

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE BIOLOGÍA



**“EFECTO DE LA FRAGMENTACIÓN EN LA DEMOGRAFÍA GENÉTICA DE  
*Astronium graveolens* (ANACARDIACEAE)”**

## **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Biol. KARMAN FARRIOL SÁNCHEZ GÓMEZ**

**DIRECTOR (A) DE TESIS: DRA. YVONNE HERRERÍAS DIEGO**

**CO-DIRECTOR: DR. MAURICIO RICARDO QUESADA AVENDAÑO**

**MORELIA, MICHOACÁN; MÉXICO ABRIL, 2017**



**DEDICATORIA**

*A Diana por todo su amor*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al posgrado en ciencias biológicas de la UMSNH, por aceptarme y permitir seguir desarrollándome en el ámbito científico.

Al Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad UNAM, Campus Morelia, por permitirme en uso de sus instalaciones.

A la reserva de la Biosfera Chamela-Cuixmala por permitirme desarrollar el proyecto dentro de su área.

Al CONACYT por haberme otorgado una beca, que me permitió dedicarme completamente a mis estudios.

A mis directores de tesis, Dra. Yvonne Herrerías Diego y Dr. Mauricio Quesada Avendaño por haberme involucrado dentro del proyecto, gracias por todo su apoyo.

A los miembros de mi comité, Dr. Omar Chassin Noria, Dr. Antonio González Rodríguez, Dr. Omar Domínguez Domínguez, gracias por aceptar formar parte de la mesa directiva.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

Al Dr. Mauricio Quesada, por adoptarme en su laboratorio y permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por todo su apoyo y amistad, pero sobre todo por enseñarme que solo a base de trabajo duro puede descubrirse algo.

Al M.C. Edson Jacob, por todo su apoyo en el trabajo de campo, por las revisiones hechas a la tesis y por toda su amistad brindada.

A Ricardo Tapia, a Luis Eduardo (Dudu), Miguel (Mike Wazowski), Anita y Baudelio por ayudarme en las colectas de campo.

Al Biol. Gumersindo Sánchez, por todo el apoyo logístico, y por no cerrarme jamás las puertas a su laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio de Ecología y evolución de polinización y sistemas reproductivos de plantas, gracias por involucrarme en su equipo de trabajo.

A Dianita por apoyarme en los momentos más difíciles, por ser mi mejor amiga, pero sobre todo por confiar en mí, gracias por hacerme feliz.

Por último, pero no menos importante, a mi Madre y a mi Abuela por creer en mí, por apoyarme siempre, gracias por la vida que me dieron.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	I
INTRODUCCIÓN .....	1
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	6
DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y ABUNDANCIA DE <i>Astronium graveolens</i> (ANACARDIACEAE) .....	6
INTRODUCCIÓN .....	6
OBJETIVO GENERAL.....	8
OBJETIVOS PARTICULARES .....	8
HIPÓTESIS PARTICULARES .....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
SITIO DE ESTUDIO.....	9
ESPECIE DE ESTUDIO .....	10
SELECCIÓN DE SITIOS .....	10
ANÁLISIS DE DATOS.....	12
RESULTADOS .....	13
DISCUSIÓN.....	15
CONCLUSIÓN .....	19
BIBLIOGRAFÍA.....	20
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	24
DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA ESPACIAL FINA DE <i>Astronium graveolens</i> (ANACARDIACEAE) .....	24
INTRODUCCIÓN .....	24
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS PARTICULARES .....	27
HIPÓTESIS PARTICULARES .....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
SITIO DE ESTUDIO.....	28
ESPECIE DE ESTUDIO .....	28
SELECCIÓN DE SITIO DE ESTUDIO.....	29
EXTRACCIÓN DE ADN .....	29
SELECCIÓN DE LOS PRIMERS.....	30

REACCIONES MULTIPLEX.....	31
ANÁLISIS DE DATOS.....	31
RESULTADOS .....	33
DIVERSIDAD GENÉTICA Y COEFICIENTE DE PARENTESCO POBLACIONAL .....	33
ESTRUCTURA GENÉTICA.....	34
ESTRUCTURA GENETICA ESPACIAL FINA .....	38
DISCUSIÓN.....	39
DIVERSIDAD GENÉTICA, ENDOGAMIA Y PARENTESCO EN LAS POBLACIONES .....	39
ESTRUCTURA GENÉTICA.....	42
CONCLUSIÓN .....	46
ANEXO .....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48

## FIGURAS

Figura 1. Reserva de la biosfera Chamela-Cuixmala (Obs. Personales). .....	3
Figura 2. Fotografías de las características morfológicas de <i>Astronium graveolens</i> (Anacardiaceae). 4	
Figura 3. Distribución geográfica de las cuatro poblaciones de estudio. A) Antiguo sur, b) Careyes, c) Santa Cruz, d) Limoncitos. ....	9
Figura 4. Distribución geográfica de las clases de tamaño dentro de cada población. ....	11
Figura 5. Función de K de Ripley para cada clase (A) adultos, (J) juveniles y (S) plántulas, la línea solida de color indica la función de L (t) = t, se muestra los limites inferiores y superiores (95%) dentro de los intervalos se espera completa aleatoriedad.....	13
Figura 6. Histograma de frecuencias basado en la abundancia de cada clase, en las poblaciones continuas y fragmentadas.....	14
Figura 7. Histograma de frecuencias basadas en la densidad (número de individuos por hectárea) para cada clase, en las poblaciones continuas y fragmentadas.....	15
Figura 8. Electroforesis de ADN nuclear de <i>Astronium graveolens</i> , se muestra extracciones de 9 individuos en agarosa al 1% teñido con EtBr 0.3 µg/ml.....	30
Figura 9. (Superior) Estructura genética poblacional estimada mediante STRUCTURE, cada individuo es representado por una barra vertical que es dividida por diferentes colores producto de una mezcla de genotipos. Las líneas negras gruesas separan a las clases de tamaño de cada población, (Inferior) análisis de coordinadas principales (PCA), dentro de cada población se indica $F_{ST}$ pareada, estadísticos F, y AMOVA .....	37
Figura 10. Correlogramas para las cuatro poblaciones, sobre el eje X se observa las diferentes clases de distancia (mts), y sobre el eje Y el coeficiente de correlación genética (r).....	38

## TABLAS

Tabla 1. Características de los 6 pares de primers microsatélites que expresaron producto de amplificación elegidos para el estudio.....	30
Tabla 2. Parámetros genéticos de los 6 microsatélites estudiados en cuatro poblaciones. N=Número de individuos, Na = Número de alelos diferentes, NO= Número de alelos privados $H_o$ = Heterocigosis observada, $H_e$ =heterocigosis esperada, $F_{is}$ = coeficiente de endogamia, $r_{xy}$ = coeficiente de parentesco.....	34

## ANEXO

Anexo 1. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA <i>Astronium graveolens</i> CTAB 2X.....	47
--	----

## RESUMEN

En el presente estudio se realizó un análisis del efecto de la fragmentación en la demografía genética de *Astronium graveolens* en la reserva de la Biosfera Chamela-Cuixmala con un total de 990 individuos distribuidos en cuatro poblaciones, los objetivos fueron comparar la distribución, abundancia, densidad, y estructura genética para tres clases de tamaño (adultos, juveniles y plántulas) en poblaciones continuas y fragmentadas, por lo que se utilizaron seis microsatélites diseñados para la especie en estudio. Los resultados mostraron un patrón de agregamiento en las cuatro poblaciones y para las tres clases de tamaño y este es mayor conforme disminuye la talla, los índices de densidad y abundancia se vieron severamente afectados por la fragmentación, por otra parte, la diversidad genética no fue afectada por esta y fue alta para cada población, las continuas mostraron un rango de ( $He$ : 0.645 -  $He$ : 0.608), mientras que las fragmentadas ( $He$ : 0.540- $He$ : 0.556), así mismo los índices de endogamia no se vieron afectados, los sitios de bosque continuo mostraron un rango de ( $F_{IS}$ : 0.024-0.015) y ( $F_{IS}$ : 0.034-0.047) para fragmentos de bosque, el coeficiente de parentesco fue muy variable para cada población, sin embargo la mayoría de las clases dentro de cada población parecen estar representados por linajes de individuos no relacionados. Por otra parte se encontró moderada estructura genética espacial entre poblaciones ( $F_{ST}$ : 0.243-0.081) probablemente resultado de un alto flujo génico vía polen a largas distancias, pero si existe moderada estructura dentro de las poblaciones entre las diferentes clases de tamaño lo que nos hace pensar en la ocurrencia de cuellos de botellas en eventos reproductivos anteriores, los resultados de estructura genética fina indican formación de grupos genéticos con alta correlación en zonas continuas a 20 mts y baja correlación en zonas fragmentadas a 30 m lo que se podría atribuir a la ausencia barreras físicas que faciliten la dispersión de semillas en estas zonas, de acuerdo a estos resultados obtenidos se recomienda implementar áreas de conservación in situ y restringir la extracción de su madera para no repercutir en el estatus genético de *Astronium graveolens*.

Palabras clave: Fragmentación, diversidad genética, estructura genética fina, flujo génico, *Astronium graveolens*.

## ABSTRACT

In the present study an analysis of the effect of fragmentation on the genetic demography of *Astronium graveolens* in the Chamela-Cuixmala Biosphere Reserve was carried out with a total of 990 individuals distributed in four populations, the objectives were to compare the distribution, abundance, density, and genetic structure for three size classes (adults, juveniles and seedlings) in continuous and fragmented populations, so that six microsatellites designed for the species under study were used. The results showed a pattern of aggregation in the four populations and for the three size classes and this is larger as size decreases, density and abundance indices were severely affected by fragmentation, on the other hand, genetic diversity was not ( $He: 0.645 - He: 0.608$ ), while the fragmented ones ( $He: 0.540-He: 0.556$ ), as well as inbreeding rates were not affected, the continuous forest sites showed a range of ( $F_{IS}: 0.024-0.015$ ) and ( $F_{IS}: 0.034-0.047$ ) for forest fragments, the kinship coefficient was very variable for each population, however the majority of the classes within each population appears to be represented by lineages of unrelated individuals. On the other hand we found a moderate spatial genetic structure between populations ( $F_{ST}: 0.243-0.081$ ) probably resulting from a high gene flow via pollen over long distances, but if there is a moderate structure within populations among the different size classes what makes us to think of the occurrence of bottlenecks in previous reproductive events, the results of fine genetic structure indicate the formation of genetic groups with high correlation in continuous areas at 20 mts and low correlation in fragmented areas at 30 mts which could be attributed to the absence physical barriers that facilitate the dispersion of seeds in these areas, according to these results, it is recommended to implement conservation areas in situ and restrict the extraction of their wood so as not to affect the genetic status of *Astronium graveolens*.

Key words: fragmentation, genetic diversity, genetic structure fine, gene flow, *Astronium graveolens*.

## INTRODUCCIÓN

La fragmentación del hábitat, producto de la perturbación antropogénica es uno de los principales problemas que enfrentan los bosques tropicales secos ya que provoca la reducción del hábitat y disminución del tamaño poblacional (Bawa, 1974). Esta puede definirse como un proceso en el que una gran extensión de hábitat es transformada en parches pequeños, aislados unos de otros por una matriz de hábitat diferente a la original (Wilcove *et al.* 1986).

Los bosques tropicales secos representan 42% de la cobertura de bosque tropical y subtropical mundial y en México representan el 31%, siendo uno de los ecosistemas más amenazados a nivel mundial (Murphy and Lugo 1986), los árboles tropicales presentes en este ecosistema presentan características particulares que los hacen susceptibles a la fragmentación del hábitat puesto que ocurren en baja densidad, tienen tasas de crecimiento y regeneración lenta, presentan una capacidad fotosintética reducida, tienen periodos reproductivos adaptados a una marcada estacionalidad, son polinizados por animales y presentan tasas de exocruzamiento altas (Bawa, 1974, Murphy and Lugo, 1986, Janzen, 1988), adicionalmente la fragmentación podría también estar asociada al tipo de estrategia reproductiva que presenten tales como el monomorfismo (hermafroditas o monoicas) o el dimorfismo con individuos agrupados en dos formas diferentes principalmente como machos y hembras que incluye las especies dioicas (flores masculinas y femeninas en distintos individuos) (Lloyd, 1980). Adicionalmente algunas especies pueden enfrentar amenazas asociadas con alto valor económico generado por la explotación de su madera (Riba-Hernández *et al.*, 2014), se ha estimado que el 27% de árboles tropicales son dioicos y más del 75% de las hermafroditas son autoincompatibles es decir, presentan mecanismos que previenen la autopolinización, por lo que en ambos casos requieren de polinizadores para el movimiento del polen entre individuos (Bawa, 1974; Bullock, 1986; Ibarra-Manriquez and Oyama 1992).

La fragmentación del bosque puede también reducir los índices de diversidad genética, flujo genético, y aumentar los niveles de endogamia (Aguilar *et al.*, 2008) esto disminuye la capacidad de las especies para poder adaptarse a los cambios del ambiente, es decir, que cuanto más diversidad genética, la población tendrá más oportunidades de

sobrevivir a los constantes cambios que ocurren en la naturaleza (Piñero, 2008), en plantas la endogamia ocurre de dos maneras: a través de la autofecundación o por endogamia biparental, la autofecundación es el caso más extremo de endogamia y se previene en plantas por la autoincompatibilidad, por otra parte la endogamia biparental ocurre cuando las poblaciones son pequeñas lo que induce al exocruzamiento entre parientes evitando la dispersión de genes vía polen y semillas a largas distancias generando alta estructura genética espacial poblacional (Ellstrand and Elam, 1993). La fragmentación del hábitat reduce el tamaño e incrementa el aislamiento espacial de poblaciones de plantas reduciendo el índice de apareamientos al azar y aumentando los índices de endogamia (Charlesworth and Charlesworth, 1987), sin embargo algunos proyectos han concluido que la fragmentación no afecta los índices de endogamia (Rossetto *et al.*, 2004) mientras que otros han concluido que si puede generar efectos negativos (Aguilar *et al.*, 2008), la teoría de la paradoja de la fragmentación predice que esta puede generar pérdida de diversidad genética, por lo que una reducción en el tamaño poblacional puede incrementar la probabilidad de la extinción de la población por la interacción de factores genéticos y ecológicos (Young *et al.*, 1996), sin embargo, el soporte empírico es escaso por lo que algunas especies pueden mostrar características que las hace más resistentes a la fragmentación, por ejemplo los árboles de hábitat templado presentan características como alta abundancia y poca diversidad, por lo que presentan menor efecto negativo, mientras que especies tropicales que al presentar menor densidad pueden ser más susceptibles a la fragmentación (Kramer *et al.*, 2007), sin embargo algunos autores señalan que las poblaciones de árboles pueden ser menos vulnerables y más resistentes a la fragmentación que otras especies de plantas por su larga longevidad, alta diversidad genética dentro de las poblaciones o bien por un extensivo movimiento de polen (Hamrick, 2004), sin embargo en los árboles que son muy longevos es difícil determinar los efectos de la fragmentación ya que esta puede afectar después de largos periodos de tiempo, por otra parte las estimaciones indirectas tales como el cambio en la diversidad genética y flujo genético permiten realizar predicciones hacia el futuro de la situación en que se encontrarán las poblaciones de árboles tropicales (Hamilton, 1999). Las respuestas a preguntas ecológicas como ¿cuáles son los patrones de abundancia y dispersión bajo diferentes condiciones? ¿cuál es la estructura genética, diversidad, endogamia y parentesco? son importantes para especies amenazadas, además estas preguntas se pueden

responder mediante el uso de herramientas moleculares, por lo que en este trabajo se usaron marcadores moleculares microsátélites (SSR), el estudio se realizó dentro y a los alrededores de la reserva de la biosfera Chamela-Cuixmala (Figura 1) que comprende de 13,200 hectáreas de bosque seco y se encuentra localizada en la costa del Pacífico en el estado de Jalisco, México en las coordenadas 19° 30' N, 105° 03' W (Rosas *et al.*, 2011), la cual presenta una marcada estacionalidad con el 85% de precipitación de junio a octubre seguida por una prolongada sequía de noviembre a junio, la vegetación predominante es el bosque caducifolio que se encuentra en los lomeríos y presenta parches de bosque subcaducifolio (Bullock, 1986).



Figura 1. Reserva de la biosfera Chamela-Cuixmala (Obs. Personales).

Dentro del bosque seco se encuentran muchas especies de árboles amenazados un claro ejemplo es *Astronium graveolens* (Anacardiaceae) (Figura 2), especie dioica de hasta 30 m de altura que se distribuye desde México hasta Paraguay, presenta flores masculinas y femeninas actinomorfas sobre pedicelos agrupadas en panículas y frutos drupáceos con una sola semilla, se encuentra tanto en bosques secos como húmedos, en los últimos años sus poblaciones se han visto reducidas debido principalmente a la explotación de su madera ya que es de excelente calidad, además tiene un veteado atractivo, alta durabilidad natural y es moderadamente fácil de preservar y trabajar, características aptas para la fabricación de muebles, pisos, objetos torneados, mangos para herramientas y pulpa para papel (Pennington, and Sarukhán, 1968), por tal motivo es una especie enlistada en la categoría de amenazada en la NOM-059-SEMANART-2010.



Figura 2. Fotografías de las características morfológicas de *Astronium graveolens* (Anacardiaceae).

