



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD
ECOLOGÍA

“GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN DEL ÁRBOL TROPICAL DIOICO

***Brosimum alicastrum*”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARÍA DE JESÚS AGUILAR AGUILAR

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MAURICIO RICARDO QUESADA AVENDAÑO.
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES-UNIDAD MORELIA, UNAM.
DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFAN
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM.

MORELIA, MICHOACAN. MAYO 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted, que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 29 de Febrero de 2016, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **Maestra en Ciencias Biológicas** de la alumna **AGUILAR AGUILAR MARÍA DE JESÚS** con número de cuenta **513014710**, con la tesis titulada **"Genética de la conservación del árbol trópicol dioico *Brosimum aliscastrum*"**, bajo la dirección del **DR. MAURICIO RICARDO QUESADA AVENDAÑO**, Tutor principal:

Presidente: Dr. Antonio González Rodríguez
Vocal: Dr. Ramiro Aguilar
Secretario: Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa
Suplente: Dr. Jorge Arturo Lobo Segura
Suplente: Dra. Juan Servando Núñez Farfán

Sin otro particular, quedo de usted.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 03 de mayo de 2016



Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD
ECOLOGÍA

“GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN DEL ÁRBOL TROPICAL DIOICO
***Brosimum alicastrum*”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
MARÍA DE JESÚS AGUILAR AGUILAR

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MAURICIO RICARDO QUESADA AVENDAÑO.
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES-UNIDAD MORELIA, UNAM.
DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFAN
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM.

MORELIA, MICHOACAN. MAYO 2016.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT (Becario No. 280547)

A los proyectos que permitieron la realización de este trabajo:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT): 2009-131008 “Efecto de la fragmentación de bosques tropicales de Mesoamérica sobre la razón sexual, estructura y flujo genético de plantas dioicas”

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN212714-3)

Al Proyecto 250996: “Laboratorio nacional de análisis y síntesis ecológica para la conservación de recursos genéticos”

A los miembros de mi comité tutorial:

Dr. Mauricio Quesada Avendaño

Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa

Dr. Juan Servando Núñez Farfan

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

Al Dr. Mauricio Quesada por la confianza y el apoyo incondicional, por su constante motivación a seguir en el mundo de la investigación.

A los miembros del comité tutorial, el Dr. Ken Oyama Nakagawa y el Dr. Juan Núñez Farfán, por su tiempo, disposición y valiosos consejos para guiar y enriquecer este trabajo.

A los Dres. Jorge Arturo Lobo Segura, Antonio González Rodríguez y Ramiro Aguilar, miembros del jurado de examen de grado, por su contribución para mejorar esta tesis con sus acertados comentarios.

Al Dr. Jorge Lobo por su colaboración en los análisis estadísticos, por su paciencia y amabilidad. Gracias por su tiempo y apoyo.

A mi familia, gracias por su paciencia y por su apoyo incondicional.

A mis padres, mi fuerza y mi motivo, por su incondicional apoyo. Por su confianza y comprensión. Por las lecciones de vida.

A Jacob por su participación en cada una de las etapas de este proyecto. Por impulsarme siempre a seguir adelante.

A Jesús Bastida, José Contreras, y Jacob Cristóbal por el apoyo en el trabajo de campo.

Al Dr. Víctor Rocha por su apoyo técnico en el laboratorio.

Al Biol. Gumersindo Sánchez por el apoyo logístico para la realización de este trabajo.

A Dolores Rodríguez, Dr. Armando Rodríguez y Leonarda Terán por su paciencia y apoyo con cada trámite.

Al personal de la Estación de Biología Chamela y al Dr. Jorge Vega por su amabilidad y atenciones en el trabajo de campo.

A mis compañeros de laboratorio, Jacob, José, Jesús, Bambi, Martín, Karman, Oliverio, Francisco, Martha, Rogelio, Víctor, Roberto, Eugenia, Estrella. Gracias por los buenos tiempos.

DEDICATORIA

*Con cariño y admiración
A mis padres, Celia y Gustavo.*

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS	6
ANTECEDENTES	7
METODOLOGÍA.....	10
Sitio de estudio	10
Especie de estudio	10
Selección de sitios.....	12
Muestreo y análisis de desempeño de la progenie.....	13
Uso de marcadores moleculares y determinación de genotipo.....	14
Análisis genéticos	15
Diversidad y estructura genética.....	15
Determinación del número efectivo de donadores de polen	16
Determinación de la distancia de dispersión de polen	16
Análisis estadísticos	17
Proporciones sexuales	17
Desempeño de progenie.....	17
RESULTADOS	18
Proporciones sexuales.....	18
Diversidad y estructura genética de adultos y progenies.....	19
Determinación de donadores de polen.....	21
Determinación de la distancias de dispersión de polen.....	22
Desempeño de la progenie	24
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIONES.....	31
LITERATURA CITADA.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Detalle de <i>Brosimum alicastrum</i>	11
Figura 2. Ubicación geográfica de los sitios de estudio.....	12
Figura 3. Comparación de distribución de frecuencias de asignaciones de paternidad.....	22
Figura 4. Número de hojas de plántulas de <i>B. alicastrum</i>	23
Figura 5. Altura de plántulas de <i>B. alicastrum</i>	24
Figura 6. Biomasa seca total de plántulas de <i>B. alicastrum</i>	24

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Poblaciones muestreadas.	12
Tabla 2. Número de árboles y plántulas genotipadas	15
Tabla 3. Primers de microsatélites nucleares de <i>B. alicastrum</i> utilizados.	15
Tabla 4. Número de individuos y proporción sexual en cada sitio.....	18
Tabla 5. Medidas de variación genética de <i>B. alicastrum</i>	20
Tabla 6. Análisis de varianza molecular (AMOVA).	20
Tabla 7. Estadísticos-F para adultos y progenie	21
Tabla 8. Número estimado de donadores de polen.....	22
Tabla 9. Parámetros de las distribuciones exponenciales para la dispersión de polen en sitios continuos y fragmentado.	23

RESUMEN

La fragmentación de los bosques es una característica dominante de los paisajes actuales, convirtiéndose en uno de los principales problemas que enfrentan los bosques tropicales secos del mundo. La reducción en la cantidad de hábitat y el aumento en el aislamiento entre parches de hábitat tienen consecuencias negativas sobre la reproducción de las plantas. En general, se espera una reducción de la diversidad genética y un aumento de la endogamia en las especies que habitan en los bosques fragmentados. Este aumento en la endogamia se refleja en un bajo desempeño de la progenie, comprometiendo la regeneración y sobrevivencia de las poblaciones naturales. Las plantas dioicas, al ser obligatoriamente exocruzadas, pueden ser más vulnerables a la fragmentación del hábitat. No obstante, los efectos de la fragmentación en estas plantas han sido poco estudiados en los bosques tropicales. En este trabajo se evalúa el efecto de la fragmentación del hábitat sobre la proporción sexual, la estructura genética y el desempeño temprano de la progenie de *Brosimum alicastrum* en la Reserva de la Biósfera Chamela-Cuixmala, México. Se compararon sitios de bosque continuo con fragmentos de bosque. Los resultados muestran que no existen sesgos en la proporción sexual esperada (1:1) en relación a la condición del hábitat. Los valores de diversidad genética son altos, la diferenciación poblacional baja y no difieren entre condiciones de hábitat. Tampoco observamos evidencia de endogamia en las frecuencias genotípicas. Las estimaciones de flujo de polen a partir de asignaciones de paternidad de semillas, muestran que la frecuencia de apareamiento es mayor entre árboles cercanos; sin embargo, también se detectaron apareamientos a larga distancia, sobretodo en los sitios fragmentados. El número efectivo de donadores de polen fue mayor en los árboles de bosque continuo que en los de bosque fragmentado. El desempeño temprano de la progenie no tuvo diferencias significativas entre condiciones de hábitat, ni en la probabilidad de germinación, ni en el tiempo de emergencia. Sin embargo, las progenies de árboles de bosque continuo presentaron significativamente una mayor altura, un mayor número de hojas y biomasa seca que las de bosque fragmentado. Nuestro trabajo demuestra efectos negativos de la fragmentación sobre el número efectivo de donadores de polen y el desempeño temprano de las progenies.

ABSTRACT

Forest fragmentation is a dominant feature of today's landscapes, becoming one of the main problems facing the tropical dry forests of the world. The reductions in the amount of habitat and increased isolation between habitat patches have negative consequences on plant reproduction. Overall, a reduction in genetic diversity and increases in inbreeding levels in species living in fragmented forest are expected. Such increase in inbreeding is reflected in low progeny performance, compromising the regeneration and survival of wild populations. Dioecious plants, are obligate outcrossers and thus more vulnerable to habitat fragmentation; nevertheless, the effects of fragmentation on these plants have been little studied in tropical forests. We evaluated the effect of habitat fragmentation on population sex ratio, genetic structure and progeny performance of *Brosimum alicastrum* in the region of Chamela-Cuixmala Biosphere Reserve, México, comparing sites of continuous forest with populations of fragmented forest. Results show unbiased sexual ratios (1: 1) in relation to habitat condition. The genetic diversity values were high, the genetic differentiation between populations was low and those did not differ between habitat conditions. We did not detect evidence of inbreeding in the genotypic frequencies. Pollen flow estimates based on paternity assignments show that the mating frequency is higher among nearby trees, but also long-distance matings were detected, especially in fragmented sites. The effective number of pollen donors was greater in trees living in continuous forest in comparison to those in fragmented forest. Progenies performed equally between habitat conditions in the probability of germination and in the onset of seedling emergence, however progeny produced in continuous forests attained higher height, produce more leaves and higher dry biomass than seedlings from fragmented forest. Finally, this study detected negative effects of fragmentation on the effective number of pollen donors and on early progeny performance.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad es casi imposible encontrar ecosistemas naturales que no hayan sido modificados por el ser humano. Se estima que 83% de la superficie de la tierra ha sido afectada por la influencia humana, ya sea directa o indirectamente (Sanderson *et al.*, 2002). Los bosques tropicales secos se consideran los ecosistemas naturales más amenazados del planeta y su mayor amenaza es el cambio en el uso de suelo. A nivel mundial, aproximadamente 48.5% de estos bosques ha sido convertido a otras formas de uso (Hoekstra *et al.*, 2005), principalmente para agricultura y asentamientos humanos (Murphy & Lugo, 1986; Maass, 1995; Murphy & Lugo, 1995). Tan sólo en los trópicos, en el período de 1980 a 2000, más del 55% de los nuevos campos agrícolas provenían de bosques intactos (Gibbs *et al.*, 2010). Como consecuencia de estas actividades se ha producido una alta fragmentación de los bosques.

El proceso de fragmentación implica la reducción en el tamaño del bosque y el aislamiento espacial entre los remanentes de bosque, lo cual produce cambios en la estructura de las poblaciones y comunidades de plantas y animales (Saunders *et al.*, 1991), alterando las interacciones bióticas que mantienen estos organismos, como la polinización (Aizen & Feinsinger, 1994; Didham *et al.*, 1996; Tschardtke & Brandl, 2004) y dispersión de semillas (Markl *et al.*, 2012; McConkey *et al.*, 2012). Debido a esto, la fragmentación del hábitat es uno de los principales problemas que enfrentan los bosques tropicales (Saunders *et al.*, 1991; Fahrig, 2003; Quesada & Stoner, 2004).

A nivel poblacional los efectos de la fragmentación del hábitat no pueden ser generalizados ya que las especies pueden responder de manera diferencial, dependiendo de sus características biológicas específicas (Kolb & Diekmann, 2005). Se ha sugerido que los árboles tropicales son un grupo susceptible a los efectos de la fragmentación, debido a que tienen lentas tasas de crecimiento, su ocurrencia es en bajas densidades, sus períodos reproductivos están adaptados a una marcada estacionalidad climática, además de que los sistemas reproductivos y de apareamiento, en un porcentaje considerable, están restringidos a la polinización cruzada, por ejemplo, en estas plantas el dioicismo está bien representado (Bawa *et al.*, 1985; Bullock, 1985; Murphy & Lugo 1986; Hamrick & Murawski 1990; Quesada *et al.*, 2001).

