



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LA FRAGMENTACIÓN EN LA ESTRUCTURA
GENÉTICA Y EN CARACTERÍSTICAS DE HISTORIA
DE VIDA DE *Sideroxylon portoricense* (Sapotaceae)
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:

LILIBETH TOLEDO CHELALA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JUAN NÚÑEZ FARFAN

2009



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.

<p>1. Datos del alumno. Apellido paterno: Apellido materno: Nombre (s): Teléfono: Universidad: Facultad o escuela: Carrera: No. de cuenta:</p>	<p>1. Datos del alumno. Toledo Chelala Lilibeth 53 91 79 27 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 098337477</p>
<p>2. Datos del asesor Grado Apellido paterno: Apellido materno Nombre (s):</p>	<p>Dr Núñez Farfán Juan Servando</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Grado Apellido paterno: Apellido materno Nombre (s):</p>	<p>Dr Eguiarte Fruns Luís Enrique</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Grado Apellido paterno: Apellido materno Nombre (s):</p>	<p>Dr Piñero Dalmau Daniel Ignacio</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Grado Apellido paterno: Apellido materno Nombre (s):</p>	<p>Dra Aguirre Planter Erika</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Grado Apellido paterno: Apellido materno Nombre (s):</p>	<p>Dr Morales Eduardo Guillaumin</p>
<p>7. Datos de la tesis. Título: No. de páginas: Año:</p>	<p>Efecto de la fragmentación en la estructura genética y características de historia de vida de <i>Sideroxylon portoricense</i> (Sapotaceae) en la selva de los Tuxtlas, Veracruz. 105 p. 2009</p>

A Cuki.

*La libertad, es uno de los más preciosos
dones que a los hombres dieron los cielos;
con ella no pueden igualarse los tesoros
que encierran la tierra y el mar:
por la libertad, así como por la honra,
se puede y debe aventurar la vida.*

Cervantes Saavedra.

La realización de este trabajo fue posible gracias al laboratorio de Genética Ecológica y Evolución, bajo la dirección del Dr. Juan Núñez Farfán, del Instituto de Ecología, UNAM y al financiamiento del proyecto SEMARNAT- CONACYT 2002- 01- C01- 00355, del cual fui becaria durante la realización del mismo. El presente trabajo forma parte del proyecto de PAPIIT-DGAPA IN-224908.

ÍNDICE

Resumen	5
1. INTRODUCCIÓN	6
2. OBJETIVO	
Objetivos particulares	12
Predicciones	13
3. MATERIAL Y MÉTODOS	
Sitio de estudio	14
Descripción de la especie	16
Caracteres de historia de vida	19
Genética de poblaciones	23
Análisis de datos	32
4. RESULTADOS	
Caracteres de historia de vida	44
Genética de poblaciones	63
5. DISCUSIÓN	
Caracteres de historia de vida	73
Genética de poblaciones	78
6. CONCLUSIONES	82
7. APÉNDICES	
Apéndice 1	84
Apéndice 2	87
Apéndice 3	89
Apéndice 4	91
Apéndice 5	95
Apéndice 6	97
8. LITERATURA	99

RESUMEN

Uno de los procesos de mayor impacto sobre la pérdida de la biodiversidad y la reducción del tamaño de las poblaciones, es la fragmentación del hábitat; este proceso influye en el cambio de las condiciones ambientales y las interacciones bióticas, afectando la supervivencia de las especies y el establecimiento, así como otros eventos.

En este estudio se evaluó el efecto de la fragmentación en dos aspectos de la biología de *Sideroxylon portoricense*: 1) El efecto de la masa de la semilla como variable determinante en la supervivencia y establecimiento de la plántula en dos contextos: la selva no perturbada y en fragmentos de la misma; 2) El efecto de la fragmentación del hábitat sobre la estructura genética de la especie.

Se pesaron y germinaron semillas de diez familias de *Sideroxylon portoricense* (Sapotaceae), un árbol del dosel superior, y se transplantaron a zonas continuas y fragmentadas. Se realizaron censos periódicos registrando: supervivencia, tasa de crecimiento, área foliar, número de hojas y daño por herbívoros y patógenos. El análisis de la estructura genética se realizó con el uso de marcadores moleculares dominantes ISSR's.

Los datos de campo indican que el porcentaje de germinación fue de 16.65%. La masa promedio de la semilla para la especie es de 0.917 g, teniendo un efecto positivo en la supervivencia de plántulas en la selva. El porcentaje de supervivencia de plántulas en fragmentos (39.94 %), fue significativamente mayor que en las zonas de selva (13.42%). La producción de hojas y el ataque por patógenos y herbívoros también es mayor en zonas fragmentadas.

La heterocigosis esperada (H_e) para la especie fue de 0.3524 (± 0.1248) y la diferenciación genética global (θ) fue alta (0.3708 ± 0.0289); el análisis de varianza molecular reveló que 58.08% de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones. No se encontró relación entre la distancia genética y la distancia geográfica, por lo que se descartó la hipótesis de aislamiento por distancia.

Los resultados sugieren que la fragmentación aun no ha afectado negativamente la variación genética de las poblaciones adultas de *S. portoricense*, mientras que la masa de la semilla y la luz en zonas continuas podría ser un factor determinante en el establecimiento de plántulas.

1. INTRODUCCIÓN

Los bosques tropicales son los ecosistemas más diversos del planeta a pesar de que sólo forman parte del 7% de la masa terrestre y son el hogar de más de la mitad de especies de plantas y animales que alberga la Tierra (Bierregaard *et al.*, 1992). Actualmente es uno de los ecosistemas más afectados por el desmonte de vegetación realizado en los últimos cuarenta años. Este fenómeno ha aumentado exponencialmente y se estima que la tasa de deforestación excede los 15 millones de hectáreas de bosque anualmente, dando como resultado la **fragmentación del hábitat** (Bierregaard *et al.*, 1992; Laurence *et al.*, 1998;).

El fenómeno de fragmentación ocurre mediante la remoción total o parcial de áreas continuas de bosque, resultando de ello la formación de mosaicos de vegetación, potreros, campos agrícolas, bosques secundarios y remanentes primarios en donde los procesos bióticos y abióticos se ven fuertemente afectados, teniendo un impacto negativo sobre la biodiversidad y la amenaza de extinciones actuales (Nason y Hamrick, 1997; Guevara *et al.*, 2004). Los tamaños poblacionales se ven reducidos y la distribución de las especies se vuelve irregular, quedando aisladas en los nuevos remanentes que podrían resultar una barrera geográfica para la dispersión (Laurence *et al.*, 1998).

Los estudios realizados sobre los efectos de la fragmentación y sus posibles consecuencias a nivel ecológico y genético, no predicen claramente las consecuencias que este fenómeno pudiera tener sobre los ecosistemas (Bierregaard *et al.*, 1992). Pocos estudios están dedicados a analizar el éxito reproductivo de las plantas y la mayoría de estos están enfocados a las

herbáceas de climas templados o regiones subtropicales (Cascante *et al.*, 2002).

En las comunidades vegetales del bosque tropical se ha observado que gran parte de las alteraciones que sufren las especies, están dadas por el *efecto de borde* (Tabarelli *et al.*, 2004), el cual afecta las condiciones microclimáticas del fragmento teniendo como consecuencia el aumento de la temperatura, la disminución de la humedad del aire y el suelo, cambios en las condiciones de luz e incidencia del viento (Murcia, 1995). Esto provoca cambios en la estructura del bosque, modificando la abundancia y establecimiento de las especies vegetales y las interacciones con depredadores, polinizadores y dispersores de semillas en los fragmentos (Lovejoy, 1983).

Estas pérdidas, tanto en depredadores como en polinizadores, pueden provocar un efecto desestabilizador en las poblaciones de dispersores de semillas, afectando la composición de especies arbóreas en los bosques. Esto da como resultado que los fragmentos aislados no puedan ser colonizados por muchas especies de plantas que potencialmente podrían vivir ahí (Bierregaard *et al.*, 1992).

Estas alteraciones incrementan la vulnerabilidad de las comunidades de árboles tropicales (Camargo y Kapos, 1985), ya que presentan ciertas características demográficas y reproductivas como las bajas densidades de algunas especies, interacciones con polinizadores específicos, altas tasas de entrecruzamiento y sistemas de apareamiento complejos como la autoincompatibilidad (Cascante *et al.*, 2002).

Una de las causas más importantes de la tasa de mortalidad de árboles en los fragmentos se debe también al efecto de borde, ya que gran número de individuos quedan expuestos a una mayor turbulencia originada por el viento, incidencia de luz solar, caída de hojarasca y estrés hídrico. Estos cambios suelen ser amortiguados gran parte del tiempo por los árboles del dosel, sin embargo esto puede afectar a las especies que se encuentran cerca de los bordes provocando la mortalidad y desecación de especies sensibles a la entrada de luz en el sotobosque (Laurence *et al.*, 1998).

La luz en el borde de un fragmento o la formación de un claro, puede beneficiar el crecimiento de ciertas especies, y esta respuesta difiere de gran forma entre especies tolerantes y pioneras, ya que el desarrollo y establecimiento de las plántulas en las primeras semanas, está fuertemente ligado con la incidencia de luz y las reservas iniciales de la semilla (Augspurger, 1984).

Por otro lado, la caída de hojarasca aumenta en los fragmentos conforme se acerca al borde (Laurence *et al.*, 1998). Esta capa de vegetación comienza a ser abundante y a formar parte del dosel primario, lo que impide la entrada de luz en ciertas zonas del sotobosque incrementando la mortalidad de plántulas (Benitez-Malvido, 1998), mientras que la acumulación de hojarasca en el sotobosque puede afectar el desempeño y establecimiento de las plántulas, ya sea ocultando las áreas fotosintéticas de la plántula, favoreciendo la infección de plántulas por la caída de hojas infectadas de árboles adultos y/o propiciando un microclima húmedo y sombrío adecuado para el establecimiento y ataque de patógenos y herbívoros (Xiong y Nilsson, 1997; García-Guzman y Benitez-Malvido, 2003).

Todos estos cambios que trae consigo la fragmentación afectan el potencial reproductivo de las especies del bosque, en el caso de los árboles tropicales, existe una disminución en la producción, el tamaño y la calidad de las semillas, lo que puede limitar la germinación, el establecimiento y reclutamiento de especies nativas (Benitez-Malvido, 1998). Existen diferentes factores que afectan los tamaños de semillas en árboles tropicales, tal es el caso de los sitios de bosque con poca luz ó de sucesión tardía, donde las especies producen semillas más grandes, mientras que en los sitios iluminados y abiertos ó de sucesión primaria, en donde las condiciones climáticas de temperatura y humedad varían constantemente, los tamaños de semillas son más pequeños o se ven influenciados constantemente por estos cambios ambientales (Thompson y Hodkinson, 1998).

El tamaño de las semillas es uno de los caracteres de historia de vida más importantes para el establecimiento y supervivencia de las plántulas en sus primeras etapas de vida. Este carácter esta mediado por la madre y el ambiente en el que esta habita, es por eso que un árbol madre determina la cantidad de recursos asignados a la semilla; la calidad de esta, determinará en gran medida la capacidad de germinación, establecimiento, crecimiento y supervivencia de la progenie (Mousseau y Fox, 1998). Se considera que este caracter está fuertemente ligado a la adecuación y al potencial evolutivo de las especies, por lo que algunas alteraciones a nivel ecológico podrían modificar la estructura y diversidad genética de las poblaciones.

Las alteraciones ecológicas causadas por la fragmentación del hábitat reducen constantemente los bosques en pequeños remanentes de vegetación, dando como resultado la reducción en el tamaño efectivo de las poblaciones. Esta disminución en el número de individuos reproductivos, representa un decremento en el número de donadores de polen, dispersores de semillas y polinizadores (Hamrick y Godt, 1996; Cascante *et al.*, 2002), lo que trae consigo la formación de "cuellos de botella", ya que los individuos restantes presentan una pequeña muestra del acervo genético inicial (Young *et al.*, 1996). El número de genotipos disponibles decrece respecto al original, hay pérdida de variabilidad genética y aumenta la probabilidad de apareamientos entre individuos emparentados, lo que lleva a las poblaciones a presentar tendencias hacia la endogamia (Cascante *et al.*, 2002). Después de esta pérdida de variación, las poblaciones fragmentadas y aisladas, continúan perdiendo alelos debido a la deriva génica dada la ausencia de individuos migrantes y la diferenciación genética entre poblaciones aumenta (Young *et al.*, 1996).

Para las plantas, los efectos genéticos de la fragmentación suelen ser más complejos debido a los hábitos sésiles que estas presentan, la diferencia en la longevidad, el tiempo generacional, la amplia variedad en sus sistemas reproductivos, flujo génico por dispersión de polen o semillas, el almacenamiento de semillas como material genético, y su interacción con polinizadores y dispersores, los cuales pueden ser afectados por este fenómeno (Young *et al.*, 1996). Esto hace que las comunidades vegetales tiendan a mantener diferentes niveles de variación genética y se encuentre distribuida entre y dentro de sus poblaciones (Hamrick y Godt, 1996).

A pesar de que la mayoría de las selvas tropicales se encuentran actualmente convertidas en mosaicos de vegetación rodeadas de potreros y pastizales, aún forman parte del refugio de muchas especies vegetales y animales y son el reservorio de una gran porción de la diversidad genética del planeta. La tasa de deforestación en áreas de selva tropical en México es muy elevada y se ha planteado la necesidad de hacer un gran esfuerzo por conservar zonas con alta diversidad biológica (Guevara *et al.*, 2004). La selva de los Tuxtlas, ubicada al sureste del estado de Veracruz es una de las zonas en donde converge un gran número de especies tropicales endémicas y representa el límite norte de distribución de las selvas altas perennifolias en América (Dirzo *et al.*, 1997).

Dado el alto grado de perturbación de esta zona, se estima que en la región de los Tuxtlas se ha perdido el 84% de la cobertura vegetal original, dando lugar a la formación de parches de diversos tamaños (Dirzo y Miranda, 1991), sin embargo aún se conservan dos grandes zonas de bosque continuo que rodean el volcán San Martín y volcán Santa Martha (Guevara *et al.*, 2004), lo que genera un escenario propicio para el estudio de las consecuencias ecológicas y genéticas de la fragmentación y las tendencias evolutivas en las especies más importantes del ecosistema con fines de conservación y restauración.

Por ello, el desarrollo de este trabajo, tiene como objetivo conocer los efectos a nivel ecológico que pudieran tener las poblaciones de *Sideroxylon portoricense* en algunos de los caracteres de historia de vida como la supervivencia, el establecimiento y las interacciones con sus depredadores y/o enemigos naturales, así como evaluar el posible impacto que ha tenido la fragmentación a nivel genético en este árbol tropical en ambientes perturbados y conservados.

2. OBJETIVO

En este estudio se describe como se modifican algunos caracteres de historia de vida en las poblaciones de plántulas cuando se fragmenta el hábitat, así como detectar si existen cambios a nivel genético en las poblaciones adultas del árbol tropical *Sideroxylon portoricense* (Sapotaceae) causados por la fragmentación de la selva alta perennifolia en la zona de los Tuxtlas, Veracruz.

Objetivos particulares

Ecológicos

- ✓ Determinar el efecto de la fragmentación en la supervivencia y caracteres de historia de vida como la tasa de crecimiento (altura), el área foliar y el número de hojas producidas en las plántulas.
- ✓ Detectar el efecto de la variación intraespecífica en la masa de la semilla sobre el establecimiento y desempeño de las plántulas bajo diferentes condiciones ambientales.
- ✓ Comparar las diferencias de daño causado por herbívoros y patógenos en plántulas establecidas en zonas de selva continua y en zonas fragmentadas.

Genéticos

- ✓ Describir la variación y estructura genética inter e intrapoblacional en árboles adultos de *Sideroxylon portoricense* en sitios de selva continua y en zonas fragmentadas.

Predicciones

- ✓ La fragmentación del hábitat tiene un efecto negativo sobre la supervivencia y caracteres de historia de vida de las comunidades de plántulas, ya que *S. portoricense* es un árbol que se encuentra en selva madura y las condiciones podrían resultar más favorables para la supervivencia, establecimiento y vigor.
- ✓ La masa de la semilla tiene un efecto positivo en la supervivencia de las plántulas y el establecimiento, ya que en esta se encuentran los recursos necesarios que aporta el árbol madre para un buen desempeño del individuo y son de suma importancia en este primer estadio de vida donde las plántulas suelen ser muy vulnerables.
- ✓ La diversidad genética de las comunidades vegetales de *S. portoricense* aún no es afectada por el fenómeno de fragmentación, ya que el tiempo de vida de los individuos adultos es mayor al tiempo de perturbación del hábitat en la selva de Los Tuxtlas. De esta forma se espera encontrar un nivel similar de diversidad genética en las poblaciones continuas y fragmentadas, así como poca diferenciación entre poblaciones debido a un constante flujo génico entre las poblaciones.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Sitio de estudio

La sierra de Los Tuxtlas se encuentra ubicada en la planicie costera del Golfo de México al sur del estado de Veracruz (Figura 1), entre los $18^{\circ} 05'$ y $18^{\circ} 45'$ de latitud norte y $94^{\circ} 35'$ y $95^{\circ} 30'$ de longitud oeste. La región se extiende sobre una superficie cercana a 3.300 km^2 .

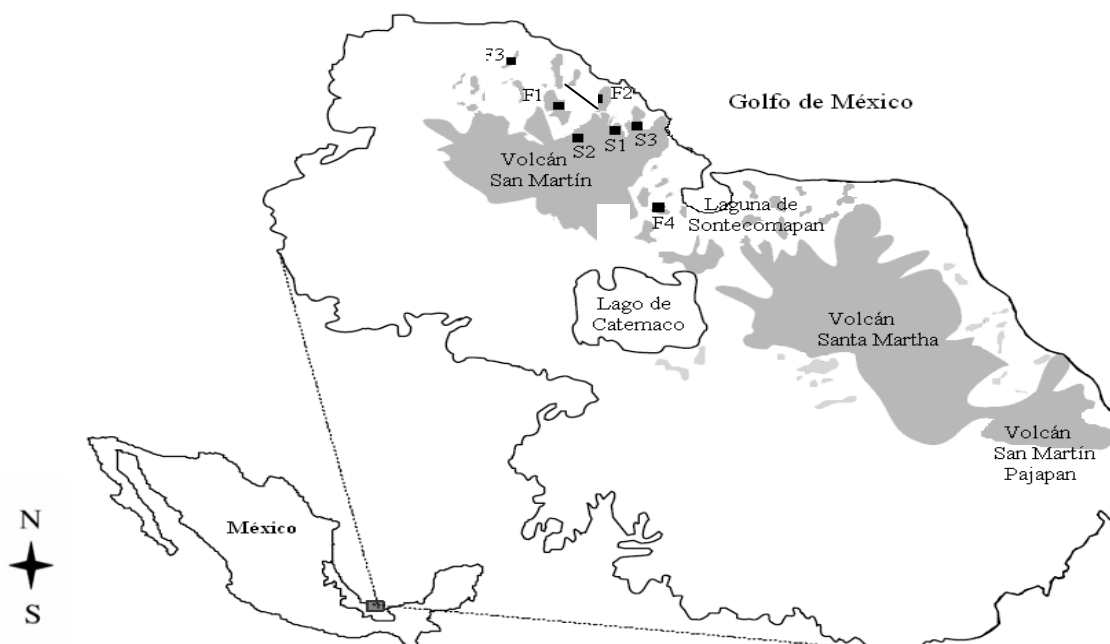


Figura 1. Mapa de la región de Los Tuxtlas, ubicada al sureste del estado de Veracruz en el Golfo de México. Las áreas grises corresponden a la superficie de selva continua que aún conserva la zona.

La formación montañosa se origina a partir de los 200 msnm hasta los 1750 msnm (Guevara *et al.*, 2004). Las elevaciones más sobresalientes son el volcán San Martín con una altitud de 1780 msnm, el volcán Santa Martha con una altura de 1660 msnm y el volcán San Martín Pajapan con 1245 msnm (Dirzo *et al.*, 1997).

El sistema de desplazamiento de los vientos, la cercanía a la costa y la topografía de la zona, influyen de gran manera en las condiciones climáticas. Esta región se ve fuertemente afectada por dos fenómenos meteorológicos importantes que son los ciclones y los "nortes". Esto propicia que sea una de las zonas más lluviosas en el país con una precipitación media anual de 4,000 mm. Existe una estacionalidad marcada, una temporada de lluvias de junio a febrero y una temporada de secas de marzo a mayo, siendo mayo el mes más seco y septiembre el más húmedo. El clima de la región es cálido húmedo y la temperatura media anual oscila entre 24 y 26° C para las zonas con altitudes menores a los 200 msnm. La mayor temperatura se presenta en mayo, mientras que enero es el mes más frío para la región y el estado (Dirzo *et al.*, 1997; Guevara *et al.*, 2004).

La vegetación predominante en la sierra de Los Tuxtlas es la selva alta perennifolia, aunque existen algunas variantes de selva mediana, selva baja, manglar, vegetación costera y bosque mesófilo en las partes más altas. Presenta una estructura muy variada, en donde se pueden encontrar árboles de diferentes tallas, lianas, trepadoras, epífitas, palmas, arbustos, hierbas y estranguladores (Miranda y Hernández, 1963). El dosel de la selva tiene una altura de 30 a 35 m, aunque hay algunos árboles que pueden alcanzar los 40 m de altura, como algunos *Ficus spp.* y *Ceibas spp.*, siendo común la presencia de contrafuertes. Entre las especies del dosel destacan algunas especies de las familias Lauraceae, Moraceae y Sapotaceae. Bajo el dosel existe un gran número de especies arbóreas que alcanzan los 20 m de altura, así como un gran número de herbáceas y palmas en el sotobosque (Dirzo *et al.*, 1997; Guevara *et al.*, 2004).

Debido a la historia biogeográfica y las condiciones climáticas de la región, esta zona presenta una alta heterogeneidad ambiental y una gran diversidad de especies teniendo un gran número de endemismos. Actualmente comparte alrededor del 70% de las especies con la flora centroamericana y el resto de las especies es compartido con Suramérica. Como resultado del cambio de uso de suelo en regiones originales de este ecosistema, gran parte del área se encuentra convertido en acahuales que rodea sitios de selva continua, en donde la vegetación se ha reducido 56% en los últimos años y la tasa de deforestación anual es del 4.3% (Dirzo *et al.*, 1997; Guevara *et al.*, 2004).

Descripción de la especie

Sideroxylon portoricense subs. *Minutiflorum* (Pittier) Sapotaceae, es un árbol del dosel superior, con alturas hasta de 40 metros y de baja densidad. Presenta ramas simples muy delgadas, con corteza de color grisáceo blanquecino a café oscuro, la cual puede ser lisa en árboles jóvenes, pero en árboles adultos presenta grietas profundas de delgadas a gruesas (Pennington, 1990). Las flores son monoicas, miden de cinco a veinte cm. y aparecen en la axila de cada brote; son fragantes de color verdoso a blanco y los frutos maduros son de color violeta muy oscuro con abundante látex blanco. Estos miden de 1.6 a 2.5 cm. de largo, presentan forma ovoide con textura lisa y suave. Cada fruto tiene generalmente una semilla y en pocas ocasiones dos. Las semillas miden de 1.2 a 1.5 mm. de largo, tienen una forma elipsoide globosa con una testa muy dura, lisa y brillante y son depredadas por aves (Figura 2). El pico de floración es de junio a septiembre y el periodo de fructificación de octubre a diciembre (Pennington, 1990).

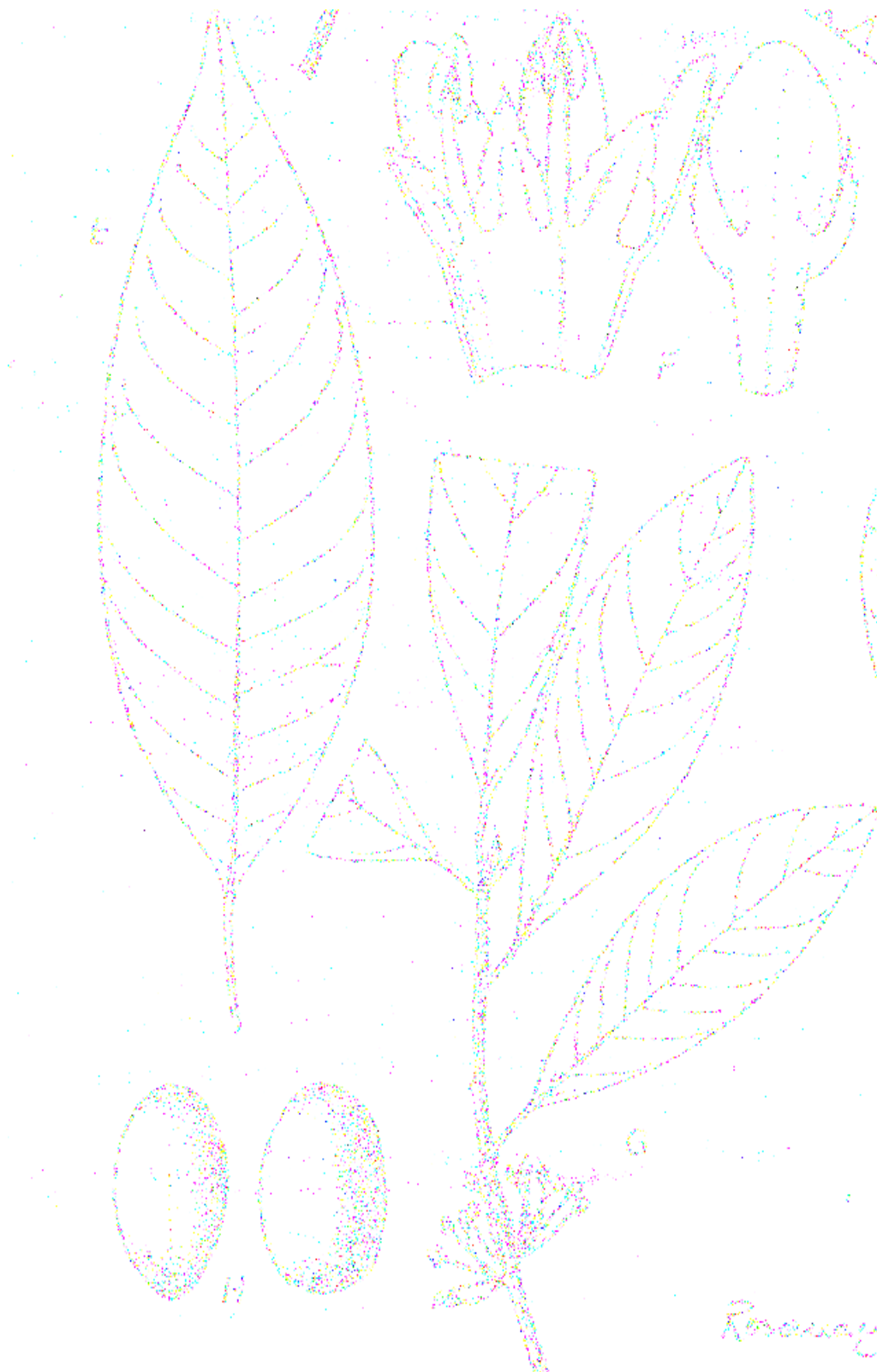


Figura 2. *Sideroxylon portoricense*. Hojas (E); flores (G); corte transversal de la flor (F); semillas (H). (Tomado de Pennington, 1990)

La distribución de esta especie en México se da en zonas bajas de la selva tropical cerca del mar y en montañas con altitudes alrededor de los 500 m. En el país se distribuye en la selva tropical del estado de Veracruz, en la zona de las lagunas de Monte Bello en Chiapas y en el estado de Jalisco. Algunos nombres locales en México son: "Apipi", "Piochi" y "Pionche" en Veracruz y "Maneicillo" en el estado de Jalisco (Pennington, 1990).



