



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

LICENCIATURA EN ECOLOGÍA

Escuela Nacional de Estudios Superiores,
Unidad Morelia

Estructura genética fina de dos epífitas con
diferentes rasgos reproductivos. *Aechmea*
mariae-reginae H. Wendl y *Werauhia ampla*
(L.B. Sm.) J.R. Grant (Bromeliaceae)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN ECOLOGÍA

P R E S E N T A

SOFÍA HUERTA FAHARA

DIRECTOR DE TESIS: DR. MAURICIO RICARDO QUESADA AVENDAÑO

MORELIA, MICHOACÁN

OCTUBRE, 2023



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.



ESCUELA
NACIONAL
DE ESTUDIOS
SUPERIORES
UNIDAD MORELIA

10
años
(2011-2021)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD MORELIA
SECRETARÍA GENERAL
SERVICIOS ESCOLARES

MTRA. IVONNE RAMÍREZ WENCE

DIRECTORA

DIRECCIÓN GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

PRESENTE

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la **sesión ordinaria 10** del **Comité Académico de la Licenciatura en Ecología** de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES), Unidad Morelia, celebrada el día **25 de septiembre de 2023**, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para la presentación del Trabajo Profesional de la alumna **Sofía Huerta Fahara** de la Licenciatura en **Ecología**, con número de cuenta **420138008**, con el trabajo titulado: **"Estructura genética fina de dos epífitas con diferentes rasgos reproductivos. *Aechmea mariaereginae* H. Wedl y *Werauhia ampla* (L.B.Sm.) J. R. Grant (Bromeliaceae)"**, bajo la dirección como tutor del **Dr. Mauricio Ricardo Quesada Avendaño** y como co-tutor el **Dr. Eric Fuchs Castillo**.

El jurado queda integrado de la siguiente manera:

Presidente:	Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa
Vocal:	Dr. Antonio González Rodríguez
Secretario:	Dr. Mauricio Ricardo Quesada Avendaño
Suplente:	Dr. Alfredo Cascante Marín
Suplente:	Dr. Edson Jacob Cristóbal Pérez

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Morelia, Michoacán a 24 de octubre de 2023.

DRA. YUNUEN TAPIA TORRES
SECRETARIA GENERAL

CAMPUS MORELIA

Antigua Carretera a Pátzcuaro N° 8701, Col. Ex Hacienda de San José de la Huerta
58190, Morelia, Michoacán, México. Tel: (443)689.3500 y (55)5623.7300, Extensión Red UNAM: 80614
www.enesmorelia.unam.mx

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco profundamente a la Licenciatura en Ecología y a la Escuela Nacional de Estudios Superiores unidad Morelia, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por mi formación académica.

Agradezco a las instituciones que financiaron la realización de esta tesis:

- Al Laboratorio Binacional de Análisis y Síntesis Ecológica UNAM-UCR (Universidad Nacional Autónoma de México-Universidad de Costa Rica).
- Al Laboratorio Nacional de Análisis y Síntesis Ecológica, ENES-UNAM.
- Al Laboratorio de Ecología Molecular, Escuela de Biología, UCR.
- A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) por financiar los proyectos PAPIIT IN200418, 219021, IN225924.
- A la Dirección General de Cooperación e Internacionalización (DGCI-UNAM) por ser beneficiaria del Programa para Actividades Especiales de Cooperación Interinstitucional (PAECI) con fines de internacionalización segundo periodo 2022, para realizar la estancia de investigación de mi tesis.
- Al Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación del Estado de Michoacán (ICTI) por ser beneficiaria del Apoyo al Fortalecimiento de las Capacidades Científicas, Humanísticas, Tecnológicas y de Innovación en Michoacán (FCCHTI22_EI008).

Agradezco a mi tutor de tesis, el Dr. Mauricio Ricardo Quesada Avendaño, y a mi Cotutor, el Dr. Eric J. Fuchs Castillo, por financiar y permitirme realizar esta tesis en sus laboratorios, por su apoyo e impulsarme académicamente.

Finalmente, agradezco a los miembros del jurado, los Dres. Alberto Ken Oyama Nakagawa, Antonio González Rodríguez, Edson Jacob Cristóbal Pérez y Alfredo Cascante Marín, por sus aportaciones a este trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco el Dr. Mauricio Quesada por “enseñarme a pensar”, por su apoyo incondicional durante toda mi formación académica, por su confianza y por impulsarme a crecer profesionalmente.

