



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“EFECTOS DE LA FRAGMENTACIÓN EN LA
ESTRUCTURA GENÉTICA DE
Heliconia uxpanapensis (Heliconiaceae)
EN LA SELVA DE LOS TUXTLAS, VERACRUZ.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:
MARÍA DEL PILAR SUÁREZ MONTES

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JUAN ENRIQUE FORNONI AGNELLI

2007





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Hoja de Datos del Jurado

Formato
1.- Datos del alumno Suárez Montes María del Pilar 55 44 00 85 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 402054623
2.- Datos del tutor Dr. Juan Enrique Fornoni Agnelli
3.- Datos del sinodal 1 Dr. Juan Servando Núñez Farfán
4.- Datos del sinodal 2 Dr. Eduardo Morales Guillaumin
5. Datos del sinodal 3 Dra. Erika Aguirre Planter
6.- Datos del sinodal 4 Dr. Fernando Rosas Pacheco
7.- Datos del trabajo escrito Efectos de la fragmentación en la estructura genética de <i>Heliconia uxpanapensis</i> (Heliconiaceae) en la selva de los Tuxtlas, Veracruz. 59 2007

Agradecimientos

La realización de este trabajo fue posible gracias al laboratorio de Genética Ecológica del Instituto de Ecología, UNAM, bajo la dirección del Dr. Juan Núñez Farfán y el Dr. Juan Fornoni Agnelli junto con el financiamiento del proyecto SEMARNAT- CONACYT 2002-01-C01-00355, del cual fui becaria durante la realización del presente trabajo de tesis.

ÍNDICE

Resumen	1
1. INTRODUCCIÓN	
Fragmentación	2
Consecuencias de la fragmentación en la estructura genética	5
2. OBJETIVO	
3. MATERIAL Y MÉTODO	
Marcadores moleculares	9
Descripción de la especie	10
Área de estudio	13
Colecta de campo	13
4. PROTOCOLO	
Extracción de ADN	16
Cuantificación de ADN	16
Selección de marcadores	17
Pruebas de PCR	17
Análisis de datos	19
5. RESULTADOS	
Variación genética	25
Diferenciación genética	27
Distancias genéticas	29
6. DISCUSIÓN	
Variación genética	31
Diferenciación genética	35
Distancias genéticas	36
Implicaciones para la conservación	37
7. CONCLUSIONES	
8. BIBLIOGRAFÍA	39
Apéndice 1	51
Apéndice 2	53
Apéndice 3	55
Apéndice 4	57
Apéndice 5	58

RESUMEN

La fragmentación del hábitat es considerada como uno de los factores contemporáneos de perturbación más importantes que afectan de manera negativa la diversidad biológica en las comunidades naturales. Sus efectos pueden expresarse a través de la erosión de la variabilidad genética o la extinción local de poblaciones o especies. Para examinar el efecto de la fragmentación sobre la variación genética, el presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de la fragmentación sobre la estructura genética de la herbácea perenne (clonal), *Heliconia uxpanapensis* en la región de Los Tuxtlas, Veracruz. Se emplearon 4 primers de marcadores moleculares nucleares (ISSR) para evaluar los efectos de la fragmentación en la diversidad y estructura genética en 3 poblaciones de la selva (sitios no fragmentados cercanos a la Estación de Biología Tropical), y en 4 poblaciones ubicadas en fragmentos de diferentes tamaños (37.4-114.6 ha). Se encontró que 60.2% de un total de 60 loci fueron polimórficos. La heterocigosis esperada promedio para la especie fue de 0.27 ± 0.1 . Se encontraron mayores niveles de variación genética en los fragmentos ($H_e = 0.29 \pm 0.15$; $I = 0.43 \pm 0.19$) que en la selva ($H_e = 0.23 \pm 0.17$; $I = 0.34 \pm 0.23$). La diferenciación genética (θ) global fue de 0.18 ± 0.02 , y no se encontraron diferencias significativas entre poblaciones de selva ($\theta = 0.22 \pm 0.04$) y fragmentos ($\theta = 0.15 \pm 0.02$). El valor promedio de Nm fue de 0.83, en los fragmentos ($Nm = 1.0$) y en la selva continua ($Nm = 0.61$). La distancia genética (Nei) entre pares de poblaciones varió entre 0.0203 y 0.0916. El análisis de varianza molecular reveló que 77.08% de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones. En este estudio no se detectó un efecto negativo de la fragmentación en la distribución de la variación genética poblacional de *H. uxpanapensis*.

1. INTRODUCCIÓN

Fragmentación

La fragmentación es un proceso a nivel de paisaje en el que una gran extensión del hábitat es transformada en parches aislados de vegetación, que se encuentran rodeados por una matriz de tierras agrícolas y otras formas de uso de suelo (Saunders *et al.*, 1991; Turner, 1996; McGarical y Cushman, 2002). En este proceso el tamaño del parche, el grado de aislamiento y el tiempo de inicio de la fragmentación influyen directamente en la biodiversidad. Sus efectos son altamente eclécticos e incluyen cambios en la riqueza, la abundancia de especies, la dinámica del bosque, la estructura trófica comunitaria, y los procesos ecológicos (Turner, 1996; Laurance *et al.*, 2002). Más aún, puede reducir la variación genética de las poblaciones, afectando en un futuro el potencial de las especies para adaptarse a los cambios ambientales e incluso llevarlas a la extinción local. Es por ello que la fragmentación del hábitat es considerada una amenaza para la diversidad biológica en las comunidades naturales (Turner, 1996; Young *et al.*, 1996, Saunders *et al.*, 1991; Debinski y Holt, 1999; Harrison y Bruna, 1999). El aislamiento y la reducción poblacional producto de la fragmentación modifican la demografía y la estructura genética de las poblaciones a través de cambios en las interacciones con los polinizadores, el efecto de borde, la disminución de flujo génico, la deriva génica, y la depresión endogámica (Young *et al.*, 1996; Honnay *et al.*, 2005; Cuartas-Hernández y Núñez-Farfán, 2006).

El efecto de borde es un mecanismo clave en la dinámica de los fragmentos que causa la pérdida de funciones ecológicas. Los efectos físicos del borde se caracterizan por alterar el microclima, incrementando la luz y el viento, aumentando la caída de árboles, la cantidad de lianas, la acumulación de hojarasca, y la reducción de la humedad (Harrison y Bruna, 1999; Laurance *et al.*, 2002 ver referencias). La

fragmentación también puede afectar la actividad de los polinizadores y las interacciones entre plantas e insectos. En consecuencia puede modificar el éxito reproductivo y los sistemas de apareamiento de las plantas (Quesada *et al.*, 2004; Chacoff y Morales, 2004).

Existe controversia con respecto a la influencia de la fragmentación del hábitat en la biodiversidad (Helm *et al.*, 2006). Algunos estudios sugieren que la fragmentación del hábitat es una amenaza para la biodiversidad principalmente porque puede provocar la extinción local de las especies además de reducir la diversidad genética y la adecuación de las especies en poblaciones remanentes (Turner, 1996; Young *et al.*, 1996; Saunders *et al.*, 1991; Harrison y Bruna, 1999; Laurance *et al.*, 2002). Sin embargo, para otros investigadores la fragmentación *per se* (es decir, la partición del hábitat sin pérdida de hábitat) tiene efectos débiles (tanto positivos como negativos) sobre la biodiversidad (Fahrig, 2003).

Las selvas tropicales se caracterizan por tener la mayor diversidad de plantas en el mundo y por presentar las mayores tasas de destrucción (Myers *et al.*, 2000; Dirzo y Raven, 2003). Las actividades antropogénicas han provocado la deforestación, fragmentación y pérdida del hábitat en los ecosistemas tropicales (Schmuki *et al.*, 2006). México es reconocido como una de las regiones megadiversas del mundo (Mittermeier y Mittermeier, 1992; Ramamoorthy *et al.*, 1993). Sin embargo, la selva tropical mexicana ocupa una pequeña proporción del territorio nacional. De acuerdo con el Inventario Nacional Forestal (SAHR 1994) 29% del territorio nacional (56.5 millones de ha), está cubierto por bosques y selvas, de los cuales 26.3 millones de ha (46%) son selvas y bosques tropicales (Barton y Merino, 2005). Las tasas de deforestación de este ecosistema son las más altas en todo el país (2% por año) (Masera *et al.*, 1997). En la

región de los Tuxtlas se ha perdido el 84% de la selva original reduciéndola a fragmentos de diferentes tamaños (Dirzo y Miranda, 1991).

Se ha propuesto que las plantas son sensibles a las consecuencias genéticas de la fragmentación (Young *et al.*, 1996). En particular, se ha planteado que las plantas del sotobosque son sistemas ideales para investigar las consecuencias de la fragmentación, como es el caso de *Heliconia acuminata* (Bruna *et al.*, 2002). Esto se debe a que las herbáceas crecen en el sotobosque en donde la mayoría de los procesos físicos (temperatura del suelo, flujo de viento, humedad y luz) son dramáticamente alterados en los fragmentos, además de ser fáciles de manipular experimentalmente (ver referencias en Bruna *et al.*, 2002). Actualmente hay pocos estudios sobre las consecuencias de la fragmentación en la estructura genética de herbáceas tropicales. En la reserva de los Tuxtlas existe una gran diversidad en la comunidad de herbáceas del sotobosque siendo la forma de crecimiento más representada (30%). La mayoría de las especies son perennes, longevas, y algunas tienen la capacidad de reproducirse clonalmente. En términos de su cobertura las herbáceas monocotiledóneas presentan altos valores de importancia (Ibarra-Manríquez *et al.*, 1997; Honnay *et al.*, 2005). Debido a la importancia de este grupo de plantas y a la creciente fragmentación de su hábitat en los Tuxtlas, se desarrolló este trabajo con el objetivo de evaluar el impacto de la fragmentación en la estructura genética de la herbácea monocotiledónea *Heliconia uxpapanensis*. Para ello, se compararon dos escenarios: uno de ellos es la selva continua (zona con escaso nivel de perturbación) y el otro escenario que corresponde a los fragmentos de los alrededores, inmersos en una matriz de tierras dedicadas a la ganadería.

Consecuencias de la fragmentación en la estructura genética

La estructura genética de las poblaciones se refiere a la distribución de la variación genética dentro y entre las poblaciones (Loveless y Hamrick, 1984). Es usualmente afectada por procesos evolutivos como el sistema de apareamiento, el flujo génico, la selección natural, la mutación y la deriva génica (Loveless y Hamrick, 1984; Hamrick y Godt, 1989). Las predicciones teóricas sobre los efectos genéticos de la fragmentación se basan en que el aislamiento espacial y la reducción del tamaño efectivo de la población pueden provocar la erosión de la variación genética e incrementar la diferenciación genética poblacional aumentando la importancia relativa de la deriva génica, la endogamia y el aislamiento (flujo génico) (Young *et al.*, 1996; Hedrick, 1999; Ledig, 1992; Templeton *et al.*, 1990; van Treuren *et al.*, 1991). A pesar de las posibles implicaciones genéticas de la fragmentación, aún no hay suficiente evidencia empírica de este fenómeno (Keyghobadi *et al.*, 2005). La variación genética puede observarse en al menos dos niveles: Intrapoblacional (Porcentaje de loci polimórficos (P), Heterocigosis (H), riqueza de alelos (A)); e Interpoblacional (G_{st} , Distancias genéticas de Nei (D), medidas de similitud de Jaccard (F), estadísticos F de Wright y G_{st}).

La capacidad de las especies para responder a la selección impuesta por los cambios inducidos por la fragmentación depende de la presencia de variación genética a todos los niveles. Teóricamente, los efectos de la fragmentación pueden provocar la reducción o pérdida de la variación, generando especies sin capacidad adaptativa para responder a las perturbaciones ambientales, lo que finalmente podría llevarlas a la extinción (Frankel *et al.*, 1995, Lowe *et al.*, 2004). Desafortunadamente, existen pocos estudios sobre fragmentación relacionados con la disminución de la heterocigosidad y la adecuación (Young *et al.*, 1996, Honnay *et al.*, 2005). Algunos de estos estudios han confirmado la reducción en la variación genética de las poblaciones pequeñas asociadas

a la fragmentación, como es el caso de las herbáceas *Salvia pratensis*, *Scabiosa columbaria* y *Gentiana pneumonanthe* (van Treuren *et al.*, 1991; Raijmann *et al.*, 1994; Young *et al.*, 1996). En la herbácea *Dieffenbachia seguine*, se ha encontrado una riqueza genotípica significativamente menor en las poblaciones de fragmentos con respecto a la de la selva (Cuartas-Hernandez y Nuñez-Farfán, 2006). Sin embargo, en *Trillium camschatcense* y *Primula elatior* no se ha detectado esta relación (van Rossum *et al.*, 2002; Tomimatsu y Ohara, 2003). Una vez que las poblaciones son fragmentadas la deriva y la endogamia son fuerzas evolutivas determinantes e importantes en la estructura genética (Young *et al.*, 1996). La deriva génica reduce la variabilidad genética produciendo cambios al azar en las frecuencias alélicas mediante la pérdida de alelos, la disminución de heterocigos y en última importancia la fijación de alelos, incrementando así la diferenciación entre las poblaciones (Crow y Kimura, 1970; Ellstrand y Elam, 1993). Sus efectos dependen de la magnitud de la reducción en el tamaño poblacional y del número de generaciones en el que una población permanece pequeña (Young *et al.*, 1996). Como resultado de la deriva se ha reportado la erosión de la variación genética en poblaciones pequeñas y fragmentadas de herbáceas perennes: *Armeria martima* (Weidema *et al.*, 1996), *Salvia pratensis*, *Scabiosa columbaria* (van Treuren *et al.*, 1991), *Gentiana pneumonanthe* (Raijmann *et al.*, 1994), *Arnica montana* (Luijten *et al.*, 2000), así como la diferenciación en poblaciones fragmentadas de *Primula elatior* (van Rossum *et al.*, 2002). La endogamia, es resultado del incremento de apareamiento entre individuos emparentados genéticamente (fecundación no azarosa). No modifica las frecuencias alélicas, pero causa una reorganización de los alelos dentro de los genotipos. En una población con endogamia, aumenta la frecuencia de homocigotos y se reducen los heterocigotos (Hedrick, 1999). Se ha encontrado un déficit de heterocigos en poblaciones pequeñas y fragmentadas de *Viola pubescens*;

atribuido al aumento de la endogamia (Culley y Grubb, 2003). En *Trillium camschatcense*, la heterocigosidad y la endogamia no están relacionadas con el tamaño poblacional, pero algunas de sus poblaciones fragmentadas mostraron coeficientes de endogamia relativamente altos (Tomimatsu y Ohara, 2003).

