

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EVALUACIÓN GENÉTICA DE LA EFECTIVIDAD DEL DISEÑO Y  
MANEJO DE LAS RESERVAS DE PALMARES DE PALMA YATAY PARA LA  
CONSERVACIÓN DE LA ESPECIE**

**por**

**Santiago CANCELA CODINA  
Pablo Andrés RODRÍGUEZ MOSQUERA**

**TESIS presentada como uno de  
los requisitos para obtener el  
título de Ingeniero Agrónomo.**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2015**

Tesis aprobada por:

Director:

-----  
Ing. Agr. Pablo Speranza

-----  
Lic. Paola Gaiero

-----  
Ing. Agr. Gabriela Jolochin

-----  
Ing. Agr. Horacio Giordano

Fecha: 28 de diciembre de 2015

Autor:

-----  
Santiago Cancela Codina

-----  
Pablo Andrés Rodríguez Mosquera

## AGRADECIMIENTOS

En primera instancia agradecemos a nuestra familias, amigos, novias y personas importante en nuestra vida personal, que nos han acompañado, compartido, apoyado, enseñado en este largo camino, no solamente en la meta de la tesis, sino que han sido pilares fundamentales en el camino de la vida y proceso de formación académico, profesional y humano de cada uno de nosotros. En segundo lugar pero no menos importantes cada uno de nosotros le agradece al otro por el importante compañerismo, soporte, apoyo, en los momentos buenos y malos en las frustraciones y esperanza, enojo y alegría que hemos tenido y sobre todas las cosas por la amistad y nunca haber perdido la fe uno en el otro y en lo que hacíamos.

También queremos agradecer a los integrantes del LEDP, por el apoyo brindado y el tiempo compartido en este proceso de formación. Agradecemos a la empresa Montes del Plata (MdP) que permitió no solo el sitio de investigación sino también la financiación de gran parte de esta tesis. Un saludo particular para quien de parte de MdP, Horacio Giordano, impulsó y brindó su entera disposición durante todo el proceso de la tesis e inclusive aceptó formar parte del tribunal. También agradecemos al resto del tribunal, por un lado a Gabriela Jolochin quien nos acercó a esta investigación y los tutores Pablo Speranza y Paola Gaiero quienes nos guiaron durante este largo proceso. Finalmente a Sully por su apoyo en la etapa final, y a todas aquellas personas que pusieron su granito de arena para poder contribuir a que esta meta fuera posible.

En una palabra GRACIAS.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PAGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
I. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
II. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	4
A. <u>CONSERVACIÓN</u> .....	4
1. <u>Conceptos generales</u> .....	4
2. <u>Áreas protegidas a nivel mundial</u> .....	5
3. <u>Conservación del sector forestal</u> .....	6
a. Paradigma del desarrollo sostenible.....	7
b. Certificación forestal, rol del FSC (Forest Stewardship Council).....	8
c. Bosques de alto valor de conservación (BAVC) y Áreas de alto valor de conservación (AVC) .....	9
d. Manejo de AVC y relación con áreas protegidas .....	10
e. AAVC en plantaciones forestales .....	11
f. Conservación forestal en Uruguay .....	12
B. <u>GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN Y SUS HERRAMIENTAS</u> .....	12
1. <u>Marcadores moleculares</u> .....	14
2. <u>Tipos de marcadores moleculares</u> .....	14
a. SSRs o Microsatélites .....	15
3. <u>SSR aplicados a la conservación</u> .....	16
C. <u>DESCRIPCIÓN DE LA PALMA <i>Butia yatay</i></u> .....	17
1. <u>Familia Arecaceae</u> .....	17
2. <u>Morfología de <i>Butia</i></u> .....	21

3. <u>Generalidades de <i>Butia yatay</i></u> .....	21
D. <u>ÁREA DE ALTO VALOR DE CONSERVACIÓN EN ESTUDIO</u>	
PALMAR DE "SANTO DOMINGO" .....	24
III. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	31
A. MUESTREO DE ADULTOS Y RENEVOS.....	31
B. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR .....	34
1. <u>Transferencia de microsátélites <i>B. eriospatha</i> a <i>B. yatay</i> y análisis</u>	
<u>poblacional</u> .....	35
C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	36
IV. <u>RESULTADOS</u> .....	37
A. TRANSFERENCIA.....	37
B. ANÁLISIS POBLACIONAL .....	38
V. <u>DISCUSIÓN</u> .....	41
A. TRANSFERENCIA.....	41
B. ANÁLISIS POBLACIONAL .....	42
C. MANEJO DEL PALMAR DE "SANTO DOMINGO" .....	44
VI. <u>CONCLUSIONES</u> .....	46
VII. <u>RESUMEN</u> .....	47
VIII. <u>SUMMARY</u> .....	49
IX. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	50

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Evolución mundial del número y superficie ocupada de áreas protegidas.....	6
2. Número de muestras (N), Número de alelos (Na), Heterocigosis observada ( $H_o$ ), Heterocigosis esperada ( $H_e$ ) por loci amplificado.....	37
3. Valor alélico de <i>Butia eriospatha</i> en 3 muestras de Quinta Castro, en los 7 Locus amplificados de <i>Butia yatay</i> en el predio de "Santo Domingo".....	38
4. Frecuencia alélica en 30 muestras (N) por Locus por población.....	39
5. Número de muestras (N), Número específico de alelos (Ne), Heterocigosis observada ( $H_o$ ), Heterocigosis esperada ( $H_e$ ), Índice de fijación (F), Número de alelos privados 0 para cada una de las poblaciones.....	40
6. $F_{ST}$ y Probabilidad (P) en 999 permutaciones entre poblaciones.....	40
Figura No.	
1. Esquema de manejo adaptativo.....	10
2. Distribución mundial de las palmas.....	18
3. Mapa de distribución de las seis especies nativas de palmas en Uruguay.....	20

4. Aspectos de los estadios de vida <i>B. yatay</i> .....	23
5. Palmares de <i>Butia yatay</i> del predio de Montes del Plata, "Santo Domingo".....	29
6. Línea del tiempo del Predio de "Santo Domingo".....	30
7. Muestreo de palmeras adultas y renovos en el sector A.....	32
8. Muestreo de palmeras adultas y renovos en el sector B.....	32
9. Escalada de palmera adulta por operarios de Geosylva.....	33

## I. INTRODUCCIÓN

El género *Butia* Becc. (Arecaceae) tiene distribución neotropical, exclusivamente sudamericana. *Butia* se encuentra en Brasil, Paraguay, Argentina y Uruguay. Este último representa el límite sur de su distribución (Lorenzi et al., 2010). La palma yatay, *Butia yatay* (Mart.) Becc., forma palmares en Paysandú (palmares de Quebracho y Guichón) y en Río Negro (palmares de Porrúa y de Mujica) (Chebataroff, 1974). Se considera que todas nuestras especies de palmas se encuentran, en diferentes grados, en peligro de extinción. Sufren amenazas por parte de la acción humana tales como la fragmentación, degradación y pérdida de sus hábitats por reforestación con especies exóticas de árboles y el pastoreo de renuevos. Estos factores ocasionan falta de regeneración, envejecimiento de las poblaciones y reducción en número de individuos. Todas estas amenazas ponen en peligro la continuidad de sus poblaciones en el futuro cercano.

Sin embargo, trabajos anteriores realizados por Gaiero (2010) indican que existe una gran diversidad genética en poblaciones naturales de *B. yatay* observado a partir de análisis con marcadores ISSR (Inter-simple sequence repeats). Si bien la variabilidad intrapoblacional es alta, la diferenciación entre poblaciones es baja como ocurre en especies de fecundación cruzada y en específico para especies leñosas. Es por ello que asegurar la viabilidad de las poblaciones permitiría mantener la variabilidad original y en caso de que poblaciones se encontraran fragmentadas esa variabilidad les permitiría la recuperación.

Una alta diversidad genética detectada en individuos adultos refleja la estructura y diversidad genética previa a la fragmentación y disminución del área de distribución de una especie, mientras que la diversidad genética de las categorías demográficas más jóvenes reflejan los fenómenos demográficos actuales. El efecto de la fragmentación del hábitat interactúa de forma compleja y tiene efectos independientes del tamaño poblacional total de la especie (Fahrig, 2003). Por este motivo es de gran importancia evaluar estos efectos cuando se establecen sistemas de áreas de conservación consistentes en varias poblaciones de tamaño reducido.

En el estudio de Gaiero (2010) sólo se incluyeron individuos adultos, que pueden estar reflejando una situación de variabilidad anterior a la acción antrópica, ya que son individuos muy longevos, que han sobrevivido dichas alteraciones. Son las cohortes posteriores (semillas y plántulas) las que se ven más afectadas por la fragmentación de las poblaciones y la pérdida de hábitats. Dado que las alteraciones antrópicas sufridas

por estas poblaciones son relativamente recientes, las palmas adultas pueden no haber tenido tiempo suficiente para responder a la fragmentación reteniendo altos niveles de variabilidad genética.

En cambio en un trabajo más reciente, Nazareno y Reis (2014), estudiaron en poblaciones del sur de Brasil de la especie cercana *Butia eriospatha* (Mart. ex Drude) Becc. tanto individuos adultos como renuevos que fueron genotipados usando 9 loci de microsatélites (SSR) y combinando esta información genética con información demográfica para evaluar la sustentabilidad a largo plazo de las poblaciones. Este enfoque permitió determinar que las poblaciones pequeñas estaban más expuestas a los efectos de la deriva genética y además observar altos niveles de diferenciación genética entre poblaciones. De todos modos, coinciden con lo encontrado en poblaciones uruguayas de *B. yatay* (Gaiero, 2010) en cuanto a la alta variabilidad genética hallada.

De confirmarse esta gran diversidad genética dentro de las poblaciones en estudio, se puede afirmar que tienen gran potencial para la implementación de medidas de conservación y sobre todo manejo sustentable, garantizando el reclutamiento en las poblaciones de *B. yatay*. Estas medidas deben ser tomadas a la brevedad, dado que posiblemente se registre la conservación de la variabilidad genética que poseían estas poblaciones antes de las alteraciones en sus ambientes, pero no se puede garantizar el mantenimiento de estos niveles de variabilidad en futuras generaciones, particularmente si en la cohorte de los renuevos se evidencia una reducción en los niveles de variabilidad genética.

Aunque se conoce poco de la ecología y la demografía de esta especie, se ha observado un declive en sus poblaciones naturales que están fragmentadas y en malas condiciones a nivel demográfico y sanitario. Además la regeneración parece ser prácticamente nula. Es necesario entender la dinámica poblacional de los palmares de *B. yatay* y describir su demografía para establecer una línea de base a partir de la cual comenzar la restauración de los hábitats y las poblaciones (Clewel et al., 2005). A su vez, la identificación de poblaciones en áreas relictuales genéticamente aisladas permiten establecer prioridades de conservación en base a la importancia de las mismas en relación a la variabilidad genética actual de la especie en su conjunto (Lesica y Allendorf, 1995).

Los palmares de *Butia yatay* de “Santo Domingo” constituyen un área natural de distribución de esta palma, siendo parte de los palmares de Quebracho. Desde 1996 se desarrollan planes de conservación dentro del palmar del predio, y se han declarado dos

zonas de Alto Valor de Conservación (AAVC) cumpliendo con los objetivos de conservación de la empresa (MdP, 2013).

Dada la distribución de la palma *B. yatay* y de la variabilidad interpoblacional que presenta, se lleva a cabo esta investigación de manera de cumplir con mantener los recursos genéticos en un estado dinámico y evolutivo, uno de los objetivos de conservación de la empresa.

Al comparar el estado adulto que se estableció en estado de antropización escaso o nulo, con el estado actual, a través de un estudio genético, se obtendrá información relevante de la situación actual. Con el apoyo de esta información genética y estudios morfológicos, se podrá elaborar un plan de manejo que permita conservar la viabilidad genética de los palmares.

Al ser esta investigación pionera en el Uruguay, genera un antecedente que permitirá y estimulará el surgimiento de otras investigaciones que permiten y permitirán conocer en mayor detalle los RRNN (Recursos naturales) y mejorar las estrategias de conservación del país.

Los objetivos de la tesis son:

- Transferir los microsatelites diseñados para *B. eriospatha* a *Butia yatay*.
- Establecer la variabilidad genética entre adultos y renuevos, intra e inter, de los dos sectores de AAVC sin pastoreo en los Palmares de “Santo Domingo”.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### A. CONSERVACIÓN

La diversidad biológica se ha visto amenazada permanentemente por la actividad humana y se encuentra en una etapa de declive. La existencia de muchas especies amenazadas, en peligro de extinción u otras extintas por la actividad del hombre son algunas de las problemáticas a las cuales se debe enfrentar el mundo hoy en día (Shaffer 1981, Eguiart y Piñeiro 1990, Rocha y Gasca 2007). Son diversas las actividades productivas que causan la fragmentación, degradación y desaparición de hábitats. Algunos de los hábitats en peligro son los bosques naturales, que han sido foco de conservación ya que algunos estudios indican que concentran la mitad de la diversidad biológica del mundo y se encuentran amenazados. A partir de la década del 90 se suscitan una serie de eventos en pos de revertir esta situación (FAO 2001, Aiama et al. 2015). Para comprender las actividades de conservación resulta imprescindible definir qué se entiende por este término y por diversidad biológica como también resumir las estrategias de conservación.

#### 1. Conceptos generales

Innumerables investigaciones y autores de todo el mundo se refieren a la conservación. La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) define a la conservación como: *“La protección, atención, gestión y mantenimiento de los ecosistemas, hábitats, especies silvestres y las poblaciones, dentro o fuera de sus entornos naturales, con el fin de salvaguardar las condiciones naturales para su permanencia a largo plazo”* (IUCN, s.f.). Es evidente que el foco principal de la conservación es conservar la biodiversidad. Para este término existen diferentes definiciones, una de ellas muy aceptada propuesta por Naciones Unidas (1992) en el marco de “La Convención de Diversidad Biológica”. *“La variabilidad entre todos los organismos vivos de cualquier Fuente, incluidos entre otros, los ecosistemas terrestres, marinos y otros ambientes acuáticos y los complejos ecológicos de los que forman parte; comprende la diversidad dentro y entre especies y de ecosistemas”*. Con esta definición queda explicitado que la conservación puede ser enfocada desde distintos puntos de vista, tanto para la diversidad de especies, como de ecosistemas o de genes.

Para poder conservar existen diferentes métodos y herramientas, según Dudley (2008) una herramienta muy utilizada en las estrategias nacionales e internacionales para la conservación son las áreas protegidas. La última versión de esta definición por IUCN (s.f.) es: *“Un espacio geográfico claramente definido, reconocido, dedicado y gestionado, mediante medios legales u otros tipos de medios eficaces para conseguir la conservación a largo plazo de la naturaleza y de sus servicios ecosistémicos y sus valores culturales asociados”*.

## 2. Áreas protegidas a nivel mundial

Según Deguignet et al. (2014) hay 209.000 áreas protegidas que pertenecen a la “World Database on Protected Areas” (WDPA) las cuales cubren más de 30 millones de km<sup>2</sup> distribuidas en 193 países (Cuadro No. 1). Actualmente está protegido el 3,41% de la superficie marina y el 14% de las áreas terrestres del mundo. Si no se tiene en cuenta la Antártida, el 15.4% de la superficie terrestre total está protegida. Según Chape et al. (2008) la historia de las áreas protegidas a nivel mundial tiene inicios desde 300 AC, pero su importancia se ha ido incrementando con el crecimiento de la población mundial en especial luego de la revolución industrial. En 1872 se reconoce el primer Parque Nacional, Yellowstone en Estados Unidos de América. Desde entonces cada país fue declarando diferentes sitios de conservación con variadas terminologías y el número de sitios destinados para la conservación ha crecido constantemente. Holdgate (1999) plantea que el primer registro para unificar la terminología es de 1933 en la Conferencia Internacional para la Protección de la Fauna y la Flora Silvestre realizada en Londres. Sin embargo, los cambios principales se inician en la década del 60 cuando se crea la Comisión Mundial de Áreas Protegidas (CMAP) en 1958 y en 1962 se celebra el 1<sup>er</sup> Congreso Mundial de Parque en Seattle repitiéndose estos congresos cada 10 años, en 1972, 1982, 1992, y 2003 (Dudley, 2008). También los cambios se dan durante una serie de eventos y acuerdos internacionales en ese periodo de tiempo. En toda esa serie de eventos internacionales se avanza por un lado en el desarrollo de una terminología que permita clasificar la información mundial y en la elaboración de una estrategia conjunta, con compromisos a corto y largo plazo de los países que forman parte. La tendencia actual es de un paradigma de desarrollo sostenible y conservación de la diversidad biológica, siendo los bosques uno de los ambientes en los que se han focalizado las áreas protegidas (Chape et al., 2008).

Cuadro No. 1. Evolución mundial del número y superficie ocupada de áreas protegidas.

Año	Número de sitios	Área total protegida (km <sup>2</sup> )
1962	9214	2.400.000
1972	16.394	4.100.000
1982	27.794	8.800.000
1992	48.388	12.300.000
2003	102.102	18.800.000
2014	209.429	32.868.673

Fuente: Deguignet et al. (2014)

Dado que los bosques concentran la mitad de la biodiversidad mundial el 13% de estos se encuentran en áreas protegidas. La superficie mundial de los bosques supera los 4000 millones de hectáreas equivalentes al 31% de la superficie terrestre del planeta. De la superficie total de bosques, el 93% son bosques naturales y el restante 7% plantaciones. En cuanto a los tipos de bosques la mayor superficie es de bosques tropicales y subtropicales (56%), y el restante 44% de bosques boreales (FAO, 2001, 2010).

