



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

EFFECTOS DE LA FRAGMENTACIÓN DEL BOSQUE TROPICAL:
BIOLOGÍA REPRODUCTIVA Y SISTEMA DE APAREAMIENTO EN
POBLACIONES DE *Dieffenbachia seguine* (Araceae)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

SANDRA EUGENIA CUARTAS HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JUAN S. NÚÑEZ FARFÁN

MÉXICO D.F.

JUNIO, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta investigación fue posible gracias a la beca otorgada por la División de Estudios de Posgrado DGEP para la realización de los estudios de Doctorado en Ciencias Biológicas y al apoyo económico para realizar el trabajo de campo y de laboratorio obtenido del proyecto “Genética de la Conservación de selvas tropicales: Efectos de la fragmentación en especies de plantas con valor ecológico, económico y de restauración” financiado por SEMARNAT-CONACyT (0355).

Agradezco al Dr. Juan Núñez por su apoyo y su confianza.

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial por sus aportes académicos y su colaboración durante estos años:

Dr. Luis Eguiarte Fruns

Dra. Susana Magallón

Agradezco a mis compañeros del Laboratorio de Genética Ecológica y Evolución, por su apoyo en el campo y en el laboratorio, por su disponibilidad para las discusiones académicas y por su amistad: Jesús Vargas, Elsa Figueroa, Alfredo Montero, Lorena Cruz, Armando López y Rafael Bello. Agradezco especialmente al Dr. Juan Fornoni por sus valiosos aportes académicos. Agradezco a Lilibeth, Pilar y Mariana por su amabilidad.

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
<i>Especie</i>	3
<i>Sitio de estudio</i>	5
<i>Literatura citada</i>	6

CAPÍTULO I. EFFECTS OF HABITAT FRAGMENTATION ON FLORAL PHENOLOGY, PREDATION AND FRUCTIFICATION IN POPULATIONS OF *DIEFFENBACHIA SEGUINE* (ARACEAE) IN MEXICO.

INTRODUCTION	9
METHODS	10
<i>Species</i>	10
<i>Study sites</i>	11
<i>Floral biology and visitors</i>	11
<i>Self-incompatibility</i>	11
<i>Phenology. census of reproductive ramets</i>	12
<i>Statistical analysis</i>	12
RESULTS	12
<i>Flowering cycle</i>	12
<i>Visitors</i>	14
<i>Interactions: Feeding flies and ant-predation</i>	14
<i>Self-incompatibility</i>	15
<i>Phenology: census of reproductive ramets</i>	15
DISCUSSION	18
<i>Floral biology</i>	18
<i>Visitors</i>	19
<i>Feeding flies and ant-predation</i>	21
<i>Self-incompatibility</i>	22
<i>Phenology: census of reproductive ramets</i>	22
CITED LITERATURE	24
APPENDIX 1. Most frequent visitors to Araceae species in Neotropical forests.	28

CAPÍTULO II. ÉXITO REPRODUCTIVO FEMENINO DE *DIEFFENBACHIA SEGUINE* (ARACEAE) EN LA REGIÓN DE LOS TUXTLAS, VERACRUZ, MÉXICO.

INTRODUCCIÓN	30
MÉTODO	32

<i>Especie y sitios de estudio</i>	32
<i>Éxito reproductivo</i>	33
<i>Limitación de polen</i>	33
<i>Análisis estadísticos</i>	34
RESULTADOS	35
<i>Éxito reproductivo</i>	35
<i>Limitación de polen</i>	40
DISCUSIÓN	42
<i>Limitación por polen</i>	42
<i>Alta tasa de aborto de infrutescencias y semillas</i>	43
<i>Polinizadores</i>	44
<i>Recursos y microclima</i>	45
<i>Tamaño de la población y tipo de hábitat</i>	46
<i>Depredación de infrutescencias y semillas</i>	47
<i>La carga genética</i>	47
<i>Variación temporal</i>	48
<i>Relación con el área del fragmento</i>	48
LITERATURA CITADA	49
CAPÍTULO III THE GENETIC STRUCTURE OF THE TROPICAL UNDERSTORY HERB <i>DIEFFENBACHIA SEGUINE</i> L. BEFORE AND AFTER FOREST FRAGMENTATION.	
ABSTRACT	54
INTRODUCTION	54
METHODS	56
<i>Species description</i>	56
<i>Study site and field collection</i>	56
<i>Genetic markers</i>	58
<i>Statistical analysis</i>	58
RESULTS	59
<i>Genetic diversity</i>	59
<i>Genetic structure</i>	62
DISCUSSION	63
<i>Genetic diversity</i>	63
<i>Genetic structure</i>	64
ACKNOWLEDGMENTS	65
REFERENCES	65

CAPÍTULO IV. SISTEMA DE APAREAMIENTO Y FLUJO DE POLEN DE *DIEFFENBACHIA SEGUINE*
EN HÁBITAT FRAGMENTADO Y CONTINUO.

INTRODUCCIÓN	70
MÉTODO	72
<i>Especie</i>	72
<i>Sitio de estudio</i>	72
<i>Muestreo</i>	72
<i>Sistema de apareamiento</i>	73
<i>Estructura de los gametos masculinos (Two-Gener)</i>	74
<i>Probabilidad de ocurrencia (Asignación)</i>	75
RESULTADOS	76
<i>Sistema de apareamiento</i>	76
<i>Estructura de los gametos masculinos (Two-Gener)</i>	77
<i>Probabilidad de ocurrencia (Asignación)</i>	79
DISCUSIÓN	81
<i>Sistema de apareamiento</i>	82
<i>Estructura de gametos masculinos (Two-Gener)</i>	85
<i>Probabilidad de ocurrencia (Asignación)</i>	87
<i>Conclusión</i>	88
LITERATURA CITADA	88
DISCUSIÓN GENERAL	92
APÉNDICE 1. Análisis de Paternidad (Método)	101
APÉNDICE 2. Análisis de Paternidad (Resultados)	102
APÉNDICE 3. Simulaciones para determinar la relación entre la varianza y la proporción	103

RESUMEN

La reducción del tamaño poblacional y las alteraciones en los patrones de flujo génico generados por la fragmentación del hábitat tienen el potencial de alterar la tasa de reproducción individual, afectar negativamente la diversidad y estructura genética de las poblaciones y modificar las interacciones entre especies. En este estudio se evaluaron las hipótesis sobre a) la disminución en el éxito reproductivo femenino (ER), b) la reducción en la diversidad genética y c) el aumento en la estructura genética de individuos adultos y gametos masculinos en poblaciones de fragmentos, comparado con poblaciones de bosque continuo. Para evaluar estas hipótesis estudiamos cuatro poblaciones (dos en selva continua y dos en fragmentos) de *Dieffenbachia seguine* (Araceae), una herbácea polinizada por escarabajos, en Los Tuxtlas (Veracruz, México). Para evaluar el ER femenino se colectaron infrutescencias durante dos temporadas reproductivas (2003 y 2005) y se contaron las semillas sanas. Para evaluar la diversidad y estructura genética se muestrearon 30 individuos adultos en promedio en cada una de diez poblaciones; para evaluar la estructura genética de los gametos masculinos muestreamos 16 familias (madres y sus progenies) en cada una de cuatro poblaciones y analizamos la variación genética empleando nueve loci enzimáticos.

El ER femenino (infrutescencias y semillas) fue menor en los fragmentos debido a una menor tasa de visita de polinizadores y a una mayor depredación de infrutescencias. La diversidad genotípica fue menor en los fragmentos, mientras que la estructura genética de adultos y gametos masculinos no ha sido influenciada por la fragmentación. Esto es debido a que el flujo de polen es muy localizado: la mayoría (>70%) de los gametos masculinos fueron asignados a su población de origen. Estos resultados indican que hay mayor limitación de polen en los fragmentos. Sin embargo, aún en la selva continua, las poblaciones de *D. seguine* presentan dinámicas ecológicas aisladas (i.e., flujo de polen restringido). La fragmentación tiene el potencial de alterar los patrones de flujo génico a través de la reducción del área efectiva de polinización causada por el aumento en la densidad de individuos reproductivos en los fragmentos.

ABSTRACT

Reductions in population size and changes on the pattern of gene flow due to habitat fragmentation, potentially, can alter the individual reproductive rate, affect negatively the genetic diversity and structure of populations and modify interactions among species. In this study, we assessed three hypotheses: a) Reduction in female reproductive success, b) reduction in genetic diversity and c) increase in genetic structure of adult and male gamete populations in fragments as compared to continuous forest populations.

To test the hypotheses we sampled four populations (two in the continuous forest and two in fragments) of *Dieffenbachia seguine* (Araceae), a herb beetle-pollinated, in los Tuxtlas (Veracruz, Mexico). To assess the female reproductive success, we collected infructescences in two reproductive seasons and counted the sound seeds. To assess the genetic diversity and genetic structure we sampled 30 adult individuals on average per each of ten populations; to assess the genetic structure of male gametes, we sampled 16 families (mothers and progenies) in each of four populations and analyzed the genetic variation using nine allozyme loci.

Female reproductive success (infructescences and seeds) was smaller in fragments due to a smaller pollinator visitation rate and a higher damage of infructescences. Genotypic diversity was smaller in fragments, while genetic structure of adults and male gametes have not been influenced by fragmentation. This is due to a localized pollen flow: most (>70%) male gametes were assigned to its own population. The results indicate that pollen limitation is higher in fragments. Moreover, *D. seguine* populations show isolated ecological (pollen flow) dynamics in both fragments and continuous forest. Fragmentation has the potential of altering the gene flow patterns through the reduction of the effective pollination area, as a consequence of an increase in the density of reproductive individuals in fragments.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La fragmentación del hábitat es un proceso a nivel de paisaje en el cual un hábitat específico es progresivamente subdividido en fragmentos más pequeños y aislados (Fahrig 2003). Actualmente la fragmentación es la trayectoria predominante del cambio del paisaje (McGarigal & Cushman 2002), principalmente en los bosques tropicales. En los últimos 15 años se ha realizado un amplio número de estudios teóricos y empíricos sobre los efectos de la fragmentación del hábitat (Saunders *et al.* 1991, Doak *et al.* 1992, Debinski & Holt 2000, Hobbs & Yates 2003). Algunos estudios proveen evidencia de pérdida de especies (Kattan *et al.* 1994, Laurance & Bierregaard 1997, Golden & Crist 2000, Fahrig 2003, Ferraz *et al.* 2003), cambios en procesos dinámicos poblacionales y de la comunidad (Murcia 1996, Didham *et al.* 1998, Caley *et al.* 2001) y cambios en el ambiente abiótico de los fragmentos (Saunders *et al.* 1991).

Sin embargo, hasta el momento, los efectos de la fragmentación sobre las interacciones entre las especies han sido poco evaluados (Didham *et al.* 1996, McGarigal & Cushman 2002), a pesar de que la mayoría de las especies viven en hábitat fragmentados. Por lo tanto, el entendimiento de las relaciones entre los cambios estructurales y funcionales del paisaje producidos por la fragmentación y la dinámica genética y ecológica de las poblaciones es actualmente de gran importancia (Jaeger 2000, Ricketts 2001, McGarigal & Cushman 2002).

La magnitud del impacto de la fragmentación depende de su efecto sobre la interacción organismo-paisaje, es decir, el efecto sobre la capacidad o posibilidad de movimiento de las especies entre los fragmentos. Si hay una modificación de los patrones de movimiento, puede cambiar la intensidad de las interacciones bióticas y la conexión demográfica y genética entre las poblaciones que permanecen en los fragmentos (Fahrig 2003). Por otro lado, la reducción en la conectividad y el tamaño de las poblaciones locales no sólo causan la alteración en las interacciones entre especies, sino que también pueden promover cambios en la diversidad y la estructura genética. Esos cambios son generados por la reducción del flujo génico entre poblaciones, el aumento en la deriva génica y el aumento de la endogamia dentro de las poblaciones. Estos procesos pueden conducir a la erosión de la variación genética y al aumento en la divergencia genética entre poblaciones (Templeton *et al.* 1990, Ellstrand & Elam 1993, Young *et al.* 1996). Tales efectos tienen

implicaciones en la persistencia de las poblaciones, porque pueden limitar la capacidad de la especie para responder a los cambios ambientales (Young *et al.* 1996).

Por lo tanto, puede considerarse que la alteración de las conexiones ecológicas existentes entre los elementos del paisaje espacialmente separados, constituye el *impacto directo* más importante de la fragmentación (Doak *et al.* 1992, Jaeger 2000). En particular, la polinización puede ser afectada por cambios en la composición o comportamiento del gremio de polinizadores (Murcia 1996, Kearns *et al.* 1998, Steffan-Dewenter & Tsharntke 2002, Tsharntke & Brandl 2004). Esto es relevante porque los polinizadores tienen un impacto directo en la estabilidad de las poblaciones de plantas, debido a que éstas dependen de los polinizadores para la remoción exitosa de polen y producción de frutos (Murcia 1996). Al mismo tiempo, porque los polinizadores determinan los patrones de flujo génico dentro y entre poblaciones, debido a que establecen las oportunidades de apareamiento a través de la dispersión de granos de polen entre las flores (Fritz & Nilsson 1994, Barret & Harder 1996) y en consecuencia, pueden modificar el sistema de apareamiento y la estructura genética de las poblaciones de plantas (Bawa 1990, Loveless & Hamrick 1984).

Considerando la escasez de estudios en este ámbito, es prioritario realizar un esfuerzo por entender los efectos de la fragmentación sobre la polinización específicamente en los bosques tropicales. Asimismo, es necesario evaluar tales interacciones a gran escala espacial y a largo plazo, dado que la mayoría de los procesos e interacciones ecológicas dependen de escalas espaciales mayores que un simple parche de hábitat, y tratar de determinar el umbral de escalas al cual se mantienen las interacciones.

La interacción planta-polinizador puede ser evaluada a través de su efecto en la producción de frutos y semillas (éxito reproductivo femenino) y en los patrones de movimiento de polen (éxito reproductivo masculino, apareamientos y diversidad y estructura genética).

El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de la fragmentación del bosque tropical en la biología reproductiva y el sistema de apareamiento de *Dieffenbachia seguine*, una hierba terrestre polinizada por escarabajos.

Para responder a este objetivo, se estudiaron cuatro poblaciones, dos en la Reserva Los Tuxtlas-UNAM (bosque continuo) y dos en fragmentos (Fig. 2, Tabla 1). Se realizó un

seguimiento a estas poblaciones durante cuatro años para responder a preguntas que se abordan de manera particular en cuatro capítulos:

1. Biología reproductiva: la biología floral individual y poblacional, los polinizadores, las interacciones, el aborto y velocidad de maduración de las infrutescencias.
2. Éxito reproductivo femenino: probabilidad de éxito en la producción de frutos y semillas y limitación de polen.
3. Diversidad y estructura genética: heterocigosis, endogamia dentro de poblaciones y diferenciación entre poblaciones.
4. Sistema de apareamiento y flujo de polen:
 - a. Parámetros del sistema de apareamiento: tasa de entrecruzamiento, endogamia en la generación parental, correlación de paternidad y número efectivo de padres.
 - b. Estructura de los gametos masculinos (Two-gener): heterogeneidad de las “nubes de polen” entre madres.
 - c. Estimación de la probabilidad de ocurrencia de los genotipos individuales de adultos y gametos masculinos dentro de su población y en las otras poblaciones mediante el método de Asignación.

El carácter complementario de la información obtenida en el campo y en el laboratorio permite dar a esta investigación un enfoque integral, que ofrece una gran ventaja respecto a estudios que sólo abordan una de las áreas. Dicho enfoque permite detectar de manera rigurosa el impacto de la fragmentación en los procesos ecológicos y genéticos que mantienen estables a las poblaciones.

Especie

Dieffenbachia seguine (Araceae) es una hierba perenne de bosques tropicales primarios, y ocasionalmente crece alrededor de claros dentro del bosque (Croat 1994). Tiene la capacidad de propagarse vegetativamente y produce entre 1-4 inflorescencias, dependiendo de su tamaño. El espádice es erecto, en la porción basal se encuentra un gran número de flores pistiladas y en la parte apical, las flores estaminadas (Fig. 1). Rodeando las flores se encuentran 4-5 estaminodios; las flores estaminadas presentan 4-5 estambres. La porción femenina se encuentra separada de la porción masculina por una zona cubierta de muy pocas flores masculinas aplanadas que raramente son fértiles. La espata es verde,

cerrada tubular y persiste hasta que el fruto madura (Mayo *et al.* 1997). Las flores pistiladas maduran primero que las flores estaminadas (i.e., dicogamia). La apertura de las inflorescencias de un ramet no se solapa temporalmente. La floración ocurre durante todo el año con un pico entre junio y noviembre. Cada flor pistilada produce un fruto con una semilla (Cuartas 2002). Los frutos son bayas naranja a rojas. Las semillas son globosas, con la testa lisa y verde oscura.

Esta planta se encuentra en el sotobosque formando parches densos. La densidad tiende a ser mayor en poblaciones de fragmentos (Tabla 1). Es polinizada por escarabajos del género *Cyclocephala* y dispersada por aves de los géneros *Habia* y *Turdus*. Algunas semillas han sido encontradas en *Hylocichla mustelina*, un ave que migra durante el invierno desde Estados Unidos a Panamá. El género comprende 85 especies, distribuidas desde el sur de México hasta Ecuador y Brasil (Mayo *et al.* 1997).

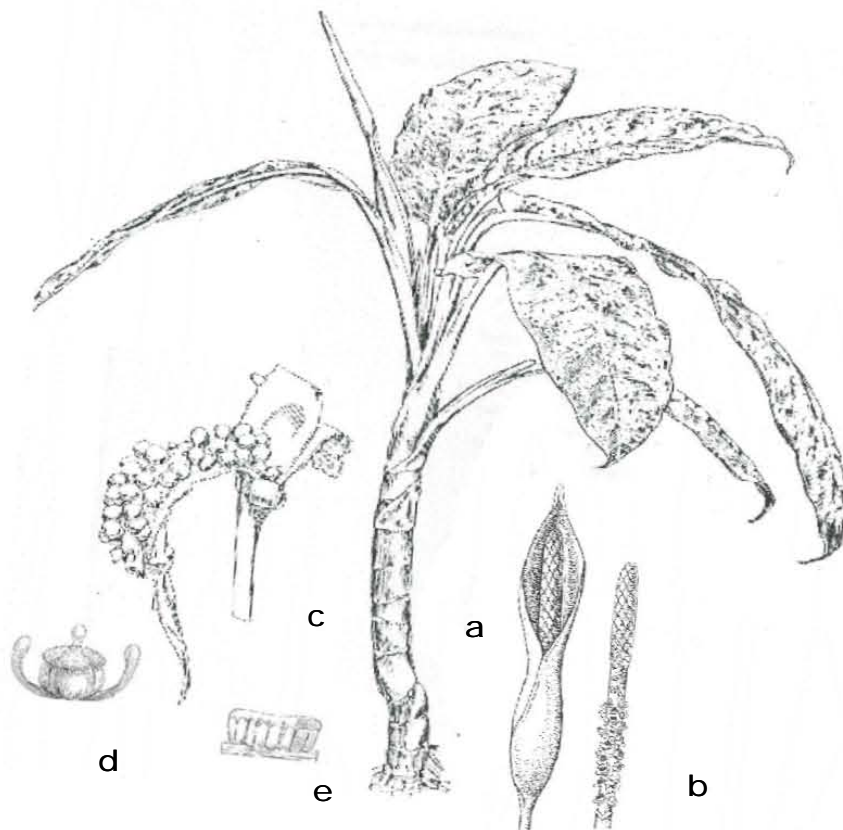


Figura 1. *Dieffenbachia seguine*. a) ramet, b) inflorescencia y detalle del espádice, c) infrutescencia, d) flor pistilada con estaminodios, e) flor estaminada. Tomado de Mayo *et al.* (1997).

Sitio de estudio

El área de estudio se encuentra en la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas, en Veracruz, México. Esta zona constituye el límite norte de la distribución de los bosques tropicales en América y se encuentra altamente fragmentada, como consecuencia de altas tasas de deforestación en los últimos 35 años (González *et al.* 1997). Se eligieron cuatro poblaciones, dos en selva continua y dos en fragmentos para responder a las preguntas de los Capítulos I, II y IV (Fig. 2). Para responder a la pregunta del Capítulo III se eligieron diez poblaciones, cuatro en bosque continuo y seis en fragmentos (ver Cap. III, Fig. 1). El bosque continuo es la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas-UNAM, la cual comprende una extensión mayor a 640 ha de bosque no perturbado. Los fragmentos son remanentes de bosque que conservan gran parte de la estructura y composición de la vegetación característica de los bosques primarios. La localización, área y densidad de las poblaciones se describen en la Tabla 1.

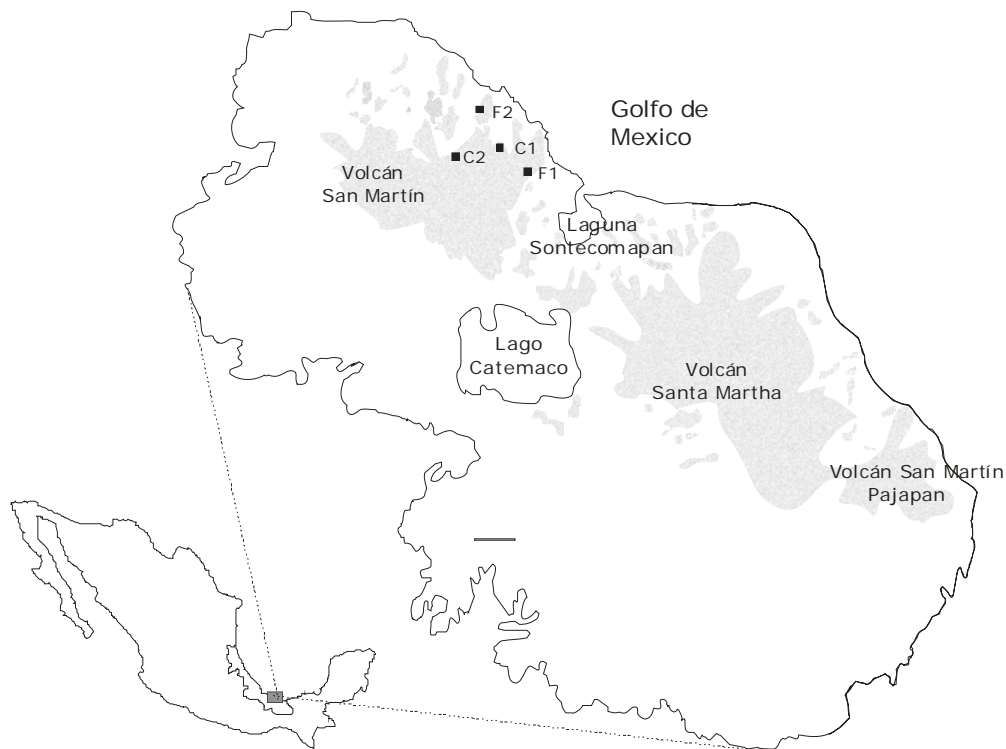


Figura 2. Localización de las poblaciones de *Dieffenbachia seguine* estudiadas en la Reserva de la Biósfera Los Tuxtlas. La población C1 está localizada en la Estacion de Biología Tropical LosTuxtlas. La barra corresponde a 4 Km. F: fragmentos, C: bosque continuo.

Tabla 1. Localización, área y densidad de ramets vegetativos (en 2000) en cuatro poblaciones de *Dieffenbachia seguine* en la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas.

Hábitat	Población	Área (ha)	Coordenadas	Densidad (ind/m ²)
Fragmentado	F1	3	18°35'050 N - 95°02'600 W	6
	F2	37	18°37'739 N - 95°05'157 W	1.25
Continuo	C1	640	18°35'240 N - 95°04'620 W	0.26
	C2	640	18°35'245 N - 95°05'912 W	1.2

LITERATURA CITADA

- Barret SCH & Harder LD. 1996. Ecology and evolution of plant mating. *TREE* 2: 73-79.
- Bawa KS. 1990. Plant-pollinator interactions in tropical rain forest. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 21: 399-422.
- Caley MJ, Buckley KA & Jones PJ. 2001. Separating ecological effects of habitat fragmentation, degradation and loss on coral commensals. *Ecology* 82: 3435-3448.
- Croat T. 1994. Taxonomic status of Neotropical Araceae. *Aroideana* 17: 33-60.
- Cuartas S. 2002. Efectos ecológicos y genéticos de la fragmentación en las poblaciones de *Dieffenbachia seguine* (Araceae) en Los Tuxtlas, Veracruz, México. MSc Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Debinski DM & Holt RD. 2000. A survey and overview of habitat fragmentation experiments. *Cons. Biol.* 14: 342-355.
- Didham RK, Hammond PM, Lawton JH, Eggleton P & Stork NE. 1998. Beetle species responses to tropical forest fragmentation. *Ecol. Mon.* 68: 295-323.
- Doak DF, Marino PC & Kareiva PM. 1992. Spatial scales mediates the influence of habitat fragmentation on dispersal success: implications for conservation. *Theor. Pop. Biol.* 41: 315-336.
- Ellstrand NC & Elam DR. 1993. Population genetic consequences of small population size. Implications for plant conservation. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 24: 217-42.
- Fahrig L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 34: 487-515.
- Ferraz G, Rusell GJ, Stoufer PC, Bierregaard RO, Pim SL & Lovejoy TE. 2003. Rates of species loss from Amazonian fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 14069-14073.
- Fritz A & Nilsson A. 1994. How pollinator-mediated mating varies with population size in plants. *Oecologia* 100: 451-462.
- Golden DM & Crist TO. 2000. Experimental effects of habitat fragmentation on rove beetles and ants: patch area or edge? *Oikos* 90: 525-538.
- González E, Dirzo R & Vogt RC. 1997. *Historia Natural de Los Tuxtlas*. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

Hobbs RJ & Yates CJ. 2003. Turner review No. 7. Impact of ecosystem fragmentation on plant populations: generalizing the idiosyncratic. *Austr. J. Bot.* 51: 471-488.

Jaeger JA. 2000. Landscape division, splitting index, and effective mesh size: new measures of landscape fragmentation. *Land. Ecol.* 15: 115-130.

Kattan GH, Álvarez-López H & Giraldo M. 1994. Forest fragmentation and bird extinctions: San Antonio eighty years later. *Cons. Biol.* 8: 138-146.

Kearns CA, Inouye DW & Waser NM. 1998. Endangered mutualisms: The conservation of plant-pollinator interactions. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 29: 83-112.

Laurance WF & Bierregaard. 1997. *Tropical forest remnants: Ecology, management, and conservation of fragmented communities*. pp 3-12. The University of Chicago Press, USA.

Loveless MD & Hamrick JL. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 65-95.

Mayo SJ, Bogner J & Boyce PC. 1997. *The genera of Araceae*. Continental Printing, Belgium.

McGarigal K & Cushman SA. 2002. Comparative evaluation of experimental approaches to the study of habitat fragmentation effects. *Ecol. Appl.* 12: 335-345.

Murcia C. 1996. Forest fragmentation and the pollination of neotropical plants. En Shelhas J & Greenberg R (eds) *Forest patches in tropical landscapes*. pp 19-36. Island Press. Washington, D.C.

Saunders DA, Hobbs RJ & Margules CR. 1991. Biological consequences of ecosystem fragmentation: A review. *Cons. Biol.* 5(1): 18-32.

Steffan-Dewenter I & Tsharntke T. 2002. Insect communities and biotic interactions on fragmented calcareous grasslands-a mini review. *Biol. Cons.* 104: 275-284.

Tsharntke T & Brandl R. 2004. Plant-insect interactions in fragmented landscapes. *Ann. Rev. Entomol.* 49: 405-430.

Templeton AR, Shaw K, Routman E & Davis SK. 1990. The genetic consequences of habitat fragmentation. *Ann. Miss. Bot. Garden* 77: 13-27.

Young A, Boyle T & Brown T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *TREE* 11: 413-418.

Capítulo I

**Effects of habitat fragmentation on floral phenology,
predation and fructification in populations of
Dieffenbachia seguine (Araceae) in Mexico**

INTRODUCTION

The analysis of the demographic effects of habitat fragmentation is of much importance because the reduction of population sizes increases the risk of extinction (Wilcox & Murphy 1985, Gibbs 2001). It occurs through a substantial loss of fitness, which is almost an inevitable consequence of fragmentation (Lande 1999), or through the reduction of the capacity of dispersal in the landscape precluding immigration to the patches (Wilcox & Murphy 1985). In small populations, the random individual variation in the rate of reproduction is more elevated and causes fluctuations in the growth rate (Lande 1998). The stability of plant populations depends to a great extent on seed production (Murcia 1996), and is directly associated to the availability of reproductive individuals (floral phenology) and pollinators. Both factors influence greatly the reproductive performance in animal-pollinated plants, because a) in populations with low densities of reproductive individuals, fitness can be reduced by the difficulty of finding potential mates (Lande 1998) and b) plants depend on pollinators for pollen transport among individuals and seed production (Murcia 1996), in such a manner that the pollinator visitation can enhance plant fitness by transferring pollen to the plant (i.e., through female function) or moving the pollen away from the plant (i.e., through male function) (Zimmerman & Pyke 1988). Additionally, the types of mating (selfing or outcrossing), influenced by pollinators and flower density (Handel 1983), determine the genetic diversity and structure of the populations in future generations, and their capability to face environmental changes (Lande 1998).

Thus, knowledge of the reproductive biology of plant populations in fragmented habitats allows to infer its effects on the biotic interactions involved in plant reproduction, and hence, has direct implications in the persistence of the species.

In the tropics, the reproductive biology of herbs is poorly known (Murcia 1996). In particular, studies on Araceae include a small number of species (Mayo *et al.* 1997, Gibernau *et al.* 1999). Detailed studies have been done on some species of the genera *Amorphophallus* (Beath 1996), *Anthurium* (Croat 1980, Valerio & Villalobos 1980), *Caladium* (Pellmyr 1985), *Dieffenbachia* (Valerio 1984, Young 1986, 1988), *Philodendron* (Gibernau *et al.* 1999), *Montrichardia* (Gibernau *et al.* 2003), and *Xanthosoma* (García-Robledo *et al.* 2004). However, *Dieffenbachia* is still the least known genus in the neotropics (Croat 1994), and its reproductive biology has been described only for *D. oerstedii* and *D. longispatha* from Costa

Rica (Valerio 1983, 1984, Young 1986, 1988), although there are 85 species in the genus (Croat 1994).

Presently, the main threat to the long term survival of many Araceae is the loss and reduction in quality of their natural habitats. Particularly, removal of tropical forest eliminates most terrestrial, climbing and epiphytic species, many of which are shade-dependent (Mayo *et al.* 1997). Also, the persistence of Araceae species could be threatened indirectly through the effects of fragmentation on beetle pollinator abundance and diversity, which have been reported in tropical forest (Halffter *et al.* 1991, Didham *et al.* 1998).

In this paper, we described the reproductive biology of *Dieffenbachia seguine*, an understory clonal herb not previously studied. Our purpose was to assess the effect of fragmentation on floral phenology, predation and fructification at the populational level.

This plant is widely distributed, ranging from South Mexico to Ecuador and Guianas (Mayo *et al.* 1997). In Mexico it is found at the Los Tuxtlas Biosphere Reserve in Veracruz. This region has undergone high deforestation rates in the last 40 years, leading to the reduction and fragmentation of the primary continuous tropical forest (Dirzo *et al.* 1997). Four populations of *D. seguine* were studied: two in continuous forest at Los Tuxtlas-UNAM Reserve and two in remnant fragments, in order to compare the reproductive dynamic of populations among continuous forest and fragments.

METHODS

Species

Dieffenbachia seguine is a caulescent terrestrial herb (Croat 1988) which usually forms dense local patches. Flowering occurs thorough the year with a peak between June and October when rain is more abundant. During other months, populations present a few isolated flowering individuals (Cuartas 2002). Inflorescences are 15-20 cm long. The spathe is green and tightly wrapped around the spadix. The upper part of the spadix bears staminated flowers (6-8 cm) and the lower part bears pistillated flowers which include staminodia (8-9 cm). There is a belt of sterile male flowers in the middle of the inflorescence (3 cm).

Study sites

This study was conducted at the Los Tuxtlas Biosphere Reserve in Veracruz, Mexico. This area has experienced high deforestation rates during the last 40 years (Dirzo *et al.* 1997). Today, there is a large undisturbed area of tropical forest at Los Tuxtlas-UNAM Tropical Biological Station (>640 ha) and a few remnant fragments with primary tropical forest characteristics. From June 2004 to February 2005 we studied four populations of *D. seguine*. This period of time was enough to observe flowering and fructification. In order to evaluate the effects of the habitat reduction on the floral phenology and fructification of *D. seguine* populations, we selected two populations in continuous forest (C1 and C2) and two populations in fragments of 3 and 37 ha (F1 and F2, respectively) in order to compare the results between the continuous and fragmented habitat condition. The populations were separated on average by 3.4 km from each other.