La fragmentación del hábitat puede aumentar la diferenciación genética entre las poblaciones a través de los efectos de la deriva (Young *et al.*, 1996, Cabe y Alstad, 1994). Sin embargo, el flujo génico entre los fragmentos puede reducir sus efectos evitando la fijación de alelos. Cuando la cantidad de flujo génico entre los fragmentos es alta, la variación genética se homogeniza. Por el contrario, al reducirse el flujo génico entre las poblaciones la deriva genética, la selección, e incluso la mutación pueden producir la diferenciación genética entre los fragmentos (Hedrick, 1999). Es por ello, que la cantidad de heterocigotos dentro de los fragmentos así como su diferenciación genética, dependerá del balance entre la deriva y el flujo génico (Keyghobadi *et al.*, 2005). El flujo génico es suficiente para mantener una baja diferenciación en las poblaciones fragmentadas de *T. camschatcense* (Tomimatsu y Ohara, 2003). Inversamente, el escaso flujo génico en las poblaciones de *Anemone nemorosa* se refleja en una alta diferenciación poblacional (Stehlik y Holderegger, 2000). También se ha sugerido que como consecuencia del reducido flujo génico, las poblaciones fragmentadas de *Dieffenbachia seguine* en la región de los Tuxtlas son propensas a la deriva y a la endogamia (Cuartas, 2002).

2. OBJETIVO

El objetivo general de este trabajo es describir la estructura genética de las poblaciones de *Heliconia uxpanapensis* en zonas de fragmento y selva continua de los Tuxtlas, con la intención de evaluar el impacto de la fragmentación en la estructura genética de la especie.

En particular se plantearon las siguientes preguntas:

(1) ¿Tiene la fragmentación del hábitat un efecto negativo en la variabilidad genética en las poblaciones de *H. uxpanapensis*?

(2) ¿Existe mayor diferenciación poblacional entre las poblaciones fragmentadas que entre las poblaciones de selva continua de *H. uxpanapensis*?

1. MATERIAL Y MÉTODO

Marcadores Moleculares

Se han desarrollado una gran variedad de técnicas y marcadores moleculares para estimar la diversidad genética en las poblaciones. Los marcadores moleculares han contribuido ampliamente en el estudio de la biología evolutiva y la conservación de las poblaciones naturales (Mueller y Wolfenbarger, 1999; Sunnucks, 2000). Tal es el caso de los ISSR (secuencias Inter-Simple Sequence Repeats) (Zietkiewicz *et al.*, 1994) que se utilizan como marcadores moleculares de DNA para detectar polimorfismos dentro de las poblaciones (Bornet *et al.*, 2001) en regiones adyacentes a microsatélite (SSRs). La técnica de los ISSR consiste en la amplificación de secuencias de DNA delimitadas por dos microsatélites. Regularmente la técnica amplifica productos entre 200 a 2000 pb. El uso de estos marcadores semiarbitrarios dominantes no requiere del conocimiento previo de las secuencias de los SSR, y tienen la ventaja de ser altamente reproducibles debido a la longitud del *primer* y a las altas temperaturas de alineación. También presentan altos niveles de polimorfismo y han sido utilizados en diversos estudios para determinar la estructura genética poblacional de varias especies (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2006).

Las amplificaciones de PCR se realizan con un solo primer (16 a 25 pb) compuesto de una secuencia complementaria a una región del SSR o micro, con o sin un extremo anclable (Bornet *et al.*, 2002). Usualmente, los *primers* incluyen de 1 a 4 nucleótidos extra en el extremo 3', que sirven de anclas (por ejemplo R. Y.) permitiendo que se de la amplificación sólo cuando el *primer* se une al extremo 5' del microsatélite. Con ello se asegura que la amplificación siempre se inicie del extremo 5' y que el *primer* se una a la misma región del locus, evitando así el deslizamiento a lo largo de la región (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Hassel, 2003; Eguiarte *et al.*, 2003) (Figura 1).

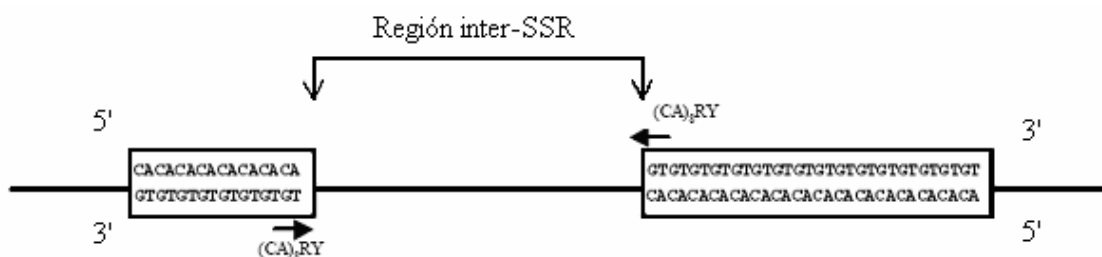


Fig. 1. Representación esquemática de una región ISSR, con el *primer* $(CA)_8RY$

(Zietkiewicz *et al.*, 1994)

Debido a que son marcadores dominantes, se interpreta que cada banda es un locus dialélico. La presencia de la banda indica el genotipo dominante (AA o Aa), mientras que la ausencia de la banda representa el genotipo homocigoto recesivo (aa) (González, 2005). La ausencia de bandas puede deberse a la pérdida de locus por delección, a inserciones en las regiones amplificadas, a la no existencia de un sitio de unión completo debido a una mutación, así como rearrreglos estructurales en los cromosomas (Wolfe y Liston, 1998).

Descripción de la especie

Las heliconias son herbáceas monocotiledóneas que pertenecen al orden de las Zingiberales y comúnmente se les conoce como “platanillo” (Tomlinson, 1969). Se propagan vegetativamente y presentan inflorescencias compuestas por brácteas que rodean a las flores hermafroditas y a los frutos en desarrollo, regularmente estas brácteas contienen agua de lluvia y fluidos que le sirven como defensa a las flores contra las larvas de herbívoros (Seifert y Seifert, 1976; Daniels y Stiles, 1979; Kress, 1983; Bronstein, 1986; Berry y Kress, 1991) (Figura 2). Se ha observado un alto grado de especialización en las interacciones colibrí-planta en algunas especies de heliconias

(Strong, 1977). Además, las heliconias son el huésped de un grupo de coleópteros hispinos de hoja enrollada que habitan y consumen las hojas inmaduras de las heliconias (Strong, 1977; Temeles y Kress, 2003). En la zona de los Tuxtlas, Veracruz, habitan tres especies de heliconias: *Heliconia lathispatha*, *Heliconia schiediana* y *Heliconia uxpanapensis* (Figura3) (Ibarra-Manríquez y Sinaca Colín, 1997). Esta última es el objeto de estudio de este trabajo ya que es la única que habita tanto en zonas de selva como de fragmento. *H. uxpanapensis*, se caracteriza por seguir el borde de los arroyos y preferir los claros. En la selva continua no alcanza alturas muy elevadas a diferencia de las zonas con mayor luz en las que presenta mayor altura y gran cantidad de ramets. Su época de floración comienza aproximadamente en los meses de agosto y septiembre. Las inflorescencias son rojas y tienen entre 12-17 brácteas con flores amarillas y frutos azules, cada fruto contiene dos semillas, y cada inflorescencia puede llegar a producir 200 semillas. Las brácteas también contienen un gran número de larvas de dípteros y otros tipos de invertebrados detritívoros.

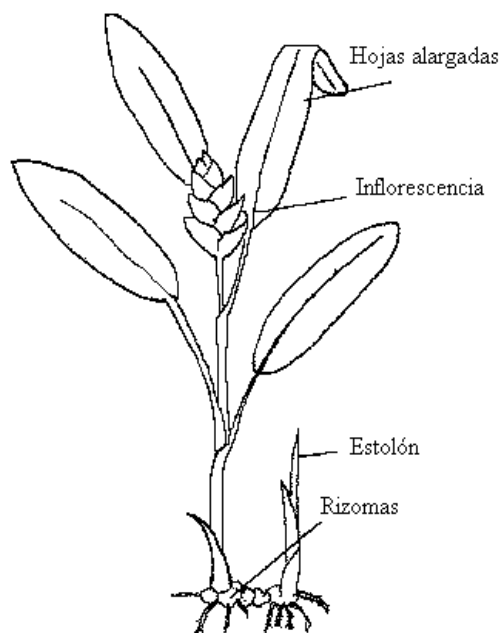


Figura 2. Esquema de una heliconia



Figura 3. *Heliconia uxpanapensis*

Área de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en la Reserva de la Biosfera de los Tuxtlas, ubicada en la planicie costera del Golfo de México, al sur del estado de Veracruz. Esta área, está conformada por una serie de montañas de origen volcánico con dirección NW-SE, localizadas entre los paralelos 18°00' a 18°43' de latitud norte y los meridianos 94°40' a 95°30' de longitud oeste. La región constituye una importante barrera climática que cuenta con cinco variantes del grupo de climas cálido húmedos; la temperatura media anual alcanza valores entre 26-24° C, y se le considera una de las regiones más lluviosas del país, ya que en promedio llueven 4700 mm. Actualmente la selva alta perennifolia es el ecosistema predominante en la mayor parte de la región (Dirzo *et al.*, 1997; Soto y Gama, 1997). Los Tuxtlas es una zona de gran importancia debido a que su biota es extremadamente rica, en ella concurren especies de origen templado (norte) y tropical (centro y sur de América). Forma el límite boreal de la selva húmeda tropical en el continente y en ella se encuentra la Estación de biología tropical de la UNAM, en donde parte de este estudio se llevó a cabo (Dirzo y Miranda, 1991; Dirzo y García, 1992). Las actividades humanas han reducido a la selva original de los Tuxtlas en pequeños fragmentos que se localizan en la punta de los cerros y en las cañadas, los cuales están rodeados por potreros, acahuales y cultivos. Este estudio se llevo a cabo en un área de 70 km² aproximadamente, incluyendo la Estación de Biología.

Colecta de campo

Se colectaron muestras de tejido foliar de 28 a 32 individuos en cuatro fragmentos diferentes (Ruiz Cortines, Dos Amates, Cerro Borrego, Cola de Pescado) y en tres sitios dentro de la selva continua (Estación, Selva II, Darwin) (Figura 4 y Tabla 1). Debido a que las heliconias se reproducen vegetativamente se procuró colectar muestras de plantas que estuviesen separadas por al menos 5 metros de distancia. Después de la colecta el tejido se etiquetó y conservó en nitrógeno líquido para ser almacenado a -80°C .

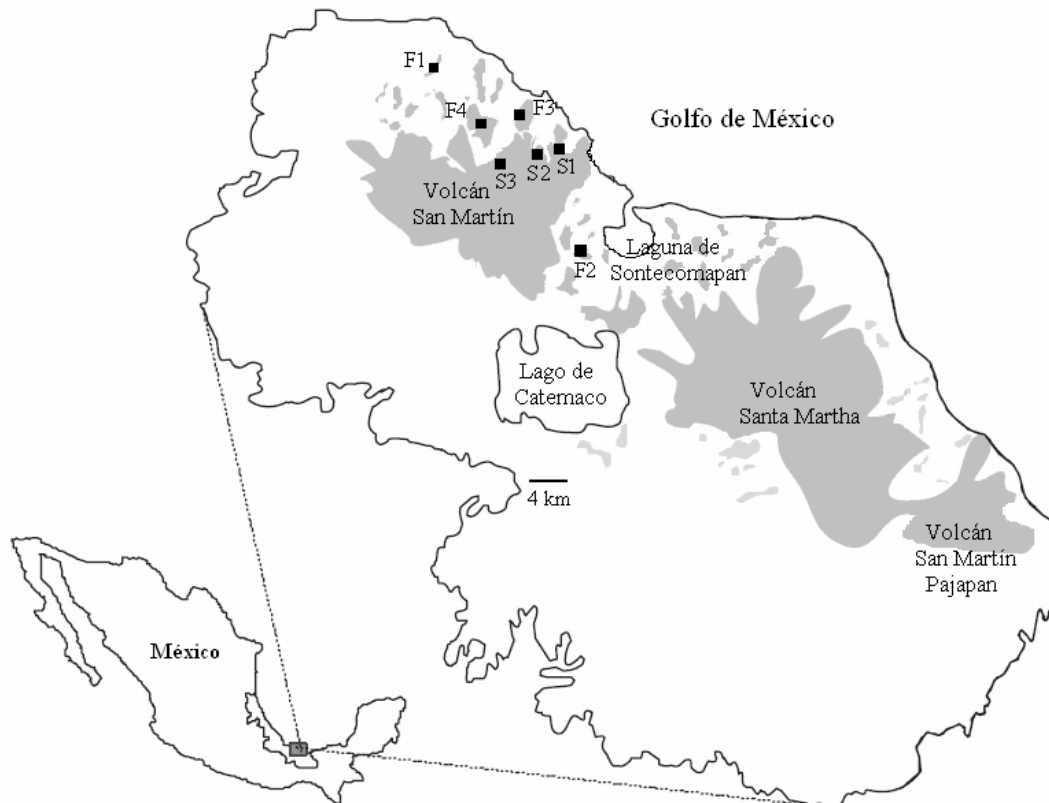


Figura 4. Mapa de la Reserva de la Biosfera de Los Tuxtlas en el estado de Veracruz, México. Las poblaciones de *H. uxpanapensis* colectadas en fragmentos (F) y en selva (S). Se señalan los sitios experimentales: F1 (Cola de Pescado), F2 (Dos Amates), F3 (Cerro Borrego), F4 (Ruiz Cortines), S1 (Darwin), S2 (Estación), S3 (Selva II).

Tabla1. Nombre y hábitat de las poblaciones colectadas de *Heliconia uxpanapensis* en la región de los Tuxtlas, Veracruz.