Al Dr. Eric Fuchs, por su dedicación, participación y tiempo en este proyecto. Por recibirme en su laboratorio, por toda su confianza, por apoyarme en todo momento y hacerme sentir como en casa durante mi estancia en Costa Rica.

Al Dr. Alfredo Cascante por su colaboración, participación y dedicación en todo momento a este trabajo y por heredarme el interés a las plantas epífitas.

A Ruth Madrigal por todo el apoyo técnico durante la realización de esta tesis.

Al jurado de examen, Dres. Ken Oyama, Antonio González, Alfredo Cascante y Jacob Cristóbal por sus valiosos comentarios a esta tesis.

A mis padres que me han dado todo. Por ser mi apoyo incondicional, por inculcarme el valor del trabajo, esfuerzo, dedicación, pasión, honestidad, lealtad y gratitud, que se ven reflejados en este trabajo. A mis hermanos por todo su amor y cariño.

A Jacob Cristóbal Pérez por su participación desde el inicio en este proyecto. Por toda su dedicación, sus consejos, recomendaciones y apoyo en la elaboración de esta tesis. Por siempre impulsarme a crecer, por siempre ser un amigo escucha, por su inigualable compañía y su cariño, gracias.

A Cristina y Matías por su entrañable amistad y por todos los momentos compartidos.

A todos mis compañeros del Laboratorio Nacional de Análisis y Síntesis Ecológica y del Laboratorio de Ecología Molecular por sus aportaciones a este proyecto.

A la Zona Protectora Cerros de la Carpintera por permitirme realizar este trabajo.

Por último, agradezco infinitamente al pueblo mexicano, que, a pesar de todas sus dolencias, me brindó educación de la más alta calidad en esta nuestra máxima casa de estudios.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
HIPÓTESIS Y PREDICCIONES	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
Sitio de Estudio.....	11
Especies de estudio.....	12
Selección de individuos.....	13
Extracción de ADN y amplificación por PCR.....	14
Diversidad genética	15
Estructura genética	16
Estructura genética fina	16
RESULTADOS	17
Diversidad genética	17
Estructura genética	19
Estructura genética fina	19
DISCUSIÓN.....	22
CONCLUSIONES.....	27
Referencias	28
ANEXO	35

RESUMEN

El efecto del sistema reproductivo y de apareamiento y los vectores de dispersión de polen y semillas sobre la diversidad y estructura genética ha sido poco estudiado en especies de angiospermas epífitas a pesar de tener una gran diversidad de estrategias reproductivas (monocarpismo y policarpismo), sistemas de apareamiento (especies autocompatibles y autoincompatibles), de expresión sexual (especies hermafroditas, monoicas, dioicas), modos de polinización y dispersión de semillas. En este estudio se determinó cómo los rasgos reproductivos de dos especies de plantas epífitas *Aechmea mariae-reginae* una especie dioica, con entrecruzamiento obligado, polinizada por colibríes y dispersada por aves y *Werauhia ampla* una especie hermafrodita, autocompatible, polinizada por murciélagos y dispersada por viento (Bromeliaceae), afectan la diversidad y la estructura genética a escala fina en un bosque montano de Costa Rica. El análisis de diversidad genética utilizando 8 loci polimórficos de microsatélites para cada especie, muestra que la diversidad genética es mayor en *A. mariae-reginae* (N_e (número efectivo de alelos) = 2.497, H_e (heterocigosidad esperada) = 0.577, F_{is} (coeficiente de endogamia) = 0.11; en comparación con *W. ampla* (N_e = 1.730, H_e = 0.401, F_{is} = 0.175*, * p <0.05). Los análisis de autocorrelación espacial mostraron que la estructura genética fina es mayor en *A. mariae-reginae* (G_{ST} =0.099, G'_{ST} = 0.225, S_p =0.0242) en comparación con *W. ampla* (G_{ST} =0.0748, G'_{ST} = 0.1254, S_p =0.0084). En ambas especies de estudio se encontraron clones (18 clones en *A. mariae-reginae* y 2 clones en *W. ampla*), sin embargo, no afectaron la diversidad ni estructura genética espacial. *Aechmea mariae-reginae* presenta altos valores de diversidad genética y pueden ser explicados por ser una especie dioica y por la capacidad de dispersión del polen mediada por colibríes, la baja diversidad genética en *W. ampla* probablemente se deba al alto potencial de autofecundación. La dispersión limitada de semillas de *A. mariae-*

reginae por aves sociales genera una alta estructura genética en la población, mientras que la dispersión anemócora de semillas de *W. ampla* no genera estructura genética.