### 3. Conservación del sector forestal

Los bosques además de su importancia en la diversidad biológica cumplen otros bienes y servicios forestales; madera industrial, combustible de madera, productos forestales no madereros, conservación del suelo y el agua, mitigación del cambio climático, apoyo a los sistemas agrícolas, generación de empleo, oportunidades recreativas y protección del patrimonio natural y cultural (FAO, 2010). El rol de los bosques en la historia de la humanidad ha sido relevante, data de la prehistoria, siendo la principal fuente de combustible y material de construcción. En general el uso del bosque por las sociedades ha sido en forma indiscriminada y no con visión sostenible. Se ha asociado la deforestación con un rápido desarrollo económico (FAO, 2012). Durante el transcurso de los años han habido variaciones en la cubierta forestal. Estas se podrían resumir en los procesos de degradación y mejora de los bosques, reforestación y regeneración natural, otros usos de la tierra, deforestación y forestación. La variación de la superficie forestal se da por la interacción del bosque con otros tipos de uso de la tierra. Se incrementa cuando, ya sea por medio de plantaciones o regeneración natural, se establece un bosque en zonas donde no existía cubierta forestal. Las pérdidas se dan

con la deforestación, lo que implica que se sustituye el bosque por otros usos (FAO, 2001).

La deforestación principalmente de los trópicos es la responsable de pérdida de bosques a nivel mundial siendo foco de preocupación. En la década del setenta se comienza a tomar mayor conciencia de afrontar este problema y ver la necesidad de que las comunidades formarán parte del manejo forestal. En la década del 90, cuando la deforestación era de 16 millones de hectáreas anuales, existieron medidas que no tuvieron éxito como el boicot al comercio de maderas tropicales, el cual tuvo resultados negativos e incrementó el problema. Como punto de partida de un nuevo paradigma surge el desarrollo sostenible en la Cumbre por la Tierra de 1992, realizada en Brasil (FAO 1995, Daniluk y López 2000, FAO 2001, 2011, 2012).

#### a. Paradigma del desarrollo sostenible

En el manejo sostenible se busca un manejo equilibrado entre conservación y uso que garantice la contribución de los bosques tanto en forma económica y social como ambiental. Se entiende que el agotamiento de los recursos naturales conlleva al fracaso de una economía. Son los países con tasas de pobreza más elevadas, con grandes conflictos civiles, los que conllevan los mayores desafíos para lograr una ordenación forestal sostenible (FAO, 2007). En esos países los bosques principales son los tropicales, que tienen un rol más importante en la diversidad biológica (FAO, 2001). La necesidad de un manejo sostenible también es impulsada por los consumidores de países importadores como Europa occidental y los Estados Unidos, estableciendo restricciones a las importaciones. Las iniciativas de certificación que aporten credibilidad surgen como la herramienta de implementación del desarrollo sostenible (FAO, 2001). Según WWF (2012) la certificación forestal se define como *“un proceso voluntario por el cual una tercera parte, acreditada, garantiza mediante un documento escrito que la gestión de un bosque (ya sea privado, comunitario o concesión) es realizada bajo exigentes estándares sociales, ambientales y económicos, previamente establecidos.”* En el 2001 la superficie de bosques certificados se estimaba en 90 millones de hectáreas. Esta representa el 2% de la superficie forestal y los bosques certificados eran limitados en los países tropicales. Sin embargo, los números indican que la superficie certificada aumenta constantemente y la certificación forestal pasa a considerarse una actividad habitual que se va ajustando y modificando con el tiempo (FAO, 2001). En Uruguay las 30 empresas forestales certificadas están bajo el sello del Forest Stewardship Council

(FSC) (Canzani y Martínez, 2013). Según FSC (2014a) los bosques certificados hasta julio 2014 superaban los 180 millones de ha, distribuidos en 81 países.

b. Certificación forestal, rol del FSC (Forest Stewardship Council)

El FSC fue fundado en octubre de 1993 en respuesta a la implementación del desarrollo sostenible. La misión del FSC es “*promover un manejo ambientalmente apropiado, socialmente beneficioso y económicamente viable de los bosques del mundo*” (FSC, 2012). El concepto de ambientalmente apropiado implica que las actividades productivas mantienen la biodiversidad, la productividad y procesos ecológicos del bosque. En cuanto a lo social, tanto las poblaciones locales como la sociedad, deben estar involucrados en los planes de manejo y disfrutan de los beneficios del bosque. Que las actividades forestales sean económicamente viables implica que sean rentables sin, generar ganancias a expensas del detrimento de los recursos naturales y/o de las comunidades (FSC, 2014b).

La certificación FSC es otorgada por auditorías de empresas certificadoras FSC acreditadas, el FSC no emite certificados. El certificado incluye por un lado a la parte productiva Certificación de Manejo Forestal- como por otro a la cadena de transformación y comercialización -Certificación de Cadena de Custodia-. Obteniendo ambos certificados se obtiene un sello o etiqueta de la entidad certificadora, asegurando que el producto proviene de un manejo de bosques que cumplen con la misión ya mencionada. Se puede obtener dos tipos de certificados CoC, *exclusiva* y *no exclusiva*. En la *exclusiva* el 100% de la materia prima proviene de bosques certificados, en cambio en la *no exclusiva* se permite parte de la materia prima de bosques no certificados. El certificado tiene una duración de 5 años, en los que por medio de auditorías anuales se verificará el cumplimiento del estándar FSC por el que le fue otorgada la certificación (WWF 2012, FSC 2012). El estándar FSC se basa en un manejo forestal de acuerdo a los 10 Principios de este organismo que son las normas esenciales para cumplir con su misión, y los 54 Criterios que permiten determinar si un Principio se cumple o no. La primera vez que se publicaron los Principios y Criterios (PyC) fue en 1994, no hay una jerarquía de los Principios o entre los Criterios y se pueden aplicar tanto juntos como separados. La certificación FSC busca ser complementaria sin remplazar a otras iniciativas internacionales, nacionales y locales que promuevan el manejo forestal sostenible (FSC, 2014b). Entre los 10 Principios del FSC, los que se refieren a los cuidados ambientales son el 6, 8 y 9. Este último se refiere a las Áreas de Alto Valor de

Conservación, antes denominadas Bosques de Alto Valor de Conservación (FSC 2009, Canzani y Martínez 2013).

c. Bosques de alto valor de conservación (BAVC) y Áreas de alto valor de conservación (AVC)

La World Wide Forest define a los BAVC como *“bosques de importancia sobresaliente y crítica debido a su alto valor ambiental o socioeconómico, a su biodiversidad o a su valor como paisaje. Por tanto, los BAVC pueden incluir por ejemplo los bosques de ladera de los Alpes europeos que protegen los asentamientos humanos, los cementerios sagrados de los indígenas de la Primera Nación de Norteamérica, los hábitats en el Sureste de Asia de los orangutanes amenazados, o los extensos bosques de paisaje en Siberia”* (WWF, 2007). En 2005 se crea la Red de Recursos de Áreas de Alto Valor de Conservación (en inglés HCVRN), con el fin de nuclear y promover la correcta identificación y gestión de las Áreas de Alto Valor de Conservación (AAVC). Se modifica el concepto de “Bosques de AVC” a “AAVC” para incluir ya sea los ecosistemas forestales como los no forestales. De esta manera se pretende expandir las fronteras de la conservación más allá de los bosques y el sector forestal, integrando otros rubros y áreas de importancia ambiental que deberían ser conservadas. En un principio se utilizaban indistintamente como el mismo concepto BAVC y AAVC. Recientemente el FSC, en la versión 5.0 de los PyC sustituyó el concepto de BAVC por AAVC incluyendo en el Principio 9 las 6 definiciones de AAVC (Brown et al., 2013):

- AVC1, Diversidad de especies
- AVC2, Ecosistemas y mosaicos a escala de paisaje
- AVC3, Ecosistemas y hábitats
- AVC4, Servicios ecosistémicos
- AVC5, Necesidades de las comunidades
- AVC6, Valores culturales

Esta terminología de AAVC también es utilizada en otros estándares de certificación forestales, de agricultura, sistemas acuáticos, instituciones financieras y bancos de desarrollo (Brown et al. 2013, HCV 2014). La creciente demanda de productos sostenibles hace prever una mayor inclusión de AAVC, aumentando los paisajes protegidos bajo este sistema. Sin embargo, los profesionales de las AAVC y

otros interesados como ONG, han visto una heterogeneidad en la aplicación de los términos y manejo de estas áreas. La red de AAVC pretende ser de referencia para garantizar que el concepto es utilizado coherentemente y de forma eficiente. Es importante una correcta identificación, gestión y monitoreo (HCV, 2014).

d. Manejo de AVC y relación con áreas protegidas

El manejo de un Área de Alto Valor de Conservación debería seguir el proceso de manejo adaptativo. La idea del manejo adaptativo implica que al aplicarse el plan de gestión y la realización de monitoreos, se evalúen los resultados y si fuera necesario se hagan las modificaciones tanto en el plan de gestión como en los monitoreos. Con el manejo adaptativo Figura No. 1. se busca que las decisiones tomadas permitan cumplir con los objetivos (Brown y Senior, 2014).

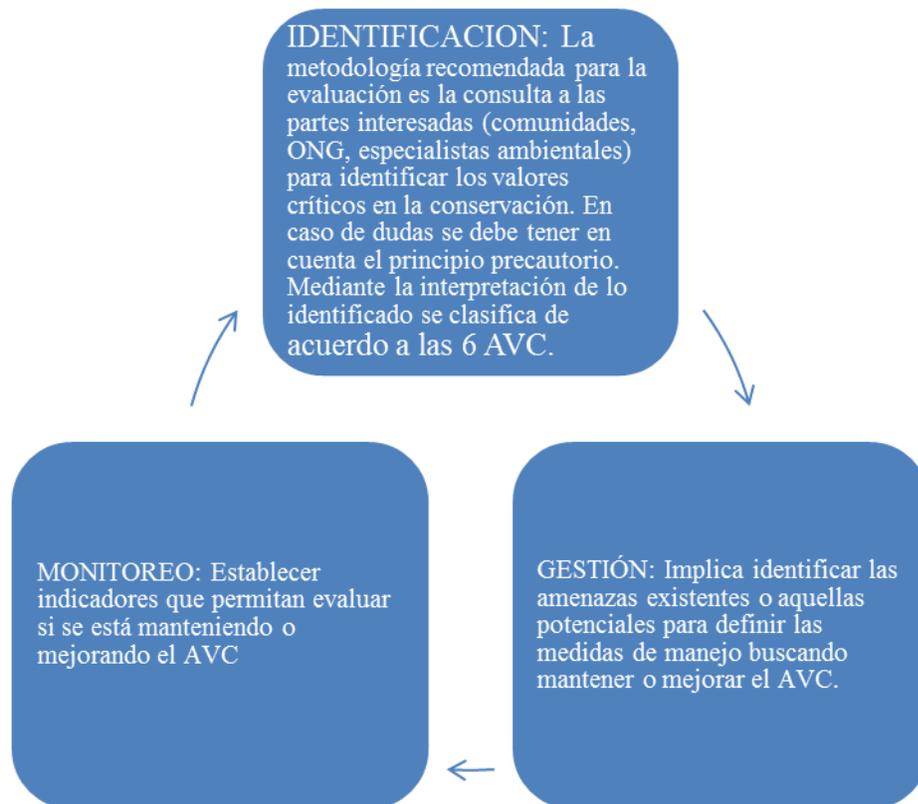


Figura No. 1. Esquema de manejo adaptativo

Fuente: modificado de Brown y Senior (2014)

Relacionando las AAVC con las Área Protegidas (AP) queda en claro que ambas tienen el objetivo de conservación, pero la diferencia radica principalmente en la escala. Las AAVC están enfocadas a la conservación desde un nivel empresarial en cambio las AP están pensadas a escala país. Hay muchas AAVC que están fuera de las redes de Áreas protegidas. La designación de un AAVC no implica que ésta tenga que ser AP. Sin embargo, si la designación de un AP fue correcta, ésta indudablemente será un AAVC. No es el objetivo de las AAVC crear más AP, sin embargo, pueden ayudar a la evaluación de la cobertura de un sistema de AP en una región (WWF 2007, Canzani y Martínez 2013). Las AAVC originalmente fueron pensadas para bosques naturales, con el incremento de las plantaciones forestales tuvo que reverse para que éstas también estuvieran contempladas (Masiero et al., 2014).

#### e. AAVC en plantaciones forestales

Las plantaciones forestales comienzan a partir del 1950. Las ventajas principales son el rápido crecimiento comparado a bosques naturales, lo que implica en menor tiempo obtener la madera demandada y se pueden establecer en sitios donde en general no son posibles otros usos de la tierra (White y Adams, 2007). Los árboles son plantados principalmente para producción, pero también para otros fines. Tres cuartas partes de las especies plantadas son nativas. La superficie plantada mundial es de 264 millones de hectáreas lo que representa el 7% del área de bosques. Esta superficie ha venido en aumento durante el siglo XX y entre el 2000 y el 2010 a un promedio de 5 millones de hectáreas por año. Las regiones donde se concentra la mayor superficie de bosques plantados son Asia oriental (concentrados en China), Europa y Norteamérica (Evans 2009, FAO 2010). La tendencia marca que la demanda de la madera será cubierta principalmente por plantaciones, por lo que resulta de importancia establecer estrategias de planificación y gestión teniendo en cuenta los factores sociales y ambientales de este cambio (FAO 2001, White y Adams 2007). El aumento de las plantaciones forestales genera controversias, siendo impulsado por algunos porque alivian la presión sobre los bosques naturales, aumentan los puestos de trabajo en el sector rural y brindan una amplia gama de servicios ecosistémicos. Por otro lado, preocupan los efectos sociales negativos como los conflictos por la tenencia de la tierra y el establecimiento de monocultivos (Warman 2014, Batra y Pirard 2015).

La certificación FSC no permite la conversión de bosques en plantaciones desde el año 1994. Según esta entidad certificadora las plantaciones deben establecerse en sitios degradados donde otros usos agrícolas son limitados pero favorables para los árboles (Levy, s.f.). Un estudio realizado en base a los informes públicos de FSC encontró la problemática de analizar la clasificación de las AAVC, en especial en las plantaciones, ya que no se utiliza uniformemente la clasificación en las 6 AAVC ya descritas. Ese estudio encontró que las plantaciones certificadas FSC se desarrollan principalmente en el hemisferio sur, Australia, Nueva Zelanda, Sudáfrica, Chile, Uruguay y Brasil (Levy, s.f.). En Uruguay se encontró que las empresas forestales certificadas FSC tienen sitios destinados para la conservación y de las 30 empresas certificadas 6 tienen declaradas AAVC pero también sin la clasificación antes mencionada (Canzani y Martínez, 2013).

#### f. Conservación forestal en Uruguay

En Uruguay se da la situación particular en el que el modelo forestal está basado en la protección del bosque nativo y el incentivo al desarrollo de bosques plantados con especies de rápido crecimiento como *Eucalyptus* spp. y *Pinus* spp. en las condiciones climáticas de Uruguay. Esto quedó establecido a partir de 1987 con la denominada Ley Forestal No. 15.939, en la cual los principales objetivos son la protección del monte nativo y el fomento de plantaciones con especies exóticas para crear una masa boscosa que permita el desarrollo de industrias (Daniluk y López 2000, DGF 2013, 2014, MGAP. DGF 2015). La superficie declarada de prioridad forestal es de 4 millones de hectáreas, lo que equivale al 23% de la superficie agropecuaria del país (Uruguay XXI, 2014). Uruguay es uno de los países que cuenta con inventario forestal nacional (IFN), se estima que para fines de 2015 las plantaciones ocuparán una superficie de 1.062.000 millones de hectáreas y el monte nativo 783 mil hectáreas (MGAP .DGF, 2015). Según Uruguay XXI (2014) la política forestal llevada a cabo permitió tener un manejo forestal sostenible. A esto se le suman las apuestas de las empresas forestales en la exportación de sus productos con certificación FSC.

## B. GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN Y SUS HERRAMIENTAS

Tratando de buscar una solución a las problemáticas de conservación planteadas anteriormente, en las últimas décadas ha surgido una nueva disciplina, la biología de la

conservación. Esta disciplina tiene un enfoque multidisciplinario e incluye entre otras ciencias la biosistemática, biogeografía y la genética, siendo esta última de particular interés en este trabajo (Shaffer 1981, Eguiart y Piñeiro 1990, Rocha y Gasca 2007). Los problemas más importantes para la genética de la conservación son la disminución del tamaño de las poblaciones y la fragmentación de los hábitats, lo que lleva a la pérdida de variabilidad genética (Eguiart y Piñeiro, 1990). Una herramienta importante para esta disciplina son los marcadores moleculares, los cuales han permitido recopilar información acerca de la diversidad genética de las distintas poblaciones y especies (Eguiarte y Pinero, 1990). Una de las principales utilidades de la genética de la conservación es la determinación e identificación taxonómica de las especies prioritarias para la conservación y unidades que deberían ser conservadas por su gran potencial evolutivo al ser futuras fuentes de diversidad genética (Mortiz, 2002). Otra aplicación importante es la detección de acciones ilícitas como la comercialización de especies protegidas (Baker et al., 2000)

Uno de los principales problemas que estudia la genética de la conservación es la fragmentación de hábitats y poblaciones, ligado a la disminución del tamaño de las poblaciones. El hecho de que un hábitat sea fragmentado genera una reducción en el número de alelos por locus por lo que lleva a una reducción de loci polimórficos. Este acontecimiento junto con el aumento de la deriva génica, endogamia y reducción en el flujo génico, ocasionan una disminución de la variabilidad genética llevando a las poblaciones hacia un cuello de botella (Nei et al. 1975, Ellstrand y Elam 1993, Lowe et al. 2005). Si esto se extiende en el largo plazo lleva como consecuencia un aumento de los alelos deletéreos, disminución de la fecundidad, aumento de la mortalidad y disminución en el crecimiento. Esto llevaría a la población hacia un vórtice de extinción ya que limita a ésta a responder a futuros cambios ambientales y disminuye su potencial evolutivo (Lande 1988, Caro y Laurenson 1994, Nason y Hamrick 1997). La capacidad de flujo de información genética entre poblaciones fragmentadas es lo que va a determinar la diferencia entre que ocurra o no lo anteriormente mencionado (Didham et al. 1996, Nason y Hamrick 1997, Aizen y Feinsinger 2003, Griscom et al. 2007). No todas las especies responden de la misma manera a la fragmentación ya que las especies raras que tienen un rango de distribución acotado y de por sí tienen un tamaño pequeño se ven menos afectadas ante un evento de fragmentación, que las especies que presentan un mayor rango de distribución y mayor tamaño (Karron 1987, Ellstrand y Elam 1993).