Figura 3. Mapa de distribución geográfica de *Sideroxylon portoricense* en México y Centroamérica (●).

También se encuentra en zonas húmedas de Guatemala, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica y Panamá; también puede encontrarse bajo condiciones de humedad (cañones empinados o la orilla de ríos) en regiones secas con un clima estacional marcado (Pennington,1990)

Caracteres de historia de vida

Colecta de campo

En marzo del 2005 se colectaron frutos de diez árboles de *Sideroxylon portoricense* distribuidos en la selva continua y en fragmentos (Figura 4). La colecta fue aproximadamente de 500 frutos por árbol y éstos fueron colectados del suelo bajo el árbol madre después de la temporada de fructificación; estos árboles fueron marcados con una etiqueta de metal, en la cual se registró la posición geográfica y el nombre del sitio (Figura 4).

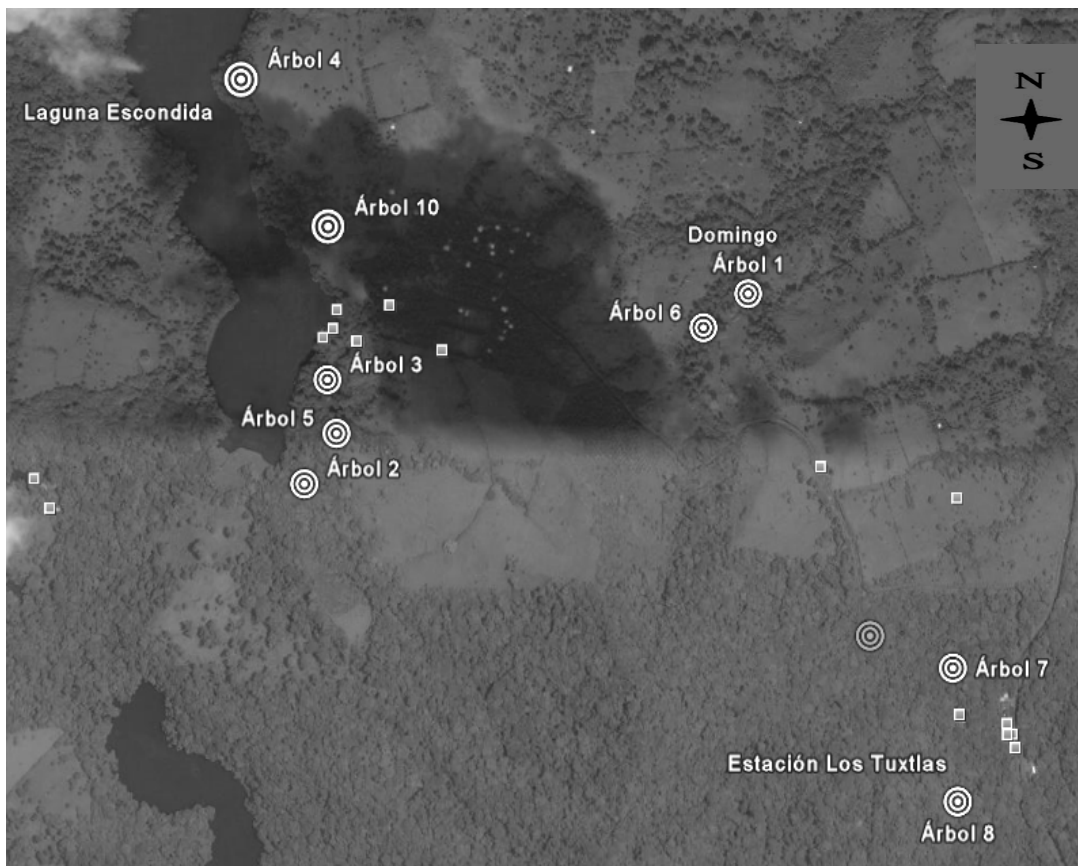


Figura 4. Mapa de la distribución geográfica de los árboles madre de *Sideroxylon portoricense* utilizados para la germinación de las semillas colectadas. (<http://earth.google.com>).

Diseño experimental

Se limpiaron los frutos y se retiró el endospermo hasta obtener semillas limpias. Las semillas se lavaron con agua y fueron seleccionadas bajo un criterio de flotación. El método se basa en que las semillas flotantes están vacías debido a que no han desarrollado por completo el embrión y el endospermo; asimismo se excluyeron de la siembra las semillas con cualquier tipo de daño; las semillas viables se dejaron secar a temperatura ambiente.

Se registró la masa húmeda de cada una de ellas, utilizando una balanza analítica y se sembraron en almácigos que contenían suelo de la selva; cada almácigo fue etiquetado registrando el número de árbol (familia) y el sitio de colecta. Se sembraron 520 semillas de siete árboles, 200 de la "familia ocho", 480 para la "familia nueve" y 140 para la "familia diez" debido a la disponibilidad de semillas. Los almácigos fueron colocados de forma aleatoria dentro del invernadero de la "Estación de Biología Tropical", con la finalidad de evitar el daño por depredadores y garantizar condiciones experimentales homogéneas.

Las semillas se regaron continuamente para evitar la desecación, ya que en esta temporada disminuyen las lluvias en la región. Una vez germinadas 800 plántulas (después de seis meses), se realizó el primer censo en octubre del 2005 registrando los siguientes atributos: supervivencia, longitud del tallo y número de hojas. Asimismo se registró el largo y el ancho de cada hoja, con la finalidad de obtener el área foliar total de cada plántula y observar cambios a través del tiempo. El área foliar se estimó utilizando un modelo de regresión lineal (área foliar original = $0.6697819 + 0.5575322 (L \times A)$; $R^2 = 0.9944$, $P =$

<0.0001, $n = 64$). Las hojas utilizadas para el modelo de regresión lineal fueron medidas en un Analizador de Imagen Digital (WinDias Basic; Delta-T Devices LTD, Cambridge. UK).

Con el fin de contrastar el daño causado por patógenos y herbívoros entre los sitios de selva continua y en fragmentos, se registró el daño por herbívoros y/o patógenos de cada hoja por plántula. El método que se utilizó para categorizar el daño por herbívoros y patógenos incluye seis niveles: 0= sin daño; 1= 1-5%; 2= 6-12%; 3=13-25%; 4=26-50%; 5=51-100% (Domínguez y Dirzo, 1995). Estas categorías fueron asignadas a cada hoja, según su proporción de daño y la suma de daño de todas las hojas fue utilizado para definir el índice de daño por patógenos y herbívoros (IH; IP) de cada plántula:

$$IH; IP = \sum_{i=0}^n (X_i n_i) / N$$

Donde. $X_i n_i$ = número de hojas con daño en la categoría i
N= número total de hojas

Cada plántula fue etiquetada con el número de familia a la que pertenecía y el número de individuo. Posteriormente se realizaron los transplantes en cuatro sitios experimentales, dos de selva continua ubicados en la Estación "Los Tuxtlas" (18° 35.240'N; 95° 04.62'W) y dos en fragmentos: "Cerro Borrego" (18° 39.958'N; 95° 05.164'W) y "Cola de Pescado" (18° 39.792'N; 95° 08.754'W) (Figura 5).

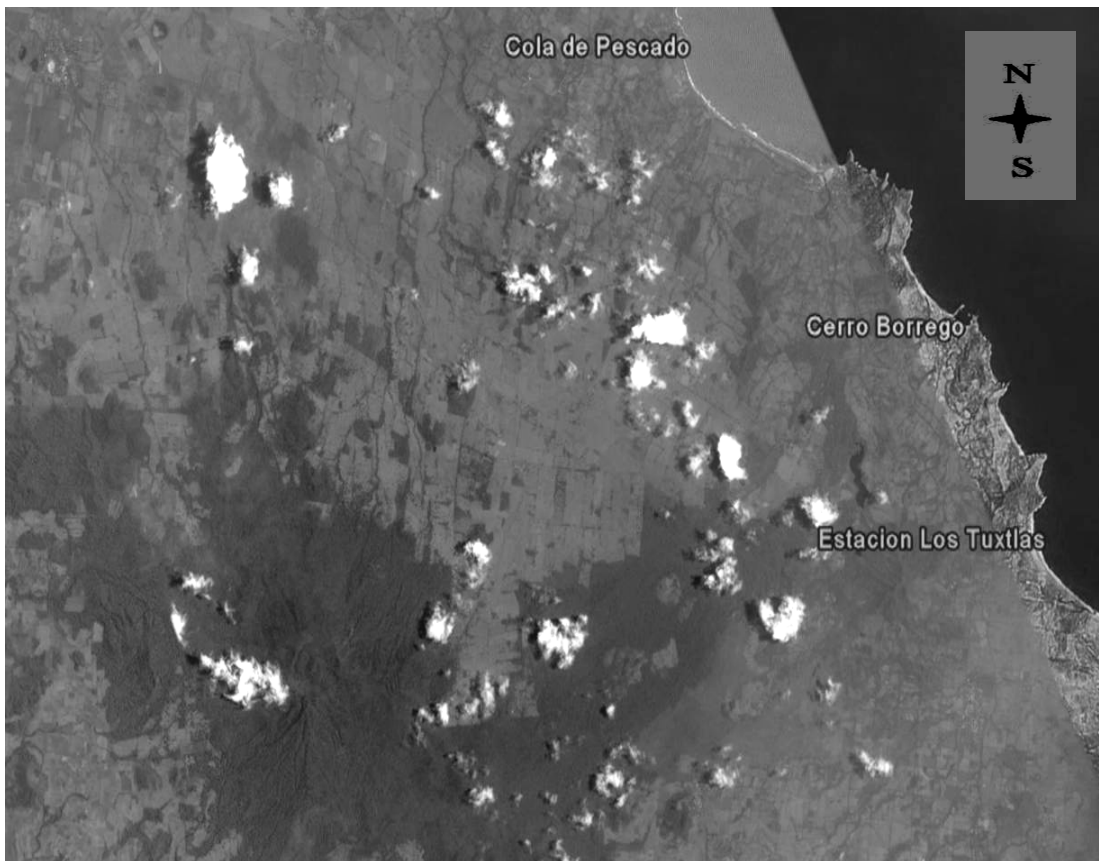


Figura 5. Mapa de los sitios experimentales en fragmentos y selva continua utilizados para el establecimiento de plántulas de *S. portoricense* en la región de los Tuxtlas, Veracruz. (<http://earth.google.com>)

En cada uno de los sitios se establecieron dos bloques aleatorios (2.30 m x 0.70 m) en donde se distribuyeron plántulas de las diez familias, teniendo un total de 100 plántulas aproximadamente por bloque; los censos se realizaron cada 45 días en promedio, durante un periodo de once meses, registrando los caracteres ya mencionados.

Se midió la cantidad de luz que incidía sobre el sotobosque en cada uno de los bloques para los dos sitios de cada hábitat. El sensor de luz se colocó en el sotobosque y se tomaron diez puntos aleatorios dentro de los bloques, teniendo un total de 40 mediciones de luz para cada hábitat. Estas mediciones se realizaron con un sensor "LI-COR Quantum", el cual mide la radiación fotosintéticamente activa en una onda de 400 a 700 nm y la unidad de medida

es de micromoles por segundo por metro cuadrado ($\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$). También se registró la temperatura que existía dentro de cada uno de los bloques con un termómetro digital de alta sensibilidad. Esta fue tomada del haz de veinte hojas distribuidas aleatoriamente dentro de cada uno de los bloques, teniendo en total 80 mediciones de temperatura para cada hábitat.

Genética de poblaciones

Marcadores Moleculares

El PCR (polymerase chain reaction) es una de las técnicas moleculares más utilizadas en los últimos años, la cual ha facilitado las investigaciones y trabajos relacionados con los ácidos nucleicos. La mayor aportación de esta técnica ha sido la simplicidad con la que se pueden amplificar miles de copias de fragmentos específicos de ADN (Wolfe, 1998).

Sin embargo, existen otras técnicas que complementan la amplificación del ADN por PCR, ya que cada una de estas depende de diversos factores como la especie de estudio, el análisis que se realiza, el desarrollo de la técnica, la reproducibilidad, el grado de polimorfismo y los costos, entre otros.

En este trabajo se utilizaron los marcadores moleculares llamados "Inter Simple Sequence Repeats" (ISSR's) los cuales presentan ventajas en contraste con otros marcadores, como los AFLPs que presentan una baja reproducibilidad y un alto costo, o la necesidad de conocer la secuencia específica para amplificar el fragmento de los SSRs o microsatélites (Pradeep *et al.*, 2002).

Los ISSR's son una técnica basada en la amplificación de un segmento de ADN dentro de una distancia amplificable que se encuentra en regiones internas de dos microsatélites dispuestos en posiciones opuestas. Esta técnica permite identificar los niveles de variación que existen en diferentes regiones del genoma y registrar polimorfismos a nivel individual convirtiéndolo en un sistema multilocus (Zietkiewicz *et al.*, 1993; Pradeep *et al.*, 2002).

La amplificación se realiza con "primers" pequeños (de 16 a 25 pb) e hipervariables, los cuales pueden ir desde dos hasta cinco nucleótidos y a veces presentan bases en los extremos que sirven de anclaje (Zietkiewicz, *et al.*, 1993).

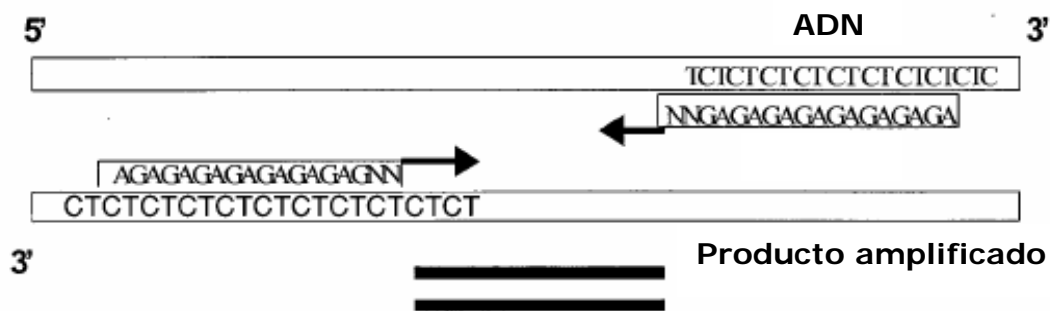


Figura 6. Representación de una reacción de PCR con ISSR's con un solo "primer" anclado en la terminación 3' con dos nucleótidos extra (NN) alineado en regiones específicas del ADN, los cuales producen bandas claras (tomado de Pradeep *et al.*, 2002).

El "primer" suele ser complementario a una región microsatélite blanco y el nucleótido extra permite que el "primer" se ancle al extremo 5' del microsatélite y comience la amplificación del ADN, generando una banda de tamaño y peso específico para ese locus, representando la región del genoma hallada entre esos dos microsatélites (Bornet y Branchard, 2001).

Generalmente se encuentran muchas regiones microsatélites pareadas a lo largo del genoma, por lo que es común reproducir bandas de diferentes tamaños en una sola reacción de PCR (Bornet y Branchard, 2001). Esta reproducibilidad también se logra con altas temperaturas de alineación, en donde alrededor del 92 al 95% de los fragmentos de ADN registrados pueden ser repetidos (Pradeep *et al.*, 2002).

Estos marcadores se consideran semiarbitrarios y dominantes (Bornet y Branchard, 2001), por lo que las bandas obtenidas son interpretadas como el genotipo dominante (ya sea homócigo o heterócigo), mientras que la ausencia de una banda puede interpretarse como el genotipo homócigo recesivo, suponiendo un sistema dialélico.

La fuente de variación de los ISSR's puede deberse a diferentes causas o a la combinación de algunas de las siguientes: mutaciones, rearrreglos estructurales en los cromosomas, la pérdida de algún alelo y/o inserciones o deleciones dentro de las regiones microsatélites (Wolfe, 1998; Pradeep *et al.*, 2002).

Esta técnica ha sido utilizada principalmente en estudios de diversidad genética y análisis filogenéticos, los cuales han permitido estimar la variación genética entre y dentro de poblaciones naturalmente cercanas en diferentes especies de cultivo como el trigo, el arroz y el camote (Nagaoka y Ogihara, 1997).

Colecta de campo

La colecta se realizó en siete sitios de la zona de los Tuxtlas, tres sitios de selva continua, ubicados dentro de "La Estación los Tuxtlas" y cuatro en los fragmentos "Laguna Azul", "Laguna Escondida", "Domingo" y "Ruiz Cortinez". Se colectó tejido foliar de árboles adultos y se registró el número de individuo y el nombre del sitio de colecta (Figura 7, tabla 1). Se colectaron de diez a veinte individuos por población dada la baja densidad poblacional en los sitios muestreados. El material fue embolsado y conservado en nitrógeno líquido para su transporte a la ciudad de México, en donde se almacenó en un ultra congelador a -80° C para ser usado posteriormente en extracciones de ADN nuclear.

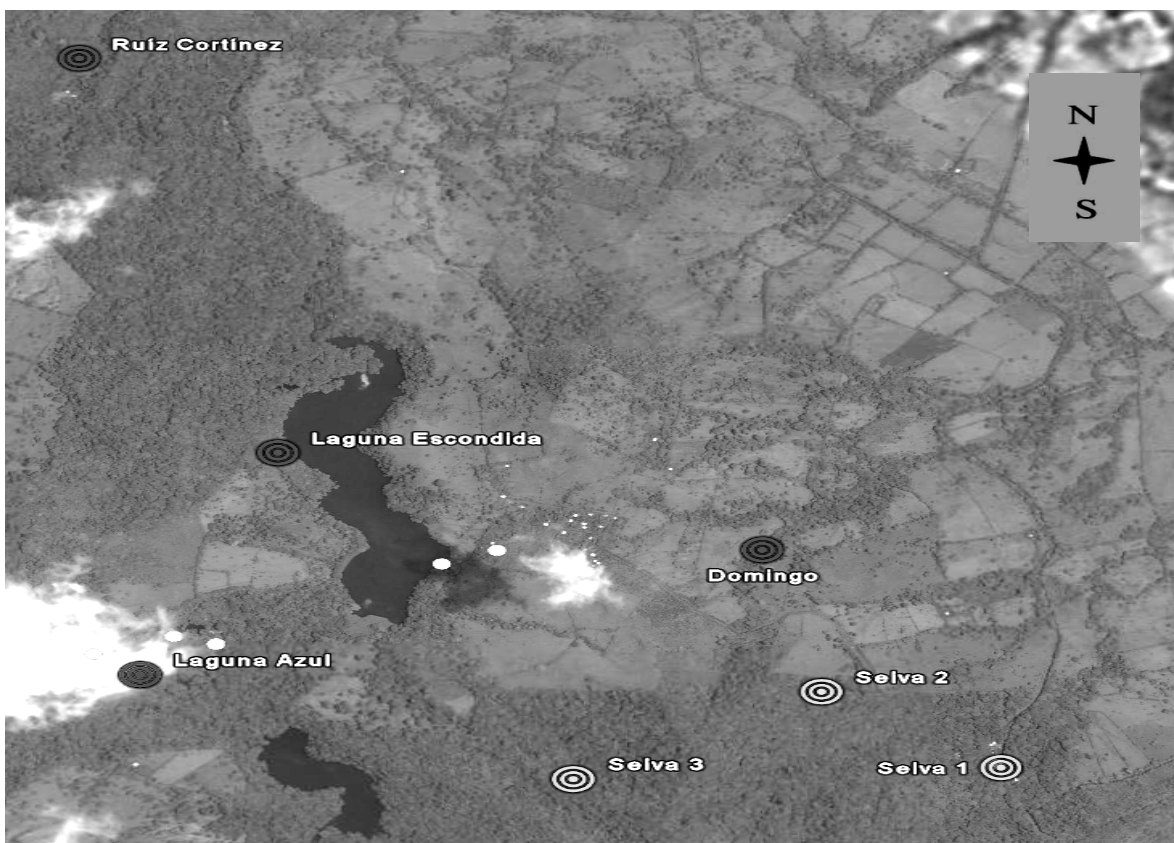


Figura 7. Mapa de las poblaciones de adultos de *Sideroxylon portoricense* colectados para obtener la estructura genética en la zona de los Tuxtlas, Veracruz (Tabla 1) (<http://earth.google.com>).

Tabla 1. Nombre y ubicación geográfica de las poblaciones colectadas de árboles adultos de *Sideroxylon portoricense* para obtener la estructura genética de sitios de selva y de fragmento en la zona de los Tuxtlas, Veracruz (Figura 7).

Hábitat	Población	Individuos	Ubicación
Selva			
	"Selva 1"	13	18° 35' 07" N. 95° 04' 29" W
	"Selva 2"	19	18° 35' 12" N. 95° 04' 40" W
	"Selva 3"	12	18° 35' 05" N. 95° 05' 00" W
Fragmento			
	"Laguna Azul"	10	18° 35' 22" N. 95° 05' 37" W
	"Laguna Escondida"	9	18° 35' 28" N. 95° 05' 20" W
	"Ruiz Cortinez"	14	18° 35' 33" N. 95° 04' 52" W
	"Domingo"	12	18° 36' 33" N. 95° 05' 44" W

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN del tejido foliar de *Sideroxylon portoricense*, se probaron diferentes protocolos de extracción, ya que las hojas de esta especie presentan una gran cantidad de polisacáridos y taninos, los cuales pueden dificultar la obtención de ADN de calidad para experimentos de amplificación.

Después de probar diferentes protocolos de extracción de ADN para plantas, resultó óptimo el protocolo de "Miniprep" modificado por Valera (2007) (Apéndice 1). Este protocolo utiliza detergentes agresivos que rompen las membranas y paredes celulares y eliminan las impurezas como sales y polisacáridos, utilizando al mismo tiempo protectores de ADN y antioxidantes que ayudan a conservar el ADN así como agrupar los ácidos nucleicos en la primera fase de extracción. En la segunda fase se utilizan enzimas que

fragmentan el RNA y desactivan las proteínas para evitar que se inhiba la reacción de PCR. Se extraen lípidos, proteínas y sales, separándolos del ADN en diferentes fases. La última fase incluye un mayor número de ciclos y limpiezas con alcohol que ayudan a eliminar tejidos celulares y posibles sales restantes, purificando el ADN (Vázquez-Lobo, 1996).

Cuantificación de ADN

El ADN extraído se estimó cualitativamente cargando 15µl de la muestra junto con colorante en geles de agarosa al 1% y se corrieron en electroforesis para verificar la presencia y la calidad de ADN. Posteriormente se realizó una medición cuantitativa utilizando un biofotómetro (Eppendorf, BioPhotometer), el cual calcula la absorbancia de ADN en nanogramos sobre microlitros (ng/µl) de una muestra dada a una longitud de onda de 260 nm.

Para realizar los experimentos, se diluyó la mitad de la muestra de ADN a una concentración final de 30 ng/µl. La otra mitad de la muestra se almacenó en un ultra congelador a -80° C.

Pruebas de optimización del sistema

La estructura genética de *S. portoricense* se analizó utilizando los marcadores dominantes ISSR's (Inter Simple Sequences Repeats). Se probaron 17 "primers" diseñados por Nucleic Acid-Protein Services Unit (University of British Columbia, Canada). Resultaron óptimos seis "primers," que fueron seleccionados por la calidad y número de bandas, así como por la repetibilidad que presentaron (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencia de los "primers" utilizados para el análisis de la estructura genética de individuos adultos de *Sideroxylon portoricense* de la región de los Tuxtlas, Veracruz.

"Primer"	Secuencia
808	AGA GAG AGA GAG AGA GC
811	GAG AGA GAG AGA GAG AC
835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC
842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG
861	ACC ACC ACC ACC ACC ACC
888	BDB CAC ACA CAC ACA CA

B = C ó G ó T.

D = A ó G ó T.

Y = C ó T.

Se realizaron diferentes modificaciones a la reacción de PCR y al programa de amplificación para ajustar el sistema y finalmente obtener el mayor número de polimorfismos posibles. Cada reacción de PCR estaba compuesta por los siguientes elementos, teniendo un volumen final de 30 µl:

*Buffer 10X para PCR: 3 µl (Tris- HCl 20 mM. pH 8.4 y KCl 50 mM).

*dNTP's: 1.8 µl a una concentración final de a 10 mM (mezcla de los cuatro nucleótidos: dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

*"Primer": 1.5 µl a 10 mM.

*MgCl₂ : 2.5 µl de a 30 mM.

*Taq polimerasa: 0.2 µl (5 u/µl).

*ADN: 2 µl a una concentración aproximada de 30 ng/ µl.

*Agua ultrapura: 19 µl.

La mitad del producto de PCR se utilizó para correr los geles y la otra mitad se almacenó como respaldo. El paquete de Taq polimerasa, Buffer 10 X y MgCl₂ utilizado fue de la marca "Biogénica", los "primers" y los dNTP's de "Invitrogen"

Las condiciones de la reacción de PCR anterior fueron las mismas para todos los "primers". En cada PCR realizado se incluía un control negativo, el cual contenía todos los elementos de la reacción a excepción de ADN; este control negativo sirve para verificar que ninguno de los reactivos de la reacción esté contaminado con ADN externo y que el ADN amplificado sea el correspondiente de cada individuo.

La obtención de ISSR's se realizó en un termociclador Thermo PX2. Las condiciones del programa de amplificación fueron las mismas para todos los "primers" utilizados en el experimento (Tabla 3).

Tabla 3. Programa de amplificación del PCR utilizado en la generación de datos moleculares para el análisis de la estructura genética de *S. portoricense* de la región de los Tuxtlas, Veracruz.