Hábitat	Población	Coordenadas	No. de muestras	
Fragmentos	F1	Cola de pescado	18° 39.792 N, 95°08.754W	31
	F2	Dos Amates F2	18 °29.129 N, 95°03.620W	32
	F3	Cerro Borrego	18° 37. 739 N,95°05.157W	28
	F4	Ruiz Cortines	18° 36. 730 N,95°05.821W	32
Selva	S1	Darwin	18° 35. 041 N,95°05.270W	30
	S2	Estación	18° 35. 240 N,95°04.620W	30
	S3	Selva II	18° 35. 245 N,95°05.912W	30

2. PROTOCOLO

Extracción de ADN

Se utilizó el protocolo “mini-prep” de CTAB (Doyle y Doyle, 1987; Vázquez Lobo, 1996) en el tejido foliar de cada individuo. En los primeros pasos de este protocolo el detergente catiónico bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB) solubiliza las membranas y promueve la formación de un complejo con los ácidos nucleicos (Milligan, 1992); a su vez comienza la inhibición enzimática por el Tetracetato de Etilendiamina (EDTA). Posteriormente, la solución de cloroformo/octanol y el uso de la centrifuga separan las membranas, las proteínas desnaturalizadas, así como la mayoría de paredes celulares y polisacáridos (Milligan, 1992). Finalmente, se precipita el ADN con isopropanol frío y se asegura la limpieza del ADN a través de lavados con etanol al 70%.

Cuantificación de ADN

Una vez extraído el ADN se realizó una estimación cualitativa de la cantidad de ADN mediante el uso de geles de agarosa al 1%. Posteriormente se estimó la concentración de ADN de cada muestra utilizando un biofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf), que proporciona mediciones directas de la concentración en microgramos/ml calculando la absorbancia del ADN a 260 nm. Se hicieron alícuotas de ADN con concentraciones entre 40-75 µg/ml con las cuales se montaron los sistemas óptimos para los ISSRs. Se garantizó un respaldo con el resto del ADN concentrado y fue refrigerado a -80 °C.

Selección de marcadores ISSRs

Se realizaron pruebas con 10 *primers* de ISSRs (intersimple sequence repeats) con el objeto de evaluar su eficiencia en la amplificación de fragmentos (loci) polimórficos. De éstos, se eligieron cuatro *primers* repetibles con la mejor resolución (853, 846, 808 y 857).

Pruebas de PCR

Para las reacciones de PCR se utilizó un programa de amplificación específico (Tabla 2) en dos termocicladores Thermo PX2 con las condiciones óptimas para cada primer (Tabla 3). Cada reacción contenía una mezcla de los siguientes componentes: buffer amortiguador 1X (Tris-HCL 20 mM, pH 8.4 y KCL 50mM), MgCl₂ (30 mM) (2 µl y 3 µl), dNTPs 0.2mM c/u, Taq 1 u, 1µM de primer (Biogenica), ADN entre 40-75 µg/ ml, en un volumen final de 20 µl. En cada PCR se incluía un control positivo que contenía todos los elementos anteriores exceptuando el ADN.

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2.0 %, se teñían con bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml. Los geles fueron fotografiados con una cámara BioDoc-ITTm Imaging system. Se calculó el tamaño de los fragmentos amplificados (bandas) con el programa DOC-It ® LS Image Analysis Software y el uso de dos marcadores de peso molecular (ladder): 100 pb (Fermentas, Life Science) y Φ x 174RF Hae III fragments (Invitrogene). Posteriormente, se hizo una matriz de presencia ausencia para cada banda o loci amplificado en los individuos analizados.

Tabla 2. Programa de amplificación del PCR

Etapa	Fase	Temperatura °C	Tiempo	# de Ciclos
I	Desnaturalización inicial	94	4 min.	1
II	Desnaturalización	94	30 seg.	32 ciclos
	Alineación	Tabla 3	45 seg	
	Polimerización	72	45 seg.	
III	Extensión	72	7 min.	1
VI	Final	4	∞	----

Tabla 3. Condiciones de amplificación y secuencia de cada *primer*

Primer	T°. de alineación	MgCl₂ [30 mM] μl	Secuencia de cada primer
853	55.0	2	TC TC TC TC TC TC TC TC RT
846	54.5	2	CA CA CA CA CA CA CA CART
857	54.2	3	AG AG AG AG AG AG AG AGTG
808	54.3	2	AG AG AG AG AG AG AG AGC

R = A ó G

Análisis de datos

Variación genética

Dado que los marcadores moleculares (ISSR) son dominantes, se usó la corrección propuesta por Lynch & Milligan (1994) para calcular las frecuencias alélicas $x = q^2$, $p = x^{1/2}$ (donde x es la frecuencia de la ausencia de bandas y $q = 1-p$). El programa TFPGA (Miller, 1997) utiliza esta corrección para calcular las frecuencias alélicas de aquellas bandas con frecuencias menores a $1-(3 / N)$, evitando utilizar loci con altas frecuencias de alélos nulos. Con el objeto de describir la cantidad de variación genética se calculó la heterocigosis esperada H_e (Nei 1978), y el número de loci polimórficos (P) por población con un intervalo de confianza del 95% y el índice de diversidad de Shannon (I). A diferencia de la heterocigosis esperada de Nei, el índice de Shannon no supone que las poblaciones se encuentren en equilibrio de Hardy-Weinberg. La heterocigosis esperada de Nei y el índice de Shannon cuantifican los niveles de diversidad genética de tal forma que las poblaciones con frecuencias alélicas intermedias presenten valores altos de diversidad. Por otro lado, las poblaciones con alta frecuencia alélica para un locus dado presentan baja diversidad (Lowe *et al.*, 2004). Estos datos se calcularon con el programa TFPGA el programa POPGENE. Para identificar diferencias significativas entre las zonas de fragmento y selva se realizó una estimación de los límites de confianza 95% ($p = 0.05$) con el modelo “t” de Student en el programa JMP 5.1.2 .

Prueba de neutralidad

Para comprobar que ninguno de los *primers* estuviera sujeto a selección y verificar que no se repitiera el genotipo de las plantas colectadas, se realizó un análisis de neutralidad de Tajima (1989,1996), con 1000 simulaciones en el programa Arlequín

3.01, que calcula el estadístico D bajo la hipótesis de neutralidad selectiva y el equilibrio poblacional. Los valores D cercanos a cero indican neutralidad.

Diferenciación poblacional

Para describir la estructura genética y la variabilidad entre las poblaciones se estimó el estadístico F_{ST} de Wright's (1951) a través del método de Weir & Cockerham (1984) (TFPGA) que calcula F_{ST} , F_{IS} y F_{IT} con los estimadores θ , f , y F por medio de una ANOVA de las frecuencias genéticas. Es un método estadístico poderoso basado en la estructura jerárquica de la diversidad entre las poblaciones, individuos entre poblaciones y alelos entre individuos. Supone que las poblaciones están en equilibrio mutación-deriva y que comparten el mismo tiempo de divergencia del ancestro; de esta manera los estimadores θ , f , y F son coeficientes de coancestría (Lowe *et al.*, 2004). La f es análoga a la medida de correlación de genes entre los individuos de la población (F_{IS} de Wright, 1951) y teta θ es similar al estadístico F_{ST} , el cual mide la cantidad de diferenciación entre las poblaciones. El programa TFPGA generó intervalos de confianza al 95% para θ con el método de remuestreo en todos los loci utilizando 1000 iteraciones. En conjunto, se hizo un análisis de varianza molecular (AMOVA) que puede considerarse como una extensión del análisis de varianza de Cokerham de las frecuencias génicas (1969). El AMOVA se realizó en el programa Arlequín 3.1 tal como los describe Excoffier *et al.* 2006.

Un AMOVA realiza un análisis jerárquico de la distribución de la variación genética entre las poblaciones y regiones, a través de la estimación de los estadísticos Φ_{ST} , Φ_{CT} y Φ_{SC} que son análogos a los estadísticos F (Cokerham 1969,1973). Cada uno de ellos significa: Φ_{ST} (correlación de las muestras dentro de las poblaciones), Φ_{CT} (correlación de las muestras entre regiones), y Φ_{SC} (correlación de las muestras entre las

poblaciones dentro de las regiones) (Excoffier *et al.*, 1992; Lowe *et al.*, 2004). El análisis se basa en el cálculo de una matriz de distancias genéticas utilizando un sistema métrico de distancias. Los niveles de significancia del AMOVA se obtienen con permutaciones no paramétricas de los datos con 1000 iteraciones. También, es una prueba poderosa ampliamente utilizada en el análisis de marcadores dominantes ya que no supone equilibrio H-W en los loci y no estima las frecuencias alélicas (Lowe *et al.*, 2004).

Distancias genéticas

Se utilizó el programa TFPGA para cuantificar el grado de similitud genética y obtener una matriz de distancias genéticas entre las poblaciones a través del algoritmo (*D*) propuesto por Nei (1972, 1978), el cual estima la distancia genética estándar. Se basa en la probabilidad de escoger dos alelos idénticos al azar en dos poblaciones diferentes, midiendo el número de cambios individuales independientemente de las poblaciones. Las ventajas de esta medida son: que acumula números de sustituciones genéticas por locus, se relaciona linealmente con el tiempo evolutivo cuando la tasa de sustitución genética por unidad de tiempo es constante, y en algunos modelos de migración se relaciona linealmente con las distancias geográficas del área (Lowe *et al.*, 2004). Posteriormente, el programa utilizó la matriz de distancias genéticas de Nei y una matriz de distancias geográficas en km (Bogan 1998-2006) para construir un fenograma con el algoritmo UPGMA (Unweighted pair group of cluster análisis using arithmetic averages).

Flujo génico (Nm)

Se puede inferir la cantidad de flujo génico (Nm) examinando la distribución de la variación genética entre las poblaciones. En este trabajo se estimó (Nm) a partir de (θ , equivalente a F_{ST}) a través de la fórmula propuesta por Wright (1951) para el modelo de islas, con la corrección de Crown y Aoki (1984).

$$\theta = 1 / 4 Nm (k / (k-1))^2 + 1$$

Donde k es el número de poblaciones. Además del flujo génico, la deriva puede cambiar las frecuencias alélicas dentro de las poblaciones dependiendo del tamaño efectivo de la población. En general, se ha planteado que un migrante ($Nm \geq 1$) por generación es suficiente para prevenir los efectos de la deriva (Wright 1943, 1946). Para saber si el patrón de flujo génico sigue un modelo de aislamiento por distancia, es decir si existe una relación entre las distancias geográficas y las distancias genéticas, se realizó una prueba de Mantel en el programa IBDWS Version 3.01 con base en el contraste de la matriz de distancias genéticas y geográficas.

5. RESULTADOS

La amplificación de ADN se llevó a cabo con cuatro *primers* de ISSR repetibles y polimórficos (Figura 5) que produjeron bandas con un rango de peso entre 250 y 2000 pares de bases (Tabla 4). En ninguno de los *primers* se encontró evidencia de selección natural por lo que la variación observada es consistente con la hipótesis de neutralidad (Tabla 5). El número de individuos muestreados fue igual al número de genotipos encontrados luego del análisis de los geles. Por lo tanto, a pesar de que *H. uxpanapensis* forma parches grandes donde es difícil distinguir a los individuos no existe evidencia para suponer que un genotipo fue muestreado más de una vez. Todos los *primers* utilizados presentaron valores similares del Índice de Shannon (I), heterocigosis esperada (H_e) y el porcentaje de loci polimórficos (%P) (Tabla 6).

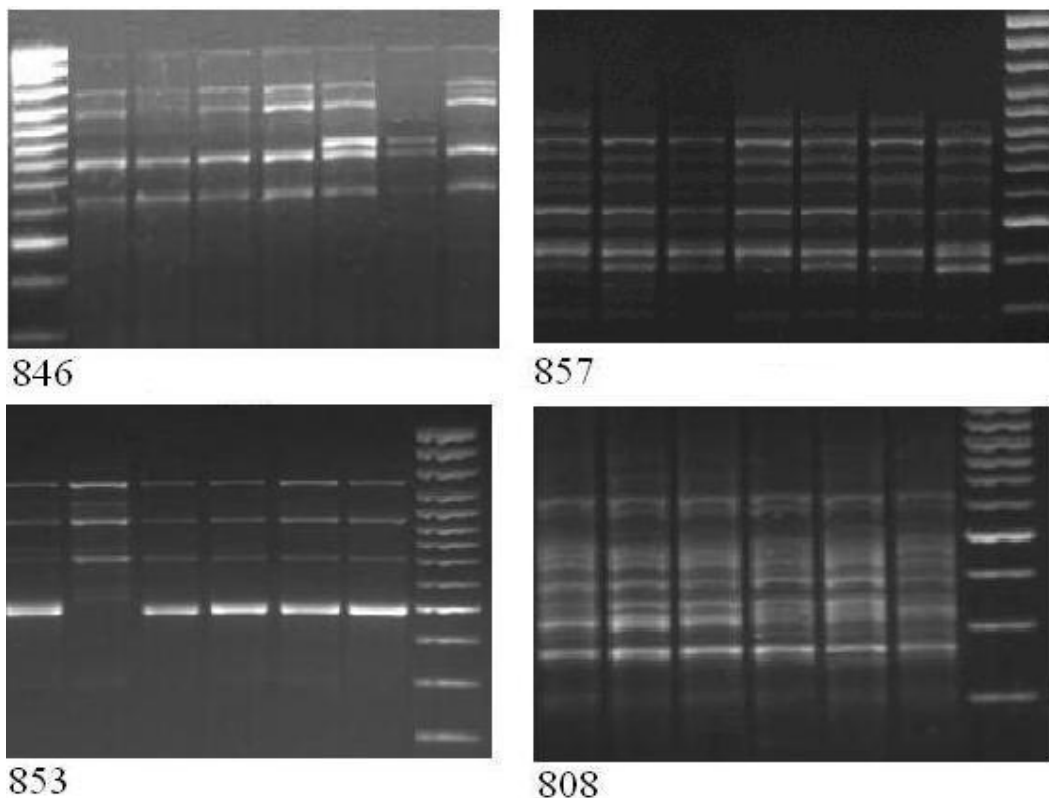


Figura 5. Representación de cada uno de los *primers* utilizados en *H. uxpanapensis* en los Tuxtlas, Veracruz.

Tabla 4. Número de loci y peso de las bandas que amplifica cada uno de los *primers* utilizados en *H. uxpanapensis*.

<i>Primer</i>	No. de loci	Rango de tamaño de loci (pb)
853	8	480 – 2000
846	16	230 – 1900
808	17	200 – 800
857	19	250 – 1140
No. total de loci	60	

Tabla 5. Estadístico *D* de Tajima para cada *primer* empleado en *H. uxpanapensis*.

<i>Primer</i>	D Tajima	P
853	0.147	0.596
857	0.268	0.619
808	0.115	0.583
809	0.157	0.635

Tabla 6. Heterocigosis esperada (H_e), porcentaje de loci polimórficos (%P) e Índice de Shannon (I) (POPGENE 1.32) para cada uno de los cuatro *primers* utilizados. En paréntesis se presenta la desviación estándar de los heterocigos esperados.