## 1. Marcadores moleculares

Un marcador molecular según Rocha (2003), es una secuencia de ADN que se ha convertido en una herramienta que permite entre otras aplicaciones, la determinación de la diversidad genética y por ende su utilidad en distintos programas de investigación. Esta secuencia de ADN puede ser localizada físicamente dentro del genoma de un organismo, pudiendo encontrarse cerca de una región codificante de interés, o de una región no codificante que presenta características estructurales particulares. Al ser una secuencia de ADN, presenta las mismas características fisicoquímicas de éste y su herencia también es explicada por las mismas leyes establecidas por la genética, los que los hacen una herramienta útil para la detección del polimorfismo (Rocha, 2002). Otra característica particular de los marcadores moleculares es que pueden ser específicos para cada individuo, grupo de individuos, especies o aún grupos taxonómicos mayores. Esto ocasiona que se conviertan en herramientas útiles para poder analizar no sólo individuos, sino también poblaciones. Es de importancia resaltar que los marcadores moleculares no siempre se aprecian en el fenotipo de los individuos, su presencia es independiente del efecto ambiental y son mucho más numerosos y polimórficos que otro tipo de marcadores. Por estas características presentan diversas utilidades en la actualidad; como la selección de plantas y variedades para programas de mejoramiento genético y la selección de plantas con alelos de interés (Villegas et al., 2000). Los marcadores moleculares son utilizados a nivel de la transgenia para el seguimiento, aislamiento y caracterización de genes de interés para ésta. En el área de la conservación como se detalló previamente presentan una importante utilidad (Kuiper et al. 2001, Dreher et al. 2003, Morris et al. 2003).

## 2. Tipos de marcadores moleculares

Hay diversos tipos de marcadores moleculares con distintas características, objetivos, funcionalidades y potencialidades. Uno de los primeros marcadores utilizados para análisis poblacionales fueron los RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Esta técnica utiliza enzimas de restricción que producen fragmentos de ADN al cortar en sitios específicos viéndose la variación en el largo de los fragmentos. Una característica importante de estos marcadores es que son codominantes, por lo que pueden detectar tanto individuos homocigotos como heterocigotos. Una de las principales desventajas que presenta este método es que su información es limitada y

requiere grandes cantidades de ADN de calidad (Parker et al. 1998, Rocha 2003, Rentaria 2007). Otro tipo de marcador pero en este caso dominante son los RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Esta técnica se basa en la metodología del PCR. Consiste en la amplificación de fragmentos de ADN con un solo cebador corto de diez nucleótidos aproximadamente que se hibrida al ADN molde de manera aleatoria (Williams et al. 1990, Aagaard et al. 1998, Parker et al. 1998, Ranade et al. 2001, Rocha 2003). Una de las técnicas más aplicadas en la actualidad debido a su calidad y cantidad de información es AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Combina dos tipos de técnicas, la de digestión por enzimas de restricción y dos amplificaciones de PCR utilizando cebadores marcados basados en las secuencias ligadas. Entre las ventajas a destacar de este tipo de marcadores es que no requieren ninguna información de la secuencia para su análisis y es una técnica altamente reproducible. Como desventaja se puede mencionar el gran número de pasos que ésta requiere para obtener resultados (Vos et al. 1995, Barcelos et al. 2002, Rocha 2003, Rentaria 2007). Los ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats) son otro tipo de marcadores moleculares amplificados por la reacción de PCR a partir de la presencia de un oligonucleótido o cebador complementario a un microsatélite. Los primeros de estos marcadores consisten en un motivo de di o tri nucleótidos. Las moléculas generadas a partir de la reacción de PCR son consideradas loci, las bandas corresponden a marcadores dominantes. La presencia de la banda representa el genotipo dominante ya sea como homocigoto o heterocigoto, en contraparte la ausencia de la banda representa el genotipo recesivo. Se asume que existen dos alelos por locus (Culley y Wolfe 2001, Rentaria 2007). A pesar de la utilidad de todos estos marcadores para la realización de este trabajo presentan desventajas en comparación con los SSRs (Simple Sequence Repeats), siendo éstos los de mayor utilidad y aporte de información para el objetivo de esta investigación.

#### g. SSRs o Microsatélites

Los Microsatélites son regiones de ADN constituidas por secuencias cortas de 1 (mononucleótidos) a 6 (hexanucleótidos) pares de bases nucleotídicas que se repiten en tándem un número elevado de veces. Están distribuidos a lo largo de todo el genoma y pueden presentarse tanto en regiones codificantes como en regiones no codificantes (Gupta et al. 1994, Zane et al. 2002, Gonzales 2003). Los que están compuestos por un único motivo se consideran puros o perfectos, los conformados por dos o más motivos se denominan compuestos y se consideran como interrumpidos aquellos que presentan uno o más nucleótidos insertos en alguna parte de la repetición (Schlotterer, 2000). Estas

regiones presentan herencia mendeliana y son codominantes, por lo que se puede diferenciar individuos homocigotos de heterocigotos (Golstein y Pollock 1994, Gonzales 2003). También presentan un alto nivel de polimorfismo, aunque están bordeados por secuencias altamente conservadas a nivel de especie. Como consecuencia de esta característica estas secuencias pueden ser amplificadas por PCR utilizando cebadores específicos. Se ha demostrado que cuanto más perfectos son los microsatélites, tienden a presentar una mayor tasa de mutación, ya que la probabilidad de deslizamiento de la polimerasa durante la replicación, aumenta con la longitud y la simplicidad del microsatélite (Schlotterer 2000, Oliveira et al. 2006). La tasa de mutación estimada para los microsatélites varía entre  $10^{-2}$  y  $10^{-5}$  (Weber y Wong 1993, Chakraborty et al. 1997). Los marcadores de este tipo son usados para identificar polimorfismos entre genotipos y permiten la detección de alelos específicos. Otra importante característica de los microsatélites es que pueden ser utilizados en una especie emparentada si es posible amplificarlos satisfactoriamente y muestran un nivel de variabilidad suficientemente informativo, a este proceso se le llama transferencia (Speranza y Malosetti, 2007).

La transferencia es empleada debido a que los costos y el esfuerzo que requiere generar nuevos microsatelites para una especie aún siguen siendo altos, especialmente si no se dispone de un genoma secuenciado u otro tipo de información genómica previa para esa especie. La eficiencia de la transferencia depende de que las frecuencias flanqueantes se conservaran durante la evolución y separación de la especie para la cual se desarrolló el marcador microsatélite y la especie en el cual va a ser transferido (Zhang, 2003). Se puede mencionar una relación entre la distancia genética y la transferibilidad de un marcador, cuanto mayor sea la distancia menos probable que la transferencia sea lograda con éxito. Cuando se transfiere un microsatélite éste puede perder polimorfismos de la especie de origen a la especie a la cual es transferido (Moreno et al. 2011, Abd 2014).

### 3. SSR aplicados a la conservación

La versatilidad y utilidad de los SSR ha aumentado debido a características tales como, la alta tasa de polimorfismo, la poca cantidad de ADN necesaria y que no se requiere el sacrificio de individuos para el análisis (Gonzales 2003, Gelape 2007). Dentro de las aplicaciones mayormente empleadas de los microsatélites se destaca el análisis de la diversidad genética y distribución geográfica, determinación de género y especie y relaciones de parentesco y paternidad (Costa, 2004). Todas estas aplicaciones

pueden asociarse a sistemas de información geográfica que permiten una optimización en cuanto a la utilidad de los recursos y la información (Guarino et al., 2002). Esto nos permite dentro de una especie evaluar cuáles son los nichos y lugares geográficos de origen de la especie y a cuáles se ha ido desplazando, ya sea en función de sus propios medios o por acción antrópica (Bedoya, 2012). De esta manera, se puede evaluar la redundancia en los materiales a conservar, optimizando los recursos empleados para la conservación y ampliando las oportunidades a otros individuos o poblaciones que requieren ser conservados (Gelapes, 2007).

Para llevar a cabo el estudio con los microsátélites, entender e interpretar los resultados, además de conocer las características y utilidades de estos, es necesario también en cualquier caso el conocimiento de la especie, su distribución, evolución y estado actual. Tal es el caso para la aplicación de éstos en las comunidades de palmeras de Uruguay y la región, que se reportan como altamente fragmentadas, debido principalmente a acciones antrópicas. Desde mediados del siglo XX diversos autores describieron a los palmares de *B. yatay* como amenazados por acción del hombre ya que no se observaban individuos jóvenes. Entre los problemas principales se manifestaba; que el ganado se alimenta de los renuevos, las tierras cultivadas no permitían establecer renuevos, la realización de prácticas agrícolas de quemas para el control de malezas y la extracción furtiva de palmeras adultas (Brussa 1998, Batista et al. 2014).

## C. DESCRIPCIÓN DE LA PALMA *BUTIA YATAY*

### 1. Familia Arecaceae

Las palmas se clasifican taxonómicamente dentro de la familia Arecaceae que integra el orden Arecales, único dentro del súper orden Areciflora, siendo de los más antiguos reconocidos en el registro fósil. Esta familia se describió en primera instancia por Schultze-Schultzenstein en 1832, sus orígenes datan de fines del Jurásico o principios del Cretácico en el oeste de Gondwana lo que sería en la actualidad América del sur y África, dispersándose luego hacia otros continentes. Esta gran historia evolutiva se observa en la combinación de muchos caracteres primitivos con otros altamente especializados. Las Arecaceae se destacan a nivel socioeconómico, ya que después de las gramíneas son la familia más importante dentro de las monocotiledóneas en utilidad para el hombre. Esto se debe a que son utilizadas como alimentos, elementos para la construcción, aceites, fibras, protección y también empleadas a nivel ornamental (Moore

y Uhl 1982, Dransfield y Uhl 1998). En la actualidad las palmas presentan una distribución tropical y sub tropical como se muestra en la Figura No. 2, siendo el continente sudamericano uno de los centros de diversidad. Se distribuyen en diversas condiciones ecológicas, aunque exigen como requerimiento para su desarrollo normal una temperatura media anual de por lo menos 20°C. En ciertos casos como ocurre en Uruguay llegan a climas templados. Esto puede deberse a relictos de climas benignos, y se trata de los límites de distribución de esta familia. A pesar que las palmas presentan un alto grado de endemismo, su dispersión se ha dado con éxito. Esto en muchos casos puede ser explicado principalmente por la acción antrópica (voluntaria o involuntariamente) dada la utilidad para el hombre mencionada anteriormente (Moore y Uhl 1973, Chebataroff 1974, Moore y Uhl 1982, Dransfield y Uhl 1998, Stern 2000, Dransfield et al. 2005).

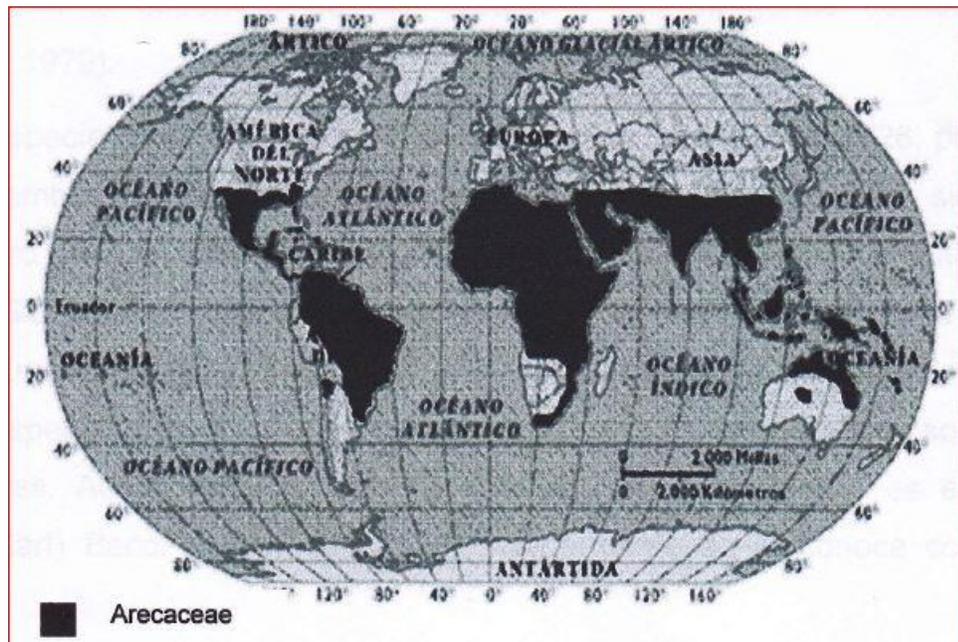


Figura No. 2. Distribución mundial de las palmas

Fuente: Stern (2000)

A nivel nacional se presentan seis especies y un híbrido de la familia Arecaceae, que se desarrollan de manera espontánea, de las cuales cuatro pertenecen al género *Butia* (*B. odorata* (Barb. Rodr.) Becc., *B. yatay*, *B. paraguayensis* (Barb. Rodr.) L. H. Bailey y *B. lallemantii* (Deble y Merchiori) Becc., *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman la única representante del género *Syagrus*, *Trithrinax campestris* (Burmeist) Drude y

Grisebach, la única representante de este género y el híbrido *XButyagrus nabonandii*. Las poblaciones de cada una de estas especies en general no comparten áreas comunes de convivencia a excepción de *S. romanzoffiana* y *B. odorata*. La distribución de las especies es explicada con cierta importancia por la historia geológica de la vegetación y los distintos ambientes edáficos, por lo que estas especies conviven y toleran distintos tipos de vegetación dados por los distintos ambientes, por tanto tienen áreas de distribución diferentes como se muestra en la Figura No. 3. Las especies nativas de Uruguay de palmas presentan distribución mayor en el cono sur que incluye Argentina, Brasil y Paraguay (Chebataroff 1974, Brussa 1998). Los géneros *Butia* y *Syagrus* son exclusivos de Sudamérica y la distribución específica de *B. yatay* y *S. romanzoffiana* las hace de las especies dentro de las palmeras más tolerantes al frío (Lorenzi et al., 2010). La distribución específica para *Butia* es en Paraguay, Argentina, Brasil y Uruguay, siendo este último el límite sur de distribución (Marcato 2004, Dransfield et al. 2008, Lorenzi et al. 2010).



Figura No. 3. Mapa de distribución de las seis especies nativas de palmas en Uruguay

Fuente: tomado de Chebataroff (1974)

## 2. Morfología de *Butia*

El género *Butia* pertenece a la familia Arecaceae, sub familia Arecoideae, tribu Coccoeae, sub tribus Butiinae. Fue descrito por primera vez en 1887 por Beccari, como parte del sub género *Cocos*, en 1916 Beccari le otorga a *Butia* la categoría de género. El género *Butia* fue separado del género *Syagrus* por diferencias morfológicas, tales como la presencia de espinas en la base del peciolo de las hojas de *Butia* y la ausencia de éstas en *Syagrus*. En 1970 Glassman recategorizó todas las especies descritas como *Butia*, pasándolas al género *Syagrus*, aunque en 1979 las volvió a *Butia* (Marcato, 2004).

Las *Butia* se caracterizan por ser palmeras pequeñas, a veces acaulecentes o medianas, de estípite erecto variando éste según la especie entre 8 y 15 m de altura. Las hojas son pinnadas, con pecíolos generalmente con márgenes dentados. A nivel reproductivo las flores son estaminadas con seis estambres cada una, el fruto presenta un endocarpo con tres poros próximos a la porción media de éstos y las semillas presentan endosperma homogéneo (Dransfield et al. 2008, Lorenzi et al. 2010). Según Rossato et al. (2009) todas las especies del género *Butia* presentan el mismo número cromosómico de células somáticas ( $2n=2x=32$ ) y la fórmula cariotípica con 14 cromosomas metacéntricos, 12 sub metacéntricos y 6 acrocéntricos (Corrêa et al. 2009, Gaiero 2010). En el género *Butia* algunas especies nativas de Uruguay comparten características morfológicas y de distribución tales como *B. yatay* y *B. paraguayensis*. Antes de la clasificación de *B. paraguayensis* como especie en sí misma se consideraba un ecotipo de *B. yatay*, conociéndose como “Yatay Enana” (Chebataroff, 1974). *B. yatay* es comúnmente confundida con *B. odorata* por la popularidad de esta última en nuestro país y las aparentes similitudes morfológicas entre sí. Sin embargo, *B. odorata* forma palmares en el sureste y *B. yatay* en el noroeste (Figura No. 3).