Floral biology and visitors

Flowering behavior and inflorescence visitors were observed during June 2004 at the peak of flowering. We marked 12 mature inflorescences in population C1 to observe the flowering cycle. Also, we checked daily in the morning during 12 days, starting on June 18th, all open inflorescences, their sexual phase and visitors, in an area of 1000 m² in each of the four populations. Daily inflorescence offer to pollinators was estimated as the number of inflorescences in the second night of opening, when the female flowers are receptive.

The morning surveys supply information about relative abundance of beetle species because they remain within inflorescences up to 24 h after arrival (Young 1988). Also, we collected floral visitors for taxonomic identification in closed inflorescences.

All beetles encountered within inflorescences were marked with acrylic paint using a unique combination of colors and number of dots. We recorded site and plant number. After that, we released them for recapture, in order to observe fly distances. Beetles were identified in the entomological collection of the Los Tuxtlas-UNAM Tropical Biology Station.

Self- incompatibility

Mating system characteristics were evaluated during June 2004. Self-pollination and facilitated self-pollination were tested by bagging an average of 12 inflorescences per

treatment in each population, prior to their opening to prevent pollination by insects. The “*self-compatibility*” treatment was applied to inflorescences in male phase using a little brush to put pollen of its own staminate flowers on the stigma of pistillate flowers, and bagging again the flower. The “*pollinator-mediated self-pollination*” treatment consisted in bagging the inflorescence and let its own pollen to reach the stigma of pistillate flowers (Schoen & Lloyd 1992). In addition, 12 naturally pollinated inflorescences were used as “*control*” treatment in each population. After 5 months, we collected the infructescences that reached maturity. Every flower in the inflorescence produces one fruit that bears one seed, it means that the number of fruits is equal to the number of seeds. We registered the number of viable and aborted fruits (or seeds).

Phenology: census of reproductive ramets

In order to record the flowering and fructification phenology, we performed three censuses: during June and November 2004 in 1000 m² plots in each population and in February 2005 in 2000 m² plots in each population. Closed and open inflorescences (reproductive effort) and the immature and mature infructescences were registered. Completely ant-consumed (empty) infructescences and yellowish, soft infructescences were assigned to *damaged* and *aborted* category, respectively.

Statistical analysis

Differences in the estimates of floral phenology and production, predation and abortion of infructescences between fragmented and continuous forest populations were tested with a *t*-test, due to all variables were normally distributed. Comparisons among populations were tested using ANOVA (Zar 1999). Differences in the probability of an inflorescence of being visited between fragmented and continuous forest, and between populations within habitats were evaluated using a logistic regression and a likelihood ratio test (G^2) (Quinn & Keough 2002).

RESULTS

Flowering cycle

Each inflorescence bears an average of 37.2 ± 3.4 (SD) female flowers. Reproductive ramets have 1-3 inflorescences depending on their size (Cuartas 2002). Only one inflorescence is

open on a ramet at a time. The phenology of individual inflorescences of *D. seguine* involves three days. Some variation was observed between individuals, in a few cases when there were no visitors, the inflorescence lasted four days. The spathe begins to open at mid-morning the first day. The male flowers are white and the stigmas yellow and dry. In the afternoon the opening of the spathe was almost total. There were no visitors to the inflorescences. In the second day the spathe opens completely and the upper part curves backward, exposing completely the spadix and the female flowers. In contrast with the majority of Araceae, no odor was released from the flowers. The stigmas turn brown and resinous sticky. Some inflorescences had visitors occupying the bottom of the floral chamber feeding on the staminodia that surround the stigmas. On the third day the spathe closes tightly in the lower and the middle part (sterile part), which prevents the mature pollen from reaching the stigmas. Visitors have to climb up and walk over the male flowers releasing pollen in sticky chains that increases the adhesion to the beetles. At the end of the day, the spathe wraps again around the male part of the spadix. The pollen flowers decompose and fall several days after anthesis. The inflorescence remains erect until anthesis and once the spathe closes it bends and hangs. Five to seven months later the fruits reach maturity, the spathe turns orange and opens exposing the red fruits. Flowering phenology differed between the four populations. F1 population had a higher number of open inflorescences per day ($r^2 = 0.221$, $F = 4.18$, $P = 0.0109$) and populations in fragments had, on average, higher daily inflorescence offer compared with populations in continuous forest ($r^2 = 0.12$, $t = -2.485$, $P = 0.0167$) (Fig. 1).

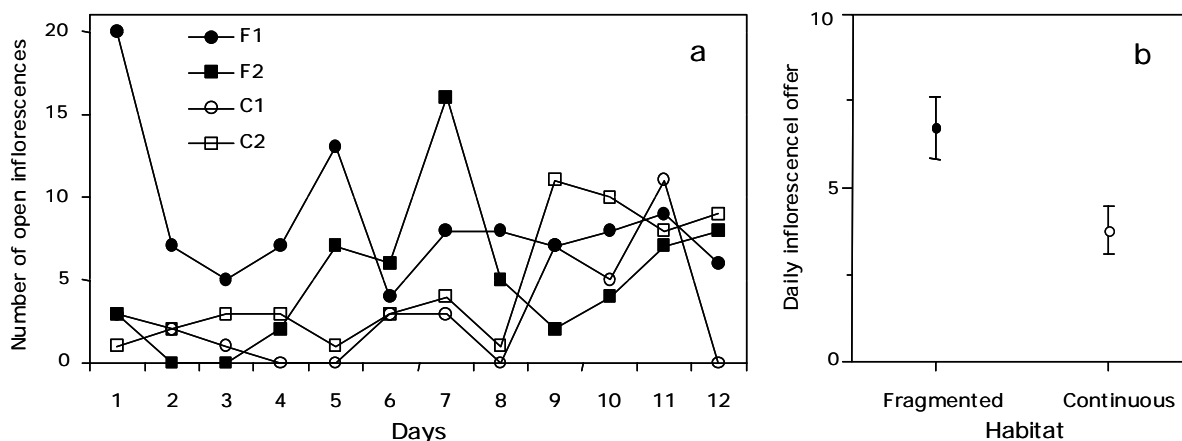


Figure 1. Number of open inflorescences a) per day in an approximate area of 4000 m² in every population and b) on average in continuous forest and fragments populations for a period of 12 days starting on June 18th 2004. The bars are the standard error of the mean.

Visitors

A total of 271 open inflorescences were checked during 12 days in all populations. Only 20.6 % of the inflorescences of *D. seguine* were visited by several insect taxa. The more abundant insects were orange mirids (13.6%), followed by beetles (4.4%) and spiders (2.6%) (Table 1). The probability of an inflorescence of being visited was significantly different between fragmented and continuous habitat and between populations (fragments) within habitats (Table 2). These differences are due to a small probability of an inflorescence of being visited by beetles in fragments than in continuous forest ($G^2 = 11.12$, $P = 0.0009$, data in Table 1). Three species of beetles visited *D. seguine*: *Cyclocephala sanguinocollis* (50%), *C. sexpunctata* (33.4%) and *C. mafaffa* (16.6%). Nine inflorescences had one beetle within the spathe, one contained two *C. sanguinocolis* and two contained two and three beetles of different species. In all cases beetles were completely covered with pollen. We did not recapture any beetle in any population, despite inflorescences were open in the vicinity.

There was not evident damage on the stigmas by any of the arthropods visiting the inflorescence, but in few cases the male flowers were chewed.

Table 1. Number of inflorescences visited/not visited and probability of an inflorescence of being visited/not visited in four populations during a 12 day period in June 2004.

VISITOR	POPULATION							
	F1		F2		C1		C2	
	N	P	N	P	N	P	N	P
<i>Cyclocephala</i>	3	0.0173	0	0.0000	7	0.1999	2	0.0833
Miridae	35	0.2023	2	0.0512	0	0.0000	0	0.0000
Spiders	7	0.0404	0	0.0000	0	0.0000	0	0.0000
None	128	0.7398	37	0.9487	28	0.7999	22	0.9166
Total	173		39		35		24	

Table 2. Results of the likelihood ratio test. H_0 = There is not relation between the probability of an inflorescence of being visited and the condition of the habitat (fragmented and continuous).

Source	d.f.	G^2	P
Habitat	3	18.77	0.0003
Population [Habitat]	6	12.80	0.0463

Interactions: Feeding flies and ant-predation

When the inflorescence is completely developed but before the spathe opens, female flies arrive to the inflorescence and lay eggs on the spathe. Once the inflorescence opened the larvae got into it. After anthesis, the larvae becomes immersed in the slime from the

decomposition of the pollen and staminodia, and accumulation of rainwater. The larvae were examined with the microscope and its digestive tract was full of pollen grains. Several weeks later we observed in the immature infructescence little brown holes where the adults escaped.

Besides, often the developing infructescences were invaded by ants, which prey upon the fruits. They bring soil and built a shelter into the infructescence.

Self-incompatibility

All inflorescences bagged in the self-pollination and facilitated self-pollination treatment aborted during the development process. This hand-pollination experiment showed the *D. seguine* does not produce seeds by self-fertilization.

A total of 51 control inflorescences (80.4%) aborted, this means that on average for all populations, only 19.6 % of the inflorescences had success in the production of infructescences and suggests that a high abortion rate is a common phenomenon in *D. seguine*. No differences were detected in rate of abortion among the four populations ($r^2 = 0.30$, $F = 2.06$, $P = 0.1589$) or between fragmented and continuous forest populations ($t = -0.35$, $P = 0.7569$).

Phenology: census of reproductive ramets

We followed the four populations from June 2004 to February 2005. The availability of inflorescences and infructescences varied through time and among populations. In the first census (June 2004) we counted the number of reproductive structures in each ramet. In the second census (November 2004) we classified the developing infructescences as viable, aborted and damaged. In the last census (February 2005), the infructescences were assigned to three different maturity states: immature (green fruits), medium (orange fruits) and mature (bright red fruits).

In the first census (June 2004) there was a high number of inflorescences in all four populations (146 on average), in contrast to the third census (February 2005) when there was no inflorescences (Fig. 2). In the second census (November 2004) there was a high number of infructescences (developing and mature) and the flowering was less intense (Fig. 2). This high number of infructescences in the continuous forest populations could be due to a moderate flowering between July and November. We counted a total of 380

infructescences, 26 % of which were damaged by ants, 32.4 % showed natural abortion and 41.6 % were sound.

The number of inflorescences was significantly higher in populations at fragments than in continuous forest in June 2004 ($t = -5.282$, $P = 0.0340$). Unexpectedly, the number of infructescences was significantly higher in populations in continuous forest than in fragments in February 2005 ($t = 5.10$, $P = 0.0364$). In fragments, the reproductive effort was higher also at the individual level. There were significantly more ramets producing one and two inflorescences in comparison with ramets in the continuous forest (1-Inflorescence: $t = -8.01$, $P = 0.0153$; 2-Inflorescences: $t = -27.89$, $P = 0.0013$) (Fig 3a). There were no significant differences in the number of viable ($t = 0.95$, $P = 0.4403$) and aborted ($t = 1.89$, $P = 0.1992$) infructescences between fragments and continuous forest populations. But, the number of damaged infructescences was significantly higher in fragments than in the continuous forest ($t = -4.77$, $P = 0.0411$) (Fig 3b). Additionally, the infructescences in medium maturation stage ($t = 7.21$, $P = 0.0187$) were higher in the continuous forest than in fragments (Fig 3c).

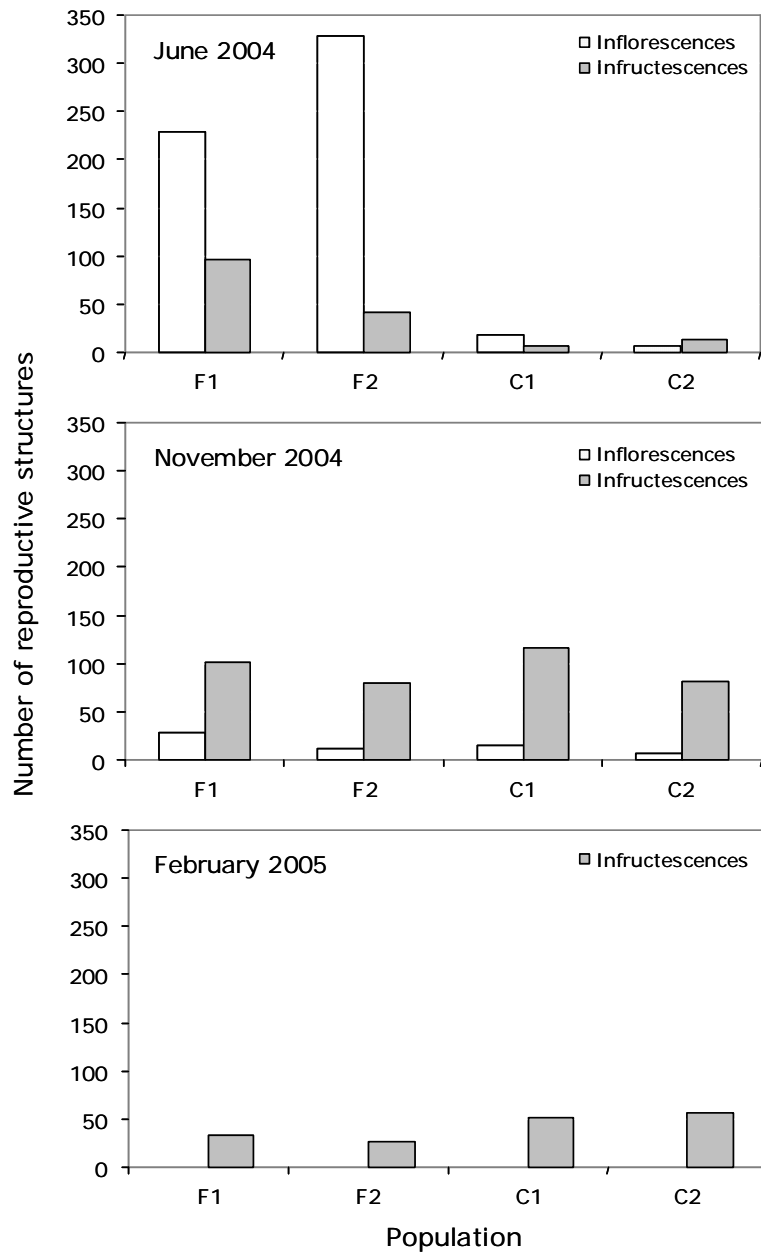


Figure 2. Number of inflorescences and infructescences during three censuses in four populations of *Dieffenbachia seguine* in Los Tuxtlas.

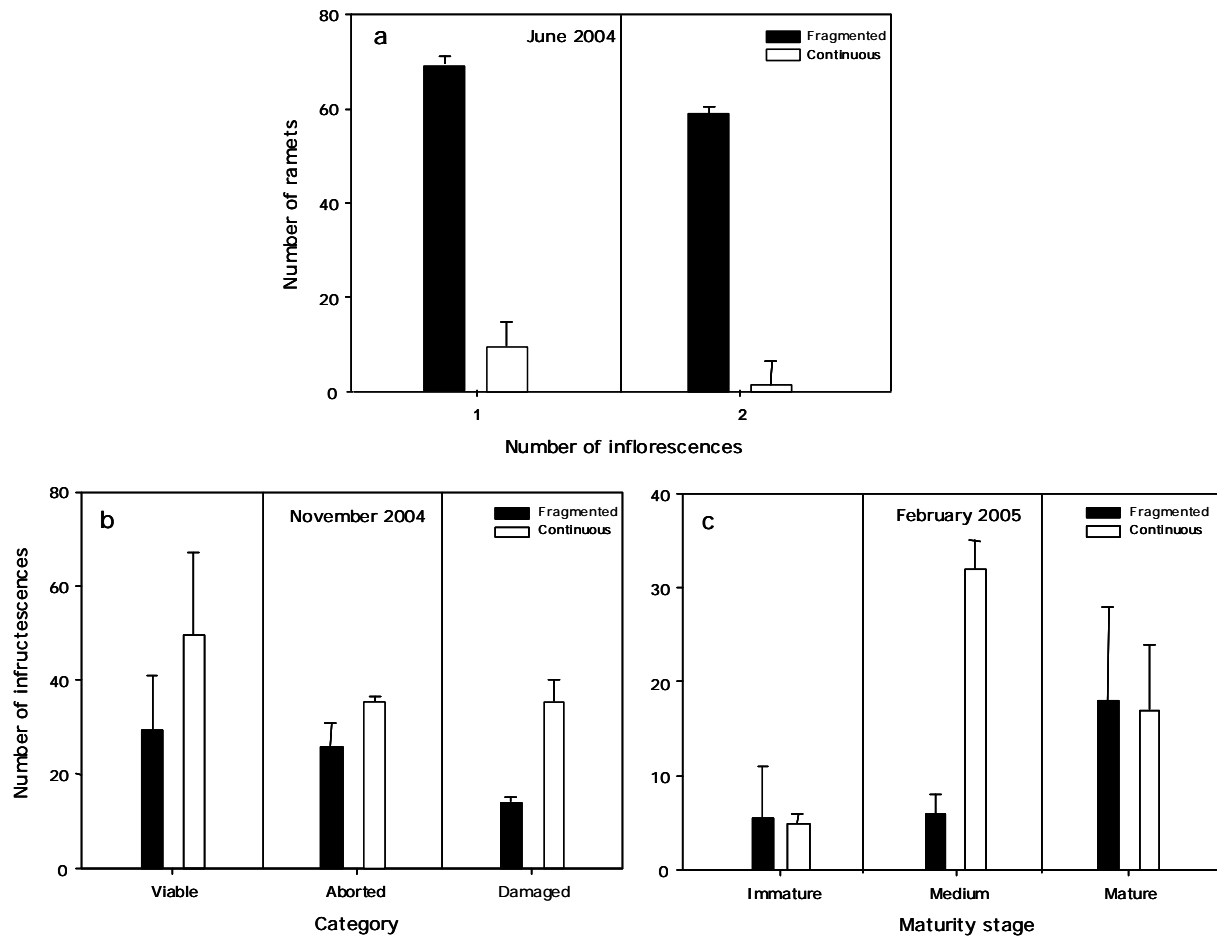


Figure 3. Description of the reproductive biology of *Dieffenbachia seguine* in fragmented and continuous forest. a) Average number of ramets bearing one or two inflorescences b) average number of viable, aborted and damaged infructescences and c) average number of infructescences in different maturity stages: immature, medium and mature. The bars are the standard error of the mean.

DISCUSSION

Floral biology

Dieffenbachia seguine possess typical features of beetle-pollinated plants: a three-day flowering cycle, floral chamber, protogyny and food rewards (staminodia) (Young 1986, Gibernau *et al.* 1999, 2003). The floral biology we observed is similar to that described for *D. oerstedii* and *D. longispatha*. In these two species, the flowering process is an event of three days, *Cyclocephala* beetles are the pollinators and the spadix increases in temperature in the evening, what probably occurs also in *D. seguine*.

The flowering of *D. seguine* populations was very intense. In a period of 12 days, five inflorescences were open daily on average, in every population of *D. seguine*. A similar

average number of open inflorescences was observed in populations of *Dieffenbachia longispatha* during 1984, whereas in two previous reproductive seasons this number was lower (Young 1986). In contrast, in populations of *Philodendron solimoense* only 1.06 inflorescences opened daily (Gibernau *et al.* 1999).

Considerable variation was observed in the reproductive phenology response among populations of *D. seguine*. The intensity of flowering was different at the four sites. In populations F2 and C1, there was a couple of days without open inflorescences, while in the other two populations the flowering was continuous and population F1 produced two times more inflorescences than the other populations. This variation among sites has been described also for four populations of *Philodendron solimoense* (Gibernau *et al.* 1999). One of the four populations of *P. solimoense* produced three times more inflorescences than the other populations and had continuous flowering during the census period. However, any ecological characteristics of the patches were evaluated.

Visitors

Although inflorescences are visited by several types of insects, *Cyclocephala* beetles seem to be the only ones that transport pollen in their bodies, which means they are the pollinators of *D. seguine* (Young 1986, Gibernau 1999). Due to the low abundance of beetles observed, it was not possible to compare their efficiency as pollinators.

Beetles of *Cyclocephala* genera have been reported visiting several Araceae genera in Latin America (Croat 1997, Schatz 1990, Valerio 1984, Young 1986), although most of the beetle species do not overlap in distribution (Appendix 1) and their abundance is very variable depending on the locality.

Cyclocephala sexpunctata has been recorded visiting other Araceae species, like *Dieffenbachia longispatha*, *Philodendron solimoense* and *Xanthosoma robustum* (Young 1986, Gibernau *et al.* 1999, Goldwasser 2000). The two other *Cyclocephala* species (*C. sanguinocolis* and *C. mafafa*) have not been previously reported as visitors of Araceae. Small mirids visiting *D. seguine* have been observed also in *D. longispatha* (Young 1988), *P. solimoense* (Gibernau *et al.* 1999), *Xanthosoma robustum* (Goldwasser 2000) and *Xanthosoma daguense* (García-Robledo *et al.* 2004). They stay into the open inflorescence sucking plant juices.

In most Aroid species studied, the inflorescences are visited by large numbers of Scarabidae beetles. In *Philodendron solimoense* the spathes were visited on average by 21 ± 12 beetles (Gibernau *et al.* 1999), in *Xanthosoma robustum* by 7 beetles (Goldwasser 2000), in *D. longispatha* by 3.6, 3.6 and 0.7 beetles in three years, respectively (Young 1986), in *Monticardia arborescens* by 1.95 ± 1.34 beetles (Gibernau *et al.* 2003) and in *Xanthosoma dagense* by 0.5 beetles (García- Robledo *et al.* 2004). In comparison, the inflorescences of *D. seguine* were visited on average, by only 0.04 individuals.

Most of inflorescences of *D. seguine*, 79% on average, did not receive any visit during our study. This value is higher than in populations of *Xanthosoma daguense* (66%), *D. longispatha* (31, 38 and 3% in three years, respectively) (Young 1986), *Philodendron solimoense* (41%) (Gibernau *et al.* 1999) and *Monticardia arborescens* (37%) (Gibernau *et al.* 2003).

This low visitation rate at Los Tuxtlas region could be due to a low abundance of the beetles. In fragments, where the visitation rate was lower compared to continuous forest, it could be a combined effect of a higher number of open inflorescences and a smaller probability of being visited by beetles. Moreover, it is likely that the observations were done in a season with generalized low abundance of beetles, like observed by Young (1986). She did not found beetles of five species during the first year of census, some of which were present the subsequent two years (Young 1986). Also, the probability of mating of *Cyclocephala* beetles was very small in *D. seguine* populations ($P \cong 0.003$) during our period of observations, although in the interaction *Dieffenbachia-Cyclocephala*, it has been suggested that the inflorescence becomes part of the reproductive cycle of beetles for offering food and mating place (Gibernau 2003). However, only one inflorescence of *D. seguine* was visited by two beetles of the same species. In contrast, numerous copulations were observed to take place inside the floral chamber of *Philodendron selloum* (Gottsberger & Gottsberger 1991) and *Philodendron solimoense* (Gibernau *et al.* 1999). There are three additional explanations for the low abundance of *Cyclocephala*. First, oviposition and larvae development of beetles occurs underground (Borror *et al.* 1981), and in general, beetles seem to be very sensitive to the oscillations in humidity and temperature (Klein 1989, Halfpter *et al.* 1991, Donaldson *et al.* 2002), this probably leads to a high larvae mortality in disturbed ecosystems. Moreover, eggs take long time to become adults, most of species have one generation per year (Borror *et al.* 1981), and this process could be

sequential and coupled with the flowering period of *D. seguine*, in such a way the beetle size populations are always small. Second, a high mortality of beetle eggs may be due to predation by ants, as documented for *Cyclocephala lurida* beetles in United States (Zenger & Gibb 2001). Third, the simultaneous mass flowering of other species, attracting beetles, like in Costa Rica (Young 1986). But this idea is unlikely in our study sites due to the very intense flowering in *D. seguine* populations and the absence of mass flowering of other beetle pollinated-species.

In *D. seguine* populations the recapture of marked beetles was null. It seems to be common in Araceae species, thought most of the beetles fly to the nearest recently opened inflorescence (Young 1986). In one population of *Xanthosoma daguense* any beetle was recaptured (Garcia-Robledo *et al.* 2004) and in one population of *D. longispatha* over 8000 beetles were marked during three flowering seasons and about 25% were recaptured (Young 1988). The null recapture of beetles in *D. seguine* coupled with some gaps in flowering suggest important insect movements and/or a low survival rate of adults, like suggested in *D. longispatha* and *P. solimoense* populations (Young 1988, 1990, Gibernau *et al.* 1999).

Feeding flies and ant-predation

The observed interaction *Dieffenbachia-Drosophilidae* flies seems to be beneficial for both species, since the larvae clean the immature infructescence of decomposing pollen, and do not damage the developing fruits. The reward for the larvae is food and shelter until maturation. It is possible that larvae have a small effect on male reproductive success because they consume fresh pollen too. Contrarily, the ants have an important negative effect on the reproductive success of *D. seguine* populations, through predation of fruits (26.1% on average for all populations), probably reducing sexual reproduction and dispersal.

Visits of flies to recently open inflorescences have been observed also in *Xanthosoma robustum* in Costa Rica (Goldwasser 2000) and *X. daguense* in Colombia (García-Robledo *et al.* 2004), but predation by ants has not been previously reported for other Araceae species. Ants have been observed only on the outer surface of the opened spathes of *Philodendron solimoense* (Gibernau *et al.* 1999).

In *D. seguine*, the negative effects of a scarce pollination on fruit production and the high predation rate of seeds seem to be additive, in comparison to *Xanthosoma dagense*, where the positive effect of increased pollinator visitation on fruit production was cancelled by the negative effect of fruit predation by Nitidulidae beetles (García-Robledo *et al.* 2005). However, the high number of infructescences produced by *D. seguine* ensures that a high number of seeds attain maturity and compensate the losses due to the predation (26%) and natural abortion (32%) (Janzen 1974).

Increased predation in forest fragments in *D. seguine* populations might be due to a greater attractiveness of plants due to greater visibility, or a greater number of predators associated to disturbed sites (Ehrlén 1996).

Self-incompatibility

The fact that self-pollinated inflorescences did not produce fruits suggest that *D. seguine* is self-incompatible. This idea is supported by the high ratio between the number of pollen grains to the number of ovules (>33000) observed in *D. seguine* from French Guiana (Chouteau *et al.* 2006). According to this ratio *D. seguine* should be classified as xenogamous taxon. Besides, it is dichogamous and open inflorescences do not overlap in an individual, which are mechanisms that promote outcrossing. In contrast, partial self-compatibility has been recorded in *Dieffenbachia longispatha* and *Xanthosoma daguense* (Young 1986, García-Robledo *et al.* 2004).

The failure of selfed embryos in *D. seguine* could be due to a post-zygotic incompatibility reaction (physiological), because the early failure of the selfed ovules was uniform (contrary to the variable and gradual effects caused by inbreeding depression) (Seavey & Bawa 1986).

Phenology: census of reproductive ramets

The reproductive effort expressed as the number of inflorescences, was higher in fragments than in continuous forest populations, even at individual level. A similar trend was observed in the dry forest trees *Pachira quinata*. Isolated trees produced twice the flowers of trees in continuous forest (Fuchs *et al.* 2003). It is likely that the lower availability of light in continuous forest becomes a limiting resource to flower production

like observed in experimental populations of *Lindera benzoin*, influencing drastically the plant fitness (Niesenbaum 1993).

We detected an abortion rate of 80.4% in control inflorescences in all populations. This high abortion rate has been reported for other plants in the same family: *Xanthosoma daguense* 78% (García- Robledo *et al.* 2004), *D. longispatha* in two consecutive years (52% and 47%) (Young 1986) and *D. oerstedii* (81%) (Valerio 1983). The high rate of abortion in open-pollinated inflorescences in *D. seguine* was common in all populations. It could be due to a failure in pollinators visit, as a consequence of their low abundance. A similar situation was observed in populations of *Dieffenbachia oerstedii* (Valerio 1983), *D. longispatha* (Young 1986) and *Philodendron solimoense* (Gibernau *et al.* 1999), species with a high specificity of pollination.

In general, populations in fragments had a higher number of inflorescences and a small number of infructescences, higher predation and a slower maturation process. This means, in terms of efficiency, that reproductive success is lower in fragments than in continuous forest and is also likely to influence population recruitment through sexual reproduction (Bawa & Ng 1990). The number of flowering individuals varies greatly from one day to the next within populations, promoting mating between relatives when inflorescences are separated short distances and outcrossing when inflorescences are separated long distances. Beetles pollinating *Philodendron solimoense* in French Guiana flight between 50 and 300 m, and transport pollen among patches separated 1-2 km and in populations of *D. longispatha* the beetles fly to the nearest open inflorescence, and eventually they fly several hundred meters (Young 1986). In populations of *D. seguine*, the synchronous flowering and the incapability of beetles to fly through the matrix (Klein 1989) suggest a local mating dynamic, that probably explains the high levels of genetic drift and inbreeding observed (Cuartas & Núñez-Farfán 2006).

In conclusion, the pollination context (climate, species composition, floral offer and distance among plants) (Saunders *et al.* 1991, Méndez & Díaz 2001, García-Robledo *et al.* 2005) on which pollinator visitation depends is variable in *D. seguine* populations. All these factors are rapidly changing in fragmented habitats, and simultaneously with a more

intense interaction with predators, the reproductive performance of populations in fragments is reduced.

CITED LITERATURE

Bawa KS & FSP Ng. 1990. Phenology-Commentaries. In KS Bawa & M Hadley (eds) *Reproductive ecology of tropical forest plants*. Man and the biosphere series. Volume 7. UNESCO. Parthenon Publishing Group. Paris.

Beath DDN. 1996. Pollination of *Amorphophallus johnsonii* (Araceae) by carrion beetles (*Phaenocochrus amplus*) in a Ghanaian rain forest. *J. Trop. Ecol.* 12:409-418.

Borror DJ, De Long DM & Triplehorn CA. 1981. *An introduction to the study of insects*. p 356. Saunders College Publishing. Orlando.

Chouteau M, Barabé D & Gibernau M. 2006. Pollen-ovule ratios in some Neotropical Araceae and their putative significance. *Plant. Syst. Evol.* 257: 147-157.

Croat TB. 1997. A revision of *Philodendron* subgenus *Philodendron* (Araceae) for Mexico and Central America. *Ann. Miss. Bot. Garden* 84: 311-704.

Croat TB. 1994. Taxonomic status of Neotropical Araceae. *Aroideana* 17: 33-60.

Croat TB. 1988. Ecology and life forms of Araceae. *Aroideana* 11: 4-35.

Croat TB. 1980. Flowering behavior of the neotropical Genus *Anthurium* (Araceae). *Am. J. Bot.* 67: 888-904.

Cuartas S. 2002. Efectos ecológicos y genéticos de la fragmentación en las poblaciones de *Dieffenbachia seguine* (Araceae) en Los Tuxtlas, Veracruz, México. M. Sc. Thesis. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.

Cuartas S & Núñez-Farfán J. 2006. The genetic structure of the tropical understory herb *Dieffenbachia seguine* L. before and after forest fragmentation. *Evol. Ecol. Res.* <http://www.evolutionary-ecology.com/forthcoming.html>

Didham RK, Hammond PM, Lawton JH, Eggleton P & Stork NE. 1998. Beetle species responses to tropical forest fragmentation. *Ecol. Mon.* 68: 295-323.

Dirzo R, González-Soriano E & Vogt RC. 1997. *Historia Natural de Los Tuxtlas*. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.

Donaldson J, Nänni I, Zachariades C & Kemper J. 2002. Effects of habitat fragmentation on pollinator diversity and plant reproductive success in Renosterveld shrublands of South Africa. *Cons. Biol.* 16: 1267-1276.

Ehrlén J. 1996. Spatiotemporal variation in predispersal seed predation intensity. *Oecologia* 108: 708-713.