El objetivo general del presente estudio es conocer el estado ecológico y genético de *Astronium graveolens* en la reserva de la biosfera Chamela-Cuixmala, así como comparar sus poblaciones en zonas fragmentadas y continuas. Así mismo es de crucial importancia que para poder desarrollar estrategias de conservación se conozca la mayor parte de la biología de la especie, por ejemplo; para las especies amenazadas es importante el conocimiento de la abundancia y distribución ya que son componentes principales de la biología reproductiva de la especie, esto proporciona información de los requerimientos necesarios para el establecimiento en las diferentes clases de edades de los árboles tropicales (Fuchs *et al.*, 2013), las poblaciones pueden encontrarse en una zona ya sea agrupados o distribuidos al azar, esto dependerá del éxito de dispersión de semillas que tenga, la abundancia también juega un papel importante en la estrategia reproductiva de la especie ya que esto puede influir en la resiliencia de sus poblaciones aumentando o disminuyendo el éxito reproductivo. Para entender el impacto que genera la fragmentación es necesario también conocer la estructura genética espacial fina de la población, esto permitirá conocer si existen agrupamientos genéticos dentro de las poblaciones y a que distancias están presentes, por lo que ayuda a comprender los patrones de flujo genético vía polen y semillas, por tal motivo este proyecto se encuentra estructurado en 2 capítulos:

En el primer capítulo se determinó la distribución espacial, así como la abundancia y densidad de tres clases de tamaños (adultos, juveniles y plántulas) de *Astronium graveolens*, en la reserva de la Biosfera Chamela-Cuixmala y sus alrededores, teniendo dos poblaciones en bosque continuo y dos en bosque fragmentado, este análisis permitió conocer la abundancia de cada clase así como entender patrones de dispersión de las poblaciones con respecto al grado de perturbación en el que se encontraban. En el segundo capítulo se

determinó la estructura genética de *Astronium graveolens*, para dos zonas contrastantes, continua vs fragmentado, el análisis se realizó para las tres clases de tamaños localizadas dentro de las cuatro poblaciones mencionadas anteriormente, el objetivo de este tema fue determinar si existe o no una estructura genética tanto espacial y fina para cada clase, y además determinar si la fragmentación afecta en los índices de diversidad genética, endogamia, y relaciones de parentesco, esto permitió conocer los patrones de flujo de genes de la especie. Finalmente, los resultados obtenidos en este proyecto serán discutidos para tener un conocimiento actual tanto genético como ecológico de las poblaciones de *Astronium graveolens*.

## CAPÍTULO 1

### DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y ABUNDANCIA DE *Astronium graveolens* (ANACARDIACEAE)

#### INTRODUCCIÓN

La distribución espacial de los individuos es fundamental para entender la biología de las especies ya que constituye una información esencial para el desarrollo de estrategias de conservación y restauración especialmente para especies amenazadas (Fuchs *et al.*, 2013). Existen cinco factores que determinan la forma del patrón espacial de las especies: 1) Factores ambientales tales como los nutrientes o la disponibilidad de luz, 2) factores reproductivos incluyendo la dispersión del propágulo 3) factores interespecificos tales como la depredación y la competencia 4) factores intraespecificos como la competencia y la densidad y 5) variación estocástica en cualquiera de estos factores causales (Hutchinson, 1953). En el caso de los árboles tropicales algunos trabajos han demostrado que en su mayoría siguen una distribución agregada y además podrían presentar estas características de acuerdo a una combinación a el método de dispersión o bien por una variación de factores abióticos como la variación microclimática, o la intensidad de luz que penetra hacia el suelo provocado por la cobertura vegetal de los árboles (Hubbell and Foster, 1986; Condit *et al.*, 2000; Fuchs *et al.*, 2013). Por otra parte, la distribución espacial de los árboles tropicales puede estar determinada por su rareza, es decir que entre más raras sean, estas estarán más agrupadas (Condit *et al.*, 2000). Por ende, es de crucial importancia entender la distribución de especies de árboles tropicales amenazados por la fragmentación, dependiendo su clase de tamaño. Pocos trabajos se han enfocado en estudiar la distribución espacial de especies que reúnen características que pudieran hacerlos más susceptibles a la fragmentación (diocas, dispersión de semillas por gravedad, polinización por insectos y tala selectiva), como es el caso de *Astronium graveolens* que podría servir como especie modelo por lo que se implementará el uso de métodos estadísticos computacionales para entender su patrón de distribución. Por el contrario en relación al análisis de abundancia existen datos que han evaluado que la fragmentación afecta la densidad de los individuos de *Astronium graveolens*, López-Gómez en 2009 realizó un estudio en la reserva de la biosfera Chamela-

Cuixmala, mediante ocho parcelas de 50 m x 50 m en zonas contrastantes (continuas vs fragmentadas), el número de individuos en general se vio reducido a la mitad aproximadamente en zonas fragmentadas, además encuentra una relación negativa dentro de las cuatro clases de vida (plántulas, juveniles, brinzales y adultos), es decir que conforme aumenta la talla de los individuos estos se hacen menos frecuentes. Por otro lado la mortalidad de plántulas fue significativamente mayor en fragmentos de bosque lo que podría afectar el reclutamiento de individuos, la única categoría que mantiene las poblaciones de *Astronium graveolens* en sitio fragmentado son los brinzales ya que para estos la mortalidad fue de cero por lo que sugiere que existe un crecimiento poblacional estable durante los próximos 50 años siempre y cuando las condiciones también permanecieran estables, además la densidad y la distribución espacial de los individuos puede estar también influenciada tanto por factores abióticos como la temperatura, humedad, riqueza de nutrientes, y la disponibilidad de luz que en conjunto reúnen características óptimas para el establecimiento de las plántulas, para el caso de *Astronium graveolens* Aguilar en 2011 y Rivera en 2011 han encontrado que las semillas provenientes de zonas fragmentadas presentan efectos negativos sobre el vigor y la germinación de las progenies respectivamente lo cual se vio reflejado al encontrar menor altura, DAP y menor número de hojas para individuos en zonas fragmentadas. En los árboles diocos la fragmentación puede generar consecuencias negativas, debido a que de manera natural la expresión sexual en estas plantas se reduce a la mitad y la proporción sexual puede estar sesgada hacia un sexo en particular, modificando su abundancia y distribución espacial (Field *et al.*,2013).

## OBJETIVO GENERAL

1. Evaluar el efecto de la fragmentación en la distribución espacial y abundancia de *Astronium graveolens* (Anacardiaceae) en el bosque tropical seco.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Comparar la densidad y abundancia de tres clases de tamaños de *Astronium graveolens* en sitios fragmentados vs continuos.
2. Comparar los patrones de distribución espacial de tres clases de tamaños de *Astronium graveolens* en sitios fragmentados vs continuos.

## HIPÓTESIS PARTICULARES

- Existe evidencia que la densidad y abundancia se puede ver afectada por la fragmentación, por lo tanto, se espera que exista menor abundancia y densidad en fragmentos de bosque que en bosque continuo.
- La fragmentación evita dispersión de semillas a largas distancias, por lo que se espera que *Astronium graveolens* presente una distribución agregada en fragmentos de bosque y por lo contrario esta será aleatoria en bosque continuo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### SITIO DE ESTUDIO

Este estudio fue realizado en la reserva de la biosfera Chamela-Cuixmala, 19° 30' N, 105° 03' (Figura 3) se caracteriza por presentar una marcada estacionalidad, la temporada seca de noviembre a mayo y la temporada lluviosa de julio a octubre con un promedio de precipitación de 750 mm anual, presenta el tipo de vegetación de bosque tropical caducifolio, y está compuesto por dos tipos de hábitats; bosque seco y vegetación rraparía localizada esta última en las riberas de los ríos, además de tener arroyos temporales (Bullock, 1986), es importante mencionar que el bosque tropical caducifolio como es el caso de Chamela ha sido catalogado como el bosque tropical más amenazado del planeta (Janzen, 1998). Estudios indican que los bosques secos son zonas preferidas para implementar agricultura y asentamientos humanos por lo que existe altas tasas de degradación mayor que en los bosques húmedos (Murphy and Lugo, 1986).

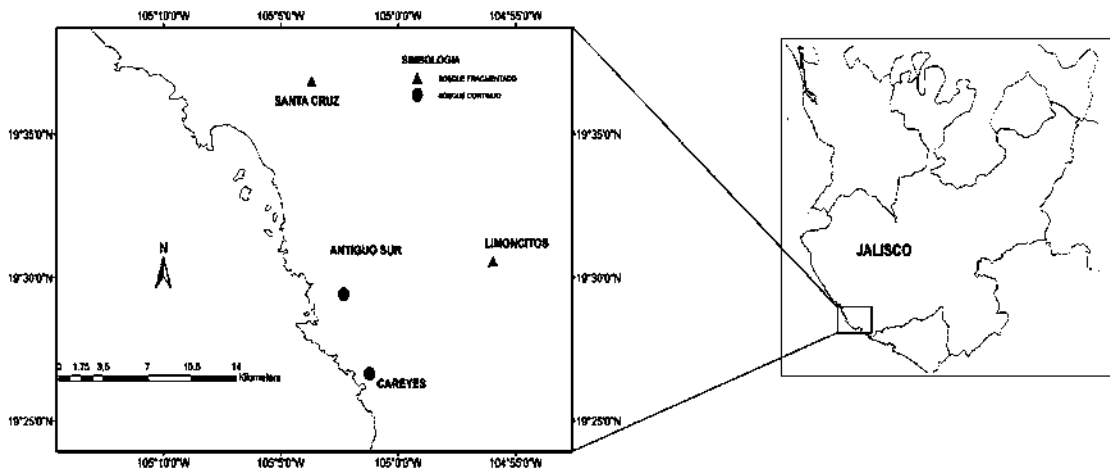


Figura 3. Distribución geográfica de las cuatro poblaciones de estudio. A) Antiquo sur, b) Careyes, c) Santa Cruz, d) Limoncitos.

## ESPECIE DE ESTUDIO

*Astronium graveolens* (Anacardiaceae). Especie dioica que se distribuye desde México hasta Paraguay, es conocida por varios nombres comunes (palo de culebro, ron ron, ciruelillo, amargoso, jobillo, jocotillo). En México se distribuye sobre la vertiente del Golfo, y el Pacífico tropical, se encuentra tanto en bosques secos como húmedos, su hábitat se refina a riveras de ríos y arroyos donde forma vecindarios de conoespecíficos y se asocia principalmente con *Brosimum alicastrum* (Moraceae). Es un árbol de hasta 30 m de altura, con fuste derecho, ramas ascendentes, copa redondeada y densa. Sus hojas son alternas, imparipinnadas, de 20 a 35 cm de largo incluyendo el pecíolo. Tiene de 5 a 7 pares de folíolos de 4 a 7 cm de largo opuestos en el raquis. Pierde la mayoría de sus hojas al florecer en la época seca, de marzo a mayo. Desarrolla inflorescencias ramificadas con flores pequeñas actinomorfas sobre pedicelos agrupadas en panículas axilares de hasta 25 cm de largo. Las flores masculinas presentan 5-7 estambres, y las femeninas también presentan estambres, pero sin polen, ovario súpero, unilocular, uniovular. Los frutos son nuececillas drupáceas de 12-13 mm de largo con una sola semilla, que madura de abril a junio. La dispersión de las semillas es por viento y es polinizada por pequeños insectos principalmente abejas del género *Plebeia*. Sus poblaciones se han visto reducidas en los últimos años debido principalmente a la explotación de sus poblaciones ya que la madera de esta especie es de excelente calidad, además tiene un veteado atractivo, alta durabilidad natural y es moderadamente fácil de preservar y trabajar, en la fabricación de muebles, pisos, objetos torneados, mangos para herramientas y pulpa para papel (Pennington, and Sarukhán, 1968). Por tal motivo es una especie enlistada con la categoría de amenazada en la NOM-059-SEMANART-2010.

## SELECCIÓN DE SITIOS

Cuatro poblaciones de *Astronium graveolens* fueron evaluadas en este estudio. Para la selección consideramos poblaciones fragmentadas a zonas que han experimentado alguna actividad antropogénica, ya sea agricultura, ganadería o asentamientos humanos (Santa Cruz, Limoncitos) y se consideraron poblaciones continuas a las zonas que estuviesen rodeados por una matriz de bosque maduro, siendo estas las poblaciones Careyes y Antiguo

sur (Figura 4). Para el análisis de distribución espacial, densidad (número de individuos por unidad de área/ha) y abundancia se seleccionaron dos ríos en zonas continuas y dos en fragmentos de bosque, posteriormente se recorrieron río arriba y río abajo en una distancia de 2 km para determinar correctamente el inicio y final de cada vecindario, una vez delimitado longitudinalmente se delimitó transversalmente a una distancia de 100 mts de lado izquierdo y 100 mts hacia el lado derecho y posteriormente se ubicaron todos los individuos dentro de esta área y fueron georeferenciados por medio de un plano cartesiano con ayuda del software Autocad V. 2016 para evitar errores en el posicionamiento geográfico por medio de coordenadas UTM, además se tomó el DAP y el diámetro basal, así como la altura de cada uno, una vez obtenidos todos los datos se realizó una clasificación de las clases de tamaños en el software (JMP V. 6) basada en la distribución de las frecuencias con respecto a la altura y diámetro de cada individuo, al final se obtuvo tres clases de tamaños, plántulas (2 cm a 100 cm), juveniles (101 cm a 5 m) y adultos (5m-25 m).

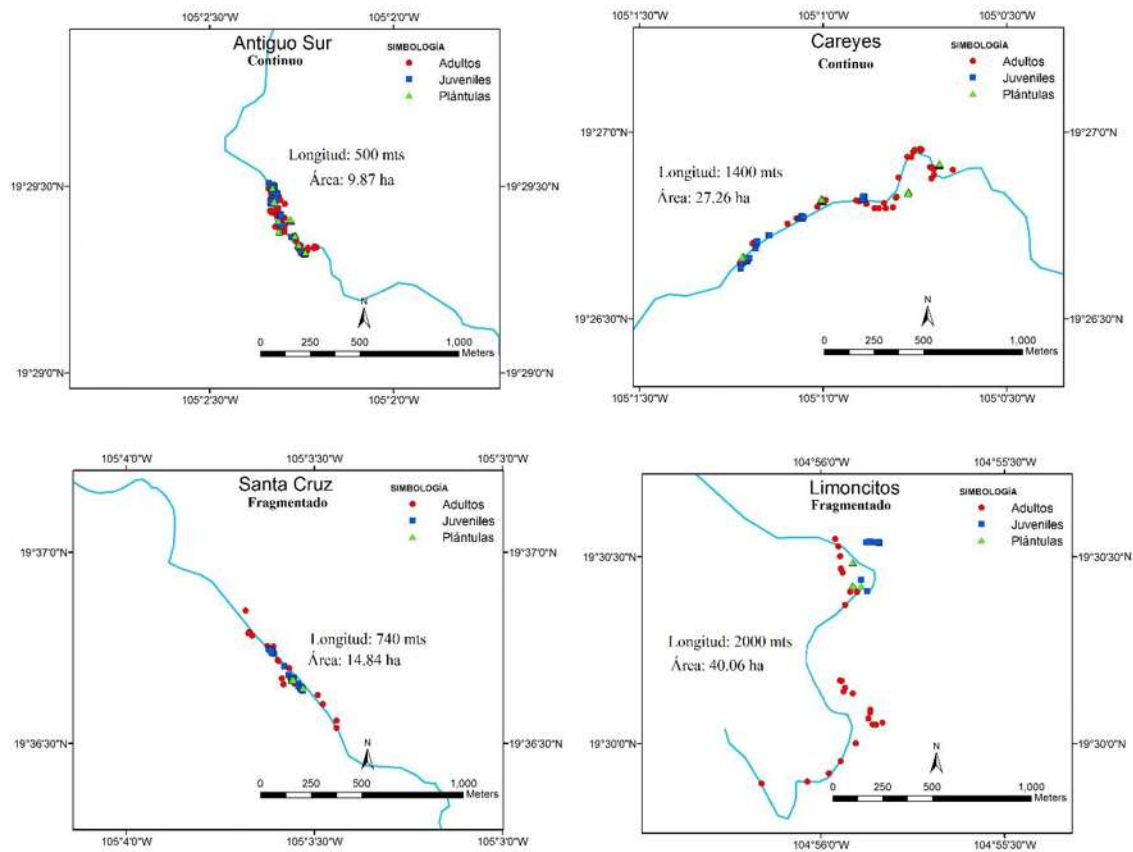


Figura 4. Distribución geográfica de las clases de tamaño dentro de cada población.