ABSTRACT

The effect of reproductive and mating systems and pollen and seed dispersal vectors on genetic diversity and structure has been little studied in epiphytic angiosperm species despite their great diversity of reproductive strategies (monocarpism and polycarpism), mating systems (self-compatible and self-incompatible species), sexual expression (hermaphroditic, monoecious, dioecious species), pollination modes and seed dispersal. In this study we determine how reproductive traits of two epiphytic plant species *Aechmea mariae-reginae* dioecious, obligately outbreeding, hummingbird-pollinated and bird-dispersed and *Werauhia ampla* hermaphrodite, self-compatible, bat-pollinated and wind-dispersed (Bromeliaceae), affect genetic diversity and fine-scale genetic structure in a Costa Rican montane forest. Genetic diversity analysis using 8 polymorphic microsatellite loci for each species shows that genetic diversity is higher in *A. mariae-reginae* N_e (effective number of alleles) = 2.497, H_e (expected heterozygosity) = 0.577, F_{is} (inbreeding coefficient) = 0.11 compared to *W. ampla* (N_e = 1.730, H_e = 0.401, F_{is} = 0.175*, * p < 0.05). Spatial autocorrelation analyses showed that fine genetic structure is higher in *A. mariae-reginae* (G_{ST} = 0.099, G'_{ST} = 0.225, S_p = 0.0242) compared to *W. ampla* (G_{ST} = 0.0748, G'_{ST} = 0.1254, S_p = 0.0084). In both study species we found clones (18 clones in *A. mariae-reginae* and 2 clones in *W. ampla*), however, they did not affect genetic diversity and spatial genetic structure. *Aechmea mariae-reginae* presents high values of genetic diversity that can be explained because it is a dioecious species and the ability of hummingbird-mediated pollen dispersal, the low genetic diversity in *W. ampla* is probably due to the high potential for self-fertilization. Limited seed dispersal

of *A. mariae-reginae* by social birds generates high genetic structure in the population, while anemochorous seed dispersal of *W. ampla* does not generate genetic structure.

INTRODUCCIÓN

Los bosques montanos tropicales son ecosistemas (Richter, 2008) que presentan una alta diversidad de especies y endemismos (Haber y Stevenson, 2004; Richter y Kluge, 2008; Willig y Presley, 2016; Cascante-Marín et al., 2019). Estos bosques se distribuyen en regiones de altitud media y con altos niveles de precipitación anual (~ 1700 mm) (Bruijnzeel y Veneklaas, 1998). En Costa Rica, los bosques montanos se distribuyen principalmente en las cordilleras de Guanacaste, Tilarán, Volcánica Central y de Talamanca, entre los 1200 y los 2500 msnm. La composición arbórea consiste en especies perennifolias de tamaño mediano (~ 20 m de altura), dominada por árboles del género *Quercus* y un alto número de especies epífitas vasculares, principalmente orquídeas, bromelias y helechos (Camacho y Orozco, 1998; Zotz, 2016), que representan hasta el 30% de la diversidad de especies en estos ecosistemas (SINAC, 2012; Cascante Marín, 2020). En los bosques montanos de Costa Rica, la familia Bromeliaceae es uno de los grupos de plantas con mayor riqueza taxonómica, presenta una alta diversidad de rasgos reproductivos con muchos síndromes de polinización, formas de dispersión de semillas, estrategias reproductivas (e.g., monocarpismo y policarpismo), sistemas de apareamiento (e.g., especies autocompatibles y autoincompatibles) y de expresión sexual (e.g., especies hermafroditas, monoicas, dioicas) (Benzing et al., 2000; Givnish et al., 2014; Zotz, 2016; Cascante-Marín y Núñez-Hidalgo, 2023). A pesar de esta alta diversidad de rasgos reproductivos se conoce poco sobre su biología, y su relación con la diversidad y estructura genética de las poblaciones (González-Astorga et al., 2004; Cascante-Marín et al., 2014, 2020; Loh et al., 2015, 2020).

