el flujo de polen mediado por insectos pequeños, aumentando las probabilidades de apareamiento entre parientes espacialmente próximos. La fecundación cruzada dentro del fragmento entre árboles cercanos sincronizados en la floración y una dispersión alélica restringida se ven reflejados en la marcada EGEF detectada en *A. colubrina* var. *cebil*.

La dispersión de semillas por autocoria en *A. colubrina* var. *cebil* tiene fuertes implicancias sobre la subestructuración genética de las poblaciones. En este sentido, cobra relevancia considerar la distribución espacial de los árboles madre en relación con los sitios de reclutamiento de los renovales (Gonzales *et al.*, 2010). *A. colubrina* var *cebil* presenta una proporción 1:1 número de granos de polen por políada/número de ovocélulas por flor (Borges *et al.*, 2017). Por lo cual, una políada podría fecundar la totalidad de las ovocélulas de una flor dando lugar a un fruto en el cual las semillas producen hermanos completos (Borges *et al.*, 2017). El patrón de estructura genética espacial detectado en renovales, así como la proximidad espacial de hermanos completos podrían ser explicados, de esta manera, por la dispersión correlacionada del conjunto de

semillas contenidas en cada fruto. Un patrón similar fue observado en la especie *Ilex leucoclada*, en la cual el agrupamiento de plántulas emparentadas sería la consecuencia de la dispersión de semillas estructuradas por parentesco en la unidad del fruto (Torimaru *et al.*, 2007). De esta manera, la marcada correlación negativa entre el parentesco y la distancia entre individuos, dada por la estructura familiar entre semillas de un mismo fruto o frutos del mismo árbol madre en *A. colubrina* var. *cebil*, pueden derivar en renovales hermanos completos o medio-hermanos agrupados en el espacio.

En especies vegetales, el polen y las semillas a menudo se dispersan a diferentes escalas (Anderson *et al.*, 2010). En el caso de *A. colubrina* var. *cebil*, mientras que pequeñas abejas sin aguijón están probablemente asociadas al movimiento del polen (por ejemplo, *Tetragonisca angustula*) (Flores y Sánchez, 2010), las semillas son dispersadas por autocoria. Las distancias de vuelo de las abejas pequeñas pueden ser de hasta 621-951m (Araújo *et al.*, 2004), y por lo tanto, estos insectos probablemente sean uno de los principales agentes responsables de la conectividad eficaz entre individuos localizados a distancias relativamente largas dentro del fragmento poblacional. Con lo cual, los individuos adultos asignados como posibles parentales, probablemente sean donantes de polen, dadas las distancias euclidianas entre pares progenitor-progenie (101 y 122m). Por su parte, la dispersión de semillas por medio de autocoria-anemocoria en cercanías de los árboles maternos propiciaría el patrón de distribución espacial agregado de los individuos, caracterizado por una elevada proporción de individuos cercanos emparentados. En poblaciones de *A. colubrina* var. *cebil* de los BSEN de Bolivia, Fredericksen *et al.* (1999) han reportado que la densidad de semillas bajo la copa puede variar entre 0 y 54 semillas/m² con un promedio de 9 semillas/m². La dispersión restringida de semillas puede generar agrupaciones espaciales de cohortes de hermanos completos y medio-hermanos localizados cerca del árbol madre (Nason y Hamrick 1997; Kalisz *et al.*, 2001). De esta manera, la autocoria en conjunto con cierto grado de autofecundación en la población estudiada, podría explicar la elevada proporción de pares de individuos implicados en relaciones de medio-hermanos o hermanos completos en el fragmento poblacional estudiado. El mayor número de hermanos detectado en renovales en relación a los adultos, podría ser explicado por las mayores tasas de mortalidad en los estadios más tempranos del ciclo de vida de las especies arbóreas, con lo cual no todos los individuos implicados en estas relaciones de parentesco alcanzarían el estadio adulto.

Dado que en *A. colubrina* var. *cebil* se asume poligamia materna y paterna, la progenie puede estar representada por medio-hermanos por parte de madre o padre, con

lo cual para interpretar las distancias entre pares de individuos emparentados se deben considerar las estrategias de dispersión de polen y de semillas de forma simultánea. En renovales, las distancias relativas registradas entre medio-hermanos (entre 3,8 y 263,5m), estuvieron en el orden de las distancias entre individuos dentro de *clusters*, con lo cual la estructura genética poblacional tiene un fuerte componente dado por la estructura familiar. Por su parte, los hermanos completos, los cuales también incluirían descendientes de eventos de autofecundación, se encuentran cercanos entre sí (entre 1 y 15m), fenómeno que estaría relacionado con la dispersión por autocoria y una elevada frecuencia de hermanos completos dentro de frutos y entre frutos de un mismo árbol madre. A su vez, las distancias medias entre hermanos completos toman los valores estimados de dispersión alélica (entre 5 y 17m).

El elevado índice de parentesco detectado entre renovales tomados de a pares en la primera clase de distancias ($F_1 = 0,33$), fue intermedio al valor esperado para hermanos completos ($F_1 = 0,25$) e individuos producto de autofecundación ($F_1 = 0,50$). Los coeficientes medios de parentesco entre renovales de *A. colubrina* var. *cebil* ($F_{ij} = 0,11$) fueron cercanos a los detectados en renovales de *Syagrus romanzoffiana* ($F_{ij} = 0,14$) agrupados debajo de individuos adultos en la Selva Paranaense, donde además se detectó una elevada proporción de medio-hermanos y hermanos completos, así como un bajo número de madres distintas que contribuirían a la generación de cada conjunto de renovales agrupados (Giombini *et al.*, 2016). Los patrones de parentesco en los renovales del fragmento poblacional estudiado caracterizados por altos niveles de parentesco en renovales a distancias cortas e intermedias, puede deberse a los efectos de una baja densidad de individuos adultos. Esto evitaría, en gran medida, el solapamiento entre las áreas en las cuales cada árbol madre dispersa sus semillas configurando familias de hermanos espacialmente próximos (Hamrick y Trapnell, 2011).

El tamaño de vecindario de *A. colubrina* var. *cebil* puede ser explicado por una baja densidad de adultos con una dispersión alélica restringida consecuencia de la dispersión de semillas por autocoria-anemocoria y de polen por insectos pequeños, así como también por un bajo solapamiento de las áreas de dispersión entre árboles donantes de semillas, lo cual en conjunto se ve reflejado en un aumento de la EGEF en renovales. Además, dado que la fecundación cruzada dentro del fragmento poblacional está limitada a los árboles sincronizados en la floración, las bajas tasas de dispersión aumentan las probabilidades de apareamiento entre parientes espacialmente próximos. De esta manera, la estructura familiar caracterizada por renovales hermanos completos

o medio-hermanos agrupados en el espacio, sería consecuencia de la correlación genética entre semillas de un mismo fruto o frutos del mismo árbol.

6.5. Eventos demográficos recientes

Los eventos demográfico-históricos que moldean la estructura genética poblacional de las especies arbóreas constituyen un factor relevante en la comprensión de la dinámica de los fragmentos poblacionales y su evolución futura.

El impacto antrópico generalmente se considera un factor relevante involucrado en la fragmentación de los Bosques Secos Estacionales Neotropicales (BSEN) y podría haber afectado la historia demográfica de las especies forestales que se distribuyen en estos bosques. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura hace treinta años reportó una lenta reducción del tamaño poblacional de *A. colubrina* (FAO, 1986), en tanto que datos recientes han indicado que, desde un punto de vista ecológico, esta especie se encuentra en un estado más lábil de lo que se pensaba previamente (Särkinen *et al.*, 2011). Además, a la luz del amplio uso de la especie en la región, especialmente para la extracción de madera y taninos, así como para leña (Justiniano y Fredericksen 1998; Tortorelli 2009), se indicó que *A. colubrina* es una especie de alta prioridad para conservación *in situ* (Monteiro *et al.*, 2006).

Tanto el contexto de impacto antrópico regional, como los niveles de fragmentación que caracterizan el paisaje de bosques rodeados de pastizales donde se localiza el fragmento poblacional estudiado, podrían estar relacionados con eventos demográficos de cuellos de botella recientes. Sin embargo, el presente estudio reveló que los patrones actuales de diversidad genética de *A. colubrina* var. *cebil* serían mejor explicados por las fluctuaciones climáticas del Cuaternario que por el impacto antrópico. Tanto las pruebas de cuello de botella como el análisis bayesiano mediante los modelos ABC no lograron detectar indicios de reducción en el tamaño efectivo poblacional, a pesar del alto nivel de fragmentación en la región. Es importante reconocer que las poblaciones que sufren una reducción en el tamaño censal no necesariamente atraviesan una reducción severa del tamaño efectivo poblacional, es decir un cuello de botella (Cornuet y Luikart, 1996). Sumado a ello, la alteración y la fragmentación de origen antrópico son en general eventos recientes en el tiempo evolutivo de las especies arbóreas y no parecen haber causado efectos genéticos detectables en el remanente de bosque estudiado. Por el contrario, los resultados sugieren que los patrones de diversidad y estructura genética poblacional actual de *A. colubrina* var. *cebil* en la zona estudiada de la provincia Paranaense, serían la consecuencia de eventos de expansión que datan

aproximadamente de hace 18.000 años atrás. Estos resultados se basan en el tiempo de generación de la especie, el cual puede ser definido como el tiempo transcurrido desde que se produce una semilla hasta que el individuo resultante de su germinación produce semillas (*sensu* Petit y Hampe, 2006), es decir la edad promedio de reproducción, el cual es un parámetro difícil de estimar para especies de árboles tropicales y subtropicales debido a la escasez de información referente a la edad y fecundidad en estas especies (Jones *et al.*, 2013). En poblaciones de *A. colubrina* var. *cebil* de la Chiquitanía Boliviana se han reportado árboles con producción de semillas a partir de un DAP ~22cm como el menor diámetro (Fredericksen *et al.*, 1999). En el presente trabajo los individuos adultos presentaron valores de DAP de entre 24 y 284cm, los cuales corresponderían, según las estimaciones propuestas por de Mattos y Seitz (2005), a individuos en un rango de edades de entre 50 y 70 años. Por ello, se consideró 50 años como un tiempo de generación adecuado para los análisis de inferencia bayesiana de *A. colubrina* var. *cebil*.