- Fuchs EJ, Lobo JA & Quesada M. 2003. Effects of forest fragmentation and flowering phenology on the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree *Pachira quinata*. *Cons. Biol.* 17: 149-157.
- García-Robledo C, Kattan G, Murcia C & Quintero-Marín P. 2005. Equal and opposite effects of floral offer and spatial distribution on fruit production and predispersal seed predation in *Xanthosoma daguense* (Araceae). *Biotropica* 37: 373-380.
- García-Robledo C, Kattan G, Murcia C & Quintero-Marín P. 2004. Beetle pollination and fruit predation of *Xanthosoma daguense* (Araceae) in an Andean cloud forest in Colombia. *J. Trop. Ecol.* 20: 459-469.
- Gibernau M, Barabé D. 2002. Pollination ecology of *Philodendron squamiferum* (Araceae). *Can. J. Bot.* 80: 316-320.
- Gibernau M, Barabé D, Labat D, Cerdan P, Dejean A. 2003. Reproductive biology of *Montricardia arboescens* (Araceae) in French Guiana. *J. Trop. Ecol.* 19: 103-107.
- Gibernau M, Barabé D, Cerdan P, Dejean A. 1999. Beetle pollination of *Philodendron solimoense* (Araceae) in French Guiana. *Int. J. Plant. Sci.* 160: 1135-1143.
- Gibbs JP. 2001. Demography versus habitat fragmentation as determinants of genetic variation in wild populations. *Biol. Cons.* 100: 15-20.
- Goldwasser L. 2000. Scarab beetles, elephant ear (*Xanthosoma robustum*) and their associates. In NM Natkarni & NT Wheelwright (eds) *Monteverde. Ecology and Conservation of a tropical cloud forest*. p 268-271. Oxford University Press. Oxford.
- Gottsberger G & Gottsberger IS. 1991. Olfactory and visual attraction of *Erioscelis emarginata* (Cyclocephalini, Dynastinae) to the inflorescences of *Philodendron selloum* (Araceae). *Biotropica* 23: 23-28.
- Halffter G, Favila ME & Halffter V. 1991. A comparative study of the structure of the scarab guild in Mexican tropical rain forest and derived ecosystems. *Folia Entomol. Mex.* 84: 131-156.
- Handel SN. 1983. Pollination ecology, plant population structure and gene flow. In L. Real (ed.) *Pollination biology*. Pp 760-771. Academic Press. NY.
- Janzen DH. 1974. Tropical blackwater rivers, animals and mast fruiting by the Diptercarpaeae. *Biotropica* 4: 69-103).
- Klein BC. 1989. Effects of forest fragmentation on dung and carrion beetle communities in central Amazonia. *Ecology* 70(6): 1715-1725.
- Lande R. 1998. Anthropogenic, ecological and genetic factors in extinction and conservation. *Res. Pop. Ecol.* 40: 259-269.
- Lande R. 1999. Extinction risks from anthropogenic, ecological and genetic factors. In LF Landweber & AP Dobson (eds) *Genetics and extinction of species*. DNA and the conservation of biodiversity. p 1-21. Princeton University Press. Princeton, NJ.
- Mayo SJ, Bogner J & Boyce PC. 1997. *The genera of Araceae*. Continental Printing, Belgium.

- Méndez M, Díaz A. 2001. Flowering dynamics in *Arum italicum* (Araceae): relative role of inflorescence traits, flowering synchrony, and pollination context on fruit initiation. *Am. J. Bot.* 88: 1774-1780.
- Murcia, C. 1996. Forest fragmentation and the pollination of neotropical plants. In J Shelhas & R Greenberg (eds) *Forest patches in tropical landscape*. p 19-36. Island Press. USA.
- Niesenbaum RA. 1993. Light or pollen – seasonal limitations of female reproductive success in the understory herb *Lindera benzoin*. *J. Ecol.* 81: 315-323..
- Pellmyr O. 1985. *Cyclocephala*: visitor and probable pollinator of *Caladium bicolor* (Araceae). *Acta Amazonica* 15: 269-272.
- Quinn GP & Keough MJ. 2002. *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Ratcliffe B. 2006. www.museum.unl.edu/research/entomology/Guide/Scarabaeoidea/Scarabaeidae-pages/ScarabaeidaeO.html
- Saunders DA, Hobbs RJ & Margules CR. 1991. Biological consequences of ecosystem fragmentation: A review. *Cons. Biol.* 5: 18-32.
- Schatz GE. 1990. Some aspects of pollination in Central American forests. In KS Bawa & M Hadley (eds) *Reproductive ecology of tropical forest*. Man and biosphere series. UNESCO. Parthenon Publishing Group, Paris.
- Schoen DJ & Lloyd DG. 1992. Self and cross-fertilization in plants. III. Methods for studying modes and functional aspects of self-fertilization. *Int. J. Pl. Sc.* 153: 381-393.
- Seavey SR & Bawa KS. 1986. Late-acting self-incompatibility in angiosperms. *Bot. Rev.* 52: 195-219.
- Seres A & Ramírez N. 1995. Biología floral y polinización de algunas monocotiledóneas de un bosque nublado venezolano. *Ann. Miss. Bot. Gard.* 82: 61-81.
- Valerio CE, Villalobos E. 1980. Polinización y eficiencia reproductiva en *Anthurium scandens* (Araceae). *Brenesia* 18: 137-146.
- Valerio CE. 1983. Fenología y eficiencia reproductiva de *Dieffenbachia oerstedii* Schott (Monocotiledonea: Araceae) en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 31: 263-267.
- Valerio CE. 1984. Insect visitors to the inflorescence of the aroid *Dieffenbachia oerstedii* (Araceae) in Costa Rica. *Brenesia* 22. 139-148.
- Wilcox BA & Murphy DD. 1985. Conservation strategy: the effects of fragmentation on extinction. *Am. Nat.* 125: 879-887.
- Young HJ. 1986. Beetle pollination of *Dieffenbachia longispatha* (Araceae). *Am. J. Bot.* 73: 931-944.
- Young, H.J. 1988. Differential importance of beetle species pollinating *Dieffenbachia longispatha* (Araceae). *Ecology* 69 (3): 832-844.

Young, H.J. 1990. Pollination and reproductive biology of an understory neotropical aroid. In KS Bawa & M Hadley (eds) *Reproductive ecology of tropical forest*. Man and biosphere series. Volume 7. p 151-164. UNESCO. Parthenon Publishing Group, Paris.

Zar JH. 1999. *Biostatistical analysis*. Fourth ed. Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ.

Zenger JT, Gibb TJ. 2001. Identification and impact of egg predators in *Cyclocephala lurida* and *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) in turfgrass. *Env. Entom.* 30: 425-430.

Zimmerman M & Pyke GH. 1988. Reproduction in *Polemonium*: assessing the factors limiting seed set. *Am. Nat.* 131: 723-738.

Appendix 1. Most frequent visitors to Araceae species in Neotropical forests.

SPECIES	VISITOR	LOCALITY	REFERENCE
<i>Dieffenbachia oerstedii</i>	<i>Scarabaeidae</i>	Costa Rica	Valerio 1983
<i>Caladium bicolor</i>	<i>Cyclocephala rustica</i>	Surinam	Pellmyr 1985
<i>Dieffenbachia longispatha</i>	<i>Erioscelis columbica</i> <i>Cyclocephala gravis</i>	Costa Rica	Young 1986
<i>Philodendrum selloum</i>	<i>Erioscelis emarginata</i>	Brazil	Gottsberger & Gottsberger 1991
<i>Dieffenbachia spp</i>	<i>Cyclocephala tutilina</i>	Venezuela	Seres & Ramirez 1995
<i>Philodendron brevispathum</i>	<i>Erioscelis proba</i>	Costa Rica	Croat 1997
<i>Philodendron solimoense</i>	<i>Cyclocephala colasi</i> <i>Cyclocephala emarginata</i>	French Guiana	Gibernau <i>et al.</i> 1999
<i>Xanthosoma robustum</i>	<i>Cyclocephala nigerrima</i> <i>Cyclocephala sexpunctata</i>	Costa Rica	Goldwasser 2000
<i>Philodendron squamiferum</i>	<i>Cyclocephala simulatrix</i> <i>Cyclocephala tylifera</i>	French Guiana	Gibernau & Barabé 2002
<i>Monticardia arborescens</i>	<i>Cyclocephala colasi</i> <i>Cyclocephala vestita</i>	French Guiana	Gibernau <i>et al.</i> 2003
<i>Xanthosoma daguense</i>	<i>Cyclocephala gregaria</i> <i>Cyclocephala amblyopsis</i>	Colombia	Garcia-Robledo <i>et al.</i> 2004
<i>Dieffenbachia seguine</i>	<i>Cyclocephala sanguinocollis</i> <i>Cyclocephala sexpunctata</i>	Mexico	This study

Cyclocephala genus is distributed in the New world belongs to the family Scarabaeidae., subfamilia Dynastinae There are 53 species described within the genus. The biology and behavior of the scarabs beetles is not known, and much remains to be studied (Ratcliffe 2006).

Capítulo II

**Éxito reproductivo femenino de *Dieffenbachia seguine* (Araceae)
en la región de Los Tuxtlas, Veracruz, México**

INTRODUCCIÓN

Las interacciones bióticas como factores que moldean la dinámica de las poblaciones y las comunidades necesitan ser abordadas desde un escenario regional, debido a que la estructura del paisaje influye no sólo en los patrones locales de biodiversidad, sino también en la intensidad con la que dichas interacciones ocurren (Bawa 1990, Murcia 1996, Tschardtke & Brandl 2004). De esta manera, los cambios estructurales del paisaje generados por la destrucción y fragmentación del hábitat pueden alterar o en algunos casos interrumpir las interacciones bióticas en las poblaciones pequeñas y aisladas (Rathcke & Jules 1993, Kareiva & Wennerger 1995, Kearns *et al.* 1998).

La alteración de las interacciones tróficas puede afectar positiva o negativamente el éxito reproductivo de las poblaciones de plantas. Si aumenta la intensidad de las interacciones bióticas, puede no sólo elevarse la tasa de visita a las flores y la polinización sino también la depredación de semillas, las infecciones por hongos patógenos o el daño por herbívoros. Si se pierden las interacciones mutualistas, se puede reducir la producción de semillas y procesos como la descomposición de la carroña y la hojarasca son más lentos (Steffan-Dewenter *et al.* 2001, Tschardtke & Brandl 2004).

La interacción con los polinizadores, en particular, es la más crítica para las poblaciones de plantas, debido a que afecta directamente su éxito reproductivo (Murcia 1996) y es de gran importancia para el mantenimiento de la estabilidad y diversidad de las comunidades (Bawa 1990). En hábitat fragmentados, el tamaño poblacional pequeño es importante para las poblaciones de plantas porque pueden sufrir procesos de endogamia y deriva genética que eventualmente pueden conducir a la pérdida de diversidad genética (Young *et al.* 1996). Al mismo tiempo, las poblaciones pequeñas son menos atractivas para los polinizadores que las poblaciones grandes (Costin *et al.* 2001) y como resultado las plantas aisladas en estas poblaciones reciben menos visitas y menos polen de los polinizadores (Jennersten 1988, Rathcke & Jules 1993, Aizen & Feinsinger 1994, , Groom 2001). En consecuencia, la limitación de polinizadores en poblaciones pequeñas puede alterar la producción de semillas en una magnitud que depende del sistema reproductivo de las plantas (Jennersten 1988, Bawa 1990, Groom 1998, Kearns *et al.* 1998). Por ejemplo, en ausencia del polinizador en especies autoincompatibles no hay producción de semillas (Lamont *et al.* 1993, Steffan-Dewenter & Tschardtke 1999).

En hábitats fragmentados, la interacción planta-polinizador es afectada si ocurren cambios en la abundancia y diversidad de polinizadores (Klein *et al.* 1989, Didham *et al.* 1998, Kearns *et al.* 1998) y su capacidad de moverse entre poblaciones, y por lo tanto, su capacidad de dispersar el polen, afectando los patrones de flujo génico en las poblaciones (Murcia 1996). La dinámica de vuelo de los polinizadores depende en gran magnitud de la densidad de las flores en un parche (Handel 1983). Cuando la densidad floral es alta, los polinizadores se mueven distancias cortas promoviendo apareamientos endogámicos (Ellstrand *et al.* 1978). En bajas densidades, los polinizadores se mueven largas distancias, aunque no necesariamente garantizan servicios de polinización de alta calidad (Groom 2001). Por ejemplo, en el caso de polinizadores generalistas, el éxito reproductivo puede reducirse a través de la pérdida de polen en flores de otras especies, a medida que la distancia entre plantas aumenta (Groom 2001).

La producción de semillas y de frutos influyen la distribución y el tamaño de las poblaciones de plantas (Steffan-Dewenter *et al.* 2001). Por lo tanto, evaluar el impacto de la fragmentación del hábitat sobre el éxito reproductivo es de gran importancia para la persistencia de las especies, mas aún, si consideramos que tales efectos pueden ser detectados muchas generaciones antes de que puedan ocurrir los efectos genéticos negativos de la reducción en el tamaño poblacional (Lande 1988).

Algunas especies de zonas templadas han sido estudiadas en ecosistemas fragmentados y los efectos en la producción de semillas han sido variables (Murren 2002, Hooftman *et al.* 2003, Aguilar & Galeto 2004), sin embargo, el efecto de la fragmentación en el éxito reproductivo de hierbas tropicales no se ha evaluado.

El propósito de este estudio fue determinar el efecto de la fragmentación del bosque tropical en el éxito reproductivo femenino a través del tiempo en una planta herbácea autoincompatible. Asimismo, se evaluó la importancia de la limitación de polen en la producción de semillas.

Para llevar a cabo este objetivo, se realizó un seguimiento de cuatro poblaciones de *Dieffenbachia seguine* en la región de Los Tuxtlas durante cinco años. *D. seguine* es una hierba típica del sotobosque de bosques tropicales. Esta planta representa un sistema ideal debido a que se encuentra en poblaciones grandes y es polinizada por escarabajos que

aparentemente son muy susceptibles a la fragmentación (Halffter *et al.* 1992). En el caso de *D. seguine*, la intensidad de la interacción planta-polinizador puede ser determinada sin ambigüedad a través de la producción natural de frutos y de experimentos de suplemento de polen a plantas en condiciones naturales. Por lo tanto, esperamos un éxito reproductivo reducido en las poblaciones de fragmentos en comparación con las poblaciones de bosque continuo, si el fenómeno de la fragmentación afecta la interacción planta-polinizador.

Las poblaciones estudiadas se encuentran localizadas en la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas, en la vertiente del Golfo de México. En esta zona, el bosque tropical ha sido severamente fragmentado en los últimos años (Dirzo *et al.* 1997), aún cuando existen áreas extensas de bosque continuo no perturbado.

La información obtenida en este estudio permitió describir cualitativa y cuantitativamente la variación espacial y temporal en el éxito reproductivo de las poblaciones de *D. seguine* en un hábitat fragmentado en la región de Los Tuxtlas y es un aporte al entendimiento del manejo de paisajes que incorpore la protección del ciclo de vida completo de estas especies.

MÉTODO

Especie y sitios de estudio

Dieffenbachia seguine es una herbácea autoincompatible (Cap. I), por lo tanto la reducción en la abundancia de polinizadores puede causar efectos severos, ya que la producción de semillas depende exclusivamente de la presencia de escarabajos del género *Cyclocephala* (Cap. I)

En *D. seguine* el éxito reproductivo femenino se puede medir a dos niveles: 1) Probabilidad de éxito de una inflorescencia en la producción de una infrutescencia (ER-Infr) y 2) Eficiencia de semillas: Número de frutos (ó semillas) en la infrutescencia respecto al número de óvulos (ER-Semillas). Estos conteos se pueden realizar de manera sencilla debido a que en esta especie cada flor en la inflorescencia posee un óvulo, produciendo un fruto con una semilla, por lo tanto el número de frutos/infrutescencia es equivalente al número de semillas/infrutescencia. Además, se pueden distinguir los frutos desarrollados de los no desarrollados (abortados), debido a que estos últimos están poco expandidos y

amarillos, mientras los frutos desarrollados están expandidos y con tono anaranjado a rojo. La suma de ambos tipos de frutos es equivalente al número total de flores/inflorescencia. Cuatro poblaciones de *Dieffenbachia seguine* fueron seleccionadas en la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas. Dos poblaciones en selva continua, en la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas - UNAM en un área >640 ha (C1 y C2) y dos poblaciones en fragmentos de 3 y 37 ha (F1 y F2 respectivamente). De esta manera se pudo comparar el éxito reproductivo de poblaciones en bosque continuo con poblaciones en fragmentos. Posteriormente, se evaluó la existencia de limitación de polen (polinizadores) en estas poblaciones. Para llevar a cabo estas observaciones se realizaron censos, colectas de infrutescencias, conteos de semillas y experimentos de suplemento de polen en períodos discontinuos durante cinco años (Tabla 1).

Éxito reproductivo

La tasa de conversión de inflorescencias a infrutescencias se evaluó en dos temporadas reproductivas: Octubre de 2000 (Censo I) y Noviembre de 2002 (Censo II). Para esto se marcaron todos los individuos de *D. seguine* con inflorescencia en un área de 1000 m² y cinco meses después fueron colectadas las infrutescencias maduras sin abrir, para evitar la remoción de los frutos por los dispersores. De igual manera, la eficiencia de semillas se estimó para dos períodos, mediante colectas de infrutescencias. La primera al final del Censo II (Abril 2003) y la segunda en Febrero de 2005 (Censo III). En esta última, se cosecharon todas las infrutescencias viables en un área de aproximadamente 2000 m² en cada población. Se contaron las semillas viables, las no desarrolladas y las dañadas (depredadas parcial o totalmente) de cada inflorescencia; se calculó la proporción semillas/óvulos (ER-semillas).

Limitación de polen

Durante la segunda fase, se realizaron experimentos de suplemento de polen para evaluar si en estas poblaciones existe una reducción en la producción de semillas debido a limitación de polen, y se midió el éxito reproductivo en los dos niveles, en las cuatro poblaciones.

La limitación por polen puede medirse mediante experimentos de suplemento de polen. Este experimento consiste en comparar el número de semillas producidas por

inflorescencias con polinización natural (tratamiento “control”), con el número de semillas producidas por inflorescencias a las cuales se les ha emasculado para impedir la autopolinización y se les suministra una carga de polen extra de otros individuos (tratamiento “suplemento de polen”) (Schoen & Lloyd 1992).

Para realizar estos experimentos, se visitaron diariamente durante 12 días a las cuatro poblaciones, se colectó el polen de las inflorescencias en fase masculina y se polinizaron manualmente las inflorescencias abiertas.

En Septiembre 2003 y Junio 2004 se embolsaron 12 inflorescencias, en promedio, en cada población. Una vez abiertas y receptivas se les suministró con la ayuda de un pincel, una carga abundante de polen obtenida de las inflorescencias en fase masculina disponibles, y posteriormente se emascularon. Considerando que *D. seguine* se puede propagar vegetativamente, las inflorescencias donadoras de polen se eligieron a una distancia mayor a 25 m de la planta polinizada con la finalidad de evitar apareamientos entre individuos relacionados genéticamente. Se marcaron también 20 y 12 inflorescencias en promedio en cada población durante el Experimento I y II, respectivamente. Éstas inflorescencias se dejaron polinizar naturalmente para utilizarlas como tratamiento control y como medidas adicionales de las proporciones infrutescencias/inflorescencias y semillas/óvulos. Cinco meses después se colectaron las infrutescencias maduras.

Tabla 1. Períodos de las observaciones realizadas en cuatro poblaciones de *Dieffenbachia seguine* entre Octubre 2000 y Febrero 2005 en la región de Los Tuxtlas.

Observación	Procedimiento	Fecha	Datos
Éxito reproductivo	Censo I	Octubre 2000	ER-Infr
	Censo II	Noviembre 2002	ER-Infr y ER-Semillas
	Censo III	Febrero 2005	ER-Semillas
Limitación de polen	Experimento I	Septiembre 2003	Limitación de polen
	Experimento II	Junio 2004	Limitación de polen

Análisis estadísticos

Se realizaron pruebas de normalidad (Shapiro Wilk) a todas las variables. El número de inflorescencias e infrutescencias se distribuyeron normalmente. En los conteos de semillas, únicamente el número de flores/inflorescencia presentó distribución normal, el resto de las variables (número de semillas viables, abortadas y con daño y éxito reproductivo) no se distribuyen normalmente. La tendencia fue igual para la colecta de infrutescencias en 2003

y 2005. Las diferencias en la probabilidad de éxito en la producción de infrutescencias entre hábitat fragmentado y continuo y entre poblaciones dentro de hábitats se evaluaron usando una regresión logística y una prueba “likelihood ratio” o prueba G^2 (Quinn & Keough 2002). Las diferencias en los promedios de las variables medidas entre poblaciones se evaluaron usando una prueba Wilcoxon (que se aproxima a una χ^2 cuando existen más de dos grupos) para las variables que no presentaron distribución normal; en el caso de las que se distribuyen normalmente, se utilizó un ANOVA. Las diferencias en los promedios entre poblaciones de bosque continuo y de fragmentado (tipo de hábitat) fueron evaluadas mediante una prueba Wilcoxon (que se aproxima a una t cuando son dos grupos) en las variables que no presentaron distribución normal. Para las variables con distribución normal se utilizó una prueba t . La correlación de Spearman fue usada para estimar la magnitud de la asociación entre las variables y el tamaño (ha) del fragmento. Se realizaron regresiones lineales con la finalidad de determinar el tipo de relación entre el éxito reproductivo y el área del fragmento (Zar 1999).

RESULTADOS

Éxito reproductivo

Se observó gran variación en el número de ramets con inflorescencias e infrutescencias entre poblaciones durante el año 2000 (Fig. 1a). Sin embargo estas diferencias no fueron significativas entre las poblaciones de fragmentos comparadas con las poblaciones de bosque continuo (Inflorescencias: $t = -0.075$, $P = 0.9474$; Infrutescencias: $t = -0.121$, $P = 0.9146$). En el año 2002, el número de inflorescencias fue altamente variable entre poblaciones y fue significativamente mayor en las poblaciones de fragmentos ($t = 22.295$, $P = 0.0020$) (Fig. 1b), en contraste con el año anterior (Fig. 1a). El número de infrutescencias viables fue similar en todas las poblaciones y no fue significativamente diferente entre poblaciones en bosque fragmentado y bosque continuo ($t = 1.265$, $P = 0.3333$). La probabilidad de éxito en la producción de infrutescencias (ER-Infr) fue pequeña en todos los sitios (0.180-0.520) durante el año 2000. La probabilidad de producir una infrutescencia fue significativamente mayor en el bosque continuo que en los fragmentos (Tabla 2, Fig. 2).

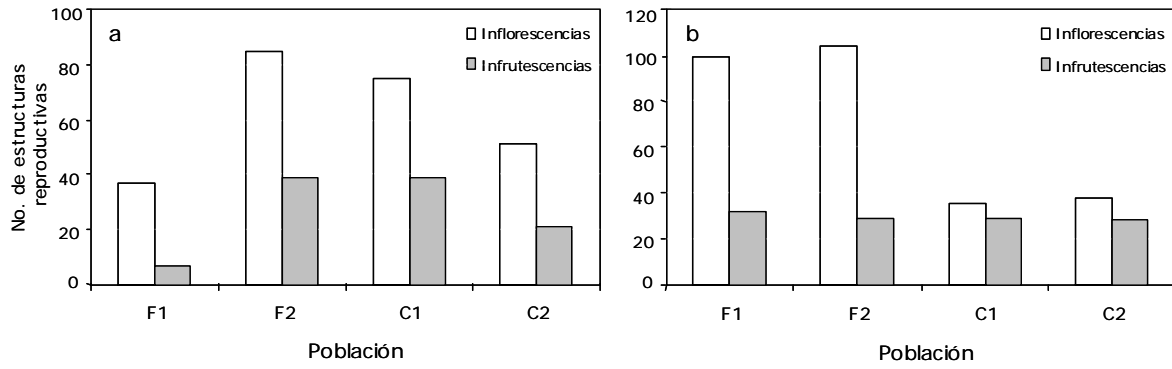


Figura 1. Número de inflorescencias e infrutescencias por población durante dos temporadas reproductivas. a) 2000 y b) 2002.

Tabla 2. Resultados de la prueba G^2 para 2000 y 2002. H_0 = No existe relación entre la probabilidad de éxito en la producción de infrutescencias y el tipo de hábitat (fragmentado y continuo).

Fuente	g.l.	2000		2002	
		G^2	P	G^2	P
Hábitat	1	5.312	0.0212	52.399	0.0000
Población [Hábitat]	2	9.954	0.0069	1.380	0.5015

En el segundo censo (2002), el éxito reproductivo a nivel de infrutescencias fue variable entre sitios, mayor que en el año anterior (0.278-0.828) y significativamente más alto en las poblaciones de bosque continuo (Tabla 2, Fig. 2).

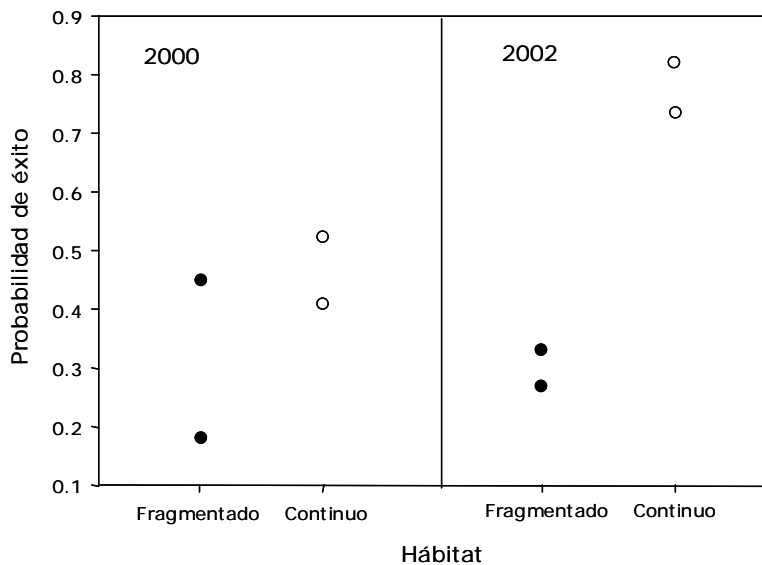


Figura 2. Probabilidad de éxito en la producción de infrutescencias (ER-Infr) en poblaciones de hábitat fragmentado y de bosque continuo en dos temporadas reproductivas, 2000 y 2002.

Se contaron las semillas viables, no desarrolladas y con daño en 30 infrutescencias en promedio por población durante el Censo II. El número de semillas viables fue altamente variable entre individuos dentro de las poblaciones (2-40), aunque los promedios por población y por tipo de hábitat fueron poco variables (Fig. 3a y Tabla 3). El número de semillas no desarrolladas mostró variación entre individuos (0-22) y entre poblaciones (Fig. 3b). Las poblaciones C1 y C2 presentaron 30% menos abortos que las poblaciones de fragmentos (Tabla 3). El número de semillas con daño presentó gran variación entre individuos. La mayoría de infrutescencias no presentaron semillas depredadas. Entre poblaciones la variación en el número de semillas con daño fue alta. La población F1 tuvo un 87% más de semillas dañadas que la población C1 (Fig. 3c); además se detectaron diferencias significativas entre poblaciones de hábitat continuo y fragmentado (Tabla 3). El número de flores/inflorescencia mostró gran variación entre poblaciones. La población F1 tuvo el 26.5% más flores en cada inflorescencia que la población C1 (Fig. 3d). El promedio de flores/inflorescencia fue significativamente mayor en poblaciones de fragmentos comparado con poblaciones de selva continua (Tabla 3).

Tabla 3. Promedio de semillas viables, no desarrolladas, con daño y número total de flores/inflorescencia para poblaciones de *D. seguine* en fragmentos y bosque continuo (2002).

Semillas	Fragmentos	Continuo	P
	Promedio ± D.E.	Promedio ± D.E.	
Viables	14.87 ± 1.21	17.83 ± 1.27	0.0783
No desarrolladas	20.38 ± 1.19	14.21 ± 1.26	0.0015
Con daño	5.14 ± 0.58	1.73 ± 0.61	0.0001
Flores/Inflorescencia	40.40 ± 1.26	33.53 ± 1.33	0.0003

El éxito reproductivo medido como el número de semillas/número de óvulos fue significativamente mayor para las poblaciones de bosque continuo comparado con las poblaciones de fragmentos ($t = 3.40$, $P = 0.0007$) (Fig. 4a).

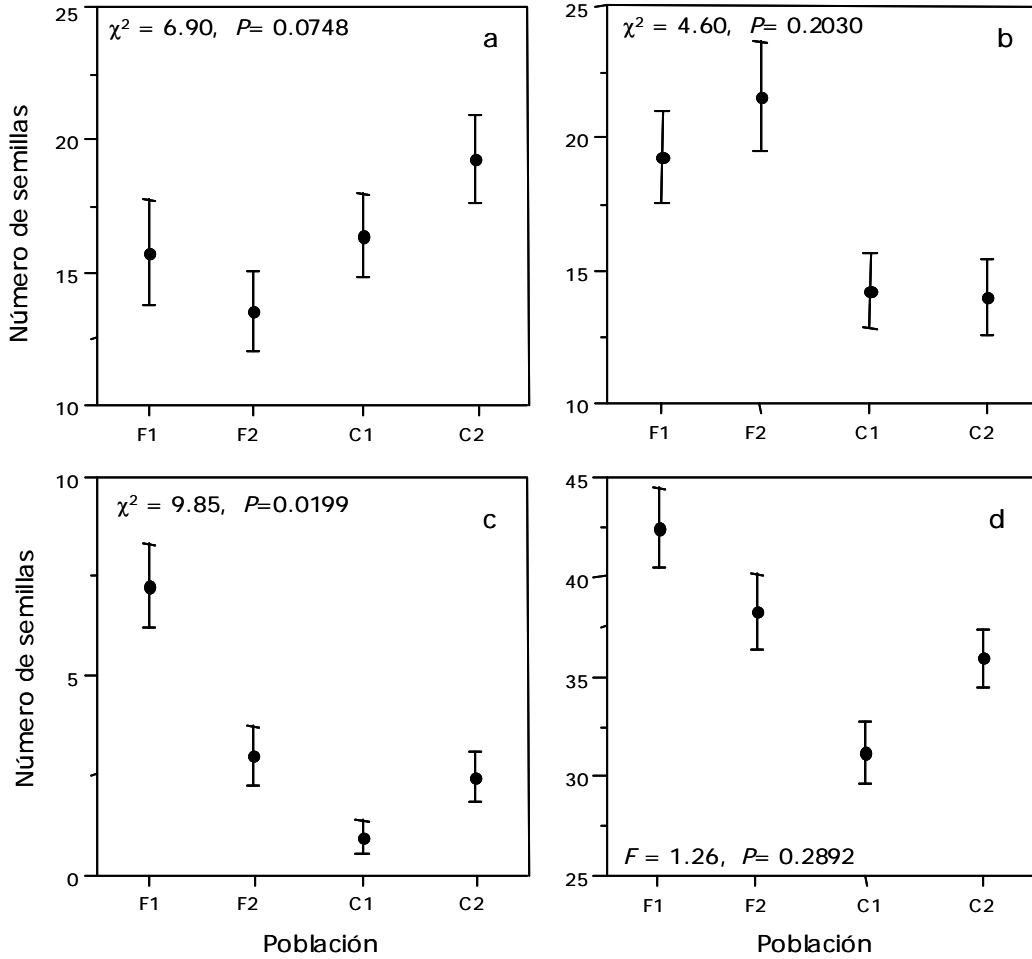


Figura 3. Número promedio (\pm error estándar) de semillas a) viables, b) no desarrolladas, c) con daño y d) número total de flores/inflorescencia en cuatro poblaciones de *D. seguine* en el año 2002.

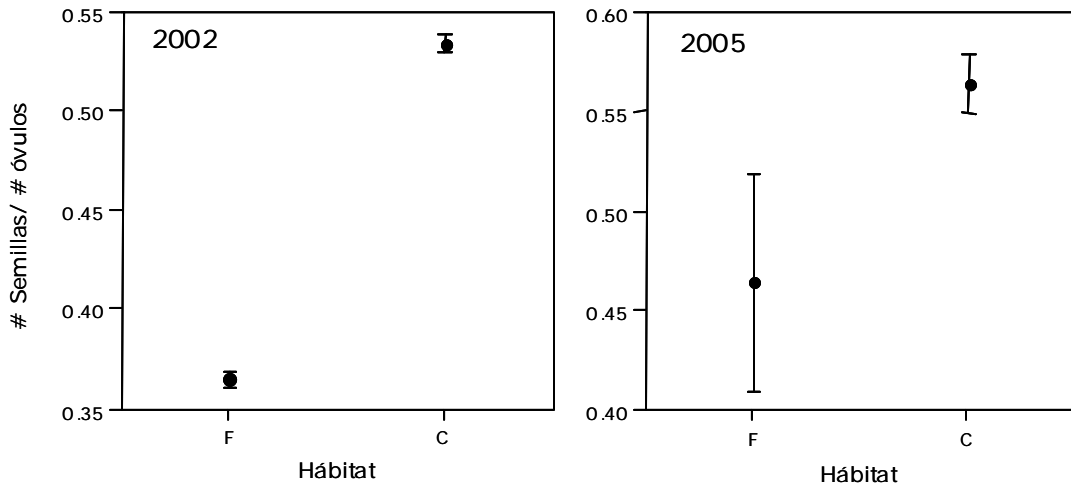


Figura 4. Éxito reproductivo (Número de semillas/Número de óvulos) en promedio para poblaciones de *D. seguine* en fragmentos (F) y bosque continuo (C) en dos temporadas reproductivas, 2002 y 2005.

En la colecta de infrutescencias en el año 2005 se contaron las semillas viables, no desarrolladas y con daño en 42 infrutescencias en promedio por población.

Al igual que en el conteo de semillas anterior, todas las variables mostraron gran variación entre individuos dentro de las poblaciones. El promedio de semillas viables entre poblaciones fue poco variable (Fig. 5a), sin embargo fue significativamente mayor en poblaciones de selva continua (Tabla 4). El número de semillas no desarrolladas mostró poca variación entre poblaciones (Fig. 5b), y no se detectaron diferencias significativas entre tipos de hábitat aún cuando las poblaciones de selva continua presentaron el 23% menos de abortos que las poblaciones de fragmentos (Tabla 4). La depredación de semillas fue menor en comparación con el año 2002 y mostró muy poca variación entre poblaciones (Fig. 5c) y tipos de hábitat (Tabla 4). El número de flores/inflorescencia fue poco variable entre poblaciones (Fig. 5d). Tampoco se detectaron diferencias significativas entre tipos de hábitat (Tabla 4).