## ANÁLISIS DE DATOS

Los patrones espaciales para cada clase fueron estimados usando la función K de Ripley (Ripley, 1977) con el paquete estadístico Spatstat implementado en el software R (R Development Core Team, 2015) este método permite probar la hipótesis en espera de patrones espaciales completamente al azar, la función es definida como:

$$K(h) = \frac{1}{\lambda} E(Nh) \text{ Donde;}$$

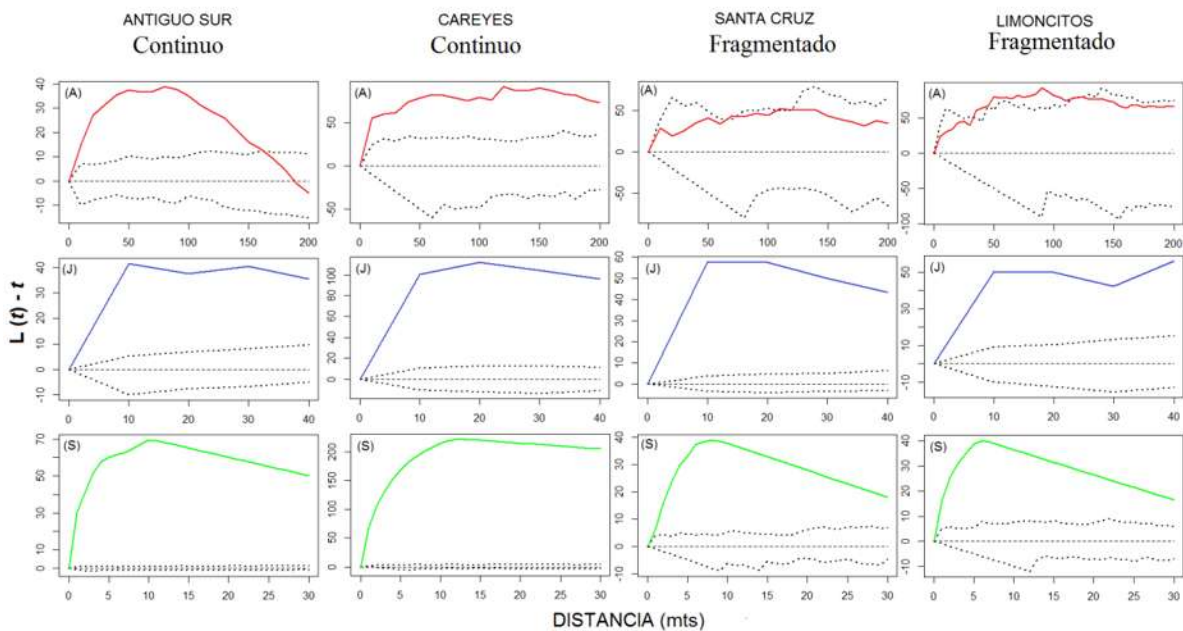
$Nh$ : Es el número de eventos dentro de una distancia  $h$  de un evento elegido al azar.

$\lambda$ : es la intensidad de número de unidades por área de cada evento basado en una distribución de Poisson,

Esta función combina la medida de distancia con el conteo del cuadrante y contiene información de la distancia de los vecindarios y por lo tanto proporciona un análisis más eficaz, el radio establecido para cada evento fue de 5 m. La representación gráfica de la función K de Ripley es representada por  $K_{obs}(r)$ , si esta no se desvía de cero existe distribución completa al azar, si  $K_{obs}(r) > 0$  existe una distribución agregada, y si  $K_{obs}(r) < 0$  se sugiere una distribución regular,  $K_{theo}(r)$  es la distribución a la cual existe una distribución aleatoria, y  $K_{hi}(r)$  y  $K_{lo}(r)$  son los límites a la cual los puntos podrían estar distribuidos al azar mínimo y máximo respectivamente, en la práctica se utiliza el estimador  $L(t) = t$  que permite tener una mejor interpretación de los resultados. Para conocer la densidad y abundancia espacial de cada clase (plántulas, juveniles, adultos) se realizó un censo general por cada población que fue representado por medio de un histograma.

## RESULTADOS

De las cuatro poblaciones muestreadas se obtuvo un total de 990 individuos, de los cuales 142 corresponden a los adultos, 227 juveniles y 621 plántulas. El resultado de la función K de Ripley indica que dentro de las cuatro poblaciones, los adultos están más agregados en zonas continuas que fragmentadas, para juveniles y las plántulas no existe diferencia entre condiciones ya que ambos muestran alto agregamiento lo que indica que *Astronium graveolens* presenta una distribución muy discreta formando pequeños vecindarios a través de las poblaciones (Figura 5), los vecindarios varían en tamaño dependiendo de la clase, los adultos pueden llegar a formar vecindarios de 50 hasta 200 metros de radio, para el caso de los juveniles llegan a formar vecindarios de 10 hasta 30 mts de radio, mientras que las plántulas llegan a formar vecindarios de 6 hasta 10 mts de radio los cuales se pueden delimitar fácilmente en campo.



Los resultados de abundancia muestran la presencia de una estructura en las poblaciones continuas donde la frecuencia de individuos disminuye conforme aumenta el tamaño, Antiguo Sur (plántulas: 310, juveniles:61 y adultos:61) y Careyes (plántulas:253, juveniles:60 y adultos:37) sin embargo no ocurre lo mismo para las poblaciones fragmentadas donde no se observa una estructura de abundancia, Santa Cruz (plántulas: 31, juveniles:80 y adultos:19) y Limoncitos (plántulas:27, juveniles:26 y adultos:25 (Figura 6).

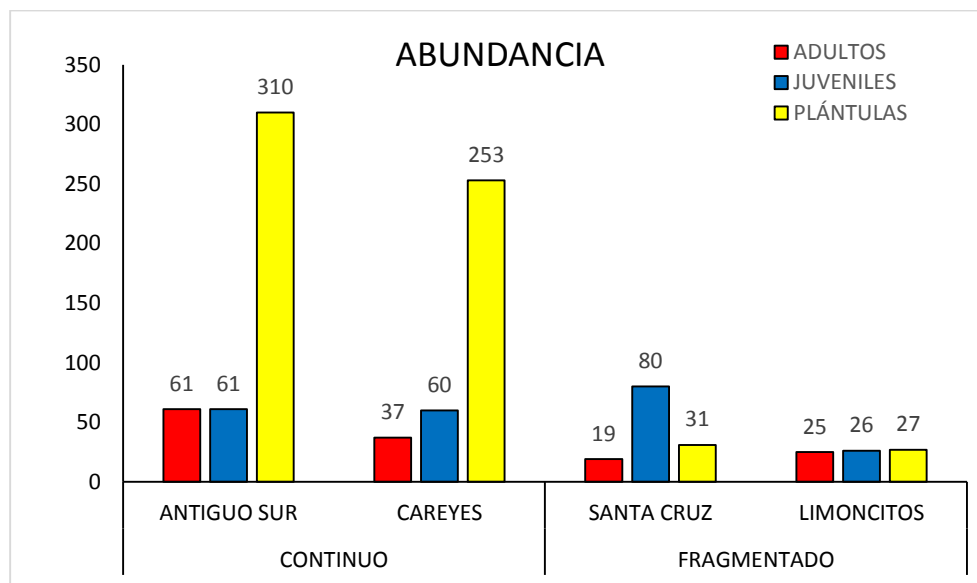


Figura 6. Histograma de frecuencias basado en la abundancia de cada clase, en las poblaciones continuas y fragmentadas.

Muy similar a lo obtenido en los resultados de abundancia parece ser el caso de la densidad (Figura 7), las poblaciones en zonas continuas parecen nuevamente mostrar una estructura de clases, para Antiguo Sur existen más plántulas por hectárea 31.39, seguidos de juveniles 6.17 ind/ha y finalmente de adultos 6.17 ind/ha, para Careyes existen más plántulas por hectárea 9.27, seguidos de juveniles 2.2 ind/ha y finalmente de adultos 1.35 ind/ha, sin embargo para las poblaciones fragmentadas el patrón es distinto debido a la baja abundancia, para el caso de Santa Cruz se puede observar la baja cantidad de individuos adultos:1.28 ind/ha y plántulas: 2.08 por hectárea, siendo los juveniles los que se encuentran

en mayor densidad 5.38 ind/ha y para el caso de Limoncitos la densidad es muy baja para todas las clases por lo que no existe ni un individuo por hectárea, adultos: 0.62 ind/ha, juveniles:0.64 ind/ha, plántulas:0.67 ind/ha.

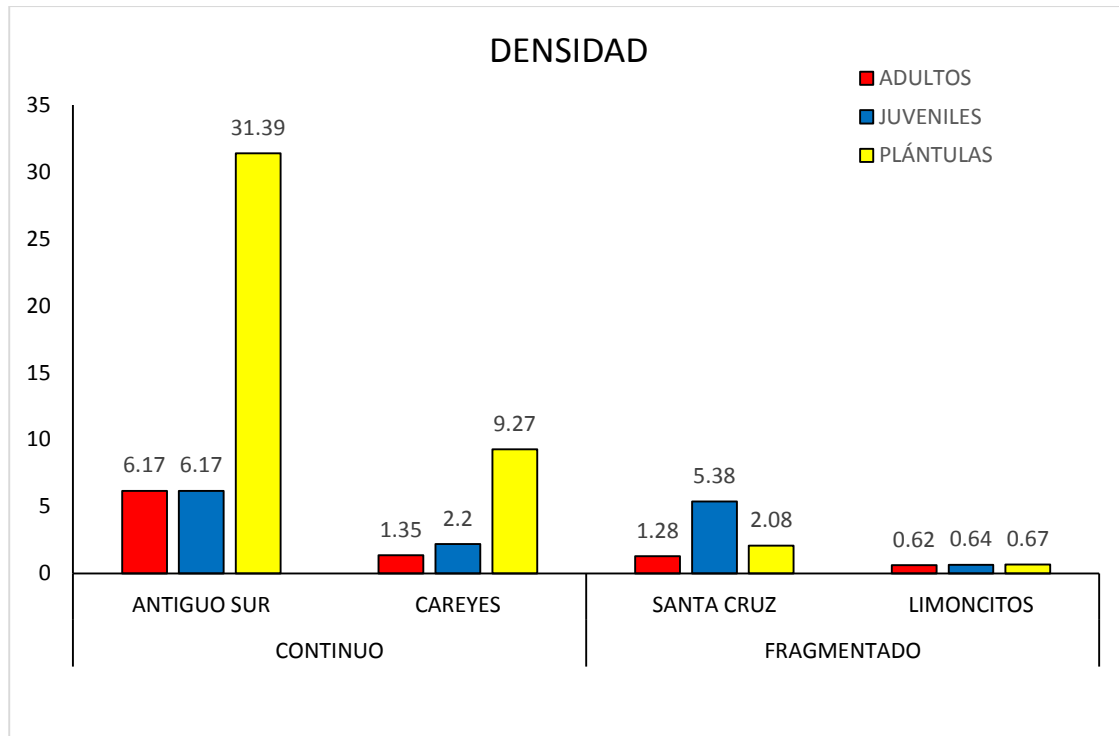


Figura 7. Histograma de frecuencias basadas en la densidad (número de individuos por hectárea) para cada clase, en las poblaciones continuas y fragmentadas.

## DISCUSIÓN

Anteriormente se ha estudiado la distribución de árboles tropicales y se ha determinado que estos presentan una distribución agregada a varias escalas (Fangliang *et al.*, 1997; Condit *et al.*, 2002; Hardy and Sonké, 2004; Li *et al.*, 2009). Las poblaciones de *Astronium graveolens* presentaron una distribución muy discreta, que permite fácilmente delimitar un vecindario de otro, así mismo dentro de estos existe una fuerte estructura poblacional formando pequeños vecindarios de tres diferentes clases (plántulas, juveniles y adultos), los resultados de distribución espacial determinaron que las tres clases de vida están agregados y este agregamiento es mayor conforme disminuye la talla de los individuos, es decir; las plántulas están más agregadas que los juveniles y estos a su vez

están más agregados que los adultos (Figura 4). El patrón de distribución espacial de *Astronium graveolens* puede variar dependiendo de la condición así como la abundancia y densidad de cada clase para diferentes condiciones por ejemplo existen más plántulas y juveniles en sitios continuos que en fragmentos, esto podría estar relacionado con la poca intensidad de luz que logra penetrar en las zonas continuas contrario a lo que ocurre en zonas fragmentadas, la luz podría ser un factor en el establecimiento de los individuos, por ejemplo al parecer las plántulas están establecidas en zonas donde no logra penetrar la luz que es bloqueada por el dosel del bosque y estas pueden estar sin variar en diámetro y altura por un largo plazo de tiempo, mientras que los juveniles están establecidos en zonas donde existen claros y logra penetrar la luz (Observaciones personales) esto nos permite asumir que probablemente las plántulas permanecen latentes en espera de luz, e inmediatamente cuando esta se encuentra disponible se desarrollan pasando a formar parte de la clase de juveniles, algo similar se ha encontrado con otras especies de árboles tropicales, por ejemplo en un estudio realizado por Fuchs *et al.*, 2013 con la especie amenazada *Guaiacum sanctum* encontró un alto índice de agregamiento para tres diferentes clases (semillas, plántulas y juveniles) pero lo más relevante es que los juveniles siempre están más presentes en zonas con mayor incidencia de luz, similar a lo que ocurre con *Astronium graveolens* lo que puede indicar que la disponibilidad de luz y la estructura de la cobertura vegetal son factores importantes que moldean la distribución espacial de la especie en estudio.

Así mismo los cambios demográficos de árboles tropicales pueden llegar a moldear la distribución espacial actual de estas dependiendo en cómo se dé la mortalidad de cada clase es decir si esta se da al azar o se presenta de una manera agregada para cada clase, por ejemplo Sterner *et al.*, 1986 ha calculado la distribución espacial después de la mortandad para dos clases de vida (adultos y juveniles) para cuatro especies de árboles tropicales, los resultados indican que después de la mortandad los adultos presentan una distribución más uniforme mientras que los juveniles presentan una distribución agregada. La fragmentación del bosque tropical seco generado por la tala selectiva puede llegar a moldear la dinámica espacial de *Astronium graveolens* lo que podría indicar que la eliminación de árboles adultos para la extracción de madera en zonas fragmentadas ha moldeado hacia una distribución al azar contrario a lo que ocurre en zonas continuas, así mismo los juveniles y plántulas muestran un patrón similar, en zonas continuas parecen estar más agregados que en zonas

fragmentadas. Existe una generalización de que los árboles tropicales adultos existen en baja densidad y se encuentran más espaciados lo que puede causar consecuencias para la biología reproductiva, estructura de la población y la evolución de las especies de árboles tropicales (Ashton, 1969), o en ocasiones se ha notado que los análisis de distribución espacial pueden variar dependiendo del diámetro, por ejemplo Ng *et al.*, 2004, Ng *et al.*, 2006 encontraron que las especies con diámetro medio o pequeño tienden a estar agrupados, mientras que individuos con diámetros grandes presentan una distribución al azar sin embargo en algunos estudios se ha determinado que no siempre ocurre lo mismo, (Hubbell, 1979) encontró que esta no es una generalización y que las especies tropicales están agrupadas independientemente del diámetro y las especies más raras están aún más agrupadas que las especies comunes, adicionalmente se ha encontrado que el sistema reproductivo de las especies no tiene una relación en la abundancia pero si con el modo de dispersión de las semillas (Plotkin *et al.*, 2002), esto ocurre cuando después de la dispersión existe mortalidad debido a la competencia intra e interespecificas, heterogeneidad ambiental asociado a la distribución de nutrientes en el suelo (John *et al.*, 2007 ), herbívora y enfermedades en plantas (Janzen, 1970; Connell, 1971), que pueden afectar los patrones de distribución espacial. Algunos resultados obtenidos por Seidler and Plotkin en 2006 han evidenciado la gran importancia del tipo de dispersión en el establecimiento a largo plazo de la estructura del bosque tropical, en el caso de una especie dioica como *Astronium graveolens* que presenta una dispersión de semillas por viento, sin embargo debido a la posición geográfica en las que siempre se encuentran sus poblaciones (laderas al bordo de ríos) las semillas pueden llegar a presentar dispersión secundaria por agua, además se ha determinado que algunas aves como el loro corona lila *Amazona finschi* puede llegar a jugar un papel muy importante como pre dispersor de semillas, ya que han llegado a funcionar como su dieta principal al presentar un traslape en la temporada de fructificación con la crianza de polluelos llegando a depredar hasta un 43% de las semillas de *Astronium graveolens* (Villaseñor-Sánchez *et al.*, 2010) así mismo algunos roedores como *Lyomis pictus* (Briones-Salas *et al.*, 2006), pueden fácilmente transportar semillas que se encuentran en el suelo de un sitio a otro a grandes distancias, estos medios de dispersión pueden haber moldeado los patrones de densidad y abundancia actuales de la especie, adicionalmente los resultados de abundancia y densidad del presente estudio muestran una fuerte desproporcionalidad en la

ocurrencia de las diferentes clases en las diferentes condiciones, para el caso de las poblaciones fragmentadas existen pocos individuos adultos y juveniles, mientras que las plántulas están casi ausentes, para el caso de las poblaciones en sitios continuos se mantiene un patrón similar para el caso de los adultos, es decir el número es bajo sin embargo los juveniles parecen ser más abundantes, y aún más las plántulas son las que se encuentran en mayor número (Figura 5,6), la fragmentación del bosque puede reducir la densidad de individuos (Benitez-Malvido, 1998), los resultados para sitios continuos como se ha mencionado anteriormente presentaron una alta proporción de plántulas y juveniles lo que podrían indicar ocurrencia de eventos reproductivos masivos haciéndonos pensar en una expansión poblacional, mientras que para sitios fragmentados no puede estar ocurriendo, probablemente causado por varios factores, a) Tala selectiva, lo que puede llegar a eliminar árboles femeninos y como consecuencias disminuir la presencia de plántulas, b) Ausencia de polinizadores; al no existir medios que permitan el transporte del polen disminuye la fecundación y por ende la producción de frutos c) Ausencia de dispersores bióticos de semillas; en ausencia de estos las semillas no pueden dispersarse por largas distancias, generando parches de individuos que compiten por el recurso lo que conlleva al deceso de muchas plántulas, d) Disponibilidad de nutrientes en el suelo, la distribución de nutrientes en el suelo no es homogéneo por lo que pueden existir parches donde las plántulas germinan pero en ausencia de los nutrientes requeridos estas son eliminadas, e) Aborto de frutos por falta de recursos de los árboles adultos lo que conlleva a la no viabilidad de las semillas para germinar, el éxito de las poblaciones de *Astronium graveolens* está muy relacionado con el éxito que tengan las plántulas para establecerse ya que de esto dependerá la cantidad de individuos que serán reclutados para posteriormente establecerse en las poblaciones.