En las plantas vasculares epífitas, se ha propuesto que la estructura genética puede ser mayor que en plantas terrestres, ya que al depender de un árbol hospedero o forofito (planta sobre la cuál crece y vive una planta vascular epífita) la agregación entre individuos es mayor, sin embargo, existen pocos datos que lo confirmen (Trapnell et al., 2004). Debido al arreglo espacial de las poblaciones naturales de epífitas, se requiere de un diseño a menor escala para analizar su estructuración genética por medio de un análisis de estructura genética a escala fina (EGF) para detectar la distribución espacial de los genotipos dentro y entre poblaciones asociados a los respectivos forofitos (Wright, 1943; McCauley, 1997). Debido a que las plantas son organismos sésiles, la EGF es afectada por factores que incluyen el sistema reproductivo y de apareamiento, la capacidad de dispersión de polinizadores y dispersores de semillas, la densidad poblacional, la proporción sexual de las poblaciones (en el caso de plantas dioicas) y las condiciones microambientales (Loveless y Hamrick, 1984; Vekemans y Hardy, 2004; Hardy et al., 2006; Dick, 2008; Nazareno et al., 2013). Por ejemplo, en plantas donde el exocruzamiento es obligado (i.e., plantas dioicas y hermafroditas autoincompatibles), se espera que tengan una menor EGF, en comparación con aquellas que se autopolinizan (e.g., hermafroditas autocompatibles) o que se propagan vegetativamente (Loveless y Hamrick, 1984). Además, los síndromes de polinización también pueden tener un efecto sobre la EGF, en especies polinizadas por insectos se espera una mayor EGF en comparación con especies polinizadas por vertebrados o viento, debido al restringido movimiento y comportamiento de forrajeo de los primeros (Loveless y Hamrick, 1984; Luna et al., 2005). En términos de dispersión de semillas, se espera una distribución espacial aleatoria en los genotipos dispersados por viento (i.e., baja EGF), mientras que en las especies dispersadas por animales o por gravedad se espera una alta EGF y distribuciones no-aleatorias (Howe y Smallwood, 1982; Loveless y Hamrick, 1984). La

EGF se ha estudiado en algunas especies de plantas leñosas tropicales (Vekemans y Hardy, 2004; Hardy et al., 2006; Dick, 2008, 2010; Fuchs y Hamrick, 2010; Cristóbal-Pérez et al., 2020), sin embargo, su estudio en las plantas vasculares epífitas es escaso (Trapnell et al., 2004; Cascante-Marín et al., 2014, 2020; Gigant et al., 2016; Torres et al., 2019).

En este estudio se caracterizó y comparó la diversidad y estructura genética fina de dos especies de bromelias *Aechmea mariae-reginae* H. Wendl y *Werauhia ampla* (L.B. Sm.) J.R. Grant (Bromeliaceae), con rasgos reproductivos contrastantes. *Aechmea mariae-reginae* una especie dioica, con exocruzamiento obligado, polinizada por colibríes y dispersada por aves principalmente (Cascante-Marín et al., 2020), y *W. ampla* una especie hermafrodita, autocompatible, polinizada por murciélagos y dispersada por viento (Núñez-Hidalgo, 2021).

OBJETIVO GENERAL

Comparar la diversidad genética y la estructura genética fina de las especies de plantas epífitas *Aechmea mariae-reginae* y *Werauhia ampla* (Bromeliaceae) con sus rasgos reproductivos contrastantes en un bosque montano de Costa Rica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar y comparar la diversidad genética de dos especies de bromelias epífitas con rasgos reproductivos contrastantes: *A. mariae-reginae* y *W. ampla*.
2. Determinar y comparar la estructura genética fina de *A. mariae-reginae* y *W. ampla*.

HIPÓTESIS Y PREDICCIONES

La expresión sexual y el sistema de autocompatibilidad afectan directamente la tasa de entrecruzamiento y por lo tanto la diversidad genética de poblaciones de plantas. Se espera que la diversidad genética sea mayor en la especie dioica (*A. mariae-reginae*) con exo-cruzamiento obligado, en comparación con la especie hermafrodita autocompatible (*W. ampla*).