Rastros de eventos demográfico-históricos se han identificado en los patrones contemporáneos de la variación genética cloroplástica en poblaciones naturales argentinas de *A. colubrina* var. *cebil* y se han realizado inferencias acerca del desarrollo temporal de estos bosques en nuestro país (Barrandeguy *et al.*, 2016). La distribución contemporánea de haplotipos cloroplásticos de *A. colubrina* var. *cebil* retiene indicios de la fragmentación histórica entre los núcleos de estos bosques, mientras que el núcleo Pedemontano Subandino habría experimentado una expansión posterior a su llegada a la región, el núcleo Misiones presentaría estabilidad histórica (Barrandeguy *et al.*, 2016). De esta manera, los elevados niveles de diversidad genética detectados en *A. colubrina* var. *cebil* en el fragmento de bosque estudiado podría deberse en parte a la estabilidad demográfico-histórica del núcleo Misiones. Sumado a ello, tanto la presencia de *clusters* genéticos diferenciados, como la presencia de alelos a baja frecuencia en el fragmento estudiado, son características de poblaciones que han atravesado eventos de expansión. Siendo estas características más evidentes en poblaciones pequeñas, de rápido crecimiento y con flujo génico restringido (Excoffier y Ray, 2008).

A. colubrina var. *cebil*, la especie más paradigmática de los BSEN, es considerada una especie indicadora de estos bosques, los cuales presentan niveles elevados de fragmentación histórica y de origen antrópico. Sin embargo, el fragmento poblacional estudiado conserva una gran diversidad genética a pesar de que los individuos que la conforman presentan un sistema de apareamiento mixto con un nivel relativamente alto de autofecundación. Sumado a ello, no se detectó evidencia de cuellos de botella

recientes, sino más bien indicios de una expansión poblacional que se remontaría al Pleistoceno tardío.

6.6. Consideraciones finales

El estudio de los patrones de estructura genética espacial a escala fina y de los procesos subyacentes que le dan forma, constituye una de las claves en la conservación de la diversidad genética en ecosistemas forestales que se desarrollan en paisajes fragmentados, siendo los árboles piezas esenciales en la composición e interacciones propias de los ecosistemas boscosos. Los análisis espaciales de la variación genética se centran en la conexión entre los patrones espaciales de la variación genética observados y los procesos espacio-temporales que los generan (Epperson, 2003). En este contexto, la dispersión alélica es un factor determinante que afecta la dinámica de las poblaciones, comunidades y ecosistemas (Hardy *et al.*, 2006). Por ello, la dispersión de polen y semillas en especies de árboles neotropicales ha recibido gran atención en estudios de estructura genética (Sork *et al.*, 1999) y demografía poblacional (Nathan y Muller-Landau, 2000). En *A. colubrina* var. *cebil*, la contribución de un número considerable de árboles reproductivos al flujo génico mediado por polen dentro del fragmento poblacional, sería responsable de mantener elevados niveles de diversidad genética.

En el fragmento poblacional estudiado, los patrones de distribución no aleatoria de los genotipos en el espacio, producto de aislamiento por distancia, fueron determinados por el apareamiento por proximidad dando lugar a grupos de individuos con frecuencias alélicas diferenciadas y elevados niveles de endogamia, lo cual además sería consecuencia del sistema de apareamiento mixto en *A. colubrina* var. *cebil*, que incluiría una proporción significativa de autofecundación. En este sentido, la estructura familiar, caracterizada por hermanos completos o medio-hermanos agrupados en el espacio, sería consecuencia de la correlación genética entre semillas de un mismo fruto o frutos del mismo árbol madre. Así, dado que las distancias de dispersión alélica regulan la extensión de la EGEF, el flujo génico restringido mediado por semillas ha configurado las diferencias en la estructura genética espacial entre estadios, con una fuerte estructura familiar en los renovales dada por una distribución espacial agrupada. Además, debido a que la estructura por edades y el agrupamiento de individuos tiende a incrementar la EGEF aumentando las correlaciones espaciales a cortas distancias (Doligez *et al.*, 1998), los efectos concertados de la mortalidad dependiente de la densidad, la reducción demográfica aleatoria y la depresión por endogamia, también explicarían la disminución temporal de la EGEF, la cual fue más pronunciada en

estadios tempranos del ciclo de vida en relación a los adultos, los cuales habrían alcanzado una mayor estabilidad demográfica.

De esta manera, el fragmento poblacional de *A. colubrina* var. *cebil* presentó estructura genética espacial que sería consecuencia de dispersión alélica restringida, lo cual también estuvo asociado a los diferentes niveles de estructuración genética detectados dependiendo del estadio del ciclo de vida analizado. Los patrones de diversidad y estructura serían evidencias genéticas de una expansión poblacional histórica en el fragmento estudiado. Por consiguiente, la hipótesis de trabajo no se rechaza, dado que el fragmento poblacional de *A. colubrina* var. *cebil* estudiado en el Sur de Misiones presentó una marcada estructura genética espacial.

Conclusiones



7. CONCLUSIONES

- ✓ Los niveles de flujo génico mediado por polen dentro del fragmento poblacional estudiado mantienen una elevada diversidad genética, riqueza alélica y elevada proporción de alelos a baja frecuencia.

- ✓ A pesar de la elevada diversidad genética, se detectaron elevados niveles de endogamia, los cuales serían consecuencia de un sistema de apareamiento mixto en *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*, que incluiría fecundación cruzada entre individuos emparentados y una proporción significativa de autofecundación en el fragmento poblacional estudiado.

- ✓ La distribución espacial de la variación genética queda explicada por la presencia de *clusters* genéticos diferenciados en ambas cohortes, como consecuencia de apareamiento por proximidad en el fragmento poblacional estudiado.

- ✓ Las diferencias en la estructura genética entre estadios estarían determinadas por dispersión alélica restringida mediada por semillas, la cual genera una distribución espacial agrupada de los renovales y una fuerte estructura familiar en el fragmento poblacional estudiado.

- ✓ La estructura genética espacial a escala fina detectada fue consecuencia de niveles restringidos de flujo génico efectivo, un sistema de fecundación mixto con alta frecuencia de autopolinización, una limitada movilidad de los propágulos, una baja densidad de árboles donantes de semilla y el establecimiento de plántulas que comparten progenitores, agrupadas en el espacio en el fragmento poblacional estudiado.

- ✓ Se delimitó un tamaño de vecindario explicado por una baja densidad de adultos con una dispersión alélica restringida y por un bajo solapamiento de las áreas de dispersión entre árboles donantes de semillas en el fragmento poblacional estudiado.

✓ La estructura familiar se caracterizó por renovales hermanos completos o medio-hermanos agrupados en el espacio en el fragmento poblacional estudiado.

✓ La población estudiada de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* no evidenció cuellos de botella recientes, sino indicios de una expansión poblacional que se remontaría al Pleistoceno tardío.