El dioicismo es un sistema reproductivo que obliga al exocruzamiento, al presentarse las funciones masculina y femenina en individuos separados. Si bien, en las angiospermas el dioicismo representa poco más del 6 %, en los trópicos se estima que hasta el 27% de los árboles son dioicos (Bawa & Opler, 1975; Ibarra-Manriquez & Oyama, 1992). Diversos factores vuelven a las plantas dioicas más vulnerables al disturbio, por ejemplo, en plantas dioicas la expresión sexual se reduce a la mitad, por lo que reducciones en el tamaño y densidad poblacionales a causa de la fragmentación, podrían afectar su reproducción al afectar el número de individuos del sexo opuesto presentes en los parches (Kramer *et al.*, 2008). Además, es probable que la sobrevivencia en ambientes perturbados sea diferencial entre sexos, provocando cambios en la proporción sexual de la población (Gehring & Linhart, 1993), afectando así el tamaño efectivo poblacional.

Los cambios en el tamaño efectivo poblacional y la alteración de las relaciones bióticas se espera que tengan consecuencias negativas en la genética de poblaciones de las plantas dioicas. Por ejemplo, la teoría de la genética de poblaciones predice que si la disminución del tamaño de los parches afecta directamente el tamaño y las densidades poblacionales, se tendría como consecuencia inmediata una pérdida de riqueza alélica, generándose un “cuello de botella” donde permanece sólo una pequeña parte del “pool” génico original, y aunque algunos individuos de las poblaciones originales pueden permanecer por varias generaciones, el incremento en el aislamiento espacial puede restringir la conectividad entre los fragmentos, debido a alteraciones en el movimiento tanto de polen como de semillas entre los parches (Young *et al.*, 1996). Además, al disminuir el número de individuos reproductivos se limita la disponibilidad de polen y se incrementa la probabilidad de endogamia en especies autoincompatibles, o se reduce el número de fuentes de polen involucradas en la producción de semillas, particularmente en especies exocruzadas (Templeton *et al.*, 1990; Ellstrand & Elam, 1993; Cascante *et al.*, 2002; Fuchs *et al.*, 2003; Lowe *et al.*, 2005; Aguilar *et al.*, 2008). En el largo plazo, la fragmentación del hábitat puede causar la pérdida de variabilidad genética en las poblaciones remanentes, debido a la deriva génica o a altos niveles de endogamia, así como también favorecer el incremento en la diferenciación genética (Menges, 1991; Young *et al.*, 1996; Sork & Smouse, 2006). En general, se espera que en última

instancia, la pérdida de variación genética puede reducir la capacidad de las poblaciones para responder a cambios ambientales futuros, así como incrementar la probabilidad de extinción local (Young *et al.*, 1996; Nason & Hamrick, 1997). Sin embargo, también se propone que la combinación de características como la longevidad, alta diversidad genética y el potencial para altas tasas de flujo génico, pueden hacer a muchas especies de árboles resistentes a la extinción y a la pérdida de diversidad genética en condiciones ambientales cambiantes (Hamrick, 2004).

Además de los efectos que la fragmentación puede tener sobre las poblaciones de adultos, también se podrían presentar cambios en las progenes debido a aumentos en los niveles de endogamia producto del cruzamiento entre individuos emparentados (Aguilar *et al.*, 2008). Por ejemplo, se ha observado que las tasas de exocruzamiento en sitios fragmentados son significativamente menores, mientras que el coeficiente de endogamia de la progenie es mayor en comparación a las poblaciones de sitios de bosque continuo (Aguilar *et al.*, 2008; Eckert *et al.*, 2010) lo que puede producir un decremento en la cantidad y calidad de la progenie (Cascante *et al.*, 2002), factores clave en el reclutamiento y supervivencia de las poblaciones (Aguilar *et al.*, 2012).

Revisiones cuantitativas de la literatura a través de meta-análisis, indican que hay poca información sobre las consecuencias genéticas de la fragmentación sobre plantas dioicas (Aguilar *et al.*, 2008; Vranckx *et al.*, 2012). El presente trabajo se centra en el estudio de las consecuencias genéticas de la fragmentación en poblaciones del árbol tropical dioico *Brosimum alicastrum* (Moraceae), en términos de afectaciones a la diversidad genética, a los patrones de flujo génico y el desempeño temprano de la progenie.

OBJETIVOS

1. Comparar la proporción sexual de las poblaciones del árbol *Brosimum alicastrum* en bosque continuo y en fragmentos de bosques.
2. Comparar la diversidad genética y estructura genética de *B. alicastrum*, tanto en individuos adultos como en su progenie, en sitios continuos y en fragmentos de bosque.
3. Comparar los patrones de flujo génico vía polen entre sitios de bosque continuo y fragmentados.
4. Comparar el desempeño temprano entre progenies provenientes de bosque continuo y fragmentado.

ANTECEDENTES

La fragmentación del hábitat es una característica dominante de los paisajes modernos por lo que se ha convertido en un tema de importancia para la conservación de los bosques, especialmente los más amenazados, generando un creciente interés en el estudio de sus consecuencias.

Teóricamente, se espera que la fragmentación erosione la variabilidad genética e incremente la divergencia genética inter-poblacional de las plantas debido a procesos como deriva génica, endogamia y a reducciones en el flujo génico (Aguilar *et al.*, 2008). Sin embargo, la evidencia empírica de la literatura provee resultados contrastantes, implicando que no todos los episodios de fragmentación necesariamente resultan en la erosión genética de las poblaciones de plantas (Young *et al.*, 1996; Collevatti *et al.*, 2001; Kettle *et al.*, 2007; Lowe, 2005). Se ha reportado que si se mantienen niveles naturales de flujo de polen a través del paisaje, los efectos de la fragmentación del hábitat sobre la diversidad genética pueden ser mitigados (Hamrick, 2012). En este aspecto, algunos estudios no encuentran una reducción en la diversidad de la nube de polen después de un proceso de fragmentación (O'Connell *et al.*, 2006), otros incluso han demostrado un incremento (Bacles *et al.*, 2005), asociándolo con una mejor dispersión del polen y mayor éxito reproductivo de los árboles remanentes, posiblemente debido a reducciones en la competencia por recursos y una mayor dispersión de polen por el viento (Smouse & Sork, 2004).

En las últimas décadas ha habido un creciente interés en la evaluación de las consecuencias genéticas de la fragmentación del hábitat sobre las plantas (Young *et al.*, 1996; Lowe, 2005; Ouborg *et al.*, 2006; Honnay & Jacquemyn, 2007), y esto ha permitido realizar análisis cuantitativos mediante meta-análisis de este aspecto (Aguilar *et al.*, 2008; Vranckx *et al.*, 2012), que indican que la diversidad genética de las plantas es afectada negativamente por la fragmentación del hábitat. Específicamente se observa una reducción en el número de loci polimórficos, en el número de alelos, en las tasas de exocruzamiento y en menor proporción en la heterocigosidad. Sin embargo, la intensidad de los efectos negativos de la fragmentación del hábitat dependen de varias características de la historia de vida, tales como el sistema de apareamiento, la

longevidad y distribución de las especies. En árboles, por ejemplo, se sugiere que los sistemas de apareamiento y los mecanismos de dispersión de polen y semillas de algunas especies, pueden ayudar a mitigar la pérdida de diversidad genética en los paisajes fragmentados (Dick, 2001; White *et al.*, 2002; Hamrick, 2004).

Aunque la dioecia promueve el exo-cruzamiento y potencialmente promueve el flujo de polen (Ellstrand & Elam, 1993), las especies dioicas son las más vulnerables a los efectos de la fragmentación del hábitat (Murcia, 1996) ya que al disminuir el tamaño y las densidades poblacionales, la expresión sexual se reduce a la mitad y pueden ocurrir desviaciones en la razón sexual de las poblaciones (Field *et al.*, 2013). En condiciones naturales, los argumentos teóricos clásicos predicen una proporción esperada de 1:1 (Fisher, 1930; Edwards, 2000). Sin embargo, desviaciones de esta proporción son comúnmente reportadas en la literatura. Delph (1999) reporta que sólo 29% de las especies muestran poblaciones con proporciones sexuales iguales, mientras que en más de la mitad (59%) las proporciones sexuales se encuentran sesgadas hacia los árboles masculinos. En árboles tropicales es posible encontrar poblaciones sin sesgo, pero también se han encontrado poblaciones sesgadas hacia uno u otro sexo, siendo más frecuente que lo estén hacia el sexo masculino, (Opler & Bawa 1978; Armstrong & Irvine 1989; Ackerly *et al.*, 1990; Thomas & LaFrankie 1993; Nicotra 1998; Osunkoya 1999; Lenza & Oliveira 2005; Queenborough *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2012; Riba-Hernández *et al.*, 2014). Bajo el contexto de la fragmentación del hábitat, en la especie *Diospyros montana* en la India, Somanathan & Borges (2000) encuentran desviaciones en la proporción sexual en condiciones naturales y fragmentadas, estando sesgada hacia el sexo masculino en los sitios conservados y sesgada hacia hembras en la población en el hábitat fragmentado.

Aunque se espera que los efectos de la fragmentación del hábitat sobre la diversidad genética sean más severos en especies auto-incompatibles y en especies dioicas (Leimu *et al.*, 2006), en estas últimas han sido poco evaluados (Aguilar *et al.*, 2008; Vranckx *et al.*, 2012). En poblaciones silvestres de la especie *Carica papaya*, Chávez-Pesqueira *et al.*, (2014) encuentran que las poblaciones de los fragmentos muestran menor diversidad genética y mayor diferenciación poblacional que las poblaciones de bosque continuo. Por otra parte, también se ha observado que el

coeficiente de endogamia de la progenie es significativamente mayor en comparación con las poblaciones en sitios continuos, mientras que en los individuos adultos no hay un efecto (Aguilar *et al.*, 2008; Vranckx *et al.*, 2012). Tales resultados sugieren cambios en los patrones de apareamiento de las poblaciones de plantas en hábitat fragmentado a través de la autopolinización en plantas auto-compatibles y/o apareamientos entre parientes, incrementando así la probabilidad de endogamia.

La pérdida de variabilidad genética y el aumento en la endogamia pueden tener un efecto sobre el desempeño de la progenie como un resultado de la depresión por endogamia (Cascante *et al.*, 2002). En *Samanea saman*, Cascante *et al.*, (2002) demostraron que las semillas producidas en árboles de poblaciones continuas tuvieron una mayor probabilidad de germinar y producir mayor área foliar y biomasa que las plántulas de la progenie de árboles aislados, lo cual puede derivar en limitaciones en el reclutamiento afectando directamente la supervivencia de las poblaciones naturales. La evaluación del desempeño de las progenies junto con medidas de diversidad genética, son importantes para entender los efectos genéticos de la fragmentación sobre el potencial de reclutamiento (González-Varo *et al.*, 2010).

El presente trabajo plantea responder las siguientes preguntas con el árbol dioico *B. alicastrum* ¿Cuál es el efecto de la fragmentación sobre las proporciones sexuales? ¿Cuál es el efecto de la fragmentación sobre la diversidad genética de individuos adultos y su progenie? ¿Existen cambios en el número de donadores de polen entre sitios de bosque continuo y fragmentado? ¿La fragmentación afecta el desempeño temprano de la progenie?.