La distancia de dispersión de los vectores de polinización y dispersión de semillas influyen sobre la estructura genética de las poblaciones. Se espera que *A. mariae-reginae*, polinizada y dispersada por aves, presente menor estructura genética que *W. ampla* que es polinizada por murciélagos y dispersada por viento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de Estudio

El estudio se realizó en los Cerros de La Carpintera, un área natural protegida de 2400 ha ubicada en el Valle Central de Costa Rica en la provincia de Cartago (Fig. 1) (09° 53' 20" N - 83° 58' 10" O), entre los 1500 y 1800 msnm. La vegetación predominante es bosque tropical montano. La temperatura media anual es de 16.1°C y la precipitación media anual es de 1764 mm. El sitio presenta una marcada estacionalidad, con una estación lluviosa de mayo a diciembre y una estación seca de diciembre a mayo. La humedad relativa se mantiene en un 96% durante todo el año. Un elemento característico de este ecosistema es que las plantas vasculares epífitas representan un tercio de la riqueza local de especies (SINAC, 2012).

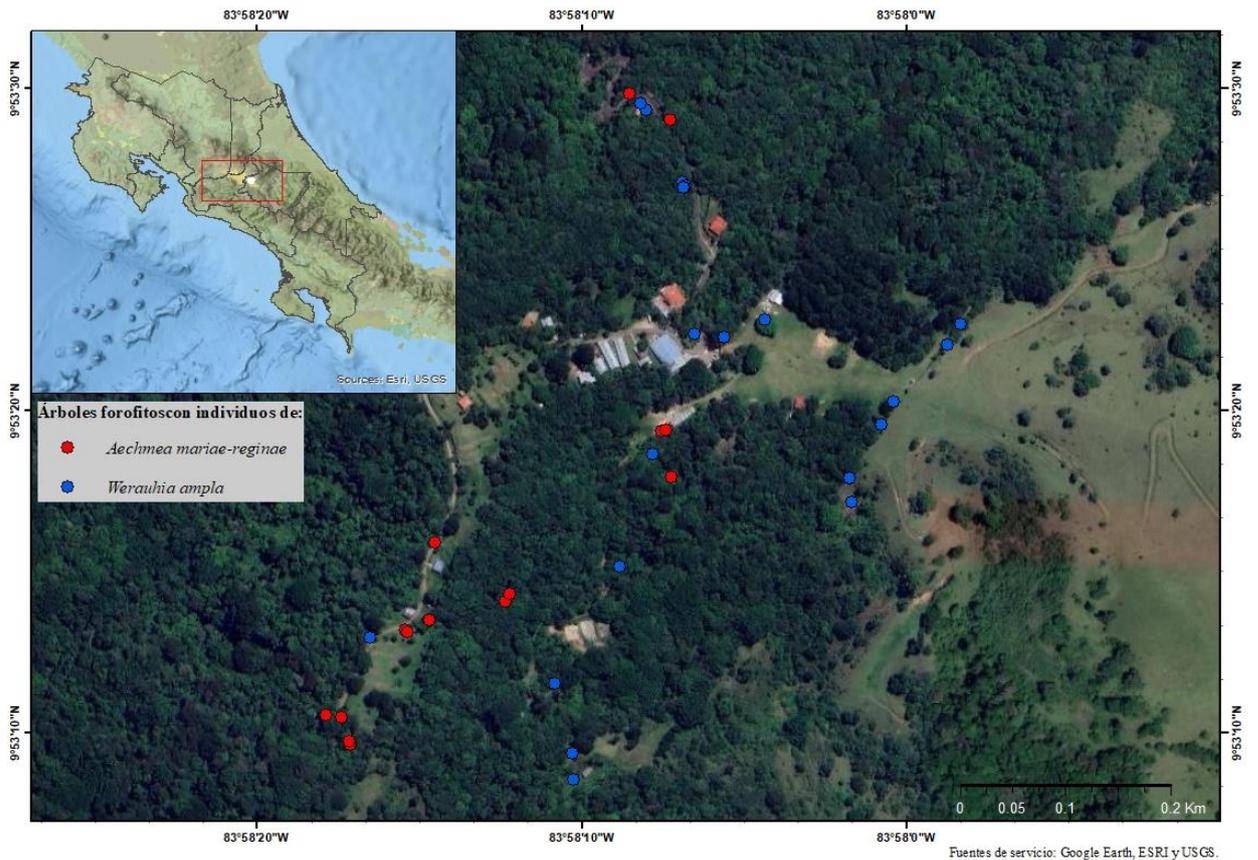


Figura 1. Distribución espacial de los árboles forófitos utilizados por *Aechmea mariae-reginae* (puntos en color rojo) y *Werauhia ampla* (puntos de color azul) en el área natural protegida Cerros de La Carpintera (recuadro rojo), en la Cordillera Central de Costa Rica. Este mapa fue elaborado con imágenes satelitales de Google Earth y ESRI. No se encontraron árboles forófitos que albergaran simultáneamente a ambas especies de estudio.