<i>Primer</i>	H_e	%P	I
853	0.23 (0.05)	64.2	0.40
846	0.23 (0.05)	66.9	0.40
808	0.19 (0.06)	51.2	0.43
857	0.22 (0.07)	58.6	0.40

Variación genética

El nivel de variación poblacional total de la especie se calculó utilizando el programa TFPGA con la corrección Lynch y Milligan (1994). Se encontró que el promedio a nivel global para el % de loci polimórficos, el índice de Shannon y la heterocigosis esperada fue $\%P = 60.2 \%$, $I = 0.32 \pm 0.26$ y $H_e = 0.22$, respectivamente (Tabla 7).

El valor de diversidad genética estimado a partir de ($\%P$, H_e , I) se calculó utilizando todos los loci de todos los individuos (213) en las zonas de fragmento (123) y selva (90) (Apéndice 5). Se agruparon todos los individuos en una sola población de fragmento y en una sola población de selva debido a que no se encontró evidencia de diferenciación genética entre las poblaciones de ambos sitios (ver Diferenciación genética).

El porcentaje de loci polimórficos fue mayor en la zona de fragmentos (86.6) que en la selva (70). Los resultados indicaron diferencias significativas entre las poblaciones de selva y fragmentos para la heterocigosis esperada ($t = 2.07$, $p = 0.003$, $N = 213$) y el índice de Shannon ($t = 2.21$, $p = 0.028$, $N = 213$) (Tabla 8).

Tabla 7. Heterocigosis esperada (H_e), porcentaje de loci polimórficos (%P, criterio del 95%) y el índice de Shannon (I) por hábitat y población.

Hábitat	Población	N	H_e	% P	I
Fragmento					
	Cola de pescado	31	0.18	46.66	0.27
	Dos Amates	32	0.31	76.66	0.45
	Cerro Borrego	28	0.27	80.00	0.40
	Ruiz Cortines	32	0.22	58.33	0.33
Selva					
	Darwin	30	0.17	50.00	0.25
	Estación	30	0.18	48.33	0.26
	Selva II	30	0.20	61.66	0.30
Global		30.4	0.22 ± 0.05	60.2 ± 13.5	0.32 ± 0.26
Total		213	0.27 ± 0.11	73.7 ± 33.0	0.58 ± 0.04

Tabla 8. Promedio de: heterocigosis esperada (H_e) e índice de Shannon (I) en las poblaciones de selva y fragmentos de *H. uxpanapensis*. DE = Desviación estándar.

	Selva	DE	Fragmentos	DE
H_e	0.23	0.17	0.29	0.15
I	0.34	0.23	0.43	0.19

Diferenciación genética

Para comparar las frecuencias alélicas de todos los loci en todas las poblaciones se utilizó la prueba exacta de Fisher (1954) y se encontró que de los 60 loci utilizados, 44 resultaron significativamente diferentes entre todas las poblaciones (Apéndice 3). Para las poblaciones de fragmento, 34 loci fueron significativamente diferentes y para las poblaciones de la selva continua 20 loci (Prueba de verosimilitud, $\chi^2 = 3.67$, $P = 0.054$) (Apéndice 4).

Se encontró que la diferenciación global entre las poblaciones es del 18% de la variación genética total ($\theta = 0.18$). El estimador del valor promedio de θ (equivalente a F_{ST}) para todas las poblaciones con un intervalo de confianza del 95% (1000 iteraciones) mostró que el valor promedio de θ difiere significativamente de cero. No se encontraron diferencias significativas con respecto a la diferenciación genética entre las poblaciones de fragmento ($\theta = 0.1541$) y selva ($\theta = 0.2292$) (Tabla 9). Utilizando la fórmula de Wright (1951) con la corrección de Crow y Aoki (1984) se calculó la magnitud de flujo génico entre las poblaciones de fragmentos ($Nm = 1.00$), selva ($Nm = 0.61$), y global ($Nm = 0.83$) (Tabla 9).

Para analizar la distribución genética en componentes jerárquicos se utilizó el análisis de varianza molecular (AMOVA) en el programa Arlequín 3.1 (Excoffier *et al.*, 2006). El análisis de varianza molecular (AMOVA) reveló que 77.08 % de la variación genética está dentro de las poblaciones con un valor $\Phi_{ST} = 0.22$ (equivalente a F_{ST}) (Tabla 10). El 0.09 % de la variación se encuentra entre hábitats (selva vs. fragmentos). El resto de la variación genética (22.84 %) se encuentra entre las poblaciones dentro de los hábitats. Las diferencias entre los valores de θ y Φ se deben a los diferentes métodos matemáticos que se utilizan para calcular cada uno de ellos.

Tabla 9. Coeficiente de coancestría θ (F_{ST}) obtenido con el método de remuestreo sobre todos los loci en las poblaciones de fragmento y selva continua de *H. uxpanapensis*.

DE = Desviación estándar

	θ Promedio	DE	IC 95%		Nm
			Inferior	Superior	
Fragmentos	0.15	0.02	0.10	0.21	1.00
Selva	0.22	0.04	0.15	0.31	0.61
Global	0.18	0.02	0.13	0.22	0.83

Tabla 10. Análisis de varianza molecular (AMOVA, Excoffier *et al.* 2006) para evaluar la distribución de la variación genética en *H. uxpanapensis* entre regiones (selva vs fragmentos), entre poblaciones dentro de regiones y dentro de las poblaciones. El hábitat 1 agrupa a las poblaciones pertenecientes a los fragmentos (Cola de pescado, Dos Amates, Borrego y Ruiz Cortines) y el hábitat 2 agrupa a las poblaciones de la selva (Darwin, Estación y Selva II).

Fuente de variación	g. l.	Suma de cuadrados	% de la variación	Estadístico Φ
Entre hábitats	1	53.50	0.09	0.00087*
Entre poblaciones dentro de los hábitats	5	265.06	22.84	0.22856**
Dentro de las poblaciones	206	1090.24	77.08	0.22923**
Total	212	1408.81		

* $p < 0.001$, ** $p < 0.00001$.

Distancias genéticas

El promedio de las distancias genéticas de Nei (1978) entre las poblaciones fue de 0.059 ± 0.017 . La distancia genética más baja ($D = 0.023$) se encontró entre las poblaciones de Ruiz Cortines y la Estación; mientras que el valor más alto ($D = 0.093$) esta entre las poblaciones de Darwin y Dos Amates. No se encontró una relación significativa entre las distancias genéticas y las geográficas (Tabla 9). El fenograma realizado con el algoritmo UPGMA produjo 6 nodos. El 1° incluye a las poblaciones de Ruiz Cortines y Estación, el 2° (las dos anteriores y Darwin), el 3° (Cola de pescado y Borrego), el 4° (Ruiz Cortines, Estación, Darwin, Cola de pescado y Cerro Borrego), el 5° (las cinco anteriores y Selva II), y 6° (todas las anteriores y Dos Amates) (Figura 6). La suposición de aislamiento por distancia fue descartada con la prueba de Mantel (1000 replicaciones, $Z = -21.81$, $r = 0.18$, $p = 0.24$) (Figura 7). Finalmente, el fenograma y la prueba de Mantel sugieren que existe poca relación entre las distancias genéticas y geográficas o entre hábitats.

Tabla 9. Matriz de distancias geográficas y genéticas de Nei (1978) entre las poblaciones de selva y fragmento. Debajo de la diagonal se presentan las distancias genéticas y por encima de la diagonal las distancias geográficas (Km) obtenidas con el programa de Larry Bogan (1998-2006).

Población	Cola de Pescado	Dos amates	Borrego	Ruiz Cortines	Darwin	Estación	Selva II
Cola Pescado		20.5077	7.0209	7.6429	11.7671	11.7159	10.2653
Dos amates	0.0876		21.1115	15.3481	11.1060	11.5272	12.2438
Borrego	0.0446	0.0659		2.69446	5.82171	5.210102	5.65361
Ruiz Cortines	0.0524	0.0662	0.0510		4.2814	4.09045	3.36172
Darwin	0.0534	0.0931	0.0609	0.0448		0.95675	1.97461
Estación	0.0555	0.0675	0.0656	0.0203	0.0614		2.60936
Selva II	0.0650	0.0916	0.0659	0.0892	0.0774	0.0711	

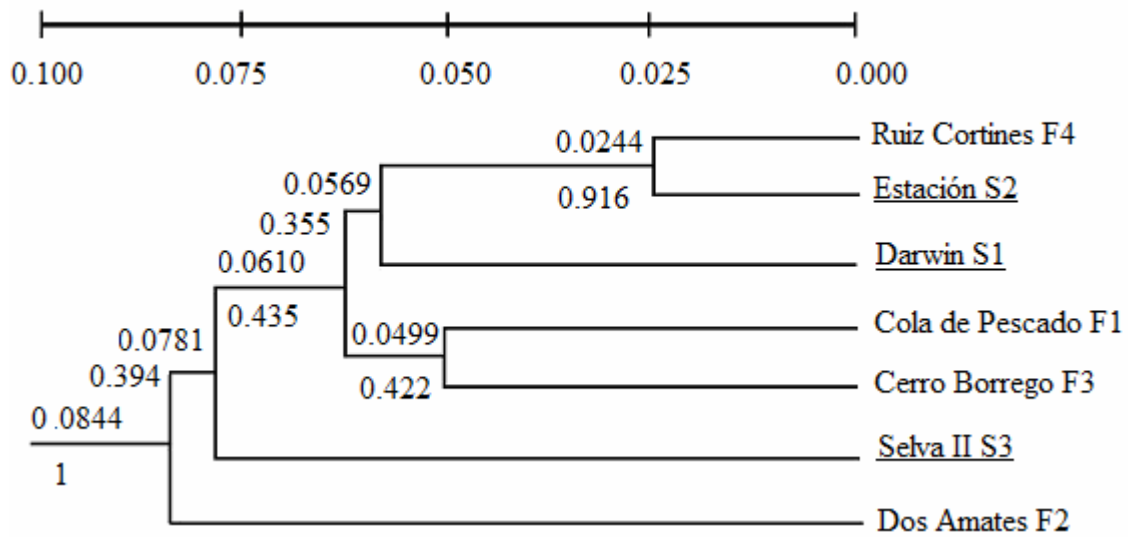


Figura 6. Fenograma UPGMA de las siete poblaciones de *Heliconia uxpanapensis* de fragmento y selva (subrayadas), basado en las distancias genéticas de Nei (1978) se muestran en la parte superior de las ramas y debajo de las ramas el valor de bootstrap (1000 permutaciones) Índice de consistencia = 0.58.

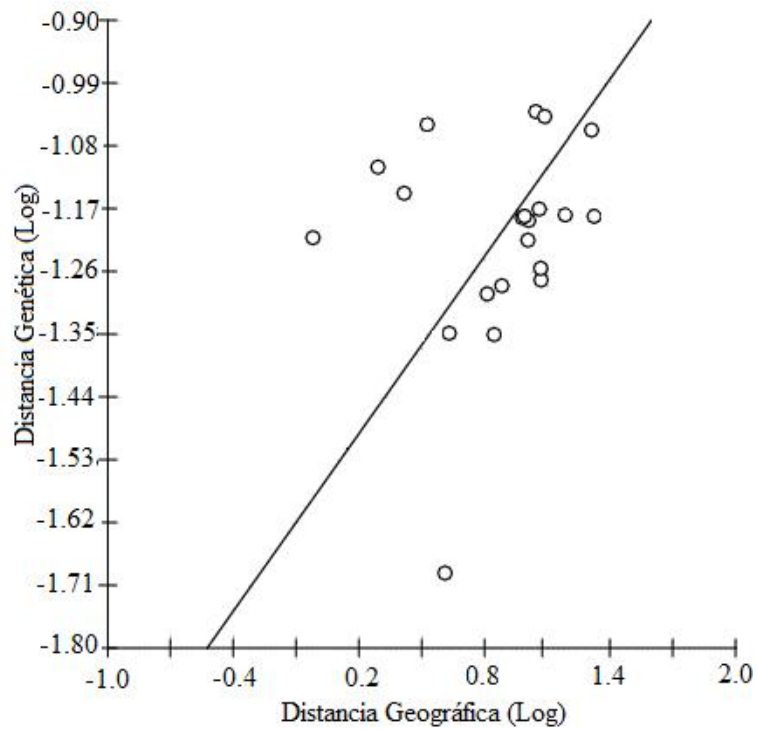


Figura 7. Relación entre las distancias genética y geográfica de las poblaciones de *H. uxpanapensis*. El ajuste lineal no fue significativo ($p = 0.24$).

6. Discusión

En *Heliconia uxpanapensis* no se encontró evidencia de que la fragmentación disminuyó la variación genética dentro de las poblaciones e incremento la diferenciación entre poblaciones. Además, se observó un mayor número de loci cuyas frecuencias difieren entre las poblaciones de fragmentos con respecto a las de selva.

Variación genética

A nivel global las poblaciones de *H. uxpanapensis* presentan niveles de variación genética relativamente altos ($H_e = 0.27$, % P = 73.7) comparables con otras herbáceas tropicales y clonales como *Heliconia bihai* (Meléndez-Ackerman *et al.*, 2005) y *Dieffenbachia seguine* L. (Cuartas-Hernández y Núñez-Farfán, 2006).