## 3. Generalidades de *Butia yatay*

*Butia yatay* se distribuye naturalmente en la zona oeste de Uruguay al norte del Río Negro formando palmares en las zonas de Guaviyú, Quebracho y Guichón (Figura No. 3). Esta palma también se distribuye en Argentina (en la Mesopotamia, provincia de Misiones, Corrientes, Entre Ríos y Santa fe) y en Brasil en el estado Río Grande do Sul (Chebataroff, 1971, Carnevali 1994, Brussa 1998, Fiaschi y Pirani 2009). La comunidad vegetal de palmares de *B. yatay* en general se caracteriza porque las palmas son el único

elemento del estrato arbóreo alto y en el estrato inferior predominan arbustos y gramíneas, aunque muchas veces también se desarrollan otros árboles aislados provenientes de los bosques nativos que se expanden a la zona de los palmares. Los palmares de *B. yatay* se asocian a un clima templado-cálido y lluvioso y se desarrollan preferentemente sobre suelos arenosos, profundos y poco fértiles, con facilidad de erosionarse. En general la vegetación de estos palmares es de moderado valor forrajero (Chebataroff 1971, Brussa 1998, Lunazzi 2009).

La palma *B. yatay* posee un estípite solitario robusto que llega a alcanzar 18 metros de altura y los 50 cm de diámetro con restos de pecíolos y raquis. En cuanto a las hojas, son pinnaticompuestas con pínulas en un mismo plano y simétrico con respecto al raquis, de tamaño mayores a 1,5 cm de ancho y largo que llega a alcanzar los 3 metros, de un color verde ceniciento. Es una especie monoica con flores dispuestas en inflorescencias de hasta un metro y medio de largo protegidas por una espata. La floración se da de octubre a febrero, con flores masculinas amarillas con sépalos y pétalos diferenciados y las femeninas castañas con tépalos. La fructificación se da entre enero y abril (Chebataroff 1974, Cabral y Castro 2007, Brussa y Grela 2007). Los frutos son drupas ovoides de ápice acuminado con perianto cubriendo más de un tercio, de color amarillo anaranjado hasta rojizo, de 4 a 5 cm de largo y contienen endocarpos de forma aovada con entre una y tres semillas. Los frutos se pueden encontrar maduros cuatros meses en el año durante el verano y otoño, con un promedio de 5 racimos por año y 100 frutos por racimo que dan una producción de 5,08 kg por palmera (Zeppenfeld et al., 2011).

Según Lunazzi (2009) el ciclo de vida de *B. yatay* se adapta al propuesto por Tomlison (1990) para la familia Arecaceae de 5 fases (Figura No. 4): fase I, embrionaria: estado de semilla; fase II, plántulas: individuos con hojas simples (enteras y lineales) sin o con pecíolo; fase III, establecimiento: individuos con hojas pinnaticompuestas, sin estípite claramente definido, incluye a los individuos que presentan la primera hoja simple y partida en su parte central por una ranura visiblemente definido; fase IV, adulto vegetativo: individuos con tamaño de hoja constante, estípite definido con crecimiento predominantemente en altura y sexualmente inmaduro, los individuos más jóvenes del estadio presentan un estípite con crecimiento predominantemente en diámetro; y fase V, adulto reproductivo: individuos con tamaño de hoja constante, crecimiento del estípite predominantemente en altura y sexualmente maduro. Este autor plantea que la transición de palmera juvenil a adulta se da en la primera floración que ocurre en general con una altura de 3-4 metros y en menor medida de 2 metros.



Figura No. 4. Aspectos de los estadios de vida *B. yatay*

Fuente: tomado de Lunazzi (2009)

Según Bonomo y Capeletti (2014) son poco los usos que se han reportado sobre la palma *yatay*, entre ellos, el uso de los frutos y semillas para alimentos y bebidas alcohólicas y no alcohólicas y con las hojas para fabricar refugios, techos y esteras. También se ha usado medicinalmente como antihelmíntico las semillas de *yatay*. Se encontró que en la pulpa, endocarpo y semilla de los frutos hay altos porcentajes de partes comestibles. Como se mencionó anteriormente los palmares de *B. yatay* se encuentran amenazados, según Carnevalli (1994) los palmares en Corrientes para la década del 90 se habían reducido en un 64%. En Argentina por tales motivos se creó en 1965 en Entre Ríos el Parque Nacional el Palmar la mayor reserva de *B. yatay* con una superficie de 8500 hectáreas. Cercano a esta área también se conserva una superficie de 200 hectáreas en convenio entre un productor privado y una ONG, y en Corrientes se creó el Parque Nacional Mburucuyá que contiene algunas zonas de *B. yatay*. En todas estas áreas es común la ausencia de individuos jóvenes. Este problema es debido a una mortandad temprana, ya que la germinación no es una limitante en ninguna de las áreas. Sin embargo, sí es común observar individuos en avanzado desarrollo en sitios tales como banquetas de caminos y rutas, y forestaciones de pinos y eucalyptus (Programa

Refugios s.f., Brussa 1998). Recientemente se han llevado a cabo estudios para mejorar la conservación de *B. yatay* en la reserva y entender la dinámica de la especie (Batista et al., 2014). En cuanto a la edad de las palmeras en el Parque Nacional el Palmar estas se estimaron en promedio 250 años (Lunazzi, 2009). Se ha observado que *B. yatay* se desarrolla en diferentes suelos y comunidades vegetales con mayor o menor densidad de individuos por hectárea (Batista et al., 2014). Estudios sobre la reproducción de la palma *yatay* indican que ésta es exclusivamente sexual y la dispersión de las semillas puede ser barocora y zoocora. Ejemplo de la dispersión de semillas es la aparición de semillas en heces de Ñandú (*Rea Americana*) en un estudio realizado en Entre Ríos, Argentina (Olmedo et al., 2008). Se comprobó que las palmeras de *B. yatay* facilitan la colonización de algunas especies cuya dispersión es realizada por aves ya que estas se posan en las palmeras, y que los palmares no tienen influencia negativa en la colonización de otras especies. Por tal motivo, es que se ha observado en zonas de reserva la expansión de especies del monte ribereño a la zona del palmar (Rolhauser 2007, Morandeira 2009). En referencia al manejo del palmar de *B. yatay*, las investigaciones concluyen que para asegurar la viabilidad de la especie, la regeneración debe establecerse en zonas de baja densidad de palmeras o inexistentes (Lunazzi, 2009). Un estudio realizado por Programa Refugios (s.f.) encontró que la medida de exclusión de ganado exclusivamente no es eficiente para el establecimiento de renuevos, sino que debe ir acompañado de control con herbicida al menos una vez por año hasta que los individuos alcancen una altura superior a 1 metro y medio. Sin embargo, los investigadores encuentran aún falta de información para definir los procesos de establecimiento de un palmar nuevo (Lunazzi 2009, Batista et al. 2014).

#### D. ÁREA DE ALTO VALOR DE CONSERVACIÓN EN ESTUDIO PALMAR DE “SANTO DOMINGO”

El área en estudio pertenece a una población de *B. yatay* en el predio “Santo Domingo”, actualmente propiedad de la empresa forestal Montes del Plata (MdP, 2014). El predio “Santo Domingo” fue adquirido por la empresa forestal Eufores S.A en 1995 como se observa en la Figura No. 5 y se localiza en el noreste del departamento de Paysandú, a 30 km de la localidad Quebracho (Vida entre..., 1999). MdP fue fundada el 1° de octubre de 2009, producto de la fusión entre las empresas ya existentes en Uruguay ARAUCO y STORA ENSO, las cuales adquieren el mismo año Eufores S.A y por ende el predio en estudio. El objetivo de MdP es la producción de pulpa de celulosa en la planta de Punta Pereira inaugurada en 2014 con el suministro de plantaciones

forestales de Eucalipto. Éstas se desarrollan en 11 departamentos de Uruguay y ocupan a diciembre de 2014, 229.771 hectáreas. El suministro de madera a la planta de celulosa que involucra tanto al área forestal como vivero, acopio y transporte de madera, se realiza bajo el sistema de gestión del manejo forestal de acuerdo a los Principios y Criterios del FSC desde que se obtuvo la certificación para la totalidad de MdP en 2011. Entre otros aspectos, la certificación ha llevado a que del total de la superficie, 64.934 hectáreas son áreas no forestadas que se utilizan para conservación y otros usos y 9990 hectáreas las ocupan monte nativo y las denominadas Áreas de Alto Valor de Conservación (AAVC) (MdP, 2014). Una de las AAVC de MdP son los palmares de *B. yatay* de “Santo Domingo”, en la cual se centra este estudio. Los palmares de “Santo Domingo” se encuentran en las coordenadas geográficas Latitud: 31°54'15.88"S y Longitud: 57°41'43.20"O. Desde la adquisición del predio “Santo Domingo” por Eufores S.A en 1995, el manejo se ha centrado en no alterar ninguna palmera adulta aún distribuida en zonas que se forestaron y promover la regeneración natural por exclusión de pastoreo en algunas zonas (Vida entre..., 1999). En 1998 esta empresa comienza con los monitoreos ambientales lo cual se ve en la Figura No. 6 con una primera instancia de diagnóstico.

El primer estudio botánico llevado a cabo en el predio fue realizado por el Ing. Agr. Daniel Bayce y Lic. E. Marchesi, donde se dividió el sitio de estudio en cuatro zonas. La zona uno contaba con dos sectores, uno bajo régimen de pastoreo que presentaba palmeras adultas de unos 10 m de alto aproximadamente y otro sector con ausencia de pastoreo desde 1996, con un tapiz herbáceo de pradera de unos 60 a 80 cm. En la zona 2 se encontró bajo régimen de pastoreo con palmeras adultas de hasta 14 metros de altura. En las partes altas de esta zona, donde había una menor densidad de individuos adultos, se encontraba una mayor regeneración de palmas con ejemplares estimados de 2 años. En la zona 3 observaron que el palmar se desarrollaba sobre afloramientos rocosos y las palmeras juveniles se encontraban entre las rocas donde se dificulta el acceso del ganado. En la zona 4 se detalla la exclusión de pastoreo desde 1996, a pesar de la exclusión del ganado no se observó regeneración de palmeras por lo que se asoció al excesivo crecimiento de la pradera y presencia de restos secos. De este primer monitoreo se decidió continuar con la exclusión de pastoreo en las dos zonas y mantener inalteradas las palmeras adultas aunque tuviera una gran dispersión inclusive a

las que se encontraban alejadas del núcleo de individuos de la zona (Bayce y Marchesi <sup>1</sup>, Vida entre..., 1999).

El segundo monitoreo se realizó por Ing. Agr. Daniel Bayce en 2002 evaluando la evolución del palmar. En la zona 1 con pastoreo, se observa inalteradas las palmeras adultas y mayor presencia de plántulas e individuos juveniles sobre todo en la zona con menor densidad de adultos. En la parte de la zona 1 sin pastoreo, se mostró como positiva una medida de manejo empleada que consistió en la pasaje de rotativa y aplicación de glifosato porque se detectó una gran regeneración de plántulas. En la zona 2, se vio también en igualdad de condiciones que el estudio anterior, no siendo percibido el establecimiento de regeneración. La zona 3 se observó inalterada y conservada en buen estado. Para la zona 4 se continuó con la exclusión del pastoreo, mostrándose una evolución del palmar por el establecimiento en altas densidades de individuos jóvenes no superiores a los 2 metros de altura. En esta zona también se observó que la medida de manejo empleada en la zona sin pastoreo del sector 1 fue igual de favorable para el establecimiento de plántulas. En este monitoreo realizado en 2002 se vuelve a destacar el buen estado general del palmar y los buenos resultados de las medidas de manejo empleadas de control de pastoreo y del tapiz herbáceo para el establecimiento de plántulas<sup>2</sup>.

En el 2004 con la certificación FSC de Eufores S.A se declararon los dos sectores sin pastoreo oficialmente como AAVC. Desde ese entonces hasta 2009 se mantuvieron monitoreos de recorridas generales que controlaron que el palmar continuaba en buen estado. Al adquirir el predio en 2009, MdP mantuvo el manejo que se venía llevando a cabo de conservar el palmar y la exclusión de pastoreo en los dos sectores declarados de AAVC.<sup>3</sup> A partir de ese año se definieron una serie de etapas que permitieran obtener mayor información del palmar, analizando los distintos manejos realizados y así evaluando la situación. Las distintas etapas se dividieron en el estudio cuantitativo de las palmeras adultas en zonas de exclusión de pastoreo como en zonas de no exclusión y por otra parte en el estudio cualitativo de estas dos situaciones como la floración fructificación y estado sanitario. También se definió estudiar cuantitativamente los palmares regenerados y hacer una línea de base de las poblaciones de palmeras en

---

<sup>1</sup> Bayce, D.; Marchesi, E. 1998. Palmares de *yatay* del establecimiento “Santo Domingo” Quebracho, Paysandú. (sin publicar).

<sup>2</sup> Bayce, D. 2002. Relevamiento de palmares y bañado “Santo Domingo”. (sin publicar).

<sup>3</sup> Giordano, H. 2014. Com. personal.

base a la fitodiversidad. En estos nuevos estudios se subdividió al palmar en 6 sectores, los cuales se conservan como clasificación en la actualidad, a diferencia de los 4 sectores en los estudios de 1998 y 2002 (Figura No. 5). El sector 1, anteriormente nombrado como sector con pastoreo de la zona 1 se encontró como un palmar ralo con un promedio de 20 palmas/ha sobre suelos arenosos y afloramientos rocosos esparcidos, con ausencia de regeneración natural pero abundante cantidad de semillas viables en el suelo, buen estado sanitario con aislados casos de *Rhinostomus barbirostris* conocido como picudo de las palmas y escasa invasión de *Gleditsia triacanthos*. El sector 2, anteriormente llamado sector con ausencia de pastoreo de la zona 1, se definió como un palmar con promedio de 172 palmas/ha sobre suelos arenosos de topografía suavemente ondulada, ejemplares adultos muy añosos de en general 10-14 metros, buena regeneración natural, ataques aislados de picudo de las palmas, relativa abundancia de especies leñosas invasoras *Morus alba* y *Gleditsia triacanthos* y en menor medida *Fraxinus pennsylvanica*. El sector 3, anteriormente zona 2, se observó como un palmar con densidad irregular, con promedio de 282 palmas/ha, sobre suelos arenosos de topografía de planicies y laderas, ejemplares adultos en muy buen estado sanitario, presencia de regeneración natural a pesar del pastoreo y buena biodiversidad específica por haber tanto especies de campos pedregosos como de suelos medios de alto potencial productivo tanto estival como invernal. El sector 4, anteriormente zona 3, se observa como un palmar también de irregular densidad con promedio de 160 palmas/ha, sobre suelos arenosos y cornisas rocosas, los adultos en muy buen estado sanitario y abundante regeneración natural a pesar del sobrepastoreo generando un 70% de cobertura del suelo. El sector 5, anteriormente parte de la zona 4, se definió como un palmar, al igual que otros sectores, con irregular densidad con promedio de 222 palmas/ha, sobre suelos arenosos con afloramientos rocosos, ejemplares adultos con aislados ataques de *Rhinostomus* y ausencia de regeneración natural. El sector 6, anteriormente zona 4 sin pastoreo, se define como un palmar heterogéneo en densidad con promedio de 158 palmas/ha, sobre suelos arenosos con escasos afloramientos rocosos, con ejemplares adultos en buen estado sanitario, muy buena regeneración natural con una depresión central con una nueva población coetánea de palmas y presencia de la especie leñosa invasora *Morus alba*. En base a estos monitoreos se define continuar con la exclusión de ganado en los dos sectores con este manejo histórico, el 2 y el 6, y se recomienda el control del pastoreo en el resto de los sectores. Estos monitoreos realizados forman parte del manejo de Mdp para las AAVC y para adecuarse a los planes de manejo que propone el FSC. En esta área el objetivo es poder asegurar la adecuada conservación actual de los ejemplares adultos que tienen más de 200 años y medidas de manejo que aseguren la continuidad generacional (Mdp, 2014). Para cumplir

con dicho objetivo, a partir de 2012 luego de los estudios anteriormente realizados, se definió realizar en el área monitoreos de evolución del palmar cada 3 años y anualmente se monitorea con estudio de aves y controles generales del área<sup>3</sup>. Como resultado de los monitoreos realizados en forma tercerizada se plantea la necesidad de hacer un corredor biológico entre los 6 sectores<sup>4</sup>. Esto implica eliminar algunos rodales de *Eucalyptus spp* que se encuentran entre los distintos sectores. Esta propuesta está basada en la idea de ampliar el palmar y dar una posibilidad de mayor flujo génico. Aunque los resultados de los monitoreos indican un buen estado del palmar en general, esta medida es planteada para mejorar su estructura etárea. Se encuentra que esto es factible debido a que el palmar presenta muy buen estado de conservación, evidenciado una abundante floración y fructificación en ejemplares adultos y buena regeneración natural (MdP, 2014). Para evaluar la necesidad del corredor biológico se decidió hacer un estudio genético que permita conocer la estructura genética del palmar y saber si existe un efecto negativo de los rodales existentes entre los sectores de palmas sobre la viabilidad del palmar por fragmentación e interrupción del flujo génico. Para poder evaluarlo, el estudio se concentra en los dos parches sin pastoreo (AAVC) separados a una distancia aproximada de 3 kilómetros. La ausencia de pastoreo en estas dos áreas permite un desarrollo del palmar donde se pueden diferenciar los distintos estados de desarrollo ontogénico de la Figura No. 4, lo que no se observa en las áreas con pastoreo. Esto permite poder comparar la situación entre adultos y las nuevas generaciones, específicamente con los renuevos.

---

<sup>4</sup> Brussa, A.; Boggiano, P. 2013. Programa de relevamientos de flora y vegetación; monitoreo en palmares de “Santo Domingo” Montes del Plata. Paysandú. (sin publicar).