METODOLOGÍA

Sitio de estudio

Este estudio fue realizado dentro y en zonas aledañas a la Reserva de la Biósfera Chamela-Cuixmala, localizada en la costa oeste de México, en el estado de Jalisco. La reserva tiene una extensión de 13,200 ha. La vegetación predominante es bosque tropical caducifolio y también se presenta en algunas áreas, principalmente asociada a los arroyos, selva mediana subcaducifolia (Lott *et al.*, 1987). El régimen de precipitación sigue un patrón estacional muy marcado, la mayoría de la lluvia ocurre durante finales de Junio a Octubre y Noviembre a Junio se caracteriza por ser una época muy seca. El promedio anual de lluvia es de 750 mm y la temperatura promedio es de 25°C (Bullock, 1986). Esta reserva es una de las pocas áreas naturales protegidas de bosque tropical seco en México (Ceballos & García, 1995).

Especie de estudio

Brosimum alicastrum Swartz, es un árbol de la familia Moraceae. Puede alcanzar hasta 40 m de altura y diámetro a la altura del pecho (DAP) de hasta 1.5 m. Se distribuye desde el norte de México a través de Centroamérica, hasta Colombia, Perú, Venezuela y en las islas del Caribe: Cuba, Jamaica y Trinidad (Batis *et al.* 1999). Se reporta como una especie dioica o monoica (Berg, 1972; Pennington y Sarukhan 1998). Sin embargo, observaciones realizadas para el presente trabajo indican que para el sitio de estudio las poblaciones son dioicas. Las flores unisexuales se encuentran en cabezuelas axilares de 1 cm de diámetro y presentan un dimorfismo marcado entre flores de distinto sexo. En los árboles masculinos, las flores se presentan en cabezuelas verdosas, las cuales consisten de muchas flores masculinas, cada una compuesta por un perianto rudimentario y un sólo estambre. Las flores femeninas, rodeadas por numerosas brácteas ovadas, verde amarillentas; consisten en un perianto grueso y tubular terminado en cuatro lóbulos pubescentes y un ovario semiínfero que contiene un óvulo; el estigma es bifurcado y completamente expuesto (Pennington & Sarukhán, 2005). Carecen de pétalos, nectarios o fragancias (Peters, 1989). Los frutos consisten de una drupa que puede ser verde, amarilla o naranja. Normalmente contienen una semilla (Figura. 1). Se reporta polinización anemófila, aunque se han

observado visitas ocasionales de trips, moscas y pequeñas abejas, que parecen funcionar más como robadores de polen (Peters, 1989).

B. alicastrum tiene un papel importante en la estructura de la vegetación así como para la comunidad de animales. Su semilla y dulce pericarpio representan un porcentaje importante de la dieta de muchos animales, tanto en el dosel como en el suelo (Estrada & Coates-Estrada, 1986; Sánchez-Cordero & Martínez-Gallardo, 1998, Vázquez-Yanes *et al.*, 1999). De esta especie puede aprovecharse prácticamente todo, por ejemplo, las semillas y el follaje constituyen un recurso importante en la alimentación del ganado vacuno, caprino, equino, porcino y aves, principalmente en la época seca (Pardo-Tejeda *et al.*, 1976; Muños & Hernández, 1994.) Además sus frutos, hojas, látex y corteza tienen usos farmacéuticos en varias partes de México (Pardo-Tejeda & Sánchez-Muños, 1980; Vazquez-Yañes *et al.*, 1999; Schlesinger, 2001).

En el bosque tropical seco, *B. alicastrum* se encuentra asociada a hábitats ribereños, áreas consideradas elementos clave para la conservación de la biodiversidad del bosque tropical seco, debido a que contienen importantes recursos para el mantenimiento y conectividad de los rangos hogareños de muchas especies animales, particularmente durante la época seca cuando los recursos son limitados (Sánchez-Azofeifa *et al.*, 2009)



Figura 1. *Brosimum alicastrum*. a) Individuo adulto; b) Flor femenina; c) Flor masculina; d) Frutos; e) Semillas.

Selección de sitios

Para determinar el efecto de la fragmentación del hábitat sobre la proporción sexual, variación genética, patrones de flujo génico y vigor de la progenie de *B. alicastrum*, se compararon tres sitios en bosque continuo con tres sitios de bosque fragmentado (Figura.2). Como se mencionó anteriormente *B. alicastrum* es una especie que ocurre en hábitats ribereños del bosque tropical seco, los cuales en algunas ocasiones son mantenidos en el paisaje por su importancia para el forrajeo del ganado, por lo que pueden representar importantes remanentes en la conectividad de las poblaciones. Se consideraron sitios de bosque continuo aquellos sitios de bosque maduro (Chamela, Careyes y Caimán) que se encuentran ubicados dentro de la Reserva de la Biósfera Chamela-Cuixmala y como sitios fragmentados pequeños remanentes menores a 10 ha (Arroyo Seco, Tecuán y Zapata). El número mínimo de individuos en la población fue 11 en la población Tecuán (Tabla 1). Estas áreas se caracterizan por estar rodeadas por una matriz diferente a la original, generalmente terrenos agrícolas o zonas de pastoreo.

Tabla 1. Poblaciones muestreadas en bosque continuo y en fragmentos de bosque .

Condición de Hábitat	Población	N
Bosque continuo	Chamela	52
	Careyes	99
	Caimán	134
Total		285
Bosque fragmentado	Arroyo Seco	43
	Tecuán	11
	Zapata	14
Total		68

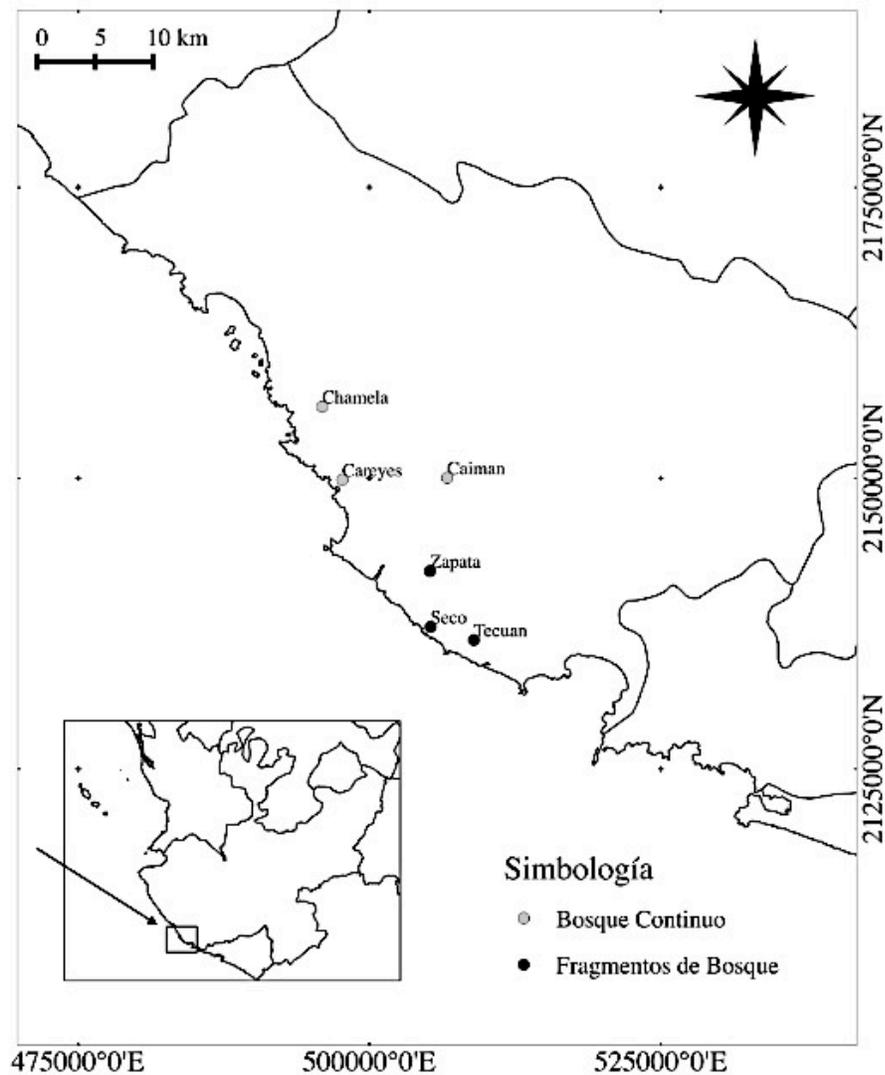


Figura 2 Ubicación geográfica de los sitios de estudio.

Muestreo y análisis de desempeño de la progenie

Se localizaron y georreferenciaron todos los individuos adultos en cada población. Cada individuo fue etiquetado y se midió el diámetro a la altura del pecho como un estimador de tamaño. Mediante la observación directa de flores y frutos, se realizó la determinación del sexo de los individuos reproductivos y se colectó tejido foliar para el análisis genético. En total se genotipificaron 186 individuos adultos, el número mínimo de individuos analizados fue diez para las poblaciones Tecuán y Zapata, y el número máximo fue 56 en la población Careyes. De los individuos femeninos que presentaron frutos se colectaron de 15 a 20 semillas sanas (no abortos, ni depredadas). En total se colectaron semillas de 45 árboles

femeninos (32 en bosque continuo y 13 en los fragmentos). En las plántulas obtenidas a partir de estas semillas se colectó tejido foliar para los análisis de diversidad genética de la progenie y de flujo génico vía polen. Un total de 592 plántulas fueron genotipificadas, 378 plántulas provenientes de bosque continuo y 214 provenientes de fragmentos de bosque (Tabla 2).

El desempeño de la progenie fue medido en este mismo ensayo en términos de germinación y crecimiento en condiciones de invernadero. Las semillas fueron mantenidas bajo las mismas condiciones ambientales, cada una se sembró a una profundidad de 0.5 cm en una bolsa que contenía una mezcla de turba, agrolita y arena (2:1:4) y fueron colocadas en filas al azar, en un invernadero en el Instituto de Investigaciones en Ecosistemas. Se regaron dos veces a la semana. Se registró el día de germinación, el número de hojas después de un mes de germinación y después de un año se realizó una cosecha destructiva y se obtuvo el número de hojas total, altura, diámetro basal y área foliar. Finalmente, cada plántula fue secada a 60° por 72 horas para obtener la biomasa seca total.

Uso de marcadores moleculares y determinación de genotipo

La variación genética fue estimada en las seis poblaciones de *B. alicastrum* ubicadas (tres en sitios de bosque continuo y tres en fragmentos de bosque) usando ocho loci de microsatélites diseñados para la especie (Tabla 2). El ADN fue extraído usando el kit comercial “DNEasy™ Plant Mini Kit” (QIAGEN), siguiendo las especificaciones del fabricante. Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un volumen total de 8.3 µl que contenían 0.3 µl de templado de ADN, 0.83 µl de primers (0.2 µM), 3 µl de H₂O y 4.16 de Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN). Los PCRs fueron realizados en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied-Biosystems) usando una temperatura inicial de desnaturalización a 95°C por 15 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización y extensión por 30 s a 95°C, un ciclo de 30 s a 60°C, un ciclo de 1 min a 72°C y un período final de elongación a 72°C durante 10min. Los productos de la PCR fueron visualizados en un secuenciador ABI PRISM 3100 Sequencer (Applied Biosystems). Los tamaños de los fragmentos fueron determinados usando GeneScan Liz 500 (Applied Biosystem). Los alelos fueron marcados manualmente usando el programa GeneMarker V 2.4.0 (SoftGenetics). Se uso el programa MICROCHECKER (Van Oosterhout *et al.*, 2004) para

evaluar la presencia de alelos nulos.

Tabla 2. Número de árboles y plántulas genotipadas en cada sitio

Condición del hábitat	Población	Árboles genotipados	Plántulas genotipadas
Bosque continuo	Chamela	33	67
	Careyes	56	211
	Caimán	55	100
	Total	144	378
Bosque fragmentado	A. seco	23	77
	Tecuán	10	63
	Zapata	10	74
	Total	42	214

Tabla 3. Primers de microsatélites nucleares de *B. alicastrum* utilizados.