Bibliografía



8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah SA, Nakagoshi N (2007) Forest fragmentation and its correlation to human land use change in the state of Selangor, peninsular Malaysia. *Forest ecology and Management*, 241(1-3), 39-48.
- Addisalem AB, Bongers F, Kassahun T, Smulders MJM (2016) Genetic diversity and differentiation of the frankincense tree (*Boswellia papyrifera* (Del.) Hochst) across Ethiopia and implications for its conservation. *Forest Ecol Manag* 360:253-260.
- Aguilar R, Quesada M, Ashworth L, Herrerias-Diego YV, Lobo J (2008) Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Mol Ecol* 17(24):5177-5188.
- Allen K, Dupuy JM, Gei MG, Hulshof C, Medvigy D, Pizano C, ..., Waring BG (2017) Will seasonally dry tropical forests be sensitive or resistant to future changes in rainfall regimes? *Environmental Research Letters*, 12(2):023001.
- Allendorf FW (1986) Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. *Zoo biology*, 5(2), 181-190.
- Anderson CD, Epperson BK, Fortin MJ, Holderegger R, James P, Rosenberg MS, Scribner KT, Spear S (2010) Considering spatial and temporal scale in landscape-genetic studies of gene flow. *Mol Ecol* 19(17):3565-3575.
- Araújo ED, Costa M, Chaud-Netto J, Fowler HG (2004) Body size and flight distance in stingless bees (Hymenoptera: Meliponini): inference of flight range and possible ecological implications. *Braz J Biol* 64(3B):563-568.
- Arruda MP, Gonçalves EC, Schneider, MPC, da Silva AL, Morielle-Versute E (2010) An alternative genotyping method using dye-labeled universal primer to reduce unspecific amplifications. *Molecular biology reports*, 37(4), 2031-2036.
- Avice JC (2004) *Molecular markers, Natural History, and Evolution*. 2nd Edition. Sinauer Associates, Inc. 684 pág.
- Bacles CF., Lowe AJ, Ennos RA (2006) Effective seed dispersal across a fragmented landscape. *Science*, 311(5761), 628-628.
- Balkenhol N, Cushman, SA; Storfer AT, Waits LP, (2016) *Landscape Genetics: Concepts, Methods, Applications*, First Edition. John Wiley and Sons Ltd. 264p.
- Barot S, Gignoux J, Menaut JC (1999) Demography of a savanna palm tree: predictions from comprehensive spatial pattern analyses. *Ecology*, 80(6), 1987-2005.
- Barrandeguy ME (2013) Estudio del rol del flujo génico y de la deriva genética en la determinación de la estructura de las poblaciones fragmentadas de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Fabaceae, Fabales) (Disertación Doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Museo).
- Barrandeguy ME, García MV, Argüelles CF, Cervigni GDL (2011) Genetic diversity of *Anadenanthera colubrina* Vell.(Brenan) var *cebil*, a tree species from the South American subtropical forest as revealed by cpSSR markers. *Silvae Genetica*, 60(1-6), 123-132.
- Barrandeguy ME, García MV, Prinz K, Pomar RR, Finkeldey R (2014) Genetic structure of disjunct Argentinean populations of the subtropical tree *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Fabaceae). *Pl Syst Evol* 300(7):1693-1705.
- Barrandeguy ME, Prado DE, Goncalves AL, García MV (2016) Demografía histórica de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Leguminosae) en Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 51(4), 689-703.
- Barrandeguy ME, Prinz K, García MV, Finkeldey R (2012) Development of microsatellite markers for *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Fabaceae), a native tree from South America. *Am J Bot* 99(9):e372-e374.
- Bauni V, Capmourteres V, Homberg MA, Zuleta GA (2013) Distribution and status of the extant xenarthrans (Mammalia: Xenarthra) in the southern cone mesopotamian savanna, Argentina. *Edentata* 14: 35-50.
- Beaumont MA (1999) Detecting population expansion and decline using microsatellites. *Genetics*, 153(4), 2013-2029.
- Berens DG, Braun C, González-Martínez SC, Griebeler, EM, Nathan R, Böhning-Gaese K (2014) Fine-scale spatial genetic dynamics over the life cycle of the tropical tree *Prunus africana*. *Heredity* 113(5):401-407.

- Besega C, Pometti CL, Ewens M, Saidman BO, Vilardi JC (2016) Fine-scale spatial genetic structure analysis in two Argentine populations of *Prosopis alba* (Mimosoideae) with different levels of ecological disturbance. *Eur J For Res* 135(3):495-505.
- Bizoux JP, Daïnou K, Bourland N, Hardy OJ, Heuertz M, Mahy G, Doucet JL (2009) Spatial genetic structure in *Milicia excelsa* (Moraceae) indicates extensive gene dispersal in a low-density wind-pollinated tropical tree. *Molecular Ecology*, 18(21), 4398-4408.
- Borges LA, Machado IC, Lopes AV (2017) Bee pollination and evidence of substitutive nectary in *Anadenanthera colubrina* (Leguminosae-Mimosoideae). *Arthropod-Plant Interactions*, 11(3), 263-271.
- Born C, Hardy OJ, Chevallier MH, Ossari S, Atteke C, Wickings E, Hossaert-Mckey MA (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(8):2041-2050.
- Boshier DH (2000) Mating systems. *Forest conservation genetics: principles and practice*, 63-79.
- Brookfield JFY (1996) A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Mol Ecol* 5:453-455.
- Brown AD, Pacheco S (2006) Propuesta de actualización del mapa ecorregional de la Argentina. En: *La situación ambiental Argentina 2005*. A. Brown; U. Martínez Ortiz; M. Acerbi y J. Corcuera Editores. Fundación Vida Silvestre. 586 p.
- Burczyk J, DiFazio SP, Adams WT (2004) Gene flow in forest trees: How far do genes really travel? *For Genet* 11(3-4):179-192.
- Burkart R, Bárbaro NO; Sánchez RO, Gómez DA (1999) Ecorregiones de la Argentina, Buenos Aires, Administración de Parques Nacionales.
- Buzatti RS, Ribeiro RA, Lemos Filho JPD, Lovato MB (2012) Fine-scale spatial genetic structure of *Dalbergia nigra* (Fabaceae), a threatened and endemic tree of the Brazilian Atlantic Forest. *Genet Mol Biol* 35(4):838-846.
- Cabrera AL (1971) Fitogeografía de la República Argentina. *Bol Soc Argent Bot* 14(1-2):1-42
- Cabrera AL (1976) *Enciclopedia Argentina de agricultura y jardinería: regiones fitogeográficas Argentinas*. Acme.
- Caetano S, Prado D, Pennington RT, Beck S, Oliveira-Filho, A Spichiger, R Naciri, Y. (2008) The history of seasonally dry tropical forests in eastern South America: inferences from the genetic structure of the tree *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). *Molecular Ecology*, 17(13), 3147-3159.
- Calonga Solís V, Barrandeguy ME, García MV (2014) Divergencia histórica en *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Leguminosae) analizando una región intrónica del ADN cloroplástico. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 49(4), 547-557.
- Campos RI, Vasconcelos HL, Ribeiro SP, Neves FS, Soares JP (2006) Relationship between tree size and insect assemblages associated with *Anadenanthera macrocarpa*. *Ecography*, 29(3), 442-450.
- Carón MM, De Frenne P, Ortega-Baes P, Quinteros A, Verheyen K (2018) Regeneration responses to climate and land-use change of four subtropical tree species of the southern Central Andes. *Forest Ecology and Management*, 417, 110-121.
- Carrió E, Rosselló JA (2013) Salt drying: a low-cost, simple and efficient method for storing plants in the field and preserving biological repositories for DNA diversity research. *Mol Ecol Res* 14(2):344-351.
- Chakraborty R, Jin L (1992) Heterozygote deficiency, population substructure and their implications in DNA fingerprinting. *Human genetics*, 88(3), 267-272.
- Chakraborty R, Zhong Y, Jin L, Budowle B (1994) Nondetectability of restriction fragments and independence of DNA fragment sizes within and between loci in RFLP typing of DNA. *Am J Hum Genet* 55(2):391-401.
- Chambers GK, MacAvoy ES (2000) Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 126(4), 455-476.
- Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol Biol Evol* 24(3):621-631.
- Charlesworth D (2003) Effects of inbreeding on the genetic diversity of populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 358(1434), 1051-1070.

- Charlesworth D, Willis JH (2009) The genetics of inbreeding depression. *Nature reviews genetics*, 10(11), 783.
- Chung MG, Epperson BK (2000) Spatial genetic structure of allozyme polymorphisms in a population of *Eurya japonica* (Theaceae). *Silvae genetica*, 49(1), 1-4.
- Chung MY, Nason J, Chung MG, Kim KJ, Park CW, Sun BY, Pak JH (2002) Landscape-level spatial genetic structure in *Quercus acutissima* (Fagaceae). *American Journal of Botany*, 89(8), 1229-1236.
- Chung MY, Nason JD (2007) Spatial demographic and genetic consequences of harvesting within populations of the terrestrial orchid *Cymbidium goeringii*. *Biological Conservation*, 137(1), 125-137.
- Chybicki IJ, Burczyk J (2009) Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. *J Hered* 100(1):106-113.
- Ciaccio M, Russo R, Palla F, Giamminola E de Viana M Leonór (2017) A genetic study on subtropical *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul tree from Northwestern Argentina. *Journal of Forest Research*, 22(3), 191-194.
- Cialdella AM (2000) Flora Fanerogámica Argentina, Fascículo 67: Fabaceae Subfamilia Mimosoideae. Proflora-CONICET, Córdoba, Argentina, 10p.
- Clark DA, Clark DB (1984) Spacing dynamics of a tropical rain forest tree: evaluation of the Janzen-Connell model. *Am Nat* 124:769-788.
- Collevatti RG, Estolano R, Ribeiro ML Rabelo SG, Lima EJ, Munhoz CB (2014) High genetic diversity and contrasting fine-scale spatial genetic structure in four seasonally dry tropical forest tree species. *Plant systematics and evolution*, 300(7), 1671-1681.
- Comita LS, Queenborough SA, Murphy SJ, Eck JL, Xu K, Krishnadas M, Beckman N, Zhu Y (2014) Testing predictions of the Janzen–Connell hypothesis: a meta-analysis of experimental evidence for distance-and density-dependent seed and seedling survival. *J Ecol* 102(4):845-856
- Connell JH (1971) On the role of natural enemies in preventing competitive exclusion in some marine animals and in rain forest trees. *Dynamics of numbers in populations*. Proceedings of the Advanced Study Institute on dynamics of numbers in populations, Oosterbeek, 7-18 September 1970, 298-312.
- Corander J, Sirén J, Arjas E (2008) Bayesian spatial modeling of genetic population structure. *Computational Statistics*, 23(1), 111-129.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 114:2001–2014
- Cornuet JM, Santos F, Beaumont MA, Robert CP, Marin JM, Balding DJ, Guillemaud T, Estoup A (2008) Inferring population history with DIY ABC: a user-friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinformatics* 24(23):2713-2719.
- Coulon A, Guillot G, Cosson JF, Angibault JMA, Aulagnier S, Cargnelutti B, ..., Hewison AJM (2006) Genetic structure is influenced by landscape features: empirical evidence from a roe deer population. *Molecular ecology*, 15(6), 1669-1679.
- Crawford TJ (1984) The estimation of neighbourhood parameters for plant populations. *Heredity*, 52(2), 273.
- de Mattos PP, Seitz RA (2005) Dinâmica de crescimento de angico (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) no Pantanal Mato-Grossense. Embrapa Florestas. Circular técnica.
- de Medeiros RLS, de Souza VC, Neto MAB, de Araújo L, da Silva Barbosa A, de Medeiros RLS (2016) Estrutura da regeneração natural de *Anadenanthera colubrina* em fragmento de brejo de altitude em Bananeiras, PB. *Pesquisa Florestal Brasileira* 36(86):95-101
- De Noir FA, Bravo S, Abdala R (2002) Dispersal mechanisms in some woody native species of Chaco Occidental and Serrano. *Quebracho* 9:140-150.
- de Oliveira CC, Zandavalli RB, de Lima AL, Rodal MJ (2015) Functional groups of woody species in semi-arid regions at low latitudes. *Austral Ecology*, 40(1), 40-49.
- de Oliveira Melo AT, Coelho ASG, Pereira MF, Blanco AJV, Franceschinelli EV (2014) High genetic diversity and strong spatial genetic structure in *Cabralea canjerana* (Vell) Mart (Meliaceae): implications to Brazilian Atlantic Forest tree conservation. *Natureza and Conservação* 12(2):129-133.
- de Queiroz LP (2009) Legumes of the Caatinga. Royal Botanic Garden Edinburgh.