Tabla 4. Promedio de semillas para poblaciones de *D. seguine* en fragmentos y bosque continuo (2005).

Semillas	Fragmentos	Continuo	P
	Promedio \pm D.E.	Promedio \pm D.E.	
Viables	18.78 \pm 1.46	22.62 \pm 1.18	0.0962
No desarrolladas	18.37 \pm 1.33	14.13 \pm 1.10	0.0417
Con daño	1.11 \pm 0.27	0.93 \pm 0.24	0.8842
Flores/Inflorescencia	38.27 \pm 1.05	37.68 \pm 1.07	0.3561

El éxito reproductivo a nivel de semillas fue significativamente mayor para las poblaciones de bosque continuo comparado con las poblaciones de fragmentos ($t = -2.55$, $P = 0.0106$) (Fig. 4b).

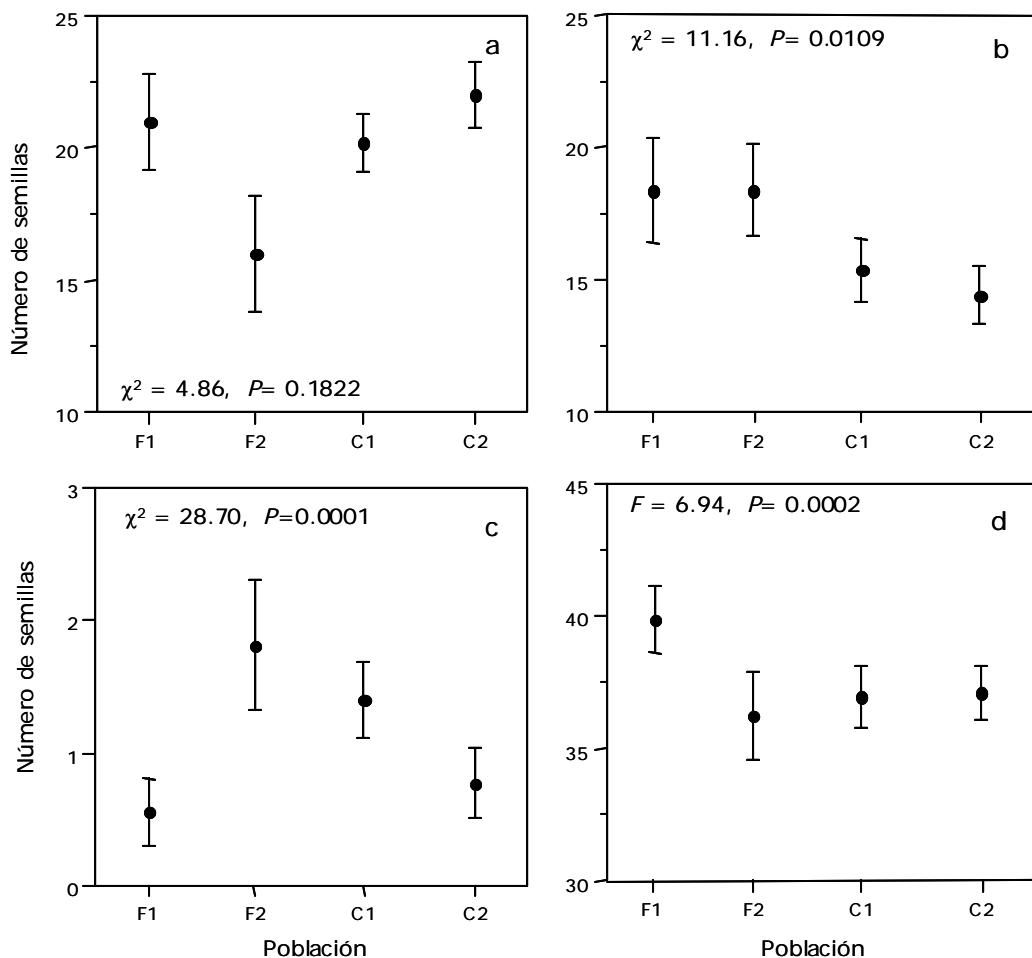


Figura 5. Número promedio (\pm error estándar) de semillas a) viables, b) no desarrolladas, c) con daño y d) número total de flores/inflorescencia en cuatro poblaciones de *D. seguine* en 2005.

Limitación de polen

De las 12 inflorescencias polinizadas manualmente en cada población en el Experimento I y II, el 43.2% y el 49% produjeron infrutescencias viables, en promedio, para cada año, respectivamente. Las infrutescencias restantes fueron abortadas durante el proceso de desarrollo. En comparación, sólo el 2.5% y 19.6% de las infrutescencias control alcanzaron la madurez. El número de infrutescencias viables promedio fue significativamente mayor en el tratamiento “Suplemento de polen” que en el tratamiento “Control” (Fig. 6). No se detectaron diferencias significativas entre tipos de hábitat en el número de infrutescencias viables o abortadas en ninguno de los dos experimentos.

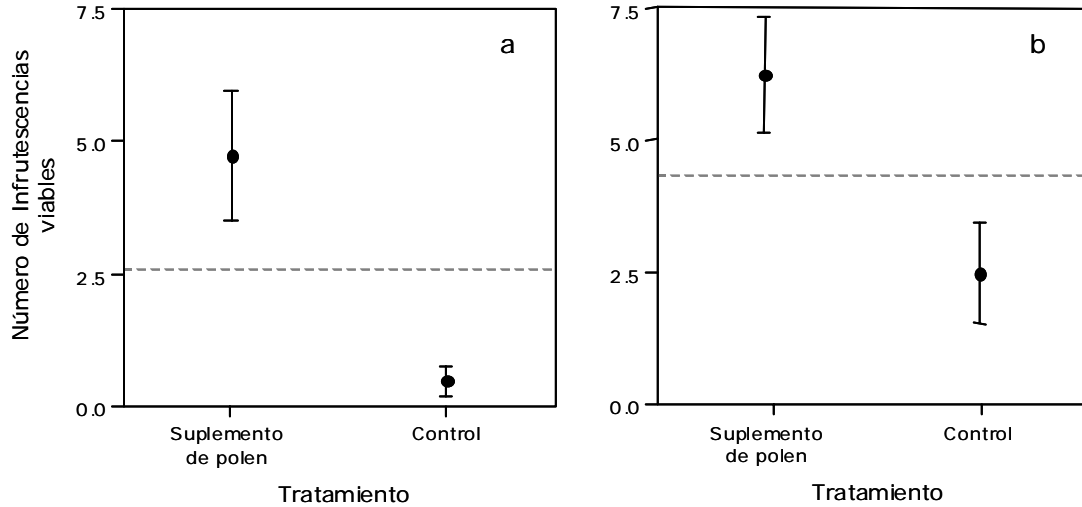


Figura 6. Número de infrutescencias viables por tratamiento. a) Experimento I (2003) y b) Experimento II (2004).

En casi todos los casos la eficiencia de semillas fue mayor en las infrutescencias que recibieron suplemento de polen que en las infrutescencias con polinización abierta, aunque es necesario tener en cuenta que la eficiencia de semillas calculada para las inflorescencias control está un poco desviada, ya que en el Experimento I el conteo de semillas se realizó únicamente en dos infrutescencias y en el Experimento II en diez infrutescencias. El número de semillas no pudo compararse entre los dos tratamientos y los tipos de hábitat debido al bajo número de infrutescencias viables (Tabla 5).

Tabla 5. Eficiencia de semillas y número de inflorescencias con *suplemento de polen* e inflorescencias con polinización abierta (*control*) en cuatro poblaciones de *D. seguine* durante dos temporadas reproductivas.

Población	Experimento I (2003)				Experimento II (2004)			
	Suplemento de polen		Control		Suplemento de polen		Control	
	Efic. semillas	N	Efic. semillas	N	Efic. semillas	N	Efic. semillas	N
F1	0.499	16	0.437	22	0.520	17	0.379	17
F2	0.580	6	0.692	26	0.512	11	0.000	11
C1	0.878	3	0.000	16	0.670	12	0.511	12
C2	0.516	19	0.000	18	0.528	11	0.149	11
Promedio	0.629	11	0.282	20.5	0.560	12.7	0.259	12.7

La mayoría de las correlaciones entre las variables con el área del fragmento no fueron significativas. Sin embargo, el ER-Infr ($r = 0.978$, $P = 0.0219$) y ER-Semillas ($r = 0.996$, $P = 0.0039$) en 2002 estuvieron asociados positivamente con el área del fragmento. En contraste

la densidad estuvo relacionada de manera inversa con el área del fragmento ($r = -0.992$, $P = 0.0076$). Solamente el ER-Infrutescencias y el ER-Semillas en 2002 mostraron una relación lineal significativa con el área del fragmento. (Tabla 6).

Tabla 6. Regresiones lineales entre el área del fragmento y el éxito reproductivo (infrutescencias y semillas) en varias temporadas reproductivas.

Variables	Ecuación	R^2	P
Área vs. ER-Infr (2000)	$ER-Infr_{2000} = 0.317 + 0.0024 \text{ área}$	0.010	0.4163
Área vs. ER-Infr (2002)	$ER-Infr_{2002} = 0.287 + 0.0079 \text{ área}$	0.934	0.0219
Área vs. ER-Semillas (2002)	$ER-Infr_{2002} = 0.359 + 0.0028 \text{ área}$	0.988	0.0039
Área vs. ER-Semillas (2005)	$ER-Infr_{2005} = 0.462 + 0.0016 \text{ área}$	0.569	0.2455

DISCUSIÓN

El éxito reproductivo en las poblaciones de *Dieffenbachia seguine* es reducido debido a una variedad de causas. La limitación de polen, las altas tasas de aborto y la depredación de infrutescencias y semillas son algunos factores que limitan la producción de semillas. La importancia de cada factor fue variable entre poblaciones y tipo de hábitat y entre años.

Limitación por polen

El suplemento de polen aumentó significativamente la producción de infrutescencias en todas las poblaciones. La conversión de inflorescencias a infrutescencias fue del 46% en promedio para todas las poblaciones en los dos años en inflorescencias con suplemento de polen, mientras que en las inflorescencias control fue, en promedio, menor al 12%.

La alta tasa de aborto en las infrutescencias control sugiere una baja tasa de visita de polinizadores debido a que *D. seguine* es auto-incompatible, por lo tanto la producción de infrutescencias y semillas depende exclusivamente de éstos. La eficiencia de semillas mostró la misma tendencia, fue del 60% en promedio para todas las poblaciones en los dos años en inflorescencias con suplemento de polen, comparado con el 26% en infrutescencias control.

En conjunto, esta información constituye evidencia de la falta de polinización en estas poblaciones, y de que es un factor que está determinando en gran parte la reducción en el éxito reproductivo femenino. Esta observación es apoyada por la baja abundancia de escarabajos polinizadores detectada en los sitios estudiados (Cap. I). Por otra parte, es posible que factores asociados al experimento tales como la falta de receptividad en el momento de aplicación del polen, la incompatibilidad con el polen, la obstrucción del

micrópilo con las cargas abundantes de polen o el daño físico de los óvulos causado por la aplicación del polen afectaran la producción de semillas (Young & Young 1992). Sin embargo, la tendencia en todas las poblaciones y todas las infrutescencias es similar, lo que sugiere un efecto pequeño de dichos factores.

Alta tasa de aborto de infrutescencias y semillas

La alta tasa de aborto de infrutescencias observada en el campo en inflorescencias polinizadas naturalmente en dos temporadas reproductivas concuerda con los datos obtenidos experimentalmente, lo cual sugiere que el aborto es un mecanismo frecuente en esta especie. La sobreproducción de inflorescencias puede tener algunas ventajas, como cuando la polinización y la depredación de semillas son inciertas o para mejorar la calidad de los frutos y semillas a través del aborto selectivo (cuando las plantas detienen su inversión en frutos que no contribuirán a sus generaciones futuras). Tal aborto selectivo depende del orden de polinización, número de semillas en desarrollo, fuente del polen o alguna combinación de estos factores (Stephenson 1981).

El hecho de que el número de infrutescencias que alcanzaron la madurez fue tan pequeño y que la eficiencia de semillas en estas poblaciones alcanzó un máximo de 87% en inflorescencias polinizadas manualmente, aún cuando estas se realizaron con cargas abundantes de polen, indica que aparte de la limitación de polen, existen otros factores que conducen a la falla reproductiva en estas plantas.

Una evidencia adicional fue obtenida a partir de observaciones de una colecta de infrutescencias abortadas (completamente flácidas y cloróticas) realizadas en Noviembre de 2003. Se colectaron 39 infrutescencias en las cuatro poblaciones y todas presentaban semillas en desarrollo, las cuales variaron entre 19 y 52 con un promedio de 35 semillas/infrutescencia, indicando que la polinización no es el único factor que influye en la producción de semillas. También es posible que estas infrutescencias hayan sido pequeñas durante el desarrollo, en comparación a otras que crecieron normalmente, y finalmente hayan sido abortadas por las plantas madre (Stephenson 1981)

Muchas investigaciones sobre el éxito reproductivo en plantas han sugerido una diversidad de factores ambientales, ecológicos y genéticos implicados en la reducción en el éxito reproductivo femenino. Entre estos se encuentran el microclima, la carga genética y

los efectos maternos (Charlesworth 1989, Cunningham 2000), los nutrientes, la depredación, daños físicos por factores abióticos (Bierzychudek 1981, Stephenson 1981, Rathcke & Jules 1993, Campbell & Halama 1993, DiFazio *et al.* 1998), el tamaño de las poblaciones y la cubierta de la vegetación (Donaldson *et al.* 2002).

Polinizadores

El hecho de que el número de infrutescencias abortadas fue mayor y la eficiencia de semillas menor en los fragmentos sugiere que la limitación de polinizadores es más importante en los fragmentos. Otra evidencia de esta idea, es que el número de semillas no desarrolladas fue mayor en los fragmentos que en el bosque continuo. La producción de semillas reducida debida a falta de polinización también ha sido detectada en varias especies en una variedad de ecosistemas fragmentados, incluso ha sido detectada en plantas con polinizadores generalistas (Donaldson *et al.* 2002). Entre las especies estudiadas que han sufrido una reducción en el éxito reproductivo están *Taxus brevifolia* (Taxaceae), un árbol del oeste de Estados Unidos (DiFazio *et al.* 1998), *Pterygodium catholicum* (Orchidaceae), una hierba perenne del sur de África (Donaldson *et al.* 2002), *Acacia brachybotrya* (Mimosaceae) y *Eremophila glabra* (Myoporaceae), dos arbustos de Australia (Cunningham 2000), *Primula sieboldii* (Primulaceae), una hierba endémica de Japón (Matsumura & Washitani 2000), *Clarkia concinna concinna* (Onagraceae), una herbácea de California (Groom 2001). En contraste, la hierba *Babiana ambigua* (Iridaceae) presentó una mayor producción de frutos en fragmentos pequeños (Donaldson *et al.* 2002).

D. seguine es polinizada por tres especies de escarabajos del género *Cyclocephala*, las cuales se encontraron en baja abundancia en todos los sitios estudiados (12 escarabajos en 271 inflorescencias), razón por la cual fue muy difícil comparar la abundancia y diversidad entre tipos de hábitat (Cap. I). Sin embargo, en una variedad de estudios se ha observado una asociación positiva entre área del fragmento y diversidad de insectos polinizadores (Klein 1989, Didham 1996, Steffan-Dewenter *et al.* 2002). En contraste, la ausencia de asociación fue observada por Donaldson *et al.* (2002) en fragmentos de diferentes tamaños en África. La única tendencia consistente que detectaron fue que la abundancia disminuyó con el aumento en distancia a fragmentos grandes, indicando que éstos pueden actuar como fuente de polinizadores. Además, observaron que los insectos polinizadores fueron

más sensibles a características del hábitat como porcentaje de la cobertura vegetal, porcentaje de pastos y la cantidad de roca en el suelo, que al tamaño del fragmento. En el caso de *Cyclocephala*, es probable que la desecación y aumento de temperatura del suelo en los fragmentos a la cual son susceptibles las larvas (Klein 1989, Halffter *et al.* 1991) sea una de las causas de su baja abundancia, así como la depredación de huevos o estadios tempranos de desarrollo, como ha sido detectado en escarabajos del mismo género en Estados Unidos por Zenger & Gibb (2001).

Otro factor que puede influenciar la abundancia de los polinizadores es la disponibilidad de recursos florales en tiempo y en espacio (Stephenson 1981, Handel 1985). Mayor número de flores influyen las tasas de visita y la fidelidad de los polinizadores. Sin embargo, en las poblaciones de *D. seguine* la densidad de individuos reproductivos es alta y aún más alta en los fragmentos, de manera que no representa un recurso limitado o poco atractivo para los polinizadores.

Recursos y microclima

El éxito reproductivo fue menor en los fragmentos que en bosque continuo. Esto sugiere que características de fragmentos de hábitat pequeños, como disminución en la humedad y aumento de la temperatura y la luz (Saunders *et al.* 1991) producen un efecto negativo en la producción de infrutescencias y semillas en las poblaciones de *D. seguine*. Es probable que el sombreado tenga un efecto positivo en la producción de semillas en la selva continua. Esta misma tendencia ha sido reportada en poblaciones de *Taxus brevifolia*, en las cuales los árboles que se encuentran bajo dosel no perturbado producen más semillas que bajo doseles clareados (Crawford 1983 en DiFazio *et al.* 1998). Sin embargo, Niesenbaum (1993) y DiFazio *et al.* (2002) encontraron que la producción de semillas en varias especies es limitada por baja disponibilidad de luz.

La disponibilidad de nutrientes es otro factor que puede causar variación en la producción de semillas. Sin embargo, en las poblaciones de *D. seguine*, es probable que la variación en la cantidad de recursos disponibles en el suelo sea pequeña. Primero, porque las tasas de aborto altas fueron generalizadas (mayor al 80% en infrutescencias control en ambos años en todas las poblaciones), segundo, porque las características de los suelos son homogéneas en la región estudiada debido a que los procesos de formación que han sufrido son los mismos y además presentan alta fertilidad (Martínez-Sánchez 1998) y

tercero, porque es probable que estas plantas puedan utilizar recursos almacenados en los rizomas (Stephenson 1981). Sin embargo, no se descarta que la variación en la producción de semillas entre individuos, esté relacionada con la existencia de una gran heterogeneidad en la disponibilidad de nutrientes a una escala pequeña, es decir, que las porciones de suelo ocupadas por ramets separados distancias cortas (p.e. 1-2 m) presenten características químicas diferentes, aspecto que sería interesante evaluar.

A nivel individual, la producción de semillas reducida, no es causada por la asignación diferencial de recursos, es decir, asignación de recursos a otra inflorescencia o a crecimiento vegetativo, debido a que la mayoría de plantas solo produce una infrutescencia y no se propaga clonalmente mientras porta una estructura reproductiva (S. Cuartas, Obs. Pers). Esta estrategia opera en conjunto con un mecanismo fisiológico generalizado, que consiste en que cuando no se pueden almacenar recursos en la inflorescencia, la producción de inhibidores de crecimiento es promovida en la planta, con la consecuente abscisión del fruto (Stephenson 1981).

Adicionalmente, estudios realizados por Henny & Rasmusen (1980) demostraron que la polinización en *D. seguine* es máxima cuando el nivel de humedad relativa es del 100%. Es probable que la humedad sea un factor limitante en estas poblaciones, debido a que en los fragmentos estudiados no se alcanza tal nivel de humedad (S. Cuartas, Obs. Pers).

Tamaño de la población y tipo de hábitat

De acuerdo con Donaldson *et al.* (2002), el tamaño de la población es un factor importante en la reproducción en plantas, incluso más importante que el tamaño del fragmento, debido a que encontraron que el desempeño reproductivo de *Ornithogalum thyrsoides* (Hyacinthaceae) y *Babiana ambigua* fue mayor en poblaciones grandes que en poblaciones pequeñas, independiente del tamaño del fragmento. En las poblaciones de *D. seguine* ocurrió lo contrario, aunque las poblaciones son grandes en todos los sitios, y en los fragmentos tanto la densidad de ramets vegetativos como reproductivos es mayor que en el bosque continuo, el éxito reproductivo fue menor en los fragmentos, indicando que en esta especie el área del fragmento y sus características asociadas son relevantes.

Depredación de infrutescencias y semillas

Otro factor que está estrechamente asociado al éxito reproductivo en las poblaciones de plantas es la depredación de frutos y semillas. En las poblaciones de *D. seguine* la depredación de infrutescencias completas por hormigas fue alta en todas las poblaciones, y significativamente mayor en los fragmentos (39%) que en el bosque continuo (14%) (Cap. I). Además, la tasa de daño a las semillas varió entre 9 y 25% en 2002 y entre 4 y 5.5% en 2005. La depredación parece ser promovida en las poblaciones de fragmentos, probablemente por el aumento en abundancia de las hormigas depredadoras, atraídas por la alta disponibilidad de infrutescencias en comparación con las poblaciones de selva continua (DiFazio *et al.* 1998).

La carga genética

Teóricamente, la sobreproducción de flores en una población se puede alcanzar como una estrategia para alcanzar la fertilidad máxima, considerando la incertidumbre en polinización y el costo (en recursos) de los frutos. Otra interpretación, es que plantas que se entrecruzan sufren altas cargas genéticas (reducción relativa en la adecuación promedio de una población comparado con la adecuación del mejor genotipo posible), causando el aborto temprano de los productos de fertilización (Charlesworth 1989). En una población que únicamente se entrecruza, los individuos son heterocigotos para muchos alelos mutantes que reducen la adecuación, en comparación con una población que se autofertiliza.

Otro factor que puede reducir la adecuación, particularmente en poblaciones con tamaños efectivos pequeños, es el aumento de apareamientos entre individuos relacionados genéticamente, que conduce a un aumento del nivel de endogamia dentro de las poblaciones (van Treuren *et al.* 1991, Ellstrand & Elam 1993). Esto puede afectar los componentes individuales de la adecuación de las plantas a través de la depresión endogámica (Young *et al.* 1996). En las poblaciones de *D. seguine*, su capacidad de propagarse vegetativamente puede acentuar la estructura genética espacial, promoviendo la endogamia biparental, con la consecuente depresión en adecuación. La mayor tasa de abortos en los fragmentos puede resultar de una posible asociación positiva entre el área del fragmento y el nivel de perturbación, aumentando la propagación clonal (Cuartas 2000) y por consiguiente, la estructura espacial. De esta manera, el número de

apareamientos endogámicos aumentaría en las poblaciones y en consecuencia la expresión de alelos deletéreos.

Variación temporal

Además de la variación espacial en el éxito reproductivo, la variación en el tiempo también fue detectada en el mediano plazo en el que se realizó este estudio. El ER-Semillas mostró tendencias iguales en los dos Censos, mientras que tanto el ER-Infr como el número de semillas con daño mostraron diferentes tendencias en el tiempo. De manera que se pudieron detectar efectos de la fragmentación que un estudio realizado en un momento en el tiempo no se hubiera podido observar, o hubiera tenido un alcance muy limitado. Pocos estudios han evaluado la variación temporal en el éxito reproductivo, no obstante, Murren (2002) estudió poblaciones de la orquídea *Catasetum viridiflavum* en Panamá durante 3 años consecutivos, y solo en uno de los años la producción de frutos fue mayor en los fragmentos, asociado probablemente al fenómeno de El Niño.

Relación con el área del fragmento

La asociación entre éxito reproductivo y área del fragmento ha mostrado ser variable entre especies. En el caso de *D. seguine*, la conversión de inflorescencias a infrutescencias en el Censo II y la eficiencia de semillas en ambos censos fueron significativa y positivamente relacionados al área del fragmento. Estos resultados sugieren una mayor vulnerabilidad de falla de polinización en esta especie en fragmentos pequeños aislados que en los grandes y mejor conectados, como ha sido sugerido también para otras especies perennes por Donaldson *et al.* (2002). En oposición, en 14 poblaciones remanentes de *Leucochrysum albicans* (Asteraceae) no se encontró asociación entre la producción de semillas y el tamaño del fragmento (Costin *et al.* 2001).

En resumen, considerando la biología reproductiva de *D. seguine* en la región de Los Tuxtlas estudiada durante 5 años se pueden reconocer algunas tendencias de las poblaciones asociadas a la fragmentación del bosque tropical, aunque son variables en el tiempo: a) Mayor producción de inflorescencias y flores/inflorescencia (esfuerzo reproductivo) en poblaciones de fragmentos que en bosque continuo, b) Mayor éxito reproductivo en bosque continuo que en fragmentos, tanto en la conversión de

inflorescencias a infrutescencias como en el número de semillas/número de óvulos, c) Mayor depredación de infrutescencias y semillas en fragmentos. La varianza en los resultados y la no asociación al tamaño de los fragmentos de algunas variables ecológicas, puede deberse a otros efectos espaciales y factores específicos de cada sitio. Tal variación espacial es la tendencia predominante en los estudios de ecología de poblaciones.

Finalmente, una explicación más precisa para la reducción del éxito reproductivo en poblaciones de *D. seguine*, podría ser una interacción entre las características ambientales asociadas a fragmentos, polinización escasa debida a la depredación de larvas de escarabajos por desecación y un aumento en abundancia de depredadores de infrutescencias y semillas. Tal interacción entre ecosistemas perturbados y depredación ha sido sugerida para las poblaciones de *Taxus brevifolia* (DiFazio *et al.* 1998)

LITERATURA CITADA

- Aizen MA & Feinsinger P. 1994. Forest fragmentation, pollination and plant reproduction in Chaco dry forest, Argentina. *Ecol.* 75: 330-351.
- Bawa KS. 1990. Plant-pollinator interactions in tropical rain forest. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 21:399-422.
- Bierzychudek P. 1981. Pollinator limitation of plant reproductive effort. *Am. Nat.* 117: 838-840.
- Campbell DR & Halama KJ. 1993. Resource and pollen limitation to lifetime seed production in a natural plant population. *Ecology* 74: 1043-1051.
- Charlesworth D. 1989. Why do plants produce so many more ovules than seeds? *Nature* 338. 21-22.
- Costin BJ, Morgan JW & Young AG. 2001. Reproductive success does not decline in fragmented populations of *Leucochrysum albicans* subsp. *albicans* var. *tricolor* (Asteraceae). *Biol. Cons.* 98: 273-284.
- Crawford RT. 1983. Pacific tew community ecology in north-central Idaho with implications to forest land management. Ph.D. dissertation. University of Idaho, Boise ID.
- Cuartas S. 2002. Efectos ecológicos y genéticos de la fragmentación en las poblaciones de *Dieffenbachia seguine* (Araceae) en Los Tuxtlas, Veracruz, México. M. Sc. Thesis. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
- Cunningham SA. 2000. Effects of habitat fragmentation on the reproductive ecology of four plant species in Mallee Woodland. *Cons. Biol.* 14: 758-768.
- Didham RK, Ghazoul J, Stork N & Davis AJ. 1996. Insects in fragmented forest: a functional approach. *TREE* 11: 255-260.

Didham RK, Hammond PM, Lawton JH, Eggleton P & Stork N. 1998. Beetle responses to tropical forest fragmentation. *Ecol. Mon.* 68: 295-323.

DiFazio SP, Wilson MV & Vance NC. 1998. Factors limiting seed production of *Taxus brevifolia* (Taxaceae) in Western Oregon. *Am. J. Bot.* 85: 910-918.

Dirzo R, González Soriano E. & Vogt RC. 1997. Introducción general. En : Historia Natural de Los Tuxtlas. Dirzo, R. González Soriano, E. & Vogt, R.C. (eds). Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.

Donaldson J, Nänni I, Zachariades C & Kemper J. 2002. Effects of habitat fragmentation on pollinator diversity and plant reproductive success in Renosterveld shrublands of South Africa. *Cons. Biol.* 16: 1267-1276.

Ellstrand NC, Torres AM & Levin DA. 1978. Density and the rate of apparent outcrossing in *Helianthus annuus* (Asteraceae). *Syst Bot.* 3: 403-407.

Ellstrand NC & Elam DR. 1993. Population genetic consequences of small population size. Implications for plant conservation. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 24: 217-42.

Groom MJ. 2001. Consequences of subpopulation isolation for pollination, herbivory, and population growth in *Clarkia concinna* (Onagraceae). *Biol. Cons.* 100: 55-63.

Halffter G, Favila ME & Halffter V. 1991. A comparative study of the structure of the scarab guild in Mexican tropical rain forest and derived ecosystems. *Folia Entomol. Mex.* 84: 131-156.

Handel SN. 1985. The intrusion of clonal growth patterns on plant breeding systems. *Am. Nat.* 125(3): 367-384.

Henny RJ & Rasmusen EM. 1980. Producing *Dieffenbachia* from seed. *Aroideana* 3: 94-95.

Hooftman DAP, van Kleunen M & Diemer M. 2003. Effects of habitat fragmentation on the fitness of two common wetland species, *Carex davalliana* and *Succisa pratensis*. *Oecologia* 134: 350-359.

Jennersten O. 1988. Pollination of *Dianthus deltoides* (Caryophyllaceae), effects of habitat fragmentation on visitation and seed set. *Cons. Biol.* 2:359-366.

Kareiva P & Wennergren U. 1995. Connecting landscape patterns to ecosystem and population processes. *Nature* 373: 299-302.

Kearns CA, Inouye DW & Waser NM. 1998. Endangered mutualisms: The conservation of plant-pollinator interactions. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 29: 83-112.

Klein BC. 1989. Effects of forest fragmentation on dung and carrion beetle communities in central Amazonia. *Ecology* 70(6): 1715-1725.

Lamont, B. B., Klinkhamer, P. G. L. & Witkowski, E.T.F. 1993. Population fragmentation may reduce fertility to zero in *Banksia goodii* – a demonstration of the Allee effect. *Oecologia* 94: 446-450.

Lande R. 1988. Demographic models on the northern spotted owl (*Strix occidentalis caurina*). *Oecologia* 75: 601-607.

- Martínez-Sánchez JL. 1998. Aspects of rain forest nutrient dynamics at Los Tuxtlas, Mexico. Tesis de Doctorado. Department of Biological Sciences. University of Stirling. Scotland, UK.
- Matsumura, C. & Washitani, I. 2000. Effects of population size and pollinator limitation on seed-set of *Primula sieboldii* populations in a fragmented landscape. *Ecological Research* 15: 307-322.
- Murcia, C. 1996. Forest fragmentation and the pollination of neotropical plants. En: Forest patches in tropical landscapes. Shelhas, J. & Greenberg, R. (eds). Pág.19-36. Island Press. Washington, D.C.
- Murren, C.J. 2002. Effects of habitat fragmentation on pollination: pollinators, pollinia viability and reproductive success. *J. Ecol.* 90:100-107.
- Niesenbaum RA. 1993. Light or pollen – seasonal limitations on female reproductive success in the understory shrub *Lindera benzoin*. *J. Ecol.* 81: 315-323.
- Quinn GP & Keough MJ. 2002. Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Rathcke BJ & Jules ES. 1993. Habitat fragmentation and plant-pollinator interactions. *Curr. Sci.* 65: 273-277.
- Saunders DA, Hobbs RJ & Margules CR. 1991. Biological consequences of ecosystem fragmentation: A review. *Cons. Biol.* 5: 18-32.
- Schoen DJ & Lloyd DG. 1992. Self- and cross-fertilization in plants. III. Methods for studying modes and functional aspects of self-fertilization. *Int. J. Plant. Sci.* 153: 381-393.
- Steffan-Dewenter I & Tschardt T. 1999. Effects of habitat isolation on pollinator communities and seed set. *Oecologia* 121: 432-440.
- Steffan-Dewenter I, Münzenberg U & Tschardt T. 2001. Pollination, seed set and seed predation on a landscape scale. *Proceedings of the Royal Society of London* 268: 1685-1690.
- Steffan-Dewenter I, Münzenberg U, Bürger C, Thies C & Tschardt T. 2002. Scale-dependent effects of landscape context in three pollinator guilds. *Ecology* 83. 1421-1432.
- Stephenson AG. 1981. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 12: 253-279.
- Tschardt, T. & Brandl, R. 2004. Plant-insect interactions in fragmented landscapes. *Ann. Rev. Entomol.* 49: 405-430.
- van Treuren R, Bijlsma R, van Delden W & Ougborg NJ. 1991. The significance of genetic erosion in the process of extinction. I. Genetic differentiation in *Salvia pratensis* and *Scabiosa columbaria* in relation to population size. *Heredity* 66: 181-189.
- Young A, Boyle T & Brown T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol. Evol.* 11: 413-418.
- Young HJ & Young TP. 1992. Alternative outcomes of natural and experimental high pollen loads. *Ecology* 73: 639-647.

Éxito reproductivo femenino de *Dieffenbachia seguine*

Zar JH. 1999. Biostatistical analysis. Fourth ed. Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ.

Zenger JT & Gibb TJ, 2001. Identification and impact of egg predators in *Cyclocephala lurida* and *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) in turfgrass. *Env. Entomol.* 30:425-430.