Microsatélite	Secuencia repetida	Secuencia del primer 5'-3'	Número de alelos	Tamaño (pb)
Bro11	(ca)10	F TTGATTCCCAACCCCACTAA R TTGCCATTTGATGTTACGACA	7	107-133
Bro7	(ga)16	F TTGCCATAAAGCAATTTCCA R CACGTGTGAGAGGTGATGATG	13	215-243
Bro28	(tg)21	F CGGCTTGCAGAGAACAGAAT R CGCAGATCGACATTTGGAAT	11	104-148
Bro13	(ca)11	F GAGTTCGCCTGTGTTTGGTT R CCTTCCCCATCTTATTCTTTGA	6	175-199
Bro10	(ag)19	F GTACTACTCACATCGTCACATA R ATTGTTTGTCATTTTGCTTC	13	122-144
Bro15	(tg)11	F TCCAGTCAACCCAAAAAGAA R CAGGCTTTTCCTGATCTTGC	7	107-121
Bro17	(ga)13	F ATCCGGTTCCTTCTCACCTC R CCTGCTTGTTGCTCAATTCC	8	196-210
Bro20	(ag)14	F TCGGATTGTCACCTGGAGAA R TCCCTCCAACGTCTTTTGAC	10	199-221

Análisis genéticos

Diversidad genética y estructura genética

La diversidad genética de adultos y su progenie fue cuantificada en términos de riqueza alélica (A), heterocigosidad observada (Ho), heterocigosidad esperada (He), e índice de fijación usando el software ARLEQUIN 3.5 (Excoffier, 2005). Debido a que la riqueza

alélica de una muestra es un parámetro afectado por el tamaño de la muestra, teniendo más alelos en las muestras grandes que en las pequeñas (Kalinowski, 2004), usamos el método de rarefacción implementado en el software ADZE (Szpiech *et al.*, 2008) para obtener la riqueza alélica (A_r) y la riqueza alélica privada (A_p). Para evaluar la distribución de la variación genética, entre condiciones y entre poblaciones dentro de las condiciones, tanto en adultos como en la progenie, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) en los adultos y su progenie usando el programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005).

Determinación del número efectivo de donadores de polen

Se estimó la correlación de paternidad multilocus (r_p) para la progenie de cada sitio muestreado. Se usó el procedimiento de máxima verosimilitud de Ritland y Jain (1981) implementado en el software MLTR (Ritland, 2002). Los errores estándar fueron estimados de 1000 réplicas con remuestreo entre familias (grupos de hermanos maternos). Ritland (2002) establece que la correlación de paternidad está inversamente relacionada con el número de padres (n), donde $r_{pm} = 1/n$, ésta fue usada para calcular el número efectivo de donadores de polen (N_{ep}). Un valor de correlación de paternidad de 1 indica que las progenies son hermanos completos y un valor de 0 indica que las progenies no comparten donadores.

Determinación de la distancia de dispersión de polen

Debido a que la relación entre la probabilidad de paternidad y la distancia es una estimación de la distribución del flujo de polen, para comparar las distancias de dispersión de polen en ambas condiciones se realizó una asignación de paternidades por reconstrucción genealógica por métodos bayesianos, utilizando cadenas de Markov y simulaciones Monte-Carlo (Hadfield *et al.*, 2006). Este modelo está disponible en el programa Masterbayes, escrito en lenguaje R (R Development Core Team 2008). El modelo Masterbayes supone que la probabilidad de que un individuo sea el padre de una progenie particular cambia de acuerdo a la distancia siguiendo una función exponencial, donde λ es el parámetro que determina la tasa de cambio de la probabilidad en relación a la distancia. Cuando $\lambda < 0$, los individuos adultos masculinos que están cerca de la madre putativa tienen más probabilidades de ser los padres. Cuando $\lambda > 0$, los individuos distantes

tienen más probabilidades de ser los padres y cuando $\lambda = 0$, la paternidad es independiente de la distancia. Este programa también estima el número de individuos masculinos no muestreados en la población y la probabilidad de paternidad a posteriori para cada par semilla-padre inferida. Si el progenitor es un árbol no muestreado, el genotipo y la distancia son desconocidas. El procedimiento MCMC fue corrido para 150,000 iteraciones, con un período de “burn-in” de 25,000 iteraciones.

Análisis estadísticos

Proporciones sexuales

La proporción sexual fue expresada como la proporción de árboles masculinos en la población:

$$\text{Proporción sexual} = \frac{\text{Número de árboles masculinos}}{\text{Número de árboles masculinos} + \text{Número de árboles femeninos}}$$

Se evaluó la desviación de la proporción esperada 1:1 mediante una prueba G de heterogeneidad y de bondad de ajuste para la frecuencia observada en cada población.

Desempeño de progenie

Para determinar diferencias entre condiciones de hábitat en el desempeño de la progenie se usó un modelo lineal generalizado utilizando el procedimiento GENMOD del software SAS 9.3. En el modelo se usó la condición del hábitat, es decir bosque continuo o fragmentado, y el sitio anidado en la condición como variables independientes y los caracteres medidos (germinación, tiempo de emergencia, número de hojas, altura, biomasa) como las variables dependientes. Se usó una distribución binomial para la probabilidad de germinación. Para el tiempo de emergencia, número de hojas y biomasa se usó una distribución Poisson y para la altura de las plántulas se usó una distribución normal.

RESULTADOS

Proporciones sexuales

Ubicamos 353 árboles en los seis sitios, 285 individuos en los sitios dentro de la zona de bosque continuo y 68 individuos en los sitios de bosque fragmentado. En tres sitios (Bosque continuo: Chamela; Fragmentos de Bosque; A. Seco y Tecuán) encontramos un mayor número de árboles masculinos, en los otros tres (Bosque continuo: Careyes y Caimán; Fragmentos de bosque: Zapata) encontramos un mayor número de árboles femeninos (Tabla 3). Sin embargo, la prueba de bondad de ajuste indica que en general las proporciones sexuales no se desvían de la proporción esperada (1:1); $X^2_p = 1.35$, g.l=1, $p > 0.05$. La proporción sexual fue 1:1 en casi todas las poblaciones ($X^2_{\text{heterogeneidad}} = 12.50$, g.l=5, $p > 0.05$). Sólo la población Zapata se desvía significativamente de la proporción esperada ($X^2 = 7.92$ g.l=1, $p < 0.05$), la cual se encuentra sesgada hacia el sexo femenino.

Tabla 4. Densidad poblacional y número de individuos por sexo en sitios de bosque continuo y fragmentado de *B. alicastrum*. La columna sin identificar indica que no fue posible determinar el sexo. * < 0.05

Condición de Hábitat	Población	Densidad (ind/ha)	Árboles masculinos	Árboles femeninos	Sin identificar	Total	Proporción sexual
Bosque continuo	Chamela	5.3	25	18	9	52	0.58 ^{ns}
	Careyes	8	38	53	8	99	0.41 ^{ns}
	Caimán	7.3	58	69	7	134	0.45 ^{ns}
Total			121	140	24	285	0.46 ^{ns}
Bosque fragmentado	Arroyo Seco	6.3	23	16	4	43	0.58 ^{ns}
	Tecuán	2.6	6	5	0	11	0.54 ^{ns}
	Zapata	2.3	2	12	0	14	0.14*
Total			31	33	4	68	0.48 ^{ns}

Diversidad y estructura genética de adultos y progenies.

Se obtuvo el genotipo de 187 árboles adultos y 592 plántulas en los seis sitios (Tabla 3) a través de ocho loci microsatélites. La frecuencia de alelos nulos estimada por el programa MICROCHECKER (Van Oosterhout et al., 2004) va de 0.016 en el locus Bro17 a 0.055 en el locus Bro7) indicando que no hay evidencia de alelos nulos en ninguno de los loci. Todos los loci fueron polimórficos en los sitios analizados y contienen un total de 75 alelos. El número promedio de alelos a través de los loci por población (A) en los adultos, va de 4.87 (en la población Tecuán) a 7.5 (en la población Caimán). Después de la corrección para la variación en el tamaño de la muestra, se observó menor variación en el número de alelos (A_r) entre los sitios que va de 4.47 (A. Seco) a 5.16 (Chamela). El número promedio de alelos privados en los sitios de bosque continuo es 0.29 y 0.26 en los sitios fragmentados. En las progenies el número promedio de alelos a través de los loci por población (A), va de 6.13 en la población Tecuán a 7 en la población Careyes, después de la rarefacción los valores varían de 6.01 en la población Zapata a 6.47 en la población Chamela. El número promedio de alelos privados para los sitios de bosque continuo es de 0.39, mientras que para las poblaciones de bosque fragmentado es de 0.22 (Tabla 4).

Los niveles de heterocigosidad esperada fueron altos (variando de $H_e = 0.56$ en la población Careyes a $H_e = 0.65$ en las poblaciones Chamela, Tecuán y Zapata en los adultos y en las progenies va de 0.55 en la población A. Seco a 0.62 en la población Tecuán). Por su parte los valores de heterocigosidad observada varían de $H_o = 0.54$ en la población Careyes a $H_o = 0.70$ en la población Tecuán en los adultos y en las progenies de $H_o = 0.53$ en la población A. Seco a $H_o = 0.64$ en la población Tecuán. No encontramos una reducción en estos parámetros de diversidad en los sitios de bosque fragmentado en comparación a los sitios de bosque continuo (Continuo: $H_e = 0.61$; Fragmentos: $H_e = 0.63$). Tampoco hay diferencias entre las generaciones estudiadas. En el caso del coeficiente de endogamia (F_{IS}) tampoco se encontró diferencia entre los sitios de bosque continuo y fragmentado ni en los adultos ni en las progenies (Tabla 4). Considerando la diversidad de todos los loci, la probabilidad de exclusión de paternidad es de 0.998.

Tabla 5. Medidas de variación genética de adultos y progenie a través de ocho loci microsatélite.

Bosque continuo	Adultos						Progenie					
	A	Ar	Ap	Ho	He	F _{IS}	A	Ar	Ap	Ho	He	F _{IS}
Chamela	7.00 (2.62)	5.16 (2.00)	0.30 (0.30)	0.62 (0.17)	0.65 (0.18)	0.04	6.50 (2.98)	6.47 (2.97)	0.54 (0.48)	0.60 (0.21)	0.60 (0.19)	-0.006
Careyes	6.63 (2.33)	4.48 (1.65)	0.23 (0.19)	0.54 (0.22)	0.56 (0.21)	0.03	7.00 (2.83)	6.28 (2.60)	0.29 (0.39)	0.59 (0.16)	0.58 (0.17)	-0.002
Caimán	7.50 (2.14)	5.00 (1.66)	0.34 (0.22)	0.59 (0.19)	0.63 (0.21)	0.06	6.75 (2.61)	6.38 (2.53)	0.35 (0.49)	0.55 (0.25)	0.58 (0.25)	0.052
Promedio	7.04 (2.36)	4.86 (1.77)	0.29 (0.24)	0.58 (0.19)	0.61 (0.20)	0.04	6.75 (2.80)	6.37 (2.70)	0.39 (0.45)	0.58 (0.21)	0.59 (0.20)	0.015
Bosque Fragmentado												
A. seco	5.25 (1.98)	4.47 (1.88)	0.08 (0.11)	0.59 (0.30)	0.59 (0.28)	0.01	6.50 (2.39)	6.24 (2.29)	0.17 (0.49)	0.53 (0.25)	0.55 (0.25)	0.044
Tecuán	4.88 (1.96)	4.88 (1.96)	0.21 (0.31)	0.70 (0.26)	0.65 (0.19)	-0.08	6.13 (2.42)	6.13 (2.42)	0.28 (0.78)	0.64 (0.18)	0.62 (0.15)	-0.025
Zapata	5.25 (1.28)	5.14 (1.34)	0.48 (0.80)	0.59 (0.25)	0.65 (0.23)	0.08	6.50 (2.14)	6.01 (2.13)	0.21 (0.78)	0.61 (0.16)	0.62 (0.17)	0.015
Promedio	5.13 (1.74)	4.83 (1.73)	0.26 (0.40)	0.63 (0.27)	0.63 (0.23)	0.003	6.38 (2.31)	6.12 (2.28)	0.22 (0.68)	0.59 (0.19)	0.60 (0.19)	0.012

A=número de alelos por locus; Ar= número de alelos por locus después de la rarefacción, Ap.= número de alelos privados por locus después de la rarefacción, Ho=Heterocigosidad observada; He= Heterocigosidad esperada; F_{IS}= Índice de Fijación. Paréntesis indican error estándar.