Los resultados de distribución espacial de *Astronium graveolens* mostraron un patrón de agregamiento para las tres clases y presenta una estructura poblacional en poblaciones continuas lo que podría indicar que existe una estrategia reproductiva hacia una expansión poblacional, mientras que en poblaciones fragmentadas se nota la ausencia de una estructura poblacional, esto provocado principalmente por la alteración de procesos biológicos generados por la perturbación antropogénica, lo que parece indicar que en estos sitios se ve afectado el potencial regenerativo de sus poblaciones.

## CONCLUSIÓN

Se ha estudiado el efecto de la fragmentación en los patrones de distribución, abundancia y densidad de la especie amenazada *Astronium graveolens* los resultados indican que las poblaciones se encuentran agrupadas para las tres clases (adultos, juveniles y plántulas), el agregamiento es mayor entre menor sea la talla de los individuos sin embargo los adultos en zonas fragmentadas no muestran un patrón de agregamiento, así mismo los índices de densidad y abundancia se ven severamente afectados por la fragmentación, lo que podría llevar a la extinción de poblaciones locales siendo este un tema importante a tratar por lo que es urgente implementar áreas de conservación in situ y restringir la extracción de árboles para la comercialización de su madera en estas poblaciones.

## BIBLIOGRAFÍA

- AGUILAR, M. 2011. Tesis de licenciatura. Efecto de la fragmentación del hábitat sobre el establecimiento temprano de *Astronium graveolens* y *Brosimum alicastrum*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- AGUILAR, R., ASHWORTH, L., GALETTO, L., & AIZEN, M. A. (2006). Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology letters*, 9(8), 968-980.
- AGUILAR, R., QUESADA, M., ASHWORTH, L., HERRERIAS-DIEGO, Y., & LOBO, J. (2008). Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Molecular Ecology*, 17(24), 5177-5188.
- ASHTON, P. S. (1969). Speciation among tropical forest trees: some deductions in the light of recent evidence. *Biological Journal of the Linnean Society*, 1(1-2), 155-196.
- BAWA, K. S. (1974). Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. *Evolution*, 85-92.
- BENITEZ-MALVIDO, J. (1998). Impact of forest fragmentation on seedling abundance in a tropical rain forest. *Conservation Biology*, 12(2), 380-389.
- BRIONES-SALAS, M., SÁNCHEZ-CORDERO, V., & SANCHEZ-ROJAS, G. (2006). Multi-species fruit and seed removal in a tropical deciduous forest in Mexico. *Botany*, 84(3), 433-442.
- BULLOCK, S. H. (1986). Climate of Chamela, Jalisco, and trends in the south coastal region of Mexico. *Archives for Meteorology, Geophysics, and Bioclimatology, Series B*, 36(3-4), 297-316.
- CHARLESWORTH, D., & CHARLESWORTH, B. (1987). Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual review of ecology and systematics*, 237-268.
- CONDIT, R., ASHTON, P. S., BAKER, P., BUNYAVEJCHEWIN, S., GUNATILLEKE, S., GUNATILLEKE, N., & LEE, H. S. (2000). Spatial patterns in the distribution of tropical tree species. *Science*, 288(5470), 1414-1418.
- CONNELL, J. H. (1971). On the role of natural enemies in preventing competitive exclusion in some marine animals and in rain forest trees. *Dynamics of populations*, 298, 312.
- ELLSTRAND, N. C., & ELAM, D. R. (1993). Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual review of Ecology and Systematics*, 217-242.

- FANGLIANG, H., LEGENDRE, P., & LAFRANKIE, J. V. (1997). Distribution patterns of tree species in a Malaysian tropical rain forest. *Journal of Vegetation Science*, 8(1), 105-114.
- FIELD, D. L., PICKUP, M., & BARRETT, S. C. (2013). comparative analyses of sex-ratio variation in dioecious flowering plants. *Evolution*, 67(3), 661-672.
- FUCHS, E. J., ROBLES, T., & HAMRICK, J. L. (2013). Spatial distribution of (Zygophyllaceae) seedlings and saplings relative to canopy cover in Palo Verde National Park, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 61(3), 1521-1533.
- HAMILTON, M. B. (1999). Tropical tree gene flow and seed dispersal. *Nature*, 401(6749), 129-130.
- HAMRICK, J. L. (2004). Response of forest trees to global environmental changes. *Forest ecology and management*, 197(1), 323-335.
- HARDY, O. J., & SONKÉ, B. (2004). Spatial pattern analysis of tree species distribution in a tropical rain forest of Cameroon: assessing the role of limited dispersal and niche differentiation. *Forest ecology and management*, 197(1), 191-202.
- HUBBELL, S. P. (1979). Tree dispersion, abundance, and diversity in a tropical dry forest. *Science*, 203(4387), 1299-1309.
- HUBBELL, S. P., & FOSTER, R. B. (1986). Commonness and rarity in a neotropical forest: implications for tropical tree conservation. In M. E. Soul (Ed.), *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, pages 205–231.
- HUTCHINSON, G. E. (1953). The concept of pattern in ecology. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 105, 1-12.
- IBARRA-MANRIQUEZ, G., AND K. OYAMA, 1992. Ecological Correlates of Reproductive Traits of Mexican Rain Forest Trees. *Am. J. Bot.* 79: 383–394.
- JANZEN, D. H. (1970). Herbivores and the number of tree species in tropical forests. *American naturalist*, 501-528.
- JANZEN, D. H. 1988. Tropical dry forest: The most endangered major tropical ecosystem. Pages 130-137 in E. O. Wilson editor. *Biodiversity*. National Academy Press, Washington D. C.
- JOHN, R., DALLING, J. W., HARMS, K. E., YAVITT, J. B., STALLARD, R. F., MIRABELLO, M., & FOSTER, R. B. (2007). Soil nutrients influence spatial distributions of tropical tree species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(3), 864-869.

- KRAMER, A. T., ISON, J. L., ASHLEY, M. V., & HOWE, H. F. (2008). The paradox of forest fragmentation genetics. *Conservation Biology*, 22(4), 878-885.
- LI, L., HUANG, Z., YE, W., CAO, H., WEI, S., WANG, Z., & HE, F. (2009). Spatial distributions of tree species in a subtropical forest of China. *Oikos*, 118(4), 495-502.
- LLOYD, D. G. (1980). Sexual strategies in plants III. A quantitative method for describing the gender of plants. *New Zealand journal of botany*, 18(1), 103-108.
- LÓPEZ-GÓMEZ, J. 2009. Tesis de licenciatura: Efecto de la fragmentación de hábitat en la estructura demográfica de *Astronium graveolens*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- MURPHY, P. G., & LUGO, A. E. (1986). Ecology of tropical dry forest. *Annual review of ecology and systematics*, 67-88.
- NG, K. K. S., LEE, S. L., SAW, L. G., PLOTKIN, J. B., & KOH, C. L. (2006). Spatial structure and genetic diversity of three tropical tree species with different habitat preferences within a natural forest. *Tree Genetics & Genomes*, 2(3), 121-131.
- NG, K. K., LEE, S. L., & KOH, C. L. (2004). Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. *Molecular Ecology*, 13(3), 657-669.
- PENNINGTON, T. D., & SARUKHÁN, J. (2005). *Árboles tropicales de México: manual para la identificación de las principales especies*. UNAM.
- PIÑERO, D., CABALLERO-MELLADO, J., & CABRERA-TOLEDO, D. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. *Capital natural de México*, 1, 437-494.
- PLOTKIN, J. B., CHAVE, J., & ASHTON, P. S. (2002). Cluster analysis of spatial patterns in Malaysian tree species. *The American Naturalist*, 160(5), 629-644.
- R CORE TEAM (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- RIPLEY, B. D. (1977). Modelling spatial patterns. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 172-212.
- RIBA-HERNÁNDEZ, P., SEGURA, J. L., FUCHS, E. J., & MOREIRA, J. (2014). Population and genetic structure of two dioecious timber species *Virola surinamensis* and *Virola koschnyi* (Myristicaceae) in southwestern Costa Rica. *Forest Ecology and Management*, 323, 168-176.

- RIVERA, E. 2011. Tesis de licenciatura: Efecto de la fragmentación sobre el vigor temprano de la progenie de *Astronium graveolens*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- ROBINSON, G. R., HOLT, R. D., GAINES, M. S., HAMBURG, S. P., JOHNSON, M. L., FITCH, H. S., & MARTINKO, E. A. (1992). Diverse and contrasting effects of habitat fragmentation. *Science (Washington)*, 257(5069), 524-526.
- ROSAS, F., QUESADA, M., LOBO, J. A., & SORK, V. L. (2011). Effects of habitat fragmentation on pollen flow and genetic diversity of the endangered tropical tree *Swietenia humilis* (Meliaceae). *Biological Conservation*, 144(12), 3082-3088.
- ROSSETTO, M., JONES, R., & HUNTER, J. (2004). Genetic effects of rainforest fragmentation in an early successional tree (*Elaeocarpus grandis*). *Heredity*, 93(6), 610-618.
- SEIDLER, T. G., & PLOTKIN, J. B. (2006). Seed dispersal and spatial pattern in tropical trees. *PLoS Biol*, 4(11), e344.
- STERNER, R. W., RIBIC, C. A., & SCHATZ, G. E. (1986). Testing for life historical changes in spatial patterns of four tropical tree species. *The Journal of Ecology*, 621-633.
- VILLASENOR-SÁNCHEZ, E. I., DIRZO, R., & RENTON, K. (2010). Importance of the lilac-crowned parrot in pre-dispersal seed predation of *Astronium graveolens* in a Mexican tropical dry forest. *Journal of Tropical Ecology*, 26(2), 227.
- WILCOVE, D. S., MCLELLAN, C. H., & DOBSON, A. P. (1986). Habitat fragmentation in the temperate zone. *Conservation biology*, 6, 237-256.
- YOUNG, A., BOYLE, T., & BROWN, T. (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(10), 413-418.

## CAPÍTULO 2

### DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA ESPACIAL FINA DE *Astronium graveolens* (ANACARDIACEAE)

#### INTRODUCCIÓN

El conocimiento de los niveles y distribución de la diversidad genética, endogamia, así como el grado de parentesco en poblaciones naturales de plantas es un requisito previo importante para diseñar estrategias de manejo y conservación (Hamrick *et al.*, 1991), a pequeñas escalas, la estructura genética espacial está muy relacionada con el sistema de reproducción de la especie, siendo el apareamiento entre individuos más próximos lo que conlleva al limitado flujo génico (polen y semillas) y puede generar una estructura genética a escala fina, así mismo la distribución agregada de los genotipos en las poblaciones es una parte integral de las mismas, e interactúa con la heterogeneidad microambiental que favorece distintos genotipos en áreas diferentes (Epperson and Allard, 1989). En el desarrollo de estrategias de conservación el conocimiento de la estructura genética espacial es de crucial importancia ya que permite planificar estrategias de muestreo, definir poblaciones y el tamaño del área a conservar, realizar inferencias sobre procesos genéticos de interés en la conservación como la migración, dispersión, deriva, mutación, endogamia, así como inferir las contribuciones relativas de polen y semillas al flujo genético (Epperson, 1993). Sin embargo las poblaciones de plantas que presenten alta estructura genética serán más vulnerables a la pérdida de diversidad genética debido a los procesos estocásticos y al pequeño tamaño poblacional por lo que el flujo genético vía semillas y polen incrementa el tamaño poblacional y mantiene altos índices de diversidad genética dentro de las poblaciones (Wright, 1946), por el contrario si la dispersión de semillas es limitado esto podría generar parches de individuos relacionados genéticamente presentando una alta estructura genética fina lo que conlleva a una pérdida de diversidad genética a través de la deriva génica (Epperson, 2000), especies de plantas con un predominante sistema de autopolinización o dispersión de semillas por gravedad, usualmente se espera que presenten gran diferenciación genética entre sus poblaciones por la baja restricción de flujo genético. Además, existen otros atributos reproductivos de las plantas que influyen potencialmente

el flujo genético como la fenología floral. Por ejemplo Domínguez *et al.*, 2005 realizaron un trabajo con la planta tropical *Erythroxylum havanense*, encontrando altos niveles de variación genética dentro de las poblaciones y alta diferenciación entre estas así como la presencia de una estructura genética espacial a cortas distancias que atribuyeron al comportamiento de forrajeo de los polinizadores y frugívoros generado por la gran masa de floración, contrario a lo que puede ocurrir con bajas densidades de floración donde el flujo génico es mayor debido a que los polinizadores forrajean menos tiempo y se desplazan a mayores distancias. Una manera de investigar la estructura genética espacial fina consiste en realizar una comparación entre diferentes clases de vida (Kalisz *et al.*, 2001) sin embargo, poco conocimiento se tiene de este campo y algunos estudios indican que la estructura genética puede aumentar (Kalisz *et al.*, 2001; Jacquemyn *et al.*, 2006), disminuir (Epperson and Alvarez-Buylla, 1997; Hamrick *et al.*, 1993) o bien esta puede no mostrar alguna diferenciación conforme aumenta la clase de tamaño (Linhart *et al.*, 1981). La reducción de estructura genética fina de plántulas a adultos podría generarse por la pérdida del número de individuos mientras que los factores históricos o la selección de micro-hábitats podría aumentar la estructura genética de los adultos. Consecuentemente la disminución del tamaño efectivo poblacional generado por la fragmentación del hábitat puede aumentar los niveles de endogamia y disminuir la heterocigosidad, por lo que el comportamiento de la estructura genética espacial puede influenciar en las respuestas adaptativas de las poblaciones para la selección de micro-ambientes (Trapnell *et al.*, 2004), la agregación espacial es común en especies tropicales incluyendo especies dioicas (Condit *et al.*, 2000), una consecuencia potencial de un arreglo espacial agregado genera distribución no al azar sobre distancias cortas lo que genera una fuerte estructura genética fina (Riba-Hernández *et al.*, 2014). Pocos estudios han evaluado la estructura genética fina en especies tropicales (Epperson and Alvarez-Buylla 1997; Condit *et al.*, 2000; Domínguez *et al.*, 2005; Riba-Hernández *et al.*, 2014) sobre todo para aquellas que se encuentran amenazadas por las actividades antropogénicas que modifican estos factores afectando la viabilidad a largo plazo de plantas dioicas, la tala selectiva es la principal actividad comercial que explota la madera de árboles tropicales (Putz *et al.*, 2012). En la actualidad una serie de técnicas moleculares han permitido conocer la información genética que los organismos portan, estas técnicas se les conocen en forma genérica como marcadores moleculares y son ampliamente utilizados en

genética ya que permiten evidenciar las variaciones (polimorfismos) en la secuencia del ADN entre dos individuos, modifiquen éstas o no su fenotipo. Los marcadores moleculares son de utilidad en estudios evolutivos y de genética poblacional, manejo de bancos de germoplasma, identificación, protección legal de germoplasma, mapeo, selección asistida por marcadores y clonado de genes (Picca *et al.*, 2004). Uno de los marcadores más utilizados, son los microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSR) son pequeñas regiones en el ADN de secuencia repetida (entre 2 a 6 pb) arregladas en serie, las cuales están distribuidas al azar por todo el ADN. Los microsatélites son secuencias altamente variables dispersas a través del genoma, este tipo de repeticiones pueden o no estar asociadas con genes y son loci altamente mutables que pueden estar presentes en muchos sitios del genoma (Moxon and Wills, 1999; Watcharawongpaiboon and Chunwongse, 2007), de manera que su análisis resulta muy adecuado para distinguir individuos emparentados, de una misma población y para el estudio de su diversidad genética (Torres and Moreno, 2005). Una falta de sensibilidad en los procedimientos estadísticos puede generar discrepancia, la mayoría de los trabajos están basados en aloenzimas desarrollando patrones de análisis para un alelo individual, pero los nuevos marcadores genéticos basados en la técnica de PCR han entrado al campo de la genética del paisaje y quienes además presentan una amplia gama de alelos por lo que Smouse and Peakall, en 1999 desarrollaron un enfoque multivariado de análisis de autocorrelación que es aplicable a marcadores multialélicos codominantes y multilocus que permiten conocer de mejor manera la estructura genética espacial fina. *Astronium graveolens* (amenazada en la NOM-059-SEMANART-2010) es un árbol tropical dioico que se distribuye en el bosque tropical subcaducifolio y representa un recurso económico importante generado por la explotación de su madera, actualmente no se ha realizado un proyecto donde se evalué el efecto que puede generar a sus poblaciones hacia su estructura genética por lo que con el apoyo de marcadores moleculares microsatélites concluiremos este objetivo.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar en efecto de la fragmentación en la diversidad y estructura genética de *Astronium graveolens* (Anacardiaceae).

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Comparar la diversidad genética de tres clases de tamaños de *Astronium graveolens* en sitios continuos vs fragmentados.
2. Comparar las relaciones de parentesco de tres clases de tamaños de *Astronium graveolens* en sitios continuos vs fragmentados
3. Comparar la estructura genética espacial de tres clases de tamaños de *Astronium graveolens* en sitios continuos vs fragmentados.