The genetic structure of the tropical understory herb *Dieffenbachia seguine* L. before and after forest fragmentation

Sandra Cuartas-Hernández and Juan Núñez-Farfán*

Laboratorio de Genética Ecológica y Evolución, Departamento de Ecología Evolutiva,
Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México,
Apartado Postal 70-275, 04510 México, Distrito Federal, Mexico

ABSTRACT

Hypothesis: Theoretically, forest fragmentation is expected to reduce genetic diversity and increase population differentiation through isolation and reduction of habitat.

Assumption: Assessing the effects of fragmentation on the genetic structure makes it necessary to know the former structure in the undisturbed, continuous habitat.

Organism: *Dieffenbachia seguine* (Araceae), an understory herb of the primary tropical rain forests.

Field site: Los Tuxtlas Biosphere Reserve, Veracruz, Mexico.

Methods: Four populations of the continuous forest (in an area >700 ha) and six populations in remnant fragments of a different area were sampled. The variability of nine allozyme loci was surveyed for 35 plants in each population.

Conclusions: *F*-statistics indicated that populations of *D. seguine* are highly structured as a result of random processes ($F_{st} = 0.3052$) and local inbreeding ($F_{is} = 0.2905$) both in fragments and in the continuous forest. However, genotypic richness was significantly lower in populations of fragments than in the continuous forest, and positively related to the fragment area. The population in the smallest fragment showed the highest genetic distance from all other populations. This suggests an exacerbation of the random differentiation process in fragments.

Keywords: Araceae, clonality, *F*-statistics, genetic drift, genotypic richness, isozymes, Los Tuxtlas.

INTRODUCTION

Habitat fragmentation may lead to changes in genetic diversity and in population structure of a species by altering the magnitude and/or direction of gene flow, the potential for colonization, and by reducing effective population size (Young *et al.*, 1996; Lande, 1999; Hanski and Ovaskainen, 2000).

* Author to whom all correspondence should be addressed. e-mail: farfan@servidor.unam.mx
Consult the copyright statement on the inside front cover for non-commercial copying policies.

Following subdivision by fragmentation, local populations could change their level of genetic differentiation depending on the rate of gene flow (Young *et al.*, 1996). If gene flow increases among fragmented populations, it may reduce or eliminate population differentiation, maintaining genetic diversity (Foré *et al.*, 1992; White *et al.*, 1999) and acting against drift or diversifying selection (Richards, 2000). In contrast, if gene flow is reduced by fragmentation, differentiation among populations may increase. A reduction in gene flow can occur through changes in the abundance and activity pattern of pollinator species (Murcia, 1996; Knutsen *et al.*, 2000). Reduced gene flow and small effective sizes of populations in fragments may lead to inbreeding and drift, and a subsequent erosion of genetic variation (Ellstrand and Elam, 1993; Young *et al.*, 1996; Rosquist and Prentice, 2000).

Loss of genetic diversity can compromise the persistence of local populations (Young *et al.*, 1996; Young and Clarke, 2000) by limiting their ability to respond adaptively to the varying local conditions (Rosquist and Prentice, 2000) and increasing the risk of extinction due to inbreeding depression (Ellstrand and Elam, 1993). Thus, knowledge about the impact of habitat fragmentation on genetic diversity and structure of populations has direct implications for the conservation and management of species, by offering insights into the evolutionary and ecological dynamics (Neel and Ellstrand, 2001).

Empirical studies of the genetic consequences of habitat fragmentation in plants have revealed that genetic variability tends to decrease in small populations, although fragmentation does not necessarily lead to genetic losses (Young *et al.*, 1996). These different responses to fragmentation are due to the variety and complexity of reproductive strategies (sexual and asexual) and mating system (outcrossing, selfing or mixed), combined with differences in population sizes, seed dispersal, and pollination systems (Young and Clarke, 2000). Moreover, the population genetic structure of a species before fragmentation is often not known (due to the lack of large areas of forest); in cases where genetic structure as produced by fragmentation can be identified, the former structure of populations preceding habitat change may be evident.

The effects of fragmentation on genetic variation and structure are well known for temperate herbs (e.g. van Treuren *et al.*, 1991; Raijman *et al.*, 1994; Young *et al.*, 1999; Rosquist and Prentice, 2000) and tropical tree species (Prober and Brown, 1994; Boshier *et al.*, 1995; Hall *et al.*, 1996; Aldrich *et al.*, 1998; Shapcott, 1998; White *et al.*, 1999). However, the genetic effects of fragmentation have not been evaluated in tropical herbs (Shapcott, 1998; Young *et al.*, 1999), despite understory species being the most diverse structural component in the tropical rain forests (Ibarra-Manriquez *et al.*, 1997). Moreover, the shorter life span of herb plant species makes it possible to evaluate the effect of fragmentation on the genetic structure of the derived generations compared with long-lived trees or shrub species.

The aim of the present study was to assess the impact of habitat fragmentation on the genetic diversity and structure of a tropical understory herb, in the Los Tuxtlas tropical rain forest. Given the effect of fragmentation on gene flow, we anticipated: (1) a reduction in genetic diversity, an increment in the genetic differentiation among populations, and increased inbreeding in populations of fragments compared with populations in the continuous forest; and (2) an inverse relationship between the size of the fragment and the magnitude of the genetic effect.

The Los Tuxtlas region has been heavily deforested over the last 30 years, producing a highly patchy landscape. However, the region constitutes an excellent system to test our hypothesis because there are still some large areas of continuous undisturbed forest (> 640 ha) and fragment remnants of different sizes (range 0.3–134 ha). The Los Tuxtlas is

an important area for preservation because it is the boreal limit of the tropical forests in America, and because it has a high species diversity of tropical and temperate origins and some endemics (González *et al.*, 1997).

We used isozyme variation to analyse four populations within the continuous forest to determine the former genetic variation and structure of the populations in an undisturbed forest, and six populations in fragments of different sizes to assess the effect of fragmentation on genetic structure. The comparison of the genetic dynamics of populations in continuous forest in relation to fragments allows us to assess, without overestimating the results, changes in the genetic variation and structure in populations of this species due to habitat reduction and isolation.

METHODS

Species description

Dieffenbachia seguine is an understory clonal herb of neotropical rain forests. It ranges from southern Mexico to Guyana, Brazil, and Ecuador (Mayo *et al.*, 1997). This species forms large aggregations. New ramets arise from broken rhizomes. Each ramet produces one to four inflorescences in a flowering season, depending on the plant's size (Cuartas, 2002). The opening of a given inflorescence on a ramet does not coincide with another inflorescence of the same ramet. Female and male flowers are located at the base and the tip of the spadix, respectively. Female flowers are receptive before pollen is released – that is, they are protogynous. To our knowledge, no studies have been published regarding the reproductive biology and mating system of *D. seguine*. The genus *Dieffenbachia* is pollinated by scarab beetles of the genera *Cyclocephala* and *Erioscelis*. The reproductive biology of *Dieffenbachia* is detailed in Young (1988, 1990). Fruits are red when mature and dispersed by understory birds of the genera *Turdus* and *Habia* (R. Estrada-Coates, personal communication).

Study site and field collection

The study was conducted at the Los Tuxtlas Biosphere Reserve located in the state of Veracruz in the Gulf of Mexico (Fig. 1). In the Los Tuxtlas region, continuous tropical rain forest has been reduced to some isolated remnants due to the conversion of land into cattle grazing and sugar cane plantations (González *et al.*, 1997). However, three large areas of undisturbed forest still remain (San Martín Volcano, San Martín Pajapan Volcano, and Sierra Santa Martha).

To assess the effect of geographic isolation on the genetic structure, ten populations of *D. seguine* from a wide geographic area were sampled within the Biosphere Reserve (Table 1, Fig. 1): four populations in the continuous forest within the Los Tuxtlas Tropical Biology Station (separated by a mean distance of 6.08 km from one another) and six populations from the few remaining remnant fragments with minimal disturbance. Four fragments are located in the vicinity of the Station (5.98 km in average), while two are located some distance from the Station (24.7 km on average) in the Sierra Santa Martha. Sampling was carried out in the centre of each fragment.

For genetic analyses, leaves of 35 plants on average were sampled in each population. Haphazardly, a plant was collected every 10 m to prevent the collection of two ramets of the same genet. Clonality was not specifically examined; however, some conclusions could be made from our results.

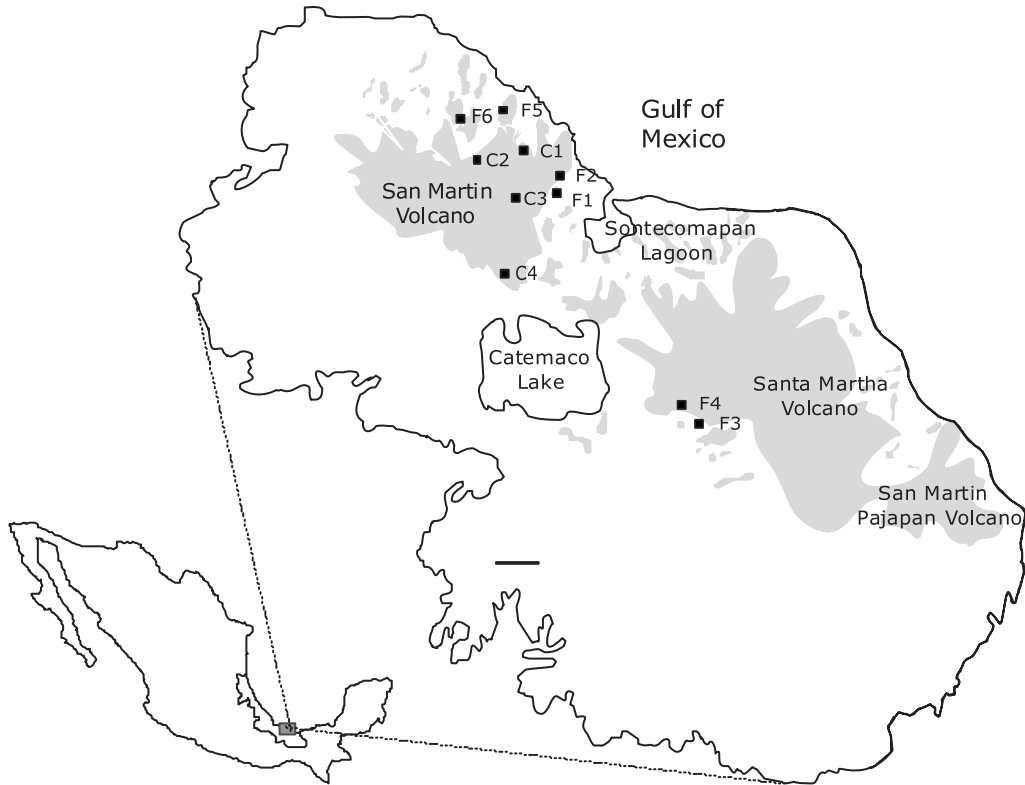


Fig. 1. Map of the Los Tuxtlas Biosphere Reserve in the State of Veracruz, Mexico. The populations of *Dieffenbachia seguine* sampled in the fragments (F) and continuous forest (C) are indicated. The stippled area highlights the area of remaining tropical forest. The horizontal line is equivalent to 4 km.

Table 1. Geographic position and area of *D. seguine* populations sampled in Los Tuxtlas, México

Population	Symbol	<i>N</i>	Geographic position	Area (ha)
Estación	C1	40	18°35'240 N, 95°04'620 W	640
Laguna	C2	30	18°35'245 N, 95°05'912 W	640
Pedregal	C3	30	18°34'347 N, 95°07'776 W	640
San Martín	C4	39	18°31'357 N, 95°10'675 W	640
Cascada	F1	30	18°34'692 N, 95°03'973 W	0.3
Playa	F2	30	18°35'050 N, 95°02'600 W	3
Santa Martha 1	F3	40	18°326'76 N, 95°07'328 W	5
Santa Martha 2	F4	40	18°22'025 N, 94°57'781 W	20
Cerro	F5	30	18°37'739 N, 95°05'157 W	37.4
Ruíz Cortínez	F6	30	18°36'730 N, 95°05'821 W	114.6

Note: *N* is the number of sampled individuals.

Genetic markers

Horizontal starch-gel electrophoresis was used to obtain allozyme data for 35 plants per population following standard methods (Cheliak and Pitel, 1984). The extraction buffer was a 3:1 mixture of the YO and VEG II buffers, respectively (Yeh and O'Malley, 1980; Cheliak and Pitel, 1984). Extracts were centrifuged at $7000 \text{ rev} \cdot \text{min}^{-1}$ for 7 min and the supernatant was absorbed by paper wicks. Samples were run on starch gels (9% w/v) at 4°C . Nine polymorphic loci of seven enzymes displayed reliable banding patterns. The buffer system Histidine pH 6.5 (run for 7 h) (Stuber *et al.*, 1988) was used for the enzymes glutamate dehydrogenase (GDH) E.C. 1.4.1.2 (one locus), malate dehydrogenase (MDH) E.C. 1.1.1.37 (two loci), and malic enzyme (ME) E.C. 1.1.1.40 (one locus). The buffer system Poulik pH 8.6 (run for 4 h) (Hakim-Elahi, 1976) was used for anodal and cathodal peroxidase (APX and CPX) E.C. 1.11.1.7 (one and two loci, respectively), glutamate oxalacetate dehydrogenase (GOT) E.C. 2.6.1.1 (one locus), and esterase (EST) E.C. 3.1.1 (one locus).

Statistical analysis

We obtained the multi-locus genotype for each individual of *D. seguine*, based on the observed banding patterns for each enzyme locus. Allelic frequencies were estimated from the genotypic frequencies and used to calculate the genetic parameters using the program TPFGA 1.3 (Miller, 1997). Four measures of genetic variation were estimated for each population: polymorphism (P , 95% criterion), mean number of alleles per locus (A), observed mean heterozygosity (H_o), and the expected mean heterozygosity (H_e) at the Hardy-Weinberg equilibrium. The deviation of the observed genotypic frequencies from random mating expectations was tested using a χ^2 goodness of fit (Zar, 1999), and then calculating the fixation index $F = 1 - (H_o/H_e)$ (Wright, 1951).

To assess the amount of clonal diversity within populations, we estimated the proportion of distinguishable genotypes G/N (i.e. probability that a newly sampled individual would have a new genotype), where G is the number of different multi-locus genotypes and N is the number of individuals sampled in each population. G/N ranges from nearly zero in populations where only a single genotype is encountered, to 1 in populations where each individual is unique (Pleasants and Wendel, 1989). Additionally, we calculated the average diversity of genotypes for fragments and continuous forest using the Shannon-Weiner index; this approximation is appropriate when sample sizes are different (Kikkama and Anderson, 1986).

The hierarchical population genetic structure is described by means of the unbiased statistics F , θ , and f , corrected for population size, number of alleles per locus, and number of populations (Weir and Cockerham, 1984), and are equivalent to Wright's F -statistics F_{it} , F_{st} , and F_{is} , respectively (Wright, 1951, 1965). We calculated 95% confidence intervals for these estimates by means of a jackknife procedure across loci (Weir, 1990). To determine whether the F_{it} and F_{is} values were significantly different from zero, a χ^2 test was performed for each locus:

$$\chi^2 = F[2N]*[k - 1] \quad \text{with } k(k - 1)/2 \text{ degrees of freedom}$$

where N is the sample size and k is the number of alleles (Weir, 1990). The departure of the F_{st} statistic from zero was determined using the χ^2 method of Workman and Niswander (1970):

$$\chi^2 = (2N) F_{st}(k - 1) \quad \text{with } (k - 1)(s - 1) \text{ degrees of freedom}$$

where s is the number of subpopulations.

The average gene flow Nm (number of individuals exchanged between populations per generation) was estimated from F_{st} values, using the equation

$$F_{st} \cong 1/(4Nma + 1)$$

where $a = [n/(n - 1)]$ and n is the number of populations (Wright, 1951, 1965; Crow and Aoki, 1984). In addition, we estimated the rate of outcrossing (t), assuming that self-fertilization is the only source of inbreeding as

$$t = (1 - f)/(1 + f)$$

where f is the inbreeding coefficient (Haldane, 1924). Finally, Nei's (1972) genetic distance (D) was estimated among all pairs of populations. A population dendrogram was constructed using an UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic averaging) procedure, based on the genetic distances among populations (Hedrick, 2000). The correlation between the matrix of genetic distance and the matrix of geographical distance among populations was tested using a Mantel's test (Manly, 1994).

Estimates of genetic diversity and population structure were obtained across individual populations (local scale), type of habitat (continuous forest and fragments), and all populations (global scale). Differences in the estimates of genetic variation between fragmented and continuous forest populations were tested with a t -test, given that all variables, except A and H_o , are normally distributed and with equal variances. For A and H_o , we used a Wilcoxon test. Spearman's rank correlation was estimated to assess the magnitude of the association between the amount of genetic diversity and the size of the fragment (Zar, 1999).

RESULTS

Genetic diversity in *D. seguine*

Nine loci analysed for *D. seguine* were polymorphic, possessing two or three alleles. Some alleles had frequencies less than 5% or were absent in some populations, either in the fragmented or in the continuous forest (Fig. 2). For most loci, allele frequencies showed marked differences between populations. There was no pattern in the allelic frequencies (e.g. fixation) in relation to the type of habitat (continuous forest or fragments) or the size of the fragment (Fig. 2).

An average of 2.01 alleles per locus across all populations was observed (Table 2). Allelic richness did not differ between fragments and continuous forest ($z = 0.113$, $p = 0.9095$). Polymorphism at the global level was $P = 84.44\%$ and ranged from $P = 66.66\%$ in fragments of intermediate size (F2 and F5) to $P = 100\%$ in some populations of both habitats (Table 2). The average polymorphism between continuous forest and fragments was not significantly different ($t = -0.313$, $p = 0.7626$). Observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.19 to 0.38, with a global mean of 0.24. Expected heterozygosity (H_e) varied from 0.27 to 0.43, with a global mean of 0.33. There were no significant differences in heterozygosity between populations in the continuous forest or fragments (H_o : $z = -1.385$, $p = 0.1650$; H_e : $t = 0.920$, $p = 0.3839$). The heterozygosity values did not show any dependence on the size of the fragment (Table 2).

Observed heterozygosities were significantly lower than expected heterozygosities in all *D. seguine* populations (global: $\chi^2 = 8.56$, d.f. = 1, $p < 0.005$; continuous forest: $\chi^2 = 4.93$,

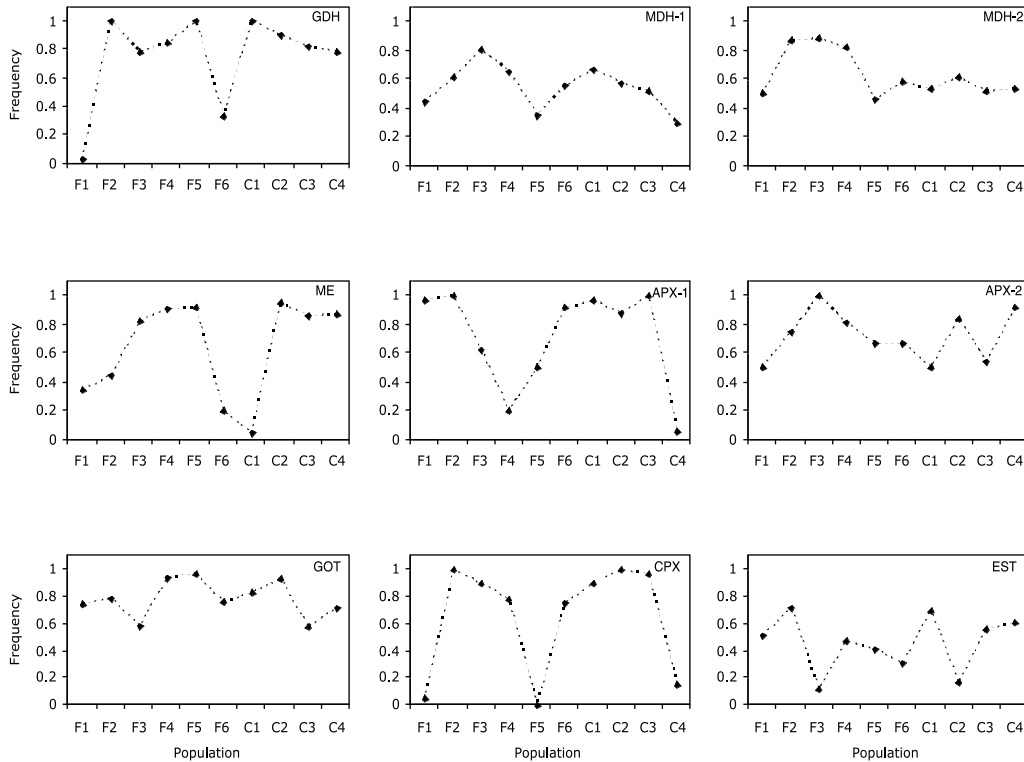


Fig. 2. Frequency of the most common allele at nine loci in ten populations of *Dieffenbachia seguine*. Populations are arranged from the smallest to the largest in area (see Table 1). *F*, fragments; *C*, continuous forest.

d.f. = 1, $p < 0.025$; fragments: $\chi^2 = 3.95$, d.f. = 1, $p < 0.05$). Deviation of genotypic frequencies from Hardy-Weinberg expectations showed no tendency to be grouped in any particular population or habitat type.

The fixation index was positive in all populations studied, indicating inbreeding and the average values did not differ significantly between populations in the continuous forest and fragments ($t = -1.362$, $p = 0.2103$) (Table 2).

Genetic diversity of *D. seguine* expressed as the number of different multi-locus genotypes was very high. A total of 296 multi-locus genotypes was observed over all populations. The average genotypic diversity was $G/N = 0.853$ (Table 2), indicating a probability of 85% that any individual chosen at random had a new multi-locus genotype (Pleasant and Wendel, 1989). At the population and type of habitat level, G/N showed high values (> 0.73). The G/N ratio was statistically lower in populations of fragments than in continuous forest ($t = -2.373$, $p = 0.0451$), indicating a negative effect of fragmentation on genotypic diversity. The Shannon-Weiner index showed the same trend, indicating lower diversity indices for populations in fragments than those in continuous forest ($t = 3.511$, $p = 0.0082$) (Fig. 3a). This implies higher genotypic diversity and/or more even frequencies in the continuous forest. Furthermore, G/N was significantly and linearly related to the area of the fragment ($r = 0.65$, $p = 0.0243$) (Fig. 3b).

Table 2. Genetic diversity estimates for *D. seguine* populations in Los Tuxtlas, Mexico

Population	<i>A</i>	<i>P</i>	H_o	H_e	<i>F</i>	<i>G/N</i>
Continuous forest						
C1	2.00	77.77	0.1961	0.2883	0.320	0.875
C2	2.00	88.88	0.2069	0.285	0.274	0.900
C3	2.00	77.77	0.2357	0.3548	0.336	0.923
C4	2.11	100.00	0.2150	0.3343	0.357	0.949
Mean	2.03	86.11	0.2134	0.3156	0.322	0.912
Standard error	0.06	6.88	0.026	0.023	0.044	0.032
Fragments						
F1	2.11	77.77	0.2594	0.3630	0.285	0.931
F2	1.78	66.66	0.2175	0.2718	0.200	0.833
F3	2.00	88.88	0.2812	0.3334	0.157	0.775
F4	2.11	100.00	0.1863	0.3267	0.430	0.750
F5	1.88	66.66	0.2460	0.3329	0.261	0.733
F6	2.11	100.00	0.3759	0.4326	0.131	0.867
Mean	2.00	83.33	0.2610	0.3434	0.244	0.815
Standard error	0.05	5.61	0.022	0.019	0.036	0.026
Global						
Mean	2.01	84.44	0.2420	0.3323	0.275	0.853
Standard error	0.03	4.13	0.018	0.015	0.029	0.025

Note: *A* is the mean number of alleles per locus, *P* is the percentage of polymorphic loci (95%), H_o is the observed heterozygosity, H_e is the expected heterozygosity, *F* is Wright's fixation index, *G/N* is genotypic richness.

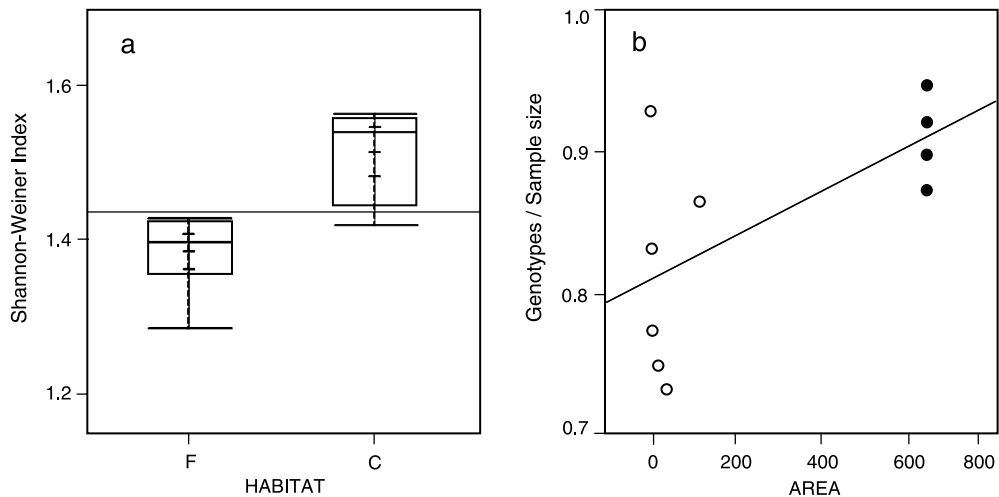


Fig. 3. (a) Box-and-whiskers plot of the genotypic diversity (Shannon-Weiner Index) of fragments (*F*) and continuous forest populations (*C*). The figure shows median genotypic diversity (lines), 25% to 75% quartiles (boxes), and ranges (whiskers). Contained within the boxes are the mean genotypic diversity and the mean standard error. (b) Relationship between fragment size and genotype richness ($G/N = 0.81 + 0.00016 \text{ area}$). ○, populations in fragments; ●, populations in continuous forest.

Genetic structure of *D. seguine* populations

Populations of *D. seguine* are highly structured (Table 3). The global and type of habitat F_{it} , F_{st} , and F_{is} estimates were significantly different from zero for all loci ($p < 0.05$). Overall population estimates of F -statistics indicate an equivalent contribution of local inbreeding (F_{is}) and population differentiation (F_{st}) to the global inbreeding (F_{it}) (Table 3). However, the extent of population differentiation was similar in magnitude for continuous forest and fragments (Table 3). Similarly, there were no significant differences in local inbreeding between continuous forest and fragment populations. The outcrossing rate estimated at the global level was 0.568, suggesting a mixed mating system in *D. seguine* populations. The indirect estimates of average gene flow at the global level ($Nm = 0.784$), among populations in the continuous forest ($Nm = 0.874$), and fragments ($Nm = 0.724$) suggest low migration rates and possible effects of genetic drift (Wright, 1951).

Genetic distances among populations were high in most cases (global average $D = 0.225$), ranging from 0.043 to 0.491. The average genetic distance (D) among populations was 0.250 and 0.241 for the continuous forest and fragments, respectively. High values of D were obtained even between populations in the continuous forest (e.g. C1 vs. C4, $D = 0.4866$). The minimum D value was observed between the C4 and F5 populations, despite the large geographic distance between them (13.75 km). The dendrogram based on genetic distances among populations (Fig. 4) shows that fragment 1 (F1) is separated from the rest of the populations by an average distance of 0.36 km. Similarly, it shows that populations do not group together by proximity (with the exception of F3 and F4, 0.5 km apart, both in the Sierra Santa Martha) or type of habitat (F or C), as illustrated by C4 and F5. Thus, contrary to expectations, there was no correlation between genetic and geographic distances among populations (Mantel test: $r = -0.1515$, $p = 0.8030$).

Table 3. Wright's F -statistics for *D. seguine* populations in Los Tuxtlas, Mexico

Locus	F_{it}	F_{st}	F_{is}
<i>Gdh</i>	0.7447***	0.4612***	0.5261***
<i>Mdh-1</i>	0.9387***	0.0595***	0.9348***
<i>Mdh-2</i>	0.7585***	0.0873***	0.7354***
<i>ME</i>	0.7578***	0.4779***	0.5360***
<i>Cpx-1</i>	0.7870***	0.7013***	0.2871***
<i>Cpx-2</i>	0.2875***	0.0580***	0.2437***
<i>Got</i>	-0.1097***	0.0992***	-0.232***
<i>Apx</i>	0.7515***	0.7100***	0.1431***
<i>Est</i>	-0.2297***	0.1067***	-0.3765***
Mean	0.5113***	0.3058***	0.2960***
Jackknife \pm standard error			
Global	0.5082 \pm 0.1600*	0.3052 \pm 0.0964*	0.2905 \pm 0.2125*
Continuous forest	0.5314 \pm 0.1644*	0.3154 \pm 0.1326*	0.3157 \pm 0.2088*
Fragments	0.4825 \pm 0.1779*	0.3121 \pm 0.0922*	0.2420 \pm 0.2335*

* $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$.

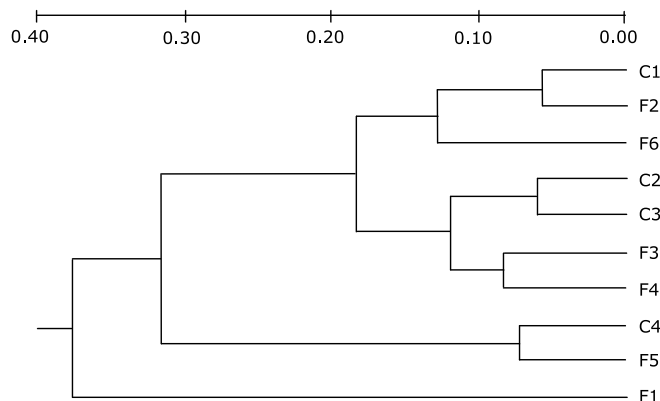


Fig. 4. UPGMA cluster analysis based on Nei's genetic distance among populations of *Dieffenbachia seguine* populations in Los Tuxtlas, Mexico.

DISCUSSION

The most striking result of this study is that populations of *D. seguine* are highly structured even in the continuous forest and were probably structured before fragmentation. Thus, fragmentation has yet to exacerbate genetic differentiation among populations beyond that prior to population subdivision, contrasting with theoretical expectations (Ellstrand and Elam, 1993; Young *et al.*, 1996). Also, we detected that habitat fragmentation has produced a reduction in the diversity of genotypes of *D. seguine*, but all other estimates of genetic diversity (allelic richness, polymorphism, and heterozygosity) showed no reduction in relation to isolation or any reduction in population size.

Genetic diversity

Populations of *D. seguine* from Los Tuxtlas are highly genetically diverse compared with other perennials or monocot species (Hamrick and Godt, 1996). There were no significant differences in genetic diversity among *D. seguine* populations in continuous forest and fragments. In addition, we did not detect any relationship between genetic variation estimates and the size of the fragments. A similar response to fragmentation has been reported in the tropical tree *Symphonia globulifera* in Costa Rica (Aldrich *et al.*, 1998) and the palm *Carpentaria acuminata* in Australia (Shapcott, 1998). However, a positive relationship between genetic variation and reproductive population size has been observed in many species [*Salvia pratensis* and *Scabiosa columbaria* (van Treuren *et al.*, 1991), *Eucalyptus albens* (Prober and Brown, 1994), *Gentiana pneumonanthe* (Raijman *et al.*, 1994), *Phitecellobium elegans* (Hall *et al.*, 1996), *Swetenia humilis* (White *et al.*, 1999), and *Rutidosia leptorrhynchoides* (Young *et al.*, 1999)], and this trend has been suggested to result from the elimination of rare alleles in fragmented populations. In contrast, in *D. seguine*, most loci had alleles at intermediate frequencies, and low-frequency alleles were not associated with fragmentation.

Genotypic diversity in populations of *D. seguine* is high compared with other clonal plants (Pleasants and Wendel 1989; Pappert *et al.*, 2000). Despite the expectation that a neighbourhood in a clonal plant would contain many identical genotypes (McLellan *et al.*, 1997), the low proportion of redundant genotypes found within and among populations of *D. seguine* suggests a low

level of clonality. This high genotypic diversity can be the result of (1) a high number of genets established prior to fragmentation, (2) different sources of propagules (migration), and (3) outcrossing (McLellan *et al.*, 1997). *Dieffenbachia seguine* possess reproductive mechanisms that promote outcrossing: protogyny, sequential flowering in a ramet, a long flowering period, and a small number of open inflorescences every day (Cuartas, 2002), obligating pollinators to move between distant inflorescences (Handel, 1985; Young, 1988; Goulson, 2000).

Average fruit-set in *D. seguine* was reduced in small fragments compared with continuous forest (Cuartas, 2002). This, together with the reduction in the number of multi-locus genotypes, suggests that fragmentation is affecting pollinators (Murcia, 1996; Knutsen *et al.*, 2000). Changes in pollination may alter the mating system and thus genotypic frequencies (Lloyd and Schoen, 1992) and reproductive success through pollen limitation (Matsumura and Washitani, 2000). Thus, it is likely that fragmentation affects the reproductive biology of natural populations of *D. seguine*, changing genotypic structure in the short term and the genetic structure in the long term (Young *et al.*, 1999).