Fase	No. de ciclos	Tiempo	Temperatura
1) Desnaturalización inicial	1	4 min.	94° C
2) Desnaturalización	35	30 seg.	94° C
Alineación		35 seg.	55° C
Polimerización		2 min.	72° C
3) Extensión	1	7 min.	72 °C
4) Estabilización	—	∞	4 °C

Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 2% previamente teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ ml de "Invitrogen") y se separaron por electroforésis. Para medir el tamaño del producto de PCR obtenido, se corrió un marcador de peso molecular de 100 pares de base (Gene Ruler 100pb ADN Ladder Plus de Fermentas), el cual estima el peso molecular de las bandas obtenidas para cada individuo.

Los fragmentos obtenidos fueron visualizados en un transluminador con luz ultravioleta y se registraron con una cámara digital Bio Doc-It (Imaging System de UVP). Para generar los datos moleculares se analizaron los geles con el programa Bio Doc-It LS Analysis Software, estimando el tamaño de las bandas amplificadas y registrando la presencia o ausencia de estas. Con los datos anteriores se realizaron matrices de "presencia-ausencia" ("0" y "1") de las bandas encontradas por individuo para cada población por cada uno de los "primers".

Análisis de datos

Caracteres de historia de vida

Los análisis de supervivencia, vigor y daño por patógenos y herbívoros fueron realizados utilizando el paquete estadístico JMP 5.1 (SAS Institute, 2004)

Supervivencia

Para evaluar la supervivencia de las plántulas durante la realización del experimento se utilizó el Modelo de Cox (1972) de riesgos proporcionales (Proportional hazards), el cual es un método de regresión semiparamétrico que permite analizar el riesgo de mortalidad o la supervivencia en función de otras variables explicativas.

Este modelo no sólo analiza la relación entre la tasa de supervivencia y el tiempo, sino también la posible relación de otras variables registradas para cada individuo como hábitat, sitio, masa de la semilla y familia; esto permite calcular la tasa de mortalidad como función del tiempo y de las variables explicatorias (Vittinghoff *et al.*, 2005).

Vigor

Para evaluar las diferencias entre hábitats en el desempeño de las plántulas a través del tiempo, se analizaron caracteres como la tasa de crecimiento, el número de hojas y el área foliar de cada uno de los individuos mediante un análisis de varianza multivariado de medidas repetidas (MANOVA).

Las modificaciones de este análisis están basadas en el ANOVA y permiten evaluar cambios en más de una variable dependiente en donde éstas no pueden ser combinadas de forma simple; asimismo evalúa si los cambios en las variables independientes afectan de forma significativa las variables dependientes, identificando el grado de interacción entre las variables independientes y la relación con las variables dependientes (Quinn y Keough, 2002). Cuando un modelo de este tipo es aplicado a datos longitudinales, se supone que las medidas son múltiples variables que están relacionadas en los mismos individuos (altura, número de hojas, área foliar). Este tipo de modelo se basa en los componentes dados entre grupos y/o individuos del análisis, explicando la varianza de las variables dependientes en función de las diferencias que existen entre los individuos de diferentes grupos.

El MANOVA predice la distribución de las medias, considerando las covarianzas de cada grupo como errores aleatorios que no se explican por pertenecer a determinado grupo. Debe señalarse que el MANOVA define la estructura entre sujetos de los valores de observaciones dadas sin que éstos se relacionen con las posibles interacciones entre variables, teniendo como objetivo modelar los perfiles de las respuestas promedio en el tiempo (Arnau y Balluerka, 2004).

Daño por patógenos y/o herbívoros

El daño causado por patógenos o por herbívoros en plántulas de *S. portoricense* se evaluó mediante un análisis de varianza (ANOVA), el cual compara los valores de un grupo de datos respecto a otro y analiza las diferencias significativas que éstos presentan basado en la varianza global observada de cada uno de los grupos (Vittinghoff *et al.*, 2005).

Al mismo tiempo se evaluó el daño de plántulas atacadas por patógenos y herbívoros simultáneamente. Se realizó una tabla de contingencia para obtener los datos sólo de las plántulas que presentaban el ataque por ambos organismos en el mismo censo. Esto fue evaluado con un análisis de regresión logística, el cual predice cómo afecta en la probabilidad de aparición de un evento dicotómico, la presencia o ausencia de diversos factores y el nivel de los mismos (Vittinghoff *et al.*, 2005).

Las variables evaluadas para los tres análisis anteriores fueron el sitio, el bloque, el censo y la familia, teniendo como tratamiento el hábitat (fragmento y selva); los valores de daño registrados originalmente fueron obtenidos en porcentajes y fueron transformados con raíz cuadrada del arcoseno para normalizar los datos.

Genética de poblaciones

Frecuencias alélicas

Los ISSR's son marcadores moleculares de tipo dominante en donde no se puede estimar el número de individuos heterocigos, por lo que las frecuencias alélicas se estiman a partir de las frecuencias de los genotipos recesivos (q^2) (i.e., individuos que no presentan banda).

Para calcular las frecuencias alélicas de esta forma, en donde la población se encuentra bajo el supuesto de equilibrio de Hardy-Weinberg, partimos de que la frecuencia del alelo recesivo es la raíz cuadrada de la frecuencia de las ausencias, es decir: $x = q^2$, siendo $q = x^{1/2}$, mientras que $p = 1 - q$ para las frecuencias de los alelos dominantes (Lynch y Milligan, 1994). Sin embargo este cálculo puede arrojar estimaciones sesgadas, por lo que se utilizó la corrección propuesta por Lynch y Milligan (1994) para marcadores dominantes utilizando el programa TFPGA (Tools for Populations Genetics Analysis, versión 1.3; Miller, 1997). Esta corrección sugiere ignorar las muestras en donde el número de individuos homocigos nulos sean menores a tres, e igualmente recomienda realizar el análisis utilizando las bandas con frecuencias menores a $1 - (3/N)$, esto con el fin de evitar utilizar loci con altas frecuencias de alelos nulos (Lynch y Milligan, 1994).

Las diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de cada población fueron calculadas mediante una prueba de probabilidad combinada de Fisher, la cual realiza simulaciones al azar con cadenas de Markov. Esta prueba no presenta sesgo, aún cuando se analizan muestras pequeñas o bajas frecuencias alélicas. Los valores de probabilidad menores a 0.05 indican diferencias

significativas entre las frecuencias alélicas (Raymond y Rousset, 1995). Esta prueba fue realizada utilizando el programa TFPGA. Asimismo se realizó una prueba de verosimilitud (X^2) para hallar las posibles diferencias estadísticas entre las frecuencias alélicas de cada hábitat.

Variación genética

La heterocigosis (H_e) explica la variación genética y representa la frecuencia media de individuos heterocigos de una población, además de ser una de las formas más amplias de diversidad genética (Hedrick, 2000). Para este estudio, se calculó la heterocigosis suponiendo un sistema dialélico con la corrección de Lynch y Milligan (1994), que reduce el sesgo estadístico dado por los marcadores dominantes a partir de la siguiente fórmula:

$$H_e = 2q(1-q) + 2 \text{Var}(q)$$

en donde $\text{Var}(q) = \frac{(1-x)}{4N}$, $q = x^{1/2} \left[1 - \frac{\text{Var}(x)}{8x^2} \right]^{-1}$ y "x" es la

proporción de N individuos que presentan alelos nulos (Lynch y Milligan, 1994).

Además se calculó el porcentaje de loci polimórficos (P), en donde se realiza un conteo del número de loci polimórficos totales y se calcula la proporción que éstos representan sobre el número de loci totales examinados para una población. Se consideró como loci polimórficos aquellos en donde el alelo más común presentaba frecuencias ≤ 0.95 (Hedrick, 2000). La heterocigosis y el porcentaje de loci polimórficos para cada población y especie fueron calculados en el programa TFPGA. Para hallar diferencias significativas en el grado de

heterocigosis entre hábitat de selva y fragmento, se realizó una estimación de los límites de confianza al 95 % con el modelo de Student con el programa JMP 5.1 (SAS Institute, 2004).

El índice de Shannon (I), es otro estimador de diversidad genética que fue utilizado para conocer el grado de variación. Este índice reduce la abundancia de valores mediante el uso de un logaritmo natural, ya que éste presenta valores de cero a infinito y el límite mayor está dado por el número de loci examinados:

$$I = -\sum p_i \ln(p_i)$$

donde p_i es la proporción de i alelos en la población.

Shannon no supone el supuesto de H-W, sin embargo, éste calcula la diversidad mediante la presencia y ausencia de bandas y el estimado de diversidad genética se aproxima a los realizados por los coeficientes de similitud de bandeo. Shannon asigna altos niveles de diversidad a las poblaciones que presentan frecuencias alélicas intermedias, mientras que aquellas que presentan frecuencias alélicas altas muestran bajos niveles de diversidad (Lowe *et al.*, 2004). Shannon fue utilizado como un estimador alternativo para describir la diversidad genética sin tener que suponer los supuestos de H-W y poder comparar el nivel de variación con otras especies que presenten sistemas multialélicos. Para interpretar el valor de este índice y compararlo es importante considerar el tamaño de la muestra, número de loci y los datos faltantes que existen entre cada una de las poblaciones y entre especies (Lowe *et al.*, 2004). Las diferencias estadísticas entre hábitats fueron analizadas con

el modelo de Student y el índice de Shannon fue calculado en el programa POPGENE Versión 1.31 (Yeh *et al.*, 1999)

Estructura genética

Para conocer el grado de diferenciación genética, se calculó el coeficiente de coancestría, *Theta* (θ), el cual está definido como la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la misma población sean idénticos por descendencia, este se ve incrementado en el tiempo y nos dice que tan diferenciadas se encuentran las poblaciones entre sí (Reynolds *et al.*, 1983). *Theta* describe la relación existente entre pares de alelos dentro de una población respecto al total poblacional y esta no puede ser calculada sólo para una población debido a que hace referencia a la variación de un proceso evolutivo (Weir y Hill, 2002).

La diferenciación poblacional fue calculada mediante el algoritmo propuesto por Weir y Cockerham (1984) en el programa TFPGA, el cual analiza la varianza entre las frecuencias alélicas de las poblaciones y la correlación de éstas en las poblaciones respecto al total. El cálculo de los intervalos de confianza se hizo mediante un bootstrap con 1000 repeticiones y un nivel de confianza al 95%. Éste es un método con alto poder estadístico utilizado para sistemas dialélicos y está basado en la estructuración jerárquica de las poblaciones; éste supone que las poblaciones se encuentran en equilibrio mutación-deriva, donde las poblaciones comparten el mismo tiempo de divergencia del ancestro común (Lowe *et al.*, 2004).

Esta variación jerárquica se divide en tres niveles: total poblacional (F_{IT}), subpoblacional (F_{ST}) e individual (F_{IS}), estadísticos de Wright, de los cuales existen los coeficientes análogos θ , f y F propuestos por Weir y Cockerham (1984), así como los estadísticos 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) que sugiere Excoffier *et al.* (1992) para el cálculo de la estructuración genética mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA).

El AMOVA se considera una extensión a los estudios de Weir y Cockerham (1984) y se hizo con la finalidad de conocer la distribución de la varianza genética en diferentes niveles. Este análisis fue realizado en el programa Arlequin ver. 2.0 (Schneider, 2000) en donde se asignaron los datos con la siguiente división: hábitat de selva subdividido en tres poblaciones y hábitat de fragmento subdividido en cuatro poblaciones.

Este método realiza correlaciones de la diversidad haplotípica en diferentes niveles jerárquicos basado en el uso de matrices de distancia genética repartiendo la varianza entre y dentro de los grupos predefinidos. La ausencia de supuestos requeridos para hacer el análisis permite que sea un método ampliamente aplicable a diferentes tipos de datos moleculares incluyendo datos de marcadores dominantes, sin modificar la estructura básica del análisis (Excoffier *et al.*, 1992; Lowe *et al.*, 2005)

Flujo génico

El flujo génico está definido por la proporción de nuevos genes que migran hacia el interior de una población mediante la dispersión y logran un establecimiento exitoso (Lowe *et al.*, 2005). La estimación del flujo génico se realizó con un método indirecto a partir de *Theta* (equivalente a F_{ST}) y está dado por el número de migrantes (Nm) por generación hacia una población.

Este método fue propuesto por Slatkin y Barton (1989), quien sugiere que θ es un buen estimador para muestras grandes y niveles de flujo génico intermedios; este método está basado en el modelo de Islas de Wright y el cálculo del flujo génico se obtiene mediante el despeje de la fórmula para θ , la cual incluye una corrección propuesta por Crow y Aoki (1984):

$$\theta = \frac{1}{4Nm\alpha + 1}, \text{ en donde el despeje de } Nm \text{ es: } Nm = \frac{1}{4\alpha} \left(\frac{1}{\theta} - 1 \right)$$

siendo $\alpha = \left(\frac{n}{n-1} \right)^2$ y $n =$ número de poblaciones estudiadas.

Se considera que si $Nm > 1$, existe un alto intercambio de flujo génico entre las poblaciones y este valor puede ser suficiente para evitar la diferenciación genética dada por deriva (Slatkin y Barton, 1989).

Distancia Genética

Se define como distancia genética el grado de divergencia entre dos poblaciones emparentadas, y se puede calcular por medio del número de cambios en un codón por gen o el número de diferencias genéticas por locus. Este método puede ser aplicado a cualquier par de poblaciones, especies o géneros, (Nei, 1972, 1978).

Nei (1978), plantea tres medidas de distancias genéticas diferentes: distancia mínima (D_m , número de diferencias de codones entre dos poblaciones); distancia estándar (D , número de diferencias individuales independientes en las dos poblaciones asumiendo la misma tasa de cambio; distancia máxima (D' , realiza el mismo cálculo que D , suponiendo que el número de diferencias en todos los loci es diferente).

En este estudio se calculó la distancia genética estándar (D) para las siete poblaciones muestreadas por medio del algoritmo propuesto por Nei (1972):

$$D = -\log_e I$$

En donde $I = \frac{J_{xy}}{\sqrt{J_x J_y}}$ siendo $J_x = \sum x_i^2$ y $J_y = \sum y_i^2$, en donde J_x y J_y

representan la probabilidad de identidad de dos genes tomados al azar de la población X y de la población Y , siendo x_i y y_i , respectivamente, la frecuencia promedio de i alelos para cada población.

La expresión J_{xy} representa la identidad genética promedio de las poblaciones, en donde $J_{xy} = \sum x_i y_i$, siendo $x_i y_i$ el producto de las frecuencias promedio de i alelos para todos los loci en las poblaciones X y Y .

La distancia estándar supone que la tasa de diferencias genéticas por locus es la misma para cada loci. Asimismo propone que si la tasa de diferencias es constante se relaciona linealmente con la tasa de divergencia de las poblaciones y con la distancia geográfica en algunos modelos de migración (Nei, 1972). D toma valores de cero cuando las poblaciones tienen frecuencias alélicas iguales hasta infinito cuando las poblaciones no comparten ningún alelo (Hedrick, 2000)

Las distancias genéticas fueron calculadas en el programa TFPGA, utilizando la corrección de Lynch y Milligan (1994). Con la matriz de distancias genéticas, el programa realizó un dendograma con el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean). Este dendograma muestra de forma gráfica la cercanía de las poblaciones analizadas así como el porcentaje de loci que soportan cada una de las ramas, este fue realizado con 10,000 permutaciones de bootstrap.

Aislamiento por distancia

Se realizó la prueba de Mantel (1967) para conocer el grado de aislamiento por distancia de las poblaciones muestreadas. Esta prueba realiza el cálculo de la correlación lineal entre dos matrices de proximidad (Sokal y Rohlf, 1995), en este caso, utiliza la matriz de distancias genéticas de Nei (1972) y la matriz de

distancias geográficas entre pares de poblaciones, obtenida mediante el cálculo a partir de las coordenadas geográficas de cada población (Bogan, 2006).

La prueba se realizó en el programa TFPGA el cual hizo comparaciones de matrices mediante 10,000 permutaciones. El programa arrojó una gráfica la cual muestra la distribución espacial por pares de las poblaciones, el estadístico Z y la significancia de la prueba.

4. RESULTADOS

Caracteres de historia de vida

Germinación

Se sembraron 4460 semillas de diez árboles madre de *Sideroxylon portoricense*, de las cuales germinó el 16.45% (734 plántulas) en condiciones de invernadero, en un periodo de tres a siete meses. La masa promedio de las semillas sembradas de *Sideroxylon portoricense* fue de 0.94 gramos y de las semillas germinadas fue de 0.918 gramos (Tabla 4).

Tabla 4. Número y masa promedio de las semillas sembradas y germinadas para cada familia de *Sideroxylon portoricense* en el invernadero de la "Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas".

Familia	Número de semillas sembradas	Masa promedio de las semillas sembradas (g)	Semillas germinadas (%)	Masa promedio de las semillas germinadas (g)
1	520	0.63	10.5	0.63
2	520	1.01	14.0	1.03
3	520	1.22	5.1	1.31
4	520	0.67	29.0	0.68
5	520	0.84	15.5	0.85
6	520	0.92	8.6	0.94
7	520	1.24	17.8	1.24
8	200	0.87	52.5	0.92
9	480	0.92	18.3	0.91
10	140	1.02	37.1	1.08
Total	4460		16.45 %	
Promedio		0.94 ± 0.27		0.918 ± 0.23

Masa de la semilla.

Se encontraron diferencias significativas en la masa promedio de las semillas de las plántulas supervivientes entre familias (Figura 8). La partición de la varianza (Tabla 5) sugiere que existe un componente genético en las diferencias entre familias para la masa de la semilla.

Tabla 5. Análisis de varianza para la masa de las semillas colectadas de los diez árboles madre de *Sideroxylon portoricense*.

Fuente	g.l.	S. C.	C. M	P	Var. Fen.	Prop. Var.
Familia	9	183.748	20.4164	<0.0000	0.0462	56.876
Error	4449	155.8712	0.035		0.035	43.124
Total	4458	339.6193			0.0812	100

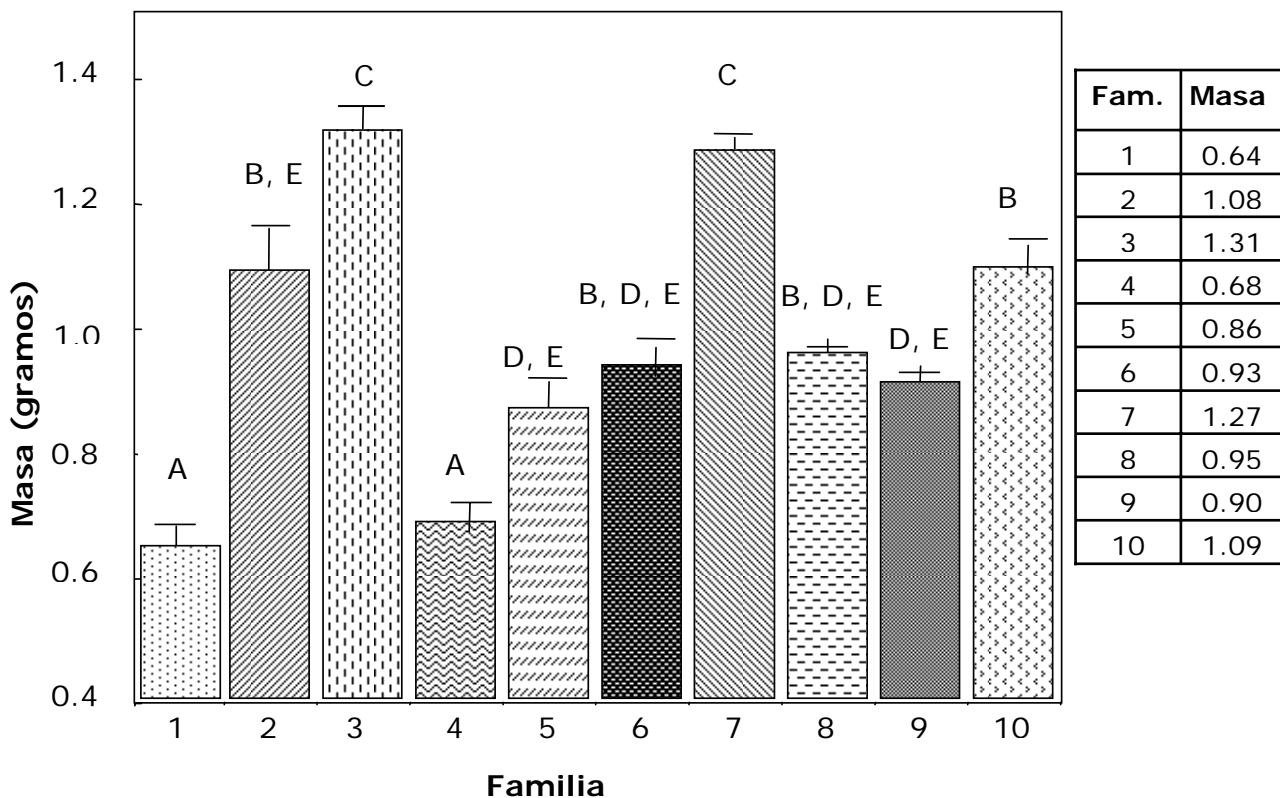


Figura 8. Masa promedio de las semillas por familia de las plántulas supervivientes de *Sideroxylon portoricense* en la región de los Tuxtlas, Veracruz. Las diferentes letras indican diferencias significativas en la masa de la semilla entre familias. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey, (SPSS 16).

Se encontró que el promedio de la masa de las semillas de las plántulas supervivientes en selva fue de 1.01 g, siendo significativamente mayor que el promedio de la masa de las semillas de las plántulas supervivientes en fragmento (0.89 g) (Figura 9, tabla 6).



Figura 9. Masa promedio de las semillas de las plántulas supervivientes de *Sideroxylon portoricense* para hábitat de selva y fragmento en la región de los Tuxtlas, Veracruz.

Tabla 6. Análisis de varianza de la masa de las semillas de las plántulas supervivientes de *Sideroxylon portoricense* sembradas en selva continua y fragmento en la región de los Tuxtlas, Veracruz.

Fuente	g.l.	S.C.	F	P
Familia	9	7.1616	50.7248	<0.0001
Hábitat	1	0.1168	7.4495	0.007
Hábitat x familia	9	0.1835	1.2999	0.2399

De la misma forma, el análisis que se realizó para comparar la masa de las semillas de plántulas vivas y muertas en la selva, mostró que existen diferencias significativas entre el promedio de las plántulas vivas (1.01 g) y el de las plántulas muertas (0.89 g) (Figura 10, tabla 6); mientras que para los fragmentos no existen diferencias significativas entre los promedios de la masa de las plántulas vivas y muertas (Figura 10, tabla 8).

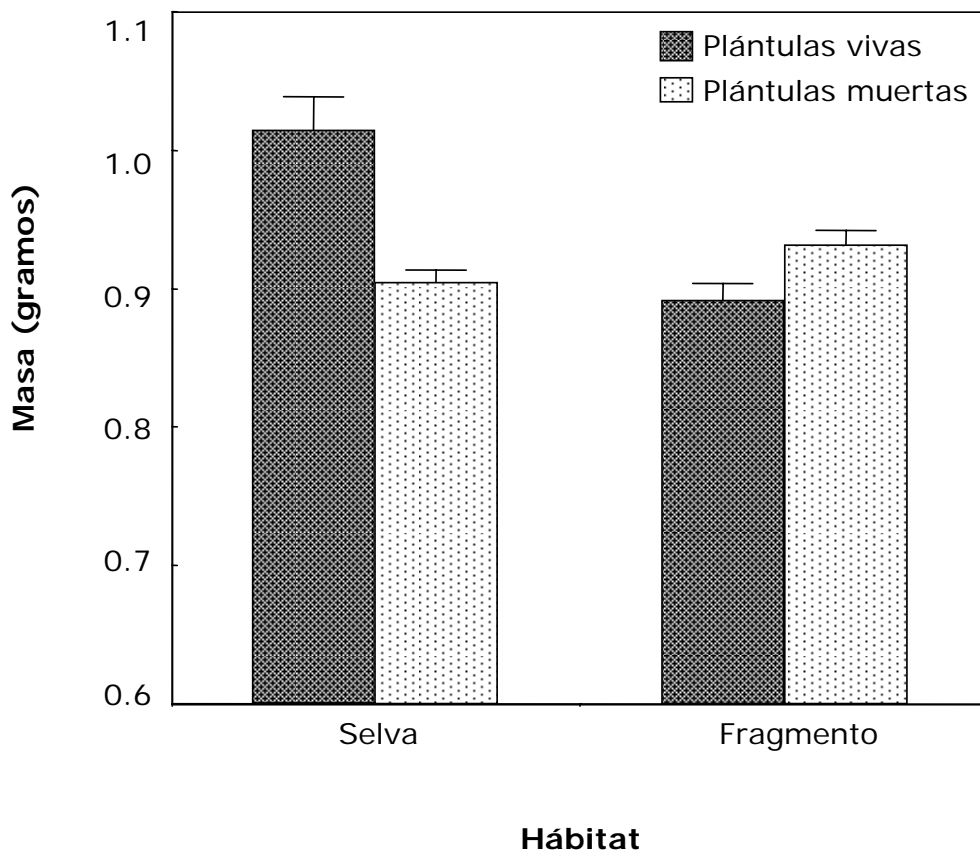


Figura 10. Masa promedio de las semillas de las plántulas vivas y muertas de *Sideroxylon portoricense* para hábitat de selva y fragmento en la región de los Tuxtlas, Veracruz.

Tabla 8. Análisis de varianza de la masa de las semillas de las plántulas muertas de *Sideroxylon portoricense* en la región de los Tuxtlas, Veracruz.

Fuente	g.l.	S.C.	F	P
Hábitat	1	0.0199	1.0903	0.2969
Familia	9	19.6764	119.7599	<0.0001
Hábitat x familia	6	0.1610	0.9803	0.4552

Supervivencia

Las 734 plántulas germinadas que sobrevivieron en el invernadero, fueron transplantadas equitativamente en cuatro sitios experimentales, dos de selva continua y dos de fragmentos, de las cuales sólo sobrevivió el 26.37% en ambos hábitats hasta el final del experimento que tuvo una duración de 313 días.

La proporción de plántulas supervivientes mostró diferencias significativas entre hábitats, sitios y bloques, teniendo 13.42 % de supervivencia en selva y 39.94% en fragmentos (Figura 11, tabla 9).