En algunas herbáceas de ambientes fragmentados o poblaciones reducidas se ha reportado una disminución en la diversidad genética (Cuadro 1). En otras como *Microseris lanceolata*, *Rutidosia leptorrhynchoides* y *Dieffenbachia seguine* las poblaciones fragmentadas aún conservan altos niveles de variación genética (Prober *et al.*, 1997, Young *et al.*, 1997; Cuartas Hernández y Núñez Farfán, 2006) (Cuadro 1). Sin embargo, .hay pocos estudios que evalúen los efectos de la fragmentación en la estructura genética de herbáceas, principalmente en ecosistemas tropicales. Las poblaciones de plantas clonales pueden mantener cantidades considerables de diversidad genética (Eckert y Barret, 1993; Widen *et al.*, 1994). Algunas herbáceas tropicales aumentan su reproducción clonal en respuesta a altos niveles de luz (Villegas, 2001), uno de los cambios físicos producto de la fragmentación en el sotobosque es el incremento en la incidencia de luz. Por lo anterior, es posible que *H. uxpanapensis* incremente la cantidad de clones y flores en los fragmentos en repuesta al aumento de la incidencia de luz. En *H. uxpanapensis* la reproducción clonal podría permitir la

persistencia poblacional cuando el ciclo reproductivo no pueda ser completado (por ejemplo, la producción de semillas, germinación y reclutamiento) (Eriksson, 1996). En otra especie de heliconia (*H. acuminata*) se han encontrado cambios en los procesos demográficos relacionados con la germinación de semillas en áreas fragmentadas en el Amazonas (Bruna, 1999; Bruna *et al.*, 2002). Sin embargo, actualmente no hay estudios que evalúen el efecto de la clonalidad sobre la variación genética de *H. uxpanapensis*. Contrariamente a lo esperado, en *H. uxpanapensis* las plantas del área fragmentada fragmentada presentaron mayor diversidad genética en comparación con las de la selva continua. Esto puede ser resultado de dos hipótesis principales: 1) Interacción con el polinizador, 2) Tamaño del área muestreada

1) Interacción *H.uxpanapensis*- polinizador (colibríes)

Las heliconias son uno de los recursos más importantes de néctar para los colibríes en la Selva de los Tuxtlas, a su vez los colibríes funcionan como polinizadores primarios de la heliconias porque las visitan frecuentemente, tienen contacto frecuente con las anteras y el estigma mientras se alimentan, y transportan polen en su cuerpo o pico (Linhart, 1973). Se sabe que los patrones de forrajeo de los colibríes pueden tener efectos en la dispersión del polen (Schlising y Turpin 1971) y que puede ser dependiente de la cantidad de néctar y la competencia intro-ínter específica por el recurso (néctar) de los colibríes (Linhart, 1973). Los colibríes regularmente utilizan dos patrones de forrajeo, el primero involucra el comportamiento territorial en el que se alimentan y defienden un área específica; el segundo se caracteriza por la amplia búsqueda de alimento (Linhart, 1973; Toledo, 1975; Temeles *et al.*, 2004; Temeles *et al.*, 2005). En Los Tuxtlas, *Heliconia uxpanapensis* es el recurso alimenticio más importante para los colibríes en virtud de sus características fenológicas, y ecológicas como son: un largo y sostenido

periodo de floración, una abundante producción de flores y una distribución de sus individuos formando grandes clones o parches. En esta área existen varias especies de colibríes que presentan los dos patrones antes descritos (Toledo, 1975). Se ha reportado que algunas especies de colibríes del sotobosque pueden persistir y fomentar el flujo de polen en una matriz de fragmentos (Stouffer y Bierregaard, 1995; Borgella *et al.*, 2001). Dado que los colibríes visitan frecuentemente zonas de disturbio como los fragmentos, los bordes y claros que se caracterizan por tener mayor abundancia de flores a comparación del bosque con menor grado de disturbio (Stiles, 1975; Linhart *et al.*, 1987), es posible que la mayor diversidad genética en el área fragmentada se debe a un mayor flujo de genes entre las poblaciones, también se ha observado que los colibríes pueden viajar cientos de metros entre las flores que visitan (Linhart, 1973; Stiles, 1980; Stouffer y Bierregaard, 1995). Dada la persistencia de los colibríes en áreas fragmentadas es posible que el aumento en la variación genética en los fragmentos se deba a la mayor abundancia de flores y a una baja competencia de los colibríes por el néctar. Estudios futuros deberían examinar la interacción planta-colibrí en ambientes fragmentados para confirmar o descartar la explicación propuesta.

Especie	Efecto de la fragmentación	Índice de diferenciación		No. de poblaciones		Lugar/hábitat	Características de la especie	Marcador molecular	Referencia
		Fragmentos	Continuo	Fragmentos	Continuo				
<i>Salvia pratensis</i>	Reducción de riqueza alélica.	$G_{st} = 0.181^*$		11*		Pastizales, dunas	Perenne, diploide, ginodioica.	Isoenzimas	van Treuren <i>et al.</i> , <i>Heredity</i> . 1991.
<i>Scabiosa columbaria</i>	Reducción de riqueza alélica.	$G_{st} = 0.115^*$		12*		Pastizales, suelos calcáreos	Perenne, diploide, ginodioica.	Isoenzimas	van Treuren <i>et al.</i> , <i>Heredity</i> . 1991.
<i>Gentiana pneumonanthe</i>	Ausencia de alelos raros.	$F_{st} = 0.19^*$		25*		Pastizales	Perenne, vida larga, autoincompatible.	Isoenzimas	Raijmann <i>et al.</i> , <i>Conserv. Biol.</i> 1994.
<i>Armeria martima</i>	Reducción de diversidad genética.	$F_{st} = 0.30^*$	$F_{st} = 0.17^*$	17*		Bosque templado	Perenne, vida larga, autoincompatible.	Isoenzimas	Weidema <i>et al.</i> , <i>Hereditas</i> .1996.
<i>Rutidosia leptorhynchoides</i>	Pérdida de alelos raros.	$F_{st} = 0.17$	----	16	----	Pastizales	Perenne, endémica.	Isoenzimas	Young <i>et al.</i> , <i>Conserv. Biol.</i> 1997.
<i>Microseris lanceolata</i>	Disminución genética gradual	$G_{st} = 0.27$		16	----	Bosques y pastos	Perenne, autoincompatible.	Isoenzimas	Prober <i>et al.</i> , <i>Conserv. Biol.</i> 1997.
<i>Árnica montana</i>	Variación genética baja.	$F_{st} = 0.14^*$		26*		Pastizales	Perenne, vida larga, autoincompatible.	Isoenzimas	Luijten <i>et al.</i> , <i>Conserv. Biol.</i> 2000
<i>Trillium camschatcense</i>	Pérdida de alelos raros.	$F_{st} = 0.13$	----	12	----	Bosque templado	Perenne, vida larga, exogámica, autoincompatible.	Isoenzimas	Tomimatsu y Ohara. <i>Conserv. Biol.</i> 2002.
<i>Swainsona recta</i>	Variación genética baja.	-----		17	----	Pastizales	Perenne, endémica.	Isoenzimas	Buza <i>et al.</i> , <i>Biol. Conserv.</i> 2000.
<i>Primula elatior</i>	Reducción de riqueza alélica.	$G_{st} = 0.02^{**}$		9**		Bosque templado	Perenne, vida larga, exogámica obligada.	Isoenzimas	van Rossum <i>et al.</i> , <i>Conserv. Biol.</i> 2002.
<i>Viola pubescens</i>	Reducción de riqueza alélica.	$\theta = 0.34$		9	----	Bosque templado	Perenne, no clonal, cleistogama.	Isoenzimas	Culley y Grubb, <i>Mol. Ecol.</i> 2003.
<i>Heliconia bihai</i> ****	Reducción de diversidad genética.	$F_{st} = 0.39^b$	$F_{st} = 0.22^b$	4	4	Selva tropical	Perenne, rep. sexual y vegetativa, posiblemente autoincompatible.	AFLP	Meléndez-Ackerman <i>et al.</i> , <i>Int.J.Plant Sci.</i> 2005.
<i>Heliconia uxpanapensis</i>	Mantiene su diversidad (H_e)	$F_{st} = 0.23^a$	$F_{st} = 0.29^a$	4	6	Selva tropical	Perenne, rep. sexual y vegetativa, posiblemente autoincompatible	ISSR	Este estudio
<i>Dieffenbachia seguine</i>	Reducción riqueza genotípica.	$F_{st} = 0.31^a$	$F_{st} = 0.31^a$	6	4	Selva tropical	Perenne, rizomatosa, clonal, cruzamiento mixto.	Isoenzimas	Cuartas Hernández y Núñez Farfán, <i>Evol. Ecol. Research</i> .2006.
<i>Carex davalliana</i>	Reducción de diversidad (A y H_e).	$F_{st} = 0.0^a$	$F_{st} = 0.0^a$	12	6	Ciénegas	Dioica, anemofilia.	Isoenzimas	Hoofman <i>et al.</i> <i>Conserv.Biol</i> 2003.

Cuadro 1. Estudios realizados en herbáceas en ambientes fragmentados

^aResultados no significativos.

^bEl estudio no indica si la diferencias son significativas.

*tamaños poblacionales grandes y pequeños.

**Diferentes tamaños poblacionales, densidad y aislamiento

***No es un estudio de fragmentación

2) Tamaño del área muestreada

Además, es importante considerar que en total el área muestreada de los fragmentos en este estudio es mayor que el área muestreada de la selva. Por lo tanto, es razonable pensar que podría existir una mayor probabilidad de encontrar alelos diferentes en el área fragmentada y así explicar el aumento en la variación genética en los fragmentos. Sin embargo la ausencia de diferenciación poblacional entre las poblaciones de fragmento no apoya esta hipótesis. Estudios posteriores podrían considerar el efecto del área muestreada para minimizar este efecto potencial.

Diferenciación genética

En comparación con la especie *Heliconia bihai* ($F_{ST} = 0.39$) (Meléndez-Ackerman *et al.*, 2005), *Dieffenbachia seguine* L ($F_{ST} = 0.30$) (Cuartas-Hernández y Núñez-Farfán, 2006) y el valor reportado (G_{ST}) en promedio para especies monocotiledóneas autocompatibles ($G_{ST} = 0.41$; Harmick y Godt, 1996), los niveles de diferenciación genética entre las poblaciones de *H. uxpanapensis* son moderados ($\theta = 0.15-0.22$).

Pese al fuerte proceso de deforestación en la región (Dirzo y Miranda, 1991) no se encontraron diferencias significativas en la distribución de la variación genética entre las poblaciones fragmentadas y las de selva continua. Es importante mencionar que la subdivisión en la selva de los Tuxtlas ocurrió recientemente (a partir de los años 60) (Dirzo, 1991) y que posiblemente los altos niveles de variación encontrados dentro de las poblaciones (77.08%) de *H. uxpanapensis* estén relacionados con la estructura original del paisaje. Mientras que la cantidad de variación entre las poblaciones (22.84%) se relacione con la estructura del paisaje actual (Keyghobadi *et al.* 2005). El

mayor número de loci cuya frecuencia difiere entre las poblaciones de fragmento con respecto a las poblaciones de la selva nos sugiere que la fragmentación está cambiando la estructura genética poblacional de *H. uxpanapensis*. Es posible que un incremento en la reproducción clonal, el número de genotipos y una fuerte conexión entre las poblaciones expliquen la ausencia de divergencia genética poblacional entre las poblaciones de fragmento y selva continua de *H. uxpanapensis*.

Distancias genéticas

En comparación con la herbácea tropical *Dieffenbachia seguine* L. ($D = 0.043-0.491$) los estimados de las distancias genéticas entre las poblaciones de *H. uxpanapensis* son pequeños ($D = 0.023-0.093$). Esto quiere decir que las poblaciones comparten la mayoría de los alelos, debido a que los valores de D son próximos a cero, sugiriendo que las poblaciones mantienen un alto grado de conexión genética a través del flujo de polen o semillas. En la zona de los Tuxtlas las heliconias representan uno de los recursos de néctar más importantes para los colibríes (Toledo, 1975) y algunas especies de colibríes pueden persistir y fomentar el flujo de polen en una matriz de fragmentos (Stouffer y Bierregaard, 1995; Borgella *et al.*, 2001). Sin embargo, los valores de flujo génico en las poblaciones de *H. uxpanapensis* son bajos, incluso dentro de la selva. Por lo que es importante considerar que el comportamiento territorial de los polinizadores asociado a la fragmentación también podría afectar (Linhart, 1973). Las semillas de heliconia son dispersadas por aves (Berry y Kress, 1991), y el comportamiento y abundancia de las aves frugívoras responde fuertemente a las modificaciones antropogénicas del paisaje (Restrepo *et al.*, 1999; Ortiz-Pulido *et al.*, 2000). El paisaje fragmentado de los Tuxtlas cuenta con una cantidad importante (60%) de especies frugívoras que contribuyen a la dispersión de las semillas (Estrada *et al.*,

1993). Probablemente la baja diferenciación poblacional de *H. uxpanapensis* se deba en parte a una alta dispersión a través de varias especies frugívoras, como en el caso de la herbácea *Maianthemum bifolium* (Honnay *et al.*, 2005) y en las poblaciones pequeñas de *Trillium camschatcense* (Tomimatsu y Ohara, 2003). El fenograma UPGMA muestra que no existe correlación entre las distancias genéticas y geográficas, ya que las poblaciones no se agrupan en fragmentos y selva, sino de manera independiente. Esto es consistente con los resultados de la prueba de Mantel que descarta un patrón de aislamiento por distancia. En conjunto, la ausencia de aislamiento y la baja diferenciación poblacional sugieren que los sitios fragmentados podrían mantener niveles significativos de flujo de genes con las poblaciones de selva. Sin embargo, los niveles observados de flujo génico se encontraron cercanos al valor umbral para suponer que éste es reducido.

Implicaciones para la conservación

La fragmentación afecta los procesos demográficos y genéticos de las poblaciones remanentes (Tomimatsu y Ohara, 2006). Algunos factores pueden ser indicadores de susceptibilidad de las poblaciones a la erosión genética y la diferenciación, por ejemplo: la reducción en la producción y geminación de semillas, la disminución del reclutamiento, la capacidad de dispersión y la extensión de la reproducción clonal (Bruna, 2003; Honnay *et al.*, 2005; Tomimatsu y Ohara, 2006). Para comprender y evitar las consecuencias negativas de la fragmentación es necesario contar con estudios que relacionen los cambios demográficos y genéticos de las poblaciones fragmentadas. En el caso de *H. uxpanapensis*, es necesario contar con mayor información sobre los procesos demográficos, el sistema de apareamiento, los

mecanismos de dispersión, los polinizadores, la reproducción vegetativa y la progenie, en conjunto con información sobre su estructura genética.

Una de las metas principales de la conservación debería ser mitigar la fragmentación de hábitats naturales, para incrementar el tamaño y conectividad de las poblaciones (Hooftman y Diemer, 2002). El ser una especie común no es una garantía de supervivencia a largo plazo en hábitats fragmentados. Es por ello que los esfuerzos de conservación tienen que incluir a especies ampliamente distribuidas del estrato herbáceo para evitar colapsos poblacionales y la consecuente declinación de la especie (van Rossum *et al.*, 2001). Dado que *H. uxpanapensis* es una planta común en la zona de los Tuxtlas con altos niveles de variación genética, su estudio puede ayudar a diseñar prácticas de conservación y de restauración en sistemas tropicales fragmentados.