Genetic structure

Although the populations of *D. seguine* studied are separated by short geographic distances, they are highly structured in continuous forest as well as in fragments. The level of differentiation in populations of *D. seguine* exceeded that observed by Hamrick and Godt (1996) for monocots in a mixed mating system with widely distributed plants. The high significant F_{st} values over loci and the small Nm values estimated between pairs of populations suggest random population differentiation (Cabe and Alstad, 1994), although selection cannot be ruled out. The high F_{st} value estimated for the populations in the continuous forest indicate that even in the undisturbed habitat, there is restricted gene flow. This remarkable result can be explained by considering the combined effects of two aspects related to the dynamics of the populations: First, colonizing events of *D. seguine* may depend upon forest gap dynamics, since *D. seguine* invade or flourish in nearby gaps (Núñez-Farfán and Dirzo, 1988). Additionally, recent studies on the demography of this herb suggest that the performance of populations (clonal growth) is enhanced in small forest patches with greater light availability (Cuartas, 2002). Second, genetic contact among populations in the continuous forest or fragments can be broken as a result of disperser or pollinator behaviour. The disperser birds of *D. seguine* have contrasting habitat preferences: *Habia* sp. is forest-restricted, whereas *Turdus* sp. prefers non-forested habitats (Graham and Blake, 2001). Similarly, beetle pollinators of *D. seguine* are unable to move among fragments or over long distances as observed in other Scarabaeidae beetles (Klein, 1989; Young, 1990; Halffter *et al.*, 1991), and their abundance is very low (S. Cuartas, personal observation).

This dependence of *D. seguine* on the creation of gaps implies that different genetic contingents could colonize recently formed gaps, through seed dispersal by *Turdus* sp. (long-distance gene flow), which explains the high genetic variability within populations. However, gene flow accomplished by *Habia* sp. and the pollinators (short-distance gene flow) following the colonization event could produce genetic differentiation, even between close populations, because these species do not fly outside the forest (Klein, 1989; Halffter *et al.*, 1991) and they only rarely reach other fragments following riparian corridors (E. Figueroa, personal communication).

Inbreeding at the global scale is high in *D. seguine* (29%) compared with some perennial herbs (Neel and Ellstrand, 2001). This level of inbreeding can result from: (1) self-pollination as

suggested for the estimated outcrossing rate ($t = 0.54$); (2) mating between relatives due to the scarcity of mates (Goulson, 2000); (3) genetic drift; and (4) bi-parental inbreeding, given that clonal growth may produce a spatial genetic structure (Ellstrand and Elam, 1993). Finally, (5) clonality can produce a similar effect to inbreeding due to the lack of genetic recombination (Abrahamson, 1980). However, the high genotypic diversity in *D. seguine* suggests that the deficit of heterozygotes is not an artefact of clonality.

The causes of inbreeding are not known for *D. seguine* and for other tropical herbs in fragmented landscapes. Thus it is imperative to investigate the reproductive biology and mating system within populations of *D. seguine*.

The absence of any habitat type or geographic pattern among populations revealed by the UPGMA analysis based on genetic distances is consistent with the explanation that *D. seguine* possesses a demographic dynamics coupled with complex colonizing events, but is not dependent upon forest fragmentation. However, population F1 branched apart from the other populations, suggesting that genetic drift could accelerate differentiation in fragmented small populations (Young *et al.*, 1999), and that the loss of genetic variability may be exacerbated through time.

Finally, because individual plants of *D. seguine* can take up to 2 years to reproduce, current populations most probably constitute a mixture of ancient genotypes established before fragmentation and new ones introduced by seed dispersal. Thus, the observed genetic structure reflects, at least in part, the post-fragmentation processes within populations.

Considering the high genetic differentiation and the loss of genotypes in small fragments, conservation strategies at the Los Tuxtlas should focus on maintaining as many large fragments as possible. This strategy will sustain both the genetic diversity distributed within and among populations and plant–pollinator interactions (Tsharnitke and Brandl, 2004), which are critical in the long-term persistence of populations. For the particular case of *D. seguine*, it is of utmost importance to maintain the processes that promote the creation of available patches of habitat for colonization (e.g. gap dynamics) and stability of species with a metapopulation structure.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Jesús Vargas for his advice on laboratory techniques and assistance in the field and Dr Rodolfo Dirzo for recommendations about the fragments. We thank the staff of the Los Tuxtlas Biological Station UNAM for allowing us to use the facilities during this study. To the members of the Laboratorio de Genética Ecológica y Evolución we are grateful for logistic support and helpful discussions. This study was supported by grant SEMARNAT-CONACyT (0355). S. Cuartas acknowledges the scholarship granted by the Division de Estudios de Posgrado (DGEP) of the Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.

REFERENCES

- Abrahamson, W.G. 1980. Demography and vegetative reproduction. In *Demography and Evolution in Plant Populations* (O.T. Solbrig, ed.), pp. 89–106. London: Blackwell Scientific.
- Aldrich, P.R., Hamrick, J.L., Chavarriaga, P. and Kochert, G. 1998. Microsatellite analysis of demographic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Mol. Ecol.*, **7**: 933–944.
- Boshier, D.H., Chase, M.R. and Bawa, K.S. 1995. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 3. Gene flow, neighborhood and population substructure. *Am. J. Bot.*, **82**: 484–490.

- Cabe, P.R. and Alstad, D.N. 1994. Interpreting population differentiation in terms of drift and selection. *Evol. Ecol.*, **8**: 489–492.
- Cheliak, W.M. and Pitel, J.A. 1984. *Techniques for Starch Gel Electrophoresis from Forest Trees*. Information Report #PI-X-42. Petawa National Forestry Reserve, Chalk River, Ontario: Institute of the Canadian Forest Service.
- Crow, J.F. and Aoki, K. 1984. Group selection for a polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 6073–6077.
- Cuartas, S. 2002. Efectos ecológicos y genéticos de la fragmentación en las poblaciones de *Dieffenbachia seguine* (Araceae) en Los Tuxtlas, Veracruz, México. MSc thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF.
- Ellstrand, N.C. and Elam, D.R. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **24**: 217–242.
- Foré, S.A., Hickey, R.J., Vankat, J.L., Guttman, S.I. and Shaefer, R.L. 1992. Genetic structure after forest fragmentation: a landscape ecology perspective on *Acer saccharum*. *Can. J. Bot.*, **70**: 1659–1668.
- González, E., Dirzo, R. and Vogt, R.C. 1997. *Historia Natural de Los Tuxtlas*. México DF: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Goulson, D. 2000. Why do pollinators visit proportionally fewer flowers in large patches? *Oikos*, **91**: 485–492.
- Graham, C.H. and Blake, J.G. 2001. Influence of patch- and landscape-level factors on bird assemblages in a fragmented tropical landscape. *Ecol. Appl.*, **11**: 1709–1721.
- Hakim-Elahi, A. 1976. Temporal changes in the population structure of the slender wild oat (*Avena barbata*) as measured by allozyme polymorphism. PhD thesis, University of California, Davis, CA.
- Haldane, J.B.S. 1924. A mathematical theory of natural and artificial selection. Part II. *Trans. Camb. Phil. Soc.*, **23**: 158–163.
- Halfpeter, G., Favila, M.E. and Halfpeter, V. 1992. A comparative study of the structure of the scarab guild in Mexican tropical rain forest and derived ecosystems. *Folia Entomol. Mex.*, **84**: 131–156.
- Hall, P., Walker, S. and Bawa, K. 1996. Effects of forest fragmentation on genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Pithecellobium elegans*. *Conserv. Biol.*, **10**: 757–768.
- Hamrick, J.L. and Godt, M.J.W. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **351**: 1291–1298.
- Handel, S.N. 1985. The intrusion of clonal growth patterns on plant breeding systems. *Am. Nat.*, **125**: 367–384.
- Hanski, I. and Ovaskainen, O. 2000. The metapopulation capacity of a fragmented landscape. *Nature*, **404**: 755–758.
- Hedrick, P.W. 2000. *Genetics of Populations*, 2nd edn. Sudbury, MA: Jones & Barlett.
- Ibarra-Manríquez, G., Martínez-Ramos, M., Dirzo, R. and Núñez-Farfán, J. 1997. La vegetación. In *Historia Natural de Los Tuxtlas* (R. Dirzo, E. González Soriano and R.C. Vogt, eds.), pp. 61–85. México DF: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Kikkawa, J. 1986. Complexity, diversity and stability. In *Community Ecology: Patterns and Process* (J. Kikkawa and D.J. Anderson, eds.), pp. 41–62. Oxford: Blackwell Scientific.
- Klein, B.C. 1989. Effects of forest fragmentation on dung and carrion beetle communities in central Amazonia. *Ecology*, **70**: 1715–1725.
- Knutsen, H., Rukke, B.A., Jorde, P.E. and Ims, R.A. 2000. Genetic differentiation among populations of the beetle *Bolitophagus reticulatus* (Coleoptera: Tenebrionidae) in a fragmented and continuous landscape. *Heredity*, **84**: 667–676.
- Lande, R. 1999. Extinction risks from anthropogenic, ecological and genetic factors. In *Genetics and Extinction of Species: DNA and the Conservation of Biodiversity* (L. F. Landweber and A.P. Dobson, eds.), pp. 1–21. Princeton, NJ: Princeton University Press.

- Lloyd, D.G. and Schoen, D.J. 1992. Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *Int. J. Plant Sci.*, **153**: 358–369.
- Manly, B.J.F. 1994. *Multivariate Statistical Methods: A Primer*. London: Chapman & Hall.
- Matsumura, C. and Washitani, I. 2000. Effects of population size and pollinator limitation on seed-set of *Primula sieboldii* populations in a fragmented landscape. *Ecol. Res.*, **15**: 307–322.
- Mayo, S.J., Bognerand, J. and Boyce, P.C. 1997. *The Genera of Araceae*. Brussels: Continental Printing.
- McLellan, A.J., Prati, D., Kaltz, O. and Schmid, B. 1997. Structure and analysis of phenotypic and genetic variation in clonal plants. In *The Ecology and Evolution of Clonal Plants* (H. de Kroon and J. van Groenendael, eds.), pp. 185–210. Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers.
- Miller, M.P. 1997. TFGPA 1.3. Tools for population genetic analysis: A Windows program for the analysis of allozymes and molecular population genetic data. Northern Arizona University, USA (user's manual available at: <http://www.marksgeneticsoftware.net>).
- Murcia, C. 1996. Forest fragmentation and the pollination of neotropical plants. In *Forest Patches in Tropical Landscapes* (J. Schelhas and R. Greenberg, eds.), pp. 19–36. Washington, DC: Island Press.
- Neel, M.C. and Ellstrand, N.C. 2001. Patterns of allozyme diversity in the threatened plant *Erigeron parishii* (Asteraceae). *Am. J. Bot.*, **88**: 810–818.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.*, **106**: 283–292.
- Núñez-Farfán, J. and Dirzo, R. 1988. Within-gap spatial heterogeneity and seedling performance in a Mexican tropical forest. *Oikos*, **51**: 274–284.
- Pappert, R.A., Hamrick, J.L. and Donovan, L.A. 2000. Genetic variation in *Pueraria lobata* (Fabaceae), an introduced, clonal, invasive plant of the southeastern United States. *Am. J. Bot.*, **87**: 1240–1245.
- Pleasants, J.M. and Wendel, J.F. 1989. Genetic diversity in a clonal narrow endemic, *Erythronium propullans*, and its widespread progenitor, *E. albidum*. *Am. J. Bot.*, **76**: 1136–1151.
- Prober, S.M. and Brown, A.H.D. 1994. Conservation of the grassy white box woodlands: Population genetics and fragmentation of *Eucalyptus albens*. *Conserv. Biol.*, **8**: 1003–1013.
- Raijman, L.E.L., van Leeuwen, N.C., Kersten, R., Oostermeijer, J.G.B., den Nijs, H.C.M. and Menken, S.B.J. 1994. Genetic variation and outcrossing rate in relation to population size in *Gentiana pneumonanthe* L. *Conserv. Biol.*, **8**: 1014–1026.
- Richards, C.M. 2000. Genetic and demographic influences on population persistence: gene flow and genetic rescue in *Silene alba*. In *Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations* (A.G. Young and G.M. Clarke, eds.), pp. 271–291. Cambridge: Cambridge University Press.
- Rosquist, G. and Prentice, H.C. 2000. Habitat fragmentation and the structure of genetic diversity within disjunct isolates of *Anthericum racemosum* L. (Anthericaceae) in Scandinavia. *Biol. J. Linn. Soc.*, **69**: 193–212.
- Shapcott, A. 1998. The patterns of genetic diversity in *Carpentaria acuminata* (Arecaceae), and rainforest history in northern Australia. *Mol. Ecol.*, **7**: 833–847.
- Stubber, C.W., Wendel, J.F. and Goodman and Smith, J.S. 1988. *Techniques and Scoring Procedures for Starch Gel Electrophoresis of Enzymes from Maize (Zea mays L.)*. Technical Bulletin #286. Raleigh, NC: North Carolina Agricultural Research Service, North Carolina State University.
- Tsharntke, T. and Brandl, R. 2004. Plant–insect interactions in fragmented landscapes. *Annu. Rev. Entomol.*, **49**: 405–430.
- van Treuren, R., Bijlsma, R., van Delden, W. and Ougborg, N.J. 1991. The significance of genetic erosion in the process of extinction. I. Genetic differentiation in *Salvia pratensis* and *Scabiosa columbaria* in relation to population size. *Heredity*, **66**: 181–189.
- Weir, B.S. 1990. *Genetical Analysis*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Weir, B.S. and Cockerham, C.C. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**: 1358–1370.

- White, G.M., Boshier, D.H. and Powell, W. 1999. Genetic variation within a fragmented population of *Swetenia humilis* Zucc. *Mol. Ecol.*, **8**: 1899–1909.
- Workman, P.L. and Niswander, J.D. 1970. Population studies on southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. *Am. J. Human Genet.*, **22**: 24–49.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugenics*, **15**: 97–159.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, **19**: 395–420.
- Yeh, F.H. and O'Malley, D.M. 1980. Enzyme variation in natural populations of Douglas-Fir, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco from British Columbia. I. Genetics variation patterns in coastal populations. *Silvae Genet.*, **29**: 83–92.
- Young, A.G. and Clarke, G.M., eds. 2000. *Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Young, A.G., Boyle, T. and Brown, T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol. Evol.*, **11**: 413–419.
- Young, A.G., Brown, A.H.D. and Zich, F.A. 1999. Genetic structure of fragmented populations of the endangered daisy *Rutidosia leptorrhynchoides*. *Consev. Biol.*, **13**: 256–265.
- Young, H.J. 1988. Differential importance of beetle species pollinating *Dieffenbachia longispatha* (Araceae). *Ecology*, **69**: 832–844.
- Young, H.J. 1990. Pollination and reproductive biology of an understory neotropical aroid. In *Reproductive Ecology of Tropical Forest Plants* (K.S. Bawa and M. Hadley, eds.), pp. 151–164. Paris: UNESCO.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*, 4th edn. Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall.

Capítulo IV

Sistema de apareamiento y flujo de polen de *Dieffenbachia seguine* en hábitat fragmentado y continuo

INTRODUCCIÓN

El flujo de genes es un factor de gran importancia en la dinámica evolutiva de las poblaciones naturales. El flujo génico restringido conduce a la subestructura, a tamaños efectivos reducidos dentro de las poblaciones y a la diferenciación genética interpoblacional debido a la selección natural o la deriva (Slatkin 1987, Godt & Hamrick 1993). Por el contrario, niveles moderados de flujo génico son suficientes para homogenizar la variación genética entre poblaciones.

La dispersión y el flujo de polen (movimiento de propágulos) no son independientes del contexto ambiental, por lo tanto, es relevante evaluar cómo los cambios en el paisaje influyen la forma como se da el flujo génico (Smouse *et al.* 2001). En particular, la fragmentación del bosque puede alterar los patrones de flujo génico debido a un aumento en el aislamiento genético y disminución del tamaño de las poblaciones locales, comprometiendo la viabilidad de las poblaciones remanentes (Ledig 1992, Dutech *et al.* 2005). Por lo tanto, conocer las tasas de migración y las distancias que los genes se mueven entre las poblaciones de plantas tiene gran importancia en la conservación de las especies y su potencial evolutivo (Sork *et al.* 1999).

Tradicionalmente, los estimadores de la estructura genética se han usado para conocer de manera indirecta, la tasa de flujo génico histórico (Neigel 1997). Sin embargo, es necesario medir el flujo génico contemporáneo, es decir en "tiempo real", para estimar con mayor precisión el efecto de los cambios recientes del paisaje y de los factores demográficos y ambientales asociados a dicho cambio sobre el patrón de flujo génico (Smouse & Sork 2004). Una manera de entender los procesos contemporáneos de movimiento de polen es la evaluación de los episodios actuales de apareamiento. Es posible medir experimentalmente la fertilidad relativa de los donadores de polen e inferir los factores ecológicos y genéticos involucrados directamente en su éxito reproductivo (Godt & Hamrick 1993) por medio del análisis de las frecuencias alélicas de las madres, los padres potenciales y sus progenies. También se puede determinar cómo las características del hábitat (fragmentado - continuo) impactan esos patrones de movimiento (Smouse *et al.* 2001) y, en consecuencia, el sistema de apareamiento y la estructura genética de las poblaciones, ya que es precisamente la forma en como se aparean los individuos la que

determina qué información genética es la que se transmite de una generación a la siguiente (Loveless & Hamrick 1989).

Actualmente existen aproximaciones más directas para describir los patrones de flujo génico dentro y entre poblaciones, usando marcadores genéticos y tratamientos estadísticos que permiten cuantificar con mayor precisión el movimiento de los genes. Además, estos métodos tienen la ventaja de que implican un esfuerzo de muestreo menor comparado con los métodos tradicionales, debido a que no se requiere la información sobre los genotipos de los padres potenciales de las progenies para inferir los patrones de flujo de polen.

En este estudio se analizó el flujo génico contemporáneo en un evento reproductivo de *Dieffenbachia seguine*, una hierba polinizada por escarabajos de los bosques tropicales de México. El propósito fue evaluar si la fragmentación de los bosques afecta los patrones de flujo de polen. Para responder a esta pregunta, se analizaron dos poblaciones en fragmentos y dos poblaciones en bosque continuo.

Se plantearon tres objetivos. Primero, evaluar la tasa de entrecruzamiento, el nivel de endogamia de la generación parental y los patrones de paternidad de las progenies. Segundo, evaluar la hipótesis de que la fragmentación afecta la estructura de las “nubes” de polen (medida por el estadístico Φ_{FT}). Tercero, evaluar las relaciones genéticas entre los individuos adultos dentro y entre poblaciones usando el método de asignación propuesto por Paetkau *et al.* (1995) y evaluar las relaciones genéticas entre los gametos masculinos que fertilizaron las progenies, aplicando una nueva aproximación desarrollada por el Dr. Peter Smouse de Rutgers University, NJ. El método de asignación permite determinar que fracción de los gametos masculinos que fertilizaron las progenies provienen de la misma o de otra población.

De manera indirecta se pueden estimar el número de padres efectivos de las progenies, la distancia esperada de dispersión del polen y el área efectiva de polinización. La comparación de los parámetros estimados entre poblaciones de bosque continuo respecto a poblaciones de fragmentos permite determinar si la fragmentación ha conducido a cambios en los patrones de flujo de polen.

Estos análisis, complementarios entre sí, permiten responder a estas preguntas y entender los patrones de flujo de polen dentro y entre poblaciones en especies herbáceas de bosques tropicales.

MÉTODO

Especie

Dieffenbachia seguine es una hierba clonal típica del sotobosque de bosques tropicales primarios. Se encuentra formando parches densos. Es autoincompatible y es polinizada por escarabajos del género *Cyclocephala*.

Sitio de estudio

El área de estudio está localizada en el Golfo de México, en la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas. Se muestrearon cuatro poblaciones: dos poblaciones en bosque continuo (C1 y C2) en la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas-UNAM, con un área >640 ha, y dos poblaciones en fragmentos remanentes de 3 y 37 ha, F1 y F2, respectivamente. Estas poblaciones están separadas 3.4 Km en promedio.

Muestreo

Se establecieron parcelas de 1000 m² en cada población. Todos los individuos reproductivos (con inflorescencia) fueron marcados y mapeados en Octubre de 2002. Se colectó tejido foliar de cada individuo en floración y se almacenó a -70°C. Las infrutescencias que alcanzaron la madurez (progenies) fueron colectadas entre Marzo y Abril de 2003. Los frutos maduros fueron hidratados durante 24 horas y posteriormente fueron escarificados. Las semillas se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% y sembradas en agar en cajas de Petri. Se mantuvieron en una cámara con humedad, luz y temperatura controladas (90% humedad, 12 horas de luz y 28°C). Dos meses más tarde se colectó el tejido foliar de cada plántula registrando la identidad de la planta madre y se almacenó a -70°C. Se usó electroforesis horizontal en geles de almidón siguiendo métodos estandarizados (Cheliak & Pitel 1984). El buffer de extracción fue una mezcla 3:1 del buffer YO y VEG II (Yeh & O'Malley 1980, Cheliak & Pitel 1984). Se obtuvieron nueve loci enzimáticos polimórficos de siete enzimas. Se usó el sistema de buffer Histidina (pH 6.5) (Stuber *et al.* 1988), corrido durante 7 horas, para las enzimas

MDH, GDH y ME y el sistema Poulik (pH 8.6) (Hakim-Elahi 1976), corrido durante 4 horas, para las enzimas EST, GOT, APX y CPX.

Se obtuvieron los genotipos multilocus de las familias (plantas madre y su progenie polinizada naturalmente). En la Tabla 1 se especifica el número total de madres y progenie muestreados en cada población. Posteriormente, se realizaron tres análisis a los datos: Sistema de apareamiento, Estructura de los gametos masculinos y Probabilidad de ocurrencia de los genotipos de los adultos y los gametos masculinos dentro y entre poblaciones (Asignación).

Tabla 1. Número de madres (familias) y progenie muestreados en cuatro poblaciones de *Dieffenbachia seguine*.

Población	Madres	Progenie
F1	24	204
F2	14	132
C1	16	139
C2	11	56
Total	65	531

Sistema de apareamiento

Los parámetros del sistema de apareamiento fueron estimados usando el programa MLTR (Multilocus Mating System Program) (Ritland 2004). Se calcularon las frecuencias alélicas de los óvulos (madres) y del polen (padres) y por el método de máxima verosimilitud se estimaron la tasa de entrecruzamiento multilocus (t_m) y la tasa de entrecruzamiento unilocus (t_s), basadas en el modelo de apareamiento mixto de Ritland & Jain (1981), el coeficiente de endogamia de las madres (F_p), y la correlación de paternidad (r_p) que corresponde a la fracción de la progenie que comparte el mismo padre (hermanos completos). Esta correlación es estimada con base en el modelo de apareamiento correlacionado de Ritland (1989). La contribución de la endogamia biparental a la tasa aparente de autofertilización se estimó de manera indirecta, a través de la diferencia ente la tasa de autofertilización multilocus y unilocus (Ritland & Jain 1981).

Los errores estándar de los estimados poblacionales se calcularon realizando 1000 bootstraps en los cuales la unidad de remuestreo fue la progenie. Se define si un parámetro difiere o no de cero con base en los errores estándar. Se calculó el número de padres efectivos (N_{ep}) como el inverso de la correlación de paternidad ($1/r_p$) (Ritland 1989).

N_{ep} es el número de machos que dan origen a esta correlación, suponiendo que todos tienen la misma probabilidad de aparearse.

Estructura de los gametos masculinos (Two-Gener: Two generations)

Para realizar este análisis es necesario conocer el genotipo de las madres y sus progenies que corresponden a dos generaciones de individuos (Two-Gener). Este método permite estimar la heterogeneidad en las “nubes” de polen “tomadas” por cada madre. Esta aproximación se basa en la idea de que las plantas madres distribuidas a través del paisaje, toman parcial o completamente conjuntos de donadores de polen que no se sobrepone (Smouse *et al.* 2001). El procedimiento está basado en el análisis de las distancias genéticas entre los gametos masculinos.

El procedimiento involucra a) muestreo de familias (madres y progenie), b) inferencia de los gametos masculinos usando los genotipos de la madre y de la progenie, c) cálculo de las distancias entre pares de gametos masculinos, d) construcción de la matriz de distancias intergaméticas y e) análisis de varianza molecular (AMOVA). En éste último se usa la matriz de distancia entre gametos masculinos como entrada, y permite separar la variación en dos componentes: *dentro de madres* y *entre madres*. El estadístico obtenido es la *correlación intraclase* Φ_{FT} (reemplazando la F de Fisher), que corresponde a la fracción de la varianza total que se debe a la diferencia entre madres, [$\Phi_{FT} = S_E^2 / (S_E^2 + S_D^2)$], donde S_E^2 y S_D^2 es la varianza entre y dentro de madres, respectivamente y es análogo al estadístico F_{st} de Wright. El objetivo analítico de este procedimiento es determinar si diferentes madres han muestreado diferentes colecciones de machos. La hipótesis nula es que las madres no han recibido polen de diferentes “nubes” de polen.

La prueba de significancia se realiza mediante la asignación aleatoria de los gametos masculinos entre madres, basado en la hipótesis de que si no hay diferencia entre las “nubes” de polen, no importa cual colección de machos es asociada con que madre. Se construye una distribución con los valores de Φ_{FT} obtenidos en cada muestreo y se determina la significancia del valor de Φ_{FT} observado. Valores de Φ_{FT} pequeños indican la existencia de un alto grado de solapamiento entre las “nubes” de polen tomadas por las madres, es decir, que las madres reciben polen de varios padres, mientras que valores

grandes, indican un grado de solapamiento muy pequeño, es decir, que las madres reciben polen de uno o pocos donadores (Fig. 1).

Se realizaron los AMOVAS para las cuatro poblaciones estudiadas, para los adultos y los gametos masculinos y para los fragmentos y el bosque continuo, usando el programa GenAlEx (Peakall & Smouse 2005). El objetivo en este punto, es determinar si la fragmentación produce el mismo o diferente nivel de estructura del polen en comparación con el bosque continuo.

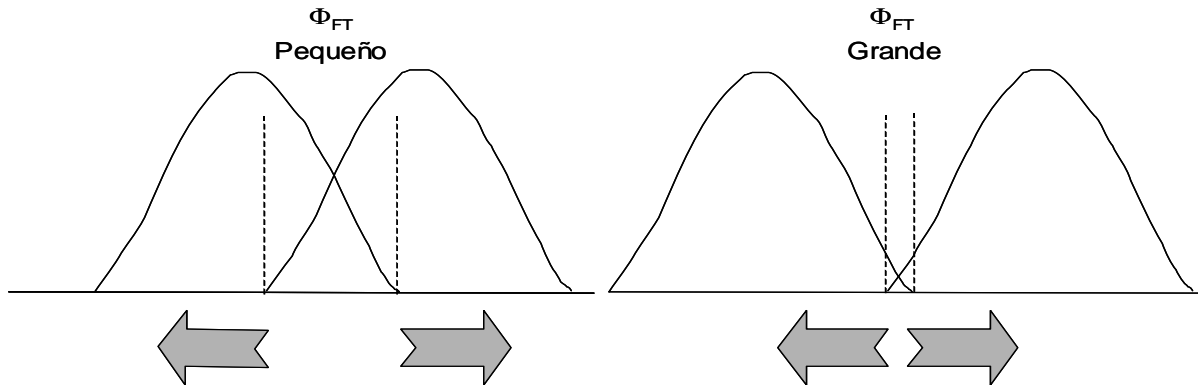


Figura 1. Interpretación de los valores Φ_{FT} . Las curvas representan la distribución de gametos masculinos tomados por cada madre. Valores pequeños de Φ_{FT} indican que el solapamiento de las “nubes” de polen entre madres es grande. Valores grandes de Φ_{FT} indican que existe gran heterogeneidad en las “nubes” de polen entre madres, de manera que el solapamiento es muy pequeño.

Probabilidad de ocurrencia (Asignación)

Este método se utilizó para determinar la probabilidad de ocurrencia de que un individuo (genotipo) pertenezca a la población de la cual proviene y permite analizar el grado de solapamiento genético de los individuos adultos y los gametos masculinos dentro y entre poblaciones. El método de asignación de los individuos adultos procede mediante los siguientes pasos: a) calcular la frecuencia esperada de cada genotipo para cada locus en esa población, b) multiplicar los valores de cada loci y transformar logarítmicamente el producto, c) realizar los mismos cálculos para estimar la frecuencia del genotipo en otras poblaciones y d) asignar el genotipo a la población en la cual tiene la mayor probabilidad (menor log-likelihood) de ocurrencia (Paetkau *et al.* 1995).

El método de asignación para los gametos masculinos comprende cinco pasos:

- a) Construcción de la matriz de probabilidades para los alelos de los gametos masculinos, de acuerdo a la probabilidad de que un alelo esté o no presente en un gameto masculino.
- b) Cálculo de las distancias genéticas: se construye el gameto promedio de cada población con las frecuencias alélicas promedio y se calcula la distancia genética de cada gameto masculino al gameto promedio de cada población.
- c) Se relativizan las distancias genéticas obtenidas para cada gameto de acuerdo al tamaño de la población a la que pertenecen.
- d) Se construye una matriz con las distancias genéticas entre gametos dentro y entre poblaciones.
- e) Se asigna cada gameto a la población con la cual tenga menor distancia genética y se obtiene una matriz de asignación.

RESULTADOS

Sistema de apareamiento

La tasa de entrecruzamiento fue mayor a 0.80 en todas las poblaciones, con un promedio de 0.957 ± 0.09 DE. Tres de las cuatro poblaciones (excepto F2), presentaron estimados de t_m que no difirieron de 1 (Fig. 2a). Las poblaciones F2 y C2 mostraron valores de endogamia biparental pequeños y significativamente diferentes de cero (Fig. 2b). Los coeficientes de endogamia para las madres fueron significativamente positivos para todas las poblaciones, excepto para la población C2 (Fig. 2c). La correlación de paternidad varió de 0.141 a 0.999 con un promedio de 0.541 ± 0.353 DE para todas las poblaciones y fue significativamente diferente entre poblaciones de bosque continuo. Los estimados de r_p de las poblaciones de bosque continuo difirieron significativamente de los estimados para los fragmentos (Fig. 2d). El conjunto de apareamiento paterno ($1/r_p$) fue variable entre poblaciones, de 1.0 N_{ep} en la población C2 a 7.1 en la población C1. En promedio N_{ep} fue de 3 plantas. No se detectaron diferencias significativas entre poblaciones de bosque continuo y fragmentos en ningún parámetro del sistema de apareamiento.

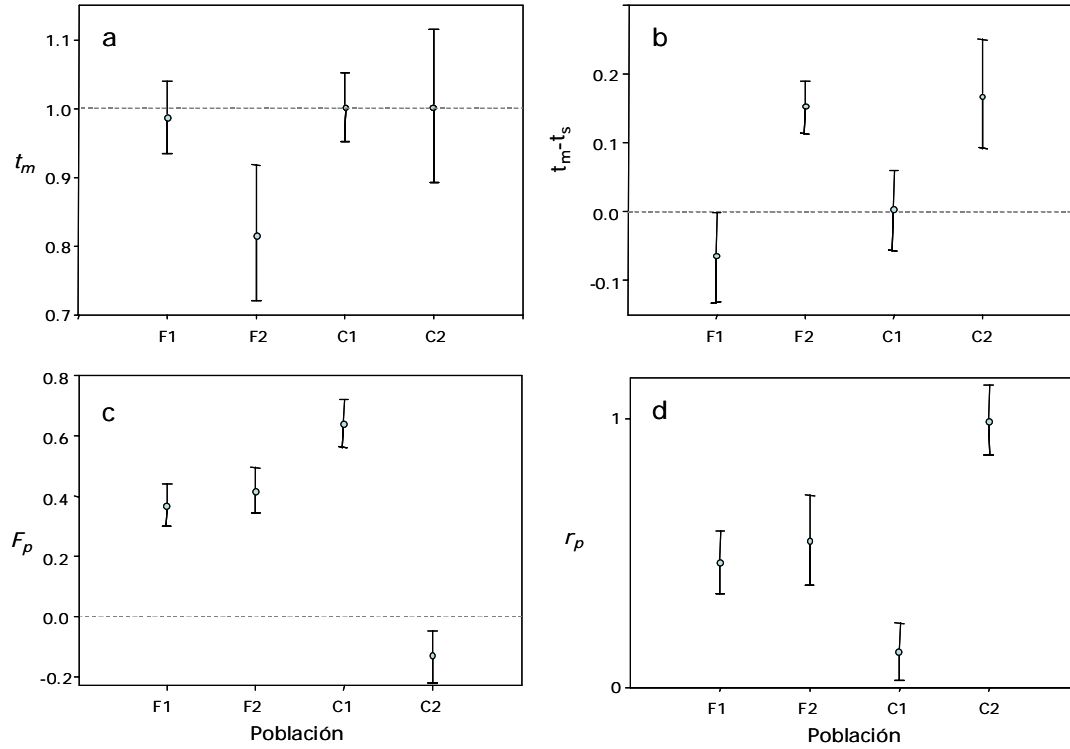


Figura 2. Parámetros del sistema de apareamiento en cuatro poblaciones de *Dieffenbachia seguine*. a) tasa de entrecruzamiento multilocus, b) endogamia biparental, c) endogamia en la generación de madres y d) correlación de paternidad. Las barras corresponden a la desviación estándar.