El análisis de varianza molecular (AMOVA) muestra que la mayoría de la variación se encuentra repartida dentro de las poblaciones (95.92 en los adultos y 94.26 en la progenie), entre las poblaciones sólo el 3.45% y 5.76% para adultos y la progenie respectivamente, y prácticamente no hay diferencias en la variación entre las condiciones del hábitat (Tabla 5).

Tabla 6. Análisis de varianza molecular (AMOVA). Distribución de la varianza genética entre hábitats, entre poblaciones y dentro de las poblaciones de *B. alicastrum*

Fuente de variación	Adultos				Progenie			
	d.f.	Suma de cuadrados	Componente de varianza	% de la variación	d.f.	Suma de cuadrados	Componente de varianza	% de la variación
Entre condiciones	1	8.75	0.01	0.63	1	29.57	-0.006	-0.02
Entre poblaciones	4	30.71	0.08	3.45	4	118.35	0.14	5.76
Dentro de poblaciones	368	892.88	2.42	95.92	1178	2775.06	2.35	94.26

El análisis de estructura genética entre los tres sitios de bosque continuo muestra muy poca variación genética interpoblacional para el caso de árboles adultos ($F_{ST} = 0.033$), y el parámetro de endogamia también fue bajo y significativo ($F_{IS}=0.047$). La progenie de estos árboles también muestra baja variación genética poblacional pero ligeramente mayor que los adultos ($F_{ST} = 0.052$), y el parámetro de endogamia no fue significativo ($F_{IS}=0.011$). Para las tres poblaciones en sitios fragmentados el parámetro de diferenciación genética poblacional fue bajo pero significativo ($F_{ST} = 0.038$), el parámetro de endogamia también fue bajo y no significativo ($F_{IS} = 0.008$), la progenie mostró una baja y significativa estructura genética y también ligeramente mayor a la de los adultos ($F_{ST} = 0.071$), la endogamia fue baja ($F_{IS} = 0.012$) y no significativa (Tabla 5).

Tabla 7. Estadísticos-F para adultos y progenie de tres sitios de bosque continuo y tres sitios de bosque fragmentado de *B. alicastrum*. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$

		F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
Bosque Continuo	Adultos	0.047*	0.079**	0.033**
	Progenie	0.011	0.063**	0.052**
Bosque Fragmentado	Adultos	0.008	0.046	0.038*
	Progenie	0.012	0.082**	0.071**

Determinación de donadores de polen

Los coeficientes de correlación de paternidad (r_p) fueron bajos en ambas condiciones, ($r_p = 0.106 - 0.246$). Ritland (2002) establece que la correlación de paternidad está inversamente relacionada al número de padres (n), donde $r_p = 1/n$, es decir, un valor de correlación de paternidad de 1 indica que las progenies son hermanos completos y un valor de 0 indica que las progenies no comparten donadores. Nuestros datos indican que la mayoría de las semillas dentro de las familias (grupos de hermanos maternos) tienen diferentes padres, sin embargo hay una disminución en el número efectivo de donadores de polen (N_{ep}) en los sitios fragmentados (Tabla 7).

Tabla 8. Correlación de paternidad (r_p) y número estimado de donadores de polen (N_{ep})

Condición	Población	r_p		N_{ep}
Bosque Continuo	Chamela	0.106	(0.042)	9.43
	Careyes	0.164	(0.041)	6.10
	Caimán	0.107	(0.038)	9.35
	Promedio	0.126		8.29
Bosque Fragmentado	A. Seco	0.246	(0.188)	4.07
	Tecuán	0.208	(0.078)	4.81
	Zapata	0.191	(0.059)	5.24
	Promedio	0.215		4.70

Determinación de la distancia de dispersión de polen

El análisis de dispersión de polen a través del análisis de paternidad resultó en 223 asignaciones, 120 en bosque continuo y 103 en el bosque fragmentado. Sin embargo, de estas asignaciones sólo 47 y 57 respectivamente tuvieron una probabilidad mayor a 0.8. Un porcentaje importante de las asignaciones se encuentra en el rango más cercano (0-50 m) tanto en el bosque continuo (55%), como en el bosque fragmentado (35%). En el bosque continuo la distancia promedio de asignaciones fue menor que en los sitios de bosque fragmentado (179 m y 332 m respectivamente). Eventos de dispersión a larga distancia (>2000 m) sólo fueron encontradas en los sitios de bosque fragmentado, en el bosque continuo hubo pocas asignaciones mayores a 1000 m y con una probabilidad de paternidad menor a 0.80. El número estimado de donadores de polen no muestreados fue mayor en el bosque continuo (121.5) que en el bosque fragmentado (22.07). La probabilidad de paternidad disminuye conforme aumenta la distancia entre la madre y los árboles masculinos. La tasa de esta disminución de probabilidad es baja en las dos condiciones y es ligeramente diferente entre condiciones (bosque continuo: -0.0030 (0.0008); bosque fragmentado: -0,0012 (0.0002)) (Figura 2) (Tabla 9).

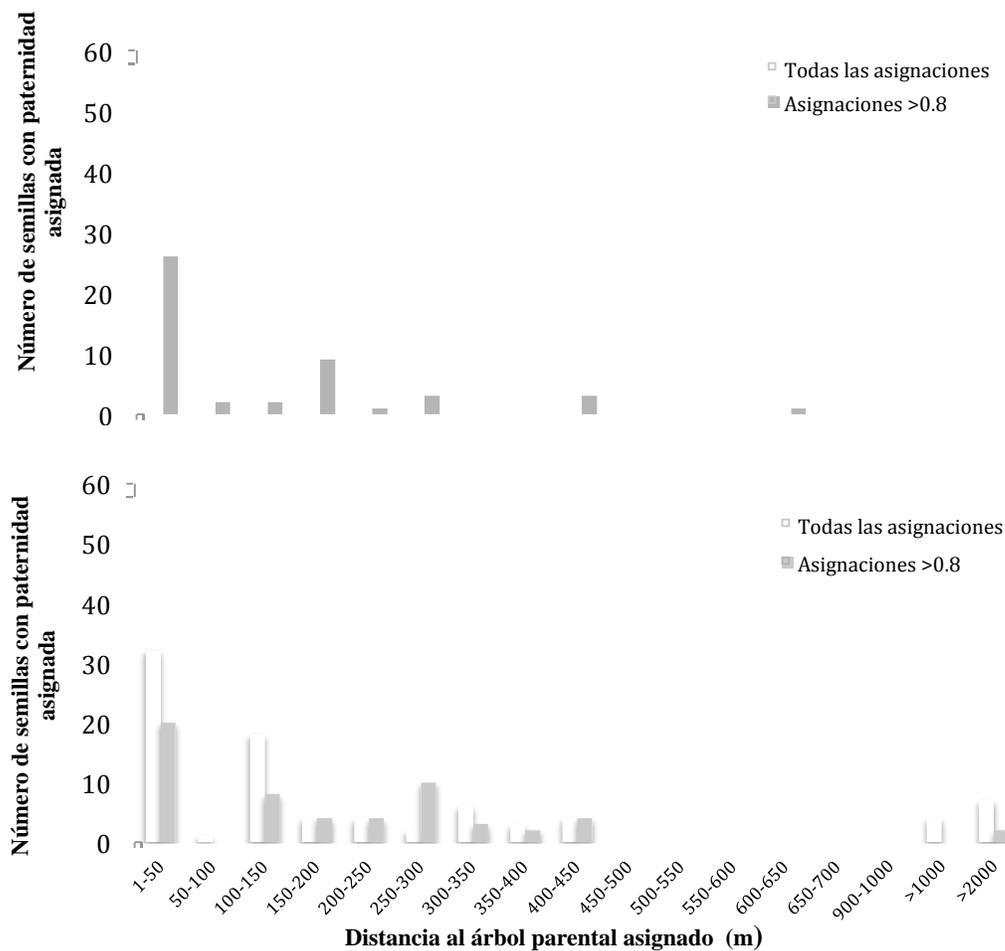


Figura 3. Comparación de la distribución de frecuencias de las asignaciones de paternidad de acuerdo a la distancia entre la prole y el padre asignado. Las barras blancas representan todas la asignaciones y las grises las que tienen una probabilidad mayor a 80%. A) Frecuencia de asignaciones en el bosque continuo. b) Frecuencia de asignaciones en los fragmentos de bosque.

Tabla 9. Parámetros de las distribuciones exponenciales para la dispersión de polen, Estimadas a partir del modelo de probabilidad total de la reconstrucción genealógica en las dos condiciones de hábitat.

	Bosque continuo	Bosque fragmentado
Parámetro λ	-0.0030 (0.0008)	-0.0012 (0.0002)
95% Límites de confianza	(-0.0047,-0.0011)	(-0.0018,-0.0008)
Distancia media de dispersión (m)	179	332
Número de machos no muestreados	121.5 (25.82)	22.07 (3.99)
95% Límites de confianza	(77.0,180.9)	(15.3,30.8)

Desempeño de la progenie

La probabilidad de germinación de las semillas fue alta y no hubo diferencias entre las condiciones del hábitat ($F=8.97$, $g.l=1$, $p=0.33$), tampoco el tiempo de emergencia de las plántulas difirió significativamente ($F=1.96$, $g.l=1$, $p=0.09$), ni el número de hojas durante un mes de crecimiento ($F=2.03$, $g.l=1$, $p=0.154$). Sin embargo, en los parámetros de vigor de las plántulas después de un año de crecimiento si hay diferencias estadísticamente significativas. Las plántulas de los árboles maternos que se encuentran en bosque continuo desarrollan un mayor número de hojas que las plántulas provenientes de árboles en bosque fragmentado ($F=87.19$, $g.l=1$, $p<0.0001$). El factor población anidado dentro de la condición, no muestra un efecto significativo en esta variable ($F=1.1$, $g.l=4$, $p=0.3545$) (Figura 3). El mismo resultado encontramos en la altura de las plántulas y en la biomasa seca total. Las plántulas provenientes de bosque continuo alcanzan una altura de hasta 17 cm mientras que las provenientes de bosque fragmentado llegan a medir hasta 14 cm ($F=45.29$, $g.l=1$, $p<0.0001$). El factor población anidado dentro de la condición no muestra un efecto significativo ($F=0.69$, $g.l=4$, $p=0.5963$) (Figura 4). La biomasa seca total también fue mayor en las plántulas provenientes de árboles en bosque continuo ($F=58.6$, $g.l=1$, $p<0.0001$) y tampoco hay un efecto significativo del factor población anidado dentro de la condición ($F=1.11$, $g.l=4$, $p=0.3488$) (Figura 5).