- de Souza TV, Torres IC, Steiner N, Paulilo MTS (2015) Seed dormancy in tree species of the Tropical Brazilian Atlantic Forest and its relationships with seed traits and environmental conditions. *Braz J Bot* 38(2):243-264.
- de Viana ML, Giamminola E, Russo R, Ciaccio M (2014) Morphology and genetics of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Fabaceae) tree from Salta (Northwestern Argentina). *Revista de biología tropical*, 62(2), 757-767.
- Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc Natl Acad Sci* 91(8):3166-3170.
- Dick CW, Hardy OJ, Jones FA, Petit RJ (2008) Spatial scales of pollen and seed-mediated gene flow in tropical rain forest trees. *Trop Plant Biol* 1(1):20-23.
- Digilio AP, Legname PR (1966) Los árboles indígenas de la provincia de Tucumán. Universidad Nacional de Tucumán-Instituto Miguel Lillo.
- Doligez A, Baril C, Joly HI (1998) Fine-scale spatial genetic structure with nonuniform distribution of individuals. *Genetics* 148(2):905-919.
- DRYFLOR (Latin American Seasonally Dry Tropical Forest Floristic Network) Banda K et al. (2016) Plant diversity patterns in neotropical dry forests and their conservation implications. *Science* 353:1383–1387.
- Duminil J, Dainou K, Kaviriri DK, Gillet P, Loo J, Doucet JL, Hardy OJ (2016) Relationships between population density, fine-scale genetic structure, mating system and pollen dispersal in a timber tree from African rainforests. *Heredity*, 116(3), 295.
- Dutech C, Sork VL, Irwin AJ, Smouse PE, Davis FW (2005) Gene flow and fine-scale genetic structure in a wind-pollinated tree species, *Quercus lobata* (Fagaceae). *American Journal of Botany*, 92(2), 252-261.
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Res* 4(2):359-361.
- Ellegren H (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews genetics*, 5(6), 435.
- Ellstrand NC (1992) Gene flow by pollen: implications for plant conservation genetics. *Oikos*, 77-86.
- Ellstrand NC (2014) Is gene flow the most important evolutionary force in plants?. *American journal of botany*, 101(5), 737-753.
- Ellstrand NC, Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual review of Ecology and Systematics*, 24(1), 217-242.
- Epperson BK (1990) Spatial patterns of genetic variation within plant populations. *Plant population genetics, breeding, and genetic resources* 229-253.
- Epperson BK (1992) Spatial structure of genetic variation within populations of forest trees. In *Population Genetics of Forest Trees* (pp. 257-278). Springer, Dordrecht.
- Epperson BK (2003) *Geographical Genetics*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey 376p.
- Epperson BK, Gi Chung, M (2001) Spatial genetic structure of allozyme polymorphisms within populations of *Pinus strobus* (Pinaceae). *American Journal of Botany*, 88(6), 1006-1010.
- Epps CW, Keyghobadi N (2015) Landscape genetics in a changing world: disentangling historical and contemporary influences and inferring change. *Molecular Ecology*, 24(24), 6021-6040.
- Escudero A, Iriondo JM, Torres ME (2003) Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biol conserv* 113(3):351-365.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14(8):2611-2620.
- Ewédjè EBK, Ahanchédé A, Hardy OJ (2017) Breeding system, gene dispersal and small-scale spatial genetic structure of a threatened food tree species, *Pentadesma butyracea* (Clusiaceae) in Benin. *Conservation Genetics*, 18(4), 799-811.
- Excoffier L (2004) Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology*, 13(4), 853-864.
- Excoffier L, Foll M, Petit RJ (2009) Genetic consequences of range expansions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, 481-501.

- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Res* 10(3):564–567
- Excoffier L, Ray N (2008) Surfing during population expansions promotes genetic revolutions and structuration. *Trends in ecology evolution*, 23(7), 347-351.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2):479-491.
- Falguera C, Faggi A, Homberg M, Bogan S, Bauni V (2015) La vegetación de Campo San Juan, In: Campo San Juan, Bauni, V, Homberg, M (Eds) Fundación Félix de Azara, Buenos Aires, pp 53-67.
- FAO-Organization FA (1986) Databook on endangered tree and shrub species and provenances FAO Rome, pp 54-59
- Fenster CB, Vekemans X, Hardy OJ (2003) Quantifying gene flow from spatial genetic structure data in a metapopulation of *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). *Evolution*, 57(5), 995-1007.
- Feres JM, Monteiro M, Zucchi MI, Pinheiro JB, Mestriner MA, Alzate-Marin AL (2012) Development of microsatellite markers for *Anadenanthera colubrina* (Leguminosae), a neotropical tree species. *American journal of botany*, 99(4), e154-e156.
- Finkeldey R, Hattermer HH (2007) Tropical forest genetics (p. 315). Berlin: Springer.
- Fischer J, Lindenmayer DB (2007) Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. *Global ecology and biogeography*, 16(3), 265-280.
- Flores FF, Sánchez YAC (2010) First results of botanical characterization of honeys produced by *Tetragonisca angustula* (Apidae, Meliponinae) in Los Naranjos, Salta, Argentina. *Bol Soc Argent Bot* 45(1-2):81-91.
- François O, Durand E (2010) Spatially explicit Bayesian clustering models in population genetics. *Molecular Ecology Resources*, 10(5), 773-784.
- Frankham R (1995) Conservation genetics. *Annual review of genetics*, 29(1), 305-327.
- Frankham R (1999) Quantitative genetics in conservation biology. *Genetics Research*, 74(3), 237-244.
- Frankham R, Briscoe DA, Ballou JD (2002) Introduction to conservation genetics. 1st Ed. Cambridge University Press, 617p.
- Fredericksen TS, Ross BD, Hoffman W, Morrison ML, Beyea J, Johnson BN, ..., Ross E (1999) Short-term understory plant community responses to timber-harvesting intensity on non-industrial private forestlands in Pennsylvania. *Forest Ecology and Management*, 116(1-3), 129-139.
- Freeland JR, Biss P, Silvertown J (2011) Contrasting patterns of pollen and seed flow influence the spatial genetic structure of sweet vernal grass (*Anthoxanthum odoratum*) populations. *Journal of Heredity*, 103(1), 28-35.
- García C, Jordano P, Godoy JA (2007) Contemporary pollen and seed dispersal in a *Prunus mahaleb* population: patterns in distance and direction. *Mol Ecol* 16(9):1947-1955.
- García MV, Balatti PA, Arturi MJ (2007) Genetic variability in natural populations of *Paspalum dilatatum* Poir analyzed by means of morphological traits and molecular markers. *Genet Resour Crop Ev* 54:935-946.
- García, MV, Prinz K, Barrandeguy ME, Miretti M, Finkeldey R (2014) A unifying study of phenotypic and molecular genetic variability in natural populations of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* from Yungas and Paranaense biogeographic provinces in Argentina. *Journal of genetics*, 93(1), 123-132.
- Garza JC, Williamson EG (2001) Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Mol Ecol* 10(2):305-318.
- Gerlach G, Jueterbock A, Kraemer P, Deppermann J, Harmand P (2010) Calculations of population differentiation based on G_{ST} and D : forget G_{ST} but not all of statistics! *Mol Ecol* 19:3845–3852.
- Ghazoul J (2005) Pollen and seed dispersal among dispersed plants. *Biological Reviews*, 80(3), 413-443.
- Gillet E, Gomory D, Paule L (2005) Measuring genetic variation within and among populations at marker loci. In: Geburek T, Turok J (eds) Conservation and Management of forest genetic resource in Europe. Arbora Publishers, Zvolen, pp 237–270.