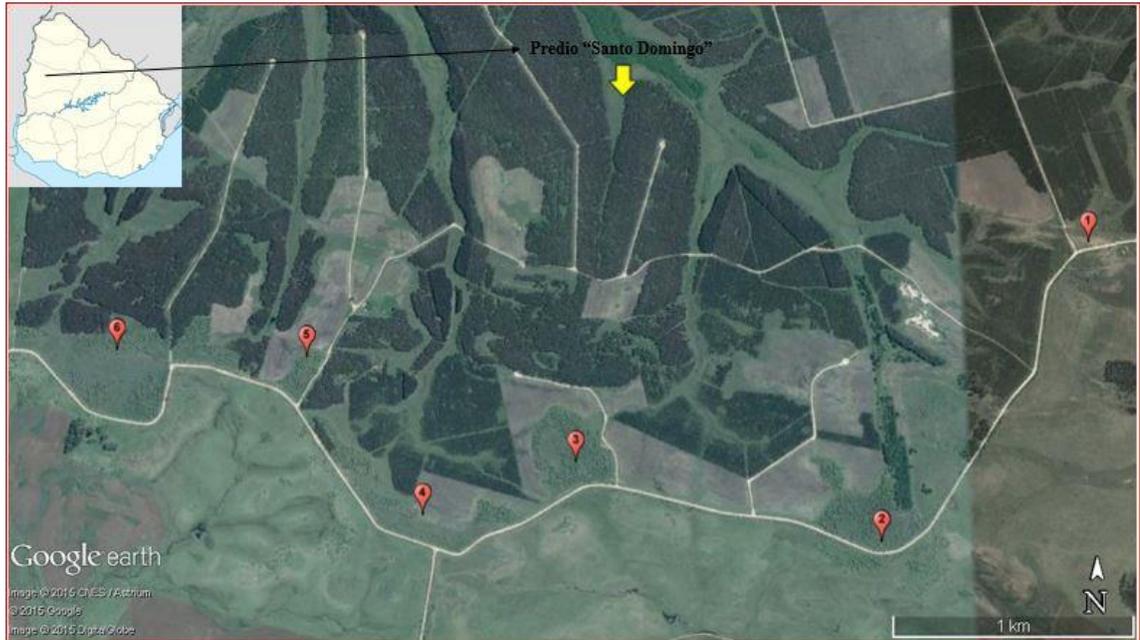


Figura No. 5. Palmares de *Butia yatay* del predio de Montes del Plata, “Santo Domingo”

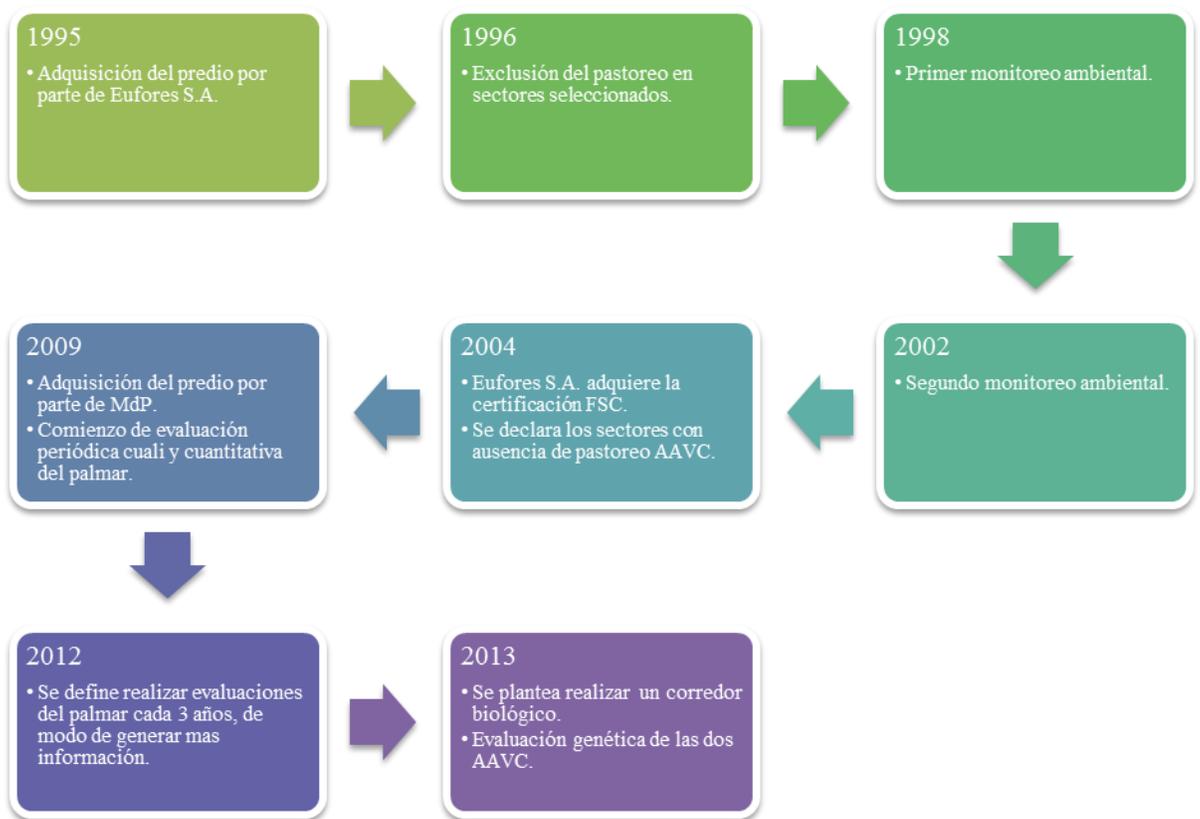


Figura No. 6. Línea del tiempo del Predio "Santo Domingo"

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### A. MUESTREO DE ADULTOS Y RENUEVOS

En primera instancia se realizó una recorrida del área para determinar la metodología de muestreo a emplear. Para el muestreo de adultos se definió un diseño sistemático de transectas en base a la distribución de los adultos en vista Google Earth en cada sector, y de acuerdo a la longitud total de las transectas, se definió cada cuantos metros correspondía el muestreo de un adulto (Figura No. 7 y Figura No. 8). Se elaboró una planilla con las coordenadas geográficas de cada punto de muestreo y en el campo se ubicaron los puntos con GPS. Una vez ubicado el punto se marcó la palmera más cercana, ésta debía presentar un estípite recto y estado sanitario que permitiera su escalada, registrando la nueva ubicación del punto de muestreo. El muestreo de las hojas se tercerizó al contratista Geosylva, mediante operarios capacitados para los trabajos en altura y con elementos de seguridad correspondientes. Los operarios escalaban las palmeras seleccionadas y cortaban una hoja la cual debía ser de las más nuevas y con mejor estado sanitario (Figura No. 9). Posteriormente se conservaban las muestras en sobres etiquetados para cada individuo en bolsas herméticas con silica gel. El muestreo de renuevos se definió de forma sistemática abarcando la totalidad del área y una distribución equitativa entre punto y punto. El muestreo se estableció en campo por tratarse de un área con vegetación frondosa por la ausencia del pastoreo, con algunas regiones con imposibilidad de acceso y ausencia de renuevos en determinadas ocasiones ya que otras especies dominan sobre los renuevos de las palmeras. Cada renuevo muestreado se georreferenció y conservó en sobres identificados de la misma manera que las muestras de adultos.



Figura No. 7. Muestreo de palmeras adultas y renuevos en el sector A



Figura No. 8. Muestreo de palmeras adultas y renuevos en el sector B

En total se muestrearon 100 individuos por cada sector en dos estados ontogénicos, 50 adultos y 50 renuevos, por lo que el total de la población muestreada es de 200 ejemplares (Figura No. 9). Se estableció una nomenclatura con la letra A para el sector 2 y B para el sector 6, seguido del número del individuo 1 al 50 para adultos y 51 al 100 para renuevos, en cada sector.



Figura No. 9. Escalada de palmera adulta por operarios de Geosylva

## B. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

En primera instancia para el procesamiento de los materiales obtenidos se realizó la extracción de ADN de las muestras mediante el protocolo propuesto por Doyle (1987). Brevemente, se utilizó un tampón de extracción con 2% CTAB (Sigma), PVP a una concentración de 40 mg/mL, y 0,5% beta-mercaptoetanol. Se probaron dos métodos de molienda, usando homogeneizador y nitrógeno. Se eligió el método con homogeneizador por ser más rápido y menos trabajoso que el nitrógeno y sin diferencias claras en la calidad del ADN. El procesamiento de los materiales comenzaba con la molienda mecánica de las muestras utilizando homogeneizador con bolitas de circonio. Para ello previamente se picaron las muestras con tijera, introduciéndolas en tubitos con las bolitas para el posterior procesamiento en el homogeneizador durante 10 ciclos de 45 segundos de molienda y 15 segundos de descanso. Luego se le incorporó 600  $\mu$ L del tampón de extracción y se volvió al homogeneizador con dos ciclos de las mismas condiciones para lograr una mezcla homogénea de la molienda con el tampón. A continuación, se siguió con la purificación y limpieza según el protocolo propuesto por Doyle (1987). Se realizó una extracción de proteínas con una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y posterior centrifugación. Se precipitó el ADN mezclando la fase acuosa recuperada con 0,54 volúmenes de Isopropanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y 0,08 volúmenes de Acetato de amonio 7,5 M. Luego de una precipitación por 20 h a  $-20^{\circ}\text{C}$  se centrifugó y se lavó el precipitado con dos lavados de etanol al 70% y 95%. Luego de terminado el proceso de extracción se comprueba que este haya sido efectivo mediante electroforesis en un gel de agarosa de 1,5% a 90 volts durante 60 minutos. Luego de este proceso el gel es teñido con bromuro de etidio (a una concentración 300  $\mu$ L/500 mL de agua de una solución stock de 100 mg/mL de bromuro de etidio, a una concentración final de 30mg/500mL) durante 5 minutos, y lavado en agua durante 15 minutos previo a su observación en el transiluminador marca BioTop de modelo TransLum dual. Las imágenes de los geles se capturaron con una cámara Canon Power Shot modelo A630. En el caso de no observar ADN para alguno de los individuos, se volvía a repetir la corrida electroforética y en las situaciones en que por segunda vez no se observara ADN, se repetía la extracción de dicha muestra.

## 1. Transferencia de microsatélites de *B. eriospatha* a *B. yatay* y análisis poblacional

Luego que todas las extracciones estuvieron realizadas, se procedió a trabajar con los marcadores moleculares SSR realizando la transferencia de *Butia eriospatha* a *Butia yatay* según los reportados para la primera por Nazareno et al. (2011). Se probaron los 14 marcadores reportados utilizando el protocolo de PCR estandarizado para el Laboratorio de Evolución y Domesticación de las Plantas (LEDP), en el cual se usan como reactivos: Buffer PCR10x, MgCl<sub>2</sub> 25mM, BSA 1%, dNTPs 2,5mM, M13 5μM, Taq 5U/μL, Primer F 5μM, Primer R 5μM y H<sub>2</sub>O. Los marcadores fueron probados en una selección de 20 individuos distintos repartidos entre las dos AAVC y distantes entre sí. En cuanto a las condiciones utilizadas en el termociclador, se probaron distintos ciclos en función de la temperatura de Annealing reportada para cada marcador por Nazareno et al. (2011). Como control positivo de PCR se obtuvieron tres muestras de *B. eriospatha* de la quinta de Castro. Luego de obtenidos los productos de PCR se comprobaba mediante un gel con el mismo procedimiento, concentraciones y tiempo detallado anteriormente, pero en este caso se observó, si la reacción había ocurrido, si los blancos no habían amplificado (comprobando la contaminación) y si en las muestras de *B. eriospatha* se había producido amplificación.

Las muestras amplificadas en cada marcador se analizaron en el servicio de secuenciación DNA Analysis Facility de la Universidad de Yale (<http://dna-analysis.research.yale.edu/>). Los resultados se analizaron con el programa Peak Scanner™ Software Version: 1.0 © Copyright 2006 Applied Biosystems. Se observó para cada marcador, si la secuencia amplificada en los individuos correspondía con el rango de los valores alélicos tomando como referencia *B. eriospatha* según Nazareno et al. (2011) registrando el valor para cada muestra en el caso que concordaran. Luego utilizando el complemento para Microsoft Excel GenAlEx 6.5.1, se conformó una matriz para los cálculos de parámetros genéticos para cada marcador. En base al análisis de estos resultados se eligieron los marcadores que brindaban mayor información para poder realizar el estudio poblacional.

Una vez seleccionados los marcadores útiles para el estudio poblacional se realizó el análisis en las restantes muestras de la población utilizando el mismo protocolo de PCR y ciclo de termociclador correspondiente a cada marcador. El objetivo a alcanzar era determinación del valor alélico para al menos 30 muestras en adultos y renuevos de cada sector en los marcadores seleccionados. El proceso de PCR fue el

mismo realizado durante la transferencia, primero verificando la amplificación mediante electroforesis y en resultados positivos el genotipado en la Universidad de Yale.

### C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los cálculos se realizaron considerando independientemente los dos sectores y dentro de los sectores los estratos etéreos, por esto mismo en el GenAEx se consideraron 4 poblaciones distintas. Dentro de cada población se seleccionaron 30 muestras, dando un total de 120 muestras las cuales se corrieron para cada marcador. Los parámetros seleccionados para analizar fueron los siguientes:

- **(Ne) Número de alelos específico**, el cual nos aporta la cantidad de alelos efectivos. Esto nos dice cuál es la cantidad de alelos promedio que se espera para cada locus en una determinada población. La fórmula que se utilizó para calcularlo fue (Peakall y Smouse, 2012)

$$Ne = 1/1-He$$

- **(He) Heterocigosis esperada, (Ho) Heterocigosis observada y (F) Índice de fijación**. Estos tres parámetros según sus valores nos permiten determinar si la población se encuentra en equilibrio H-W (Peakall y Smouse, 2012).

$$He = 1 - \sum p_i^2$$

$$Ho = \text{Número de heterocigotas}/N$$

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

- **(F<sub>ST</sub>) Estructura de la variabilidad molecular**. La estimación del F<sub>ST</sub> va a definir cuán diferenciadas son genéticamente las poblaciones. Esto permite saber si está ocurriendo o no estructuración dentro de la población (Balloux y Lugon-Moulin, 2002).

$$F_{ST} = (HT - He) / HT$$

Con el análisis de los resultados de estos indicadores, se procedió a la discusión de los mismos, obteniendo las conclusiones necesarias para darle un cierre al trabajo realizado.

## IV. RESULTADOS

### A. TRANSFERENCIA

En el Cuadro No. 2 se puede observar que el número de muestras analizado (N) para los 7 marcadores que lograron amplificar de los 14 evaluados para la transferencia es de 18. Los restantes siete marcadores no se presentan en el cuadro porque no se logró una correcta amplificación pese a los esfuerzos. De los 7 loci en que se obtuvo amplificación, cuatro de ellos (But6, But7, But17 y But23) resultaron polimórficos con más de un alelo variando entre 4 para el But07 y 2 para el But06. En los valores de heterocigosis observada ( $H_o$ ) se observa como valor más alto 0,500 para el But 7 y But 17 y como valor más bajo 0,0 para el But 4, But 8 y But 10. La heterocigosis esperada ( $H_e$ ) presenta valores fluctuantes entre 0,631 para el But 7 y 0 para los últimos tres marcadores del cuadro. El loci But08 encontrado con un solo alelo perdió el polimorfismo de la especie de origen y los otros 2 loci monomórficos (But4 y But10) mantienen el monomorfismo reportado por Nazareno et al. (2011) en *B. eriospatha* (Cuadro No. 3). En la amplificación obtenida en los 7 loci se obtuvo valores alélicos similares a los reportados en la especie de origen, tanto en *B. yatay* como en el testigo de las 3 muestras de *B. eriospatha* presenten en la Quinta de Castro (Cuadro No. 3). Por lo tanto, los marcadores con los que se decidió continuar son los polimórficos, el But 6, But 7, But 17 y But 23 ya que presentan valores que permiten realizar el estudio poblacional.

Cuadro No. 2. Número de muestras (N), Número de alelos (Na), Heterocigosis observada ( $H_o$ ), Heterocigosis esperada ( $H_e$ ) por loci amplificado.

Locus	N	Na	$H_o$	$H_e$
But 6	18	2,000	0,167	0,313
But 7	18	4,000	0,500	0,631
But17	18	3,000	0,556	0,586
But 23	18	2,000	0,389	0,424
But 4	18	1,000	0,000	0,000
But 8	18	1,000	0,000	0,000
But 10	18	1,000	0,000	0,000

Número de muestras (N), Número de alelos (Na), Heterocigosis observada ( $H_o$ ), Heterocigosis esperada ( $H_e$ )

Cuadro No. 3. Valor alélico de *Butia eriospatha* por Nazareno et al. (2011) y en 3 muestras de Quinta Castro, en los 7 Locus amplificadas de *Butia yatay* en el predio de “Santo Domingo”.

Locus	<i>Butia eriospatha</i>		<i>Butia yatay</i>
	Nazareno et al. (2011) Tamaño (pb) + M13	Quinta de Castro Alelo	Santo Domingo Alelo
But 6	199	203	197
	201	195	199
	203		
	205		
	207		
But 7	290	275	267
	298	289	273
	300		279
	304		285
But17	222	222	218
	224	224	220
But 23	188	187	224
	192		181
			183
But 4	222	222	187
But 8	214	216	222
	216	218	216
	218		
	220		
	226		
But 10	230		
	152	152	152

pb: pares de bases

## B. ANÁLISIS POBLACIONAL

En las cuatro poblaciones en estudio se encontró similares frecuencias alélicas para cada uno de los 4 loci utilizados en el análisis poblacional (Cuadro No. 4). La

mayor diferencia en la frecuencia alélica es de un 20% para la población B-Renuevos con respecto a A-Renuevos, en el locus But06. El mayor número de alelos fue de 4 para el locus But07 y el menor de 2 por el But06 al igual que como se había encontrado en la muestra menor de 18 utilizada para la transferencia (Cuadro No. 2).