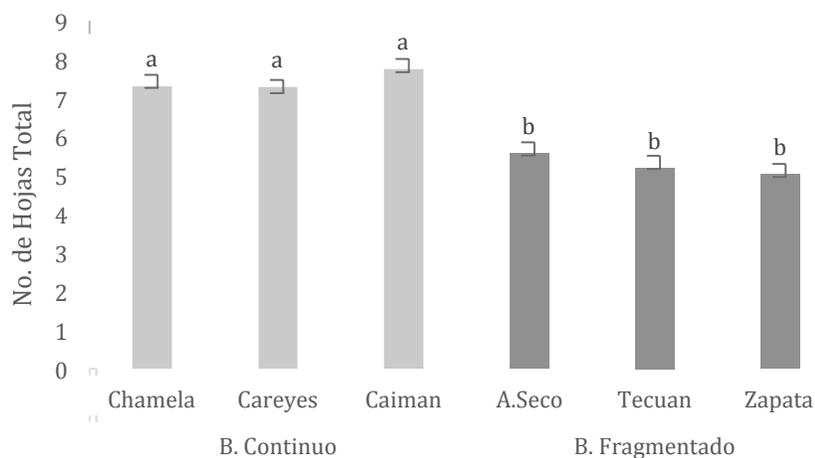


Figura 4. Número de hojas de plántulas de *B. alicastrum* creciendo en condiciones de invernadero por 1 año. Las barras representan las medias y las líneas sobre las barras el error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p<0.05$)

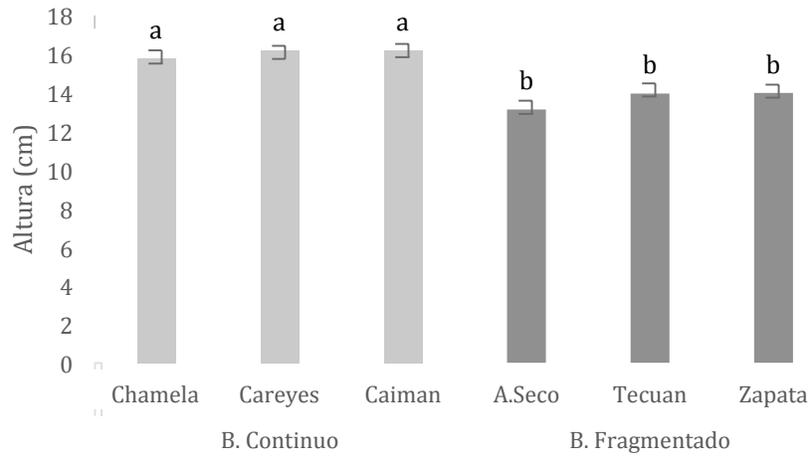


Figura 5. Altura de plántulas de *B. alicastrum* después de un año de crecimiento en condiciones de invernadero, obtenidas de individuos creciendo en bosque continuo y fragmentado. Las barras representan las medias y las líneas sobre las barras el error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

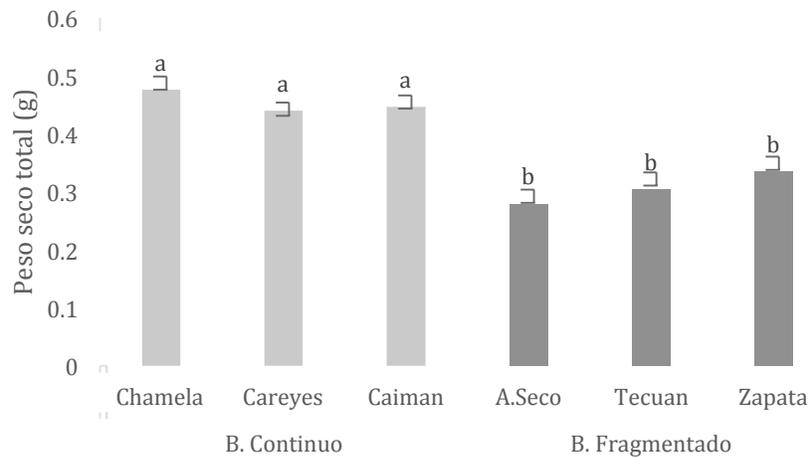


Figura 6. Biomasa seca total de plántulas de *B. alicastrum* después de un año de crecimiento en condiciones de invernadero, obtenidas de individuos creciendo en bosque continuo y fragmentado. Las barras representan las medias y las líneas sobre las barras representan el error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

DISCUSIÓN

La modificación antropogénica de los ecosistemas naturales puede tener consecuencias negativas sobre las poblaciones de plantas. En las plantas dioicas, uno de los atributos poblacionales que puede ser afectado por disturbios es la proporción sexual. En general, en este trabajo no se observaron desviaciones estadísticamente significativas de la proporción esperada 1:1, resultado que también se ha observado en otras especies tropicales dioicas (e.g. Opler & Bawa, 1978; Pavón & de Luna Ramírez, 2008; Riba-Hernández *et al.*, 2014). De manera natural, de acuerdo a Fisher (1930), en las especies dioicas, la inversión parental a cada sexo debe ser igual debido a que la contribución genética de cada sexo es equivalente, por lo que se espera que la proporción sexual sea 1:1. Sin embargo, en algunas especies de árboles tropicales dioicos existe un sesgo en las proporciones sexuales hacia el sexo masculino, éste resultado ha sido atribuido a que los árboles masculinos pueden florecer más frecuentemente (e.g. Bullock & Bawa, 1981; Bullock, 1982; Thomas & LaFrankie, 1993; Nicotra, 1998), a una edad más temprana (Opler & Bawa, 1978; Bullock & Bawa, 1981; Armstrong & Irvine, 1989; Ackerly *et al.*, 1990; Queenborough *et al.*, 2007), o a que los árboles femeninos pueden tener tasas de mortalidad mayores en comparación con los árboles masculinos, esto último asociado principalmente a diferencias en los costos reproductivos entre sexos (Allen & Antos, 1988). No obstante en las regiones tropicales hay poca evidencia de mortalidad diferencial entre sexos en árboles dioicos (Bullock, 1992; Nicotra, 1998; Uribe-Mú & Quesada, 2006). A pesar de que las poblaciones de *B. alicastrum* en la mayoría de los sitios de bosque fragmentado han sido reducidas, sólo en el sitio Zapata, observamos un sesgo significativo hacia árboles femeninos. La predominancia del sexo femenino entre las especies dioicas es rara y pocos casos han sido reportados (Melampy & Howe, 1977; Opler & Bawa, 1978). El sitio Zapata, es representativo de una zona utilizada para pastoreo de ganado, por lo que este resultado puede ser un artefacto de la preferencia de los pobladores por mantener los árboles femeninos, debido a que la producción de semillas sirve como alimento para el ganado. Mediciones de la productividad en términos de kilogramos de frutos por árbol, indican que un árbol femenino adulto puede producir hasta 163 kg de frutos (Hernández-González *et al.*, 2014). En la especie *Diospyros sylvatica*, Somanathan & Borges (2000), también

encuentran un sesgo hacia árboles femeninos en un fragmento y lo atribuyen a la eliminación selectiva de árboles masculinos, ya que en esta especie las tasas de crecimiento de estos árboles son menores que las de los individuos femeninos y por esa razón son preferidos para la construcción de establos (Somanathan & Borges, 2000).

Las predicciones de las consecuencias genéticas de la fragmentación de hábitat están basadas en la teoría de la genética de poblaciones. Sin embargo, en árboles no hay evidencia suficiente que soporte esta teoría (Kramer *et al.*, 2008). En general se ha observado que la respuesta de las poblaciones de árboles a la fragmentación del hábitat puede variar. Para cualquier especie un conjunto de factores determina sí y como, esta es afectada. Algunas de estas características pueden ser, la longevidad y el sistema reproductivo (Aguilar *et al.*, 2008), por lo que las consecuencias de la fragmentación pueden ser especie-específicos. En algunas especies se afecta negativamente la diversidad genética y se incrementa la diferenciación poblacional como consecuencia de la fragmentación (Young *et al.*, 1996; Lowe *et al.*, 2005; Chávez-Pesqueira *et al.*, 2014), mientras que en otras especies las distancias de flujo génico entre las poblaciones remanentes aumentan, lo cual disminuye la estructura genética poblacional (Nason *et al.*, 1998; Dick *et al.*, 2003).

En este trabajo los niveles de heterocigosidad encontrados para las poblaciones de *B. alicastrum* fueron altos, tanto en los adultos (0.63) como en las progenies (0.60) y son similares a los valores observados en otras especies dioicas de la familia Moraceae, como *Ficus hispida*, *Ficus exasperata* ($H_e = 0.639$ y $H_e = 0.776$, respectivamente) (Dev *et al.*, 2011) y *Milicia excelsa* ($H_e = 0.547$) (Bizoux *et al.*, 2009) y no difirió ni entre condiciones de bosque ni entre clases de tamaño. Tampoco se observaron pérdidas importantes ni en la riqueza alélica, ni en la riqueza alélica privada. Este resultado en los adultos puede deberse a el número de generaciones transcurridas después de la fragmentación del hábitat, las cuales se ha demostrado pueden ser determinantes en la reducción de la diversidad genética de las poblaciones de plantas (Aguilar *et al.*, 2008). En la región de estudio el proceso de fragmentación inició en la década de 1950, mientras que *B. alicastrum* puede vivir más de 150 años (Martínez-Ramos & Alvarez-Buylla, 1998) por lo que es muy probable que estos árboles adultos se hayan establecido antes del proceso de fragmentación. Por otro lado, en las progenies estos resultados pueden estar relacionados a las características de la especie.

Se ha sugerido que los árboles en general pueden ser menos vulnerables y más resistentes a los impactos de la fragmentación del hábitat que otras plantas, debido a su alta diversidad genética y al movimiento extensivo de polen (Hamrick, 2004). Además, el sistema de apareamiento por entrecruza presentan una manera de mantener la variación genética y de disminuir el número de individuos homocigos (Loveless & Hamrick, 1984). No obstante los resultados de diversidad genética en los hábitats fragmentados no puede ser adjudicado a un sólo factor, sino más bien a la integración de varios efectos como el tamaño poblacional, el grado de aislamiento y las características del paisaje (Ezard & Travis, 2006).

El análisis de varianza molecular muestra que entre condiciones de hábitat no hay variación genética, la mayor parte de la variación genética está dentro, más que entre poblaciones (definidas como sitios de muestreo). Resultado similar al encontrado por Lander & Monro (2015) en la misma especie, usando marcadores nucleares ribosomales y marcadores de cloroplasto. La variación genética interpoblacional observada fue baja, resultado similar al encontrado por Hamrick *et al.*, (1993) para la misma especie en la Isla Barro Colorado ($F_{ST}= 0.050$). Lo que sugiere que hay flujo de polen a través del paisaje y puede estar evitando la estructuración genética. Esto puede deberse a que como se ha sugerido, por su gran tamaño y producción masiva de polen y semillas, las plantas perennes y leñosas tienen un alto potencial para el flujo de genes (Vranckx *et al.*, 2012). Además el flujo de polen en árboles y arbustos, particularmente en especies polinizadas por viento, puede ser extensivo y de alguna manera contrarresta la pérdida de variación genética (Nason & Hamrick, 1997; White, *et al.*, 2002; Hamrick, 2004; Dick *et al.*, 2008). Lo que también explica los bajos valores de endogamia en la progenie.

El movimiento de polen detectado en nuestro análisis ocurrió principalmente en distancias menores a 600 m, aunque la frecuencia es mayor a distancias más próximas (<50 m). Sin embargo, también detectamos flujo de polen ocurriendo a distancias mayores a un kilómetro y en los sitios fragmentados incluso mayores a 2 kilómetros. Sin embargo, la cantidad de asignaciones es muy baja, probablemente debido a las dificultades asociadas con el muestreo total de los padres, como indica el alto número de individuos no muestreados que probablemente provengan de lugares fuera de los sitios de estudio, aunque

no descartamos la posibilidad que sean individuos dentro de los sitios pero que no fueron identificados como reproductivos, pero que están contribuyendo a la reproducción.