7. Conclusiones

- Globalmente las poblaciones de *H. uxpanapensis* tienen niveles de variación genética relativamente altos
- La fragmentación del hábitat no parece haber afectado negativamente la variación genética de las poblaciones de *H. uxpanapensis*.
- No se detectó divergencia genética poblacional entre fragmentos y selva continua.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamson, W.G. 1980. Demography and vegetative reproduction. En: Demography and evolution in plant populations. Botanical Monographs. Volume 15. Solbrig, O.T. (ed). Pág.: 89-106. University of California Press. area in southeast Mexico. *Conservation Biology* **6** (1): 84-90.
- Bacles, C.F.E. Lowe, J. Ennos, R.A. 2004. Genetics effects of chronic habitat fragmentation on tree species: the case of *Sorbus aucuparia* in a deforested Scottish landscape. *Molecular Ecology* (**13**): 573-584
- Barton Bray., D. & Merino Pérez L. 2005. La experiencia de las comunidades forestales en México. SEMARNAT: INE, Consejo Civil Mexicano para la Silvicultura Sostenible, 2004. pp 21-22
- Berry, F. & Kress, W.J. 1991. Heliconia. An identification Guide. *Smithsonian Institution Press*. Washington & London.
- Bogan, L. 1998-2006. Calculator for Distances between Geographical Locations. Cambridge Station, Nova Scotia. www.go.ednet.ns.ca/~larry/bsc/jslatlng.html
- Boles, R.L., Lovett-Doust, J. & Lovett-Doust, L. 1999. Population genetic structure in green dragon (*Arisaema dracontium*, Araceae). *Canadian Journal of Botany* **77**: 1401-1410.
- Borgella R., Snow, A.A., Gavin T.A. 2001. Species richness and pollen loads of hummingbirds using forest fragments in southern Costa Rica. *Biotropica* **33**(1):90-109
- Bornet, B. & Branchard, M. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* **19**: 209-215.
- Bornet, B., Muller C., Paulus, F., Branchard, M. 2002. Highly informative nature of inter simple sequence repeat (ISSR) sequences amplified using tri- and tetra-nucleotide

- primers from DNA of cauliflower *Brassica oleracea* var. *botrytis* L. *Genome* **45**: 890-896.
- Bronstein, J. L. 1986. The origin of bract liquid in a neotropical *Heliconia* species. *Biotropica* **18** (2): 111-114.
- Bruna, E. M. 2003. Are plant populations in fragmented habitats recruitment limited? Tests with an amazonian herb. *Ecology* **84** (4): 932-947.
- Bruna, E.M. 1999. Seed germination in rainforest fragments. *Nature* **402**:139
- Bruna, E.M., Nardo, O., Strauss, S.Y., & Harrison, S. 2002. Experimental assesment of *Heliconia acuminata* growth in a fragmented Amazonian landscape. *Journal of Ecology* **90**: 639-649.
- Buza, L., Young, A. Thrall, P. 2000. Genetic erosion, inbreeding and reduced fitness in fragmented populations of the endangered tetraploid pea *Swainsona recta*. *Biological Conservation* **93**(2): 177-186.
- Cabe, P.R. & Alstad, D. 1994. Interpreting population differentiation in terms of drift and selection. *Evolutionary Ecology* **8**: 489-492.
- Chacoff, N.P. & Morales, J.M. 2004. Efectos de la fragmentación sobre la aborción y depredación de Semillas en el Chaco Serrano. *Biotropica* **36** (1): 109-117.
- Charpentier, A. 2001. Consequences of clonal growth for plant mating. *Evolutionary Ecology* **15**: 521-30.
- Cockerham, C.C. 1973. Analyses of gene frecuencies. *Genetics* **74**: 679-700.
- Cokerham, C.C. 1969. Variance of gene frecuencies. *Evolution* **23**: 72-84.
- Crow, J.F. & Aoki, K. 1984. Group selection for a polygenic behavioral trait: Estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **81**: 6073-6077.

- Crow, J.F. & Kimura, M.A. 1970. *An introduction to population genetics theory*. London: Harper & Row. pp. 591
- Cuartas Hernández S. 2002. Efectos ecológicos y genéticos de la fragmentación en las poblaciones de *D. seguine* (Araceae) en los Tuxtlas, Veracruz, México. Tesis de Maestría, Instituto de Ecología, UNAM. México D. F.
- Cuartas-Hernández, S., Núñez-Farfán, J. 2006. The genetic structure of the tropical understory herb *Dieffenbachia seguine* L. before and after forest fragmentation. *Evolutionary Ecology Research* **8**: 1061-1075.
- Culley, T.M. & Grubb, T.C. 2003. Genetic effects of habitat fragmentation in *Viola pubescens* (Violaceae), a perennial herb with hasmogamous and cleistogamous flowers. *Molecular Ecology* **12**: 2919-2930.
- Daniels, G.S. & Stiles F.G. 1979. The *Heliconia* taxa of Costa Rica. Keys and descriptions. *Brenesia* **15** (Supl.): 1-150.
- Debinski, M.D. & Holt, .R.D. 1999. A Survey and Overview of Habitat Fragmentation Experiments. *Conservation Biology* **14** (2): 342-355.
- Dirzo, R. & Raven, P.P.H. 2003. Global state of biodiversity and loss. *Annu.Rev.Environ.Resour* **28**: 137-167.
- Dirzo, R. 1991. Rescate y restauración ecológica de la selva de Los Tuxtlas. *Ciencia y desarrollo* **17**: 33-46.
- Dirzo, R., & García, M.C. 1992. Rates of Deforestation in Los Tuxtlas, a Neotropical
- Dirzo, R., & Miranda, A.1991. El limite boreal de la selva tropical húmeda en el continente americano contracción de la vegetación y solución de una controversia. *Interciencia* **16**: 240-247.

- Dirzo, R., Gonzáles Soriano, E., Vogt, R. 1997. Introducción general En: Historia natural de los Tuxtlas, Gonzáles Soriano E., Dirzo R, Vogt R. (edS). Universidad nacional Autónoma de México.
- Doyle, J.J. & Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem Bull* **19**: 11-15.
- Eckert, C.G., Barret, S.C.H. 1993. Clonal reproduction and patterns of genotypic diversity in *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *American Journal of Botany* **80**: 1175-1182.
- Eguiarte, L. 1999. Una guía para principiantes a la genética de poblaciones. En: La evolución biológica, Núñez-Farfán J y Eguiarte L. (compiladores) Universidad nacional Autónoma de México.
- Eguiarte, L., Aguirre, X., Rocha, M., Torres, C., Silva, A. y Valera, A. 2003. Diversidad genética de dos especies mezcaleras. Proyecto Conabio V038, Informe final.
- Ellstrand, N.C. & Elam, D.R. 1993. Population genetic of small population size: implication for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24**: 217-242.
- Eriksson, O. 1996. Regional dynamics of plants: a review of evidence for remant, source-sink and metapopulations. *Oikos* **77**: 248-258.
- Estrada, A., Coates-Estrada, R., Meritt, D. Jr., Montierl, S., Curiel, D. 1993. Patterns of frugivore species richness and abundante in forest islands and in agricultural habitats at Los Tuxtlas, Mexico. *Plant Ecology* **1**: 245-257.
- Excoffier L., Smouse, P.E., & Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**:479-491
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. 2006. Arlequin ver 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**: 47-50.

- Fahring, L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecol. Evol. Syst.* **34**: 487-515.
- Fisher, R.A. 1954. *Statistical Methods for research workers.* 12th ed. Oliver and Boyd Edinburgh.
- Frankel, O.H., Brown, A.H.D., & Burdon, J.J. 1995. *The conservation of plant biodiversity.* Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom.
- González González A. 2005. *Biología Reproductiva y Genética de Poblaciones del Agave garciae-mendozae.* Tesis Profesional Biología, Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F.
- Goulson, D. 2000. Why do pollinators visit proportionally fewer flowers in large patches?. *Oikos* **91**: 485-492.
- Hamrick, J.L. & Godt, M.J.W. 1989. Allozyme diversity in plant species. In : Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS, eds. *Plant population genetics, breeding, and genetic resources.* Sunderland, MA: Sinauer Associates, 43-63.
- Hamrick, J.L. & Godt, M.J.W. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* **351**: 1291-1298.
- Harrison, S. & Bruna, E. 1999. Habitat fragmentation and large-scale conservation: what do we know for sure? *Ecography* **22**: 225-232.
- Hart, D.L., & Clark A.G. 1989. *Principles of population genetics.* 2 ed. Sinauer Associates.
- Hassel, K. & Gunnarsson, U. 2003. The use of intersimple sequence repeats (ISSR) in bryophyte populations studies. *Linbergia* **28**: 152-157.
- Hedrick, W. 1999. *Genetics of populations.* USA, Jones and Bartlett Publishers, Inc.
- Helm, A., Hanski, I., Pärtel, M. 2006. Slow response of plant species richness to habitat loss and fragmentation. *Ecology letters* **9**: 72-77.

- Honnay, O., Jacquemyn, H., Bossuyt, B., Hermy M. 2005. Forest fragmentation effects on patch occupancy and population viability of herbaceous plant species. *New Phytologist* **166**: 723-736
- Hooftman, D.A.P & Diemer, M. 2002. Effects of small habitat size and isolation on the population structure of common wetland species. *Plant Biology* **4**:720-728
- Ibarra-Manríquez G. & Sinaca Colín S. 1997. Fanerógamas En: Historia natural de los Tuxtlas, Gonzáles Soriano E., Dirzo R, Vogt R. (eds.). Universidad Nacional Autónoma de México.z
- Ibarra-Manríquez, G., Marínez-Ramos, M., Dirzo, R., Núñez-Farfán, J. 1997. La vegetación En: Historia natural de los Tuxtlas, Gonzáles Soriano E., Dirzo R, Vogt R. (eds.). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Jensen, J.L., Bohonak, A.J., and Kelley, S.T. 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6: 13.v.3.0.3 <http://ibdws.sdsu.edu/>
- Keyghobadi, N., Roland, J., Matter, F.S., Strobeck, C. 2005. Among-and within-patch components of genetic diversity respond at different rates to habitat fragmentation. An empirical demonstration. *Proc.R.Soc.B.* **272**: 553-560.
- Kress, W.J .1983. Self-Incompatibility in Central American *Heliconia*.*Evolution* **37** (4): 735-744.
- Laurance, W.F., Lovejoy, T.E., Vasconcelos, H.L., Bruna, E.M., Didham, R.K., Stouffer, P.C., Gascon, C., Bierregaard, R.O., Laurance, S.G., Sampaio, E. 2002. Ecosystem decay of Amazonian forest fragments: a 22-Year investigation. *Cons Biol.* **16**: 605-618.
- Ledig, F.T. 1992. Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems. *Oikos* **63**: 87-108.
- Li, W., Wang, B., Wang, J. 2006. Lack of genetic variation of an invasive clonal plant *Eichhornia crassipes* in China revealed by RAPD and ISSR markers. *Aquatic Botany* **84**: 176-180.

- Linhart, Y.B. 1973. Ecological and behavioral determinants of pollen dispersal in hummingbird-pollinated Heliconia. *The American Naturalist* **107** (956): 511-523.
- Linhart, Y.B., Feinsinger, R., Beach, J.H., Busby, W.H., Murray, K.G., Pounds, W.Z., Kinsman, S., Guindon, C.A., Kooiman, M. 1987. Disturbance and predictability of flowerings patterns in bird-pollinated cloud forest plants. *Ecology* **68**: 1696-1710.
- Loveless, M.D., & Hamrick, J.L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of the Ecology and Systematics* **15**: 65-95.
- Lowe, A., Harris, S. y Ashton, P. 2004. *Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application*, Blackwell Publishing, United Kingdom, pp 326.
- Luijten, S.H., Dierick A., Oostermeijer J.G.B., Raijmann L.E.L., & den Nijs H.C.M. 2000. Population size, genetic variation, and reproductive success in a rapidly declining, self-incompatible perennial (*Arnica Montana*) in The Netherlands. *Conservation Biology* **14**:1776-1787.
- Lynch, M. & Milligan, B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* **3**: 91-99.
- Masera, O.R., Ordoñez, M.J., & Dirzo, R. 1997. Carbon emissions from Mexican Forests: Current Situation and Long-term Scenarios. *Climatic Change* **35**: 265-295.
- McGrarical, K., & Cushman, A.S. 2002. Comparative evaluation of experimental approaches to the study of habitat fragmentation effects. *Ecological Applications* **12** (2): 335-345.
- Meléndez-Ackerman, E.J., Dperanza, P., Kress, W.J., Rohena L., Toledo, E., Cortés, C., Treece, D., Gitzendanner, M., Soltis., P. & Soltis, D. 2005. Mocrevolutionary process inferred from AFLP and morphological variation in Heliconia Bihai (Heliconiaceae). *International Journal of Plant Sciences* **166**(5): 781-794.

- Miller, M.P. 1997. Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA) 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.
- Milligan, B. 1992. Plant DNA isolation. In: Molecular Genetic Analysis of Populations: a Practical Approach (ed. Hoelzel AR), pp. 59–88. IRL Press, Oxford.
- Mittermeier R. A. & Mittermeier, C. G. 1992. La importancia de la diversidad biológica en México. En Sarukhán, J. & Dirzo, R. (Eds.), *Mexico confronts the Challenges of Biodiversity*. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Morden, C.W. & Loeffler, W. 1999. Fragmentation and genetic differentiation among subpopulations of the endangered Hawaiian mint *Haplostachys haplostachya* (Lamiaceae). *Molecular Ecology* **8** (4): 617-625.
- Mueller, U.G. & Wolfenbarger, L.L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology & Evolution* **14**: 389-394.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A. B, Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation. *Nature* **403**: 853-858.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* **106**: 283-92.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceeding of the National Academy of Science U.S.A.* **70**: 3321–3323.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genetics* **89**: 583-90.
- Ortiz-Pulido, R., Laborde, J., Guevara, S. 2000 Fruit-eating habits of birds in a fragmented landscape: implications for seed dispersal. *Biotropica* **32**:473-488.
- Prober, S.M., Spindler, L.H., Brown, A.H.D. 1998. Conservation of the grassy white box woodlands: Effects of remnant population size on genetic diversity in the allotetraploid herb *Microseris lanceolata*. *Conserv. Biol.* **12**: 1279-1290.