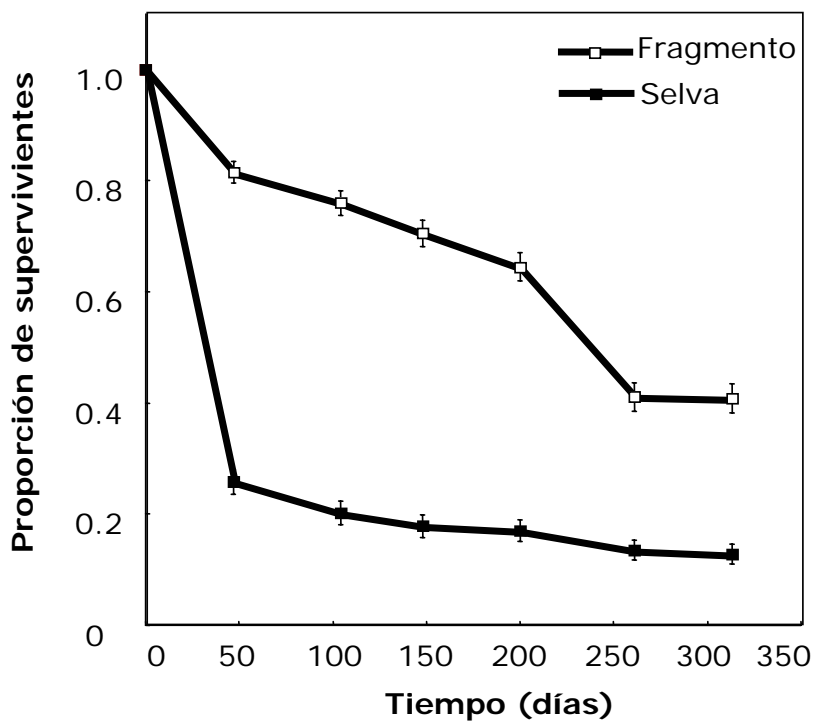


Figura 11. Supervivencia de plántulas de *Sideroxylon portoricense* para hábitat de selva continua y de fragmento a través del tiempo en la región de los Tuxtlas, Veracruz.

La supervivencia registrada entre sitios presenta diferencias significativas entre cada uno de ellos, manteniendo la misma tendencia en la supervivencia del hábitat (Figura 12, tabla 9).

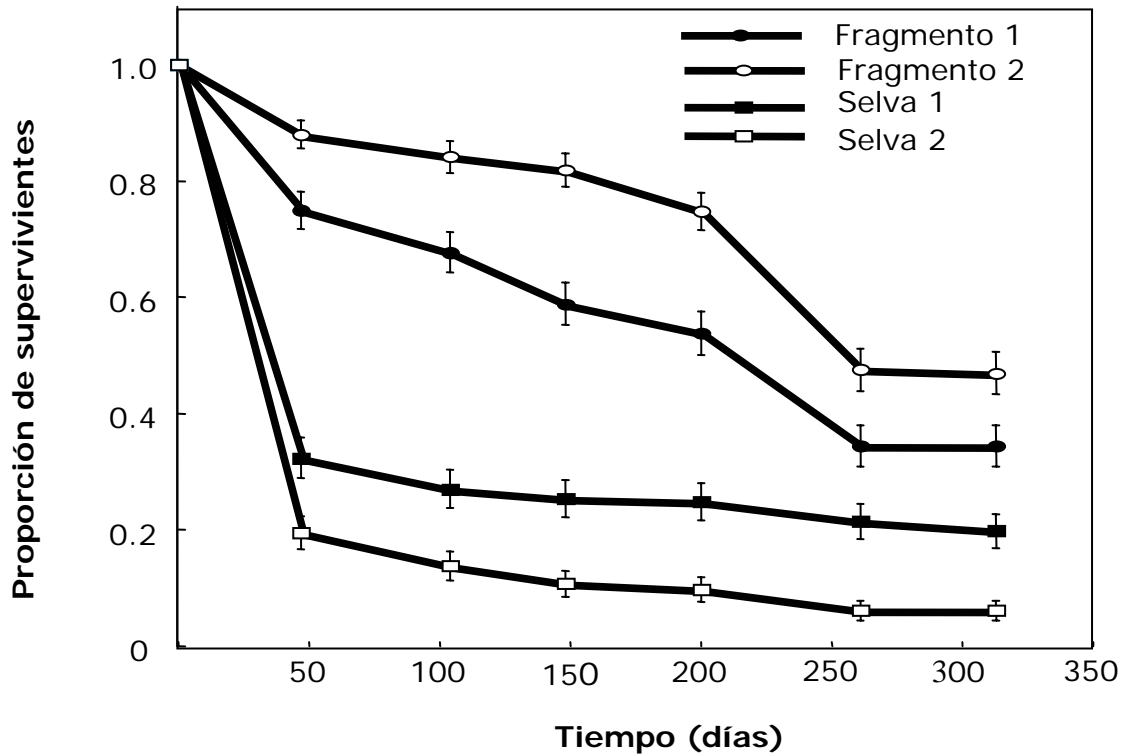


Figura 12. Supervivencia de plántulas de *Sideroxylon portoricense* por sitio en hábitat de selva y fragmento a través del tiempo en la región de los Tuxtlas, Veracruz.

Tabla 9. Análisis de supervivencia de plántulas de *S. portoricense* en sitios de selva y fragmento a través del tiempo en la región de los Tuxtlas, Veracruz.

Fuente	g.l.	χ^2	P
Hábitat	1	81.7870	<0.0000
Sitio (hábitat)	2	20.4808	<0.0000
Bloque (Sitio x hábitat)	4	11.5755	<0.0208
Familia	9	5.0511	0.8298
Familia x hábitat	9	4.2768	0.8923

No se encontraron diferencias significativas en la proporción de plántulas supervivientes en cada una de las familias a través del tiempo, estas mostraron una tendencia similar en la supervivencia sin importar la varianza familiar (Figura 13, tabla 9).

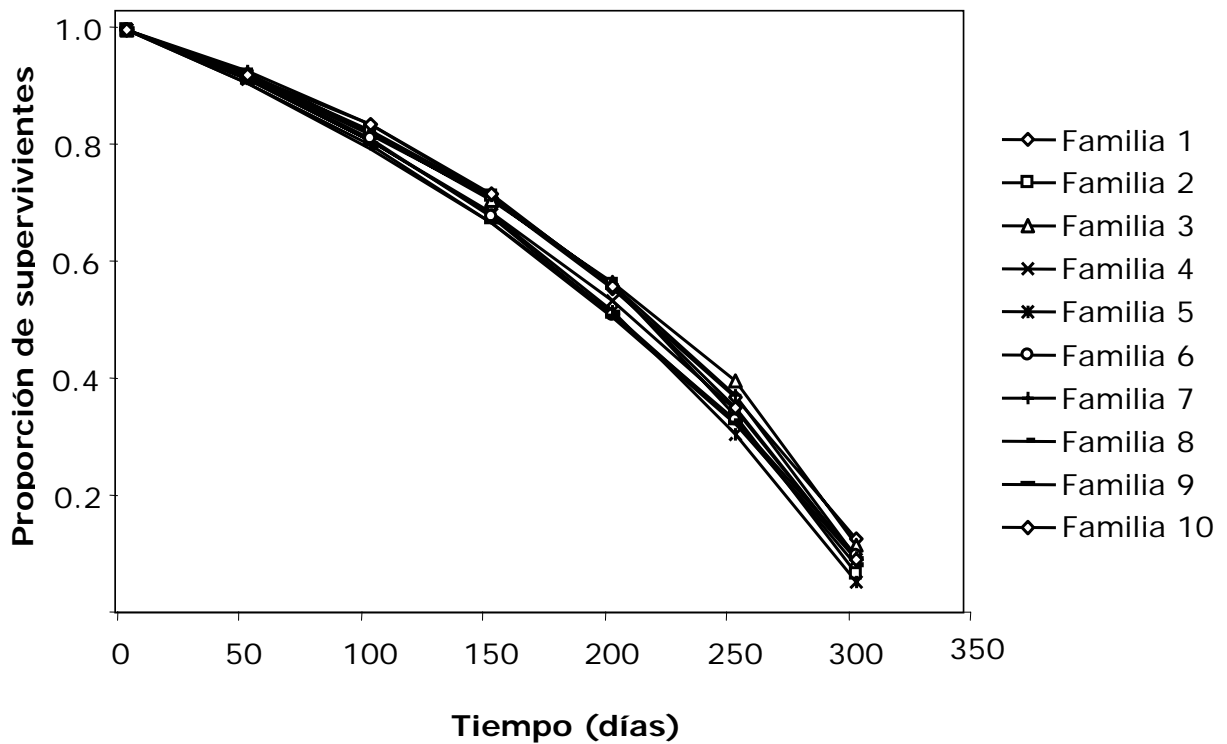


Figura 13. Supervivencia de plántulas de selva y fragmento de *Sideroxylon portoricense* para cada familia a través del tiempo en la región de los Tuxtlas, Veracruz.

Altura

En cuanto a la altura promedio para cada hábitat, no se encontraron diferencias significativas en el tiempo total del experimento, sin embargo cuando esta se analiza a partir de los cien días de establecimiento y hasta el final, se puede encontrar que la altura difieren significativamente entre las plántulas de sitios fragmentados respecto a las de selva continua ($P= 0.0458$) (Figura 14). Para el caso de cada una de las familias de *Sideroxylon portoricense* se hallaron diferencias significativas en el crecimiento a lo largo del tiempo (Figura 15, tabla 10)

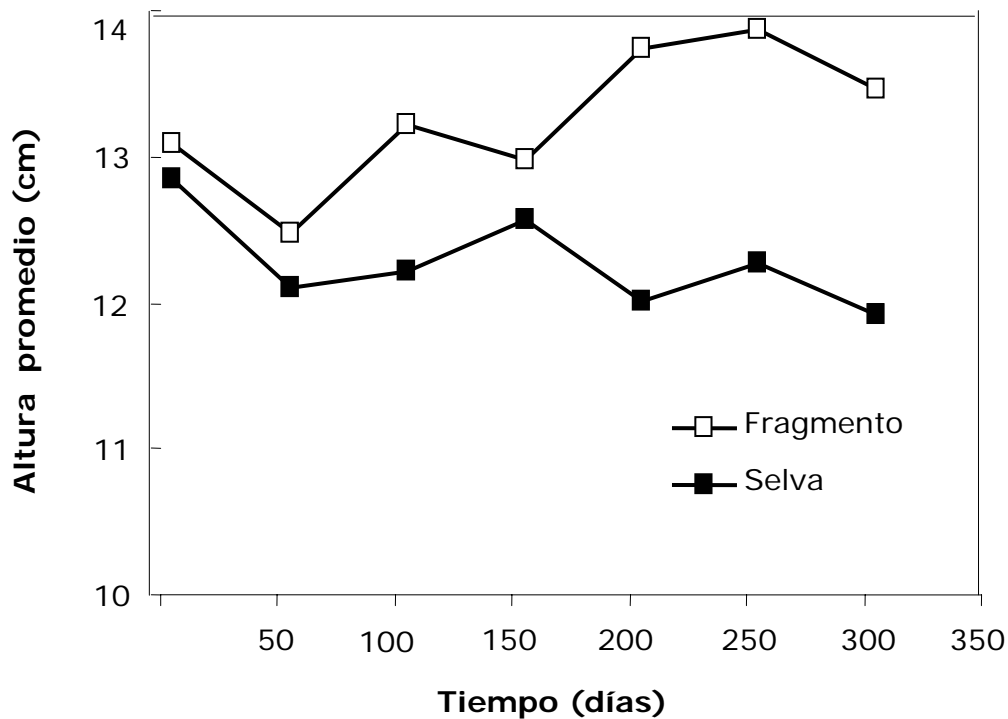


Figura 14. Altura promedio de plántulas de *Sideroxylon portoricense* en zonas de selva continua y fragmentos a través del tiempo en la región de los Tuxtlas, Veracruz.

Tabla 10. Análisis de varianza de medidas repetidas (MANOVA) para la altura de plántulas de *Sideroxylon portoricense* en zonas de selva continua y fragmentos a través del tiempo en la región de los Tuxtlas, Veracruz.

Fuente	g.l.	F	P
Hábitat	1	2.6135	0.1018
Familia	9	4.2403	<0.0001
Familia x hábitat	9	1.2461	0.2714

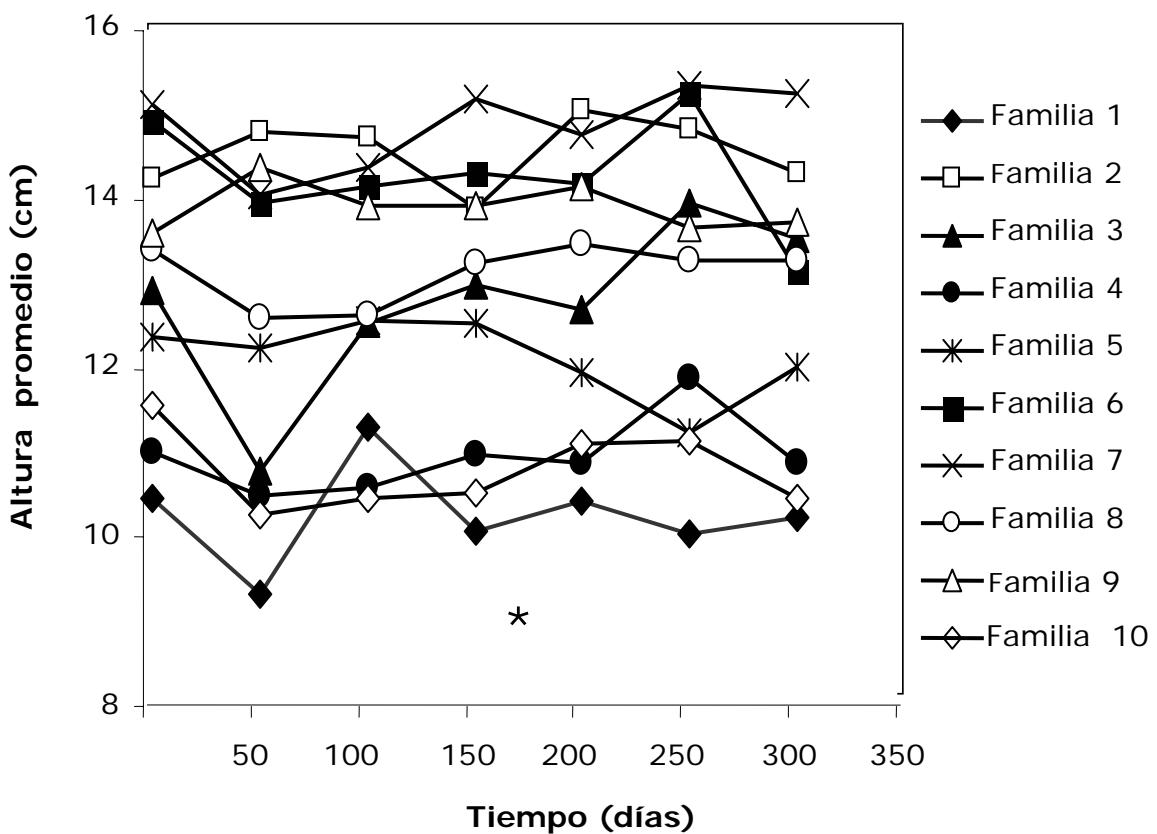


Figura 15. Altura promedio de plántulas de *Sideroxylon portoricense* para cada familia a través del tiempo en la región de los Tuxtlas, Veracruz.

Número de hojas.

La producción foliar muestra diferencias significativas entre hábitats (Tabla 11). El número de hojas producidas por las plántulas en las zonas fragmentadas fue significativamente mayor respecto a la producción de hojas en la selva continua a lo largo de todo el experimento, también se hallaron diferencias significativas en el número de hojas producidas entre cada censo para ambos hábitats (Figura 16.a).

En cuanto a la producción en el número de hojas por familia, se observó que las plántulas establecidas en las zonas de fragmento tienen una mayor producción respecto a las plántulas de las zonas de selva. Estas diferencias fueron significativas en los fragmentos para la mayoría de las familias (Tabla 11, figura 16 b).

Tabla 11. Análisis de producción foliar de plántulas de *Sideroxylon portoricense* en sitios de selva y fragmento a través de tiempo en la región de los Tuxtlas, Veracruz.

Fuente	g.l	S.C.	F	P
Hábitat	1	97.7244	392.0631	<0.0001
Sitio (hábitat)	2	2.6971	5.5818	0.0038
Bloque (sitio x hábitat)	4	2.2047	2.2813	0.0584
Censo	6	158.8121	109.5535	<0.0001
Hábitat x censo	6	45.737	31.5508	<0.0001
Familia	9	11.5703	5.3211	<0.0001

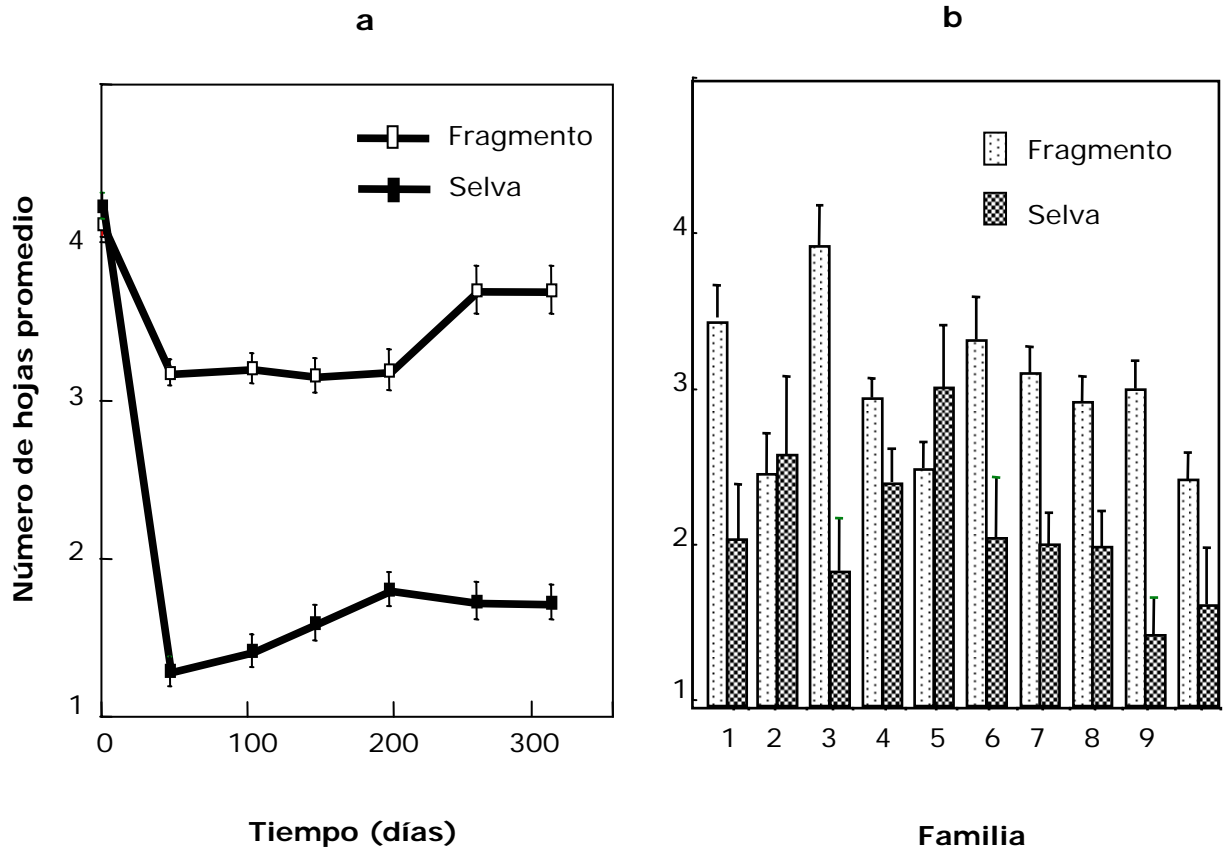


Figura 16.a. Número de hojas producidas por plántulas de *Sideroxylon portoricense* para hábitat de selva y fragmento a través del tiempo. Figura 16.b. producción foliar por familia en sitios de selva continua y fragmentos en la región de los Tuxtlas, Veracruz.

Área foliar

Este carácter mostró diferencias significativas entre hábitats a través del tiempo (Tabla 12). Los sitios de selva continua presentaron una fuerte disminución en la producción de área foliar, mientras que en los fragmentos ésta se mantuvo fluctuante sin que el área producida fuera significativa al final del experimento (Figura 17).

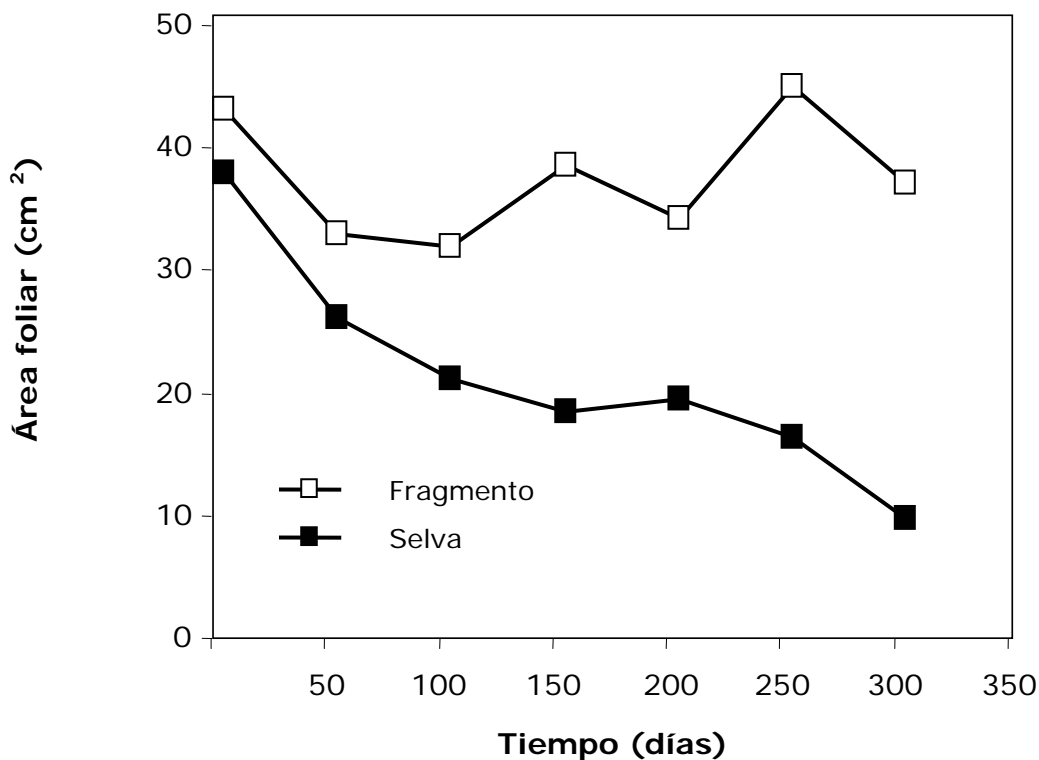


Figura 17. Área foliar promedio de plántulas de *Sideroxylon portoricense* en sitios de selva continua y fragmentos a través del tiempo, en la zona e los Tuxtlas, Veracruz.

Tabla 12. Análisis de varianza de medidas repetidas (MANOVA) para el área foliar de plántulas de *Sideroxylon portoricense* en zonas de selva continua y fragmentos.

Fuente	g.l.	F	P
Hábitat	1	14.0452	0.0003
Familia	9	1.2549	0.2699

Daño por patógenos

El ataque por patógenos fue significativamente mayor para las plántulas establecidas en fragmentos respecto a los sitios de selva (Figura 18.a, tabla 13). Estas diferencias significativas también se hallaron a través del tiempo en cada censo y para las familias establecidas en fragmentos (Figura 18.b).

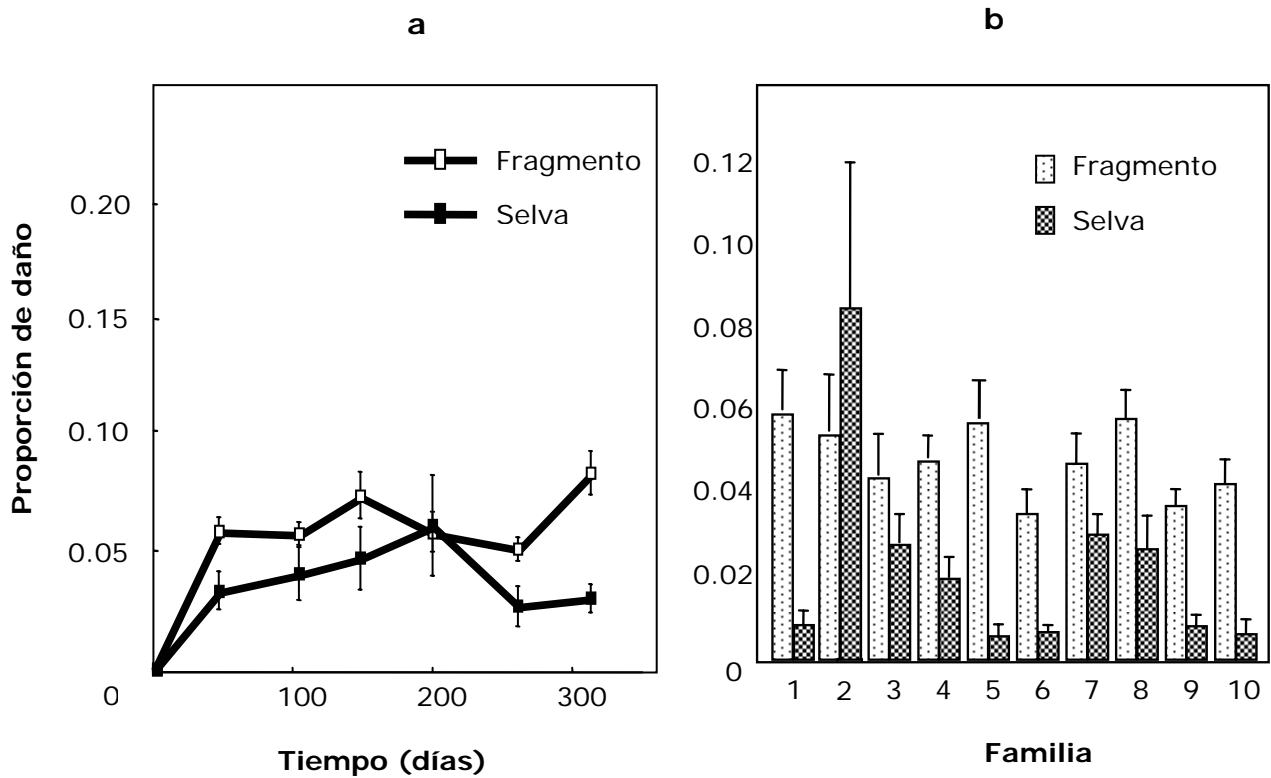


Figura 18.a. Daño por patógenos en plántulas de *S. portoricense* en hábitat de selva y fragmento a través del tiempo. Figura 18.b. Daño por patógenos para cada familia en sitios de selva continua y fragmentos en la región de los Tuxtlas, Veracruz.