Estructura de los gametos masculinos (*Two-Gener*)

La heterogeneidad en las “nubes” de polen fue alta y significativa para las cuatro poblaciones, lo que significa que diferentes madres recibieron polen de diferentes donadores. Los estimados de Φ_{FT} variaron entre 0.340-0.425. Los componentes de varianza entre madres y dentro de madres fueron similares en todas las poblaciones (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados del AMOVA para cuatro poblaciones de *Dieffenbachia seguine*. Φ_{FT} es la medida de la estructura del polen.

Poblac.	Fuente	gl	SC	Var. Est.	%	Φ_{FT}	<i>P</i>
F1	<i>Entre Madres</i>	23	148.01	0.643	38%	0.377	0.001
	<i>Dentro de Madres</i>	180	190.65	1.059	62%		
F2	<i>Entre Madres</i>	13	93.27	0.668	37%	0.372	0.001
	<i>Dentro de Madres</i>	118	132.47	1.123	63%		
C1	<i>Entre Madres</i>	15	105.13	0.693	34%	0.340	0.001
	<i>Dentro de Madres</i>	123	164.82	1.340	66%		
C2	<i>Entre Madres</i>	10	39.70	0.629	43%	0.425	0.001
	<i>Dentro de Madres</i>	45	38.27	0.851	57%		

Se detectó una estructura genética alta entre hábitats tanto en las poblaciones de adultos como de gametos masculinos. La distribución de la variación fue similar en adultos y polen. La diferenciación entre las poblaciones dentro de hábitats fue alta en individuos adultos y polen (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados del AMOVA de individuos adultos y gametos masculinos para cuatro poblaciones de *Dieffenbachia seguine*, entre hábitat continuo y fragmentado.

	Fuente	gl	SC	Var. Est.	%	Estadístico	Valor	P
ADULTOS N=209	Entre Hábitats	1	78.13	0.591	8%	Φ_{HT}	0.079	0.001
	Entre Pobl./Hábitat	2	90.18	0.776	10%	Φ_{PH}	0.112	0.001
	Indiv./Dentro de Poblaciones	205	1252.50	6.110	82%	Φ_{PT}	0.182	0.001
GAMETOS	Entre Hábitats	1	246.90	0.529	7%	Φ_{HT}	0.072	0.001
MASCULINOS N=531	Entre Pobl./Hábitat	2	204.99	0.808	11%	Φ_{PH}	0.119	0.001
	Indiv./Dentro de Poblaciones	526	3132.26	5.955	82%	Φ_{PT}	0.183	0.001

Del valor de Φ_{FT} se puede estimar el número efectivo de donadores de polen, a través de la relación $N_{ep} = 1/2\Phi_{FT}$. La densidad (d) promedio de plantas fue 69 ind/1000 m². Suponiendo que sólo el 10% de las inflorescencias estuvieron abiertas cada día, la densidad efectiva (d_e) promedio sería 6.9 ind/1000 m². Un estimado del área efectiva de polinización es $A_{ep} = N_{ep}/d_e$, que sería un círculo centrado en la madre en cuestión con un radio r (Austerlitz & Smouse 2001).

Se obtuvieron estimados de N_{ep} muy similares entre sí. La distancia promedio esperada de dispersión de polen fue pequeña. Teóricamente, en estas poblaciones, se encuentran en promedio 1.32 donadores efectivos de polen en un círculo de área 323.91 m² y un radio de 8.6 m (Fig. 3). El área efectiva de polinización A_{ep} fue significativamente menor (marginamente) en fragmentos que en selvas ($t = -4.215$, $P = 0.0514$) y de igual manera el radio del círculo ($t = -5.202$, $P = 0.0350$).

Tabla 4. Estimados indirectos del número de padres efectivos N_{ep} , densidad efectiva d_e (individuos reproductivos), área efectiva de polinización A_{ep} y radio del A_{ep} .

Población	Φ_{FT}	N_{ep}	Densidad (1000m ²)	d_e (10%)	A_{ep} (m ²)	r (m)
F1	0.377	1.326	0.099	0.0099	133.93	6.53
F2	0.372	1.344	0.104	0.01043	129.23	6.41
C1	0.340	1.470	0.035	0.0035	612.50	11.56
C2	0.425	1.176	0.038	0.0038	420.00	9.92
Promedio ± (DE)	0.378 (0.035)	1.329 (0.120)	0.069 (0.037)	0.0069 (0.004)	323.91 (235.59)	8.60 (2.55)

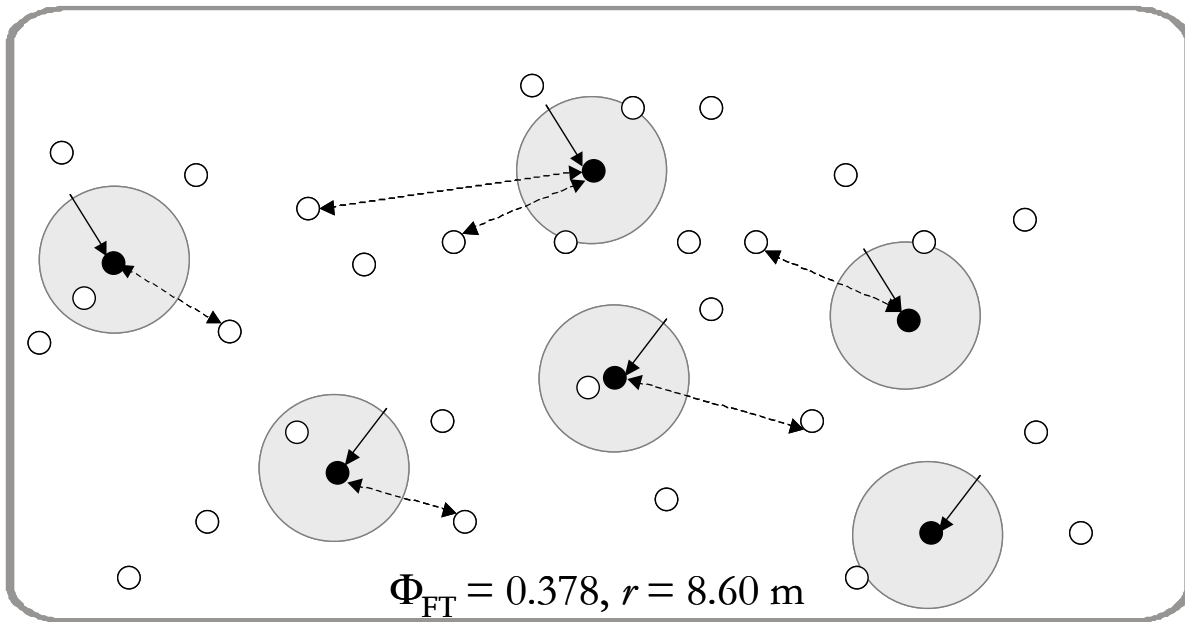


Figura 3. Vecindario genético promedio en las poblaciones de *Dieffenbachia seguine*. Los círculos negros representan las plantas madre, los círculos blancos los padres y los círculos grises el tamaño del vecindario genético. Las flechas dentro de los círculos grises representan el radio y las flechas con línea discontinua señalan los movimientos posibles del polen. Los valores promedio de Φ_{FT} y r fueron tomados de la Tabla 4.

Probabilidad de ocurrencia (Asignación)

Se detectó una alta estructura genética en adultos y en gametos masculinos. En promedio, el 65 % de los adultos tuvo mayor probabilidad de ocurrencia en la población de la cual provienen que en las otras poblaciones. Más del 50% de los individuos fueron asignados a su propia población en las cuatro poblaciones (Fig. 4). Además, en los análisis entre pares de poblaciones, en la mayoría de los casos, los individuos de una población estuvieron ubicados en un área del espacio de probabilidades de ocurrencia diferente a los individuos de la otra población (Fig. 5), indicando que hay un alto grado de diferenciación genética.

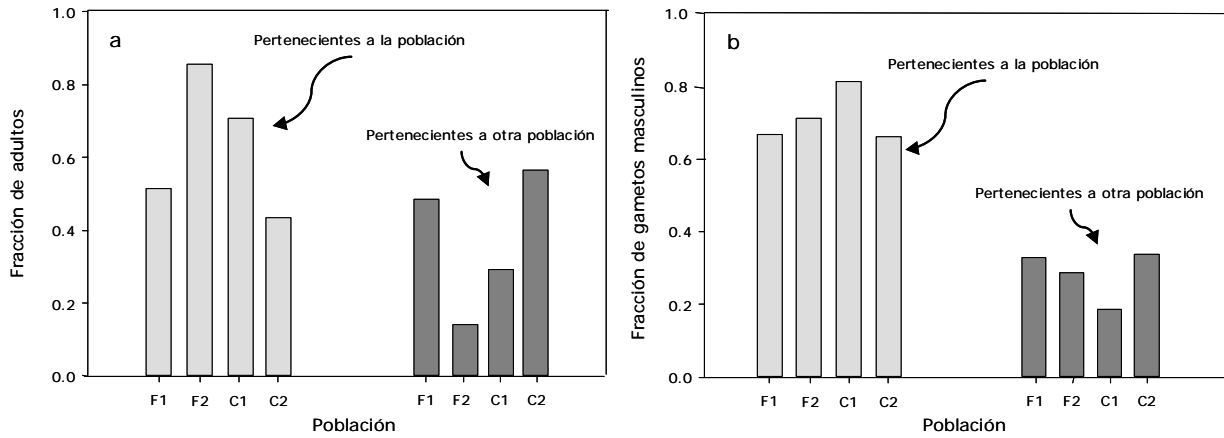


Figura 4. Fracción de asignación. El histograma de la izquierda representa la distribución de la fracción de individuos asignados a la población de la cual provienen y el histograma de la derecha la fracción total de individuos asignados a otras poblaciones, con base en su probabilidad de ocurrencia. a) De individuos adultos y b) de gametos masculinos.

La fracción de gametos masculinos asignada a la población en la cual fueron observados fue alta (>0.65) en todos los casos (Fig. 4). La asignación de la fracción restante fue variable entre las poblaciones restantes. En promedio, el 71.2% de los gametos masculinos fueron más cercanos genéticamente al gameto promedio de su población (Tabla 5).

Tabla5. Fracción de gametos masculinos asignados a cuatro poblaciones de *Dieffenbachia seguine*

POBLACIÓN	Hacia				
	Desde	F1	F2	C1	C2
F1		0.667	0.025	0.069	0.240
F2		0.061	0.712	0.030	0.197
C1		0.115	0.007	0.813	0.065
C2		0.286	0.018	0.036	0.661

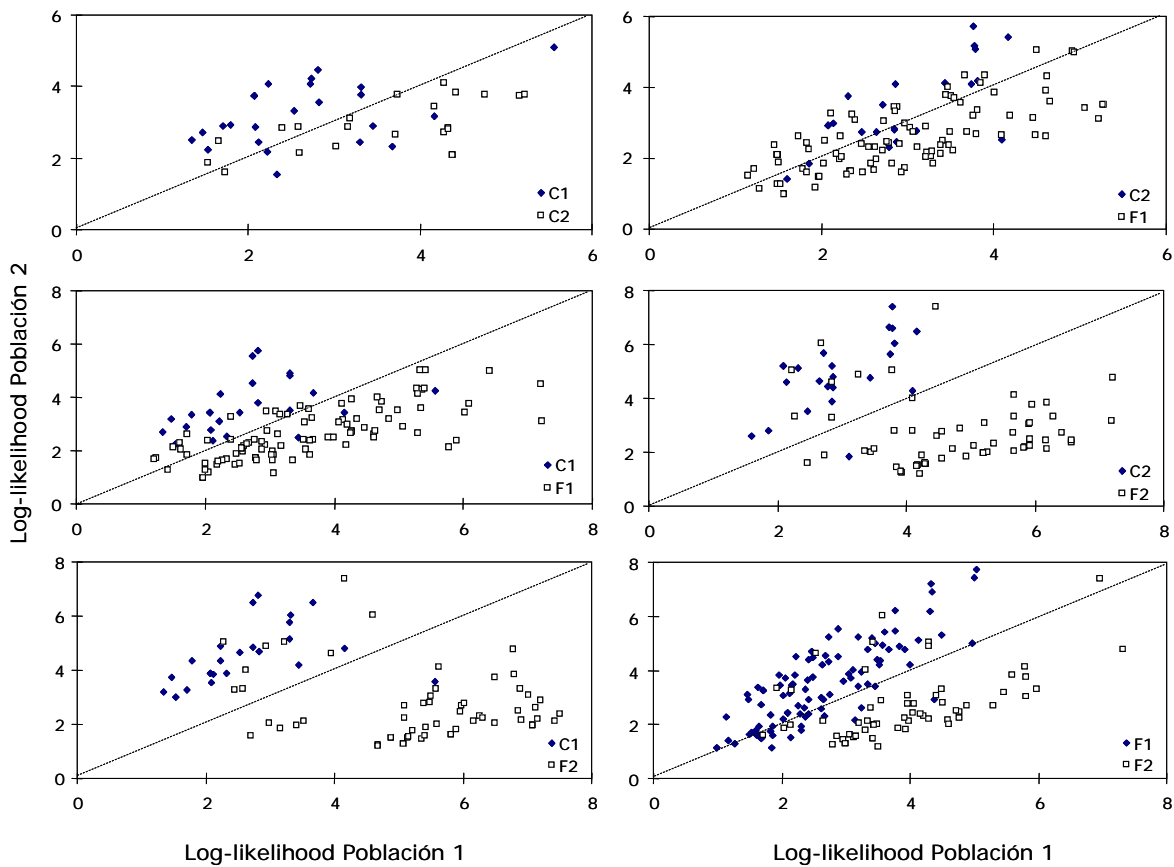


Figura 5. Asignación de genotipos de individuos adultos por pares de poblaciones. Para cada individuo (genotipo) se graficó el valor log-likelihood en su propia población vs. log-likelihood en la otra población.

DISCUSIÓN

Con base en los estimados de la tasa de entrecruzamiento, la correlación de paternidad, la estructura de polen y la fracción de gametos masculinos asignados a su propia población, se puede inferir que el movimiento de polen es restringido en gran proporción al interior de las poblaciones de *Dieffenbachia seguine* y que en su mayoría los apareamientos se dan sólo entre dos individuos. Este estudio sugiere que la fragmentación del bosque tropical tiene el potencial de reducir el área efectiva de polinización a través del aumento en la densidad de individuos reproductivos en los fragmento y también que las diferencias observadas entre poblaciones en los estimadores del sistema de apareamiento pueden estar relacionadas a la variación en las características espaciales particulares de cada población.

Sistema de apareamiento

El entrecruzamiento casi completo en las poblaciones de *D. seguine* corrobora el hallazgo de que la especie es autoincompatible (Cap. I) y apoya la clasificación de Chouteau *et al.* (2006) como especie completamente xenógama, basada en la alta proporción polen-óvulo. De manera que todas las semillas que se producen provienen de entrecruzamiento. La tasa de entrecruzamiento no estuvo asociada con la densidad de individuos reproductivos ni con el área del fragmento. Los estudios sobre el sistema de apareamiento realizados hasta el momento en hábitat fragmentados muestran tendencias muy variables al respecto. En especies de árboles como *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) (Quesada *et al.* 2004), *Cavanillesia platanifolia* (Bombacaceae) (Murawski & Hamrick 1992), *Shorea megistophylla* (Dipterocarpaceae) (Murawski *et al.* 1994) y en la hierba *Salvia pratensis* (Lamiaceae) (van Treuren *et al.* 1993), la tasa de entrecruzamiento estuvo positivamente asociada a la densidad de flores, mientras que en el arbusto *Ardisia escallonioides* (Myrsinaceae) (Pascarella 1997) y la herbácea *Helianthus annuus* (Asteraceae) (Ellstrand *et al.* 1978) no se detectó tal asociación. En *Gentiana pneumonanthe* (Gentianaceae) detectó una correlación positiva entre la tasa de entrecruzamiento y el tamaño poblacional (Raijmann *et al.* 1994), mientras que en *Salvia pratensis* (Lamiaceae) no hubo correlación con el tamaño, (van Treuren *et al.* 1993). Quesada *et al.* (2004), mostraron que en *Ceiba aesculifolia* y *C. grandiflora* el sistema de apareamiento no fue afectado por el aislamiento y que mantienen un sistema predominantemente autoincompatible. En *Samanea saman* (Fabaceae) no se detectaron diferencias en la tasa de autofertilización entre árboles aislados y en bosque continuo (Cascante *et al.* 2002). En contraste, en el árbol *Pachira quinata* (Bombacaceae) las poblaciones localizadas en bosque continuo fueron predominantemente autoincompatibles, mientras que los árboles aislados fueron parcialmente autocompatibles (Fuchs *et al.* 2003). Aldrich *et al.* (1998) encontraron que la tasa de autofertilización en las plántulas de *Symphonia globulifera* (Clusiaceae) de los fragmentos fue mayor que en el bosque continuo.

En dos de las cuatro poblaciones, F2 y C2, la endogamia fue significativamente diferente de cero. Como *D. seguine* no se autofertiliza, la aparente tasa de autofertilización se debe a la endogamia biparental (Ritland & Jain 1981), de manera que los entrecruzamientos

ocurren más frecuentemente entre plantas relacionadas genéticamente que lo esperado al azar (Ellstrand *et al.* 1978, Ritland 1984). Tal endogamia puede ser causada por la subestructura espacial de los genotipos en la población (Ennos & Clegg 1982, Ritland & Ganders 1985) combinado con flujo de polen limitado (Sun & Ritland 1998, este estudio), ó la variación temporal en la sincronía de floración entre individuos (Hall *et al.* 1996). Las poblaciones de *D. seguine* presentan una marcada subestructura espacial (Cuartas, datos no publicados) y forma parches muy densos. Sin embargo, la endogamia biparental parece estar más asociada a la diversidad genotípica que a la densidad, al menos en la población F2, que presenta la menor diversidad genotípica. Tasas altas de endogamia biparental asociadas a altas densidades han sido observadas en las herbáceas *Centaurea solstitialis* (Sun & Ritland 1998) y *Helianthus annuus* (Ellstrand *et al.* 1978). En oposición a lo esperado, en la población F1 no se detectó endogamia biparental a pesar de que tuvo una mayor densidad. Una explicación posible, es que la mayor oferta de polen aumenta la posibilidad de entrecruzarse con un individuo no emparentado. La floración en las poblaciones de *D. seguine* a veces es en ramets distantes entre sí, a veces en ramets muy cercanos, de manera que la distancia efectiva entre plantas cambia diariamente. Esta forma de floración facilita tanto apareamientos entre individuos no emparentados como entre parientes, explicando la alta tasa de entrecruzamiento y de endogamia biparental.

La ocurrencia de madres completamente exogámicas (F_p negativa) en la población C2 es desconcertante, considerando que la tasa de endogamia biparental fue diferente de cero. Esto puede ser explicado por depresión endogámica, si la carga genética es alta (Sun & Ritland 1998). Las otras poblaciones presentan generaciones de madres con endogamia alta. Particularmente la población C1 tiene una tasa de endogamia materna significativamente mayor a la de los fragmentos (F1 y F2). Es probable que endogamias tan diferentes en las madres se asocien a eventos demográficos diferentes, por ejemplo, que la establecimiento de la población C1 haya sido previo al de las poblaciones en los fragmentos y por lo tanto tenga un mayor número de generaciones de apareamientos endogámicos, o que el grado de parentesco entre los individuos fundadores haya sido mayor (Hedrick 2000). También puede deberse a selección en etapas muy tempranas del desarrollo de las semillas.

De igual manera, las correlaciones de paternidad fueron variables entre las poblaciones. En tres poblaciones entre el 50 y el 100% de los pares de progenie dentro de una familia fueron hermanos completos, solamente la población C1 tuvo una r_p pequeña indicando un conjunto paterno grande, asociado probablemente a un mayor número de polinizadores (Cap.I).

El número efectivo de padres de las progenes varió entre 1 y 7, con un promedio de 3 en todas las poblaciones, aunque tal promedio es altamente afectado por la población C1. Si se excluye esta población el número promedio de parejas disminuye a 1.6, lo cual parece ser una tendencia general en esta especie. La r_p surge de la tendencia de que las cargas de polen de los polinizadores son derivadas de la misma planta (eventos de dispersión correlacionados) o de la disponibilidad limitada de donadores de polen (Sun & Ritland 1998, Hardy *et al.* 2004). Ambas explicaciones se ajustan a las poblaciones de *D. seguine*. Pocas inflorescencias están abiertas al mismo tiempo en la población, y se encuentran en diferentes fases (no receptiva, femenina masculina) y la abundancia de polinizadores es muy baja, por lo cual los pocos donadores de polen disponibles tienen alta posibilidad de entrecruzarse y que las cargas de polen transportadas por los polinizadores se deriven de una sola planta. Los valores de r_p detectados en *D. seguine* son más altos que los encontrados en *Eriogonum ovalifolium* (Polygonaceae) (Neel *et al.* 1998), *Mimulus guttatus* (Scrophulariaceae) (Ritland 1989) y *Centaurea solstitialis* (Asteraceae) (Sun & Ritland 1998), aunque similares a los detectados en las poblaciones de *Rutidosia leptorrhynchoides* (Asteraceae) (Wells & Young 2002). Por otra parte, los valores de r_p no difirieron significativamente entre poblaciones de hábitat continuo y fragmentado. En comparación, en poblaciones de *Symphonia globulifera*, *Samanea saman* y *Ceiba grandiflora* las progenes de árboles aislados fueron más similares que en árboles de bosque continuo (Aldrich & Hamrick 1998, Cascante *et al.* 2002, Quesada *et al.* 2003), mientras que en *Swietenia humilis* (Meliaceae) la progenie de árboles aislados fue producida por un amplio número de donadores (White *et al.* 2002). Las modificaciones al sistema de apareamiento detectadas en los estudios anteriores están asociadas principalmente a cambios en los patrones de visita o la ausencia de polinizadores.

Las correlaciones indican que las progenes en *D. seguine* están más relacionadas que lo predicho sólo por la tasa de entrecruzamiento. En resumen, gran proporción de los apareamientos ocurren entre solo dos individuos.

En general, las tendencias son similares en todas las poblaciones con unas pequeñas diferencias significativas, independiente del tipo de hábitat y la densidad. Asimismo, todo parece indicar que aunque los polinizadores son escasos, realizan un trabajo eficiente en esta especie que depende de su presencia para mantenerse en el tiempo. A diferencia de las tendencias similares esperadas en las dos poblaciones de hábitat no perturbado, se observó mayor variación en los parámetros del sistema de apareamiento en comparación a las dos poblaciones en los fragmentos. Esto sugiere que no hay efecto de la fragmentación sino que cada población tiene una dinámica ecológica particular, la preceden eventos de colonización diferentes y es posible que su posición, topografía, y grado de aislamiento estén generando las diferencias. Por ejemplo, las poblaciones F2 y C2 son más aisladas, están localizadas en un cerro y una hondonada, respectivamente, explicando en parte la endogamia biparental detectada, mientras la población C1 está en medio de otros parches, aumentando la posibilidad de recibir polen de varias fuentes, explicando la r_p pequeña. Es importante notar que aunque hay alto entrecruzamiento, la escala intra-parche a la que se produce, acentúa la estructura genética, explicando en parte la alta diferenciación observada entre poblaciones y la gran diversidad genética en esta especie.

Estructura de gametos masculinos (Two-Gener)

Los valores de Φ_{FT} estimados son altos, lo cual indica que la polinización efectiva es muy localizada y que las cargas de polen que fertilizaron a las madres fueron diferentes en composición (Smouse *et al.* 1991). La reducción y aislamiento del hábitat no ha promovido un mayor movimiento en los polinizadores, el nivel de estructura entre fragmentos y bosque continuo fue similar tanto para las poblaciones de adultos como de gametos masculinos. Esto es debido, probablemente a un reducido número de donadores disponibles cada día en cada población acoplado a la baja densidad, a la corta distancia que recorren los polinizadores y a su comportamiento especialista (Cap I). La diferenciación mayor entre las “nubes” de polen entre poblaciones dentro de hábitats, que entre hábitats, es un resultado congruente con la idea de que las diferencias en el sistema de apareamiento dependen de las características de cada población más que de un efecto de la fragmentación.

Comparado con los árboles *Dinizia excelsa* (Fabaceae) (Dick *et al.* 2003) y *Pinus echinata* (Pinaceae) (Dyer & Sork 2001) y la hierba *Cornus florida* (Cornaceae) (Sork *et al.* 2005), los valores de Φ_{FT} son muy altos en *D. seguine*. En *Dinizia excelsa* y *Cornus florida*, la perturbación del hábitat ha promovido un mayor movimiento de polen que en el bosque no perturbado (Sork *et al.* 2005). En contraste, la estructura del polen en *Pinus equinata* estuvo negativamente asociada con la estructura vegetativa (densidad de árboles) (Dyer & Sork 2001).

A pesar de que la densidad es un factor que determina la estructura genética del polen, en las poblaciones de *D. seguine* la estructura del polen fue independiente de la densidad conespecífica. Por lo tanto, los patrones de movimiento de polen no responden al número de individuos reproductivos por área. Esta misma tendencia fue observada en poblaciones de *Pinus echinata* (Dyer & Sork 2001). Sin embargo, la fragmentación del bosque tropical tiene el potencial de cambiar el flujo génico mediado por polen, a través del aumento en la densidad de individuos reproductivos en los fragmentos, la cual puede conducir a la reducción del área efectiva de polinización. Esto se debe a que el arreglo espacial de las plantas puede afectar el movimiento de los polinizadores, de manera que menor distancia entre plantas puede disminuir la distancia promedio de la transferencia de polen. Teóricamente, en los fragmentos, el área efectiva de polinización es un círculo con radio $6.46 \text{ m} \pm 0.077 \text{ DE}$, centrado en la madre en cuestión, que contiene un donador de polen, mientras que en bosque continuo el radio es de $10.74 \text{ m} \pm 1.159 \text{ DE}$. No obstante, los estimados directos (no teóricos) del movimiento de polen en estas poblaciones, probablemente resultarían en que el área del círculo que contiene un macho y una madre (A_{ep}) es mayor a la estimada indirectamente.

El área efectiva de polinización estimada en poblaciones de *D. seguine* es muy pequeña en comparación a la estimada en poblaciones de *D. longispatha* en Costa Rica (Young 1988, 1990) y *Astrocaryum mexicanum* (Arecaceae) en Los Tuxtlas, México (Eguiarte *et al.* 1993). En *D. seguine* el área del vecindario varió entre 129.23 y 612.50 m². En contraste, en las poblaciones de *D. longispatha*, en las cuales se evaluó el movimiento de los escarabajos polinizadores, el área del vecindario varió entre 87,308 y 179,848 m², a pesar de que la densidad efectiva fue muy similar a la de las poblaciones de *D. seguine* (0.0026 - 0.0059

ramets/m²) (Young 1988, 1990). Asimismo, en poblaciones de *A. mexicanum*, el área del vecindario se estimó incorporando la varianza en la dispersión de semillas y de polen, y se encontró gran variación (6.25 - 2,537m²) (Eguiarte *et al.* 1993) Esta gran diferencia entre los vecindarios de las tres especies, se debe a que los polinizadores se mueven largas distancias en *D. longispatha* (hasta 680 m) y en *A. mexicanum*, mientras que en *D. seguine* los movimientos de los polinizadores son en su mayoría a cortas distancias.

Probabilidad de ocurrencia (Asignación)

Los resultados indican la existencia de un patrón espacial en la distribución de las frecuencias alélicas, congruente con la alta diferenciación genética (F_{st}) detectada en las poblaciones de adultos y en las “nubes” de polen (Φ_{FT}). Sin embargo, dicha distribución no estuvo asociada con las distancias geográficas.

La cantidad de solapamiento genético entre las poblaciones, medida por la asignación de los individuos adultos o de los gametos masculino, es pequeña (Smouse *et al.* 1982). Por lo tanto, existen suficientes diferencias entre poblaciones que permiten clasificar un genotipo como altamente característico de la población de la cual proviene (Paetkau *et al.* 1995). El alto grado de estructura detectado puede explicarse en parte por la presencia de individuos fundadores de las poblaciones, similares genéticamente por azar o por dispersión “correlacionada”, es decir, la dispersión masiva de semillas de una sola planta. Los individuos asignados a una población diferente a la población de la cual fueron muestreados, pertenecen probablemente a inmigrantes o descendientes de inmigrantes que se originaron en la población a la cual fueron asignados (Paetkau *et al.* 1995, Waser & Strobeck 1998). También es probable que la asignación “forzosa” de los individuos a una de las otras tres poblaciones evaluadas produzca un sesgo en los resultados debido a que es posible que esos individuos provengan de parches no muestreados en este estudio. De esta manera, se puede sobreestimar la fracción de individuos asignados a una población particular debido a que es la más similar genéticamente.

El hecho de que la asignación de los gametos masculinos fue en promedio, un 8% mayor que la de los adultos sugiere que el movimiento de genes a través del polen es más localizado que el movimiento total (polen + semillas) de genes entre poblaciones. De manera que la dispersión a través de semillas por aves es la fuente más probable de inmigración contemporánea a las poblaciones.

Conclusión

Las poblaciones de *D. seguine*, presentan entrecruzamiento completo y una alta relación genética dentro de las progenies. Asimismo, el polen es altamente estructurado y en general, las madres reciben polen de un solo donador. La única modificación del patrón de flujo génico en estas poblaciones generadas por la fragmentación del bosque tropical es la reducción del área efectiva de polinización en los fragmentos. El flujo de genes localizado puede ser consecuencia de la dinámica demográfica de las poblaciones de *D. seguine*. En este estudio, hemos mostrado que la fragmentación no afecta el flujo de polen en especies herbáceas con polinizadores especialistas acopladas a la apertura de claros de manera que forman parches funcional y ecológicamente independientes. Es necesario estudiar otras especies con polinizadores especialistas para poder generalizar estas tendencias.

LITERATURA CITADA

Aldrich PR & Hamrick JL. 1998. Reproductive dominance of pasture trees in a fragmented tropical forest mosaic. *Science* 281: 103-105.

Aldrich PR, Hamrick JL, Chavarriaga P & Kochert G. 1998. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Mol. Ecol.* 7: 933-944.

Austerlitz F & Smouse PE. 2001. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. II. Relation between Φ_{FT} , pollen dispersal and interfemale distance. *Genetics* 157: 851-857.

Cascante A, Quesada M, Lobo JJ & Fuchs EA. 2002. Effects of dry forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. *Cons. Biol.* 16: 137-147.

Cheliak WM & Pitel JA. 1984. Techniques for starch gel electrophoresis from forest trees. Information report PI-X-42. Petawa National Forestry Institute. Canadian Forestry Service. Calk River, Ontario.

Chouteau M, Barabé D & Gibernau M. 2006. Pollen-ovule ratios in some Neotropical Araceae and their putative significance. *Plant. Syst. Evol.* 257: 147-157.

Dick CW, Etchelecu G & Austerlitz F. 2003. Pollen dispersal of tropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian forest. *Mol. Ecol.* 12: 753-764.

Dutech C, Sork VL, Irwin AJ, Smouse PE & Davis FW. 2005. Gene flow and fine-scale genetic structure in a wind-pollinated tree species, *Quercus lobata* (Fagaceae). *Am. J. Bot.* 92: 252-261.

Dyer RJ & Sork VL. 2001. Polen pool heterogeneity in shortleaf pine, *Pinus equinata* Mill. Mol. Ecol. 10: 859-866.

Eguiarte LE, Búrquez A, Rodríguez J, Martínez-Ramos M, Sarukhán J & Piñero D. 1993. Direct and indirect estimates of neighborhood and effective population size in a tropical palm, *Astrocaryum mexicanum*. Evol. 47: 75-87.

Ellstrand NC, Torres AM & Levin DA. 1978. Density and rate of apparent outcrossing in *Helianthus annuus* (Asteraceae). Syst. Bot. 3: 403-407.

Ennos RA & Clegg MT. 1982 Effect of population substructuring on estimates of outcrossing rate of grain sorghum (*Sorghum bicolor*). Ther. Appl. Gen. 66: 323-327.

Fuchs EJ, Lobo JA & Quesada M. 2003. Effects of forest fragmentation and flowering phenology on the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree *Pachira quinata*. Cons. Biol. 17: 149-157.

Godt MJW & Hamrick JL. 1993. Patterns and levels of pollen-mediated gene flow in *Lathyrus latifolius*. Evolution 47: 98-110.

Hall P, Walker S & Bawa KS. 1996. Effects of forest fragmentation on genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Pithecellobium elegans*. Cons. Biol. 10: 757-768.