Cuadro No. 4. Frecuencia alélica en 30 muestras (N) por Locus por población.

Locus	Alelos/N	A-Adultos	B-Adultos	A-Renuevos	B-Renuevos
		Frecuencia	Frecuencia	Frecuencia	Frecuencia
But 6	197	0,200	0,217	0,250	0,050
	199	0,800	0,783	0,750	0,950
But 7	267	0,167	0,183	0,067	0,183
	273	0,400	0,283	0,400	0,367
	279	0,367	0,467	0,400	0,367
	285	0,067	0,067	0,133	0,083
But 17	218	0,033	0,050	0,033	0,067
	220	0,500	0,350	0,350	0,383
	224	0,467	0,600	0,617	0,550
But 23	181	0,400	0,350	0,417	0,383
	183	0,600	0,633	0,567	0,617
	187	0,000	0,017	0,017	0,000

N: número de muestras

Los resultados del análisis genético poblacional realizado con los cuatro marcadores seleccionados se presentan en el Cuadro No. 5. Para los 4 sectores en estudio (A adultos, A renuevos, B adultos y B renuevos), se determinó como 30 el número de muestras (N) analizadas por sector. El número de alelos esperados ( $N_e$ ) tiene como media 2,100 para las cuatro poblaciones, con el valor más alto en 2,147 para el sector A adultos y 2,109 como menor valor para el sector B renuevos. Los valores de heterocigosis observada ( $H_o$ ) varían entre 0,475 y 0,400 para el sector A renuevos y A adultos respectivamente. La heterocigosis esperada ( $H_e$ ) oscila entre 0,508 para el sector A renuevos y 0,451 para B renuevos. Al comparar el rango de valores de  $H_o$  con respecto a  $H_e$  en cada una de las poblaciones se observa que ambas presentan valores similares. En los dos sectores en los individuos adultos el Índice de fijación (F) es mayor a 0, 0,248 para el sector A y 0,137 para el sector B. En cambio en los renuevos el indicador Índice de fijación (F) se encuentra cercano a 0. De acuerdo al análisis de AMOVA de partición de la varianza encontrada, los resultados indican lo mismo que se

observa en el Cuadro No. 5, que la varianza se debe a la variación encontrada dentro de los individuos. En ninguno de los sectores en estudio se encontró presencia de alelos privados por lo que no fue necesario el ajuste de ninguno de los parámetros analizados.

Cuadro No. 5. Número de muestras (N), Número específico de alelos (Ne), Heterocigosis observada ( $H_o$ ), Heterocigosis esperada ( $H_e$ ), Índice de fijación (F), Número de alelos privados 0 para cada una de las poblaciones.

Población	N	$\underline{N_e}$		$\underline{H_o}$		$\underline{H_e}$		$\underline{F}$	
		X	EE	X	EE	X	EE	X	EE
A-Adultos	30	2,147	0,335	0,400	0,105	0,501	0,073	0,248	0,129
B-Adultos	30	2,115	0,309	0,425	0,069	0,499	0,067	0,137	0,109
A-Renuevos	30	2,132	0,280	0,475	0,037	0,508	0,058	0,046	0,081
B-Renuevos	30	2,109	0,440	0,442	0,116	0,451	0,127	-0,007	0,063

Número de muestras (N), Número específico de alelos (Ne), Heterocigosis observada ( $H_o$ ), Heterocigosis esperada ( $H_e$ ), Índice de fijación (F), Media (X), Error estándar (EE)

Los valores de  $F_{ST}$  son cercano a 0 entre todos los sectores. Se observa también que las significancias estadísticas referentes a estos resultados se encuentran por encima de 0,05 (Cuadro No. 6).

Cuadro No. 6.  $F_{ST}$  y Probabilidad (P) en 999 permutaciones entre poblaciones.

Población	Población	$F_{ST}$	P	No. Pm
A-Adultos	B-Adultos	0,000	0,405	999
A-Adultos	A-Renuevos	0,000	0,412	999
B-Adultos	A-Renuevos	0,000	0,429	999
A-Adultos	B-Renuevos	0,000	0,425	999
B-Adultos	B-Renuevos	0,002	0,342	999
A-Renuevos	B-Renuevos	0,010	0,156	999

$F_{ST}$ , Probabilidad (P), Número de permutaciones (No. Pm)

## V. DISCUSIÓN

### A. TRANSFERENCIA

En el presente trabajo de los 14 marcadores que originalmente se planteó transferir desde *B. eriospatha* (Nazareno et al., 2011) a *B. yatay*, la mitad lograron ser amplificados con éxito. Los restantes siete no se lograron amplificar pese a que se probó las condiciones planteadas en el estudio original para el que fueron desarrollados y distintas condiciones particulares para cada marcador. La transferencia de un microsatélite de una especie a otra puede tener éxito como no, dependiendo de la conservación de las secuencias flanqueantes de un microsatélite en la especie objetivo. Muchas veces por circunstancias evolutivas estas secuencias en la especie original para la que fueron diseñados se pierden en la especie objetivo, lo que hace que su transferencia no sea posible (Zhang, 2003). La utilidad del microsatélite transferido va a estar dada por el grado de polimorfismo que la especie objetivo siga presentando en la región de interés (Martínez y Gómez, 2003). De los siete marcadores amplificados, como se muestra en los datos del Cuadro No. 2, tres de ellos no presentan polimorfismo, no siendo útiles para el análisis poblacional. Puede suceder que el marcador pierda el polimorfismo que presenta en la especie de origen y que en la especie objetivo sea monomórfico (Martínez y Gómez 2003, Moreno et al. 2011, Abd 2014).

Parte de los resultados concuerdan con lo encontrado en *B. eriospatha* según Nazareno et al. (2011) donde 5 de los 14 SSR desarrollados resultaron monomórficos, es decir el 35% de los evaluados contra el 42% de los 7 amplificados en *B. yatay*. Al transferirlos a *B. yatay* 2 de los loci (But04 y But10) resultaron también monomórficos. Sin embargo, el otro locus monomórfico en *B. yatay*, *But08*, presenta polimorfismo en *B. eriospatha* (Cuadro No. 3). Esta pérdida de polimorfismo también fue encontrada entre especies del mismo género (*Phoenix*) según Pintaud et al. (2010). Tanto el locus But04 como el locus But10 contienen repeticiones perfectas de di-nucleótidos, (CA)<sub>6</sub> y (GT)<sub>5</sub> respectivamente y en cambio el locus But08 contiene una repetición de di-nucleótido compuesta (CA)<sub>9</sub> y (TA)<sub>5</sub>. El porcentaje de transferencia obtenido del 50% es decir, 7 de los 14 SSR ensayados es menor al reportado por Nazareno et al. (2011) entre *B. eriospatha* y *Butia catarinensis* de 86% (12 de 14 SSR). Sin embargo, los dos SSR que en *B. catarinensis* no se obtuvo amplificación tampoco se obtuvieron en la transferencia a *B. yatay* (But01 y But20). Esta diferencia encontrada en la eficiencia de la transferencia entre otros motivos puede deberse a una relación de parentesco más

cercana entre *B. eriospatha* y *B. catarinensis* que con *B. yatay*. Según Abd (2014) a mayor distancia genética es menor el porcentaje de transferencia de SSR entre especies. En otras especies de la familia Arecaceae se han reportado diferentes resultados en la eficiencia de transferencia pero son diversas las investigaciones que demuestran la transferibilidad de SSR dentro de la familia Arecaceae. Mistura et al. (2012) encontraron una eficiencia de transferencia entre *Cocos nucifera* y *B. odorata* del 40%. Dentro del género *Phoenix* Akkak et al. (2009) reportaron 100% de éxito de transferencia entre 21 SSR desarrollados para *Phoenix dactylifera* y 14 especies de ese género y de forma similar Pintaud et al. (2010) con un 90% entre *Phoenix dactylifera* y 12 especies de dicho género. Zaki et al. (2012) también evaluaron con éxito la transferencia en la familia Arecaceae de SSR desarrollados para *Elaeis oleifera*. Al comparar estos resultados de eficiencia de transferencia en la familia Arecaceae se podría decir que fue bajo el porcentaje encontrado al transferir dentro de un mismo género, ya que se obtuvo un 50% de transferencia y en otros casos similares la transferibilidad ronda el 90%. A pesar de ello se obtuvo un número de loci variable suficiente para el estudio planteado.

## B. ANÁLISIS POBLACIONAL

El análisis poblacional fue realizado con los cuatro marcadores seleccionados del proceso de transferencia, But 06, But 07, But 17 y But 23. La población de adultos al presentar un Índice de fijación (F) mayor a 0 indicaría que no se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg (H-W). Los adultos son individuos centenarios que cuando se establecieron se supone que las actividades humanas eran de menor impacto por lo que no se esperaba una desviación del equilibrio (H-W). Sin embargo, en el proceso de establecimiento pudo haber existido endocria por diversos motivos que con estos datos no son suficientes poder explicar. Al analizar la situación actual con los renuevos se restableció el equilibrio (H-W). Esto se puede concluir a partir de que en el Cuadro No. 5 los valores de F son cercanos a cero en los dos sectores A y B para los renuevos. Que esté en equilibrio H-W quiere decir que la población presenta apareamiento al azar y que no está sufriendo ningún proceso de migración, selección, mutación o deriva génica, por lo que las frecuencias alélicas y genotípicas son constantes de una generación a otra. Ésto es una ventaja para la conservación y continuidad de estas poblaciones, ya que indica que no va a tener problemas de endogamia, estratificación de la población, problemas genotípicos y acumulación de alelos deletéreos (Wei Guo y Thompson 1992, Wigginton et al. 2005, Peakall y Smouse 2012). Uno de los objetivos de esta investigación era comparar la situación actual entre el estado ontogénico renuevos con

respecto al de adultos. Al comparar la  $H_o$  entre los adultos y renuevos en cada sector, no se observan grandes diferencias lo que indicarían que no hay reducción de heterocigosis. Resultados similares fueron encontrados en poblaciones de *B. eriospatha* Nazareno y Reis (2014) donde no hay diferencia entre  $H_o$  y  $H_e$ , entre adultos y renuevos. Sin embargo, en esa investigación se reporta una reducción en  $H_o$  al comparar juntos adultos y renuevos, entre poblaciones grandes de más de 450 palmeras contra pequeñas de menos de 50 palmeras. El problema de reducción de heterocigosis fue encontrado en otra especie del mismo género, *B. odorata* en un análisis también con SSR pero exclusivamente en adultos para 3 poblaciones con distancia menores a 3km, encontrando un valor de  $H_o$  (0,20) claramente menor con respecto al esperado  $H_e$  (0,6) (Mistura, 2013). Esta reducción de heterocigosis implica una posible ocurrencia de autofecundación o cruzamiento entre individuos con alto grado de parentesco lo que genera la endogamia. Una situación similar fue encontrada por Lanes et al. (2014) en la palmera *Acrocomia aculeata* pero en un estudio realizado en base a la conservación ex situ en bancos de germoplasma. Este autor asocia los menores valores de  $H_o$  a la forma de dispersión de semilla de esta especie con frutos pesados y corta dispersión del polen por polinizadores.

Podemos concluir que no se presenta fragmentación en la población en estudio por ser todos los valores de  $F_{ST}$  cercanos a 0 y sus probabilidades mayores a 0,05 lo que significa que los resultados no son estadísticamente significativos (Cuadro No. 6). Eso se concluye al comparar en cada sector, adultos contra renuevos y entre renuevos de ambos sectores. Por tratarse de ejemplares añosos, de edad superior a 200 años, la comparación entre los adultos de ambos sectores no estarían reflejando los efectos de la fragmentación. La comparación en cada sector de adultos contra renuevos nos da la idea específica de si la fragmentación está teniendo consecuencias en la diversidad genética en ese sector. Pero al comparar el estado ontogénico de renuevos del sector A contra el del sector B esto refleja si existe una fragmentación entre estos sectores producto de la forestación existente entre ambos, separados por aproximadamente 3 kilómetros. Posiblemente la forestación no ha tenido consecuencias en la fragmentación de las palmeras en los sectores estudiados, ya que entre medio de estos dos sectores como se describió anteriormente existe además de forestación en algunas zonas en el predio de “Santo Domingo” otros 4 sectores de palmeras. A su vez del lado sur del predio donde los campos pertenecen a otros privados también hay importantes zonas con abundantes palmeras. También la población en estudio se encuentra dentro de lo que se conoce como los palmares de Quebracho lo que implica que difícilmente las diversas zonas de palmares queden aislados entre sí, siendo probable la existencia de flujo génico entre las

diversas poblaciones. También se puede concluir que no hay fragmentación por que la mayor variabilidad está dada dentro de individuos y no entre poblaciones ni individuos de acuerdo al estudio de AMOVA realizado. Otro factor que refleja una ausencia de fragmentación tanto entre los sectores A y B y entre los distintos estados ontogénicos de estas poblaciones es la ausencia de alelos privados en cualquiera de ellos. Esto demuestra que el flujo génico tanto de forma horizontal como de forma vertical está ocurriendo sin obstáculos ni limitaciones. Los resultados que obtenemos de ausencia de fragmentación en esta población podrían extrapolarse a otras poblaciones de *B. yatay* siendo importante asegurar la viabilidad de cada uno de los palmares principalmente formando una estructura disetanea de edades. Sin embargo, para aseverar la existencia de flujo génico entre poblaciones se debería disponer de información inexistente para la especie. Si bien se sabe que la reproducción de *B. yatay* es sexual y la dispersión de semillas puede ser barocora y zoocora, falta información exacta sobre las distancias de dispersión tanto de polen como de semillas (Olmedo et al., 2008).

### C. MANEJO DEL PALMAR DE “SANTO DOMINGO”

De acuerdo a estudios botánicos realizados en la totalidad del palmar se planteaba la necesidad de un corredor biológico por posible impedimento del flujo génico y falta de estructura etérea<sup>4</sup>. De esta investigación podemos afirmar que no habría mayores problemas dados en cuanto al aislamiento de la población (falta de flujo génico) ni estructuración de la misma por lo que no sería necesario tomar medidas para mitigar problemáticas bajo este argumento. Sin embargo en la revisión bibliográfica se plantea que para asegurar la viabilidad del palmar es necesario que presente diferentes estados ontogénicos, los cuales estarían dados por el establecimiento de la regeneración en zona con baja o nula densidad de adultos (Lunazzi 2009, Batista et al. 2014). El hecho que existan sectores sólo con individuos adultos es nocivo, ya que el envejecimiento del palmar es notorio y no hay estratos juveniles que permitan que el palmar se siga manteniendo en el largo plazo cuando los individuos añosos vayan muriendo (Rivas, 2004). Las dos áreas en estudio se han manejado históricamente con exclusión de ganado con el propósito de conservar individuos adultos y estimular la regeneración. Este manejo ha tenido en parte resultados muy positivos de acuerdo a la evolución de los monitoreos realizados desde 1998. Se puede observar en una de estas áreas que el desarrollo de individuos juveniles se dio en forma concentrada en una zona media con ausencia de individuos adultos (Figura No. 7). Esta situación es concordante con lo que se menciona en la revisión bibliográfica en cuanto a que la regeneración debe

establecerse en zonas con baja concentración de palmeras adultas. Por tal motivo, se plantea la incertidumbre de si es necesario considerar la aplicación de un corredor biológico, de manera de explotar la ventaja de tener individuos adultos en muy buen estado de conservación los cuales van a permitir una correcta regeneración del palmar con la aplicación de un manejo adecuado. El establecimiento del corredor biológico puede resultar de alto impacto económico para una empresa forestal. Teniendo en cuenta que se trata de individuos añosos y que se conservan en buen estado, esta medida podrá hacerse paulatinamente entre los distintos turnos de cosecha empleados en el predio cada 10 años. En las zonas donde se irá implementando la expansión del palmar se deberá ir monitoreando esta evolución ya que hasta el momento se desconoce si es la medida más apropiada. Una de las alternativas posibles estudiadas en *B. yatay*, es con exclusión de ganado hasta que las palmeras alcancen un metro y medio de altura. Durante ese periodo de tiempo se debe hacer control del tapiz herbáceo siendo posible con herbicidas como el glifosato (Programa Refugios, s.f.). Otra alternativa, pero en una especie muy emparentada como *B. odorata* es utilizar el pastoreo intermitente en distintos periodos del año (Rivas, 2005).

## VI. CONCLUSIONES

Se cumplió con éxito la transferencia de los marcadores moleculares SSR de *Butia eriospatha* a *Butia yatay*. Se seleccionaron cuatro loci polimórficos que pueden ser utilizados en estudios poblacionales para *B. yatay*.

Las dos áreas en estudio corresponden a una misma población ya que no presentan diferenciación genética. Sin embargo, para afirmar que todo el palmar de “Santo Domingo” corresponde a una misma población se necesitaría ampliar la muestra poblacional incluyendo otros sectores. Se plantea la hipótesis de que se trataría de una misma población en base a los resultados encontrados entre los dos sectores en estudio y a las distancias entre los sectores que conforman dicho palmar.

En cuanto al plan de manejo, de acuerdo a estos resultados las actividades forestales que se vienen llevando a cabo en el predio no habrían generado efectos en la fragmentación de la población de palmares. Por este motivo, no resultaría necesario eliminar rodales entre medio del palmar. A pesar de éstos, se plantea la incertidumbre según la bibliografía encontrada, de la necesidad de ampliar el palmar para asegurar una estructura disetanea de edades y optimizar su regeneración.