- Giombini MI, Bravo SP, Tosto DS (2016) The key role of the largest extant Neotropical frugivore (*Tapirus terrestris*) in promoting admixture of plant genotypes across the landscape. *Biotropica*, 48(4), 499-508.
- Goncalves AL, Barrandeguy ME, García MV (2014) Estructura y representatividad genética cloroplástica en poblaciones naturales de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Leguminosae) de Argentina. *Bol Soc Arg de Bot* 49(2):235-245.
- Gonzales E, Hamrick JL, Smouse PE, Trapnell DW, Peakall R (2009) The impact of landscape disturbance on spatial genetic structure in the Guanacaste tree, *Enterolobium cyclocarpum* (Fabaceae). *Journal of Heredity*, 101(2), 133-143.
- Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *J Hered* 86:485-486.
- Gregorius HR (1978) The concept of genetic diversity and its formal relationship to heterozygosity and genetic distance. *Mathematical Biosciences*, 41(3-4), 253-271.
- Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Chaumeil P, Léger P, Lepais O, ..., Petit RJ (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular ecology resources*, 11(4), 591-611.
- Guzmán R (1997) Caracterización y clasificación de especies forestales en gremios ecológicos en el bosque sub-húmedo estacional de la región de Lomerío, Santa Cruz-Bolivia. Tesis M.Sc CATIE, Turrialba, Costa Rica. 53 Pp.
- Guzmán-Gutiérrez RA (2001) Clasificación de especies forestales en gremios ecológicos en el bosque seco de Lomerío, Santa Cruz, Bolivia. *Regeneración y Silvicultura de Bosques Tropicales en Bolivia*, 77.
- Haddad NM, Brudvig, L. A Clobert, J Davies, K. F Gonzalez, A Holt, R. D ... Cook, W. M. (2015) Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Science Advances*, 1(2), e1500052.
- Hamilton M (2011). *Population genetics*. John Wiley Sons.
- Hamilton M, Miller JR (2002) Comparing relative rates of pollen and seed gene flow in the island model using nuclear and organelle measures of population structure. *Genetics*, 162(4), 1897-1909.
- Hampe A, El Masri L, Petit RJ (2010) Origin of spatial genetic structure in an expanding oak population. *Mol Ecol* 19(3):459-471
- Hamrick JL (2004) Response of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecol Manag* 197(1):323-335.
- Hamrick JL, Godt MJ, Sherman-Broyles SL (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. In *Population genetics of forest trees* (pp. 95-124). Springer, Dordrecht.
- Hamrick JL, Godt MJW (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Phil Trans R Soc Lond B* 351(1345):1291-1298.
- Hamrick JL, Murawski DA, Nason JD (1993) The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. *Vegetatio*, 107(1), 281-297.
- Hamrick JL, Trapnell DW (2011) Using population genetic analyses to understand seed dispersal patterns. *Acta Oecologica*, 37(6), 641-649.
- Hanski I (1998) Metapopulation dynamics. *Nature*, 396(6706), 41.
- Hardy OJ, Maggia L, Bandou E, Breyné P, Caron H Chevallier MH, Doligez A Dutech C, Kremer A, Latouche-Hallé CE, Troisieux V (2006) Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. *Mol Ecol* 15(2):559-571.
- Hardy OJ, Vekemans X (1999) Isolation by distance in a continuous population: reconciliation between spatial autocorrelation analysis and population genetics models. *Heredity*, 83(2), 145.
- Hardy OJ, Vekemans X (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol Ecol Notes* 2(4):618-620.
- Hartl DL, Clark AG (2007) *Principles of Population Genetics*. 4th Ed. Sinauer Associates, Sunderland, 653p.
- Hedrick PW (1999) Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53(2):313-318.
- Heuertz, M Vekemans, X Hausman, J. F Palada, M Hardy, O. J. (2003) Estimating seed vs. pollen dispersal from spatial genetic structure in the common ash. *Molecular Ecology*, 12(9), 2483-2495.
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789), 907.

- Heywood JS (1991) Spatial analysis of genetic variation in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22(1), 335-355.
- Hubbell SP, Condit R, Foster RB (1990) Presence and absence of density dependence in a neotropical tree community. *Phil Trans R Soc Lond B* 330:269–281.
- Huff DR, Peakall R, Smouse PE (1993) RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. *Theoretical and Applied Genetics*, 86(8), 927-934.
- Humano CA (2014) Crecimiento de plantaciones forestales de tres especies nativas del Chaco Semiárido de Jujuy, Argentina. *Yvyrareta*, 23-29.
- Ibrahim KM, Nichols RA, Hewitt GM (1996) Spatial patterns of genetic variation generated by different forms of dispersal during range expansion. *Heredity*, 77(3), 282.
- Janzen DH (1970) Herbivores and the number of tree species in tropical forests. *The American Naturalist*, 104(940), 501-528.
- Jombart T, Devillard S, Dufour AB, Pontier D (2008) Revealing cryptic spatial patterns in genetic variability by a new multivariate method. *Heredity*, 101(1), 92.
- Jones F, Cerón-Souza I, Hardesty BD, Dick CW (2013) Genetic evidence of Quaternary demographic changes in four rain forest tree species sampled across the Isthmus of Panama. *J Biogeogr* 40(4):720-731.
- Jones FA, Hubbell SP (2006) Demographic spatial genetic structure of the Neotropical tree, *Jacaranda copaia*. *Mol Ecol* 15(11):3205–3217.
- Jones OR, Wang J (2010) COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Mol Ecol Res* 10(3):551-555.
- Jost L (2008) G_{ST} and its relatives do not measure differentiation. *Mol Ecol* 17(18):4015-4026.
- Jost L, Archer F, Flanagan S, Gaggiotti O, Hoban S, Latch E (2018) Differentiation measures for conservation genetics. *Evol Appl* 00:1–10 <https://doi.org/10.1111/eva.12590>.
- Jump AS, Peñuelas J (2006) Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(21), 8096-8100.
- Justiniano MJ, Fredericksen TS (1998) Ecología y silvicultura de especies menos conocidas: Curupaú – *Anadenanthera colubrina* Proyecto BOLFOR, Santa Cruz, Bolivia 58 p.
- Kalisz S, Nason JD, Hanzawa FM, Tonsor SJ (2001) Spatial population genetic structure in *Trillium grandiflorum*: the roles of dispersal, mating, history, and selection. *Evolution* 55(8):1560-1568.
- Kiill LHP, da Silva TA (2016) Fenología e biología floral de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Fabaceae) no Município de Petrolina, PE. Embrapa Semiárido-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E).
- Kimura M, Ohta T (1971) Theoretical aspects of population genetics (No. 4). Princeton University Press.
- Latouche-Hallé C, Ramboer A, Bandou E, Caron H, Kremer A (2003) Nuclear and chloroplast genetic structure indicate fine-scale spatial dynamics in a neotropical tree population. *Heredity* 91(2):181-190.
- Lazrek F, Roussel V, Ronfort J, Cardinet G, Chardon F, Aouani ME, Huguet T (2009) The use of neutral and non-neutral SSRs to analyse the genetic structure of a Tunisian collection of *Medicago truncatula* lines and to reveal associations with eco-environmental variables. *Genetica*, 135(3), 391.
- Leblois R, Rousset F, Estoup A (2004) Influence of spatial and temporal heterogeneities on the estimation of demographic parameters in a continuous population using individual microsatellite data. *Genetics* 166:1081–1092.
- Lewis G, Schrire B, Mackinder B, Lock M (2005) Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Lindenmayer DB, Franklin JF, Fischer J (2006) General management principles and a checklist of strategies to guide forest biodiversity conservation. *Biological conservation*, 131(3), 433-445.
- Lintusaari J, Gutmann MU, Dutta R, Kaski S, Corander J (2017) Fundamentals and recent developments in approximate Bayesian computation. *Systematic biology*, 66(1), e66-e82.
- Loiselle BA, Sork VL, Nason JD, Graham C (1995) Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *Am J Bot* 82:1420–1425.
- Lorenzi H (1992) Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Editora Plantarum 352p.-col. illus.. Por Geog, 4.

- Loveless MD (1992) Isozyme variation in tropical trees: patterns of genetic organization. *New forests*, 6(1-4), 67-94.
- Loveless MD (2002) Genetic diversity and differentiation in tropical trees. *Modelling and experimental research on genetic processes in tropical and temperate forests (2000: Kourou, French Guiana)*, 3-30.
- Lowe AJ, Boshier D, Ward M, Bacles CFE, Navarro C (2005) Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity*, 95(4), 255.
- Lowe AJ, Breed MF, Caron H et al. (2018) Standardized genetic diversity-life history correlates for improved genetic resource management of Neotropical trees. *Divers Distrib* 00:1–12. <https://doi.org/10.1111/ddi.12716>
- LPWG (The Legume Phylogeny Working Group) Azani, N, et al. (2017) A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon* 66(1):44-77.
- Luckow M (2005) Tribe Mimoseae, en G. P.Lewis, B. Schrire, B. Mackinder M. Lock (eds.), *Legumes of the World*, pp. 163-183. London: Royal Botanic Gardens, Kew.
- Luximon N, Petit EJ, Broquet T (2014) Performance of individual vs. group sampling for inferring dispersal under isolation-by-distance. *Molecular ecology resources*, 14(4), 745-752.
- Machado IC, Barros LM, Sampaio EV (1997) Phenology of caatinga species at Serra Talhada, PE, northeastern Brazil. *Biotropica*, 29(1), 57-68.
- Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in ecology evolution*, 18(4), 189-197.
- Manoel RO, Alves PF, Dourado CL, Gaino AP, Freitas ML, Moraes ML, Sebbenn AM (2012) Contemporary pollen flow, mating patterns and effective population size inferred from paternity analysis in a small fragmented population of the Neotropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf.(Leguminosae-Caesalpinioideae). *Conservation Genetics*, 13(3), 613-623.
- Martínez OG, Barrandeguy ME, García MV, Cacharani DA, Prado DE (2013) Presencia de *Anadenanthera colubrina* var. *colubrina* (Fabaceae, Mimosoideae) en Argentina. *Darwiniana*, nueva serie, 1(2), 279-288.
- Mazo TE, Barrandeguy ME, García MV (2014) Endocría y coancestría en poblaciones naturales de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*. *Revista de Ciencia y Tecnología*, (22), 22-27.
- McCauley DE (1997) The relative contributions of seed and pollen movement to the local genetic structure of *Silene alba*. *Journal of Heredity*, 88(4), 257-263.
- McIntyre S, Hobbs R (1999) A framework for conceptualizing human effects on landscapes and its relevance to management and research models. *Conservation biology*, 13(6), 1282-1292.
- Meirmans PG (2012) The trouble with isolation by distance. *Molecular ecology*, 21(12), 2839-2846.
- Meirmans PG, Hedrick PW (2011) Assessing population structure: F_{ST} and related measures. *Molecular ecology resources*, 11(1), 5-18.
- Michalakis Y, Excoffier L (1996) A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics*, 142(3), 1061-1064.
- Miles L, Newton AC, DeFries RS, Ravilious C, May I, Blyth S, ..., Gordon JE (2006) A global overview of the conservation status of tropical dry forests. *Journal of Biogeography*, 33(3), 491-505.
- Miyazaki Y, Isagi Y (2000) Pollen flow and the intrapopulation genetic structure of *Heloniopsis orientalis* on the forest floor as determined using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 101(5-6), 718-723.
- Mogni VY, Oakley LJ, Prado DE (2015) The distribution of woody legumes in neotropical dry forests: the Pleistocene Arc Theory 20 years on. *Edinburgh J Bot* 72:35-60.
- Monteiro JM, Cecília de Fátima CB, De Albuquerque UP, De Lucena RFP, Florentino ATN, De Oliveira RLC (2006) Use and traditional management of *Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan in the semi-arid region of northeastern Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2(1):6.
- Monthe FK, Hardy OJ, Doucet JL, Loo J, Duminil J (2017) Extensive seed and pollen dispersal and assortative mating in the rain forest tree *Entandrophragma cylindricum* (Meliaceae) inferred from indirect and direct analyses. *Molecular ecology*, 26(19), 5279-5291.