Tabla 13. Análisis de varianza de la proporción de daño por patógenos en plántulas de *Sideroxylon portoricense* en la región de los Tuxtlas, Veracruz.

Fuente	g.l	S. C	F	P
Hábitat	1	0.3753	18.0089	<0.0001
Sitio (hábitat)	2	0.1209	2.9023	<0.0551
Bloque (hábitat x sitio)	4	0.1374	1.6488	0.1593
Censo	6	4.8742	46.7737	<0.0001
Hábitat x censo	6	0.5686	5.4571	0.0001
Familia	9	0.7649	3.6701	<0.0001

Herbívoros

El daño registrado por herbívoros, muestra la misma tendencia que el daño por patógenos, en dónde las plántulas establecidas en fragmentos son más atacadas respecto a las plántulas de la selva (Figura 19.a). Estas diferencias son significativas para el hábitat, los sitios dentro de hábitats y entre cada uno de los censos (Tabla 14). El daño por herbívoros para cada una de las familias también fue significativamente mayor en las plántulas establecidas en fragmentos (Figura 19.b, tabla 14).

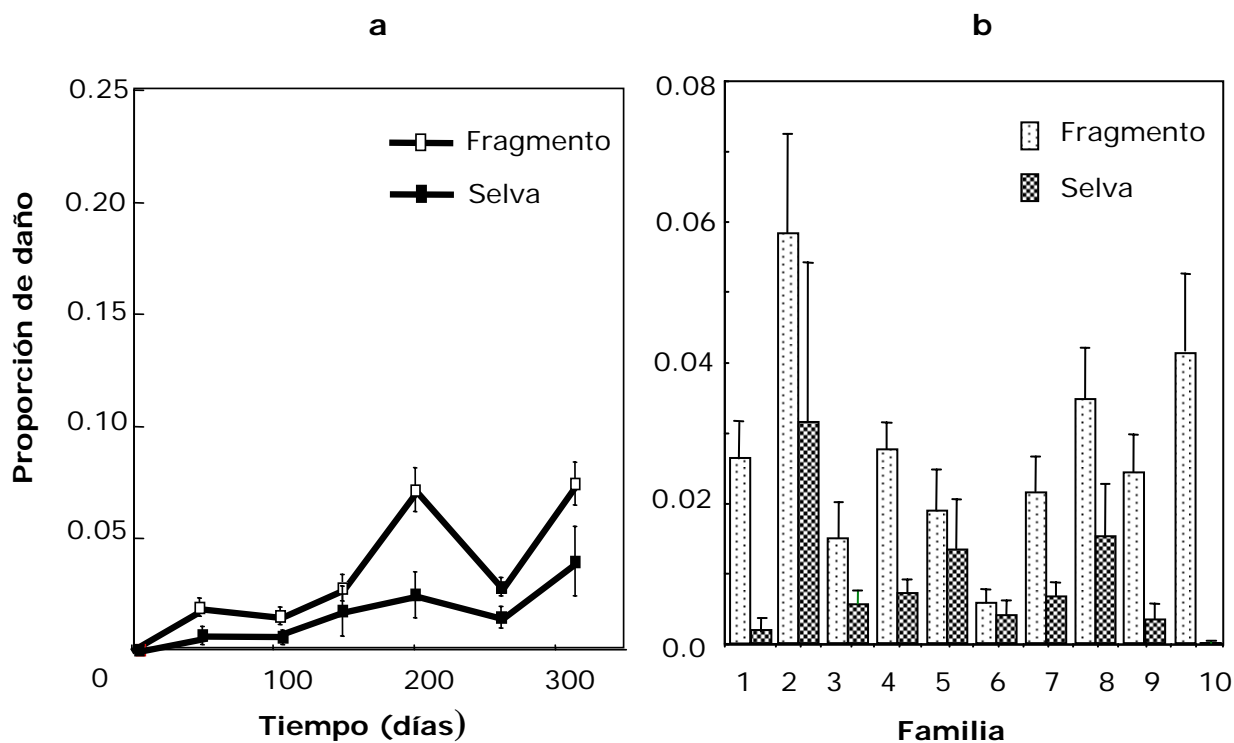


Figura 19.a. Daño por herbívoros en plántulas de *S. portoricense* en hábitat de selva y fragmento a través del tiempo. Figura 19.b. Daño por herbívoros para cada familia en sitios de selva continua y fragmentos en la región de los Tuxtlas, Veracruz.

Tabla 14. Análisis de varianza de la proporción de daño por herbívoros en plántulas de *Sideroxylon portoricense* en la región de los Tuxtlas, Veracruz.

Fuente	g.l	S. C	F	P
Hábitat	1	0.4508	27.3548	<0.0001
Sitio (hábitat)	2	0.6443	19.5491	<0.0001
Bloque (hábitat x sitio)	4	0.0183	0.2778	0.8925
Censo	6	3.7449	37.8732	<0.0001
Hábitat x censo	6	0.4013	4.059	0.0005
Familia	9	0.7896	5.3237	<0.0001

Daño por patógenos y herbívoros

Se encontró que la proporción de plántulas dañadas al mismo tiempo por patógenos y herbívoros (Tabla 15) es significativamente mayor en los sitios de fragmento respecto a los sitios de selva a través del tiempo. También se muestran diferencias significativas en la proporción de plántulas atacadas entre un censo y otro (Figura 19, tabla 16).

Tabla 15. Criterio utilizado para obtener la proporción de plántulas atacadas de *S. portoricense* por patógenos y herbívoros al mismo tiempo (1,1), en bosque continuo y fragmentado en la región de los Tuxtlas, Veracruz. El "0" indica la ausencia de patógenos y/o herbívoros y el "1" indica presencia.

	0	1	
0	0,0	1,0	Patógenos
1	0,1	1,1	
	Herbívoros		

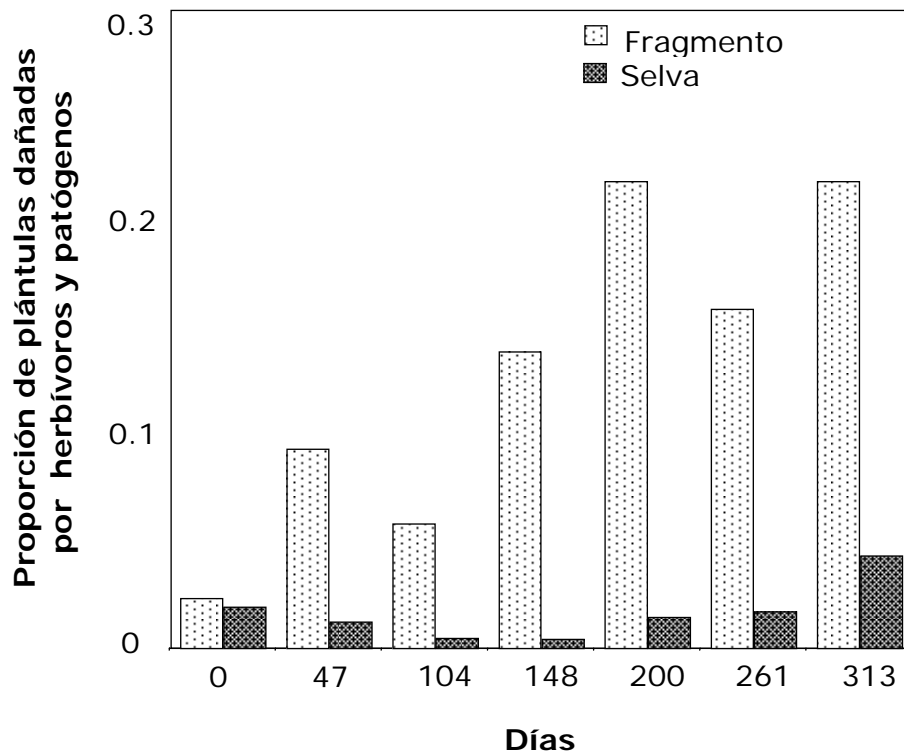


Figura 19. Proporción de plántulas de *Sideroxylon portoricense* dañadas por patógenos y herbívoros a través en el tiempo para las zonas de selva y de fragmentos. El número de día corresponde al número de censo realizado en el campo.

Tabla 16. Análisis de varianza de la proporción de plántulas dañadas por patógenos y herbívoros en hábitat de selva y fragmento en la región de los Tuxtlas, Veracruz.

Fuente	g.l.	χ^2	P
Hábitat	1	28.9723	<0.0000
Censo	6	50.3338	<0.0000
Herbivoría	1	97.39	<0.0000
Hábitat x Censo	6	20.0706	0.0027
Hábitat x herbivoría	1	5.2176	0.0224
Censo x herbivoría	6	85.201	<0.0000

Luz

Se encontró que el promedio de la cantidad de luz que incide sobre las plántulas de *Sideroxylon portoricense* es significativamente mayor en los fragmentos respecto a las zonas de selva. De la misma forma, el promedio en la cantidad de luz que incide en cada uno de los sitios de fragmento presenta diferencias significativas respecto a los sitios de selva (Figura 20, tabla 17).

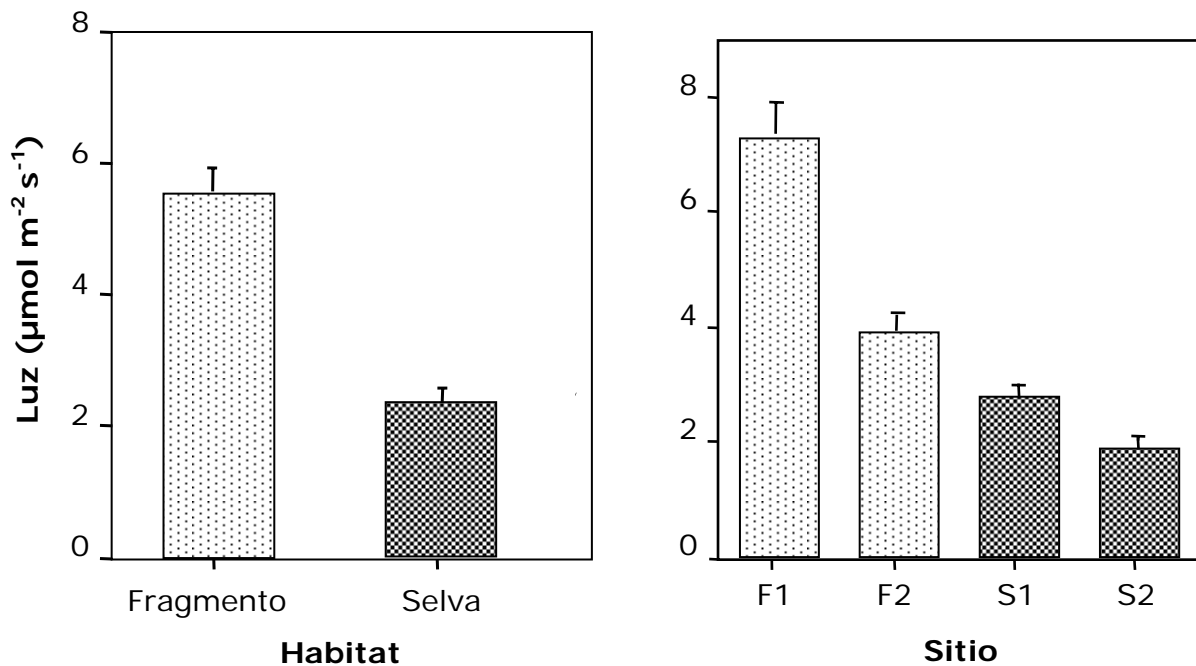


Figura 20. Incidencia de luz sobre las plántulas de *Sideroxylon portoricense* en hábitat de selva y fragmento y para cada uno de los sitios dentro del hábitat, en la región de los Tuxtlas, Veracruz.

Tabla 17. Análisis de varianza de la cantidad de luz al interior de los sitios de selva continua y fragmentos.

Fuente	g.l	S. C	F	P
Hábitat	1	9.1773	79.7647	<0.0001
Sitio (hábitat)	2	4.5553	19.7966	<0.0001
Bloque (sitio x hábitat)	4	0.8042	1.7476	0.149

Genética de poblaciones

Extracción de ADN

Se extrajo ADN de 89 individuos adultos de *Sideroxylon portoricense* correspondientes a siete poblaciones, tres de selva y cuatro fragmento, obteniendo un promedio de 300 ng/ μ l que sirvió para hacer diluciones y realizar el experimento (Figura 21)

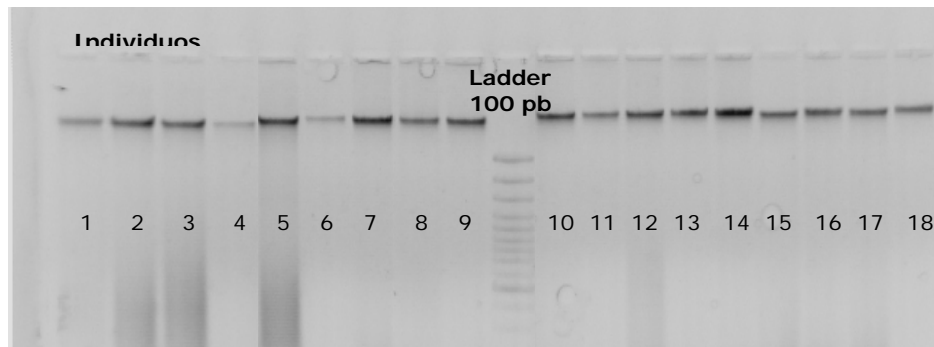


Figura 21. Gel de extracciones de ADN total de individuos de poblaciones adultas de *Sideroxylon portoricense* de la región de los Tuxtlas, Veracruz.

A partir de los seis "primers" utilizados (Figura 22.a y 22.b), se obtuvo un total de 86 bandas polimórficas consideradas cada una como un locus, con un rango de peso molecular de 210 a 1600 pares de base (Tabla 18).

Tabla 18. Número de loci y peso molecular de los "primers" utilizados para la amplificación de ADN de *S. portoricense* de la región de los Tuxtlas, Veracruz.

Primer	No. de loci	Peso molecular (pb)
808	16	1100- 220
811	14	920- 230
835	17	1230- 210
842	12	1200- 210
861	16	1600- 240
888	11	1200- 230
locus	86	

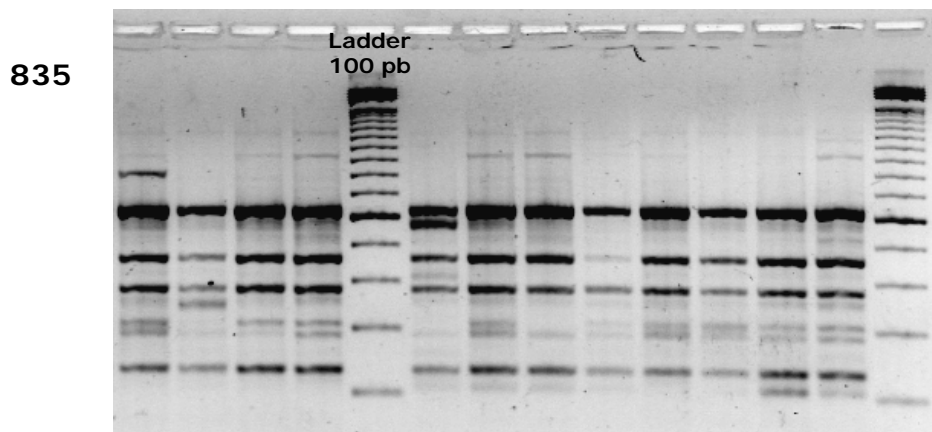
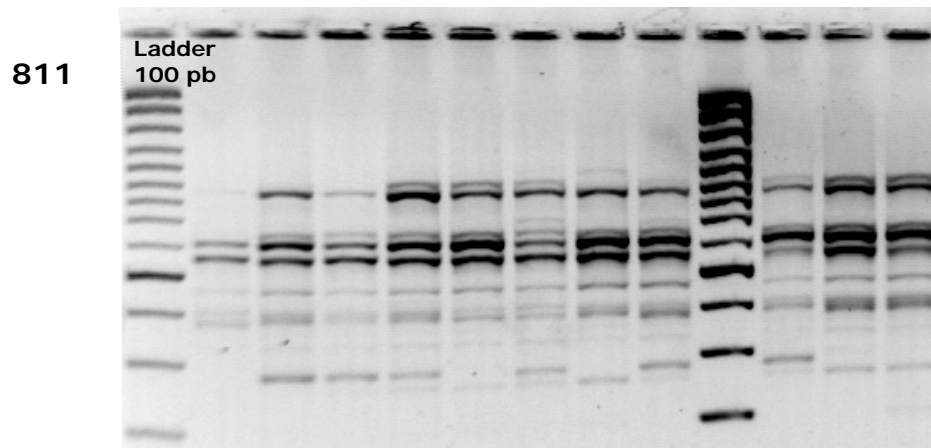
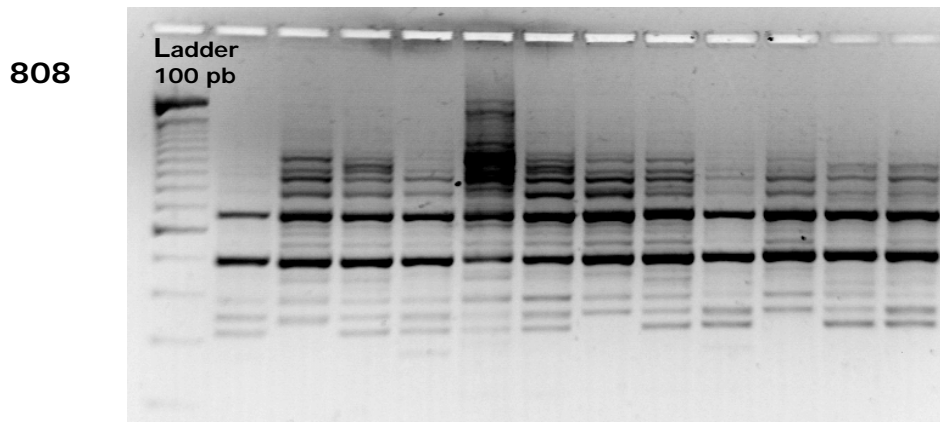


Figura 22.a. Fotografías de los geles de ISSR's amplificados de individuos adultos de *Sideroxylon portoricense* de la región de los Tuxtlas; "primer" 808 (16 loci; bandas de 1100 a 220 pb), 811 (14 loci; bandas de 920 a 230 pb) y 835 (17 loci; bandas de 1230 a 210 pb.)

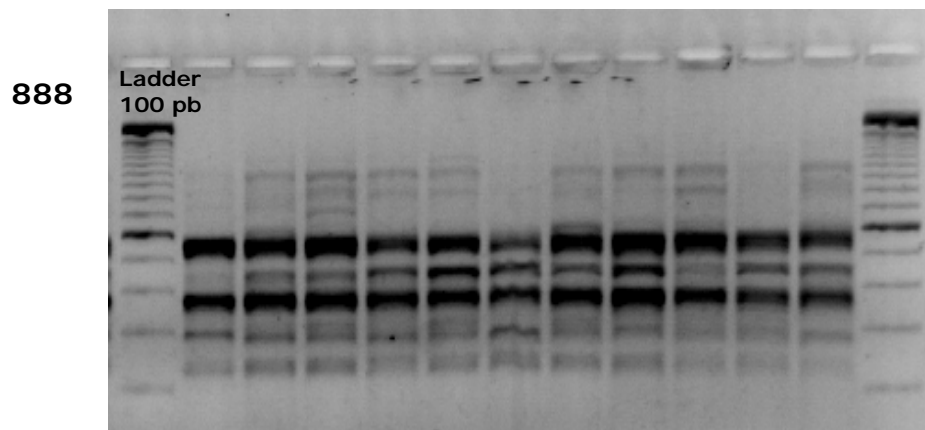
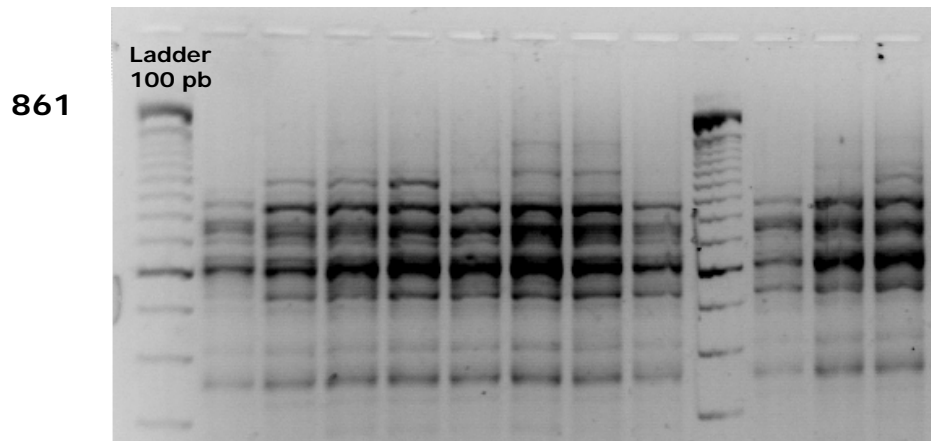
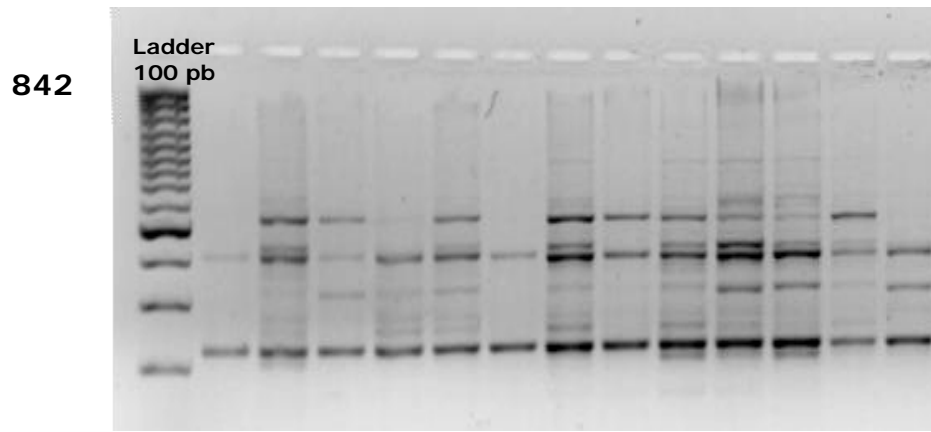


Figura 22.b. Fotografías de los geles ISSR's amplificados de individuos adultos de *Sideroxylon portoricense* de la región de los Tuxtlas, Veracruz; "primer" 842 (12 loci; bandas de 1200 a 210 pb), 861 (16 loci; bandas de 1200 a 240 pb) y 888 (11 loci; bandas de 1200 a 230 pb).

Variación genética

El cálculo de las frecuencias alélicas entre poblaciones de *S. portoricense*, mostró diferencias significativas (Apéndice 2), teniendo 72 de 86 loci diferentes. No se hallaron diferencias significativas en el cálculo de las frecuencias alélicas de poblaciones de selva respecto a las poblaciones de fragmento (prueba de verosimilitud, $\chi^2 = 0.0796$, $P = 0.7777$). Las frecuencias alélicas de cada una de las poblaciones de *S. Portoricense* pueden consultarse en el Apéndice 3 y 4.

Los niveles de heterocigosis, porcentaje de loci polimórficos e índice de Shannon hallados para la especie fueron los siguientes: $H_e = 0.3524 \pm 0.1248$; %P = 100; $I = 0.5264 \pm 0.1457$ (Tabla 19). Asimismo se encontró que los índices de variación más altos en las poblaciones de *S. portoricense* están representados en el continuo "Selva 2" ($H_e = 0.3078$; %P = 80.23; $I = 0.4501$), mientras que los valores más bajos se encuentran en el fragmento "Laguna Escondida" ($H_e = 0.1731$; %P = 46.51; $I = 0.2436$) (Tabla 19).

Los índices de variación también fueron calculados para cada hábitat, en donde se utilizaron los loci de todos de los individuos de selva para un grupo (44) y los loci de todos los individuos de fragmento para el otro grupo (45). Se encontró que los niveles de variación son más altos para las poblaciones de selva ($H_e = 0.3491 \pm 0.1355$; %P = 94.18; $I = 0.5297 \pm 0.1680$) en contraste con las poblaciones de fragmento ($H_e = 0.3105 \pm 0.1513$; %P = 89.53; $I = 0.4795 \pm 0.1893$) (Tabla 19), sin que estos muestren diferencias significativas (H_e : $t = 1.61$, $p = 0.1092$; I : $t = 1.84$, $p = 0.0675$). La heterocigosis para cada locus por hábitat se muestra en el apéndice 5.

Tabla 19. Índices de variación genética para cada una de las poblaciones de *Sideroxylon portoricense* en hábitat de selva y fragmento de la región de los Tuxtlas, Veracruz. Tamaño de la población (N); heterocigosis esperada (H_e); porcentaje de loci polimórficos (% P, criterio del 95%) e Índice de Shannon (I).

Hábitat	Población	N	H_e	%P	I
Selva					
	"Selva 1"	13	0.2422	58.13	0.3457
	"Selva 2"	19	0.3078	80.23	0.4501
	"Selva 3"	12	0.2145	53.48	0.3061
	Selva	44	0.3491	94.18	0.5297
			(± 0.1355)		(± 0.1680)
Fragmento					
	"Laguna Azul"	10	0.2082	54.65	0.2944
	"Laguna Escondida"	9	0.1731	46.51	0.2436
	"Ruiz Cortinez"	12	0.2152	52.32	0.3210
	"Domingo"	14	0.2485	68.60	0.3747
	Fragmento	45	0.3105	89.53	0.4795
			(± 0.1513)		(± 0.1893)
Especie		89	0.3524	100	0.5264
			(± 0.1248)		(± 0.1457)

De la misma forma se calcularon los índices de variación para cada uno de los "primers" utilizados para *S. portoricense*, siendo el primer 842 el que presentó mayor nivel de variación ($H_e = 0.3966 \pm 0.1005$; $I = 0.5813 \pm 0.1128$) y los niveles de variación más bajos se presentaron en el "primer" 835 ($H_e = 0.3206 \pm 0.1438$; $I = 0.4887 \pm 0.1726$) (Tabla 20).