## HIPÓTESIS PARTICULARES

1. Si la magnitud y tiempo de la fragmentación ha sido alta y ha reducido el intercambio genético dentro y entre las poblaciones, se espera encontrar menor diversidad genética en sitios fragmentados que en continuos.
2. La fragmentación puede reducir el apareamiento aleatorio entre individuos, por lo que se espera exista mayor índice de parentesco en fragmentos de bosque que en sitios continuos.
3. La fragmentación a largo plazo reduce los índices de flujo génico vía polen y semillas por lo que se espera encontrar mayor estructura genética en los fragmentos que en sitios continuos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### SITIO DE ESTUDIO

El presente estudio se llevó a cabo en la reserva de la Biosfera Chamela-Cuixmala y a sus alrededores que comprende de 13,200 hectáreas de tierra y se encuentra localizada en la costa del Pacífico en el estado de Jalisco, México en las coordenadas 19° 30' N, 105° 03' W (Rosas *et al.*, 2011), la vegetación predominante es el bosque caducifolio que se ubica principalmente en los lomeríos y que es ampliamente reconocido por su alta diversidad así como alto índice de endemismo, así como parches de bosque sub-caducifolio, este tipo de vegetación presenta pérdida de hojas en la mayoría de especies vegetales al término de la época de lluvias (Bullock, 1986), el clima presenta una temperatura media anual de 24.9°C con una precipitación de 750 mm anual y una marcada estacionalidad con el 85% de la precipitación durante junio a octubre seguida por una prolongada sequía de noviembre a junio sin embargo la influencia de la estación Biológica con ciclones tropicales y el Niño pueden generar variación interanual en la cantidad de precipitación, por lo que la producción de frutos y semillas así como la fenología de los árboles tropicales puede variar dependiendo de la cantidad de lluvia presente (García-Oliva *et al.*, 2002), la reserva tiene alta variación en su topografía que van desde 20 m a 520 m sobre el nivel del mar (Bullock, 1986), está constituida por el 92% de cobertura vegetal de bosque seco, 2% de bosque ripario y el 3.7 corresponde a zonas utilizadas para agricultura o pastoreo, y a los alrededores de la reserva en un radio de 10 km 79.85% es bosque seco, 1.65% bosque ripario y 16.55% zonas agrícolas (Sánchez-Azofeifa *et al.*, 2009).

### ESPECIE DE ESTUDIO

*Astronium graveolens* (Anacardiaceae) es un árbol común del bosque tropical subcaducifolio que alcanza alturas de hasta 30 m con el fuste recto, ramas ascendentes, copa redondeada densa y diámetros de hasta 1 m, se distribuye desde México (vertiente del pacífico y la península de Yucatán) a Sur América (Pennington and Sarukhan, 2005), la fructificación ocurre durante marzo a junio y al término de la temporada seca cuando los recursos de alimentos son limitados, por lo que las semillas han llegado a funcionar como la dieta principal del loro corona lila (*Amazona finschi*) ya que puede presentar un traslape en

la temporada de fructificación con la crianza de polluelos de esta especie (Villaseñor-Sánchez *et al.*, 2010) las hojas son fáciles de reconocer ya que presentan un olor agradable a fruto de mango en estado verde (Obs. personales), las flores se producen en panículas, estas son pequeñas de 2 cm aproximadamente polinizadas por insectos y la dispersión de semillas es por viento principalmente (Villaseñor-Sánchez *et al.*, 2010). Las poblaciones de *Astronium graveolens* actualmente están disminuyendo por la explotación de su madera lo que puede afectar en los patrones ecológicos y genética de la misma.

### SELECCIÓN DE SITIO DE ESTUDIO

Para poder realizar una comparación de la estructura genética en tres diferentes clases de tamaño bajo dos escenarios diferentes (continuo vs fragmentado) se seleccionaron cuatro poblaciones de individuos adultos (mismas utilizadas en el capítulo 1), es muy importante mencionar que los vecindarios formados por *Astronium graveolens* son muy específicos debido a que presenta una distribución muy discreta lo que nos permite distinguir fácilmente una población de otra. A cada población se le colectó todos los individuos adultos, juveniles y plántulas, se les midió el diámetro y su respectiva posición geográfica por medio de rumbos y azimut para tener la distancia correcta entre individuos, a cada individuo se le colectó una muestra de tejido de hoja fresca (80-100 mg) para el análisis genético.

### EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción de material genético se utilizó tejido de hojas jóvenes (80 mg) mediante el protocolo CTAB 2x (bromuro hexadeciltrimetilamonio) (Doyle and Doyle, 1987) (Anexo 1) con algunas modificaciones posteriormente se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% para observar la calidad y cantidad aproximada de ADN obtenido (Figura 8).

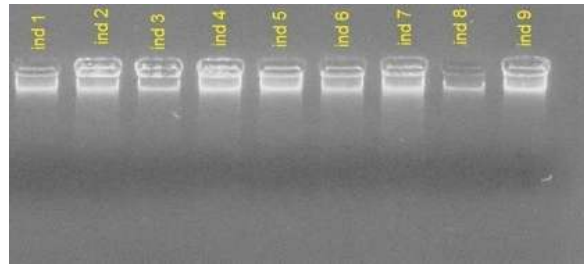


Figura 8. Electroforesis de ADN nuclear de *Astronium graveolens*, se muestra extracciones de 9 individuos en agarosa al 1% teñido con EtBr 0.3 µg/ml

### SELECCIÓN DE LOS PRIMERS

Se probaron un total de 16 pares de primers microsatélites desarrollados por la compañía Genetic Marker Services, Brighton, United Kingdom, los pares de primer que no expresaron producto de amplificación o que presentaron errores de genotipado generado por alelos nulos, tartamudeo y pérdida de alelos largos en Micro-Checker V 2.2.3 (Oosterhout et al., 2004), fueron descartados del análisis, y la final se contó únicamente con 6 pares de primers, de los cuales todos se encontraron en equilibrio Hardy Weinberg una vez que fueron obtenidas las temperaturas óptimas de alineamiento (PCR de gradiente) de cada primer fueron ordenados en tres diferentes mezclas basados en la similitud de temperatura de alineamiento y su diferente fluoróforo asignado 6-FAM, VIC, NED y PET, cada uno representado por un color; azul, verde, amarillo y rojo respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Características de los 6 pares de primers microsatélites que expresaron producto de amplificación elegidos para el estudio.

Nombre	SSR	T °C	Tamaño (pb)	Forward primer	Reverse primer	Sonda	Alelos
ast33	(GT)10	53	122-132	AAGCTCGTTAGGTGATATGTAGC	TGCTGTAAATGCAAATCTCG	VIC	6*
ast39	(GA)11	60	157-167	CAGAGAAAGCTTCACTTATGAG	TGATACTTTTCACCCCTTCTG	NED	6*
ast22	(CA)11	55	106-202	AACTGCCATTGATGAAGTGT	CCCATGTGGTCAGGTAATAA	NED	27*
ast38	(TG)9	56	106-120	CGTCCCGAGGTCTATGTGAT	GAGAACCTTGCCATGTGAG	VIC	7*
ast46	(AAG)8	57	153-252	GAGAGTTGGGCAGTTGGAGA	TCTGCCTCAGCTTCTTTCCT	6FAM	8*
ast45	(AC)9	56	115-203	GGAATTAGAGGCTTGTTGA	CAAAAATGGCCCAAGTATGT	PET	18*

Se indica la temperatura de alineamiento, sonda marcada, número de alelos total, \*HWE P <0.05, nivel de significancia p=0.05.

## REACCIONES MULTIPLEX

En total se generaron tres mezclas diferentes entre los 6 pares de primers de acuerdo a la temperatura de alineamiento y en base al tamaño en Pb. Las mezclas se realizaron utilizando el kit Multiplex (QUIAGEN) llevadas a un volumen final de 12.5  $\mu$ l el cual contenía 1x PCR Master Mix, primers 0.2  $\mu$ M, H<sub>2</sub>O y 50 ng/ $\mu$ l de ADN aproximadamente. Las pruebas PCR se realizaron en un termociclador *GeneAmp PCR System 9700*, el ciclo consistió en una desnaturalización a 95°C por 15 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30s, 53-60 °C por 60s, 72 °C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 15 minutos. Los productos de amplificación obtenidos fueron visualizados en un transiluminador de UV para electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de etidio y corridos durante 30 minutos a 80 W. Una vez obtenido todos los productos PCR se separaron por electroforesis capilar en el secuenciador automático ABI PRISM 3100- *Avant* (Applied-Biosystems) en un volumen final de 13.75  $\mu$ l que contenía formamida, Gene Scan-600 LIZ (Applied-Biosystems) y producto de PCR.

## ANÁLISIS DE DATOS

Para determinar el polimorfismo de cada microsatélite se realizó la lectura de los electroferogramas mediante el software GeneMarker V 2.2.0, una vez obtenida la matriz de datos crudos, se procedió a realizar el *binning* para ajustar el tamaño de cada alelo con el software TANDEM (Matschiner and Salzburger, 2009), para evaluar el equilibrio Hardy Weinberg así como el número alélico de cada microsatélite, su heterocigosidad observada, esperada, y el análisis de varianza molecular (AMOVA) se utilizó Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer, 2011). Para analizar la estructura genética de cada población se utilizó Structure V 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) y con *STRUCTURE HARVESTER* (Earl and VonHoldt, 2012) se determinó el número de agrupamientos conocidos como K mediante un método bayesiano (Falush *et al.*, 2003; Evanno *et al.*, 2005) utilizando el modelo de mezcla, con la opción de frecuencia de alelos correlacionados entre poblaciones (Falush *et al.*, 2003)

y analizando parámetros a partir de  $K=2$  hasta  $K=10$  para posteriormente graficar mediante un análisis de componentes principales. Para realizar los análisis de estructura genética fina se montó la matriz de datos en el software GenAlEx 6.5 (Peakall and Smouse, 1999), el cual permitió hacer correlaciones genéticas mediante correlogramas multilocus, multialelicos este índice mide a través de un coeficiente de correlación en base a matrices de distancias genéticas la similitud genética entre pares de individuos que se encuentran separados a una distancia geográfica y una vez evaluada esta correlación se grafican los coeficientes en relación a la distancia de separación, constituyendo los correlogramas que fueron combinados en conjuntos de clases utilizando la opción de poblaciones múltiples, el análisis de los correlogramas se utilizó con 999 permutaciones y ajustado a 95% de intervalos de confianza. Las simulaciones de coeficiente de parentesco fueron realizados en R (R Core Team 2015) implementado el paquete estadístico “related” (Pew *et al.*, 2015), utilizando el modelo de Ritland 1996 que simula el parentesco entre individuos por medio de las frecuencias alélicas sin tener a priori los genotipos paternos, comparando cada alelo de cada microsatélite entre todos los individuos del mismo grupo, el valor va de 0 a 1.0 y asigna cuatro categorías de parentesco dependiendo el porcentaje de alelos que comparten los individuos, calcula la relación promedio dentro de cada grupo específico, un valor promedio de  $r_{xy}= 0.0$  significa que no están relacionados,  $r_{xy}=0.25$  son medios hermanos,  $r_{xy}= 0.50$  hermanos completos y así mismo  $r_{xy}= 0.50$  representan padres a hijos.

## RESULTADOS

### DIVERSIDAD GENÉTICA Y COEFICIENTE DE PARENTESCO POBLACIONAL

Los resultados permitieron genotipar 698 individuos entre las cuatro poblaciones, 111 corresponden a árboles adultos, 194 juveniles y 393 plántulas, todos los loci analizados (seis) mostraron ser polimórficos con un total de 72 alelos entre las cuatro poblaciones y no presentaron evidencia de alelos nulos, además en todas las muestras combinadas y por población los seis loci microsatelites mostraron desviaciones del equilibrio Hardy Weinberg  $P < 0.05$  el número de alelos promedio por población presentó una ligera variación, Antiguo Sur =33.33, Careyes =31.33, Santa Cruz =29, y Limoncitos =24.33. Los niveles de Heterocigosidad esperada dentro de cada población fueron altos y sin una diferencia significativa entre clases, Antiguo sur (adultos  $He$ : 0.650, juveniles  $He$ : 0.620, plántulas  $He$ : 0.665, total  $He$ : 0.645) Careyes (adultos  $He$ : 0.592, juveniles  $He$ : 0.615, plántulas  $He$ : 0.617, total  $He$ : 0.608), Santa Cruz (adultos  $He$ : 0.546, juveniles  $He$ : 0.598, plántulas  $He$ : 0.477, total  $He$ : 0.540) y Limoncitos (adultos  $He$ : 0.575, juveniles  $He$ : 0.579, plántulas  $He$ : 0.514, total  $He$ : 0.556), por su parte los valores de Heterocigosidad observada mostraron valores muy similares a la esperada y sin una diferencia significativa entre clases. En el caso del coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) los resultados fueron bajos y sin una diferencia significativa entre clases de cada población en sitios continuos, Antiguo Sur (adultos  $F_{IS}$ : 0.043, juveniles  $F_{IS}$ : 0.020, plántulas  $F_{IS}$ : 0.008, total  $F_{IS}$ : 0.024), Careyes (adultos  $F_{IS}$ : 0.019, juveniles  $F_{IS}$ : 0.023, plántulas  $F_{IS}$ : 0.003, total  $F_{IS}$ : 0.015) y para poblaciones en fragmentos de bosque también fueron resultados similares Santa Cruz (adultos  $F_{IS}$ : 0.064, juveniles  $F_{IS}$ : 0.023, plántulas  $F_{IS}$ : 0.016, total  $F_{IS}$ : 0.034), Limoncitos (adultos  $F_{IS}$ : 0.062, juveniles  $F_{IS}$ : 0.033, plántulas  $F_{IS}$ : 0.046, total  $F_{IS}$ : 0.047 ) (Tabla 2). Los resultados del coeficiente de parentesco fueron obtenidos para cada clase dentro de cada población y adicionalmente se obtuvo un promedio general, los resultados fueron muy variables, para el caso de Antiguo Sur no existió una diferencia significativa entre clases  $P > 0.05$ , los adultos presentaron un valor de  $r_{xy} = 0.190$ , los juveniles  $r_{xy} = 0.174$  y las plántulas  $r_{xy} = 0.065$  por lo que estos resultados indican que los individuos no se encuentran relacionados, para el caso de Careyes existe una diferencia significativa intrapoblacional  $P < 0.05$  los adultos mostraron un valor de  $r_{xy} = 0.108$ , los juveniles  $r_{xy} = 0.162$  y las plántulas  $r_{xy} = 0.579$  lo que

indica que los adultos y juveniles no están relacionados pero las plántulas están sesgadas hacia un linaje de ser hermanos completos, para la población de Santa Cruz también existe una diferencia significativa  $P < 0.05$ , los adultos presentaron un valor de  $r_{xy} = 0.076$ , los juveniles  $r_{xy} = 0.150$  y las plántulas  $r_{xy} = 0.287$  esto indica que los adultos y los juveniles no presentan relación de parentesco pero las plántulas parecen ser medios hermanos, finalmente para la población de Limoncitos igualmente existe una diferencia significativa  $P < 0.05$ , los adultos presentaron un valor de  $r_{xy} = 0.155$ , los juveniles  $r_{xy} = 0.509$  y las plántulas  $r_{xy} = 0.246$ , lo que significa que los adultos no están relacionados, los juveniles están sesgados a ser hermanos completos y las plántulas medios hermanos (Tabla 2). Finalmente para tener una comparación de cada índice entre las poblaciones de diferentes condiciones se realizó un análisis de comparación de medias mediante un ANOVA aplicando un nivel de significancia de 0.05, se obtuvo un valor de P bajo la  $H_0$ : de que todas la medias poblacionales son iguales, para el caso de  $H_0$ : el valor fue de  $P > 0.05$ ,  $H_e$ :  $P > 0.05$ ,  $F_{IS}$ :  $P > 0.05$ , y  $r_{xy}$ :  $P > 0.05$  lo que significa que aceptamos la  $H_0$ , por lo que no existe diferencia significativa entre las medias poblacionales de cada índice para cada población en diferente condición (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros genéticos de los 6 microsatélites estudiados en cuatro poblaciones. N=Número de individuos, Na = Número de alelos diferentes, NO= Número de alelos privados  $H_0$ = Heterocigosis observada,  $H_e$ = heterocigosis esperada,  $F_{IS}$ = coeficiente de endogamia,  $r_{xy}$ = coeficiente de parentesco.