Casos de flujo de polen a largas distancias en especies polinizadas por viento han sido reportados, por ejemplo, en la especie *Milicia excelsa* se estiman distancias de dispersión de 1 a 7.1 km. La fragmentación del hábitat puede impactar el flujo de polen no imponiendo una barrera para el movimiento de polen entre los parches remanentes, pero si reduciendo la diversidad de fuentes de polen (Quesada *et al.*, 2013). Si bien es cierto, tal como se ha demostrado en otros trabajos, que el flujo de polen a larga distancia es posible, otras características de la dispersión del polen pueden afectarse, como por ejemplo el número efectivo de donadores de polen. Nuestros resultados muestran que el número efectivo de donadores de polen es menor en los sitios de bosque fragmentado. Resultado encontrado en otras especies tropicales como *Swietenia humilis* (Rosas *et al.*, 2011), y *Ceiba aesculifolia* (Quesada *et al.*, 2013). Una explicación puede ser el menor número de individuos reproductivos en los sitios fragmentados, ya que aunque exista flujo de polen e incluso aunque este sea a distancias mayores como se ha observado en otras especies, no necesariamente implica que un mayor número de donadores de polen estén involucrados en la reproducción (Rosas *et al.*, 2011; Quesada *et al.*, 2013;). Tanto la distancia de dispersión del polen, como el número de donadores de polen por evento reproductivo, tienen influencia directa sobre la calidad de la progenie producida (Cascante *et al.*, 2002).

Los resultados de los análisis de vigor indican que la fragmentación del hábitat no afecta los parámetros de germinación (probabilidad de germinación, tiempo de emergencia). Sin embargo, los parámetros a un año de crecimiento (altura, número de hojas y biomasa total) si difieren entre condiciones de hábitat, siendo mayores en las progenies provenientes del bosque continuo. Resultados similares, donde se encuentran reducciones en el desempeño, han sido reportados en la literatura. En la especie *Samanea saman*, Cascante *et al.*, (2002) encuentran reducciones en la tasa de germinación, área de hojas y biomasa de las plántulas. Aguilar *et al.*, (2012) también reportan un menor desempeño de las plántulas del árbol *Prosopis caldenia* provenientes de bosques fragmentados. Este resultado puede estar asociado a las condiciones físicas de los sitios donde crecen los padres, se ha observado que debido a la fragmentación ocurren alteraciones en las condiciones locales, por ejemplo en el microclima, ya que ligado a la pérdida en la cantidad

del hábitat, se desencadenan cambios en el ambiente físico debido principalmente al efecto de borde, resultando en incrementos en la radiación solar y exposición al viento, los cuales afectan los procesos de ciclaje de nutrientes, presencia de microorganismos del suelo y retención de la humedad, así como incrementos en la evaporación y desecación de las plantas que se encuentran creciendo en los fragmentos de bosque (Saunders *et al.*, 1991; Kapos 1989; Didham, 2001; Mix, *et al.*, 2006). Otra posible explicación puede estar relacionada con la cantidad y calidad del polen que fertiliza a los óvulos. En general, se ha reportado que la progenie producida por grandes cargas de polen tienden a aumentar la germinación y el crecimiento vegetativo (Mulcahy & Mulcahy, 1975; Stephenson *et al.*, 1986; Quesada, 1993). Se espera que las medidas de diversidad de polen se correlacionen con el desempeño de la progenie, debido a que una diversidad de polen reducida resulta en una alta probabilidad de combinaciones no adecuadas de polen y óvulos (Skogsmyr & Lankinen, 2002). Trabajos previos también han encontrado evidencia de que una diversidad de polen reducida es el efecto que mejor explica la variación en el crecimiento de las plántulas y probablemente tiene efectos por encima de la endogamia (Breed *et al.*, 2012). Existe la expectativa de que la heterocigosidad pueda correlacionarse con el desempeño, sin embargo, debido a que los marcadores moleculares microsatélites son considerados generalmente neutrales y la muestra total relativa al genoma es pequeña, esto implica que la correlación puede no ser fuerte (Reed & Frankham, 2003).

Nuestros resultados indican que para esta especie, la modificación del hábitat puede tener serias consecuencias sobre procesos como el flujo génico vía polen y el desempeño temprano de la progenie, los cuales son clave para la supervivencia de las poblaciones de plantas. Son necesarios trabajos que evalúen otra serie de factores como, el establecimiento y la regeneración de las poblaciones de manera natural, así como la composición genética de los propágulos establecidos.

CONCLUSIONES

Las proporciones sexuales de *Brosimum alicastrum* en los sitios muestreados no difieren significativamente de la proporción esperada (1:1).

La fragmentación del hábitat no afectó los niveles de diversidad genética ni de endogamia en las poblaciones de *B. alicastrum* estudiadas en Chamela, Jalisco.

El número efectivo de donadores de polen fue mayor para árboles de *B. alicastrum* en bosque continuo que para los árboles de bosque fragmentado.

La distancia promedio de movimiento de polen fue mayor en sitios fragmentados que en sitios de bosque continuo.

Las características de desempeño temprano de la progenie en sitios de bosque fragmentado disminuyeron significativamente en comparación a los de bosque continuo.

LITERATURA CITADA

- Ackerly, D. D., Rankin-De-Merona, J. M., & Rodrigues, W. A. (1990). Tree Densities and Sex Ratios in Breeding Populations of Dioecious Central Amazonian Myristicaceae. *Journal of Tropical Ecology*, 6(2), 239–248.
- Aguilar, R., Ashworth, L., Calviño, A., & Quesada, M. (2012). What is left after sex in fragmented habitats? Assessing the quantity and quality of progeny in the endemic tree *Prosopis caldenia* (Fabaceae). *Biological Conservation*, 152, 81–89.
- Aguilar, R., Quesada, M., Ashworth, L., Herrerias-Diego, Y., & Lobo, J. (2008). Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Molecular Ecology*, 17(24), 5177–5188.
- Aizen, M. A., & Feinsinger, P. (1994). Habitat Fragmentation, Native Insect Pollinators, and Feral Honey Bees in Argentine “Chaco Serrano”. *Ecological Applications*, 4(2),
- Allen, G. A., & Antos, J. A. (1988). Relative reproductive effort in males and females of the dioecious shrub *Oemleria cerasiformis*. *Oecologia*, 76(1), 111–118.
- Armstrong, J. E., & Irvine, A. K. (1989). Flowering, Sex Ratios, Pollen-Ovule Ratios, Fruit Set, and Reproductive Effort of a Dioecious Tree, *Myristica insipida* (Myristicaceae), in Two Different Rain Forest Communities. *American Journal of Botany*, 76(1), 74–85.
- Bacles, C. F. E., Burczyk, J., Lowe, A. J., & Ennos, R. A. (2005). Historical and Contemporary Mating Patterns in Remnant Populations of the Forest Tree *Fraxinus excelsior* L. *Evolution*, 59(5), 979–990.
- Bawa, K. S., & Opler, P. A. (1975). Dioecism in Tropical Forest Trees. *Evolution*, 29(1), 167–179.

- Bizoux, J.-P., Daïnou, K., Bourland, N., Hardy, O. J., Heuertz, M., Mahy, G., & Doucet, J.-L. (2009). Spatial genetic structure in *Milicia excelsa* (Moraceae) indicates extensive gene dispersal in a low-density wind-pollinated tropical tree. *Molecular Ecology*, *18*(21), 4398–4408.
- Breed, M. F., Marklund, M. H. K., Ottewell, K. M., Gardner, M. G., Harris, J. B. C., & Lowe, A. J. (2012). Pollen diversity matters: revealing the neglected effect of pollen diversity on fitness in fragmented landscapes. *Molecular Ecology*, *21*(24), 5955–5968.
- Cascante, A., Quesada, M., Lobo, J. J., & Fuchs, E. A. (2002). Effects of Dry Tropical Forest Fragmentation on the Reproductive Success and Genetic Structure of the Tree *Samanea saman*. *Conservation Biology*, *16*(1), 137–147.
- Ceballos, G., & García, A. (1995). Conserving Neotropical Biodiversity: The Role of Dry Forests in Western Mexico. *Conservation Biology*, *9*(6), 1349–1356.
- Chávez-Pesqueira, M., Suárez-Montes, P., Castillo, G., & Núñez-Farfán, J. (2014). Habitat fragmentation threatens wild populations of *Carica papaya* (Caricaceae) in a lowland rainforest. *American Journal of Botany*.
- Collevatti, R. G., Grattapaglia, D., & Hay, J. D. (2001). Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology*, *10*(2), 349–356.
- Delph, L. F. (1999). Sexual Dimorphism in Life History. En. Geber M. A., Dawson T. E, & L. F. Delph (Eds.), *Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants* (pp. 149–173). Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Germany.

- Dev, S. A., Kjellberg, F., Hossaert-McKey, M., & Borges, R. M. (2011). Fine-scale Population Genetic Structure of Two Dioecious Indian Keystone Species, *Ficus hispida* and *Ficus exasperata* (Moraceae). *Biotropica*, *43*(3), 309–316.
- Dick, C. W. (2001). Genetic rescue of remnant tropical trees by an alien pollinator. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *268*(1483), 2391–2396.
- Dick, C. W., Etchelecu, G., & Austerlitz, F. (2003). Pollen dispersal of tropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. *Molecular Ecology*, *12*(3), 753–764.
- Dick, C. W., Hardy, O. J., Jones, F. A., & Petit, R. J. (2008). Spatial Scales of Pollen and Seed-Mediated Gene Flow in Tropical Rain Forest Trees. *Tropical Plant Biology*, *1*(1), 20–33.
- Didham, R. K. (2010). Ecological Consequences of Habitat Fragmentation. In *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 1-11.
- Didham, R. K., Ghazoul, J., Stork, N. E., & Davis, A. J. (1996). Insects in fragmented forests: a functional approach. *Trends in Ecology & Evolution*, *11*(6), 255–260.
- Eckert, C. G., Kalisz, S., Geber, M. A., Sargent, R., Elle, E., Cheptou, P.-O., Goodwillie C., Johnston M.O., Kelly J.K., Moeller D.A., Porcher E., Ree R.H., Vallejo-Marín M., Winn, A. A. (2010). Plant mating systems in a changing world. *Trends in Ecology & Evolution*, *25*(1), 35–43.
- Edwards, A. W. F. (2000). Carl Düsing (1884) on The Regulation of the Sex-Ratio. *Theoretical Population Biology*, *58*(3), 255–257.

- Ellstrand, N. C., & Elam, D. R. (1993). Population Genetic Consequences of Small Population Size: Implications for Plant Conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24(1), 217–242.
- Fahrig, L. (2003). Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), 487–515.
- Field, D. L., Pickup, M., & Barrett, S. C. H. (2013). Ecological context and metapopulation dynamics affect sex-ratio variation among dioecious plant populations. *Annals of Botany*, 111(5), 917–923.
- Fuchs, E. J., Lobo, J. A., & Quesada, M. (2003). Effects of Forest Fragmentation and Flowering Phenology on the Reproductive Success and Mating Patterns of the Tropical Dry Forest Tree *Pachira quinata*. *Conservation Biology*, 17(1), 149–157.
- Gao, J., Queenborough, S. A., Chai, J. P. (2012). Flowering sex ratios and spatial distribution of dioecious trees in a South-east Asian tropical seasonal forest. *Journal of Tropical Forest Science* 21(4):517-527.
- Gehring J.W., Linhart Y.B. (1993). Sexual dimorphism and response to low resources in the dioecious plant *Silene latifolia* (Caryophyllaceae). *International Journal of plant Science* 154: 152-162.
- Gibbs, H. K., Ruesch, A. S., Achard, F., Clayton, M. K., Holmgren, P., Ramankutty, N., & Foley, J. A. (2010). Tropical forests were the primary sources of new agricultural land in the 1980s and 1990s. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(38), 16732–16737.