- Mostacedo B, Fredericksen TS, Gould K, Toledo M (2001) Responses of community structure and composition to wildfire in dry and subhumid tropical forests in Bolivia. *Journal of Tropical Forest Science*, 488-502.
- Murawski DA, Gunatilleke IAUN, Bawa K (1994) The effects of selective logging on inbreeding in *Shorea megistophylla* (Dipterocarpaceae) from Sri Lanka. *Conservation Biology*, 8, 997–1002.
- Musiani M, Leonard JA, Cluff HD *et al.* (2007) Differentiation of tundra/taiga and boreal coniferous forest wolves: genetics, coat color and association with migratory caribou. *Mol Ecol* 16:4149–4170.
- Nason JD, Hamrick JL (1997) Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of neotropical canopy trees. *J Hered* 88(4):264-276.
- Nathan R, Muller-Landau HC (2000) Spatial patterns of seed dispersal, their determinants and consequences for recruitment. *Trends in ecology evolution*, 15(7), 278-285.
- Nauta MJ, Weising FJ (1996) Constraints on allele size at microsatellite loci: implications for genetic differentiation. *Genetics* 143: 1021–1032.
- Nazar DC, De La Fuente GA, Dulout LN (2013) En búsqueda de la dimensión simbólica de la tunita, Sierra De Ancasti (Catamarca, Argentina). *Cuadernos de la Facultad de Humanidades y Ciencias Sociales. Universidad Nacional de Jujuy*, (45), 69-93.
- Nei M (1972) Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106(949), 283-292.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12), 3321-3323.
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 29(1), 1-10.
- Nery FC, Nery MC, de Oliveira Prudente D, de Alvarenga AA, Paiva R (2018) Morphological and Physiological Germination Aspects of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(2), 593-600.
- Nielsen EE, Hansen MM, Meldrup D (2006) Evidence of microsatellite hitch-hiking selection in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): implications for inferring population structure in nonmodel organisms. *Molecular Ecology*, 15(11), 3219-3229.
- Oakley LJ, Prado DE (2011) El dominio de los bosques secos estacionales neotropicales y la presencia del arco Pleistocénico en la República del Paraguay. *Rojasiana*, 10(1), 55-75.
- Oddou-Muratorio SYL, Demesure-Musch VIE, Pelissier E, Gouyon PH (2004) Impacts of gene flow and logging history on the local genetic structure of a scattered tree species, *Sorbus torminalis* L. Crantz. *Molecular Ecology*, 13(12), 3689-3702.
- Oetting WS, Lee HK, Flanders DJ, Wiesner GL, Sellers TA King RA (1995) Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. *Genomics*, 30(3), 450-458.
- Ohta T, Kimura M (1973) A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetics Research*, 22(2), 201-204.
- Opdam P, Wascher D (2004) Climate change meets habitat fragmentation: linking landscape and biogeographical scale levels in research and conservation. *Biological conservation*, 117(3), 285-297.
- Ortego J, Bonal R, Muñoz A (2010) Genetic consequences of habitat fragmentation in long-lived tree species: the case of the Mediterranean holm oak (*Quercus ilex*, L.). *Journal of Heredity*, 101(6), 717-726.
- Pakkad G, Ueno S, Yoshimaru H (2008) Gene flow pattern and mating system in a small population of *Quercus semiserrata* Roxb.(Fagaceae). *Forest ecology and Management*, 255(11), 3819-3826.
- Parker KC, Hamrick J L Parker, A. J Nason, J. D. (2001) Fine-scale genetic structure in *Pinus clausa* (Pinaceae) populations: effects of disturbance history. *Heredity*, 87(1), 99.
- Peakall PE, Smouse R (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. *Population genetic software for teaching and research-an update*. *Bioinformatics* 28:2537-2539.
- Pennington RT, Lavin M, Oliveira-Filho A (2009) Woody plant diversity, evolution, and ecology in the tropics: perspectives from seasonally dry tropical forests. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, 437-457.
- Pennington TR, Prado DE, Pendry CA (2000) Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *J Biogeogr* 27(2):261-273.

- Petit RJ, Duminil J, Fineschi, S, Hampe A, Salvini, D, Vendramin, G. G. (2005) Invited review: comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology*, 14(3), 689-701.
- Petit RJ, Hampe A (2006) Some Evolutionary Consequences of Being a Tree Linked references. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 37(May):187–214.
- Petit, R. J, El Mousadik, A, Pons, O. (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation biology*, 12(4), 844-855.
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999) BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J Hered* 90(4):502–503
- Prado DE (2000) Seasonally dry forests of tropical South America: from forgotten ecosystems to a new phytogeographic unit. *Edinburgh J Bot* 57(03):437-461.
- Prado DE, Gibbs PE (1993) Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* pp 902-927.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2):945-959.
- Quantum GIS Development Team (2017) QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>
- Queiroz R (2012) Plantas do Brasil Leguminosae (Fabaceae). Disponible en: <http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.com/2012/11/anadenanthera-colubrina-vell-brenan.html>
- Ray N, Currat M, Excoffier L (2003) Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Molecular Biology and Evolution*, 20(1), 76-86.
- Reed DH, Frankham R (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation biology*, 17(1), 230-237.
- Ribeiro RA, Lovato MB (2004) Mating system in a neotropical tree species, *Senna multijuga* (Fabaceae). *Genetics and Molecular Biology*, 27(3), 418-424.
- Ritland K, Jain S (1981) A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. *Heredity*, 47(1), 35.
- Robledo-Arnuncio JJ, Alia R, Gil L (2004) Increased selfing and correlated paternity in a small population of a predominantly outcrossing conifer, *Pinus sylvestris*. *Molecular Ecology*, 13(9), 2567-2577.
- Robledo-Arnuncio JJ, Gil L (2005) Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total-exclusion paternity analysis. *Heredity*, 94(1), 13.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145(4), 1219-1228.
- Rousset F (2000) Genetic differentiation between individuals. *J Evol Biol*, 13, 58-62.
- Rousset F (2008) Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Res* 8(1):103-106.
- Sambrook, J, Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Särkinen T, Iganci JR, Linares-Palomino R, Simon MF, Prado DE (2011) Forgotten forests-issues and prospects in biome mapping using Seasonally Dry Tropical Forests as a case study. *BMC Ecology* 11(1):27.
- Schlötterer, C. (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109(6), 365-371.
- Schnabel A, Laushman RH, Hamrick JL (1991) Comparative genetic structure of two co-occurring tree species, *Maclura pomifera* (Moraceae) and *Gleditsia triacanthos* (Leguminosae). *Heredity*, 67(3), 357.
- Schnabel A, Nason JD, Hamrick JL (1998) Understanding the population genetic structure of *Gleditsia triacanthos* L.: seed dispersal and variation in female reproductive success. *Molecular Ecology*, 7(7), 819-832.
- Schoville SD, Bonin A, François O, Lobreaux S, Melodelima C, Manel S (2012) Adaptive genetic variation on the landscape: methods and cases. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43, 23-43.
- Schroeder JW, Tran HT, Dick CW (2014) Fine scale spatial genetic structure in *Pouteria reticulata* (Engl.) Eyma (Sapotaceae), a dioecious, vertebrate dispersed tropical rain forest tree species. *Global Ecol Conserv* 1:43-49.