## VII. RESUMEN

La especie de palmera *Butia yatay* se distribuye en Argentina, Brasil y en Uruguay específicamente en la zona oeste al norte de Río Negro formando palmares en las zonas de Guaviyú, Quebracho y Guichón. Estos palmares coexisten con la forestación y la ganadería, entre otras actividades humanas. Producto de esta coexistencia, sufren amenazas tales como la fragmentación, degradación y pérdida de sus hábitats. Estos factores ocasionan falta de regeneración, envejecimiento de las poblaciones y reducción en número de individuos. Los palmares de *Butia yatay* de "Santo Domingo" (pertenecientes a la empresa forestal Montes del Plata) constituyen un área natural de distribución de esta palma, siendo parte de los palmares de Quebracho. La población de palmeras de "Santo Domingo" podría presentar fragmentación producto de la forestación, lo que podría causar reducción en el flujo génico y depresión endogámica. Se estudió en profundidad dos zonas de palmeras dentro de este predio donde se ha realizado desde 1996 un manejo de exclusión de pastoreo con el fin de permitir la regeneración. Los dos sectores están separados a una distancia de 3 km y están rodeados por otros sectores con palmeras y forestación. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la forestación en la variabilidad genética entre adultos y renuevos dentro y entre los dos sectores en estudio. Para evaluar la existencia de fragmentación existen herramientas genéticas como los marcadores microsatélites. Estos marcadores no han sido desarrollados directamente para *B. yatay* pero pueden ser transferidos de una especie emparentada como *Butia eriospatha*. Se evaluaron 14 loci desarrollados para *B. eriospatha*, de los cuales 7 amplificaron con éxito y de ellos 4 se transfirieron con el polimorfismo que permitió la evaluación genética de las poblaciones. En total se muestrearon 100 individuos por cada sector en dos estados ontogénicos, 50 adultos y 50 renuevos, por lo que el total de la población muestreada es de 200 ejemplares. Al comparar en cada sector, adultos contra renuevos y entre renuevos de ambos sectores podemos concluir que no se presenta fragmentación. Esto se concluye por ser todos los valores de  $F_{ST}$  cercanos a 0 siendo avalados éstos por sus correspondientes significancias estadísticas. Las dos áreas en estudio corresponden a una misma población ya que no presentan diferenciación genética. Se plantea la hipótesis de que las palmeras de "Santo Domingo" sean una misma población en base a los resultados encontrados entre los dos sectores en estudio. En cuanto al plan de manejo, de acuerdo a estos resultados las actividades forestales que se vienen llevando a cabo en el predio no han generado efectos en la fragmentación de la población de palmares.

Palabras clave: *Butia yatay*; Microsatélites; Conservación; Fragmentación.

## VIII. SUMMARY

*Butia yatay* is a palm species distributed in Argentina, Brazil and Uruguay especially to the north of the Rio Negro, with populations in Guaviyú, Quebracho and Guichón. These populations coexist with forestation, cattle grazing and other human activities. Fragmentation, degradation and loss of habitats are the product of this coexistence between palms and human activities. These threats generate lack of regeneration, aging populations and reduction on the number of individuals. The population of *Butia yatay* in Santo Domingo (belonging to the forestry company Montes del Plata) are part of the natural distribution of this species, being part of the Quebracho populations. This population could present fragmentation due to forestation, which could cause reduction in the gene flow and inbreeding depression. Two zones of cattle grazing exclusion were established in 1996 to promote regeneration. The two zones are 3 km away from each other, and they are surrounded with other sectors with palms and forestation. The objective of this work was to evaluate the effect of forestation in the genetic variability between adult individuals and seedlings within and between the two sectors. To evaluate the existence of fragmentation there are genetic tools like SSRs markers. These markers have not been developed directly for *B. yatay* but they can be transferred from a related species like *Butia eriospatha*. 14 loci developed for *B. eriospatha* were evaluated, from which only 7 were amplified successfully. Only 4 of the 7 showed enough polymorphism to perform the genetic evaluation of the populations. In total 100 samples were collected per sector in two ontogenetic states, 50 adults and 50 seedlings. In total, 200 samples were collected. Comparing within one sector, adults to seedlings and seedlings from one sector with seedlings from the other sector, we can conclude that there is no fragmentation. We can conclude this because all  $F_{ST}$  values are close to 0, being supported by their statistical significances. These two areas under study correspond to the same population as they do not present genetic differentiation. A hypothesis arises that "Santo Domingo" palms represent the same population based on these results between the two sectors under study. Regarding management plan, with this study the forestry activities that are being carried out in the land have not generated effects on the fragmentation of the palm populations.

Keywords: *Butia yatay*; Microsatellites; Conservation; Fragmentation.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Aagaard, J. E.; Krutovskii, K. V.; Strauss, S. H. 1998. RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. *Heredity*. 81: 69-78.
2. Abd, M. M. 2014. Desarrollo y transferibilidad de los microsatélites en *Prunus* y su aplicación en estudios de variabilidad. Tesis PhD. Lérida, España. Universidad de Lleida. 206 p.
3. Aiyem D., Edwards S., Bos G., Ekstrom J., Krueger L., Quétier F., Savy C., Semroc B., Sneary M. and Bennun L. 2015. No Net Loss and Net Positive Impact Approaches for Biodiversity: exploring the potential application of these approaches in the commercial agriculture and forestry sectors. Gland, IUCN. 66 p.
4. Aizen, M. A.; Feinsinger, P. 2003. Bees not to be? Responses of insect pollinator faunas and flower pollination to habitat fragmentation. In: Bradshaw, G. A.; Marquet, P. A. eds. *How landscapes change; human disturbance and ecosystem fragmentation in the americas*. New York, Springer-Verlag. pp. 111-129.
5. Akkac, A.; Scariot, V.; Torello Mraioni, D.; Boccacci, P.; Beltramo, C.; Botta, R. 2009. Development and evaluation of microsatellite markers in *Phoenix dactylifera* L. and their transferability to other Phoenix species. *Biología Plantarum*. no. 1: 164-166.
6. Baker, C. S.; Lento, G. M.; Cipriano, F.; Palumbi, S. R. 2000. Predicted decline of protected whales based on molecular genetic monitoring of Japanese and Korean markets. *The Royal Society*. 267(1449): 1191-1199.
7. Balloux, F.; Lugon-Moulin, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*. 11(2): 155-165.
8. Barcelos, E.; Amblard, P.; Berthaud, J.; Seguin, M. 2002. Genetic diversity and relationship in American and African oil palm as revealed by RFLP and AFLP molecular markers. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 37(8): 1105-1114.

9. Batista, W. B.; Rolhauser, A. G.; Biganzoli, F.; Burkart, S. E.; Goveto, L.; Maranta, A.; Pignataro, A. G.; Morandeira, N. S.; Rabadan, M. 2014. Las comunidades vegetales de la sabana del parque nacional El Palmar (Argentina). *Darwiniana*. 2(1): 5-38.
  
10. Batra, P.; Pirard, R. 2015. Is a typology for planted forests feasible, or even relevant?. CIFOR. Info brief no. 121. 8 p.
  
11. Bedoya, C. A. 2012. Estudios de diversidad genética en poblaciones de maíz (*Zea mays* L.) evaluadas con microsatélites. Tesis PdD. Palma de Mallorca, España. Universidad de las Islas Baleares. 209 p.
  
12. Bonomo, M.; Capeletti, L.E. 2014. Uso prehispánico de las palmeras *Syagrus romanzoffiana* y *Butia yatay* en el nordeste argentino; aportes desde la etnografía y la biometría. (en línea). *Revista del Museo de Antropología*. 7(2): 227-234. Consultado oct. 2015. Disponible en <http://www.researchgate.net/publication/269111772>
  
13. Brown, E. N.; Dudley, A.; Lindhe, D. R.; Muhtaman, C.; Stewart, Y.; Synnott, T. 2013. Guía genérica para la identificación de altos valores de conservación; una guía de buenas prácticas para la identificación de AVC en diferentes ecosistemas y sistemas de producción. (en línea). s.l., Proforest por la Red de Recursos de AVC. s.p. Consultado may. 2015. Disponible en <https://ic.fsc.org/high-conservation-values.87.htm>
  
14. \_\_\_\_\_; Senior, M. J. M. 2014. Common guidance for the management and monitoring of high conservation values; a good practice guide for the adaptive management of HCVs. (en línea). s.l., Proforest por la Red de Recursos de AVC. Consultado may. 2015. Disponible en <https://www.hcvnetwork.org/resources/cg-management-and-monitoring-2014-english>
  
15. Brussa, C. A. 1998. El Uruguay y sus palmeras. (en línea). Suplemento Jardines. El País, Montevideo, UY, nov. 19: 1-6. Consultado oct. 2015. Disponible en [http://www.guayubira.org.uy/palmares/uruguay\\_y\\_sus\\_palmeras.html](http://www.guayubira.org.uy/palmares/uruguay_y_sus_palmeras.html)
  
16. \_\_\_\_\_; Grela, I. A. 2007. Flora arbórea del Uruguay; con énfasis en las especies de Rivera y Tacuarembó. Montevideo, COFUSA. 544 p.

17. Cabral, E. L.; Castro, M. 2007. Palmeras Argentina; claves para su reconocimiento. Buenos Aires, L.O.L.A.. 88 p.
18. Canzani, L.; Martínez, L. G. 2013. Certificación forestal FSC y áreas de alto valor para la conservación. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 88 p.
19. Carnevali, R. 1994. Fitogeografía de la Provincia de Corrientes. (en línea). Asunción, Paraguay, Litocolor. pp. 265 – 274. Consultado dic. 2015. Disponible en <http://www.agrotecnicounne.com.ar/introduccion/unidad-3/bibliografia-de-la-unidad-3/carnevali001.pdf/view>
20. Caro, M. T.; Laurenson, M. K. 1994. Ecological and genetic factors in conservation; a country tale. *Science*. 263(5149): 485-486.
21. Chakraborty, R.; Kimmel, M.; Stivers, D. N.; Davison, L. J.; Deka, R. 1997. Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94: 1041-1046.
22. Chape, S.; Spalding, M.; Jenkins, M. D. 2008. The world's protected areas. Berkeley, USA, University of California. 192 p.
23. Chebataroff, J. 1971. Condiciones ecológicas que influyen en la distribución de las palmeras del Uruguay. Montevideo, UdelaR. Facultad de Humanidades y Ciencias. 24 p.
24. \_\_\_\_\_. 1974. Palmeras del Uruguay. Montevideo, UdelaR. Facultad de Humanidades y Ciencias. 31 p.
25. Clewell, A.; Rieger, J.; Munro, J. 2005. Guidelines for developing and managing ecological restoration projects. (en línea). 2<sup>nd</sup>. ed. Tucson, Society for Ecological Restoration International. s.p. Consultado dic. 2015. Disponible en <http://www.ser.org/resources/resources-detail-view/guidelines-for-developing-and-managing-ecological-restoration-projects#7>
26. Corrêa, L. B.; Barbieri, R. L.; Rossato, M.; Büttow, M. V.; Heiden, G. 2009. Caracterização cariológica de palmeiras do gênero *Butia* (Arecaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura*. 31(4): 1111-1116.

27. Costa, A. M. 2004. Uso de marcadores RAPD e do sistema de informacao geográfica no estudo da variabilidade genética e ecológica de *Stylosanthes macrocephala* M. B. Ferr. et S. Costa. Tesis MSc. Ciências Genômicas e Biotecnologia. Brasília, Brasil. Universidade Católica de Brasilia. 79 p.
28. Culley, T. M.; Wolfe, A. D. 2001. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescensaiton* (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. (en línea). *Heredity*. 86: 545-556. Consultado jul. 2015. Disponible en <http://www.researchgate.net/publication/11792712>.
29. Daniluk, G.; López, M. 2000. Establecimiento de un modelo de certificación ecológica de bosques como estrategia de comercialización; el caso de Uruguay. *Revista de Dirección Organización y Administración de Empresas*. 23: 146-154.
30. Deguignet, M.; Juffe-Bignoli, D.; Harrison, J.; MacSharry, B.; Burgess, N.; Kingston, N. 2014. 2014 United Nations List of Protected Areas. (en línea). Cambridge, UNEP. World Conservation Monitoring Centre. 34 p. Consultado jul. 2015. Disponible en [http://wdpa.s3.amazonaws.com/WPC2014/2014\\_UN\\_LIST\\_REPORT\\_EN.pdf](http://wdpa.s3.amazonaws.com/WPC2014/2014_UN_LIST_REPORT_EN.pdf)
31. Didham, R. K.; Ghazoul, J.; Stork, N. E.; Davis A. J. 1996. Insects in fragmented forests; a functional approach. *Tree*. 11(6): 255-260.
32. Doyle, J. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19: 11-15.
33. Dransfield, J.; Uhl, N. W. 1998. Palmae. In: Kubitzki, K.; Huber, H; Ruddal, P. J.; Stevens, P. S.; Stutzel, T. eds. *The families and genera of vascular plants*. Berlin, Springer-Verlag. pp. 306-388.
34. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; Asmussen, C. B.; Baker, W. J.; Harley, M. M.; Lewis, C. E. 2005. A new phylogenetic classification of the palm family, Arecaceae. *Royal Botanic Gardens*. 60(4): 559-569.
35. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 2008. *Genera palmarum: the evolution and classification of palms*. Kew, England, The Royal Botanic Gardens. 744 p.

36. Drehe, K.; Khairallah, M.; Ribaut, J.; Morris, M. 2003. Money matters (I); costs of field and laboratory procedures associated with conventional and marker-assisted maize breeding at CIMMYT. (en línea). *Molecular Breeding*. 11: 221–234. Consultado oct. 2015. Disponible en <http://www.researchgate.net/publication/227150681>.
37. Dudley, N. ed. 2008. Directrices para la aplicación de las categorías de gestión de áreas protegidas. Gland, Suiza, UICN. 96 p.
38. Eguiarte, E. L.; Piñero, D. 1990. Genética de la conservación; leones vemos, genes no sabemos. (en línea). *Ciencias*. 4: 34-47. Consultado jul. 2015. Disponible en <http://www.revistacienciasunam.com/images/stories/Articles/ESP4/CNSE0406.pdf>
39. Ellstrand, N. C.; Elam, D. R. 1993. Population genetic consequences off small population size; implication for plant conservation. (en línea). *Annual Review of Ecology and Systematics*. 24: 217-242. Consultado set. 2015. Disponible en <http://www.annualreviews.org/aronline>
40. Encuentro Sobre Pequeñas Frutas y Frutas Nativas del MERCOSUR (4º., 2010, Pelotas, RS, BR). 2010. Diversidad y distribución geográfica de *Butia (Areaceae)*. San Pablo, Brasil, Universidad de San Pablo. 216 p.
41. Evans, J. 2009. Planted forests; uses, impacts and sustainability. (en línea). Roma, FAO/CABI. s.p. Consultado jul. 2015. Disponible en <http://www.fao.org/forestry/24489-0e54acf5c0bee7238cf5ebd97931a4bb7.pdf>
42. Fahrig, L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 34(1): 487–515.
43. FAO. 1995. State of the world's forests 1995. (en línea). Roma. s.p. Consultado sep. 2015. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/003/X6953E/X6953E00.htm#TOC>
44. \_\_\_\_\_. 2001. Situación de los bosques del mundo 2001. (en línea). Roma. s.p. Consultado sep. 2015. Disponible en <ftp.fao.org/docrep/fao/003/y0900s/>
45. \_\_\_\_\_. 2007. Situación de los bosques del mundo 2007. (en línea). Roma. 143 p. Consultado oct. 2015. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/009/a0773s/a0773s00.htm>

46. \_\_\_\_\_.2010. Evaluación de los recursos forestales mundiales 2010. Roma. 381 p.
47. \_\_\_\_\_. 2011. Situación de los bosques del mundo 2011. (en línea). Roma. 176 p. Consultado ago. 2015. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/013/i2000s/i2000s.pdf>
48. \_\_\_\_\_.2012. El estado de los bosques del mundo 2012. (en línea). Roma. 51 p. Consultado oct. 2015. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/016/i3010s/i3010s.pdf>
49. Fiaschi, P.; Pirani, J. R. 2009. Review of plant biogeographic studies in Brazil. *Journal of Systematics and Evolution*. 47(5): 477-496.
50. FSC (Forest Stewardship Council, DE). 2009. Guía FSC paso a paso. s.l., Frank Katto. 37 p. (Serie Técnica FSC No. 2009 - T002)
51. \_\_\_\_\_. 2012. About FSC en español. (en línea). Bonn, Alemania. 2 p. Consultado jul. 2015. Disponible en <https://ic.fsc.org/download.acerca-del-fsc.a-1888.pdf>
52. \_\_\_\_\_. 2014a. Market info pack; an overview of recent trends and current status of Forest Stewardship Council® (FSC®) certification. (en línea). Bonn, Germany. 31 p. Consultado jul. 2014. Disponible en <https://ic.fsc.org/preview.2014-fsc-market-info-pack.a-3730.pdf>
53. \_\_\_\_\_. 2014b. Principios y criterios del FSC para el manejo forestal responsable; FSC-STD-01-001 V5-1 ES. (en línea). Bonn, Alemania. 32 p. Consultado ago. 2015. Disponible en <https://ic.fsc.org/los-principios-y-criterios.34.htm>
54. Gaiero, P. 2005. Caracterización citogenética de cuatro especies de palmas (Fam. *Arecaceae*) nativas de Uruguay. Tesis Licenciatura en Ciencias Biológicas. Montevideo, Uruguay. Facultad de Ciencias. 97 p.
55. \_\_\_\_\_. 2010. Diversidad genética en palmas nativas (*Arecaceae*); citogenética contenido de ADN y análisis moleculares poblacionales. Tesis MSc. Ciencias Agrarias opción Ciencias Vegetales. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 112 p.