- Gonzales, E., Hamrick, J. L., Smouse, P. E., Trapnell, D. W., & Peakall, R. (2010). The Impact of Landscape Disturbance on Spatial Genetic Structure in the Guanacaste Tree, *Enterolobium cyclocarpum* (Fabaceae). *Journal of Heredity*, *101*(2), 133–143.
- Hamrick, J. L. (2004). Response of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecology and Management*, *197*(1–3), 323–335.
- Hamrick, J. L. (2012). Tropical breeding systems: one and done? *Heredity*, *109*(6), 330–331.
- Hamrick, J. L., Murawski, D. A., & Nason, J. D. (1993). The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. *Vegetatio*, *107*(1), 281–297.
- Hernández-González, O., Vergara-Yoisura, S. & Larqué-Saavedra A (2014). Studies on the productivity of *Brosimum alicastrum* a tropical tree used for animal feed in the Yucatan Peninsula. *Bothalia Journal*, *44*(6), 70-81.
- Hoekstra, J. M., Boucher, T. M., Ricketts, T. H., & Roberts, C. (2005). Confronting a biome crisis: global disparities of habitat loss and protection. *Ecology Letters*, *8*(1), 23–29.
- Honnay, O., & Jacquemyn, H. (2007). Susceptibility of Common and Rare Plant Species to the Genetic Consequences of Habitat Fragmentation. *Conservation Biology*, *21*(3), 823–831.
- Ibarra-Manriquez, G., & Oyama, K. (1992). Ecological Correlates of Reproductive Traits of Mexican Rain Forest Trees. *American Journal of Botany*, *79*(4), 383–394.

- Hadfield JD, Richardson DS, Burke T. (2006) Towards unbiased parentage assignment: combining genetic, behavioural and spatial data in Bayesian framework. *Mol Ecol* 15: 3715-3730. *Molecular ecology*, 15(12), 3715–30.
- Kettle, C. J., Hollingsworth, P. M., Jaffré, T., Moran, B., & Ennos, R. A. (2007). Identifying the early genetic consequences of habitat degradation in a highly threatened tropical conifer, *Araucaria nemorosa* Laubenfels. *Molecular Ecology*, 16(17), 3581–3591.
- Kolb, A., & Diekmann, M. (2005). Effects of Life-History Traits on Responses of Plant Species to Forest Fragmentation. *Conservation Biology*, 19(3), 929–938.
- Kramer, A. T., Ison, J. L., Ashley, M. V., & Howe, H. F. (2008). The Paradox of Forest Fragmentation Genetics. *Conservation Biology*, 22(4), 878–885.
- Lander, T. A., & Monro, A. (2015). Conservation of *Brosimum alicastrum*, an underutilized crop and keystone forest tree species; a potential win–win for conservation and development in Latin America. *Biodiversity and Conservation*, 24(8), 1917–1930.
- Laurent Excoffier, G. L. (2005). ARLEQUIN v. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online*, 1, 47–50.
- Leimu, R., Mutikainen, P., Koricheva, J., & Fischer, M. (2006). How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? *Journal of Ecology*, 94(5), 942–952.
- Lenza, E., & Oliveira, P. E. (2005). Reproductive biology of *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae), a dioecious species, in a gallery forest of Triângulo Mineiro, Brazil. *Brazilian Journal of Botany*, 28(1), 179–190.

- Loveless, M. D., & Hamrick, J. L. (1984). Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15, 65–95.
- Lowe, A. (2005). Population genetics of neotropical trees focus issue. *Heredity*, 95(4), 243–245.
- Lowe, A. J., Boshier, D., Ward, M., Bacles, C. F. E., & Navarro, C. (2005). Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity*, 95(4), 255–273.
- Maass, J. M. (1995). Conversion of tropical dry forest to pasture and agriculture. En Bullock, S.H., Mooney, H.A., E. Medina (Eds), *Seasonally Dry Tropical Forests*. Cambridge University Press. 399-442.
- Markl, J. S., Schleuning, M., Forget, P. M., Jordano, P., Lambert, J. E., Traveset, A., Wright S.J., Böhning-Gaese, K. (2012). Meta-Analysis of the Effects of Human Disturbance on Seed Dispersal by Animals. *Conservation Biology*, 26(6), 1072–
- McConkey, K. R., Prasad, S., Corlett, R. T., Campos-Arceiz, A., Brodie, J. F., Rogers, H., & Santamaria, L. (2012). Seed dispersal in changing landscapes. *Biological Conservation*, 146(1), 1–13.
- Menges, E. S. (1991). Seed Germination Percentage Increases with Population Size in a Fragmented Prairie Species. *Conservation Biology*, 5(2), 158–164.
- Mix, C., Xavier Picó, F., van Groenendael, J. M., & Joop Ouborg, N. (2006). Inbreeding and soil conditions affect dispersal and components of performance of two plant species in fragmented landscapes. *Basic and Applied Ecology*, 7(1), 59–69.

- Mulcahy, D. L., & Mulcahy, G. B. (1975). The influence of gametophytic competition on sporophytic quality in *Dianthus chinensis*. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 46(6), 277–280.
- Murcia, C. (1995). Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 10(2), 58–62.
- Murphy, P. G., & Lugo, A. E. (1986). Ecology of Tropical Dry Forest. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 17(1), 67–88.
- Murphy, P. G., & Lugo, A. E. (1995). Dry forests of Central America and the Caribbean. En *Seasonally Dry Tropical Forests*, Bullock, S.H., Mooney, H.A., E. Medina (Eds), Cambridge University Press.
- Nason, J. D., & Hamrick, J. L. (1997). Reproductive and Genetic Consequences of Forest Fragmentation: Two Case Studies of Neotropical Canopy Trees. *Journal of Heredity*, 88(4), 264–276.
- Nason, J. D., Herre, E. A., & Hamrick, J. L. (1998). The breeding structure of a tropical keystone plant resource. *Nature*, 391(6668), 685–687.
- Nicotra, A. B. (1998). Sex ratio variation and spatial distribution of *Siparuna grandiflora*, a tropical dioecious shrub. *Oecologia*, 115(1-2), 102–113.
- O'Connell, L. M., Mosseler, A., & Rajora, O. P. (2006). Impacts of forest fragmentation on the mating system and genetic diversity of white spruce (*Picea glauca*) at the landscape level. *Heredity*. 97:418-426.
- Opler, P. A., & Bawa, K. S. (1978a). Sex Ratios in Tropical Forest Trees. *Evolution*, 32(4), 812–821.

- Opler, P. A., & Bawa, K. S. (1978b). Sex Ratios in Tropical Forest Trees. *Evolution*, 32(4), 812–821.
- Osunkoya, O. O. (1999). Population structure and breeding biology in relation to conservation in the dioecious *Gardenia actinocarpa* (Rubiaceae) – a rare shrub of North Queensland rainforest. *Biological Conservation*, 88(3), 347–359.
- Ouborg, N. J., Vergeer, P., & Mix, C. (2006). The rough edges of the conservation genetics paradigm for plants. *Journal of Ecology*, 94(6), 1233–1248.
- Pavón, N. P., & de Luna Ramírez, I. (2008). Sex ratio, size distribution and nitrogen resorption in the dioecious tree species *Bursera morelensis* (Burseraceae). *Journal of Tropical Ecology*, 24(04).
- Pennington, T. D., & Sarukhán, J. (2005). *Árboles tropicales de México : manual para la identificación de las principales especies*. Universidad Nacional Autónoma de México., & Fondo de Cultura Económica (México).
- Queenborough, S. A., Burslem, D. F. R. P., Garwood, N. C., & Valencia, R. (2007). Determinants of biased sex ratios and inter-sex costs of reproduction in dioecious tropical forest trees. *American Journal of Botany*, 94(1), 67–78.
- Quesada, M., Herrerías-Diego, Y., Lobo, J. A., Sánchez-Montoya, G., Rosas, F., & Aguilar, R. (2013). Long-term effects of habitat fragmentation on mating patterns and gene flow of a tropical dry forest tree, *Ceiba aesculifolia* (Malvaceae: Bombacoideae). *American Journal of Botany*, 100(6), 1095–1101.
- Quesada, M., Winsor, J. A., & Stephenson, A. G. (1993). Effects of Pollen Competition on Progeny Performance in a Heterozygous Cucurbit. *The American Naturalist*, 142(4), 694–706.

R Development Core Team 2008 R: a language and environment for statistical computing.

R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.R-project.org/>.

Reed, D. H., & Frankham, R. (2003). Correlation between Fitness and Genetic Diversity.

Conservation Biology, 17(1), 230–237.

Riba-Hernández, P., Segura, J. L., Fuchs, E. J., & Moreira, J. (2014). Population and

genetic structure of two dioecious timber species *Virola surinamensis* and *Virola*

koschnyi (Myristicaceae) in southwestern Costa Rica. *Forest Ecology and*

Management, 323, 168–176.

Ritland, K. (2002). Extensions of models for the estimation of mating systems using n

independent loci. *Heredity*, 88(4), 221–228.

Rosas, F., Quesada, M., Lobo, J. A., & Sork, V. L. (2011). Effects of habitat fragmentation

on pollen flow and genetic diversity of the endangered tropical tree *Swietenia*

humilis (Meliaceae). *Biological Conservation*, 144(12), 3082–3088.

Sánchez-Azofeifa, G. A., Quesada, M., Cuevas-Reyes, P., Castillo, A., & Sánchez-

Montoya, G. (2009). Land cover and conservation in the area of influence of the

Chamela-Cuixmala Biosphere Reserve, Mexico. *Forest Ecology and Management*,

258(6), 907–912.

Sanderson, E. W., Jaiteh, M., Levy, M. A., Redford, K. H., Wannebo, A. V., & Woolmer,

G. (2002). The Human Footprint and the Last of the Wild. *BioScience*, 52(10), 891–

904.

Saunders, D. A., Hobbs, R. J., & Margules, C. R. (1991). Biological Consequences of

Ecosystem Fragmentation: A Review. *Conservation Biology*, 5(1), 18–32.

- Skogsmyr, I., & Lankinen, Å. (2002). Sexual selection: an evolutionary force in plants? *Biological Reviews*, 77(4), 537–562.
- Smouse, P. E., & Sork, V. L. (2004). Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. *Forest Ecology and Management*, 197(1–3), 21–38.
- Somanathan, H., & Borges, R. M. (2000). Influence of exploitation on population structure, spatial distribution and reproductive success of dioecious species in a fragmented cloud forest in India. *Biological Conservation*, 94(2), 243–256.
- Sork, V. L., & Smouse, P. E. (2006). Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. *Landscape Ecology*, 21(6), 821–836.
- Stephenson, A. G., Winsor, J. A., & Davis, L. E. (1986). Effects of Pollen Load Size on Fruit Maturation and Sporophyte Quality in Zucchini. En D. L. Mulcahy, G. B. Mulcahy, & E. Ottaviano (Eds.), *Biotechnology and Ecology of Pollen* (pp. 429–434). Springer New York.
- Szpiech, Z. A., Jakobsson, M., & Rosenberg, N. A. (2008). ADZE: a rarefaction approach for counting alleles private to combinations of populations. *Bioinformatics*, 24(21), 2498–2504.
- Thomas, S. C., & LaFrankie, J. V. (1993). Sex, Size and Interyear Variation in Flowering Among Dioecious Trees of the Malayan Rain Forest. *Ecology*, 74(5), 1529–1537.
- Tscharntke, T., & Brandl, R. (2004). Plant-Insect Interactions in Fragmented Landscapes. *Annual Review of Entomology*, 49(1), 405–430.
- Uribe-Mú, C. A., & Quesada, M. (2006). Preferences, patterns and consequences of branch removal on the dioecious tropical tree *Spondias purpurea* (Anacardiaceae) by the

- insect borer *Oncideres albomarginata* chamela (Cerambycidae). *Oikos*, *112*(3), 691–697.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P., Shipley P., (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, *4*:535-538.
- Vranckx, G., Jacquemyn, H., Muys, B., & Honnay, O. (2012). Meta-Analysis of Susceptibility of Woody Plants to Loss of Genetic Diversity through Habitat Fragmentation. *Conservation Biology*, *26*(2), 228–237.
- White, G. M., Boshier, D. H., & Powell, W. (2002). Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: An example from *Swietenia humilis* Zuccarini. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(4), 2038–2042.
- Young, A., Boyle, T., & Brown, T. (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution*, *11*(10), 413–418.