Tabla 20. Índices de variación genética de los seis “primers” utilizados para *Sideroxylon portoricense* con los datos de todas las poblaciones. Heterocigosis esperada (H_e); número de loci polimórficos por primer (n.l.); porcentaje de loci polimórficos (% P, criterio del 95%) e Índice de Shannon (I).

“Primer”	H_e	n.l.	%P	I
808	0.3246 (\pm 0.1344)	16	100	0.4956 (\pm 0.1585)
811	0.3779 (\pm 0.1145)	14	100	0.5592 (\pm 0.1304)
835	0.3206 (\pm 0.1438)	17	100	0.4887 (\pm 0.1726)
842	0.3966 (\pm 0.1005)	12	100	0.5813 (\pm 0.1128)
861	0.3464 (\pm 0.1217)	16	100	0.5226 (\pm 0.1425)
888	0.3555 (\pm 0.1201)	11	100	0.5335 (\pm 0.1394)

Estructura genética

Se encontró que existe una diferenciación global alta entre las poblaciones de *S. portoricense* ($\theta = 0.3708 \pm 0.0289$). El intervalo de confianza del 95% (1000 repeticiones) para θ de todas las poblaciones es de 0.3184 - 0.4237, por lo cual el valor promedio de θ difiere significativamente de cero. También se estimó la diferenciación genética para cada hábitat, en donde θ fue menor para los sitios de selva ($\theta = 0.3518$) en contraste con los sitios fragmento ($\theta = 0.3745$) sin diferir significativamente (Tabla 21). Los valores promedio de θ de para cada locus en todas las poblaciones pueden consultarse en el apéndice 6.

A partir de θ (equivalente a G_{st}) (Hedrick, 2000), se calculó el número de migrantes efectivos por generación (Nm) para la especie y para cada hábitat. Se encontró que el valor de Nm para *Sideroxylon portoricense* es de 0.3118, mientras que el valor de Nm para selva es de 0.2047 y de 0.2358 para los sitios de fragmento (Tabla 21).

Tabla 21. Diferenciación genética de *S. portoricense* obtenida mediante el algoritmo del coeficiente de coancestría (Weir y Cockerham, 1984) para hábitat de selva y fragmento en la región de los Tuxtlas, Veracruz. Diferenciación genética (θ); intervalo de confianza (IC 95%); estimación del flujo génico (Nm).

Hábitat	θ	IC 95%		Nm
		Inferior	Superior	
Selva	0.3518 \pm 0.0342	0.2797	0.4160	0.2047
Fragmento	0.3745 \pm 0.0367	0.3023	0.4467	0.2358
Global	0.3708 \pm 0.0289	0.3184	0.4237	0.3118

Se encontró que el 58.08% de la variación genética de *S. portoricense* esta dentro de cada una de las poblaciones con un valor de $\Phi_{ST} = 0.4192$ (valor equivalente a θ). El 40.04% de la variación genética se encontró entre las poblaciones dentro de las hábitats, mientras que el resto de la variación genética para la especie, se encuentra entre los hábitats y no resultó ser significativa (1.88%) (Figura 23, tabla 22).

Tabla 22. Análisis de varianza molecular (AMOVA, Excoffier *et al.* 2005) para las poblaciones adultas de *Sideroxylon portoricense* en la región de los Tuxtlas, Veracruz (* = P < 0.05). Se consideraron dos hábitats: selva y fragmento, en las cuales están representadas tres poblaciones de selva y cuatro poblaciones de fragmento.

Fuente	g.l.	S.C	Comp. Var.	%var.	Φ
Entre hábitats.	1	123.297	0.3409	1.88	0.0188
Entre poblaciones dentro de los hábitats.	5	502.663	7.2464	40.04*	0.4080
Dentro de las poblaciones.	82	862.085	10.5132	58.08*	0.4192

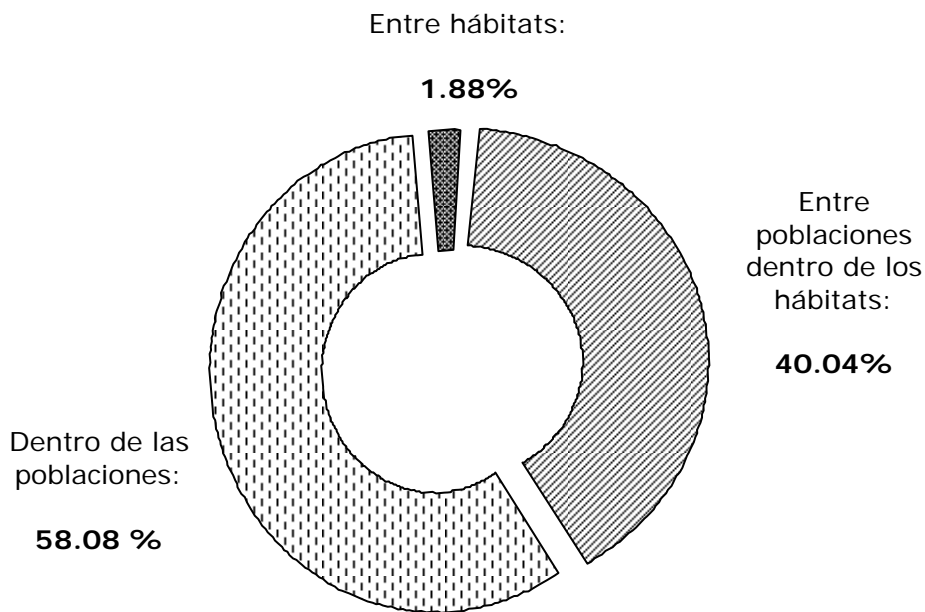


Figura 23. Representación gráfica de la distribución de la variación genética jerárquicamente en las poblaciones adultas de *Sideroxylon portoricense*, en la región de los Tuxtlas, Veracruz.

Distancias genéticas y aislamiento por distancia

La distancia genética promedio (D) entre todos los pares de poblaciones para *S. portoricense* fue de 0.2065 ± 0.0463 . Las poblaciones con menor similitud genética fueron dos fragmentos, "Laguna Azul" y "Laguna Escondida" con un valor de 0.0510, mientras que las poblaciones más emparentadas fueron "Selva 3" y "Laguna Escondida" con una distancia genética de 0.2821 (Tabla 23).

Tabla 23. Matriz de distancias genéticas (D) (Nei, 1978) y geográficas (Km.) (Bogan, 2006) entre las poblaciones de selva y fragmento de *Sideroxylon portoricense* en la región de los Tuxtlas, Veracruz. Las distancias geográficas se muestran sobre la diagonal, mientras que las genéticas por debajo de ella.

Población	Selva 1	Selva 2	Selva 3	Laguna Azul	Laguna Escondida	Domingo	Práxedes
Selva 1		0.3572	1.0887	2.0463	1.6287	1.0458	3.4389
Selva 2	0.1773		0.801	1.6992	1.2717	0.7353	3.1181
Selva 3	0.2141	0.2577		1.2041	0.9186	0.8922	2.3931
Lag. Azul	0.2134	0.2141	0.2304		0.5314	1.3619	2.1926
Lag. Esc.	0.2309	0.2456	0.2821	0.0510		0.8351	2.1187
Domingo	0.2190	0.1513	0.2256	0.2037	0.2305		2.3931
Práxedes	0.2042	0.2177	0.1953	0.1634	0.2048	0.2140	

Se realizó un dendograma mediante el algoritmo UPGMA utilizando un bootstrap de 10,000 permutaciones para visualizar gráficamente la relación genética de las poblaciones (Figura 24). La prueba de Mantel no resultó significativa ($Z= 6.7145$, $r= 0.1158$, $p= 0.2940$). No existe una correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica y se rechaza la hipótesis de aislamiento por distancia (Figura 25).

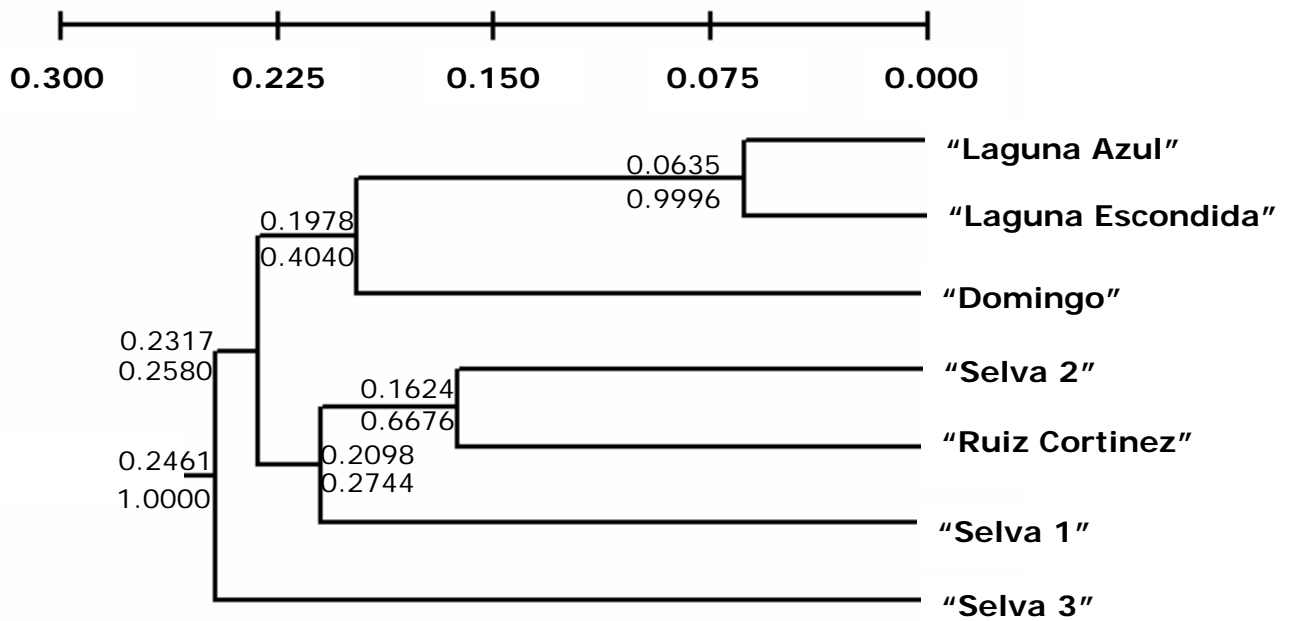


Figura 24. Dendrograma de las poblaciones de *S. portoricense* realizado con el algoritmo UPGMA. En la parte superior de cada nodo se muestra la distancia genética (Nei, 1972) y por debajo el valor del bootstrap que lo soportan.

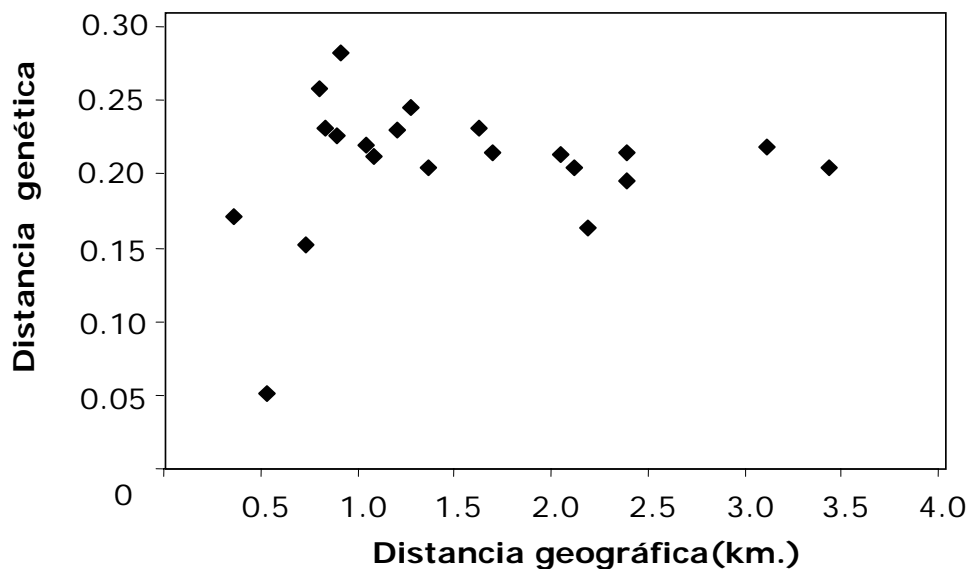


Figura 25. Prueba de Mantel. Análisis de aislamiento por distancia de las poblaciones de *Sideroxylon portoricense* en la región de los Tuxtlas, Veracruz. El ajuste lineal no resultó significativo ($r= 0.1158$; $P= 0.2940$). Cada punto representa un par de poblaciones (Tabla 23).

5. DISCUSIÓN.

Caracteres de historia de vida.

Los fragmentos presentan características ambientales que propician el establecimiento y supervivencia de las plántulas de *S. portoricense*, de la misma forma los caracteres de vigor presentan ventajas en las plántulas que logran establecerse en los fragmentos debido a las condiciones de luz que estos presentan.

Masa de semilla.

La masa de las semillas representa la cantidad de recursos que el árbol madre le aporta a cada plántula para la supervivencia y el éxito en el establecimiento en esta primera fase (Kitajima, 2000). La masa promedio de las semillas que produce *S. portoricense* es de 0.91 gramos (masa en peso seco de 0.46 gr.), las cuales pueden ser consideradas como semillas pequeñas respecto a las producidas por otros árboles tropicales (Holl y Lulow, 1997). En general, las semillas grandes le confieren mayores ventajas de supervivencia a las plántulas en sitios cerrados o donde la luz esta limitada, mientras que las semillas pequeñas suelen tener mayor éxito en el crecimiento de las plántulas en sitios abiertos (Paz y Martínez-Ramos, 2003). En este estudio se encontró que la masa de la semilla tiene una relación positiva sobre a la supervivencia y establecimiento de las plántulas en selva, mientras que para las zonas de fragmentos la masa de la semilla no juega un papel determinante y cualquier tamaño de semilla puede establecerse al interior de los fragmentos.

De la misma forma, se observó que existe varianza genética entre la masa de la semillas de cada una de las familias sin encontrar una relación respecto al

hábitat de donde proviene el árbol madre. Lo anterior sugiere que la masa de la semilla determina la supervivencia sólo en condiciones de estrés ambiental como la falta de luz y que la varianza genética de las semillas se encuentra bajo selección en estas condiciones.

Supervivencia.

Se encontró una mayor supervivencia de plántulas en fragmentos respecto al bosque continuo, esta diferencia mostró ser significativa para el hábitat. Las condiciones que presentan los fragmentos, como mayor incidencia de luz en el sotobosque, permiten que el establecimiento y supervivencia de las plántulas sea mayor en los fragmentos respecto a los sitios de bosque continuo, en donde existe una menor entrada de luz al sotobosque. Estos resultados pueden ser apoyados con las mediciones de luz que se registraron para ambos hábitats, en donde se muestra una diferencia significativa en la cantidad de luz incidente al interior de fragmentos en comparación con los sitios de selva continua. Un estudio realizado por Augspurger (1984), con 18 especies tropicales de árboles con diferentes grados de tolerancia a la luz en Barro Colorado, muestra que la mayoría de las especies germinan más rápido y tienen una mayor supervivencia bajo condiciones de luz, ya que esta suele ser fundamental en las primeras etapas de la plántula. De la misma forma en un estudio realizado en Costa Rica, con cuatro especies de árboles tropicales en zonas de bosque, sombra y potrero, *S. portoricense* mostró una mayor supervivencia en las zonas de potrero, donde las cantidades de luz y la temperatura fueron significativamente mayores (Loik y Holl, 1999). Lo anterior nos sugiere que *S. portoricense* se comporta como una especie medianamente tolerante, ya que puede llegar a establecerse en sitios con bajas cantidades de luz y zonas abiertas. Es importante señalar que las plántulas de este árbol se encuentran en muy bajas

densidades dentro de los continuos y su establecimiento puede verse afectado. De esta forma, la supervivencia de *S. portoricense* depende en gran medida de factores físicos y de los cambios que pueda sufrir el ambiente través del tiempo, como la apertura de claros o formación de remanentes y por otro lado, la varianza genética de las semillas puede ser seleccionada sólo bajo ciertos ambientes; esto hace que la supervivencia este determinada por la heterogeneidad ambiental.

Vigor.

El crecimiento de las plántulas y la producción foliar fue significativamente mayor en los fragmentos, debido a que estas zonas presentan rangos de luz mayores respecto a los continuos. La luz determina gran parte del vigor de las plántulas, ya que esta representa un recurso importante en el crecimiento de plántulas provenientes de semillas pequeñas (Paz y Martínez- Ramos, 2003) así como en la producción y el tamaño de las hojas. Estos caracteres suelen verse beneficiados cuando las plántulas tienen una mayor capacidad para capturar luz, debido a que las plántulas establecidas en los fragmentos tienen una mayor tasa de fotosíntesis y producción de área foliar. Al mismo tiempo se ha visto que las plántulas que se logran establecer en sitios cerrados tienen mayor dificultad para captar energía solar, ya que esta se encuentra reducida y el flujo de luz suele ser variable en el tiempo y en el espacio (Delagrange *et al.*, 2006). La entrada de luz permite que las hojas se mantengan vivas y la producción de estas continúe. En los continuos se observó que la mayoría de las plántulas presentaban una hoja en promedio o sólo mantenían el tallo en pie sin ninguna hoja, ya que la luz necesaria para mantener las hojas era limitada.

Los resultados obtenidos en este trabajo pueden ser apoyados por un estudio de Loik y Holl (1999) realizado al sureste de Costa Rica, en donde el número de hojas, el área foliar y el grosor de las hojas de plántulas de *S. portoricense*, resultó ser mayor en potreros y bajo la sombra de árboles aislados en comparación con el bosque continuo. Lo anterior nos sugiere que estos caracteres se ven beneficiados cuando las plántulas se establecen en zonas abiertas como claros, potreros o bordes de fragmentos en donde la incidencia de la luz incrementa el vigor de las plántulas de *S. portoricense*.

Daño por patógenos y herbívoros.

El bosque tropical es uno de los ambientes más comunes en donde las interacciones entre herbívoros y plantas se favorecen frecuentemente. Cualquier tipo de tejido puede convertirse en un recurso esencial para los herbívoros y los patógenos, como hojas jóvenes, tallos, raíces y/o semillas (Domínguez y Dirzo, 1995).

El daño por patógenos y herbívoros registrado en tallos y hojas en plántulas de *S. portoricense* fue mayor en fragmentos. Muchas veces los cambios en el ambiente, como la formación de bordes en los fragmentos permiten el flujo de organismos, incluyendo patógenos y herbívoros (Benítez- Malvido y Lemus Albor, 2003). Los daños causados por depredadores en plántulas de *S. portoricense* en fragmentos, podrían deberse a oportunistas o generalistas que consumen hojas jóvenes y tallos en el caso de los herbívoros, mientras que el daño por patógenos podría estar dado por especies que se encuentran en la hojarasca del sotobosque e infectan las plántulas cercanas (García-Guzmán y Benítez-Malvido, 2003). Por otro lado, la baja densidad de plántulas en los continuos permite que *S. portoricense* escape de los posibles depredadores que

se encuentren en el bosque, a pesar de que se considera que la densidad de una especie no siempre está relacionada con el ataque por sus depredadores (Coley y Barone, 1996). También es importante señalar que la densidad de plántulas "con hojas" en los continuos era muy baja respecto a los fragmentos, lo que hace que la proporción de ataque por patógenos y herbívoros en los sitios de bosque sea mucho menor y significativa, ya que en estos sitios la cantidad de recursos para los oportunistas y/o generalistas era menor.

Estructura genética

Los resultados obtenidos sobre diversidad y estructuración genética de árboles de *S. portoricense* no indican que exista un efecto negativo de la fragmentación sobre las poblaciones que se encuentran en remanentes y continuos, sin embargo se halló una diferenciación genética entre las poblaciones de esta especie que sugiere ciertas tendencias evolutivas.

Diversidad genética

S. portoricense es una especie que presenta niveles de variación altos ($H_e=0.3524$) en poblaciones adultas, en comparación con los niveles de variación encontrada para algunas herbáceas y árboles tropicales (Eguiarte *et al.*, 1992; Hall *et al.*, 1994; Lovvett y Haq, 2000). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de variación entre poblaciones de continuos y remanentes, lo que sugiere que la diversidad genética no se modifica con el hábitat. Probablemente la variación genética se encontraba distribuida de la misma forma en un continuo de vegetación antes de la fragmentación del hábitat ocurriera, fenómeno que comenzó en los últimos cuarenta años (Bierregaard *et al.*, 1992), tiempo menor a la edad reproductiva de estos árboles, por lo que se podría suponer que el bosque tropical de la región de los Tuxtlas aún no ha sido afectado negativamente en su estructura genética por el fenómeno de la fragmentación.

Es posible que estos altos niveles de variación estuvieran dados por un flujo constante de alelos, en donde las poblaciones reciben genotipos externos mediante la dispersión de frutos por aves, las cuales suelen tener una gran capacidad de dispersión (Martínez-Garza y González-Montagut, 2002), provocando el intercambio de genes y con esto el mantenimiento de la diversidad genética.

Diferenciación genética.

S. portoricense presentó una diferenciación global alta ($\theta=0.3708$), en comparación con otros estudios de especies tropicales realizados con ISSR's (Nybom, 2004; Suárez-Montes, 2007; Zhao *et al.*, 2007; Le Roux *et al.*, 2008), también se encontró que esta diferenciación no es significativa entre hábitats ($\theta= 0.3518$ en selva y 0.3745 en fragmentos). Esta diferenciación podría estar dada por la pérdida de alelos a causa de la disminución en los tamaños poblacionales como consecuencia de la reducción del hábitat, lo que hace que las poblaciones tiendan al aislamiento y la diferenciación aumente (Young *et al.*, 1996). Asimismo esta alta diferenciación genética puede resultar discordante con la distancia geográfica pequeña entre las poblaciones (3.5 km.), sin embargo, se considera que esta estructuración no está relacionada con la distancia, si no con la reducción del flujo génico entre las poblaciones debido a la falta de polinizadores ó la disminución en la dispersión de frutos por aves (Dominguez *et al.*, 2005).

La distribución de la varianza genética resultó ser mayor dentro de las poblaciones (58.08%) y entre las poblaciones dentro de los hábitats (40.04%), siendo significativa esta distribución, mientras que sólo el 1.88% se encuentra

distribuida entre hábitats. Esta estructuración genética puede deberse a que la especie crece en pequeños parches o zonas determinadas por la incidencia de luz, en donde los individuos establecidos presentan diferencias alélicas respecto a otras poblaciones, sin que estos tiendan a la endogamia y sean diversos genéticamente. Es importante señalar que los tamaños poblacionales de *S. portoricense* suelen ser muy bajos, lo que representa un problema demográfico más que genético; sin embargo los tamaños efectivos de esta especie podrían llevar a las poblaciones a la deriva génica.

Flujo génico y distancia genética

El flujo génico (Nm) es considerado como uno de los elementos más importantes en la estructura genética de las poblaciones, ya que mediante este ocurre el intercambio de alelos que determina el comportamiento evolutivo de las poblaciones y las especies (Slatkin, 1994). El nivel de flujo génico hallado para *S. portoricense* fue de 0.3118, valor que refleja un bajo intercambio de alelos entre las poblaciones de esta especie en comparación con otros estudios realizados con ISSR's en especies tropicales (Suárez-Montes, 2007; Aguilar-Amezquita, 2008) y herbáceas perennes (Zhao *et al.*, 2007), ya que se considera que si Nm es mayor a uno, las poblaciones presentan menor probabilidad de diferenciación y teóricamente no hay deriva génica, pero si este valor es menor a uno, entonces la deriva génica actúa sobre cada una de las poblaciones haciéndolas evolucionar independientemente (Slatkin, 1994). Este valor de flujo génico concuerda con el valor de estructuración global ($\theta=0.3708$) encontrado para *S. portoricense*, ya que muestra una alta diferenciación poblacional debido a un bajo nivel de flujo génico entre ellas, en donde la deriva génica podría comenzar a actuar no sólo por un bajo

intercambio genético, si no por la baja densidad poblacional de esta especie debido a su historia de vida. Es importante señalar que la estimación del flujo génico para este estudio es indirecto y depende de la estimación de la estructura genética de cada población, cálculo que puede verse afectado por las suposiciones bajo las que se encuentran las frecuencias alélicas.

Las poblaciones de *S. portoricense* presentan una distancia genética promedio moderada (0.2065 ± 0.0463) en comparación con otros estudios de plantas (González, 2004; Suárez-Montes, 2007; Aguilar-Amezquita, 2008;) lo que significa que cierta proporción de los alelos son compartidos entre las poblaciones y no están altamente emparentadas, lo que evidencia la alta estructuración genética de la especie. No se encontró evidencia de que exista relación entre la distancia genética de las poblaciones y la distancia geográfica a la que se encuentra cada una de estas, por lo que la hipótesis de aislamiento por distancia fue descartada. Es importante señalar que la escala de distancia geográfica entre poblaciones es muy pequeña (3.5 km.), y podría ser que para observar el efecto de aislamiento por distancia se requiera una mayor escala geográfica entre las poblaciones estudiada. Teniendo una escala geográfica tan pequeña no importa si los individuos pertenecen a poblaciones diferentes en hábitats distintos ya que todas las poblaciones podrían estar formando una metapoblación, tomando en cuenta que la variación genética se encontraba distribuida en todas las poblaciones como un continuo antes de la fragmentación del hábitat. Esto reafirma que las poblaciones no se han erosionado genéticamente de forma significativa y que quizá la relación genética que estas presentan, está relacionada por el flujo de genes. De la misma forma, el dendograma realizado para ver de forma gráfica el grado de relación genética de las poblaciones no muestra una clara agrupación entre las

poblaciones de selva y las poblaciones de fragmento; sin embargo podría comenzar a observarse una tendencia en donde las poblaciones se agrupen por hábitat en un futuro próximo, en donde la fragmentación provoque la erosión genética.

6. CONCLUSIONES

- La supervivencia de plántulas de *Sideroxylon portoricense* se ve beneficiada en sitios de fragmentos dado por las condiciones de luz en el sotobosque, mientras que la masa de la semilla juega un papel importante en la supervivencia, establecimiento y los caracteres de vigor como la tasa de crecimiento, el área foliar y la producción de hojas, sólo cuando las plántulas se someten a condiciones ambientales de estrés como la falta de luz en sitios cerrados de bosque maduro, lo que hace que la supervivencia depende en gran medida de la heterogeneidad ambiental.
- Existe una alta variación genética asociada al alto porcentaje de polimorfismo en las poblaciones adultas de *S. portoricense*; asimismo hay una alta estructuración genética de las poblaciones sin importar el hábitat al que estas pertenezcan, ya que la mayor parte de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones.
- *S. portoricense* presenta un bajo nivel de flujo génico entre sus poblaciones asociado a la alta estructuración poblacional y probablemente a la baja densidad demográfica que presenta esta especie.
- La distancia genética de esta especie es moderada entre sus poblaciones ya que aún existe un bajo intercambio genético; no se encontró aislamiento por distancia dado que la escala geográfica entre poblaciones es pequeña.