- Quesada, M., Stroner, K. E., Lobo, A. J., Herrerías-Diego, Y., Palacios-Guevara, C., Murguía-Rosas, M.A., Salazar, K.A., & Rosas-Guerrero, V. 2004. Effects of forest fragmentation on pollinator and consequences for plant reproductive success and mating patterns in bat-pollinated bombaceous trees. *Biotropica* **36** (2) 131-138.
- Raijmann, L.E.L., Van Leeuwen, N.C., Kersten, R., Oostermeijer G.B., Den Nijs, H.C.M, Menken, S.B.J. 1994. Genetic variation and outcrossing rate in relation to population size in *Gentiana pneumonanthe* L. *Conserv. Biol.* **8**(4): 1014-1026.
- Ramamoorthy T. P., Bye R., Lot A. & Fa J. (Eds.). 1993. Biological diversity of Mexico, origins and distributions. Oxford University Press, New York.
- Restrepo, C., Gomez, N., Heredia, S. 1999. Anthropogenic edges, treefall gaps, and fruit-fruivore interactions in a neotropical montane forest. *Ecology* **80**:668-685.
- SAS Institute. 2004. JMP. Statistics and Graphics Guide, version 5.1. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina
- Saunders, D.A., Hobbs, R.J., Margules, C.R. 1991. Biological consequences of ecosystem fragmentation: A review. *Conservation Biology* **5**:18-32.
- Schlising, R.A., & Turpin R.A. 1971. Hummingbird dispersal of *Delphinium cardinale* pollen treated with radioactive iodine. *American Journal of Botany* **58**: 401-406.
- Schmuki, C., Vouberger, C., Runciman, D., Maceachern, S., & Sunnucks, P. 2006. When log-dwellers meet loggers: impact of forest fragmentation on two endemic log-dwelling beetles in southeastern Australia. *Molecular Ecology* **15**: 1481-1492.
- Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH)1994. Inventario Nacional Forestal. SARH, México
- Seifert, R.P. & Seifert, F.H. 1976. A community matrix analysis of Heliconia insect communities. *The American Naturalist* **119** (973): 461-483.

- Soto, M. & Gama, L. 1997. Introducción general En: Historia natural de los Tuxtlas, González Soriano E., Dirzo R., Vogt R. (Eds.). Universidad nacional Autónoma de México.
- Stehlik, I. & Holderegger, R. 2000. Spatial genetic structure and clonal diversity of *Anemone nemorosa* in late successional deciduous woodlands of central Europe. *Journal of Ecology* **88** (3):424-435.
- Stiles, F.G. 1975. Ecology, flowering phenology, and hummingbird pollination of some Costa Rican *Heliconia* species. *Ecology* **56**: 285-301.
- Stiles, F.G. 1980. The annual cycle in a tropical wet forest hummingbird community. *Ibis* **122**: 322-343.
- Stouffer, P.C. & Bierregaard, R.O. Jr. 1995. Use of Amazonian forest fragments by understory insectivorous birds. *Ecology* **76**(8):2429-2445.
- Strong, D.R. Jr. 1977. Rolled-Leaf Hispine Beetles (Chrysomeliade) and their Zingiberales Host Plants in Middle America. *Biotropica* **9** (39): 156-169.
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution* **15** (5):199-203.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**: 585-596
- Tajima, F. 1996. The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics* **143**: 1457-1465.
- Temeles, E. J., Goldman, R.S., Kudla, A.U.2005. Foraging and territory economics of sexually dimorphic purple-throated caribs (*Eulampis jugularis*) on three *Heliconia* morphs. *The Auk* **122** (1): 187-204.
- Temeles, E.J., Muir, A.B, Slutsky E.B., Vitousek, M.N. 2004. Effect of food reductions on territorial behavior of purple-throated caribs. *The Condor* **106**:691-695

- Temeless, E.J. & Kress, W.J. 2003. Adaptation in a Plant-Hummingbird Association. *Science* **300**: 630-633.
- Templeton, A.R., Shaw, K., Routman, E., Davis, S.K. 1990. The genetic consequences of habitat fragmentation. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **77** (1): 13-27.
- Toledo, V.M. 1975. La estacionalidad de las flores utilizadas por los Colibríes de una selva tropical húmeda en México. *Biotropica* **7**(1):63-70.
- Tomimatsu, H., Ohara, M. 2003. Genetic diversity and local population structure of fragmented populations of *Trillium camschatcense* (Trilliaceae). *Conservation Biology* **109**: 249-258.
- Tomimatsu, H., Ohara, M. 2006. Evaluating the consequences of habitat fragmentation: a case study in the common forest herb *Trillium camschatcense*. *Population Ecology* **48**: 189-198
- Tomlinson, P.B. 1969. Anatomy of the monocotyledons. III. Commelinales Zingiberales. The Clarendon Press, Oxford. 446 p.
- Turner, I.M. 1996. Species Loss in Fragments of Tropical Rain Forest: A Review of the Evidence. *Journal of Applied Ecology* **33** (2): 200-209.
- Van Rossum, F., Echchgadda, G., Szabadi, I., Triest, L. 2002. Commonness and long-term survival in fragmented habitats: *Primula elatior* as a study case. *Conservation Biology* **10**: 1229-1244.
- Van Treuren, R., Bijlsma, R., van Delden, W., & Ouberg, E. N. 1991. The significance of genetic erosion in the process of extinction. In Genetic differentiation in *Savilla pratensis* and *Scabiosa columbaria* in relation to population size. *Heredity* **66**: 181-189.
- Vázquez Lobo, Y.A. 1996. Filogenia de hongos endositos del género *Pinus* L.: implementación de técnicas moleculares y resultados preliminares. Tesis Licenciatura (Biólogo)-UNAM, Facultad de Ciencias, México D. F.

- Villegas A. C. 2001. Spatial and temporal variability in clonal reproduction of *Achmea magdalenae*, a tropical understory herb. *Biotropica* **33**(1):38-59.
- Weidema, I.R., Siegismund & Philipp M. 1996. Distribution of genetic variation within and among Danish populations of *Armeria maritima*, with special reference to the effects of population size. *Hereditas* **124** (2): 121-129.
- Weir, S. & Cockerham, C. 1984. Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38** (6): 1358-1370.
- Widen, B., Cronberg, N., Widen, M. 1994. Genotypic diversity, molecular markers and spatial distribution of genets in clonal plants, a literature survey. *Folia Geobotanica and Phytotaxonomica* **29**: 245-263.
- Wolfe, A.D. & Liston, A. 1998. Contributions of PCR-Based methods to Plant Systematics and Evolutionary Biology. In Soltis, Soltis & Doyle (Eds.) *Molecular Systematics of Plants II*, 45-82, Kluwer academic Publisher, USA.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* **28**: 114-38.
- Wright, S. 1946. Isolation by distance under diverse system of mating. *Genetics* **28**: 139-56.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenetics* **15**: 323-354.
- Yeh, F., Yang R.C., & Boyle T. Population Genetic Analysis POPGENE Version 1.32.A joint Project of Ag/ For Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta and Center for international Forestry Research.
- Young, A., Boyle, T., Brown, T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution* **11**: 413-418.
- Zietkiewicz, E., Rafalski A. & Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored polymerase chain reactions amplification. *Genomics* **20**: 176-183.

APÉNDICE 1

Extracción de ADN en Plantas. MÉTODO "MINI-PREP"

1. En un mortero moler alrededor de 1g de tejido y moler con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, eliminar el máximo de fibras.
2. Moler el equivalente a una punta de espátula de tejido pulverizado (≈ 0.2 g) junto con 1 ml de buffer CTAB 2X (Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2% y b-Mercaptoetanol 0.3%, que se agrega solamente cuando se va a utilizar el buffer).
3. Recuperar todo en un tubo eppendorf de 1.5 ml y centrifugar a 10 000 rpm durante 8 minutos a 4° C.
4. Eliminar el sobrenadante y resuspender con 600 μ l de CTAB 2X (agitar, hasta despegar el tejido). Incubar en un baño a 60° C durante 10 minutos (agitar los tubos cada 3 min.).
5. Agregar a cada tubo 600 μ l de cloroformo: octanol 24:1, agitar hasta homogeneizar y centrifugar a 7000 rpm durante 12 minutos a 4° C (10 a 15 minutos, hasta que el sobrenadante quede transparente).
6. Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo (con una pipeta de 200 μ l). Este paso es fundamental para obtener un ADN limpio, se debe evitar recuperar material de la difase que se forma.
7. Precipitar el ADN con 2/3 del volumen final (500 μ l aprox.) de isopropanol frío. Dejar reposar de 30 minutos a 12 horas a -20° C.
8. Centrifugar a 9000 rpm durante cinco minutos a 4° C. Eliminar el sobrenadante.
9. Limpiar el pellet agregando 1 ml de etanol al 70% frío y centrifugando a 7000 rpm durante 5 minutos a 4° C.
10. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet con 200 μ l de agua.

Reactivos:

Buffer de extracción CTAB 2X

- Tris-HCl 100 mM pH 8
- NaCl 1.4 M
- EDTA 20 mM pH 8
- CTAB 2%
- b-mercaptoetanol 0.3% (no agregar este reactivo hasta el momento de usar el buffer).

Stocks

Tris-HCl para 1 lt

Tris PM 121.1 gr.

- 121.1 gr de Tris
- 800 ml de agua bidestilada
- Agitar y agregar HCL hasta que el pH = 8 (aforar a 1 lt)

NaCl 5 M

- Disolver 292.2 gr de NaCl en 800 ml de agua, la solución se satura y cuando esto suceda agregar un poco más de agua sin excederse para no cambiar la concentración.
- Ajustar a 1 litro con agua. Esterilizar en autoclave y almacenar en botella de cristal a temperatura ambiental.

EDTA 0.5 M (500 ml)

- 93.05 gr. De EDTA sal sódica
- 400 ml de agua
- Ajustar el pH a 8 con NaOH. Medir el pH mientras se disuelve y llevarlo a pH 8 (así se disuelve por completo)
- Aforar a 500 ml con agua y almacenar en botella de cristal a temperatura ambiente

Para hacer 100 ml de buffer CTAB 2X

- 4 ml de EDTA 0.5M
- 10 ml de Tris-HCL pH 8 1M
- 28 ml de NaCl 5M
- CTAB 2g
- 300 µl de 2-mercaptoetanol (para que esté al 0.3%) justo antes de usar el buffer.

APÉNDICE 2

Frecuencias alélicas por loci para cada una de las poblaciones y primer, p y q

<i>FRAGMENTOS</i>								
Locus	Cola de pescado		Dos amates		Borrego		Ruiz Cortines	
	p	q	p	q	p	q	p	q
1	1.0000	0.0000	0.6818	0.3182	0.6600	0.3400	0.6818	0.3182
2	1.0000	0.0000	0.6365	0.3635	0.6600	0.3400	0.6365	0.3635
3	1.0000	0.0000	0.5595	0.4405	0.7851	0.2149	0.7989	0.2011
4	0.2789	0.7211	0.0476	0.9524	0.1125	0.8875	0.2076	0.7924
5	0.6767	0.3233	0.6365	0.3635	0.7851	0.2149	0.7989	0.2011
6	0.2358	0.7642	0.0000	1.0000	0.0735	0.9265	0.0000	1.0000
7	1.0000	0.0000	0.6365	0.3635	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000
8	0.1562	0.8438	0.0000	1.0000	0.1125	0.8875	0.0978	0.9022
1	0.4860	0.514	0.7989	0.2011	0.4277	0.5723	0.3123	0.6877
2	0.2151	0.7849	0.6365	0.3635	0.4932	0.5068	0.2477	0.7523
3	0.0000	1.0000	0.2901	0.7099	0.1327	0.8673	0.1509	0.8491
4	0.0000	1.0000	0.0808	0.9192	0.0928	0.9072	0.0978	0.9022
5	0.0325	0.9675	0.0476	0.9524	0.4277	0.5723	0.0315	0.9685
6	0.0325	0.9675	0.2076	0.7924	0.0735	0.9265	0.0641	0.9359
7	0.0000	1.0000	0.0476	0.9524	0.0179	0.9821	0.0156	0.9844
8	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0156	0.9844
9	0.5898	0.4102	0.6818	0.3182	0.6600	0.3400	0.5595	0.4405
10	0.7957	0.2043	0.7344	0.2656	0.7851	0.2149	0.7344	0.2656
11	0.4272	0.5728	0.1694	0.8306	0.2185	0.7815	0.4643	0.5357
12	0.1011	0.8989	0.0000	1.0000	0.0928	0.9072	0.0978	0.9022
13	0.7957	0.2043	0.3590	0.6410	0.7163	0.2837	0.6365	0.3635
14	0.1011	0.8989	0.2274	0.7726	0.1533	0.8467	0.3590	0.6410
15	0.6767	0.3233	0.2901	0.7099	1.0000	0.0000	0.5962	0.4038
16	0.0000	1.0000	0.0156	0.9844	0.1745	0.8255	0.2076	0.7924
1	1.0000	0.0000	0.0782	0.9218	1.0000	0.0000	0.0000	1.0000
2	0.0161	0.9839	0.0305	0.9695	0.0735	0.9265	0.0000	1.0000
3	0.7957	0.2043	0.642	0.358	0.4277	0.5723	1.0000	0.0000
4	0.5525	0.4475	0.3227	0.6773	0.1533	0.8467	0.3863	0.6164
5	0.0000	1.0000	0.2196	0.7804	0.1327	0.8673	0.0000	1.0000
6	0.6307	0.3693	0.6866	0.3134	1.0000	0.0000	0.7344	0.2656
7	0.7957	0.2043	0.7385	0.2615	0.7851	0.2149	0.3123	0.6877
8	0.0325	0.9675	0.642	0.358	0.0546	0.9454	0.0000	1.0000
9	0.6307	0.3693	0.6023	0.3977	0.6116	0.3884	0.5257	0.4743
10	1.0000	0.0000	0.6866	0.3134	0.7163	0.2837	1.0000	0.0000
11	0.7302	0.2698	0.4447	0.5553	0.7851	0.2149	0.6365	0.3635
12	1.0000	0.0000	0.7385	0.2615	0.6116	0.3884	0.5257	0.4743
13	0.0000	1.0000	0.2005	0.7995	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
14	0.0000	1.0000	0.2005	0.7995	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
15	0.0000	1.0000	0.2196	0.7804	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
16	0.0000	1.0000	0.0462	0.9538	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
17	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000