ANTIGUO SUR (CONTINUO)							
	N	Na	NO	$H_0$	$H_e$	$F_{IS}$	$r_{xy}$
ADULTOS	46	37	1	0.612	0.650	0.043	0.190
JUVENILES	45	26	1	0.600	0.620	0.020	0.174
PLÁNTULAS	240	37	5	0.654	0.665	0.008	0.065
PROMEDIO	110	33.33	2.33	0.622	0.645	0.024	0.143

$H_0 = NS P > 0.05$ ,  $H_e = NS P > 0.05$ ,  $F_{IS} = NS P > 0.05$ ,  $r_{xy} = NS P > 0.05$

CAREYES (CONTINUO)							
	N	Na	NO	$H_0$	$H_e$	$F_{IS}$	$r_{xy}$
ADULTOS	28	34	0	0.571	0.592	0.019	0.108
JUVENILES	54	29	0	0.596	0.615	0.023	0.162
PLÁNTULAS	96	31	5	0.608	0.617	0.003	0.579
PROMEDIO	59	31.33	1.6	0.592	0.608	0.015	0.283

$H_0 = NS P > 0.05$ ,  $H_e = NS P > 0.05$ ,  $F_{IS} = NS P > 0.05$ ,  $r_{xy} = S P < 0.05$

SANTA CRUZ (FRAGMENTADO)							
	N	Na	NO	$H_0$	$H_e$	$F_{IS}$	$r_{xy}$
ADULTOS	18	31	1	0.491	0.546	0.064	0.076
JUVENILES	70	35	2	0.571	0.598	0.023	0.150
PLÁNTULAS	30	21	1	0.456	0.477	0.016	0.287
PROMEDIO	39	29	1.33	0.506	0.540	0.034	0.171

$H_0 = NS P > 0.05$ ,  $H_e = NS P > 0.05$ ,  $F_{IS} = NS P > 0.05$ ,  $r_{xy} = S P < 0.05$

LIMONCITOS (FRAGMENTADO)							
	N	Na	NO	$H_0$	$H_e$	$F_{IS}$	$r_{xy}$
ADULTOS	19	29	0	0.526	0.575	0.062	0.155
JUVENILES	25	21	0	0.547	0.579	0.033	0.509
PLÁNTULAS	27	23	0	0.463	0.514	0.046	0.246
PROMEDIO	24	24.33	0	0.512	0.556	0.047	0.303

$H_0 = NS P > 0.05$ ,  $H_e = NS P > 0.05$ ,  $F_{IS} = NS P > 0.05$ ,  $r_{xy} = S P < 0.05$

## ESTRUCTURA GENÉTICA

Los resultados fueron obtenidos para cada clase dentro de cada población y se llevó una comparación entre estas, para el caso de Antiguo Sur mediante el método Evanno *et al.*, 2005 se pudo localizar la presencia de tres grupos genéticos  $K=3$  los cuales se comparten entre las diferentes clases, el análisis de coordenadas principales (PCA) generado por la matriz de distancia genética y geográfica generó dos ejes de variación: el primero explica el 26.1% y el segundo el 10.7%, este análisis detectó dos principales grupos: el grupo 1, con valores altos en el eje 1 y valores intermedios en el eje 2, contiene muestras de adultos, juveniles y pocas plántulas, el grupo 2 con bajos valores en el eje 1 y bajos valores en el eje 2 contiene únicamente plántulas. Los resultados de  $F_{ST}$  pareada indican que existe mayor diferenciación genética entre los adultos y los juveniles  $F_{ST}$ : 0.135 y por otra parte existe menor diferenciación genética entre adultos y plántulas  $F_{ST}$ : 0.050, el análisis de varianza molecular explica que el 91.04% de la variación se encuentra dentro de cada clase y únicamente el 8.96% entre clases, los resultados para Careyes indican que existe también tres grupos genéticos distribuidos entre las clases de tamaño, el análisis de coordenadas principales (PCA) generó dos ejes de variación: el primero explica el 34.07% y el segundo el 8.5%, este análisis detectó dos principales grupos: el grupo 1 con valores altos en el eje 1 y valores intermedios en el eje 2, contiene muestras de adultos, juveniles y algunas plántulas, el grupo 2 con valores intermedios en el eje 1 y valores bajos en el eje 2, contiene únicamente plántulas, los resultados de  $F_{ST}$  pareada nos permitieron observar que existe mayor diferenciación genética entre adultos y plántulas  $F_{ST}$ : 0.265, mientras que la menor diferenciación se encuentra entre adultos y juveniles  $F_{ST}$ : 0.103, y el AMOVA permitió identificar que el 75.68% de la variación genética se localiza dentro de clases y únicamente el 24.31% entre clases, para el caso de las poblaciones en bosque fragmentado los resultados fueron muy similares, en Santa Cruz también se localizaron tres grupos genéticos distribuidos entre las tres clases, sin embargo el análisis de coordenadas principales (PCA) generó dos ejes de variación: el primero explica el 16.9% y el segundo el 13.6%, este análisis permitió identificar únicamente un grupo con valores intermedios en el eje 1 y valores intermedios en el eje 2, por lo que el grupo está formado por una mezcla de las tres

clases de tamaño, los resultados de  $F_{ST}$  pareada indican que existe mayor diferenciación genética entre adultos y plántulas  $F_{ST}$ : 0.124 y menor diferenciación entre adultos y juveniles  $F_{ST}$ : 0.071, así mismo se localizó que la mayor variabilidad genética se localiza dentro de cada clase 91.89% y únicamente 8.11% entre clases, finalmente para la población de Limoncitos también se localizaron tres grupos genéticos que de igual manera se comparten entre las clases de tamaño sin embargo similar a Santa Cruz el análisis de coordenadas principales (PCA) generó dos ejes de variación: el primero explica el 18.4% y el segundo el 14.7%, este análisis permitió identificar únicamente un grupo con valores intermedios en el eje 1 y valores intermedios en el eje 2, por lo que el grupo está formado por una mezcla de las tres clases de tamaño, la mayor diferenciación genética se encontró entre adultos y plántulas  $F_{ST}$ : 0.189 y la menor diferenciación entre juveniles y plántulas, el análisis de varianza molecular indica que el 84.79% de la variación genética se encuentra dentro de cada clase, y únicamente el 15.21% entre clases (Figura 9).

Por otra parte los resultados permiten realizar una comparación entre las cuatro poblaciones mediante los estadísticos  $F$ , los valores fueron bajos de acuerdo a lo establecido por Wright en 1978, para el caso de Antiguo Sur el índice de diferenciación genética total fue de  $F_{ST}$ : 0.089 lo que indica que no existe estructura genética poblacional significativa entre sus diferentes clases, el coeficiente de endogamia dentro de los individuos relativo a la subpoblación fue de  $F_{IS}$ : 0.288 y el coeficiente de endogamia dentro de los individuos relativo a la población total fue de  $F_{IT}$ : 0.115 para Careyes el índice de diferenciación genética fue de  $F_{ST}$ : 0.243 lo que significa que existe moderada diferenciación genética entre las clases el  $F_{IS}$ : 0.031 Y  $F_{IT}$ : 0.267, para Santa Cruz el índice de diferenciación genética fue de  $F_{ST}$ : 0.081 lo que indica que no existe estructura genética dentro de esta población el  $F_{IS}$ : 0.065 y  $F_{IT}$ : 0.141 y finalmente Limoncitos quien mostró un valor de  $F_{ST}$ : 0.152 lo que indica que existe moderada diferenciación genética dentro de la misma y además mostró un  $F_{IS}$ : 0.100 y  $F_{IT}$ : 0.237 (Figura 9).

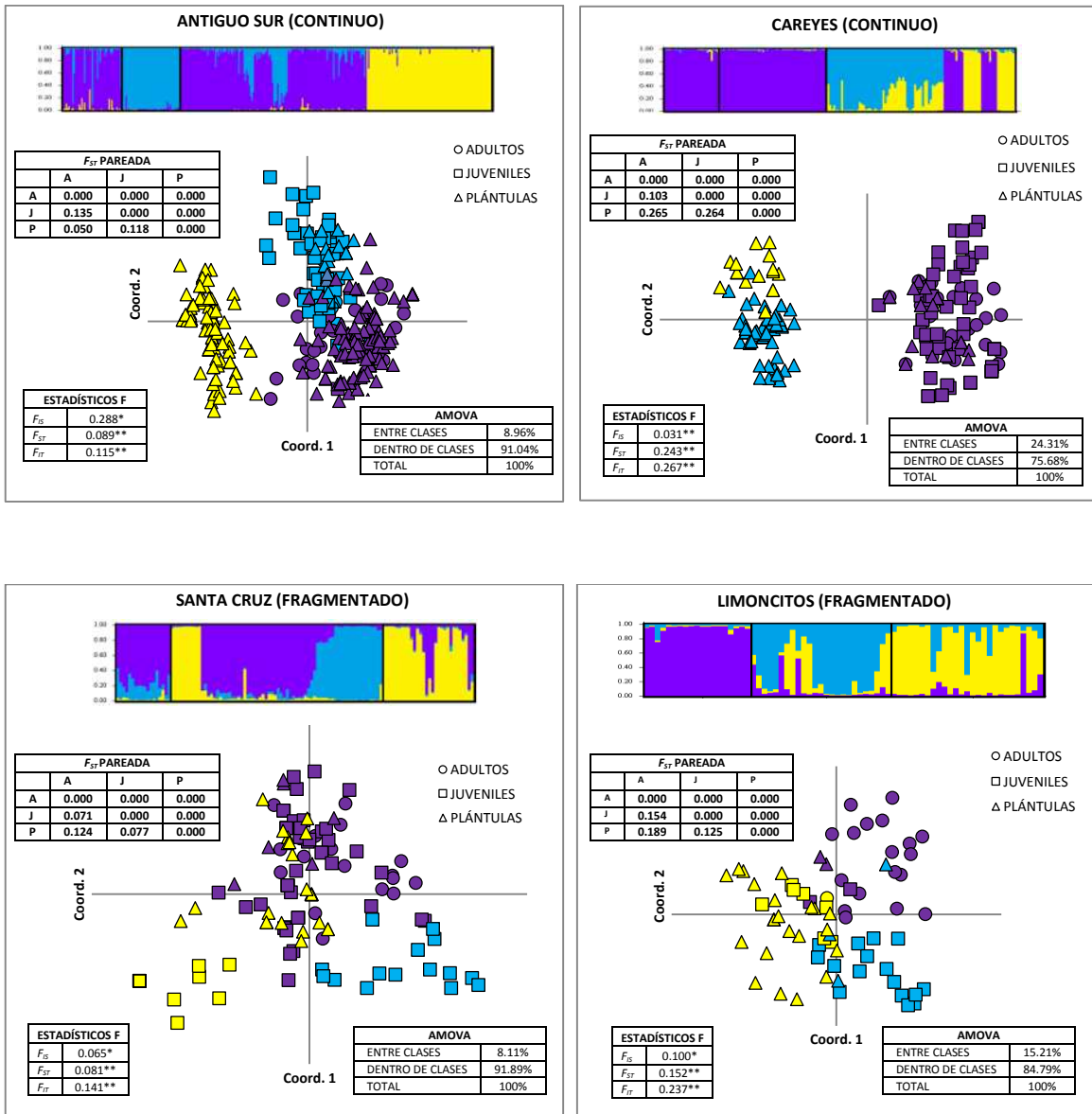


Figura 9. (Superior) Estructura genética poblacional estimada mediante STRUCTURE, cada individuo es representado por una barra vertical que es dividida por diferentes colores producto de una mezcla de genotipos. Las líneas negras gruesas separan a las clases de tamaño de cada población, (Inferior) análisis de coordenadas principales (PCA), dentro de cada población se indica  $F_{ST}$  pareada, estadísticos F, y AMOVA.

## ESTRUCTURA GENETICA ESPACIAL FINA

La estructura genética fina fue analizada por clases dentro de cada población y entre el total de individuos, para el caso de Antiguo Sur, todas las clases mostraron valores positivos de correlación genética, los adultos mostraron un valor de correlación de  $r: 0.098$ , los juveniles  $r: 0.198$  y las plántulas  $r: 0.382$  y la sumatoria total mostró un valor de correlación positiva de  $r: 0.371$ , para el caso de Careyes los adultos mostraron un valor de correlación negativo  $r:-0.077$ , los juveniles un valor positivo  $r: 0.344$  y las plántulas un valor de  $r: 0.016$ , mientras que la sumatoria total de clases mostró un valor positivo de correlación  $r: 0.284$ . Para la población de Santa Cruz los adultos mostraron un valor positivo de  $r: 0.399$ , los juveniles  $r: 0.186$  y las plántulas un valor de  $r: 0.002$  y el total mostró un valor positivo de correlación de  $r: 0.076$ , y finalmente para la población de Limoncitos todas las clases mostraron valores positivos de correlación, los adultos  $r: 0.389$ , los juveniles  $r: 0.025$  y las plántulas  $r: 0.006$ , el total mostró un valor de correlación positivo  $r: 0.175$ , estos resultados permiten identificar que existe una diferencia entre las poblaciones, y además se puede notar claramente que el existe mayor correlación genética en sitios continuos que en fragmentados (Figura 10).

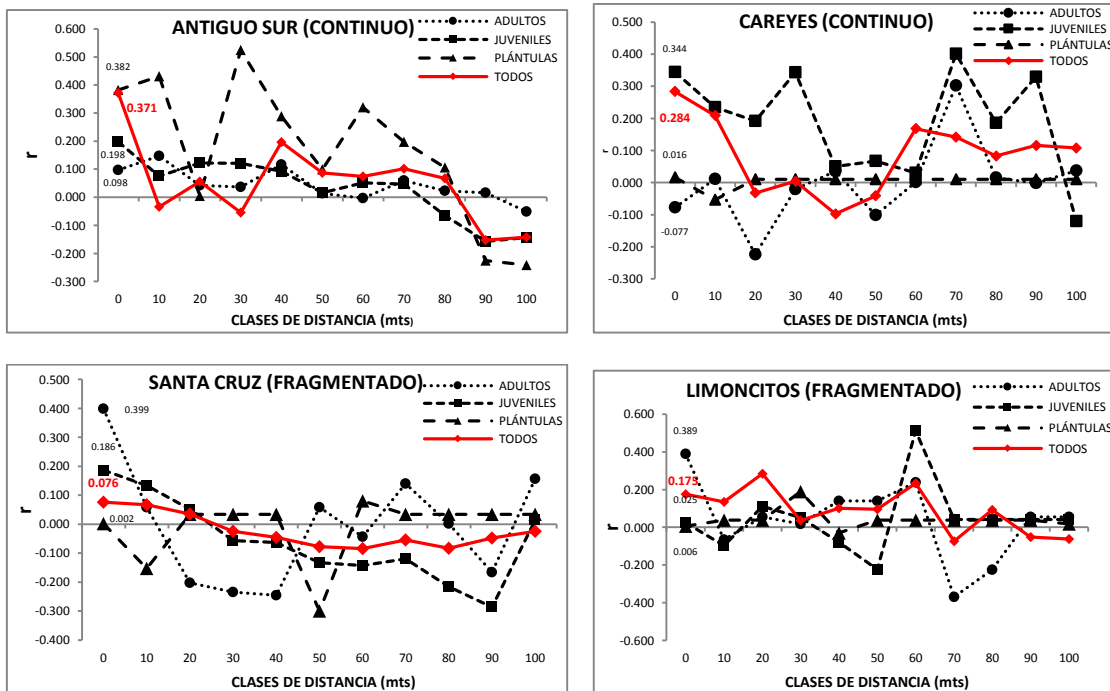


Figura 10. Correlogramas para las cuatro poblaciones, sobre el eje X se observa las diferentes clases de distancia (mts), y sobre el eje Y el coeficiente de correlación genética (r).

## DISCUSIÓN

### DIVERSIDAD GENÉTICA, ENDOGAMIA Y PARENTESCO EN LAS POBLACIONES

Teóricamente la fragmentación antropogénica es una de las formas más aparentes de degradación ambiental y es considerada una gran amenaza para la biodiversidad terrestre (Ratchke, 1993) adicionalmente esta conlleva a la paradoja de que afecta o no el estatus genético de plantas ya sea por a la erosión de la diversidad genética provocado por el incremento en la deriva génica, alta endogamia, reducción de flujo génico lo que puede generar una extinción local o una alta estructura genética dentro de las poblaciones (Ellstrand and Elam 1993; Lienert 2004; Kramer *et al.*, 2007; Piotti 2009). Los resultados obtenidos aquí de la amplificación de los seis microsatélites indican que todos son altamente polimórficos en ocasiones llegando a presentar hasta 27 alelos por locus (Ast 22), anteriormente se han realizado estudios con otras especies del mismo género mediante microsatélites (Caetano *et al.*, 2005; Caetano *et al.*, 2008) llegando a encontrar valores similares de alelos que van desde los tres hasta 33 alelos por locus lo que indica presencia de alto índice polimórfico en este género, los niveles de diversidad genética fueron altos y variables sin embargo no fueron significativamente diferentes en cada clase. Anteriormente se ha estudiado el efecto de la fragmentación en especies de árboles tropicales y se han encontrado altos niveles de diversidad genética sin verse afectado por la fragmentación (Foré *et al.*, 1992; Collevatti *et al.*, 2001; González-Astorga and Núñez-Farfán 2001; Rossetto *et al.*, 2004; Andrianoelina *et al.*, 2009; Dixo *et al.*, 2009; Rosas *et al.*, 2011) y en ocasiones sin encontrar diferencias entre clases de tamaño (Aldrich *et al.*, 1998), por lo que este efecto negativo ha sido atribuido a la eficiente polinización y dispersión de semillas, sin embargo con el paso del tiempo pueden llegar a sufrir efectos negativos lo que podría resultar en la pérdida de adecuación de la población. En este estudio se logró observar una diversidad genética alta y similar entre clases, además el índice de endogamia mostró valores bajos y similares entre las diferentes clases de cada población lo que significa que no existe exocruzamiento entre parientes, con estos resultados podríamos asumir que la fragmentación no ha afectado los índices de diversidad genética entre clases y que el flujo génico ha sido constante a través de las generaciones. Anteriormente ya se había evaluado el efecto de la fragmentación causado por la deforestación en *Astronium graveolens*