- Schwartz MK, McKelvey KS (2009) Why sampling scheme matters: the effect of sampling scheme on landscape genetic results. *Conservation Genetics*, 10(2), 441.
- Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters*, 9(5), 615-629.
- Séré M, Thevenon S, Belem AMG, De Meeùs T (2017) Comparison of different genetic distances to test isolation by distance between populations. *Heredity*, 119(2), 55.
- Shi MM, Michalski SG, Chen XY, Durka W (2011) Isolation by elevation: genetic structure at neutral and putatively non-neutral loci in a dominant tree of subtropical forests, *Castanopsis eyrei*. *PLoS One*, 6(6), e21302.
- Silva CRS, Albuquerque PSB, Ervedosa FR, Mota JWS, Figueira A, Sebbenn AM (2011) Understanding the genetic diversity, spatial genetic structure and mating system at the hierarchical levels of fruits and individuals of a continuous *Theobroma cacao* population from the Brazilian Amazon. *Heredity*, 106(6), 973.
- Slatkin M, Barton NH (1989) A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*, 43(7), 1349-1368.
- Smouse PE, Sork VL (2004) Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. *Forest Ecology and Management*, 197(1-3), 21-38.
- Sokal RR, Rohlf FJ (1981) *Biometry*. Freeman, New York, USA.
- Soldati GT, de Albuquerque UP (2010) Impact assessment of the harvest of a medicinal plant (*Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan) by a rural semi-arid community (Pernambuco), northeastern Brazil. *Internat J Biodiv Science, Ecosyst Serv and Manag* 6(3-4):106-118.
- Sork VL, Nason J, Campbell DR, Fernandez JF (1999) Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. *Trends in Ecology Evolution*, 14(6), 219-224.
- Sork VL, Smouse PE (2006) Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. *Landscape ecology*, 21(6), 821-836.
- Steffen P, Eggen A, Stranzinger G, Fries R, Dietz AB, Womack JE (1993) Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. *Animal Genetics*, 24(2), 121-124.
- Steiner JJ, Poklemba CJ, Fjellstrom RG, Elliott LF (1995) A rapid one-tube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analyses. *Nucleic Acids Research* 23(13):2569-2570
- Stewart CN, Excoffier L (1996) Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: application to *Vaccinium macrocarpon* (American Cranberry). *Journal of Evolutionary Biology*, 9(2), 153-171.
- Sumner J, Rousset F, Estoup A, Moritz C (2001) 'Neighbourhood' size, dispersal and density estimates in the prickly forest skink (*Gnypetoscincus queenslandiae*) using individual genetic and demographic methods. *Molecular Ecology*, 10(8), 1917-1927.
- Tambarussi EV, Sebbenn AM, Alves-Pereira A, Vencovsky R, Cambuim J, da Silva AM, de Moraes MA, de Moraes MLT (2017) *Dipteryx alata* Vogel (Fabaceae), a neotropical tree with high levels of selfing: implications for conservation and breeding programs. *Annals of Forest Research* 60(1):243-261.
- Tarazi R, Mantovani A, Dos Reis MS (2010) Fine-scale spatial genetic structure and allozymic diversity in natural populations of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). *Conserv Genet* 11(3):965-976.
- Tautz D, Renz M (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic acids research*, 12(10), 4127-4138.
- Templeton AR (2006) *Population genetics and microevolutionary theory*. John Wiley Sons.
- Torimaru, T Tani, N Tsumura, Y Nishimura, N Tomaru, N. (2007) Effects of kin-structured seed dispersal on the genetic structure of the clonal dioecious shrub *Ilex leucoclada*. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 61(6), 1289-1300.
- Torroba-Balmori P, Budde KB, Heer K, González-Martínez SC, Olsson S, Scotti-Saintagne C, Casalis M, Sonké B, Dick CW, Heuertz M (2017) Altitudinal gradients, biogeographic history and microhabitat adaptation affect fine-scale spatial genetic structure in African and Neotropical populations of an ancient tropical tree species. *PLoS ONE* 12(8):e0182515
- Tortorelli LA (2009) *Maderas y bosques argentinos*. Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires 515p.
- Troupin D, Nathan R, Vendramin GG (2006) Analysis of spatial genetic structure in an expanding *Pinus halepensis* population reveals development of fine-scale genetic clustering over time. *Mol Ecol* 15(12):3617-3630.

- Turner MG (2005) Landscape ecology: what is the state of the science?. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst* 36, 319-344.
- Vallone PM, Butler JM (2004) AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *Biotechniques*, 37(2), 226-231.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4(3):535-538.
- Van Rossum, F Triest, L. (2007) Fine-scale spatial genetic structure of the distylous *Primula veris* in fragmented habitats. *Plant Biology*, 9(3), 374-382.
- Varela OR, Albornoz PL (2013) Morpho-anatomy, imbibition, viability and germination of the seed of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Fabaceae). *Revista de biología tropical*, 61(3), 1109-1118.
- Vekemans X, Hardy OJ (2004) New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Mol Ecol* 13(4):921-935.
- Viglizzo EF, Frank FC (2006) Land-use options for Del Plata Basin in South America: Tradeoffs analysis based on ecosystem service provision. *Ecological Economics*, 57(1), 140-151.
- von Reis Altschul S (1964) A taxonomic study of the genus *Anadenanthera*. *Contributions from the Gray herbarium of Harvard University* 193:3-65.
- Wagner AP, Creel S, Kalinowski ST (2006) Maximum likelihood estimation of relatedness and relationship using microsatellite loci with null alleles. *Heredity*, 97, 336-345.
- Wagner HH, Fortin MJ (2013) A conceptual framework for the spatial analysis of landscape genetic data. *Conserv Genet* 14(2):253-261.
- Waits LP, Storfer A (2015) Basics of population genetics: quantifying neutral and adaptive genetic variation for landscape genetic studies. *Landscape Genetics*, 35-57.
- Wang J (2004) Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics*, 166(4), 1963-1979.
- Wang J, Santure AW (2009) Parentage and sibship inference from multi-locus genotype data under polygamy. *Genetics*.
- Wells GP, Young AG (2002) Effects of seed dispersal on spatial genetic structure in populations of *Rutidosia leptorrhychoides* with different levels of correlated paternity. *Genetics Research*, 79(3), 219-226.
- Werneck FP, Costa GC, Colli GR, Prado DE, Sites JW (2011) Revisiting the historical distribution of Seasonally Dry Tropical Forests: new insights based on palaeodistribution modelling and palynological evidence. *Global Ecology and Biogeography* 20(2):272-288.
- White TL, Adams WT, Neale DB (2007) *Forest Genetics*. Cabi, Cambridge, MA 682 p.
- Whitlock MC, McCauley DE (1999) Indirect measures of gene flow and migration: F_{ST} not equal to $1/(4Nm + 1)$. *Heredity* 82:117-125.
- Williamson-Natesan EG (2005) Comparison of methods for detecting bottlenecks from microsatellite loci. *Conserv Genet* 6(4):551-562.
- Wright BM (1950) A new dust-feed mechanism. *Journal of Scientific Instruments*, 27(1), 12
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics*, 28(2), 114.
- Wright S (1946) Isolation by distance under diverse systems of mating. *Genetics*, 31(1), 39.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15, 323-354.
- Wright S (1969) *Evolution and the Genetics of Populations. Volume 2, The Theory of Gene Frequencies*. University of Chicago Press, Chicago.
- Wright S, Lauga B, Charlesworth D (2002) Rates and patterns of molecular evolution in inbred and outbred *Arabidopsis*. *Molecular Biology and Evolution*, 19(9), 1407-1420.
- Wright SI, Kalisz S, Slotte T (2013) Evolutionary consequences of self-fertilization. *Proc R Soc B* 280:20130133. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2013.0133>
- Yahara T, Javadi F, Onoda Y, de Queiroz LP, Faith DP, Prado DE, Akasaka M, Kadoya T, Ishihama F, Davies S et al. (2013) Global legume diversity assessment: concepts, key indicators, and strategies. *Taxon* 62: 249-266.
- Yamagishi H, Tomimatsu H, Ohara M (2007) Fine-scale spatial genetic structure within continuous and fragmented populations of *Trillium camschatcense*. *Journal of Heredity*, 98(4), 367-372.
- Young A, Boyle T, Brown T (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol Evol* 11(10):413-418.

- Young AG, Clarke GM, Cowlshaw G (Eds.) (2000) Genetics, demography and viability of fragmented populations (Vol. 4). Cambridge University Press.
- Young AG, Merriam HG (1994) Effects of forest fragmentation on the spatial genetic structure of *Acer saccharum* Marsh. (sugar maple) populations. *Heredity*, 72(2), 201.
- Zhao YJ, Gong X (2012) Genetic structure of the endangered *Leucomeris decora* (Asteraceae) in China inferred from chloroplast and nuclear DNA markers. *Conservation genetics*, 13(1), 271-281.
- Zhu Y, Mi X, Ren H, Ma K (2010) Density dependence is prevalent in a heterogeneous subtropical forest. *Oikos*, 119(1), 109-119.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2), 176-183.
- Zucchi MI, Sujii PS, Mori GM, Viana JP, Grando C, Silvestre EDA, ..., Siqueira MV (2018) Genetic diversity of reintroduced tree populations in restoration plantations of the Brazilian Atlantic Forest. *Restoration Ecology*, 26(4), 694-701.