Lo anterior nos sugiere que el efecto de la fragmentación del hábitat aún no ha erosionado de forma significativa la diversidad genética de las poblaciones de esta especie, mientras que algunos eventos físicos asociados a la modificación del hábitat benefician la supervivencia y el establecimiento de las plántulas de algunas especies como *S. portoricense* que puede establecerse en zonas con mayores cantidades de luz. Esta especie presenta cierto potencial para regenerar las zonas perturbadas de selva o sitios fragmentados y aumentar su densidad demográfica en el bosque tropical. Esto ayudaría a que los tamaños poblacionales fueran mayores, se conservara la variación genética y existiera un mayor intercambio genético para evitar que las poblaciones de esta especie tiendan a la deriva génica o se vean sometidas en cuellos de botella, donde potencialmente tienen lugar las extinciones locales.

Es de gran importancia entender como se comportan las poblaciones a nivel genético y ecológico cuando ocurren cambios continuos en el ambiente y el hábitat se ve fragmentado, ya que gran parte de las especies de árboles tropicales suelen ser altamente susceptibles a estas modificaciones y la estructura del bosque depende en cierta medida de ellos.

Estos estudios en conjunto, son un herramienta básica para entender lo que sucede en las selvas tropicales y con esto ayudar mediante planes de manejo a restaurar y rescatar gran parte de las selvas mexicanas que actualmente se encuentran convertidas en mosaicos de vegetación formados por acahuales, potreros, fragmentos y continuos, los cuáles aún son refugio de un gran número de especies y gran parte de la diversidad genética se encuentra en las selvas tropicales.

7. APÉNDICES

Apéndice 1.

Protocolo de extracción de ADN de plantas mini-prep.

- 1.- Moler 500 mg de tejido en un mortero con nitrógeno líquido hasta pulverizar y eliminar el máximo de fibras.
- 2.- Agregar 500 μ l de buffer de extracción CTAB y 500 μ l de STE hasta homogeneizar. Recuperar el extracto crudo en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- 3.- Centrifugar a 10,000 rpm (revoluciones por minuto) durante 8 minutos y eliminar el sobrenadante obtenido. Si el sobrenadante resulta de un color intenso, se recomienda repetir los pasos 2 y 3.
- 4.- Resuspender el precipitado obtenido con 500 μ l de CTAB 2X y 500 μ l de STE.
- 5.- Centrifugar a 10,000 rpm durante 8 min a 4° C.
- 6.- Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado con 600 μ l CTAB 2X.
- 7.- Agregar 50 unidades de RNAsa.
- 8.- Agregar 15 μ l de proteinasa K e incubar a -20° C durante 20 minutos. Mezclar por inversión e incubar en hielo durante 5 minutos.

9.- Agregar a cada tubo 600 μ l de la mezcla cloroformo-octanol (24:1), agitar con vortex hasta homogeneizar (no exceder la agitación).

10.- Centrifugar a 9,500 rpm durante 12 minutos. En caso de que el sobrenadante no sea transparente, repetir el paso anterior con el sobrenadante resultante de la primera centrifugación.

11.- Recuperar la fase acuosa (superior) en un tubo nuevo. Este paso es fundamental para obtener un ADN limpio, se debe evitar recuperar el material de la fase intermedia que contiene principalmente proteínas.

12.- Agregar 600 μ l de isopropanol frío a -20° C para precipitar el ADN.

13.- Incubar durante 2 horas a -20° C.

14.- Centrifugar a 9,000 rpm durante 5 minutos a 4° C. Eliminar el sobrenadante. Se observará un pequeño botón al final del tubo, este es el ADN que debe ser de color blanco translucido. Si este es muy blanco y muy grande es posible que este sucio, muestras de este tipo es conveniente eliminarlas o volverlas a limpiar con alcohol.

15.- Lavar el ADN agregando 1ml de etanol al 70% a -20° C, mezclar por inversión hasta observar que el botón se desprende. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 10,000 rpm durante 5 minutos.

16.- Eliminar el sobrenadante sin perder de vista el botón y resuspender el ADN con 50 μ l de agua ultra pura .

Buffers de extracción.

Buffer de extracción CTAB 2X:

*Tris-HCL 100mM pH 8

*NaCl 1.4 M

*EDTA 20mM pH8

*CTAB 2%

*β-mercaptoetanol 0.3% (agregar justo al momento de usarse)

Buffer de extracción CTAB:

*Tris-HCL 100mM pH 8

*NaCl 1.5 M

*EDTA 20mM pH8

*CTAB 4%

*PVP40 4%

*Ácido ascórbico 0.1%

*DIECA 0.1%

*β-mercaptoetanol 0.3% (agregar al momento de usarse)

Buffer de extracción STE:

*Tris-HCL 100mM pH 8

*EDTA 50mM pH8

*NaCl 100mM

*β-mercaptoetanol 0.3% (agregar al momento de usarse)

Apéndice 2.

Frecuencias alélicas promedio por locus para *Sideroxylon portoricense*
 (* =P< 0.05)

Locus	p	q	P<0.05	SE
1	0.1286	0.8714	0.0011*	0.0006
2	0.1759	0.8241	0.0007*	0.0003
3	0.1027	0.8973	0.0000*	0.0000
4	0.1091	0.8909	0.0000*	0.0000
5	0.2115	0.7885	0.0000*	0.0000
6	0.5553	0.4447	0.0000*	0.0000
7	0.0530	0.9470	0.0598	0.0056
8	0.1971	0.8029	0.0000*	0.0000
9	0.1971	0.8029	0.0000*	0.0000
10	0.4310	0.5690	0.0000*	0.0000
11	0.1553	0.8447	0.3394	0.0096
12	0.4838	0.5162	0.0000*	0.0000
13	0.3293	0.6707	0.0000*	0.0000
14	0.4950	0.5050	0.0000*	0.0000
15	0.2719	0.7281	0.0000*	0.0000
16	0.0775	0.9225	0.0000*	0.0000
17	0.2349	0.7651	0.2320	0.0147
18	0.3627	0.6373	0.0000*	0.0000
19	0.0879	0.9121	0.0141*	0.0040
20	0.1255	0.8745	0.0750	0.0061
21	0.3284	0.6716	0.0184*	0.0051
22	0.5603	0.4397	0.0000*	0.0000
23	0.5733	0.4267	0.0577	0.0066
24	0.4577	0.5423	0.0000*	0.0000
25	0.1582	0.8418	0.0001*	0.0001
26	0.1921	0.8079	0.0000*	0.0000
27	0.5356	0.4644	0.0087	0.0024
28	0.1582	0.8418	0.4073	0.0101
29	0.3284	0.6716	0.7864	0.0089
30	0.2571	0.7429	0.0955	0.0135
31	0.1384	0.8616	0.0000*	0.0000
32	0.0697	0.9303	0.0000*	0.0000
33	0.1003	0.8997	0.0000*	0.0000
34	0.0577	0.9423	0.0006*	0.0003
35	0.0577	0.9423	0.0064*	0.0036
36	0.3284	0.6716	0.0000*	0.0000
37	0.1515	0.8485	0.0000*	0.0000
38	0.0941	0.9059	0.0250*	0.0027
39	0.3120	0.6880	0.0000*	0.0000
40	0.5356	0.4644	0.0000*	0.0000
41	0.5236	0.4764	0.0000*	0.0000
42	0.2276	0.7724	0.0001*	0.0001
43	0.3039	0.6961	0.0000*	0.0000
44	0.3715	0.6285	0.0000*	0.0000
45	0.2724	0.7276	0.0000*	0.0000

Locus	p	q	P<0.05	SE
46	0.3715	0.6285	0.0000*	0.0000
47	0.1648	0.8352	0.0030*	0.0016
48	0.4210	0.5790	0.0000*	0.0000
49	0.1759	0.8241	0.0000*	0.0000
50	0.4310	0.5690	0.0055*	0.0016
51	0.1091	0.8909	0.0002*	0.0002
52	0.2564	0.7436	0.0000*	0.0000
53	0.5553	0.4447	0.2071	0.0164
54	0.2261	0.7739	0.0000*	0.0000
55	0.5553	0.4447	0.0540	0.0088
56	0.1621	0.8379	0.0000*	0.0000
57	0.3293	0.6707	0.0001*	0.0001
58	0.3466	0.6534	0.0027*	0.0008
59	0.7116	0.2884	0.0579	0.0067
60	0.1128	0.8872	0.0002*	0.0002
61	0.0577	0.9423	0.0398*	0.0047
62	0.2204	0.7796	0.0000*	0.0000
63	0.2571	0.7429	0.0000*	0.0000
64	0.2422	0.7578	0.0000*	0.0000
65	0.5120	0.4880	0.0000*	0.0000
66	0.1852	0.8148	0.0000*	0.0000
67	0.1784	0.8216	0.0000*	0.0000
68	0.4474	0.5526	0.0000*	0.0000
69	0.5603	0.4397	0.0103*	0.0015
70	0.1128	0.8872	0.0000*	0.0000
71	0.2422	0.7578	0.0000*	0.0000
72	0.2132	0.7868	0.0000*	0.0000
73	0.3453	0.6547	0.0000*	0.0000
74	0.4178	0.5822	0.0000*	0.0000
75	0.1191	0.8809	0.0000*	0.0000
76	0.2801	0.7199	0.0000*	0.0000
77	0.0818	0.9182	0.0000*	0.0000
78	0.1852	0.8148	0.0000*	0.0000
79	0.1582	0.8418	0.0001*	0.0001
80	0.1852	0.8148	0.0000*	0.0000
81	0.4083	0.5917	0.0000*	0.0000
82	0.4083	0.5917	0.0000*	0.0000
83	0.3202	0.6798	0.0000*	0.0000
84	0.7149	0.2851	0.0789	0.0097
85	0.8791	0.1209	0.6196	0.0200
86	0.4178	0.5822	0.0000*	0.0000

Apéndice 3.

Frecuencias alélicas promedio por locus para hábitat de selva y fragmento de *Sideroxylon portoricense* (* =P< 0.05).

SELVA				Locus	FRAGMENTO			
p	q	P<0.05	SE		p	q	P<0.05	SE
0.1732	0.8268	0.0007*	0.0002	1	0.0845	0.9155	0.2830	0.0052
0.1870	0.8130	0.0021*	0.0009	2	0.1637	0.8363	0.0552	0.0037
0.0463	0.9537	0.1938	0.009	3	0.1637	0.8363	0.0000*	0.0000
0.1596	0.8404	0.0000*	0.0000	4	0.0596	0.9404	0.0143*	0.0017
0.1332	0.8668	0.0000*	0.0000	5	0.2990	0.7010	0.0412*	0.0062
0.4957	0.5043	0.0002*	0.0001	6	0.6196	0.3804	0.1236	0.0091
0.0825	0.9175	0.1457	0.0033	7	0.0234	0.9766	0.1515	0.0066
0.2446	0.7554	0.0000*	0.0000	8	0.1500	0.8500	0.0262*	0.003
0.3235	0.6765	0.0000*	0.0000	9	0.0845	0.9155	0.0008*	0.0004
0.2298	0.7702	0.0002*	0.0002	10	0.7707	0.2293	0.5537	0.0077
0.1596	0.8404	0.0383*	0.0030	11	0.1500	0.8500	1.0000	0.0000
0.6240	0.3760	0.0084*	0.0015	12	0.3684	0.6316	0.0001*	0.0001
0.1332	0.8668	0.0417*	0.0040	13	0.6196	0.3804	0.5210	0.0083
0.3404	0.6596	0.0000*	0.0000	14	0.7252	0.2748	0.5421	0.0082
0.4738	0.5262	0.0006*	0.0002	15	0.1101	0.8899	0.0067*	0.0015
0.1332	0.8668	0.0000*	0.0000	16	0.0234	0.9766	0.1305	0.0052
0.2751	0.7249	0.2133	0.0091	17	0.1960	0.8040	0.3115	0.0080
0.4325	0.5675	0.0555	0.0046	18	0.2988	0.7012	0.0000*	0.0000
0.0703	0.9297	0.2453	0.0061	19	0.1050	0.8950	0.0052*	0.0009
0.1202	0.8798	0.0045*	0.0010	20	0.1300	0.8700	1.0000	0.0000
0.3756	0.6244	0.0380*	0.0045	21	0.2832	0.7168	0.0704	0.0032
0.7733	0.2267	0.0656	0.0046	22	0.4194	0.5806	0.0011*	0.0005
0.5186	0.4814	0.0165*	0.0024	23	0.6281	0.3719	0.6061	0.0084
0.4957	0.5043	0.8341	0.0051	24	0.4194	0.5806	0.0000*	0.0000
0.1075	0.8925	0.2345	0.0080	25	0.2099	0.7901	0.0000*	0.0000
0.2446	0.7554	0.0005*	0.0003	26	0.1428	0.8572	0.0007*	0.0004
0.5186	0.4814	0.0356*	0.0040	27	0.5478	0.4522	0.0124*	0.0021
0.2010	0.7990	0.7856	0.0049	28	0.1174	0.8826	0.2785	0.0085
0.2751	0.7249	0.9255	0.0020	29	0.3825	0.6175	0.7977	0.0087
0.2751	0.7249	0.5440	0.0075	30	0.2383	0.7617	0.0305*	0.0037
0.1463	0.8537	0.0012*	0.0003	31	0.1300	0.8700	0.0000*	0.0000
0.0229	0.9771	0.7335	0.0028	32	0.1174	0.8826	0.0000*	0.0000
0.1332	0.8668	0.0000*	0.0000	33	0.0687	0.9313	0.0083*	0.0020
0.1075	0.8925	0.0041*	0.0008	34	0.0111	0.9889	1.0000	0.0000
0.0703	0.9297	0.0032*	0.0009	35	0.0452	0.9548	0.1472	0.0048
0.2597	0.7403	0.0000*	0.0000	36	0.4007	0.5993	0.0000*	0.0000
0.1870	0.8130	0.0000*	0.0000	37	0.1174	0.8826	0.0000*	0.0000
0.0703	0.9297	1.0000	0.0000	38	0.1174	0.8826	0.0070*	0.0016
0.3756	0.6244	0.0000*	0.0000	39	0.2530	0.7470	0.0000*	0.0000
0.3940	0.6060	0.0000*	0.0000	40	0.7314	0.2686	0.2524	0.0049
0.7283	0.2717	0.3468	0.0083	41	0.3825	0.6175	0.0000*	0.0000
0.1202	0.8798	0.0769	0.0054	42	0.3477	0.6523	0.0236*	0.0030
0.5186	0.4814	0.0683	0.0048	43	0.1428	0.8572	0.0031*	0.0011
0.4527	0.5473	0.0007*	0.0003	44	0.2988	0.7012	0.0054*	0.0018
0.1596	0.8404	0.0000*	0.0000	45	0.4007	0.5993	0.0000*	0.0000

SELVA				FRAGMENTO				
p	q	P<0.05	SE	Locus	p	q	P<0.05	SE
0.4129	0.5871	0.0000*	0.0000	46	0.3310	0.6690	0.0011*	0.0008
0.1732	0.8268	0.0036*	0.0010	47	0.1558	0.8442	0.0475*	0.0044
0.5131	0.4869	0.2021	0.0088	48	0.3404	0.6596	0.0000*	0.0000
0.2990	0.7010	0.0004*	0.0004	49	0.0703	0.9297	0.0205*	0.0024
0.4899	0.5101	0.2806	0.0064	50	0.3756	0.6244	0.0052*	0.0014
0.0972	0.9028	0.0196*	0.0025	51	0.1202	0.8798	0.0001*	0.0001
0.3157	0.6843	0.0002*	0.0001	52	0.2010	0.7990	0.0095*	0.0018
0.5904	0.4096	0.1048	0.0065	53	0.5186	0.4814	0.3666	0.0140
0.2359	0.7641	0.0002*	0.0002	54	0.2152	0.7848	0.0041*	0.0015
0.5374	0.4626	0.0934	0.0045	55	0.5681	0.4319	0.0675	0.0036
0.3504	0.6496	0.4330	0.0092	56	0.0114	0.9886	1.0000	0.0000
0.2990	0.7010	0.1447	0.0048	57	0.3578	0.6422	0.0000*	0.0000
0.4259	0.5741	0.0004*	0.0002	58	0.2751	0.7249	0.5369	0.0082
0.6196	0.3804	0.1034	0.0049	59	0.8283	0.1717	0.4133	0.0088
0.2298	0.7702	0.4310	0.0065	60	0.0111	0.9889	0.6884	0.0110
0.0825	0.9175	0.1483	0.0037	61	0.0337	0.9663	0.0297*	0.0037
0.3404	0.6596	0.0000*	0.0000	62	0.1174	0.8826	0.6017	0.0116
0.1870	0.8130	0.0016*	0.0007	63	0.3310	0.6690	0.0003*	0.0002
0.3235	0.6765	0.0000*	0.0000	64	0.1690	0.8310	0.0000*	0.0000
0.4527	0.5473	0.0000*	0.0000	65	0.5729	0.4271	0.0000*	0.0000
0.2909	0.7091	0.0000*	0.0000	66	0.0927	0.9073	0.0000*	0.0000
0.0000	1.0000	1.0000	0.0000	67	0.4007	0.5993	0.0000*	0.0000
1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	68	0.2240	0.7760	0.0000*	0.0000
0.4527	0.5473	0.0313*	0.0025	69	0.6931	0.3069	0.4981	0.0070
0.1332	0.8668	0.0371	0.0026	70	0.0927	0.9073	0.0000*	0.0000
0.2152	0.7848	0.0000*	0.0000	71	0.2679	0.7321	0.0005*	0.0003
0.3235	0.6765	0.0000*	0.0000	72	0.1174	0.8826	0.0000*	0.0000
0.2010	0.7990	0.0000*	0.0000	73	0.5240	0.4760	0.0000*	0.0000
0.4527	0.5473	0.0000*	0.0000	74	0.3825	0.6175	0.0000*	0.0000
0.1732	0.8268	0.0000*	0.0000	75	0.0687	0.9313	0.0080*	0.0014
0.2751	0.7249	0.0000*	0.0000	76	0.2832	0.7168	0.0032*	0.0010
0.0345	0.9655	0.3434	0.0059	77	0.1300	0.8700	0.0000*	0.0000
0.2010	0.7990	0.0002*	0.0001	78	0.1690	0.8310	0.0000*	0.0000
0.1596	0.8404	0.0016*	0.0005	79	0.1558	0.8442	0.0006*	0.0003
0.2446	0.7554	0.0000*	0.0000	80	0.1300	0.8700	0.0003*	0.0002
0.1596	0.8404	0.0000*	0.0000	81	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000
0.5186	0.4814	0.0000*	0.0000	82	0.3147	0.6853	0.0000*	0.0000
0.2152	0.7848	0.0000*	0.0000	83	0.4388	0.5612	0.0000*	0.0000
0.7733	0.2267	1.0000	0.0000	84	0.6591	0.3409	0.0385*	0.0029
0.8283	0.1717	0.5607	0.0080	85	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000
0.3940	0.6060	0.0000*	0.0000	86	0.4388	0.5612	0.0000*	0.0000

Apéndice 4.

Frecuencias alélicas por locus para cada una de las poblaciones de *Sideroxylon portoricense*

SELVA

Locus	Estación 1		Estación 2		Estación 3	
	p	q	p	q	p	q
1	0.3701	0.6299	0.0263	0.9737	0.2305	0.7695
2	0.1644	0.8356	0.0534	0.9466	0.4839	0.5161
3	0.1204	0.8796	0.0263	0.9737	0.0000	1.0000
4	0.0385	0.9615	0.0263	0.9737	0.6740	0.3260
5	0.0000	1.0000	0.0263	0.9737	0.5693	0.4307
6	1.0000	0.0000	0.2355	0.7645	1.0000	0.0000
7	0.0000	1.0000	0.1099	0.8901	0.1310	0.8690
8	0.0000	1.0000	0.5296	0.4704	0.1792	0.8208
9	0.5859	0.4141	0.0812	0.9188	0.5693	0.4307
10	0.1204	0.8796	0.0812	0.9188	1.0000	0.0000
11	0.2601	0.7399	0.0534	0.9466	0.2305	0.7695
12	0.3701	0.6299	0.7398	0.2602	1.0000	0.0000
13	0.2108	0.7892	0.1703	0.8297	0.0000	1.0000
14	0.5037	0.4963	0.1099	0.8901	0.6740	0.3260
15	0.2108	0.7892	0.7398	0.2602	0.4839	0.5161
16	0.0000	1.0000	0.3452	0.6548	0.0000	1.0000
17	0.2108	0.7892	0.3861	0.6139	0.1792	0.8208
18	0.6865	0.3135	0.3861	0.6139	0.2854	0.7146
19	0.1204	0.8796	0.0812	0.9188	0.0000	1.0000
20	0.0385	0.9615	0.0534	0.9466	0.3449	0.6551
21	0.3701	0.6299	0.5296	0.4704	0.1792	0.8208
22	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.5693	0.4307
23	0.5859	0.4141	0.3452	0.6548	1.0000	0.0000
24	0.5037	0.4963	0.5296	0.4704	0.4104	0.5896
25	0.0385	0.9615	0.1703	0.8297	0.0852	0.9148
26	0.0000	1.0000	0.3067	0.6933	0.4839	0.5161
27	0.6865	0.3135	0.5882	0.4118	0.2854	0.7146
28	0.1644	0.8356	0.2355	0.7645	0.1792	0.8208
29	0.3129	0.6871	0.2702	0.7298	0.2305	0.7695
30	0.2108	0.7892	0.3452	0.6548	0.2305	0.7695
31	0.0000	1.0000	0.3067	0.6933	0.0852	0.9148
32	0.0000	1.0000	0.0263	0.9737	0.0417	0.9583
33	0.0000	1.0000	0.3452	0.6548	0.0000	1.0000
34	0.1644	0.8356	0.0000	1.0000	0.2305	0.7695
35	0.0000	1.0000	0.0263	0.9737	0.2305	0.7695
36	0.6865	0.3135	0.0534	0.9466	0.2854	0.7146
37	0.0000	1.0000	0.5296	0.4704	0.0000	1.0000
38	0.0785	0.9215	0.0812	0.9188	0.0417	0.9583
39	0.6865	0.3135	0.1396	0.8604	0.5693	0.4307
40	0.0000	1.0000	0.6563	0.3437	0.6740	0.3260
41	1.0000	0.0000	0.7398	0.2602	0.5693	0.4307
42	0.1644	0.8356	0.1703	0.8297	0.0000	1.0000
43	0.3701	0.6299	0.4774	0.5226	1.0000	0.0000
44	0.4330	0.5670	0.7398	0.2602	0.1792	0.8208
45	0.0385	0.9615	0.0263	0.9737	0.6740	0.3260

Locus	Estación 1		Estación 2		Estación 3	
	p	q	p	q	p	q
46	0.6865	0.3135	0.5882	0.4118	0.0417	0.9583
47	0.1644	0.8356	0.3067	0.6933	0.0000	1.0000
48	0.3701	0.6299	0.5169	0.4831	0.6740	0.3260
49	0.3701	0.6299	0.5169	0.4831	0.0000	1.0000
50	0.4330	0.5670	0.4145	0.5855	0.6740	0.3260
51	0.0385	0.9615	0.2148	0.7852	0.0000	1.0000
52	0.5037	0.4963	0.0859	0.9141	0.5693	0.4307
53	0.4330	0.5670	0.5771	0.4229	1.0000	0.0000
54	0.2108	0.7892	0.4633	0.5367	0.0000	1.0000
55	0.5037	0.4963	0.4145	0.5855	1.0000	0.0000
56	0.3129	0.6871	0.2879	0.7121	0.4839	0.5161
57	0.2601	0.7399	0.2148	0.7852	0.4839	0.5161
58	0.6865	0.3135	0.5169	0.4831	0.1310	0.8690
59	0.6865	0.3135	0.4633	0.5367	1.0000	0.0000
60	0.1644	0.8356	0.3067	0.6933	0.1792	0.8208
61	0.0000	1.0000	0.1099	0.8901	0.1310	0.8690
62	0.0000	1.0000	0.4299	0.5701	1.0000	0.0000
63	0.4330	0.5670	0.1703	0.8297	0.0000	1.0000
64	0.3129	0.6871	0.6563	0.3437	0.0000	1.0000
65	0.6865	0.3135	1.0000	0.0000	0.0000	1.0000
66	0.0000	1.0000	0.3067	0.6933	1.0000	0.0000
67	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
68	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000
69	0.3701	0.6299	0.6563	0.3437	0.2854	0.7146
70	0.2108	0.7892	0.1703	0.8297	0.0000	1.0000
71	1.0000	0.0000	0.0534	0.9466	0.0852	0.9148
72	0.0000	1.0000	0.4774	0.5226	0.5693	0.4307
73	0.0000	1.0000	0.5882	0.4118	0.0000	1.0000
74	1.0000	0.0000	0.1703	0.8297	1.0000	0.0000
75	1.0000	0.0000	0.0263	0.9737	0.0000	1.0000
76	0.0000	1.0000	0.3861	0.6139	0.4839	0.5161
77	0.0000	1.0000	0.0263	0.9737	0.0852	0.9148
78	0.4330	0.5670	0.2022	0.7978	0.0000	1.0000
79	0.2108	0.7892	0.0263	0.9737	0.3449	0.6551
80	0.0000	1.0000	0.5882	0.4118	0.1310	0.8690
81	0.0000	1.0000	0.0263	0.9737	1.0000	0.0000
82	0.0000	0.0000	0.2702	0.7298	1.0000	0.0000
83	0.0000	1.0000	0.6563	0.3437	0.0000	1.0000
84	0.6865	0.3135	0.7398	0.2602	1.0000	0.0000
85	0.6865	0.3135	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000
86	1.0000	0.0000	0.0812	0.9188	1.0000	0.0000

Frecuencias alélicas por locus para cada una de las poblaciones de
Sideroxylon portoricense