1	0.5181	0.4819	0.4941	0.5059	0.3414	0.6586	0.5257	0.4743
2	1.0000	0.0000	0.7344	0.2656	0.7163	0.2837	1.0000	0.0000
3	0.7957	0.2043	0.6818	0.3182	0.6600	0.3400	1.0000	0.0000
4	0.4860	0.5140	0.6818	0.3182	0.4594	0.5406	0.4093	0.5907
5	1.0000	0.0000	0.6818	0.3182	0.7163	0.2837	0.6818	0.3182
6	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.7851	0.2149	0.7989	0.2011
7	0.0325	0.9675	0.2274	0.7726	0.0546	0.9454	0.0315	0.9685
8	0.3014	0.6986	0.5595	0.4405	0.3414	0.6586	0.7989	0.2011
9	0.3488	0.6512	0.4093	0.5907	0.3151	0.6849	0.1151	0.8849
10	1.0000	0.0000	0.6365	0.3635	0.6600	0.3400	1.0000	0.0000
11	0.7302	0.2698	0.7344	0.2656	1.0000	0.0000	0.7989	0.2011
12	0.0000	1.0000	0.0476	0.9524	0.000	1.0000	0.0000	1.0000
13	1.0000	0.0000	0.7344	0.2656	0.7163	0.2837	1.0000	0.0000
14	0.0161	0.9839	0.0156	0.9844	0.0546	0.9454	0.0641	0.9359
15	1.0000	0.0000	0.7344	0.2656	0.7851	0.2149	1.0000	0.0000
16	0.0662	0.9338	0.0641	0.9359	0.0735	0.9265	0.0315	0.9685
17	1.0000	0.0000	0.4941	0.5059	0.7851	0.2149	1.0000	0.0000
18	0.5898	0.4102	0.5962	0.4038	0.2897	0.7103	0.5595	0.4405
19	0.3247	0.6753	0.1328	0.8672	0.0000	1.0000	0.0476	0.9524

<i>SELVA</i>						
Locus	Darwin		Estación		Selva II	
	p	q	p	q	p	q
1	0.7923	0.2077	0.7258	0.2742	0.6715	0.3285
2	0.7923	0.2077	0.7258	0.2742	0.6715	0.3285
3	0.7923	0.2077	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000
4	0.0864	0.9136	0.1233	0.8767	0.1818	0.8182
5	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000
6	0.4178	0.5822	0.0167	0.9833	0.1818	0.8182
7	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000
8	0.0000	1.0000	0.0509	0.9491	0.1233	0.8767
1	0.0864	0.9136	0.3636	0.6364	0.3136	0.6864
2	0.1233	0.8767	0.2023	0.7977	0.0864	0.9136
3	0.0685	0.9315	0.1046	0.8954	0.0509	0.9491
4	0.0864	0.9136	0.0000	1.0000	0.0336	0.9664
5	0.0000	1.0000	0.0336	0.9664	0.0000	1.0000
6	0.0509	0.9491	0.0000	1.0000	0.0167	0.9833
7	0.0336	0.9664	0.0000	1.0000	0.0167	0.9833
8	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
9	0.5452	0.4548	0.7258	0.2742	0.6247	0.3753
10	0.7923	0.2077	0.7923	0.2077	1.0000	0.0000
11	0.3381	0.6619	0.2670	0.7330	0.0509	0.9491
12	0.0864	0.9136	0.1046	0.8954	0.1618	0.8382
13	1.0000	0.0000	0.7258	0.2742	0.6715	0.3285
14	0.1618	0.8382	0.1233	0.8767	0.2670	0.7330
15	0.7258	0.2742	0.5831	0.4169	1.0000	0.0000
16	0.0336	0.9664	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
1	0.2546	0.7454	0.0000	1.0000	0.7258	0.2742
2	0.1476	0.8524	0.0000	1.0000	0.1818	0.8182

3	0.6659	0.3341	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000
4	0.0000	1.0000	0.5452	0.4548	0.7923	0.2077
5	0.7888	0.2112	0.1084	0.8916	0.2023	0.7977
6	1.0000	0.0000	0.6715	0.3285	0.7923	0.2077
7	0.7212	0.2788	0.3381	0.6619	1.0000	0.0000
8	0.0172	0.9828	0.0167	0.9833	0.7923	0.2077
9	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.6715	0.3285
10	0.6659	0.3341	1.0000	0.0000	0.1424	0.8576
11	0.7212	0.2788	0.6715	0.3285	0.7923	0.2077
12	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000
13	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
14	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
15	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
16	0.0527	0.9473	0.0000	1.0000	0.0509	0.9491
17	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.3381	0.6619
1	0.6247	0.3753	0.5831	0.4169	0.1562	0.8438
2	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000
3	1.0000	0.0000	0.7258	0.2742	0.6767	0.3233
4	0.4178	0.5822	0.2670	0.7330	0.3738	0.6262
5	1.0000	0.0000	0.6247	0.3753	0.6767	0.3233
6	1.0000	0.0000	0.7923	0.2077	0.7957	0.2043
7	0.0000	1.0000	0.0336	0.9664	0.0662	0.9338
8	0.7258	0.2742	0.6715	0.3285	0.5898	0.4102
9	0.0336	0.9664	0.0000	1.0000	0.1950	0.8050
10	1.0000	0.0000	0.7923	0.2077	1.0000	0.0000
11	0.7923	0.2077	0.7923	0.2077	1.0000	0.0000
12	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
13	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.6767	0.3233
14	0.0167	0.9833	0.0000	1.0000	0.0161	0.9839
15	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000
16	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.1754	0.8246
17	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.7957	0.2043
18	0.5452	0.4548	0.5831	0.4169	0.7957	0.2043
19	0.2023	0.7977	0.0000	1.0000	0.0492	0.9508

APÉNDICE 3

Frecuencias alélicas por locus para el total de las poblaciones $P < 0.05$

loci	p	q	P de Fisher <0.05
1	0.7747	0.2552	0.5453 ± 0.0152
2	0.7318	0.2682	0.3767 ± 0.0144
3	0.8479	0.1520	0.0055 ± 0.0016
4	0.1483	0.8517	0.0083 ± 0.0030
5	0.8424	0.8517	0.0635 ± 0.0062
6	0.1322	0.8677	0.0000 ± 0.0000
7	0.9480	0.0519	0.0013 ± 0.0006
8	0.0772	0.9227	0.0000 ± 0.0000
9	0.3983	0.6016	0.0000 ± 0.0000
10	0.2863	0.7164	0.0000 ± 0.0000
11	0.1139	0.8860	0.0000 ± 0.0000
12	0.0559	0.9440	0.0125 ± 0.0029
13	0.0818	0.9181	0.0000 ± 0.0000
14	0.0636	0.9363	0.0000 ± 0.0000
15	0.0187	0.9812	0.4792 ± 0.0127
16	0.0022	0.9977	1.0000 ± 0.0000
17	0.6266	0.3733	0.7339 ± 0.0151
18	0.8048	0.1951	0.9506 ± 0.0039
19	0.2764	0.7235	0.0000 ± 0.0000
20	0.0920	0.9079	0.0470 ± 0.0073
21	0.7006	0.2993	0.0000 ± 0.0000
22	0.1989	0.8010	0.0118 ± 0.0023
23	0.6959	0.3040	0.0000 ± 0.0000
24	0.0214	0.9786	0.0000 ± 0.0000
25	0.4369	0.5630	0.0000 ± 0.0000
26	0.0642	0.9357	0.0000 ± 0.0000
27	0.7901	0.2098	0.0000 ± 0.0000
28	0.3931	0.6072	0.0000 ± 0.0000
29	0.2074	0.7926	0.0000 ± 0.0000
30	0.7879	0.2120	0.2159 ± 0.0105
31	0.6701	0.3298	0.0000 ± 0.0000
32	0.2221	0.7778	0.0000 ± 0.0000
33	0.7202	0.2797	0.0000 ± 0.0000
34	0.7445	0.2555	0.0000 ± 0.0000
35	0.6830	0.3169	0.0217 ± 0.0046
36	0.8394	0.1606	0.0007 ± 0.0004
37	0.0286	0.9713	0.0000 ± 0.0000
38	0.0286	0.9713	0.0000 ± 0.0000
39	0.0313	0.9686	0.0000 ± 0.0000
40	0.0214	0.9786	0.0256 ± 0.0038
41	0.0483	0.9517	0.0000 ± 0.0000
42	0.4633	0.5366	0.0000 ± 0.0000
43	0.9215	0.0784	0.0679 ± 0.0038

44	0.7914	0.2085	0.2382 ± 0.0082
45	0.4421	0.5578	0.0129 ± 0.0038
46	0.7687	0.2314	0.1855 ± 0.0126
47	0.8817	0.1182	0.7748 ± 0.0070
48	0.0636	0.9363	0.0000 ± 0.0000
49	0.5697	0.4302	0.0000 ± 0.0001
50	0.2024	0.7975	0.0000 ± 0.0002
51	0.8698	0.1301	0.0084 ± 0.0032
52	0.8354	0.1645	0.8317 ± 0.0068
53	0.0068	0.9932	0.0155 ± 0.0026
54	0.8753	0.1246	0.0697 ± 0.0038
55	0.0261	0.9738	0.2682 ± 0.0104
56	0.9313	0.0686	0.1701 ± 0.0101
57	0.0586	0.9413	0.0001 ± 0.0001
58	0.8678	0.1321	0.0000 ± 0.0000
59	0.5656	0.4344	0.0018 ± 0.0014
60	0.1080	0.8919	0.0000 ± 0.0000

APÉNDICE 4

Prueba de Fisher para todos los loci en las poblaciones de fragmento y selva $P < 0.05$

<i>FRAGMENTO</i>			<i>SELVA</i>		
Locus	P	E S	Locus	P	E S
1	0.2796	0.0107	1	0.3768	0.0064
2	0.1842	0.0062	2	0.3689	0.0074
3	0.0161*	0.0034	3	0.2538	0.0048
4	0.0019*	0.0008	4	0.4090	0.0112
5	0.4357	0.0057	5	1.0000	0.0000
6	0.0000*	0.0000	6	0.0001*	0.0001
7	0.0118*	0.0022	7	1.0000	0.0000
8	0.0025*	0.0008	8	0.0156*	0.0021
9	0.0000*	0.0000	9	0.0126*	0.0025
10	0.0000*	0.0000	10	0.2026	0.0135
11	0.0000*	0.0000	11	0.7443	0.0067
12	0.0445*	0.0032	12	0.0070*	0.0012
13	0.0000*	0.0000	13	0.3378	0.0056
14	0.0147*	0.0032	14	0.0318*	0.0015
15	0.3369	0.0083	15	0.1187	0.0029
16	1.0000	0.0000	16	1.0000	0.0000
17	0.6922	0.0091	17	0.7498	0.0047
18	1.0000	0.0000	18	0.7169	0.0061
19	0.0013*	0.0006	19	0.0006*	0.0003
20	0.0302*	0.0028	20	0.4034	0.0119
21	0.0004*	0.0002	21	0.3607	0.0085
22	0.0023*	0.0006	22	0.1648	0.0130
23	0.0000*	0.0000	23	0.0768	0.0033
24	0.0000*	0.0000	24	0.0575	0.0024
25	0.0000*	0.0000	25	0.0000*	0.0000

26	0.0838	0.0053	26	0.0364*	0.0057
27	0.0035*	0.0009	27	0.0131*	0.0017
28	0.0003*	0.0002	28	0.0000*	0.0000
29	0.0000*	0.0000	29	0.0000*	0.0000
30	0.5874	0.0081	30	0.4468	0.0045
31	0.0000*	0.0000	31	0.0002*	0.0001
32	0.0000*	0.0000	32	0.0000*	0.0000
33	0.7194	0.0103	33	0.0000*	0.0000
34	0.0719	0.0089	34	0.0000*	0.0000
35	0.0727	0.0052	35	0.5679	0.0069
36	0.0028*	0.0013	36	1.0000	0.0000
37	0.0000*	0.0000	37	1.0000	0.0000
38	0.0000*	0.0000	38	1.0000	0.0000
39	0.0000*	0.0000	39	0.0595	0.0030
40	0.0578	0.0047	40	0.0000*	0.0000
41	1.0000	0.0000	41	0.0000*	0.0000
42	0.2649	0.0136	42	1.0000	0.0000
43	0.2601	0.0066	43	0.3601	0.0058
44	0.2068	0.0071	44	0.0958	0.0080
45	0.0915	0.0065	45	0.3238	0.0086
46	0.3415	0.0091	46	1.0000	0.0000
47	0.6109	0.0077	47	0.1845	0.0052
48	0.0010*	0.0006	48	0.6230	0.0087
49	0.0000*	0.0000	49	0.0000*	0.0000
50	0.0036*	0.0015	50	1.0000	0.0000
51	0.0241*	0.0026	51	0.3340	0.0051
52	0.7264	0.0078	52	1.0000	0.0000
53	0.0612	0.0030	53	0.3340	0.0051
54	0.2462	0.0087	54	1.0000	0.0000
55	0.3773	0.0097	55	0.0567	0.0045
56	0.3063	0.0075	56	0.5139	0.0058
57	0.7690	0.0075	57	1.0000	0.0000
58	0.0001*	0.0001	58	0.0000*	0.0000
59	0.0057*	0.0014	59	0.5817	0.0058
60	0.0000*	0.0000	60	0.0000*	0.0000

APÉNDICE 5

Heterocigosis esperada en fragmentos y selva por locus

Locus	Selva	Fragmentos
1	0.391	0.3979
2	0.3901	0.4235
3	0.2128	0.3852
4	0.228	0.268
5	0	0.3995
6	0.3092	0.1334

7	0	0.304
8	0.1082	0.1631
9	0.3735	0.5013
10	0.2375	0.4703
11	0.1392	0.2411
12	0.0764	0.1258
13	0.0222	0.1993
14	0.0441	0.1704
15	0.0331	0.0403
16	0	0.0081
17	0.468	0.4702
18	0.2686	0.3505
19	0.3343	0.4315
20	0.2089	0.1334
21	0.3683	0.4841
22	0.3006	0.3312
23	0.4086	0.4956
24	0.0222	0.1704
25	0.3882	0.427
26	0.1894	0.0562
27	0.3098	0.4507
28	0.4668	0.4523
29	0.4157	0.1557
30	0.3421	0.3995
31	0.4869	0.48
32	0.4284	0.2547
33	0.4836	0.4841
34	0.5011	0.3291
35	0.3901	0.4702
36	0	0.4426
37	0	0.0953
38	0	0.0953
39	0	0.103
40	0.0657	0.0243
41	0.1795	0
42	0.4903	0.5006
43	0	0.304
44	0.3683	0.369
45	0.462	0.502
46	0.4086	0.3852
47	0.2686	0.2358
48	0.0657	0.1557
49	0.4494	0.5006
50	0.1392	0.4129
51	0.2128	0.369
52	0.2686	0.3291
53	0	0.0243
54	0.3098	0.304
55	0.0222	0.0719
56	0	0.2737

57	0.1082	0.1106
58	0.2128	0.3995
59	0.468	0.502
60	0.1494	0.2134