Hakim-Elahi A. 1976. Temporal changes in the population structure of the slender wild oat (*Avena barbata*) as measured by allozyme polymorphism. Ph. D. Thesis. University of California, Davis.

Hardy OJ, González-Martínez SC, Colas B, Fréville H, Mignot A & Olivieri I. 2004. Fine-scale genetic structure and gene dispersal in *Centaurea corymbosa* (Asteraceae). Genetics 168: 1601-1614.

Hedrick W. 2000. *Genetics of populations*. Second edition. Jones and Barret Publishers. Sudbury, Massachusetts.

Ledig FT. 1992. Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems. Oikos 63: 87-108.

Loveless MD & Hamrick JL. 1989. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. Ann. Rev. Ecol. Syst. 15: 65-95.

Murawski DA, Gunatilleke IAUN & Bawa K. 1994. The effects of selective logging on inbreeding in *Shorea megistophylla* (Dipterocarpaceae) from Sri Lanka. Cons. Biol. 8: 997-1002.

Murawski DA & Hamrick JL. 1992. The mating system of *Cavanillesia platanifolia* under extremes of flowering density: a test of predictions. Biotropica 24: 99-101.,

Neel MC, Ross-Ibarra J & Ellstrand NC. 2001. Implications of mating patterns for conservation of the endangered plant *Eriogonium ovalifolium* var. *vineum* (Polygonaceae). Am. J. Bot. 88: 1214-1222.

Neigel JE. 1997. A comparison of alternative methods for estimating gene flow from genetic markers. Ann. Rev. Ecol. Syst. 28: 105-128.

Pascarella JB. 1997. The mating system of the tropical understory shrub *Ardisia escallonioides* (Myrsinaceae). Am. J. Bot. 84: 456-460.

Quesada M, Stoner KE, Lobo JA., Herrerías Y, Palacios-Guevara C, Munguia-Rosas MA., Salazar C & Guerrero V. 2004. Effects of forest fragmentation on pollinator activity and consequences for plant reproductive success and mating patterns in bat-pollinated Bombacaceous trees. *Biotropica* 36: 000-000.

Quesada M, Stoner KE, Rosas-Guerrero V, Palacios-Guevara C & Lobo JA. 2003. Effects of habitat disruption on the activity of nectarivorous bats (Chiroptera: Phyllostomidae) in a dry tropical forest: implications for the reproductive success of *Ceiba grandiflora*. *Oecologia* 135: 400-406.

Paetkau D, Calvert W, Stirling I & Strobeck C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Mol. Ecol.* 4: 347-354.

Peakall R & Smouse PE. 2005. GenAlEx. 6. Genetic Analysis in Excel. Population genetics software for teaching and research. The Australian National University of Canberra, Australia. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>.

Raijman LEL, van Leeuwen NC, Kersten R, Oostermeijer JGB, den Nijs HCM & Menken SBJ. 1994. Genetic variation and outcrossing rate in relation to population size in *Gentiana pneumonanthe* L. *Conservation Biology* 8(4): 1014-1026.

Ritland K. 2004. MLTR. Multilocus Mating System Program. Version 3.0. <http://genetics.forestry.ubc.ca/ritland/programs>.

Ritland K. 1989. Correlated matings in the partial selfer, *Mimulus guttatus*. *Evolution* 43: 848-859.

Ritland K & Gandres FR. 1985. Variation in the mating system of *Bidens mensziesii* (Asteraceae) in relation to population substructure. *Heredity* 55: 235-244.

Ritland K. 1984. The effective proportion of self-fertilization with consanguineous matings in inbred populations. *Evolution* 43: 848-859.

Ritland K & Jain SK. 1981. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. *Heredity* 47: 35-52.

Slatkin M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-792.

Smouse PE & Sork VL. 2004. Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. *For. Ecol. Manag.* 197: 21-38.

Smouse PE, Dyer RJ, Westfall RD & Sork VL. 2001. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. I. Male gamete heterogeneity among females. *Evolution* 55: 260-271.

Smouse PE, Spielman RS & Park MH. 1982. Multiple-locus allocation of individual groups as a function of the genetic variation within and differences among human populations. *Am. Nat.* 119: 445-463.

Sork VL, Smouse PE, Apsit VJ, Dyer RJ & Westfall RD. 2005. A two-generation analysis of pollen pool genetic structure in flowering dogwood, *Cornus florida* (Cornaceae), in the Missouri Ozarks. *Am. J. Bot.* 92: 262-271.

Sork VL, Nason J, Campbell DR & Fernandez JF. 1999. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. *TREE* 14: 219-224.

Stuber CW, Wendel JF, Goodman & Smith JS. 1988. Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). Technical bulletin 286. North Carolina Agricultural Service. N.C. State University. Raleigh N.C.

Sun M & Ritland K. 1998. Mating system of yellow starthistle (*Centurea solstitialis*), a successful colonizer in North America. *Heredity* 80: 225-232.

van Treuren R, Bulsma R, Ouborg NJ & van Delden W. 1993. The effects of population size and plant density on outcrossing rates in locally endangered *Salvia pratensis*. *Evolution* 47: 1094-1104.

Waser PM & Strobeck C. 1998. Genetic signatures of interpopulation dispersal. *TREE* 13: 43-44.

Wells GP & Young AG. 2002. Effects of seed dispersal on spatial genetic structure in populations of *Rutidosis leptorrhynchoides* with different levels of correlated paternity. *Genet. Res. Camb.* 79: 219-226.

White GM, Boshier DH & Powell W. 2002. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 2038-2042.

Yeh FH & O'Malley DM. 1980. Enzyme variation in natural populations of Douglas-Dir, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco from British Columbia. I. Genetic variation patterns in coastal populations. *Silvae Genet* 29: 83-92.

Young H. 1988. Neighborhood size in a beetle pollinated aroid: effects of low density and asynchronous flowering. *ecologia* 76: 461-466.

Young H. 1990. Pollination and reproductive biology of an understory neotropical Aroid. En KS Bawa & Hadley M (eds) *Reproductive ecology of tropical forest plants*. Man and the biosphere series. Volume 7. UNESCO, Paris.

DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados del presente estudio indican que la fragmentación del bosque tropical ha modificado significativamente algunos aspectos de la dinámica ecológica y evolutiva de las poblaciones de *Dieffenbachia seguine*; al mismo tiempo sugieren que las poblaciones de *D. seguine* son unidades funcionalmente independientes y están fuertemente influenciadas por sus características ambientales particulares.

No se detectaron correlaciones entre las variables ecológicas (p.e., densidad de individuos reproductivos y éxito reproductivo) y genéticas (p.e., t_m , r_p , Φ_{FT}) evaluadas. En la Figura 1 se esquematizan todos los aspectos evaluados y las relaciones entre ellos en cada una de las cuatro poblaciones de *D. seguine*. En resumen, en los fragmentos se detectó un aumento en el esfuerzo reproductivo, tanto en el número de inflorescencias como en el número de flores/inflorescencias (1a, 1b), aumento en la oferta floral diaria (1c), reducción en el éxito reproductivo (1d) asociada a limitación de polen (1e), aumento en la depredación (1f) y disminución en la diversidad genotípica (1g) y en el área efectiva de polinización (1h). Todos estos efectos están asociados a un mayor grado de perturbación en los fragmentos, la cual ha generado un aumento significativo de la propagación clonal, y por lo tanto de individuos reproductivos. En consecuencia, el número de genotipos idénticos es mayor y el área de polinización menor. La baja abundancia de escarabajos polinizadores y el aumento en la tasa de depredación en los fragmentos ha afectado negativamente su éxito reproductivo.

Los parámetros que describen la dinámica ecológica y genética señalan que el movimiento de polen se da principalmente dentro de poblaciones y que la mayoría de los apareamientos se dan entre dos individuos. Sin embargo, la determinación de la paternidad de cada semilla permite medir el movimiento exitoso de polen dentro de las poblaciones de plantas y de esta manera estimar cuáles son los donadores más exitosos entre todos los posibles.

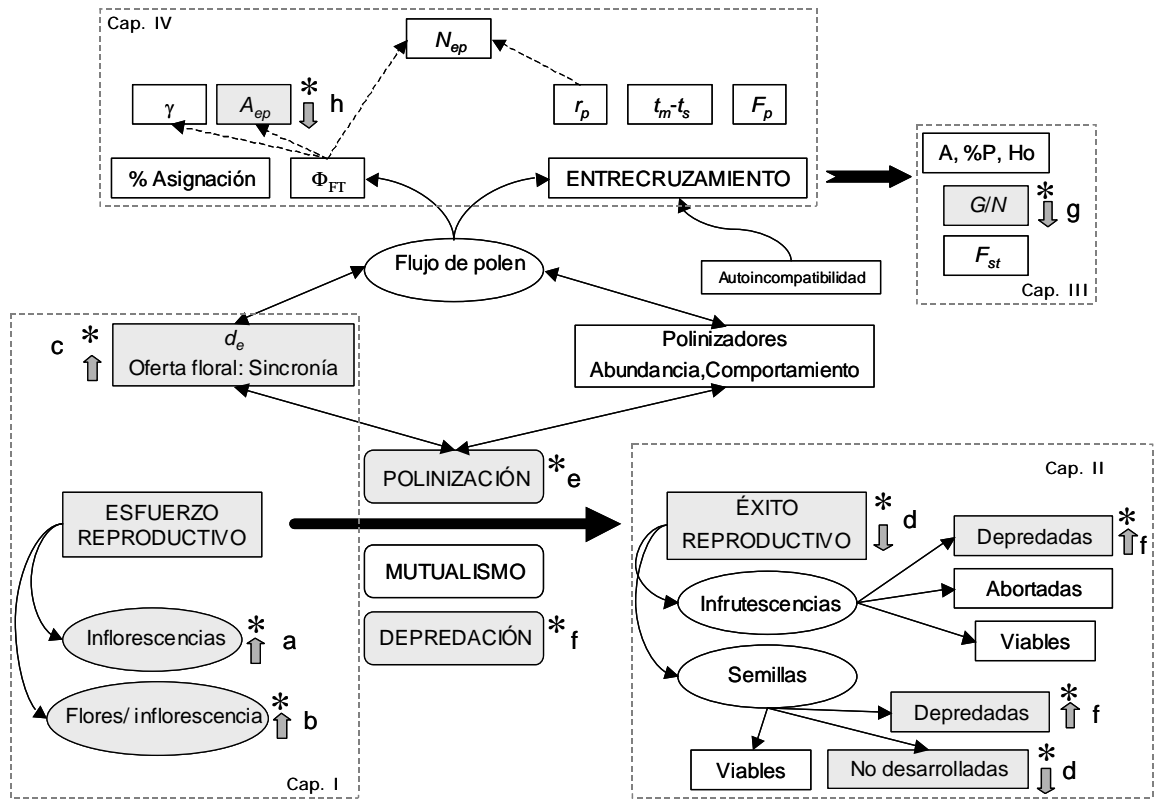


Figura 1. Efectos de la fragmentación del bosque tropical en la biología reproductiva y el flujo de polen en poblaciones de *Dieffenbachia seguine*. En el esquema se señalan las relaciones entre las variables. Los cuadros en líneas punteadas señalan los temas abordados en los cuatro capítulos. Las flechas negras y gruesas señalan los procesos más importantes en la dinámica de las poblaciones, las flechas delgadas indican asociaciones directas y las flechas punteadas indican estimaciones indirectas. Los cuadros grises y los asteriscos señalan los aspectos diferentes entre poblaciones de bosque continuo y fragmentado y la flecha indica la dirección del efecto en los fragmentos.

Para determinar la paternidad se usó el programa *Cervus 2.0* (Marshall *et al.* 1998). La descripción del método se encuentra en el Apéndice 1 y los resultados se encuentran en el Apéndice 2.

Para realizar inferencias acerca del éxito reproductivo masculino, se eligió como el padre de una progenie aquel con mayor valor LOD. Con base en este supuesto, se calculó el éxito reproductivo masculino y su varianza (variación entre machos en el número de parejas) y la distancia promedio de dispersión de polen padre-hijo. La distribución del éxito reproductivo masculino (Fig. 2) muestra que existe gran variación en el número de apareamientos que alcanza cada donador de polen. La mayoría de los machos no se aparean y gran proporción se aparean solo con una hembra; sólo eventualmente alcanza un número superior de apareamientos.

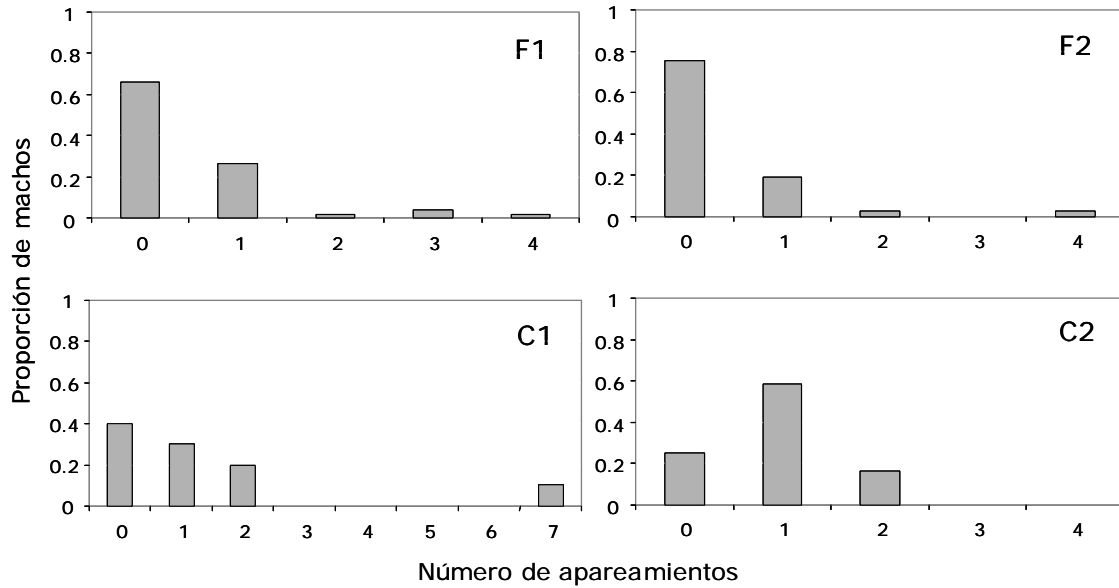


Figura 2. Éxito reproductivo masculino estimado con base en los resultados del análisis de paternidad en cada población. F: fragmentos, C: bosque continuo.

La varianza en el éxito reproductivo masculino fue estimada bajo el supuesto de que el apareamiento es aleatorio entre plantas y es definida como:

$$\sigma^2 = \frac{n}{c} \left(1 - \frac{1}{c} \right)$$

donde n es el número de hembras, c es el número de machos, por lo n/c es la proporción sexual. $1/c$ es la probabilidad de apareamiento de un macho y es inversamente proporcional a su representación en la población de machos (Wade & Pruett-Jones 1990).

La proporción sexual promedio en las poblaciones de *D. seguine* fue de 1.47 hembras por cada macho. La varianza estimada en el número de parejas entre machos tuvo valores entre 1.08 y 1.94 (Tabla 1).

Tabla 1. Número de madres y padres involucradas en el evento reproductivo de Octubre de 2003, proporción sexual (n/c), varianza en el reproductivo masculino (σ^2), distancia promedio padre-progenie (m) y éxito reproductivo total. F: fragmentos, C: bosque continuo.

Población	Número de Madres	Padres asignados	n/c	σ^2	Distancia Padre-Progenie	Éxito reproductivo
F1	24	18	1.33	1.26	15.31	0.424
F2	13	9	1.44	1.28	12.90	0.349
C1	14	6	2.33	1.94	10.76	0.833
C2	11	9	1.22	1.08	16.17	0.869
Promedio	15.5	10.5	1.47	1.39	13.78 ± 2.44 DE	0.618

Para determinar la relación entre la varianza y la proporción sexual y la magnitud real de la varianza se realizaron dos simulaciones (Apéndice 3). Se pueden concluir dos cosas de este experimento. Uno, que la varianza está asociada linealmente con la proporción sexual y que la velocidad del cambio está fuertemente influenciada por la representación de cada macho en la población ($1/c$); entre más grande sea, más rápidamente aumenta la varianza y segundo, que la varianza máxima se alcanza cuando el número de machos es 4 o mayor, porque dada la proporción sexual se satura la función femenina (Apéndice 3). La biología reproductiva de *D. seguine* determina que aunque haya gran disponibilidad de donadores de polen, el apareamiento se realice sólo entre dos individuos. Estos resultados son congruentes con las correlaciones de paternidad y los valores de Φ_{FT} obtenidos.

La varianza cambia muy rápidamente cuando el número de donadores es entre 1 y 3, pero a partir de 4 donadores aumenta lentamente. Los valores de la varianza observada en las poblaciones de *D. seguine* son altos, debido a que son muy cercanos a los valores máximos esperados (asíntota, Apéndice 3, Fig. b). Esto indica que el acervo de genes de la siguiente generación es una muestra de aquellos individuos que lograron aparearse.

La distancia padre-progenie promedio observada para todas las poblaciones fue de $13.78 \text{ m} \pm 2.44 \text{ DE}$ y fue significativamente mayor que el estimado teórico (Cap. IV). No se detectaron diferencias en la distancia padre-progenie entre poblaciones de fragmentos y bosque continuo, lo que sugiere que aunque teóricamente la fragmentación pueda cambiar los patrones de flujo génico por el aumento en densidad, en el evento de flujo génico contemporáneo evaluado no se detectó dicho efecto. En la Figura 3, se observa la distribución espacial de las plantas madre y de las plantas donadoras de polen en el evento reproductivo evaluado para cada población de *D. seguine*. En general, cada planta madre tiene machos en su cuadrante o en un cuadrante adyacente, lo cual es congruente con el radio promedio del área efectiva de polinización que fue de 8.6 m.

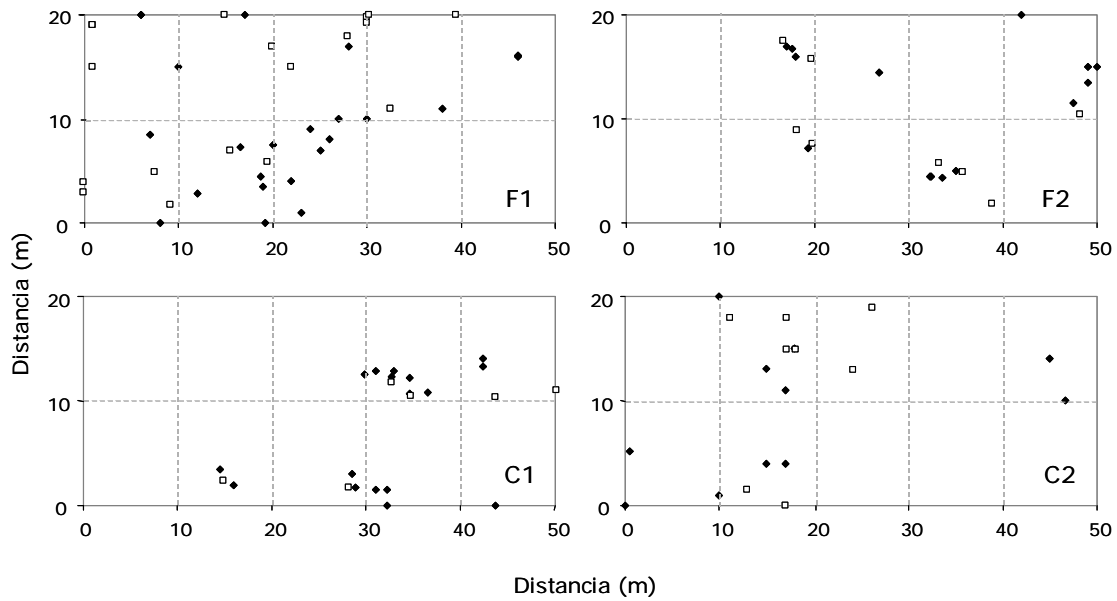


Figura 3. Distribución espacial de las plantas madre y padre en el evento reproductivo evaluado. Los rombos negros representan las plantas madre y los cuadros blancos representan a los donadores de polen.

El éxito reproductivo total, es decir la proporción entre plantas que funcionaron como madres más las plantas que funcionaron como donadoras de polen entre el total de individuos reproductivos (número censado) $[(m + p)/total]$, fue altamente variable entre poblaciones. Varió entre 36.5 % y 97.3 % y fue significativamente menor en poblaciones de fragmentos para este evento reproductivo ($G^2 = 88.03, P < 0.0001$) (Fig. 4), aunque la densidad de individuos reproductivos fue mayor.

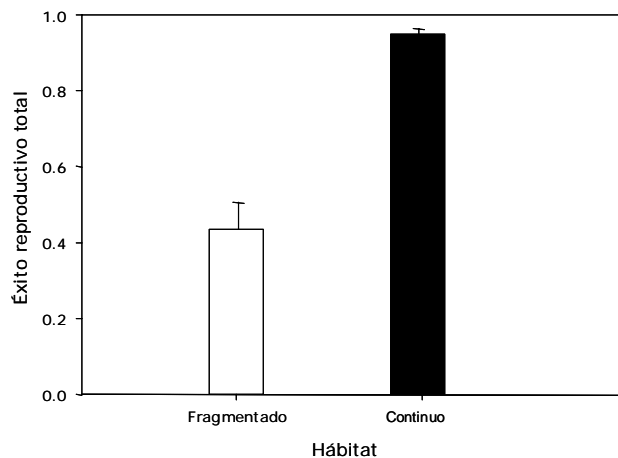


Figura 4. Éxito reproductivo promedio total en hábitat fragmentado y continuo. El éxito reproductivo se estimó como la proporción entre el número de plantas madre más el número de plantas donadoras de polen respecto al total de plantas reproductivas. F: Fragmentos, C: Continuo.

La Figura 5 ilustra la manera en la que se podrían producir una alta tasa de entrecruzamiento y al mismo tiempo una alta tasa de endogamia, como las detectadas en las poblaciones de *D. seguine*. La distribución espacial de los individuos reproductivos en conjunto con la fase de madurez en la que se encuentra (hembra o macho) determinan el tipo de apareamientos (entrecruzamiento o endogamia) posibles en estas poblaciones en el tiempo. Por ejemplo, el primer y segundo día existe una mayor probabilidad de entrecruzamiento, a diferencia del tercer día cuando la probabilidad de apareamientos entre individuos cercanos es mayor, de manera que diariamente cambia la distancia efectiva de polinización.

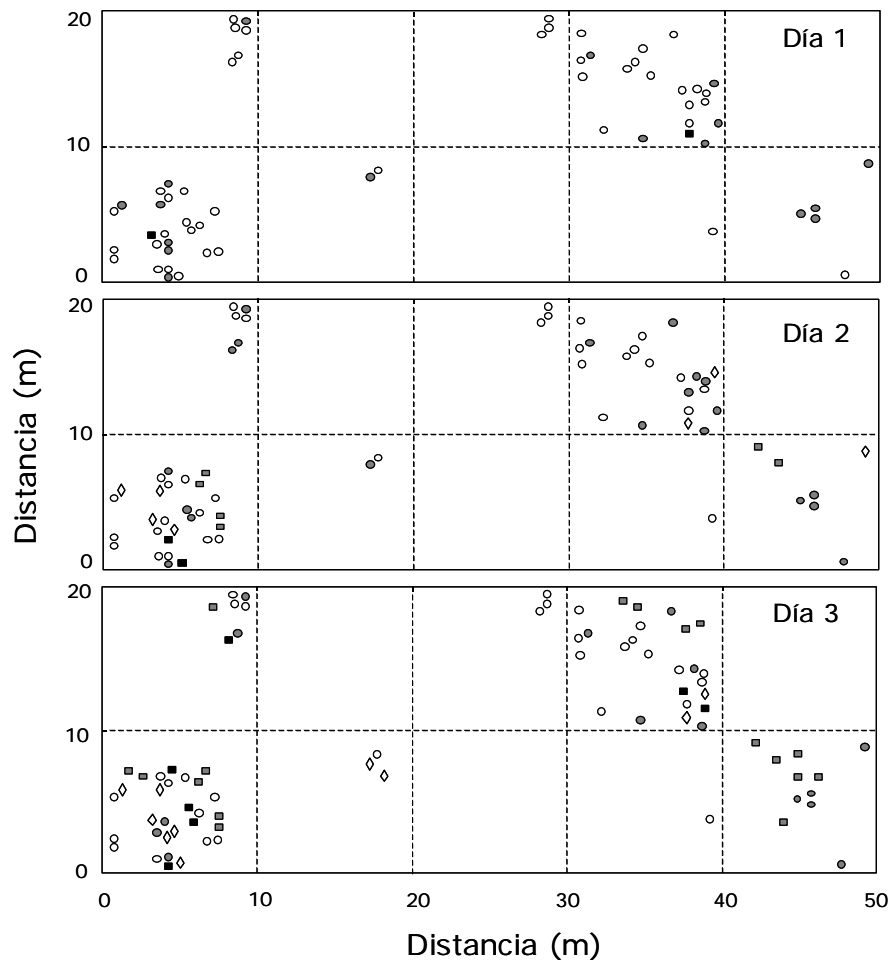


Figura 5. Distribución espacial y temporal de los individuos reproductivos en fase femenina o masculina en la población C2 en el evento reproductivo de 2002. Los círculos blancos representan las inflorescencias cerradas, los círculos grises las inflorescencias en fase femenina, los cuadrados negros las plantas liberando polen y los rombos blancos las inflorescencias recién cerradas (i.e., fecundadas).

De este estudio surgen varias conclusiones:

- 1) Es necesario retener fragmentos grandes (>>40 ha) para garantizar la estabilidad de los procesos que mantienen las poblaciones, de manera que funcionen como fuente de polinizadores e inhiban el aumento de las poblaciones de depredadores.
- 2) En *D. seguine* la fragmentación no ha modificado los patrones de flujo de polen. Sin embargo en los fragmentos existe el potencial para modificar el movimiento del polen a través del aumento en la densidad de individuos reproductivos. La reducción en el área efectiva de polinización en los fragmentos puede conducir al aumento de la endogamia y a la pérdida de diversidad genética con el paso de las generaciones.
- 3) En los fragmentos el reclutamiento de individuos a través del crecimiento vegetativo es mayor que en el bosque continuo, y como resultado la densidad de *D. seguine* ha aumentado drásticamente. Es posible que esto suceda a cambio del deterioro demográfico de otras especies del sotobosque, y constituya un factor que facilite su extinción. Por lo tanto, es importante evaluar el efecto de la fragmentación en la interacción entre especies.
- 4) La alteración de los patrones reproductivos, es decir, la reducción en la producción de semillas en los fragmentos, puede tener un efecto importante en la estabilidad no sólo de las poblaciones de *D. seguine*, sino de especies con características ecológicas similares. En estas poblaciones existe el riesgo del aumento en la endogamia biparental que, aunque típicamente es menos severa que la depresión endogámica causada por autofertilización, puede causar niveles importantes de depresión endogámica (Nason & Ellstrand 1995).
- 5) Aunque la fragmentación afecta la conectividad, es decir, la interacción planta-paisaje, la escala local a la cual se dan los procesos ecológicos en las poblaciones de *D. seguine* amortigua el efecto negativo. Esto puede ser consecuencia de la dinámica de las poblaciones de *D. seguine*, probablemente asociada a la formación de claros, en conjunto con la idea de que cada parche es funcional y ecológicamente independiente. Por lo tanto, las poblaciones en bosque continuo funcionan aisladamente, y las poblaciones en los fragmentos, debido a la mayor disponibilidad de luz y a mayor tasa de perturbación, tienen una dinámica demográfica acelerada, lo que ha resultado en mayores densidades y menores áreas efectivas de polinización.
- 6) La auto-incompatibilidad y la heterogeneidad en la floración de plantas individuales posibilitan tasas altas de entrecruzamiento, manteniendo los altos niveles de variación genética detectados en esta especie.

7) Hemos mostrado que la fragmentación no afecta el flujo de polen en especies herbáceas cuyas poblaciones son dependientes de claros y con polinizadores especialistas. Sin embargo, es necesario estudiar otras especies con polinizadores especialistas para poder generalizar estas tendencias.

9) La variación ambiental y espacial particular de cada población, generada o no por la fragmentación es un factor determinante de la mayoría de las diferencias observadas entre poblaciones. Por lo tanto, es importante mantener una tasa de cambio del paisaje baja, para conservar la estabilidad de la interacción entre el paisaje y las especies.

LITERATURA CITADA

Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB & Pemberton JM. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7: 639-655.

Nason JD & Ellstrand NC. 1995. Lifetime estimated of biparental inbreeding depression in the self-incompatible annual plant *Raphanus sativus*. *Evol.* 49: 307-316.

Wade MJ & Pruett-Jones SG. 1990. Female copying increase the variance in male mating success. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5749-5753.

Apéndice 1. Análisis de Paternidad (Método).

Para determinar la paternidad se usó el programa *Cervus 2.0* (Marshall *et al.* 1998). Se requiere conocer los genotipos multilocus de las plantas madre, de los donadores potenciales de polen y de la progenie asociada para calcular las frecuencias alélicas. *Cervus* realiza una simulación con el objetivo de estimar el poder de resolución de los loci codominantes, dadas sus frecuencias alélicas y calcula los valores Delta críticos que se usarán para evaluar estadísticamente los análisis de paternidad.

Con base en las frecuencias alélicas se construyen un par de genotipos materno y paterno y una serie de genotipos de padre candidatos no relacionados y se produce la progenie. Posteriormente, se compara la probabilidad de paternidad del padre verdadero (medida por su valor LOD) con la probabilidad de paternidad de cada uno de los padres candidatos no relacionados. Para cada hijo se calcula la diferencia entre los valores LOD del padre candidato más probable y el segundo padre más probable (i.e., $LOD_1 - LOD_2$), llamada valor Delta (Δ). Comparando la distribución de los valores Delta de los casos donde los padres candidatos más probables fueron los verdaderos padres con la distribución en la cual los padres más probables fueron individuos no relacionados, se encuentra el valor Delta crítico que puede ser usado para distinguir padres verdaderos de padres candidatos no relacionados a un nivel de confianza predeterminado (p.e. 80%). En el análisis de paternidad con los datos reales, cualquier padre que exceda el valor Delta crítico (calculado en la simulación) se le asigna la paternidad con el nivel de confianza determinado. El programa calcula el valor Delta crítico para un nivel de confianza estricto (p.e. >80%) y relajado (<80%).

Apéndice 2. Análisis de Paternidad (Resultados)

Porcentaje de éxito en la asignación de la paternidad con probabilidad estricta y relajada

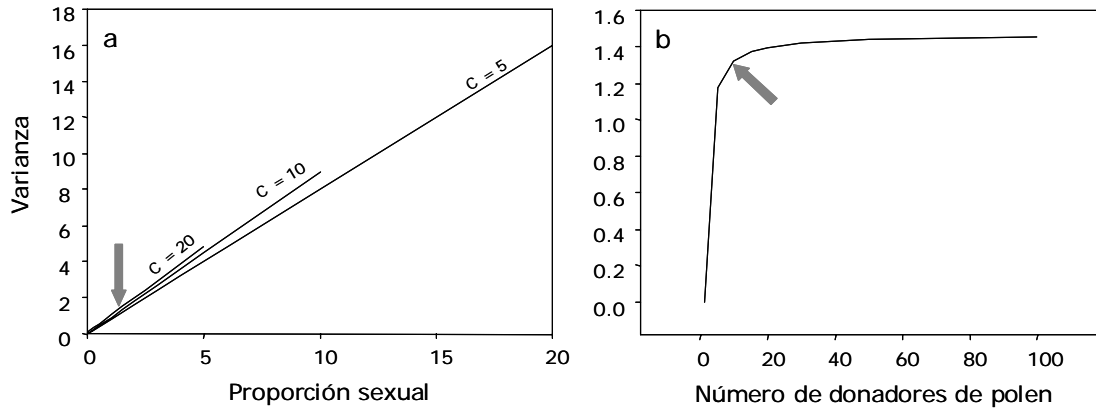
Población	Padres candidatos	Progenie	Tasa de éxito	
			<i>P</i> estricta (80%)	<i>P</i> relajada (50%)
F1	53	204	3	14
F2	37	132	11	48
C1	6	139	47	50
C2	12	56	38	100

La tasa de éxito (% de casos en que el análisis en el que la paternidad fue asignada) varió entre el 3 y el 47 % con un nivel de confianza del 80%. La exactitud en la asignación fue mayor en los casos donde el número de padres candidatos fue menor.

Apéndice 3. Simulaciones para determinar la relación entre la varianza y la proporción sexual.

Se realizaron dos simulaciones:

- Manteniendo el número de machos constante (5, 10 y 20) y cambiando la proporción sexual (Fig. a).
- Manteniendo constante la proporción sexual (n/c promedio observada) y cambiando el número de machos (Fig. b).



Simulaciones del cambio de la varianza en el éxito reproductivo masculino. a) manteniendo el número de machos constante (5, 10 y 20) y cambiando la proporción sexual, y b) manteniendo constante la proporción sexual (n/c promedio observada) y cambiando el número de machos. Las flechas señalan los valores obtenidos en las poblaciones de *D. seguine*.