Especies de estudio

Aechmea mariae-reginae H. Wendl. (Bromeliaceae) es una especie epífita tipo tanque, con una roseta de hasta 170 cm de diámetro, de la subfamilia Bromelioideae (Smith y Downs, 1979), que se distribuye en bosques húmedos de Centroamérica (0-1800 msnm) desde el sur de Nicaragua hasta el noroeste de Panamá (Morales, 2003). Es una especie dioica, de flores unisexuales de color rosa a azul dispuestas en inflorescencias compactas de 9.5-21 cm de largo, con brácteas foliáceas de color rosa, polinizada principalmente por colibríes (Cascante-Marín et al., 2020). Los individuos femeninos producen frutos carnosos, dispersados por aves (Cascante-Marín et al., 2020).

Werauhia ampla (L.B. Sm.) J.R. Grant (Bromeliaceae) es una especie epífita de la subfamilia Tillandsioideae, endémica de los bosques húmedos de zonas montañosas de Costa Rica (Cáceres González et al., 2013). Es una especie hermafrodita autocompatible de flores blancas, de anthesis nocturna, dispuestas en inflorescencias de 20-30 cm de largo polinizada por murciélagos (Núñez-Hidalgo, 2021), que produce frutos secos capsulares y semillas con apéndices plumosos, dispersados por viento (Morales, 2003; Núñez-Hidalgo, 2021).

Selección de individuos.

Se ubicaron, georreferenciaron y colectó tejido foliar de individuos adultos de las dos especies de estudio (de aquí en adelante “bromelias”) dentro de sus árboles forofitos. Para caracterizar la distribución espacial de las bromelias, se georreferenciaron los forofitos (Fig. 1) y de cada bromelia se obtuvieron tres puntos espaciales: 1) la altura respecto a la base del forofito (Y), 2) la distancia horizontal entre el individuo y el eje principal del forofito (X) y 3) el azimut con respecto al norte (Z) (Fig. 2). Se recolectó tejido foliar de un total de 93 individuos de *A. mariae-reginae* y 91 de *W. ampla* en 15 y 23 árboles forofitos, respectivamente (no se encontró ningún forofito que albergara simultáneamente a ambas especies de estudio) (Fig. 1). Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente hasta la extracción de ADN, la cual fue realizada el mismo día de la colecta.