56. Gelape, F. 2007. Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservación y uso de recursos genéticos. Planaltia, D. F., EMBRAPA Cerrados. 102 p.
57. Goldstein, B. D.; Pollock, D. D. 1994. Least squares estimations of molecular distance noise abatement in phylogenetic reconstruction. *Theoretical Population Biology*. 45: 219-226.
58. Gonzales, E. G. 2003. Microsatélites; sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*. 59(3): 377-388.
59. Griscom, H. P.; Kalko, E. K. V.; Ashton, M. S. 2007. Frugivory by small vertebrates within a deforested, dry tropical region of central america. *Biotropica*. 39(2): 278-282.
60. Guarino, L.; Jarvis, A.; Hijamans, R. J.; Maxted, N. 2002. Geographic information systems (GIS) and the conservation and use of plant genetic resources. *In*: Engels, J. M. M.; Rao, V. R.; Brown, A. H. D.; Jackson, M. T. eds. *Managing plant genetic diversity*. Makati, International Rice Research Institute. pp. 387-404.
61. Gutpa, M.; Chiyn, Y.; Romero-Severson, J.; Owen, J. L. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats-sequence repeats. (en línea). *Theoretical and Applied Genetics*. 89: 998-1006. Consultado set. 2015. Disponible en <http://www.researchgate.net/publication/258215046>.
62. HCV (High Conservation Value, UK). 2014. Annual report 2014. (en línea). s.l. 17 p. Consultado abr. 2015. Disponible en <https://www.hcvnetwork.org/.../2014-annual-report>
63. Holdgate, M. 1999. *The green web*. London, Earthscan. s p.
64. IUCN (International Union for Conservation of Nature, SH). s.f. IUCN definitions; english. (en línea). s.l. s.p. Consultado sep. 2015. Disponible en [https://cmsdata.iucn.org/downloads/en\\_iucn\\_glossary\\_definitions.pdf](https://cmsdata.iucn.org/downloads/en_iucn_glossary_definitions.pdf)
65. Karron, D. J. 1987. A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners. (en línea). *Evolutionary Ecology*. 1(1): 47-58. Consultado set. 2015. Disponible en <http://www.researchgate.net/publication/225211817>.

66. Kuiper, H. A.; Kleter, G. A.; Noteborn, P. J. M.; Kok, E. J. 2001. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *The Plant Journal*. 27(6): 503-528.
67. Lande, R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science*. 241(4872): 1455-1460.
68. Lanes, É. C. M.; Motoike, S. Y.; Kuki, K. N.; Nick, C.; Freitas, R. D. 2014. Molecular characterization and population structure of the macaw palm, *Acrocomia aculeata* (*Arecaceae*), ex situ germplasm collection using microsatellites markers. *Journal of Heredity*. 106 (1): 102–112.
69. Lesica, P.; Allendorf, F. W. 1995. When are peripheral populations valuable for conservation? *Conservation Biology*. 9(4): 753–760.
70. Levy, M. s. f. Understanding high conservation value forest (HCVF); implementation in intensively managed plantations. (en línea). s.n.t. s.p. Consultado jul. 2015. Disponible en [https://www.hcvnetwork.org/resources/folder.2006-09-29.6584228415/Understanding%20HCVF July%202010\\_%20final.pdf](https://www.hcvnetwork.org/resources/folder.2006-09-29.6584228415/Understanding%20HCVF%20July%202010_%20final.pdf)
71. Lorenzi, H.; Noblick, L. R.; Kahn, F.; Ferreira, E. 2010. Flora brasileira; Arecaceae (palmeiras). 9a. ed. Sao Pablo, Instituto Plantarum. 384 p.
72. Lowe, A. J.; Boshier, D.; Ward, M.; Bacles, C. F. E.; Navarro, C. 2005. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity*. 95(4): 255-273.
73. Lunazzi, M. M. 2009. Estructura y dinámica poblacional de la palmera *Butia yatay* en la sabana del Parque Nacional El Palmar; análisis en la escala de stand. Tesis MSc. en Recursos Naturales. Buenos Aires, Argentina. Universidad de Buenos Aires. 129 p.
74. Marcato, A. M. 2004. Revisão taxonômica do gênero *Butia* (Becc.) Becc. E filogenia da subtribo *Butiinae* Saakov (Palmae). Tesis Doctorado en Biología. São Paulo, Brasil. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociencias. 147 p.
75. Martínez-Gómez, P.; Arulsekhar, S.; Potter, D.; Gradziel, T.M. 2003. An extended interspecific gene pool available to peach and almond breeding as

- characterized using simple sequence repeat (SSR) markers. *Euphytica*. 131: 313–322.
76. Masiero, M.; Secco, L.; Pettenella, D.; Brotto, L. 2015. Standards and guidelines for forest plantation management; a global comparative study. *Forest Policy and Economics*. 53(2015): 29–44.
77. MdP (Montes del Plata, UY). 2013. Plan de gestión y resultados de monitoreo; resumen público. (en línea). s.l. 81 p. Consultado dic. 2015. Disponible en <http://www.montesdelplata.com.uy/descargables.php?lang=es>
78. \_\_\_\_\_. 2014. Plan de gestión y resultados de monitoreo; resumen público. (en línea). s.l. 42 p. Consultado dic. 2015. Disponible en <http://www.montesdelplata.com.uy/descargables.php?lang=es>
79. Meffe, G. K.; Viderman, S. 1995. Combining science and policy in conservation biology. *Wildlife Society*. 23(3): 327-332.
80. MGAP. DGF (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección General Forestal, UY). 2013. Un sector que apuntala el desarrollo del país. El Observador, Montevideo, UY, jul.26: 12.
81. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. 2014. Cincuenta años promoviendo un desarrollo forestal sostenible. El Observador, Montevideo, UY, jul. 6: 11.
82. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. 2015. Paquete de informe sobre los bosques 2015. Montevideo, s.e. 77 p.
83. Mistura, C. C.; Barbieri, R. L.; Castro, C. M.; Priori, D.; Branco Villela, J. C. 2012. Transferibilidade de marcadores microssatélites de coco (*Cocos nucifera*) para butiá (*Butia odorata*). *Magistra (Cruz das Almas)*. 24(4): 360-369.
84. \_\_\_\_\_. 2013. Caracterização de recursos genéticos de *Butia odorata* no Bioma Pampa. Tesis PhD Ciências Fitomelhoramento. Pelotas, Brasil. Universidade de Pelotas. 79 p.
85. Moore, H. E.; Uhl, N. W. 1973. The monocotyledons; their evolution and comparative biology. *The Quarterly Reviews in Biology*. 48: 414-436.
86. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 1982. The major trends of evolution in palms. *Botanical Review*. 48(1): 1-69.

87. Morandeira, N. S. 2009. Distribución espacial de árboles y palmeras en sitios de la sabana de *Butia yatay*; Parque Nacional El Palmar, Entre Ríos, Argentina. Tesis Licenciatura en Ciencias. Buenos Aires, Argentina. Universidad de Buenos Aires. 68 p.
88. Moreno, A. C.; Marchelli, P.; Vendramin, G. G.; Gallo, L. A. 2011. Cross transferability of SSRs to five species of *Araucariaceae*; a useful tool for population genetic studies in *Araucaria araucana*. *Forest Systems*. 20(2): 303-314.
89. Morris, M.; Drehe, K.; Ribaut, J.; Khairallah, M. 2003. Money matters (II); costs of maize inbred line conversion schemes at CIMMYT using conventional and marker-assisted selection. (en línea). *Molecular Breeding*. 11: 235-247. Consultado oct. 2015. Disponible en <http://www.researchgate.net/publication/226722064>.
90. Mortiz, C. 2002. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology*. 51(2): 238-254.
91. Nason, J. D.; Hamrick, J. L. 1997. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation; two case studies of neotropical canopy trees. (en línea). *The Journal of Heredity*. 88(4): 264-276. Consultado set. 2015. Disponible en <http://jhered.oxfordjournals.org>.
92. Nazareno, A. G.; Zucchi, M. I.; Dos Reis, M. S. 2011. Microsatellite markers for *Butia eriospatha* (Arecaceae), a vulnerable palm species from the Atlantic rainforest of Brazil. (en línea). *American Journal of Botany*. 98(7): 198–200. Consultado dic. 2013. Disponible en <http://jhered.oxfordjournals.org/content/105/1/120.full>
93. \_\_\_\_\_; Reis, M. 2014. At risk of population decline? An ecological and genetic approach to the threatened palm species *Butia eriospatha* (Arecaceae) of Southern Brazil. *Journal of Heredity*. 105(1): 120–129.
94. Nei, M.; Maruyama, T.; Chakraborty, R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. (en línea). *Evolution*. 29(1): 1-10. Consultado set. 2015. Disponible en <http://www.researchgate.net/publication/223189194>.
95. Olivera, E. J.; Gomes, J.; Zucchi, M. I.; Vencovsky, R.; Carneiro, M. L. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*. 29(2): 294-307.

96. Olmedo, M.; Chatellenaz, M. L.; Fontana, J. L. 2008. Dispersión de *Butia yatay* (Arecaceae) por el ñandú (*Rhea americana*) en el Parque Nacional Mburucuyá, Corrientes. (en línea). s.l., Universidad Nacional del Nordeste por la Secretaria General de Ciencia y Técnica. s.p. (Comunicaciones científicas y tecnológicas). Consultado set. 2015. Disponible en <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/investigacion/com2008/B-005.pdf>
97. ONU (Organización de las Naciones Unidas, US). 1992. Convenio sobre la diversidad biológica 1992. (en línea). New York. 30 p. Consultado jun. 2015. Disponible en <http://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf>
98. Parker, P. G.; Snow, A. A.; Chung, M. D.; Booton, G. C.; Furest, P. A. 1998. What molecules can tell us about populations; choosing and using a molecular marker. (en línea). Ecology. 79(2): 361-382. Consultado set. 2015. Disponible en <http://www.researchgate.net/publication/30069175>.
99. Peakall, R.; Smouse, P. E. 2012. GenAlEx 6.5; genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. Bioinformatics 28: 2537-2539.
100. Pintaud, J. C.; Zehdi, S.; Couvreur, T.; Barrow, S.; Henderson, S.; Aberlenc-Bertossi, F.; Tregear, J.; Billotte, N. 2010. Species delimitation in the Genus Phoenix (Arecaceae) based on SSR markers, with emphasis on the identity of the date palm (*Phoenix dactylifera*). (en línea). In: Seberg, O.; Petersen, G.; Barford, A. S.; Davis, J. I. eds. Diversity, phylogeny, and evolution in the monocotyledons. Aarhus, Aarhus University Press. pp. 267-286. Consultado dic. 2015. Disponible en [https://www.researchgate.net/publication/230845751\\_An\\_evaluation\\_of\\_the\\_taxonomy\\_of\\_the\\_genus\\_Phoenix\\_Arecaceae\\_using\\_SSR\\_markers\\_with\\_emphasis\\_on\\_the\\_identity\\_of\\_the\\_date\\_palm\\_Phoenix\\_dactylifera\\_L](https://www.researchgate.net/publication/230845751_An_evaluation_of_the_taxonomy_of_the_genus_Phoenix_Arecaceae_using_SSR_markers_with_emphasis_on_the_identity_of_the_date_palm_Phoenix_dactylifera_L)
101. Programa Refugios de Vida Silvestre. Fundación Vida Silvestre Argentina. Refugio de Vida Silvestre la Aurora del Palmar Entre Ríos. s.f. Estudio de la regeneración del palmar de Yatay (*Butia yatay*). (en línea). Buenos Aires. 12 p. Consultado set 2015. Disponible en <http://www.ecopuerto.com/bicentenario/informes/RegeneracPalmarYatay.pdf>

102. Ranade, S. A.; Farooqui, N.; Bhattacharya, E.; Verma, A. 2001. Gene tagging with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for molecular breeding in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 20(3): 251-275.
103. Rentaria, M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares; las herramientas moleculares. *In*: Eguiart, L. E.; Souza, V.; Aguirre, X. eds. *Ecología molecular*. México, D. F., Instituto Nacional de Ecología. pp. 541-566.
104. Rivas, M.; Barilani, A. 2004. Diversidad, potencial productivo y reproductivo de los palmares de *Butia capitata* (Mart.) Becc. de Uruguay. *Agrociencia* (Montevideo). 8(1): 11-20.
105. \_\_\_\_\_. 2005. Desafíos y las alternativas para la conservación *in situ* de los palmares de *Butia capitata* (Mart.) Becc. *Agrociencia* (Montevideo). 9(1): 161-168.
106. Rocha, P. J. 2002. Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. *Palmas*. 23(2): 9-17.
107. \_\_\_\_\_. 2003. Marcadores moleculares, una herramienta útil para la selección genética de palma de aceite. *Palmas*. 24(2): 11-25.
108. Rocha, M.; Gasca, J. 2007. *Ecología molecular de la conservación; introducción a la ecología molecular*. *In*: Eguiart, L. E.; Souza, V.; Aguirre, X. eds. *Ecología molecular*. México, D. F., Instituto Nacional de Ecología. pp. 251-272
109. Rolhauser, A. G. 2007. Expansión de poblaciones arbóreas nativas en las sabanas del Parque Nacional El Palmar; patrones y procesos en las escalas de paisaje y de parche. Tesis MSc. en Recursos Naturales. Buenos Aires, Argentina. Universidad de Buenos Aires. 68 p.
110. Rossato, M.; Correa, L. B.; Barbieri, R.; Valli Büttow, M.; Heiden, G. 2009. Caracterización cariologica de palmeras del genero *Butia* (Arecaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura*. 31(4): 1111-1116.
111. Schlötterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*. 109(10): 365-371.
112. Shaffer, M. L. 1981. Minimum population sizes for species conservation. (en línea). *Bio Science*. 31(2): 131-134. Consultado jul. 2015. Disponible en

<http://links.jstor.org/sici?sici=00063568%28198102%2931%3A2%3C131%3AMPSFSC%3E2.0.CO%3B2-2>

113. Speranza, P.; Malosetti, M. 2007. Nuclear and cytoplasmic microsatellite markers for the species of the Dilatata group of *Paspalum* (Poaceae). *Plant Genetic Resources*. 5(1): 14–26.
114. Stern, K. 2000. *Introductory plant biology*. 8th. ed. s.l., Mc Graw-Hill. 589 p.
115. Tomlinson, P. B. 1990. *The structural biology of palms*. Oxford, Clarendon. 477 p.
116. Uruguay XXI. 2014. Sector Forestal. Además de excelentes condiciones de clima y suelo para la producción maderera, existen oportunidades para agregado de valor en la fase industrial. s. l. 26 p.
117. Vida entre palmeras; un valioso aporte de EUROFORES SA al conocimiento de la flora y fauna de nuestro país. (en línea). *Forestal* 3 (12): 13-14. Consultado oct. 2015. Disponible en [http://www.guayubira.org.uy/monte/bibliografia/Eufores\\_Palmeras.pdf](http://www.guayubira.org.uy/monte/bibliografia/Eufores_Palmeras.pdf)
118. Villegas, V. E.; Duran, C.; Beebe, S. 2000. Caracterización molecular de materiales dura. *Palmas*. 21(1): 35-40.
119. Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van de Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M.; Zabeau, M. 1995. AFLP; a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23(21): 4407-4414.
120. Warman, R. D. 2014. Global wood production from natural forests has peaked. *Biodiversity and Conservation*. 23: 1063–1078.
121. Weber, J. L.; Wong, C. 1993. Mutation of humans short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*. 2(8): 1123-1128.
122. Wei Guo, S.; Thompson, E. A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. 48(2): 361–372
123. White, T. L.; Adams, W. T.; Neale, W. B. *Forest genetics*. Cambridge, CABI. 702 p.

124. Wigginton, J. E.; Cutler, D. J.; Abecasis, G. R. 2005. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *The American Journal of Human Genetics*. 76: 887–883
125. Williams, J. G. K.; Kubelike, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A.; Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18(22): 6531-6535.
126. WWF (World Wide Fund for Nature, SH). 2007. Bosques de alto valor de conservación; el concepto en teoría y práctica. (en línea). Gland. 28 p. Consultado abr. 2015. Disponible en [https://www.hcvnetwork.org/resources/folder.2006-09-29.6584228415/bosques con alto valor de conservacion webfinal 1.pdf](https://www.hcvnetwork.org/resources/folder.2006-09-29.6584228415/bosques%20con%20alto%20valor%20de%20conservacion%20webfinal%201.pdf)
127. \_\_\_\_\_. 2012. Guía de certificación forestal. (en línea). Santiago de Cali, Colombia, Rafael Venegas Deza. 70 p. Consultado may. 2015. Disponible en [http://awsassets.panda.org/downloads/certificacion\\_forestal\\_web.pdf](http://awsassets.panda.org/downloads/certificacion_forestal_web.pdf)
128. Zaki, N. M.; Singh, R.; Rosli, R.; Ismail, I. 2012. *Elaeis oleifera* genomic-SSR markers; exploitation in oil palm germoplasm diversity and cross-amplification in Areaceae. *International Journal of Molecular Sciences*. 13: 4069-4088.
129. Zane, L.; Bargelloni, L.; Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation; a review. *Molecular Ecology*. 11(1): 1-16.
130. Zeppenfeld, V. B.; Aozani, L. M.; Abella, E. C.; Da Rosa, C. S.; Rosseto, V. 2011. Manejo sustentável e participativo de butiazeiro no município de Quaraí, RS. (en línea). *Anais do SIEPE*. 3(3): s.p. Consultado dic 2015. Disponible en <http://seer.unipampa.edu.br/index.php/siepe/article/view/2087>
131. Zhang, D.; Hewitt, G. M. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations; practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*. 12: 563-584.