comparando plántulas y adultos mediante ocho isoenzimas (Schwarcz *et al.*, 2010) los resultados encontraron alta diversidad genética en adultos y plántulas ( $H_e$ : 0.620-0.610 respectivamente) así mismo los valores de endogamia presentaron valores de  $F_{IS}$ : 0.402-0.175 lo que indica que la fragmentación no afectó los índices de diversidad genética pero si ligeramente la endogamia, sin embargo esto puede depender de factores como el tamaño de fragmentos (White *et al.*, 1999), así como del tiempo de inicio de la fragmentación, ya que no todos los eventos de fragmentación generan efectos negativos y en ocasiones la variación genética por aloenzimas pueden responder de manera diferente debido a que estas pueden ser afectadas por el ambiente (Young *et al.*, 1996). Por otra parte los resultados generales aquí obtenidos sin tener una clasificación de clases, muestran que existe mayor diversidad genética en poblaciones continuas que en fragmentos sin embargo es una diferenciación no significativa, lo que concuerda a lo encontrado por Dominguez *et al.*, 2005 con el arbusto *Erythroxylum havanense* en las mismas poblaciones aquí estudiadas, los valores de endogamia del presente estudio fueron muy bajos y cercanos a cero y se observa una diferencia entre condiciones, encontrando mayor endogamia en fragmentos que en continuos, sin embargo similar a lo que ocurre con la diversidad genética es una diferencia no significativa, Cascante *et al.*, 2002 realizó un estudio con *Samanea saman* y encontró una reducción en la diversidad genética y aumento de endogamia en sitios fragmentados, estos patrones pueden interpretarse de diferentes maneras por lo que los resultados obtenidos son el reflejo de la historia demográfica de cada población, Aguilar *et al.*, 2008 realizó un meta-análisis donde evaluó el efecto de la fragmentación en la diversidad genética y la endogamia para 102 especies de plantas incluyendo arbustos y árboles con diferentes estrategias de dispersión y en su gran mayoría especies polinizadas por insectos y concluyó que la fragmentación no afecta en la diversidad genética similar a lo obtenido en el presente proyecto sin embargo los resultados de endogamia en progenies si se vieron afectados por la fragmentación caso contrario a lo que ocurre en *Astronium graveolens* donde se nota una ligera disminución de la endogamia conforme disminuye la talla de los individuos. Por otra parte los resultados de parentesco fueron muy variables en cada clase dentro de cada población, y al parecer no existe una relación con la condición lo que significa que los eventos reproductivos para cada clase no han sido iguales y los linajes de cada una pueden variar, estos resultados podrían ser explicados por varios factores como por ejemplo, a) las

proporciones sexuales femeninas; aunque el presente estudio no se evaluó debido a la falta de floración durante la ejecución del mismo se ha encontrado anteriormente (Cristobal-Pérez, 2011) que pueden presentar diferencia bajo diferentes condiciones, una proporción de 2:1 (dos machos por cada hembra) en bosque continuo y 3:1 (tres machos por cada hembra) en fragmentos de bosque concluyendo que la fragmentación afecta los índices sexuales femeninos, los resultados aquí obtenidos no permiten localizar una diferencia de parentesco entre condiciones sin embargo para algunas poblaciones existen diferencias significativas de parentesco entre las clases lo que permite concluir que probablemente el aumento de parentesco este dado por la baja cantidad de hembras que pudieran presentarse en cada generación reproductiva, b) proporciones sexuales masculinas; en el caso contrario al anterior una disminución en los donadores de polen podría aumentar los niveles de parentesco y aunque el apareamiento sea aleatorio y el flujo génico se dé a largas distancias dentro de las poblaciones estos tienen menos probabilidad de aumentar su diversidad genética debido a que las capsulas de los frutos madres podrían contener semillas polinizadas por menos donadores de polen y representando un arreglo de progenies de medios hermanos lo que podría generar consecuencias negativas posteriores a través de varios eventos reproductivos c) sincronización fenológica; el estrés generado por la escases de recursos o los cambios repentinos en las condiciones abióticas podría generar que no todos los individuos masculinos sean reproductivos al tiempo de la recepción de polen por las hembras, lo que podría condicionar los linajes aumentando el índice de parentesco.

*Astronium graveolens* es una especie amenazada y algunas de sus poblaciones se ubican en zonas fragmentadas por lo que el riesgo genético puede aumentar provocado por cambios en algunos factores como el tamaño poblacional, grado de aislamiento y el fitness poblacional (Ellstrand and Elam 1993), así como los efectos negativos que puedan tener en interacciones específicas como la polinización y la dispersión de semillas (Magrath *et al.*, 2014) sin embargo una explicación plausible de los resultados obtenidos en este estudio indican que *Astronium graveolens* no se ve afectado por la fragmentación en la diversidad genética, endogamia y parentesco esto probablemente sea resultado de la combinación entre la alta longevidad, alta diversidad genética intrapoblacional, así como la alta tasa de flujo génico (Hamrick., 2004), además de que la fragmentación puede no estar afectando en los componentes de dispersión de semillas tanto biótica como abiótica y tampoco ha reducido la

polinización a larga distancia haciéndolos resistentes a la extinción local y a la pérdida de diversidad genética causada por esta. Sin embargo es muy importante tener en cuenta los resultados aquí obtenidos ya que estamos observando una historia genética corta debido a que únicamente se estudian tres clases de tamaño y aunque probablemente de diferentes eventos reproductivos, es muy probable que el efecto de la fragmentación estudiada aquí sea relativamente reciente (50 años) y que los individuos de *Astronium graveolens* se hayan establecido antes de la fragmentación, sin embargo en el transcurso del tiempo (no a muy largo plazo) la fragmentación pudiera afectar en los índices de diversidad genética, endogamia y parentesco.

## ESTRUCTURA GENÉTICA

La historia demográfica genética de las poblaciones proporciona información crítica de los mecanismos responsables que han moldeado la estructura genética actual observada y puede verse afectada por factores demográficos (natalidad, mortalidad, dispersión y diferentes clases de vida) y factores genéticos (mutación, deriva genética, recombinación, selección y flujo génico) (Alvarez-Buylla and Garay 1994; Burczyk *et al.*, 2004), algunos estudios han evaluado la estructura genética de árboles confinados al bosque tropical seco (Novick *et al.*, 2003; Caetano *et al.*, 2008; Arias *et al.*, 2012) y lluvioso (Eguiarte *et al.*, 1992; Lemes *et al.*, 2003) pero pocos se han enfocado a estudiar el efecto de la fragmentación antropogénica en la demografía genética de plantas (Aldrich *et al.*, 1998; Kelly *et al.*, 2004; Jones and Hubbell 2006), los resultados pueden ser muy variables y en ocasiones algunos autores concluyen que la estructura genética entre poblaciones así como dentro de poblaciones pueden verse afectada ya sea por la distancia entre poblaciones generando fuerte diferenciación genética (Dayanandan *et al.*, 1999; Bottin *et al.*, 2005) o no (Alvarez-Buylla and Garay 1994, Wickneswari *et al.*, 2004; Hanson *et al.*, 2008). Este trabajo es pionero en estudiar la estructura genética de *Astroium graveolens*, bajo la comparación de diferentes condiciones, los resultados de este estudio mediante el análisis bayesiano realizado con STRUCTURE confirmaron la presencia de tres grupos genéticos en cada población de los cuales en su mayoría se comparten entre clases y entre poblaciones tanto fragmentadas como continuas, desde un punto de vista intrapoblacional, los índices de

diferenciación fueron muy variables, bajos, moderados, y altos ( $F$  pareada) y en la mayoría de las poblaciones la mayor diferenciación es generada en las plántulas debido al establecimiento de un grupo genético en la mayoría de las poblaciones se comparte mínimamente entre clases, pero si en alto índice entre poblaciones, lo que se pudiera atribuir a factores históricos como cuellos de botellas (Aldrich *et al.*, 1998; Jones and Hubbell 2006) que pudieron generar una disminución del tamaño efectivo poblacional evitando el flujo genético a través de las generaciones. La estructura genética generada por el análisis de componentes principales indican que en poblaciones continuas puede haber estructura genética espacial mientras que en fragmentadas no, sin embargo los estadísticos  $F$  no muestran una diferencia significativa entre clases de cada población, por lo que se concluye que las cuatro poblaciones presentan moderada estructura genética y la fragmentación no afecta a esta si no que al contrario parece disminuir la diferenciación genética entre clases, estos resultados pudieran sugerir que la dispersión histórica de polen en estas clases ha ocurrido sobre largas distancias (a más de 10 km) similar a lo encontrado por Nason and Hamrick, 1997 en *Spondias mombin* (Anacardiaceae) quienes localizaron movimiento de polen a distancias de 6 y 14 km tanto para sitios continuos y fragmentos de bosque, lo que resulta en un balance entre la polinización cruzada y el flujo de polen (Wang *et al.*, 2011) a largas distancias lo que ha reducido la diferenciación genética dentro y entre poblaciones y además conlleva a la reducción de pérdida de diversidad genética en paisajes fragmentados (O'Connell *et al.*, 2006).

A una escala más pequeña la estructura genética puede estar relacionada con el tipo de sistema reproductivo de la especie, siendo el limitado flujo genético lo que generalmente conlleva al apareamiento entre individuos más próximos causando estructura genética a escala fina (Smouse and Peakall 1999; Degen *et al.*, 2001), entender las limitaciones para la dispersión es de mucho interés, por lo que los marcadores moleculares han facilitado estos análisis (Cavers *et al.*, 2005), en un estudio realizado en la reserva Chamela Cuixmala por Dominguez *et al.*, 2005 con el arbusto *Erythroxylum havanense* encontró estructura genética fina significativa pero a cortas distancias concluyendo que los patrones observados son resultado del comportamiento de los polinizadores y de la alta masa de floración. Aunque la mayoría de los trabajos están enfocados en conocer la estructura genética espacial fina de manera vertical en algunas especies se puede realizar de forma horizontal a distancias cortas

(Trapnell *et al.*, 2004), además muchas especies tropicales ya han sido objetos de estudio de la estructura genética fina (Hardy *et al.*, 2006; Barluenga *et al.*, 2011). *Astronium graveolens* es una especie dioica uniovular y auto incompatible que se exocruza mediante la polinización por abejas por lo que genera ventaja hacia otras especies monoicas, sin embargo la ausencia de polinizadores en zonas fragmentadas podría generar desventaja, así mismo debido a la calidad de su madera la tala selectiva también podría afectar los patrones de distribución genética espacial, aunque se ha encontrado que esta no afecta en ocasiones en árboles maderables (Riba-Hernández *et al.*, 2014). Algunos trabajos han estudiado la estructura genética fina en la demografía de plantas y han encontrado que esta aumenta conforme aumenta el tamaño de clase (Epperson and Alvarez-Buylla, 1997; Jacquemyn *et al.*, 2006; Yamagishi *et al.*, 2007), mientras que en otros trabajos no se ha encontrado estructura genética fina en ninguna clase (Fuchs and Hamrick, 2010) atribuido a la dispersión de semillas a largas distancias. Los resultados aquí obtenidos fueron muy variables para cada clase dentro de cada población, pero en términos generales existe mayor correlación genética en sitios conservados ( $r$ : 0.371, 0.284) a una distancia de 10 y 20 mts que en fragmentos de bosque ( $r$ : 0.076, 0.175) a distancias de 25 a 30 mts, similar a lo encontrado por Born *et al.*, 2008 y Ismail *et al.*, 2014. Varios mecanismos permiten explicar estos resultados; a) alta tasa de mortalidad en plántulas: (Epperson and Alvarez-Buylla, 1997) en zonas fragmentadas lo que conlleva a la eliminación de genotipos no viables para la germinación dejando únicamente individuos con genotipos capaces de germinar bajo las condiciones de escasez de recurso (competencia intraespecífica) mostrando un patrón de aleatoriedad en los genotipos con presencia de vecindarios homogéneos, mientras que en zonas continuas al tener más recurso todos los genotipos tienen la misma probabilidad de establecerse lo que repercute en la formación de grupos genéticos, b) polinización: las masas de floración son un factor importante en la formación de estructura genética fina si esta es mayor, también aumentará la visita de polinizadores (Quesada *et al.*, 2004) y por lo tanto mayor producción de frutos lo que puede generar formación de capsulas que contienen semillas polinizadas por un solo donador de polen en la misma panícula, que al ser dispersadas quedan ordenadas espacialmente de manera no aleatoria, mientras que para fragmentos al tener menos recursos los polinizadores pueden forrajear varias flores de diferentes panículas que al ser dispersadas los genotipos quedan ordenados aleatoriamente, c) dispersión de

semillas: esta puede ser a mayores distancias en zonas fragmentadas que continuas, al ser un bosque denso las corrientes de viento no logran desplazar a largas distancias las semillas, mientras que en zonas fragmentadas al no existir barreras físicas, la dispersión de semillas se da a mayor distancia. Así mismo un factor muy importante en la dispersión de semillas de *Astronium graveolens* y que además puede correlacionarse con la estructura genética fina encontrada, podría ser por la deposición de semillas causada por los frugívoros principalmente por el loro corona lila *Amazona finschi* ya que se ha encontrado que cerca del 56% de frutos son eliminados de las panículas y depositados bajo el árbol madre por gravedad durante el forrajeo (Villaseñor-Sánchez *et al.*, 2010) lo que aumenta la posibilidad formación de grupos genéticos reflejando alta correlación (Hamrick *et al.*, 1993). Los resultados aquí obtenidos permiten concluir que la dispersión de semillas se da a mayores distancias dentro de zonas fragmentadas y mientras que en zonas continuas parecen tener un radio de dispersión de 10 metros, y aunque la fragmentación antropogénica puede influir en la formación de estructura genética espacial fina debido al limitado flujo génico (De-Lucas *et al.*, 2009; Cascante- Marín *et al.*, 2014), en ocasiones esta puede seguir formando grupos genéticos pero sin disminuir el flujo de genes (Wang *et al.*, 2011), esto puede depender del medio de dispersión de polen, lo que al parecer indicar que los árboles polinizados por viento pueden mostrar distancias superiores a las polinizadas por abejas (Dutech *et al.*, 2005).

## CONCLUSIÓN

Se evaluó el efecto de la fragmentación en el estatus genético de *Astronium graveolens*, concluyendo que esta no afecta los índices de diversidad genética, además tampoco afecta en los índices de endogamia así como los patrones de parentesco, lo que indica que la fragmentación puede reducir el tamaño poblacional sin embargo no ha afectado los parámetros genéticos *Astronium graveolens*, adicionalmente se observó que no existe estructura genética entre poblaciones, resultado de eventos de flujo génico a largas distancias, sin embargo puede existir moderada estructura genética entre diferentes clases dentro de cada población lo que se atribuye principalmente a la ocurrencia de cuellos de botellas, adicionalmente se encontró mayor estructura genética fina en bosque continuo que en fragmentado lo que indica que existe un parentesco genético en individuos cercanos de 20 a 30 mts, estos resultados podría repercutir severamente en el estatus genético de *Astronium graveolens*, por lo que urge implementar un manejo controlado hacia la extracción de la madera de esta especie, lo que ha generado una disminución en sus poblaciones.

## ANEXO

### Anexo 1. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA *Astronium graveolens* CTAB 2X

1. Pesar de 20-30 mg de tejido seco (húmedo de 60-80 mg)
2. Moler con nitrógeno líquido
3. Colocar el tejido en un vial de 2.0 ml y poner 600 *ul* de buffer CTAB 2x 2% y colocar 3 *ul* de Rnasa y mantener en hielo
4. Incubar a baño maría a 60c° x 10 (o 45) minutos revolver 2 veces durante la incubación.
5. Agregar a cada muestra 600 *ul* de cloroformo-isoamil 24:1 y agitar hasta homogenizar las muestras (rotular nuevo juego de tubos)
6. Centrifugar a 7000 rpm x 12 minutos (o hasta que el sobrenadante quede transparente).
7. Recuperar el sobrenadante (300-500 *ul*) sin perturbar las dos fases. Pasarlo a un tubo nuevo. Mantener las muestras en hielo.
8. Precipitar el ADN con ¾ del volumen final con isopropanol frio.  
Para precipitar se balancea suavemente el tubo para 500 *ul* – 350*ul*  
400 *ul*- 300 *ul*  
300 *ul*- 200 *ul*
9. Dejar a -20 C°y seguir al día siguiente
10. Centrifugar a 10 000 rmp x5 minutos y eliminar el sobrenadante asegúrese de que la pastilla se quede pegada al fondo.
11. Limpiar el ADN con 600 *ul* de etanol 70% frio o al 100% y vortexear y centrifugar a 10,000 rmp x5 minutos. Repetir el paso nuevamente (dos veces para que se limpie más)
12. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el tubo invertido sobre una sanita hasta que alcohol se haya evaporado por completo (aproximadamente 2 horas) agregar 50 *ul* de TE y dejar disolver

.....

## BIBLIOGRAFÍA

- AGUILAR, R., QUESADA, M., ASHWORTH, L., HERRERIAS-DIEGO, Y., & LOBO, J. (2008). Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Molecular Ecology*, 17(24), 5177-5188.
- ALDRICH, P. R., HAMRICK, J. L., CHAVARRIAGA, P., & KOCHERT, G. (1998). Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Molecular Ecology*, 7(8), 933-944.
- ALLAYE KELLY, B., HARDY, O., & BOUVET, J. M. (2004). Temporal and spatial genetic structure in *Vitellaria paradoxa* (shea tree) in an agroforestry system in southern Mali. *Molecular Ecology*, 13(5), 1231-1240.
- ALVAREZ-BUYLLA, E. R., & GARAY, A. A. (1994). Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pioneer tree species. *Evolution*, 437-453.
- ANDRIANOELINA, O., FAVREAU, B., RAMAMONJISOA, L., & BOUVET, J. M. (2009). Small effect of fragmentation on the genetic diversity of *Dalbergia monticola*, an endangered tree species of the eastern forest of Madagascar, detected by chloroplast and nuclear microsatellites. *Annals of botany*, 104(6), 1231-1242.
- ARIAS, D. M., ALBARRÁN-LARA, A. L., GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, A., PEÑALOZA-RAMÍREZ, J., DORADO, O., & LEYVA, E. (2012). Genetic diversity and structure of wild populations of the tropical dry forest tree *Jacaratia mexicana* (Brassicales: Caricaceae) at a local scale in Mexico. *Revista de Biología Tropical*, 60(1), 01-10.
- BARLUENGA, M., AUSTERLITZ, F., ELZINGA, J. A., TEIXEIRA, S., GOUDET, J., & BERNASCONI, G. (2011). Fine-scale spatial genetic structure and gene dispersal in *Silene latifolia*. *Heredity*, 106(1), 13-24.
- BORN, C., HARDY, O. J., CHEVALLIER, M. H., OSSARI, S., ATTEKE, C., WICKINGS, E., & HOSSAERT-MCKEY, M. (2008). Small-scale spatial genetic structure in the Central African rainforest tree species *Aucoumea klaineana*: a stepwise approach to infer the impact of limited gene dispersal, population history and habitat fragmentation. *Molecular Ecology*, 17(8), 2041-2050.
- BOTTIN, L., VERHAEGEN, D., TASSIN, J., OLIVIERI, I., VAILLANT, A., & BOUVET, J. M. (2005). Genetic diversity and population structure of an insular tree, *Santalum austrocaledonicum* in New Caledonian archipelago. *Molecular ecology*, 14(7), 1979-1989.
- BULLOCK, S. H. (1986). Climate of Chamela, Jalisco, and trends in the south coastal region of Mexico. *Archives for Meteorology, Geophysics, and Bioclimatology, Series B*, 36(3-4), 297-316.
- BURCZYK, J., DIFAZIO, S. P., & ADAMS, W. T. (2004). Gene flow in forest trees: how far do genes really travel? *Forest Genetics*, 11(3/4), 179.