Anexos



ANEXO I

Frecuencias alélicas globales de los *loci* SSR analizados

Frecuencias alélicas por locus

Ac34.3		Ac48.1		Ac11.2		Ac28.3		Ac157.1		Ac41.1		Ac172.1		Ac162.1	
164	0,008	119	0,004	101	0,013	162	0,034	86	0,008	115	0,004	85	0,013	108	0,008
166	0,004	123	0,069	104	0,004	164	0,068	102	0,004	119	0,004	86	0,030	112	0,004
167	0,008	125	0,078	106	0,004	192	0,004	103	0,004	121	0,025	87	0,017	114	0,051
171	0,034	126	0,022	108	0,038	197	0,004	105	0,008	122	0,004	88	0,288	115	0,064
173	0,072	127	0,004	109	0,008	200	0,004	106	0,034	123	0,004	89	0,030	116	0,415
175	0,284	128	0,009	110	0,309	202	0,013	107	0,050	126	0,134	90	0,013	117	0,008
177	0,106	129	0,043	111	0,081	204	0,017	108	0,172	128	0,063	91	0,004	118	0,034
178	0,008	130	0,030	112	0,242	205	0,017	109	0,050	129	0,050	92	0,076	119	0,008
179	0,072	132	0,004	113	0,081	206	0,034	110	0,029	130	0,092	93	0,042	120	0,017
180	0,004	133	0,022	114	0,034	207	0,034	111	0,021	131	0,004	94	0,055	121	0,008
181	0,059	134	0,013	115	0,021	208	0,004	112	0,021	132	0,013	95	0,021	122	0,013
183	0,004	135	0,013	116	0,013	210	0,004	113	0,008	133	0,008	96	0,047	124	0,013
184	0,004	136	0,082	117	0,047	211	0,059	117	0,008	134	0,059	97	0,025	126	0,004
187	0,013	137	0,017	118	0,008	213	0,030	118	0,071	135	0,206	98	0,008	128	0,013
189	0,025	138	0,017	119	0,008	217	0,004	119	0,046	136	0,042	100	0,017	130	0,038
190	0,042	139	0,022	120	0,017	218	0,004	120	0,013	137	0,059	103	0,013	131	0,047
191	0,021	140	0,052	121	0,017	219	0,021	121	0,021	138	0,034	104	0,008	133	0,013
192	0,021	142	0,116	122	0,008	220	0,017	122	0,004	139	0,013	105	0,051	134	0,008
193	0,004	143	0,004	123	0,042	221	0,030	126	0,008	140	0,038	106	0,008	135	0,047
194	0,030	144	0,039	124	0,004	222	0,025	130	0,004	141	0,017	108	0,030	136	0,025
195	0,013	145	0,017			223	0,030	134	0,021	142	0,008	109	0,013	137	0,064
196	0,004	146	0,030			224	0,021	135	0,021	143	0,013	110	0,025	139	0,013
199	0,004	147	0,004			225	0,008	138	0,004	144	0,029	111	0,008	140	0,013
200	0,008	148	0,026			226	0,030	139	0,013	146	0,008	112	0,047	141	0,021
203	0,021	149	0,022			227	0,025	140	0,008	147	0,013	113	0,072	142	0,004
204	0,008	150	0,047			228	0,025	142	0,021	148	0,004	114	0,008	147	0,004
205	0,038	151	0,013			229	0,008	143	0,004	149	0,021	117	0,004	151	0,004
207	0,004	152	0,030			230	0,038	146	0,004	150	0,021	120	0,013	154	0,004
211	0,008	154	0,017			231	0,008	147	0,021	155	0,004	123	0,004	158	0,004
212	0,004	155	0,009			233	0,025	148	0,008	161	0,004	124	0,008	164	0,008
214	0,013	156	0,004			234	0,034	149	0,021					165	0,008
221	0,004	157	0,013			235	0,047	154	0,008					167	0,004
222	0,034	159	0,009			236	0,114	162	0,004					190	0,004
230	0,004	160	0,013			237	0,047	169	0,021					191	0,004
238	0,004	161	0,004			238	0,047	170	0,008						
		163	0,013			239	0,008	171	0,008						
		164	0,004			240	0,004	175	0,050						
		166	0,004			241	0,008	177	0,017						
		167	0,022			242	0,013	178	0,013						
		168	0,013			243	0,008	179	0,029						
		169	0,004			245	0,004	180	0,004						
		171	0,004			253	0,013	181	0,034						
		181	0,009			281	0,004	182	0,008						
		196	0,004					183	0,008						
		211	0,004					188	0,004						
								190	0,013						
								193	0,004						
								205	0,004						
								211	0,004						
								212	0,004						
								213	0,004						
								216	0,004						
								218	0,008						

ANEXO II

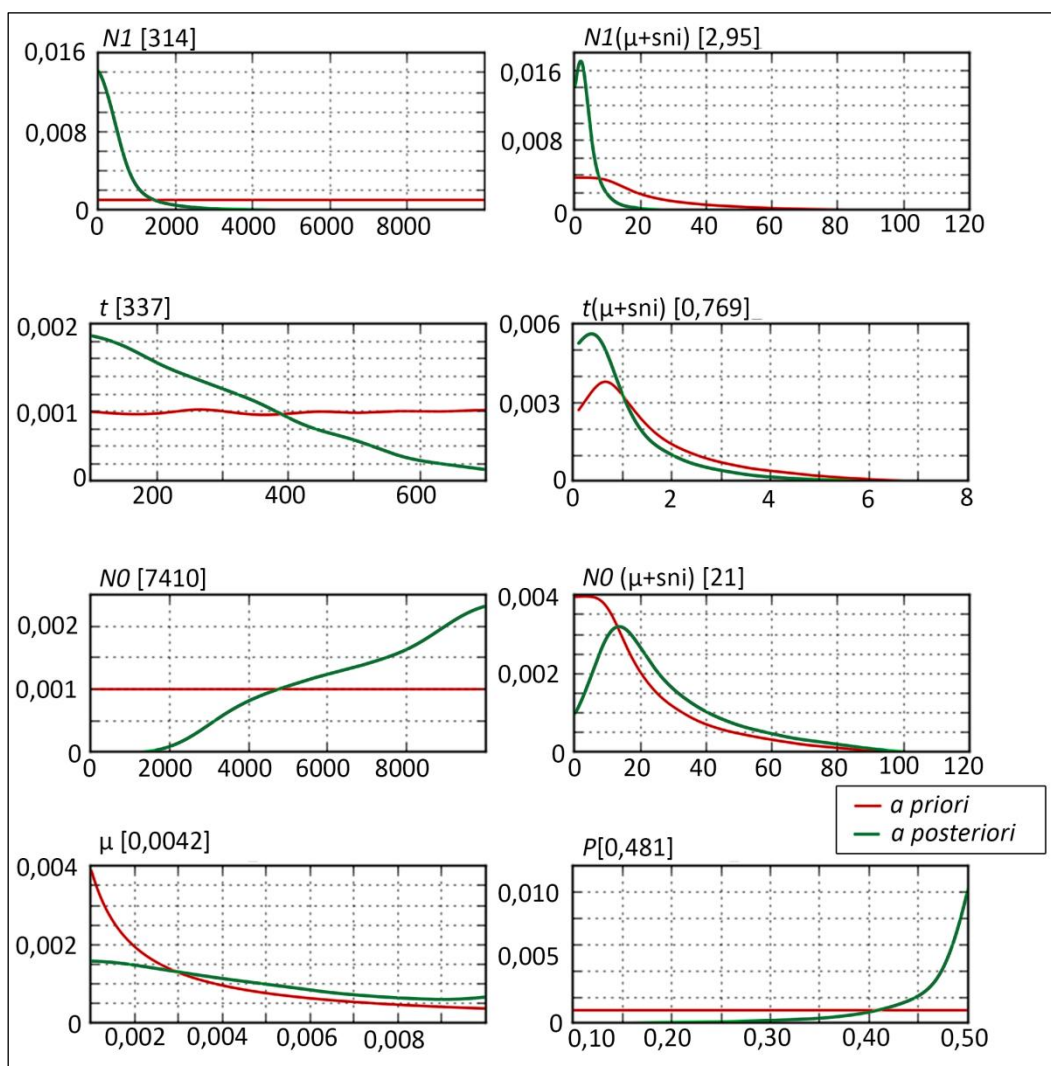
**Análisis de eventos demográfico-históricos mediante
análisis de aproximación Bayesiana (ABC)**

Distribuciones posteriores de los parámetros históricos y demográficos
para los escenarios de cambio en el tamaño poblacional

Escenarios	Parámetros	Media	Mediana	Moda	q025	q050	q950	q975
Cambio reciente en el tamaño poblacional	<i>N0</i>	5530	5690	9940	511	881	9620	9810
	<i>t</i>	3,9	3,9	1,9	1,0	1,0	7,0	7,0
	<i>N1</i>	2000	1410	818	362	444	5910	7340
	μ	$4,7 \times 10^{-3}$	$4,2 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^{-3}$	$9,4 \times 10^{-3}$	$9,8 \times 10^{-3}$
	<i>P</i>	0,440	0,468	0,500	0,216	0,269	0,500	0,500
Cambio histórico en el tamaño poblacional	<i>N0</i>	7110	7410	9650	3020	3440	9800	9900
	<i>t</i>	357	337	104	110	120	655	676
	<i>N1</i>	712	314	128	48	63	2780	4360
	μ	$4,7 \times 10^{-3}$	$4,2 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^{-3}$	$9,4 \times 10^{-3}$	$9,8 \times 10^{-3}$
	<i>P</i>	0,452	0,481	0,500	0,238	0,294	0,500	0,500

N0: Tamaño poblacional actual; *t*: tiempo generacional; *N1*: tamaño poblacional histórico; μ : tasa media de mutación de los SSRs; *P*: parámetro medio de la distribución geométrica y percentiles (q025, q050 q950 y q975) de la distribución de los parámetros.

Distribuciones *a priori* y *a posteriori* de los parámetros históricos y demográficos para el escenario de expansión poblacional histórica



Se indica la mediana de la distribución de los parámetros entre corchetes. NO : Tamaño poblacional actual; t : tiempo generacional; $N1$: tamaño poblacional histórico; μ : tasa media de mutación de los SSRs; P : parámetro medio de la distribución geométrica.; $(\mu+sni)$: estimación de cada parámetro en combinación con la tasa de mutación de los SSRs y la tasa de inserción de nucleótidos ($4,24 \times 10^{-3}$ y $2,81 \times 10^{-4}$ mutaciones/locus/generación, respectivamente).