FRAGMENTO

Locus	Laguna Azul		Laguna Escondida		Ruiz Cortinez		Domingo	
	p	q	p	q	p	q	p	q
1	0.0000	1.0000	0.0556	0.9444	0.1114	0.8886	0.1588	0.8412
2	0.3555	0.6445	0.0556	0.9444	0.1942	0.8058	0.0500	0.9500
3	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.6006	0.3994	0.0500	0.9500
4	0.0500	0.9500	0.0000	1.0000	.00000	1.0000	0.2189	0.7811
5	0.2839	0.7161	0.0556	0.9444	0.4533	0.5467	0.3555	0.6445
6	0.6437	0.3563	0.5045	0.4955	1.0000	0.0000	0.4358	0.5642
7	0.1028	0.8972	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
8	0.2189	0.7811	0.0000	1.0000	0.2865	0.7135	0.0500	0.9500
9	0.0500	0.9500	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.3555	0.6445
10	0.6437	0.3563	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.6437	0.3563
11	0.1588	0.8412	0.1146	0.8854	0.1518	0.8482	0.1588	0.8412
12	0.5292	0.4708	0.0000	1.0000	0.5214	0.4786	0.4358	0.5642
13	0.5292	0.4708	0.5045	0.4955	0.6006	0.3994	1.0000	0.0000
14	0.6437	0.3563	0.6250	0.3750	1.0000	0.0000	0.6437	0.3563
15	0.2839	0.7161	0.1778	0.8222	0.0000	1.0000	0.0500	0.9500
16	0.1028	0.8972	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
17	0.2839	0.7161	0.0556	0.9444	0.2390	0.7610	0.1792	0.8208
18	0.3555	0.6445	1.0000	0.0000	0.3375	0.6625	0.0000	1.0000
19	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.1114	0.8886	0.2854	0.7146
20	0.1028	0.8972	0.1146	0.8854	0.1518	0.8482	0.1310	0.8690
21	0.2839	0.7161	0.4062	0.5938	0.1114	0.8886	0.4104	0.5896
22	0.5292	0.4708	1.0000	0.0000	0.4533	0.5467	0.1310	0.8690
23	0.6437	0.3563	1.0000	0.0000	0.5214	0.4786	0.5693	0.4307
24	0.5292	0.4708	1.0000	0.0000	0.6976	0.3024	0.0000	1.0000
25	0.1028	0.8972	0.0000	1.0000	0.1518	0.8482	0.6740	0.3260
26	0.2189	0.7811	0.4062	0.5938	0.0000	1.0000	0.0852	0.9148
27	0.4358	0.5642	1.0000	0.0000	0.3375	0.6625	1.0000	0.0000
28	0.1588	0.8412	0.0000	1.0000	0.1114	0.8886	0.1792	0.8208
29	0.3555	0.6445	0.5045	0.4955	0.3375	0.6625	0.3449	0.6551
30	0.2839	0.7161	0.2463	0.7537	0.3926	0.6074	0.0417	0.9583
31	0.0000	1.0000	0.4062	0.5938	0.0000	1.0000	0.2305	0.7695
32	0.0000	1.0000	0.5045	0.4955	0.0357	0.9643	0.0852	0.9148
33	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0357	0.9643	0.2305	0.7695
34	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0357	0.9643	0.0000	1.0000
35	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0357	0.9643	0.1310	0.8690
36	1.0000	0.0000	0.6250	0.3750	0.0357	0.9643	0.5693	0.4307
37	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.4533	0.5467	0.0000	1.0000
38	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.2865	0.7135	0.1310	0.8690
39	0.6437	0.3563	0.6250	0.3750	0.0000	1.0000	0.1310	0.8690
40	1.0000	0.0000	0.6250	0.3750	1.0000	0.0000	0.5693	0.4307
41	0.0000	1.0000	0.1778	0.8222	0.6976	0.3024	1.0000	0.0000
42	0.3555	0.6445	0.1146	0.8854	0.6006	0.3994	0.2854	0.7146
43	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.2390	0.7610	0.2854	0.7146
44	0.2839	0.7161	0.2463	0.7537	0.6006	0.3994	0.0852	0.9148
45	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.1518	0.8482	0.2854	0.7146

Locus	Laguna Azul		Laguna Escondida		Ruiz Cortinez		Domingo	
	p	q	p	q	p	q	p	q
46	0.1028	0.8972	0.1146	0.8854	0.6976	0.3024	0.4104	0.5896
47	0.0000	1.0000	0.1146	0.8854	0.2865	0.7135	0.1792	0.8208
48	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.6976	0.3024	1.0000	0.0000
49	0.0000	1.0000	0.1294	0.8706	0.0000	1.0000	0.1792	0.8208
50	0.1588	0.8412	0.2019	0.7981	0.6976	0.3024	0.4104	0.5896
51	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.3926	0.6074	0.0417	0.9583
52	0.1588	0.8412	0.2817	0.7183	0.0357	0.9643	0.4104	0.5896
53	0.4358	0.5642	0.6030	0.3970	0.3926	0.6074	0.6740	0.3260
54	0.4358	0.5642	0.3713	0.6287	0.0357	0.9643	0.1792	0.8208
55	0.5292	0.4708	1.0000	0.0000	0.6976	0.3024	0.3449	0.6551
56	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0357	0.9643	0.0000	1.0000
57	0.3555	0.6445	0.6030	0.3970	0.0357	0.9643	1.0000	0.0000
58	0.3555	0.6445	0.3713	0.6287	0.2390	0.7610	0.1792	0.8208
59	0.6437	0.3563	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000
60	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0417	0.9583
61	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.1310	0.8690
62	0.0500	0.9500	0.1778	0.8222	0.1518	0.8482	0.0852	0.9148
63	0.1588	0.8412	0.2463	0.7537	0.2390	0.7610	1.0000	0.0000
64	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000	1.0000
65	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.1792	0.8208
66	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.4104	0.5896
67	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.4533	0.5467	0.0000	1.0000
68	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.1792	0.8208
69	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.6006	0.3994	0.5693	0.4307
70	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.4104	0.5896
71	0.3555	0.6445	0.6250	0.3750	0.2865	0.7135	0.0000	1.0000
72	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.3926	0.6074	0.0417	0.9583
73	0.5292	0.4708	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.1792	0.8208
74	1.0000	0.0000	0.5045	0.4955	0.0000	1.0000	0.6740	0.3260
75	0.1588	0.8412	0.1778	0.8222	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
76	0.1028	0.8972	0.0556	0.9444	0.4533	0.5467	0.4839	0.5161
77	0.1588	0.8412	0.5045	0.4955	0.0000	1.0000	0.0417	0.9583
78	0.0000	1.0000	0.5045	0.4955	0.0000	1.0000	0.3449	0.6551
79	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.3375	0.6625	0.2305	0.7695
80	0.1028	0.8972	0.0556	0.9444	0.0000	1.0000	0.4104	0.5896
81	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000
82	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.5693	0.4307
83	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000	0.0000
84	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.6976	0.3024	0.4104	0.5896
85	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000
86	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000	0.0000

Apéndice 5.

Heterocigosis esperada por locus para hábitat de selva y fragmento en *Sideroxylon portoricense*.

Locus	Selva	Fragmento
1	0.2897	0.1565
2	0.3075	0.2770
3	0.0893	0.2770
4	0.2714	0.1134
5	0.2335	0.4242
6	0.5057	0.4769
7	0.1531	0.0462
8	0.3738	0.2580
9	0.4427	0.1565
10	0.3580	0.3576
11	0.2714	0.2580
12	0.4747	0.4709
13	0.2335	0.4769
14	0.4542	0.4032
15	0.5044	0.1983
16	0.2335	0.0462
17	0.4034	0.3187
18	0.4965	0.4237
19	0.1322	0.1900
20	0.2140	0.2287
21	0.4744	0.4105
22	0.3547	0.4925
23	0.5050	0.4724
24	0.5057	0.4925
25	0.1940	0.3354
26	0.3738	0.2475
27	0.5050	0.5010
28	0.3249	0.2095
29	0.4034	0.4777
30	0.4034	0.3671
31	0.2526	0.2287
32	0.0452	0.2095
33	0.2335	0.1293
34	0.1940	0.0222
35	0.1322	0.0873
36	0.3889	0.4857
37	0.3075	0.2095
38	0.1322	0.2095
39	0.4744	0.3822
40	0.4830	0.3974
41	0.4003	0.4777
42	0.2140	0.4587
43	0.5050	0.2475
44	0.5012	0.4237
45	0.2714	0.4857

Locus	Selva	Fragmento
46	0.4904	0.4479
47	0.2897	0.2660
48	0.5055	0.4542
49	0.4242	0.1322
50	0.5057	0.4744
51	0.1776	0.2140
52	0.4372	0.3249
53	0.4893	0.5050
54	0.3648	0.3417
55	0.5030	0.4964
56	0.4606	0.0227
57	0.4242	0.4648
58	0.4948	0.4034
59	0.4769	0.2878
60	0.3580	0.0222
61	0.1531	0.0659
62	0.4542	0.2095
63	0.3075	0.4479
64	0.4427	0.2840
65	0.5012	0.4949
66	0.4173	0.1701
67	0.0000	0.4857
68	0.0000	0.3515
69	0.5012	0.4302
70	0.2335	0.1701
71	0.3417	0.3967
72	0.4427	0.2095
73	0.3429	0.5045
74	0.5012	0.4777
75	0.2897	0.1293
76	0.4034	0.4105
77	0.0674	0.2287
78	0.3249	0.284
79	0.2714	0.2660
80	0.3738	0.2287
81	0.2714	0.0000
82	0.5050	0.4362
83	0.3417	0.4980
84	0.3547	0.4544
85	0.2878	0.0000
86	0.4830	0.4980

Apéndice 6.

Diferenciación genética (θ) por locus para todas las poblaciones de *Sideroxylon portoricense* (* = $P < 0.05$).

Locus	θ	P<0.05
1	0.3726	0.0023*
2	0.3729	0.0018*
3	0.3704	0.0000*
4	0.3702	0.0000*
5	0.3721	0.0000*
6	0.3693	0.0000*
7	0.3718	0.0556
8	0.3724	0.0000*
9	0.3711	0.0000*
10	0.3657	0.0000*
11	0.3737	0.3806
12	0.3718	0.0000*
13	0.3704	0.0000*
14	0.3713	0.0000*
15	0.3712	0.0000*
16	0.3714	0.0000*
17	0.3747	0.2161
18	0.3718	0.0000*
19	0.3723	0.0193*
20	0.3729	0.0741
21	0.3749	0.0228*
22	0.3691	0.0000*
23	0.3730	0.0580
24	0.3724	0.0000*
25	0.3716	0.0000*
26	0.3727	0.0000*
27	0.3721	0.0045*
28	0.3738	0.4291
29	0.3759	0.7546
30	0.3748	0.1059
31	0.3724	0.0000*
32	0.3711	0.0000*
33	0.3718	0.0000*
34	0.3717	0.0003*
35	0.3717	0.0071*
36	0.3691	0.0000*
37	0.3704	0.0000*
38	0.3724	0.0222*
39	0.3713	0.0000*
40	0.3698	0.0000*
41	0.3690	0.0000*
42	0.3731	0.0000*
43	0.3703	0.0000*
44	0.3730	0.0000*
45	0.3663	0.0000*

Locus	theta	P
46	0.3721	0.0000*
47	0.3734	0.0053*
48	0.3701	0.0000*
49	0.3718	0.0000*
50	0.3747	0.0091*
51	0.3720	0.0001*
52	0.3730	0.0000*
53	0.3743	0.1853
54	0.3732	0.0000*
55	0.3728	0.0508
56	0.3722	0.0000*
57	0.3707	0.0000*
58	0.3742	0.0035*
59	0.3713	0.0538
60	0.3724	0.0006*
61	0.3719	0.0426*
62	0.3688	0.0000*
63	0.3700	0.0000*
64	0.3661	0.0000*
65	0.3650	0.0000*
66	0.3676	0.0000*
67	0.3643	0.0000*
68	0.3622	0.0000*
69	0.3728	0.0164*
70	0.3720	0.0000*
71	0.3682	0.0000*
72	0.3715	0.0000*
73	0.3665	0.0000*
74	0.3656	0.0000*
75	0.3663	0.0000*
76	0.3734	0.0000*
77	0.3713	0.0000*
78	0.3723	0.0000*
79	0.3729	0.0000*
80	0.3712	0.0000*
81	0.3607	0.0000*
82	0.3649	0.0000*
83	0.3628	0.0000*
84	0.3725	0.0782
85	0.3710	0.6276
86	0.3615	0.0000*

8. LITERATURA

Aguilar, A. B. 2008. Efecto de la fragmentación del hábitat en la palma *Chamedorae alternans* (Wendl.) Araceae en la selva tropical de los Tuxtlas Veracruz, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México.

Arnau, J. y Balluerka, N. 2004. Análisis de datos longitudinales y de curvas de crecimiento. Enfoque clásico y propuestas actuales. *Psicotema* 16: 156-162.

Augspurger, C. K. 1984. Light requirements of neotropical tree seedlings: A comparative study of growth and survival. *The Journal of Ecology*. 72: 777-795.

Benítez-Malvido, J. 1998. Impact of forest fragmentation on seedling abundance in a tropical rain forest. *Conservation Biology*. 12: 380- 389

Benítez- Malvido, J. y Lemus-Albor, A. 2005. The seedling community of tropical rain forest edges and its interaction with herbivores and pathogens. *Biotropica*. 37: 301-313

Bierregaard, R., Lovejoy, T., Kapos, V., Augusto dos Santos, A. y Hutchings, R. 1992. The biological dynamics of tropical rainforest fragments. *Bioscience*. 42: 859- 866.

Bogan, L. 2006. Calculator for distance between Geographical Locations. Cambridge Station, Nova Scotia.
<http://www.go.ednet.ns.ca/~larry/bsc/jslatlng.html>

Bornet, B. y Branchard, M. 2001. Nonanchored Intersimple Sequence Repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19: 209- 215

Camargo, J. L. y Kapos, V. 1995. Complex edge effects on soil moisture and microclimate in Central Amazonian forest. *Journal of Tropical Ecology*. 11: 205-221.

Cascante, A., Quesada, M. y Lobo, J. 2002. Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. *Conservation Biology*. 16: 137- 147.

Coley, P. y Barone, J. 1996. Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 27: 305- 335

Cox, D. 1972. Regression models and life tables. *Journal of the Royal Statistical Society Series*. 34: 187- 220.

Crow, J. F. y Aoki, K. 1984. Group selection for a polygenic behavioral trait: Estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 81: 6073-6077.

Delagrange, S., Montpied, P., Dreyer, E., Messier, C. y Sinoquet, H. 2006. Does shade improve light interception efficiency? A comparison among seedlings from shade-tolerant and intolerant temperate deciduous species. *New Phytologist*. 172: 293- 304

Dirzo, R., González-Soriano, E. y Vogt, R. C. 1997. *Historia natural de los Tuxtlas*. México: Universidad Nacional Autónoma de México, CONABIO, IE.

Dirzo, R., y Miranda, A. 1991. El límite boreal de la selva tropical húmeda en el continente americano. Contracción de la vegetación y solución de una controversia. *Interciencia* 16: 240- 247.

Domínguez, C. A. y Dirzo, R. 1995. Plant herbivory interactions in Mesoamerican tropical dry forests. En: Bullock, S. H., Medina, E. y Mooney, H. A., eds. *Seasonally dry tropical forests*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 304-325.

Domínguez, C. A., Abarca, C. A, Eguiarte, L. E. y Molina-Freaner, F. 2005. Local genetic differentiation among populations of the mass-flowering shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *New Phytologist*. 166: 663-672.

Eguiarte, L., Pérez-Nasser, N. y Piñero, D. 1992. Genetic structure of outcrossing rate and heterosis in *Astrocarium mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. *Heredity*. 69: 217- 228.

Excoffier, L., Smouse P. E. y Quattro, M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among ADN haplotypes: Application to human mitochondrial ADN restriction data. *Genetics* 131: 479- 491.

García-Guzmán, G. y Benítez-Malvido, J. 2003. Effect on the incident of leaf-fungal pathogens and herbivory in seedling of the tropical tree *Nectandra ambigens*. *Journal of Tropical Ecology*. 19: 171-177.

González, G. A. 2004. Biología reproductiva y genética de poblaciones de *Agave garciae-mendozae*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México.

Guevara S., Laborde, J. y Sánchez-Ríos, G. 2004. *Los Tuxtlas. El paisaje de la sierra*. Veracruz, México: Instituto de Ecología A.C. y Unión Europea.

Hall, P., Chase, M. y Kamaljit, B. 1994. Low genetic variation but high population differentiation in a common tropical forest tree species. *Conservation Biology*. 8: 471- 482.

Hamrick, J. y Godt, M. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*. 351:1291-1298

- Hedrick, P. W. 2000.** *Genetics of populations*. Massachusetts, USA: Jones and Bartlett Publishers.
- Holl, K. y Lulow, M. 1997.** Effects of species, habitat and distance from edge on post-dispersal seed predation in a tropical rainforest. *Biotropica*. 29: 459-468.
- Image. 2006.** Google Earth Terra Metrics version 4.0. <http://earth.google.com>
- Kitajima, K. y Fenner, M. 2000.** Ecology of seedling regeneration. En: Fenner, M., ed. *Seeds: The ecology of regeneration in plant communities*. Wallingford, UK: CABI Publishing, 331- 359.
- Laurence, W., Ferreira, F., Rankin de Merona, J. y Laurence S. 1998.** Rain forest fragmentation and the dynamics of Amazonian tree communities. *Ecology*. 79: 2032- 2040.
- Le Roux, J., Wieczorek, A. M. y Meyer, J. Y. 2008.** Genetic diversity and structure of the invasive tree *Miconia calvescens* in Pacific Islands. *Diversity and Distributions*. 14: 935: 948
- Loik, M. y Holl, K. 1999.** Photosynthetic responses to light for rainforest seedlings planted in abandoned pasture, Costa Rica. *Restoration Ecology*. 7: 382- 391.
- Lovejoy, T. E., Bierregaard, R. O., Rankin, J. M. y Schubart, H. 1983.** Ecological dynamics of tropical forest fragments. En: Lutton, S. L., Whitmore, T. C., Chadwick, A. C., eds. *Tropical rain forest: ecology and management*. Oxford, UK: British Ecological Society and Blackwell Scientific Publications, 377- 384.
- Lovett, P. y Haq, N. 2000.** Diversity of the Sheanut tree (*Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn.) in Ghana. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 97: 297- 304
- Lowe, A., Harris S. y Ashton, P. 2004.** *Ecological Genetics: Design, Analysis and Application*. UK: Blackwell Publishing.
- Lynch, M. y Milligan, B. G. 1994.** Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99
- Martínez-Garza, C. y González-Montagut, R. 2002.** Seed rain of fleshy-fruited species in tropical pastures in Los Tuxtlas, Mexico. *Journal of Tropical Ecology*. 18: 457- 462.
- Mantel, N. 1967.** The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Research*. 1: 209- 220.
- Miller, M. 1997.** Tools for Populations Genetic Analysis (TFPGA) 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Arizona, USA.
- Miranda, F. y Hernández, E. 1963.** Los tipos de vegetación de México y su clasificación. *Sobretiro del Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 28: 29-179.

Mousseau, T. A. y Fox, Ch. W. 1998. The adaptative significance of maternal effects. *Trends in Ecology and Evolution*. 13: 403- 407.

Murcia, C. 1995. Edge effects in fragmented forest: implications for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*. 10: 58- 62.

Murray, M. G. y Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high weight plant ADN. *Nucleic Acids Research* 8:4321- 4326

Nagaoka, T. y Ogiwara Y. 1997. Applicability of intersimple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as ADN markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theory Applied Genetics*. 94: 597-602.

Nason, J. y Hamrick J. 1997. Reproductive and genetic consequence of forest fragmentation: Two case studies of neotropical canopy trees. *Journal of Heredity*. 88: 264- 276.

Nei, M. 1972. Genetic distances between populations. *The American Naturalist*. 106: 283-292.

Nei, M. 1978. The theory of genetic distance and evolution of human races. *Japanese Journal of Human Genetics*. 23:341-369.

Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*. 13: 1143- 1155.

Paz, H. y Martínez-Ramos, M. 2003. Seed mass and seedling performance within eight species of *Psychotria* (Rubiaceae). *Ecology*. 84: 439-450.

Pennington, T.D. 1990. Sapotaceae. *Flora Neotrópica Monograph*. 52:139 - 145.

Pradeep, M., Sarla, N. y Siddiq, E. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*. 128: 9-17.

Quinn, G. P. y Keough, M. J. 2002. *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Raymond, M. L. y Rousset, F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.

Reynolds, J., Weir, B. S. y Cockerham, C. 1983. Estimation of the coancestry coefficient basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105: 767- 779.

SAS Institute. 2004. JMP. Statistics and graphics guide, version 5.1. SAS Institute Inc. North Carolina, USA.

Schneider S., Roessli D., y Excoffier L., 2000. Arlequín ver. 2.0. A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva, Switzerland.

Slatkin, M. 1994. Gene flow and population structure. En: Real, L. A., ed. Ecological genetics. New Jersey, USA: Princeton University Press, 4-17.

Slatkin, M. y Barton, N. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43: 1349- 1368.

Sokal, R. y Rohlf J. 1995. *Biometry*. New York, USA: W.H. Freeman and Company.

Suarez-Montes, M. P. 2007. Efectos de la fragmentación en la estructura genética de *Heliconia uxpanapensis* (Heliconiaceae) en la selva de los Tuxtlas, Veracruz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México, DF.

Tabarelli, M., Cardoso Da Silva, J. M. y Gascon, C. 2004. Forest fragmentation synergisms and the impoverishment of neotropical forests. *Biodiversity and Conservation* 13:1419- 1425.

Thompson, K. y Hodkinson, D. 1998. Seed mass, habitat and life history: a re-analysis of Salisbury (1942- 1974). *New Phytologist*. 138: 163- 167.

Valera, A. y Falcon, L. 2007. Extracción de ácidos nucleicos. En: Eguiarte, L., Souza, V. y Aguirre, X., comps. Ecología molecular. México: Instituto Nacional de Ecología, México, 499- 515.

Vázquez Lobo, Y. A. 1996. Filogenia de hongos endositos del género *Pinus L.*: implementación de técnicas moleculares y resultados preliminares. Tesis de Licenciatura. Facultad de ciencias, UNAM. México DF.

Vittinghoff, E., Glidden, D. V., Shiboski, S. C. y McCulloch, C. E. 2005. *Regression methods in biostatistics. Linear, logistic, survival, and repeated measures models*. N.Y., USA: Springer, Berlín.

Weir, B. S. y Cockerham, C. 1984. Estimating F - Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

Weir, B. S. y Hill, W. G. 2002. Estimating F - Statistics. *Annual Review of Genetics* 36: 721-750.

Wolfe, D. y Liston, A. 1998. Contribution of PCR-based methods to plants systematics and evolutionary biology. En: Soltis, D., Soltis, P. y Doyle, J., eds. *Molecular Systematics of Plants II*. Boston, USA: Kluwer Academia Publisher, 43- 86.

Xiong, S. y Nilsson, C. 1997. Dynamics of leaf litter accumulations and its effects on riparian vegetation: a review. *Botanical Review*. 63: 240- 264.

Yeh, C. F., Yang, R. y Boyle, T. 1999. Population Genetic Analysis. POPGENE Version 1.32. A joint project for Molecular Biology and Biotechnology Centre. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Canada.

Young, A., Boyle, T. y Brown, T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentations for plants. *Trends in Ecology and Evolution*. 10: 413-418.

Zhao, W., Wang, Y., Chen, T., Jia, G., Wang, X., Qi, J., Pang, Y., Wang, S., Li, Z., Huang, Y., Pan, Y. y Yang, Y. 2007. Genetic structure of mulberry from different ecotypes revealed by ISSR´s in China: An implications for conservation of local mulberry varieties. *Scientia Horticultur*. 115:47:55.

Zietkiewicz, A., Rafalsky, A. y Labuda, D. 1993. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 20: 176-183.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de forma especial al Dr. Juan Núñez Farfán por ser el director de este proyecto; por su confianza, paciencia, consejos y por todo el apoyo brindado en este largo camino. Mil gracias Juan.

Agradezco a los miembros del jurado por enriquecer este trabajo con sus comentarios y sugerencias, al Dr. Luis Eguiarte Fruns, al Dr. Daniel Piñero Dalmau, al Dr. Eduardo Morales Guillaumin y a la Dra. Erika Aguirre Planter. También quisiera agradecer las revisiones y sugerencias realizadas por parte de la M. en I. B. B. Rosalinda Tapia López.

A mi madre, Norma Chelala Rojas, por su gran paciencia, cariño, comprensión y energía de todos los días. Gracias por darme lo mejor de ti y darme tanta fuerza.

A mi padre, Álvaro Toledo Duarte, por su cariño y apoyo; por guiarme en el camino de la vida y enseñarme los diferentes matices de la existencia.

A mis hermanos, Hamlet y Zitlalilt, por existir, por las risas, los juegos, por crecer juntos, por ser mis mejores compañeros en todo momento y compartir nuestras vidas juntos. Gracias por todo el cariño y apoyo.

A Montserrat Santillán y a mis pequeños, Yami, Yaz y Ham. Gracias por ser parte de mi vida, quererme como soy, apoyarme y hacerme feliz.

A todos los miembros del laboratorio de Genética Ecológica y Evolución. Gracias por la ayuda brindada en el laboratorio, en el campo, en la estadística, en las sugerencias académicas y por amenizar mi estancia en el laboratorio: a Mariana, Alfredo, Pilar, Armando, Bernardo, Vania, Edson, Ivan, Eunice, Laura Lorena, Memo, Alejandro, Jorge, Elsa, Jonathan, Sandra, Rafael, Rafael Torres, Jesús Vargas, Asis Hallab y Mariana Abarca.

También agradezco al laboratorio de Evolución Molecular y Experimental por la ayuda brindada con los marcadores moleculares, los softwares de genética y dudas técnicas. Gracias a Enrique Scheinvar y Laura Espinoza por rescatarme del monstruo de los ISSR's y ayudarme en todo.

A mis amigos de la vida, Cecilia Padierna, Erika Antúnez, David Mota y Julio Romero. Gracias por estar siempre, darme lo mejor de ustedes en todo momento y ayudarme a resolver los rompecabezas.

A Julio Rodríguez: por tantos años de compañía y estar más allá del Nirvana. Por "único y exclusivo". Gracias Juli, nunca pierdas la esencia.

A mis amigas del Instituto de Ecología, Vania Jiménez, Pilar Suárez, Rosa Cuevas, Vinisa Saynes, Lilia Roa y Marylin Bejarano; por su apoyo, comprensión, consejos, regaños y charlas multitemáticas. Gracias chicas!

Por todos los buenos y malos momentos compartidos y las miles de aventuras: Malva, Di, y Armandi.

A Pis: por todas las historias contadas, la energía, la motivación, las alegrías, los barcos y los vuelos, la intermitencia e infinitud, por todo lo compartido. Por tu luz y exactitud, gracias!

Finalmente, a la selva tropical de Los Tuxtlas, por existir, por su magia y ser tan bella!