- CAETANO, S., NUSBAUMER, L., & NACIRI, Y. (2008). Chloroplast and microsatellite markers in *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. and close species of Anacardiaceae: toward the definition of a species complex? *Candollea*, 63(1), 115-130.
- CAETANO, S., PRADO, D., PENNINGTON, R. T., BECK, S., OLIVEIRA-FILHO, A., SPICHIGER, R., & NACIRI, Y. (2008). The history of seasonally dry tropical forests in eastern South America: inferences from the genetic structure of the tree *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). *Molecular Ecology*, 17(13), 3147-3159.
- CAETANO, S., SILVEIRA, P., SPICHIGER, R., & NACIRI-GRAVEN, Y. (2005). Identification of microsatellite markers in a neotropical seasonally dry forest tree, *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). *Molecular Ecology Notes*, 5(1), 21-23.
- CASCANTE, A., QUESADA, M., LOBO, J. J., & FUCHS, E. A. (2002). Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. *Conservation biology*, 16(1), 137-147.
- CASCANTE-MARÍN, A., OOSTERMEIJER, G., WOLF, J., & FUCHS, E. J. (2014). Genetic diversity and spatial genetic structure of an epiphytic bromeliad in Costa Rican montane secondary forest patches. *Biotropica*, 46(4), 425-432.
- CAVERS, S., DEGEN, B., CARON, H., LEMES, M. R., MARGIS, R., SALGUEIRO, F., & LOWE, A. J. (2005). Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. *Heredity*, 95(4), 281-289.
- COLLEVATTI, R. G., GRATTAPAGLIA, D., & HAY, J. D. (2001). Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10(2), 349-356.
- CONDIT, R., ASHTON, P. S., BAKER, P., BUNYAVEJCHEWIN, S., GUNATILLEKE, S., GUNATILLEKE, N., ...& LEE, H. S. (2000). Spatial patterns in the distribution of tropical tree species. *Science*, 288(5470), 1414-1418.
- CRISTOBAL-PÉREZ, J. 2011. Tesis licenciatura: Efecto de la fragmentación del hábitat sobre la demografía y la fenología de *Astronium graveolens* (Anacardiaceae). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- DAYANANDAN, S., DOLE, J., BAWA, K. S., & KESSELI, R. (1999). Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). *Molecular Ecology*, 8(10), 1585-1592.
- DAYANANDAN, S., DOLE, J., BAWA, K. S., & KESSELI, R. (1999). Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). *Molecular Ecology*, 8(10), 1585-1592.
- DEGEN, B., CARON, H., BANDOU, E., MAGGIA, L., CHEVALLIER, M. H., LEVEAU, A., & KREMER, A. (2001). Fine-scale spatial genetic structure of eight tropical tree species as analysed by RAPDs. *Heredity*, 87(4), 497-507.

- DE-LUCAS, A. I., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. C., VENDRAMIN, G. G., HIDALGO, E., & HEUERTZ, M. (2009). Spatial genetic structure in continuous and fragmented populations of *Pinus pinaster* Aiton. *Molecular ecology*, 18(22), 4564-4576.
- DIXO, M., METZGER, J. P., MORGANTE, J. S., & ZAMUDIO, K. R. (2009). Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest. *Biological Conservation*, 142(8), 1560-1569.
- DOMÍNGUEZ, C. A., ABARCA, C. A., EGUIARTE, L. E., & MOLINA-FREANER, F. (2005). Local genetic differentiation among populations of the mass-flowering tropical shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *New phytologist*, 166(2), 663-672.
- DOYLE, J. J. AND DOYLE J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem bull*, 19, 11-15.
- DUTECH, C., SORK, V. L., IRWIN, A. J., SMOUSE, P. E., & DAVIS, F. W. (2005). Gene flow and fine-scale genetic structure in a wind-pollinated tree species, *Quercus lobata* (Fagaceae). *American Journal of Botany*, 92(2), 252-261.
- EARL, D. A. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4(2), 359-361.
- EGUIARTE, L. E., PEREZ-NASSER, N., & PIÑERO, D. (1992). Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. *Heredity*, 69(3), 217-226.
- ELLSTRAND, N. C., & ELAM, D. R. (1993). Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual review of Ecology and Systematics*, 217-242.
- EPPERSON, B. K. (1993). Spatial and space-time correlations in systems of subpopulations with genetic drift and migration. *Genetics*, 133(3), 711-727.
- EPPERSON, B. K. (2000). Spatial genetic structure and non-equilibrium demographics within plant populations. *Plant Species Biology*, 15(3), 269-279.
- EPPERSON, B. K., & ALLARD, R. W. (1989). Spatial autocorrelation analysis of the distribution of genotypes within populations of lodgepole pine. *Genetics*, 121(2), 369-377.
- EPPERSON, B. K., & ALVAREZ-BUYLLA, E. R. (1997). Limited seed dispersal and genetic structure in life stages of *Cecropia obtusifolia*. *Evolution*, 51(1), 275-282.
- EVANNO, G., REGNAUT, S., & GOUDET, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8), 2611-2620.

- EXCOFFIER, L., & LISCHER, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10(3), 564-567.
- FALUSH, D., STEPHENS, M., & PRITCHARD, J. K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164(4), 1567-1587.
- FORÉ, S. A., HICKEY, R. J., VANKAT, J. L., GUTTMAN, S. I., & SCHAEFER, R. L. (1992). Genetic structure after forest fragmentation: a landscape ecology perspective on *Acer saccharum*. *Canadian journal of botany*, 70(8), 1659-1668.
- FUCHS, E. J., & HAMRICK, J. L. (2010). Genetic diversity in the endangered tropical tree, *Guaicum sanctum* (Zygophyllaceae). *Journal of Heredity*, 101(3), 284-291.
- GARCÍA-OLIVA, F., CAMOU, A., & MAASS, J. M. (2002). El clima de la región central de la costa del Pacífico mexicano. *Historia natural de Chamela*, 3(10).
- GONZÁLEZ-ASTORGA, J., & NÚÑEZ-FARFÁN, J. (2001). Effect of habitat fragmentation on the genetic structure of the narrow endemic *Brongniartia vazquezii*. *Evolutionary Ecology Research*, 3(7), 861-872.
- HAMRICK, J. L. (2004). Response of forest trees to global environmental changes. *Forest ecology and management*, 197(1), 323-335.
- HAMRICK, J. L., GODT, M. J. W., MURAWSKI, D. A., & LOVELESS, M. D. (1991). Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. *Genetics and conservation of rare plants*, 75-86.
- HAMRICK, J. L., MURAWSKI, D. A., & NASON, J. D. (1993). The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. In *Frugivory and seed dispersal: ecological and evolutionary aspects* (pp. 281-297). Springer Netherlands.
- HAMRICK, J. L., MURAWSKI, D. A., & NASON, J. D. (1993). The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. In *Frugivory and seed dispersal: ecological and evolutionary aspects* (pp. 281-297). Springer Netherlands.
- HANSON, T. R., BRUNSFELD, S. J., FINEGAN, B., & WAITS, L. P. (2008). Pollen dispersal and genetic structure of the tropical tree *Dipteryx panamensis* in a fragmented Costa Rican landscape. *Molecular Ecology*, 17(8), 2060-2073.
- HARDY, O. J., MAGGIA, L., BANDO, E., BREYNE, P., CARON, H., CHEVALLIER, M. H., ...& TROISPOUX, V. (2006). Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. *Molecular ecology*, 15(2), 559-571.
- ISMAIL, S. A., GHAZOUL, J., RAVIKANTH, G., KUSHALAPPA, C. G., SHAANKER, R. U., & KETTLE, C. J. (2014). Fragmentation Genetics of *Vateria indica*: implications for management of forest genetic resources of an endemic dipterocarp. *Conservation genetics*, 15(3), 533-545.

- JACQUEMYN, H., BRYN, R., VANDEPITTE, K., HONNAY, O., & ROLDÁN-RUIZ, I. (2006). Fine-scale genetic structure of life history stages in the food-deceptive orchid *Orchis purpurea*. *Molecular Ecology*, 15(10), 2801-2808.
- JONES, F. A., & HUBBELL, S. P. (2006). Demographic spatial genetic structure of the Neotropical tree, *Jacaranda copaia*. *Molecular ecology*, 15(11), 3205-3217.
- KALISZ, S., NASON, J. D., HANZAWA, F. M., & TONSOR, S. J. (2001). Spatial population genetic structure in *Trillium grandiflorum*: the roles of dispersal, mating, history, and selection. *Evolution*, 55(8), 1560-1568.
- KRAMER, A. T., ISON, J. L., ASHLEY, M. V., & HOWE, H. F. (2008). The paradox of forest fragmentation genetics. *Conservation Biology*, 22(4), 878-885.
- LEMES, M. R., GRIBEL, R., PROCTOR, J., & GRATTAPAGLIA, D. (2003). Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. *Molecular Ecology*, 12(11), 2875-2883.
- LIENERT, J. (2004). Habitat fragmentation effects on fitness of plant populations—a review. *Journal for nature conservation*, 12(1), 53-72.
- LINHART, Y. B., MITTON, J. B., STURGEON, K. B., & DAVIS, M. L. (1981). Genetic variation in space and time in a population of ponderosa pine. *Heredity*, 46(3), 407-426.
- MAGRACH, A., LAURANCE, W. F., LARRINAGA, A. R., & SANTAMARIA, L. (2014). Meta-Analysis of the Effects of Forest Fragmentation on Interspecific Interactions. *Conservation Biology*, 28(5), 1342-1348.
- MATSCHINER, M., & SALZBURGER, W. (2009). TANDEM: integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows. *Bioinformatics*, 25(15), 1982-1983.
- MOXON, E. R., & WILLS, C. (1999). DNA microsatellites: agents of evolution? *Scientific American*, 280(1), 94-99.
- NASON, J. D., & HAMRICK, J. L. (1997). Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of neotropical canopy trees. *Journal of Heredity*, 88(4), 264-276.
- NOVICK, R. R., LEMES, M. R., NAVARRO, C., CACCONE, A., & BERMINGHAM, E. (2003). Genetic structure of Mesoamerican populations of big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, 12(11), 2885-2893.
- O'CONNELL, L. M., MOSSELER, A., & RAJORA, O. P. (2006). Impacts of forest fragmentation on the mating system and genetic diversity of white spruce (*Picea glauca*) at the landscape level. *Heredity*, 97(6), 418-426.
- PEAKALL, R. AND SMOUSE P.E. (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.

- PENNINGTON, T. D., & SARUKHÁN, J. (2005). *Árboles tropicales de México: manual para la identificación de las principales especies*. UNAM.
- PEW, J., MUIR, P. H., WANG, J., & FRASIER, T. R. (2015). related: an R package for analysing pairwise relatedness from codominant molecular markers. *Molecular ecology resources*, 15(3), 557-561.
- PICCA, A., HELGUERA, M., SALOMÓN, N AND CARRERA, A. 2004. Marcadores Moleculares. In: *Biología y Mejoramiento Vegetal. Parte II. Herramientas básicas*. Ediciones INTA. Echenique, V., Rubinstein, C., y L. Mroginski (Eds.). Parte II, Cap. 4 pp. 61-68.
- PIOTTI, A. (2009). The genetic consequences of habitat fragmentation: the case of forests. *iForest-Biogeosciences and Forestry*, 2(3), 75-76.
- PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M., & DONNELLY, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- PUTZ, F. E., ZUIDEMA, P. A., SYNNOTT, T., PEÑA-CLAROS, M., PINARD, M. A., SHEIL, D., ...& PALMER, J. (2012). Sustaining conservation values in selectively logged tropical forests: the attained and the attainable. *Conservation Letters*, 5(4), 296-303.
- QUESADA, M., STONER, K. E., LOBO, J. A., HERRERIAS-DIEGO, Y., PALACIOS-GUEVARA, C., MUNGUÍA-ROSAS, M. A., ...& ROSAS-GUERRERO, V. (2004). Effects of Forest Fragmentation on Pollinator Activity and Consequences for Plant Reproductive Success and Mating Patterns in Bat-pollinated Bombacaceous Trees1. *Biotropica*, 36(2), 131-138.
- R CORE TEAM (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- RATHCKE, B. J. (1993). Habitat fragmentation and plant—pollinator. *Current Science*, 65(3), 273-277.
- RIBA-HERNÁNDEZ, P., SEGURA, J. L., FUCHS, E. J., & MOREIRA, J. (2014). Population and genetic structure of two dioecious timber species *Virola surinamensis* and *Virola koschnyi* (Myristicaceae) in southwestern Costa Rica. *Forest Ecology and Management*, 323, 168-176.
- RITLAND, K. (1996). Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genetical Research*, 67(02), 175-185.
- ROSAS, F., QUESADA, M., LOBO, J. A., & SORK, V. L. (2011). Effects of habitat fragmentation on pollen flow and genetic diversity of the endangered tropical tree *Swietenia humilis* (Meliaceae). *Biological Conservation*, 144(12), 3082-3088.
- ROSSETTO, M., JONES, R., & HUNTER, J. (2004). Genetic effects of rainforest fragmentation in an early successional tree (*Elaeocarpus grandis*). *Heredity*, 93(6), 610-618.
- SANCHEZ-AZOFEIFA, G. A., QUESADA, M., CUEVAS-REYES, P., CASTILLO, A., & SANCHEZ-MONTOYA, G. (2009). Land cover and conservation in the area of influence of the

- Chamela-Cuixmala Biosphere Reserve, Mexico. *Forest Ecology and Management*, 258(6), 907-912.
- SCHWARCZ, K. D., PATACA, C. L., ABREU, A. G., BARIANI, J. M., MACRINI, C. M., & SOLFERINI, V. N. (2010). Genetic diversity in Atlantic Forest trees: fragmentation effects on *Astronium graveolens* (Anacardiaceae) and *Metrodorea nigra* (Rutaceae), species with distinct seed dispersal strategies. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 164(3), 326-336.
- SMOUSE, P. E., & PEAKALL, R. (1999). Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity*, 82(5), 561-573.
- SMOUSE, P. E., & PEAKALL, R. (1999). Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity*, 82(5), 561-573.
- TORRES, M. AND MORENO, S. 2005. Caracterización mediante marcadores moleculares basados en ADN. Departamento de Biología vegetal. Universidad Politécnica de Madrid.
- TRAPNELL, D. W., HAMRICK, J. L., & NASON, J. D. (2004). Three-dimensional fine-scale genetic structure of the neotropical epiphytic orchid, *Laelia rubescens*. *Molecular Ecology*, 13(5), 1111-1118.
- VAN OOSTERHOUT, C., HUTCHINSON, W. F., WILLS, D. P., & SHIPLEY, P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535-538.
- VILLASENOR-SÁNCHEZ, E. I., DIRZO, R., & RENTON, K. (2010). Importance of the lilac-crowned parrot in pre-dispersal seed predation of *Astronium graveolens* in a Mexican tropical dry forest. *Journal of Tropical Ecology*, 26(2), 227.
- WANG, R., COMPTON, S. G., & CHEN, X. Y. (2011). Fragmentation can increase spatial genetic structure without decreasing pollen-mediated gene flow in a wind-pollinated tree. *Molecular Ecology*, 20(21), 4421-4432.
- WATCHARAWONGPAIBOON, N., & CHUNWONGSE, J. (2007). Development of microsatellite markers from an enriched genomic library of pumpkin (*Cucurbita moschata* L.). *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 29(5), 1217-1223.
- WHITE, G. M., BOSHIER, D. H., & POWELL, W. (1999). Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. *Molecular Ecology*, 8(11), 1899-1909.
- WICKNESWARI, R., HO, W. S., LEE, K. S., & LEE, C. T. (2004). Impact of disturbance on population and genetic structure of tropical forest trees. *Forest Genetics*, 11(3/4), 193.
- WRIGHT, S. (1946). Isolation by distance under diverse systems of mating. *Genetics*, 31(1), 39.
- WRIGHT, S. (1978). Vol. 4: Variability within and among natural populations. *Evolution and the genetics of populations: a treatise in four volumes: University of Chicago Press*.

- YAMAGISHI, H., TOMIMATSU, H., & OHARA, M. (2007). Fine-scale spatial genetic structure within continuous and fragmented populations of *Trillium camschatcense*. *Journal of Heredity*, 98(4), 367-372.
- YOUNG, A., BOYLE, T., & BROWN, T. (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(10), 413-418.