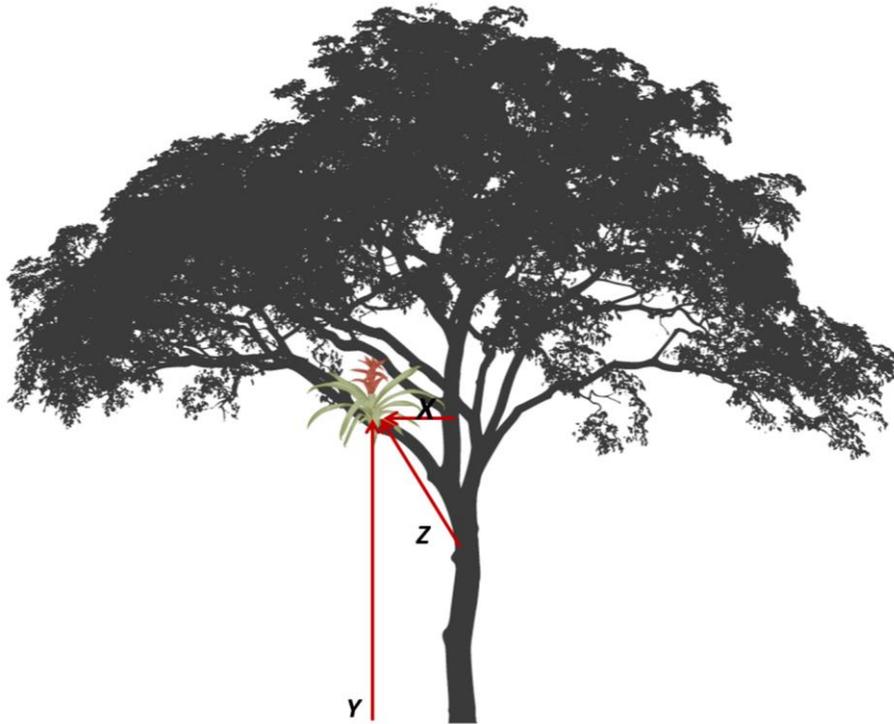


Figura 2. Representación gráfica de la ubicación espacial de las bromelias epífitas en un árbol forofito. Cada línea representa la dirección de tres puntos para obtener la ubicación del individuo. El eje Y, es la altura respecto la base del forofito; el eje X, es la distancia horizontal entre el individuo y el eje principal del forofito; el eje Z, es el azimut con respecto al norte.

Extracción de ADN y amplificación por PCR

La extracción de ADN total se realizó mediante una modificación del protocolo Bromuro cetil trimetil amonio (CTAB) (Doyle y Doyle, 1987). En *A. mariae-reginae* se amplificaron 8 loci polimórficos de microsatélites: Ac01, Ac11, Ac25 y Ac55 (Goetze et al., 2013); Acom_71.3, Acom_78.4, Acom_82.8 y Acom_109.6 (Wöhrmann y Weising, 2011). En *W. ampla* se amplificaron 8 loci polimórficos de microsatélites Ac11 y Ac25 (Goetze et al., 2013); Acom_78.4, Acom_12.12 y Acom_101.1 (Wöhrmann y Weising, 2011); Dd10 (Zanella et al., 2012); VgC01 y VgA04 (Palma-Silva et al., 2007). Las amplificaciones por PCR se realizaron en un termociclador Veriti96-Well (Applied Biosystems) utilizando las condiciones descritas por Palma-Silva et al., (2007) (Anexo 1). Los fragmentos obtenidos se analizaron en un secuenciador ABI 3500 (Applied Biosystems) de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, usando GS500

LIZ para determinar el tamaño molecular de los fragmentos (Applied Biosystems). Los alelos se registraron utilizando el software GeneMarker versión 2.4.2 (SoftGenetics LLC, State College, PA, USA).

Diversidad genética

La diversidad genética se cuantificó estimando el número promedio de alelos por locus (N_a), la heterocigosidad observada (H_o) y la esperada (H_e), y el coeficiente de endogamia (F), utilizando el software GenAlEx versión 6.5 (Peakall y Smouse, 2006). Debido a que ambas especies de estudio tienen la capacidad de reproducirse vegetativamente, se estimó la probabilidad de identidad (PI), que calcula la probabilidad de encontrar aleatoriamente genotipos multilocus idénticos. Los genotipos multilocus idénticos se consideraron *ramets* del mismo individuo cuando se encontraban dentro del mismo árbol. La probabilidad de identidad utilizando los 8 loci fue de $PI = 0.00001$ y $PI = 0.001$ para *A. mariae-reginae* y *W. ampla*, respectivamente. Para determinar la diversidad clonal, se identificaron todos los genotipos multilocus únicos con el software GenoDive v.3.06. (Meirmans, 2020) y se calcularon los índices de diversidad de Simpson (S) y el índice de equitatividad (E). El índice de Simpson calcula la probabilidad de que dos genotipos aleatorios sean distintos y toma valores de 0 a 1, donde 0 indica que todos los genotipos son iguales y 1 indica que todos los genotipos son diferentes (Legendre y Legendre, 2012). El índice de equitatividad calcula la abundancia relativa de los genotipos en la población y toma valores de 0 a 1, donde los valores cercanos a 0 indican que un genotipo domina la población y valores cercanos a 1 indican alta equitatividad (i.e., no hay genotipos dominantes y están todos igualmente distribuidos en la población) (Legendre y Legendre, 2012). Para determinar el efecto de los *ramets* sobre la diversidad

genética, todos los parámetros de diversidad genética se calcularon incluyendo a todos los individuos y excluyendo a los clones.

Estructura genética

Para determinar las diferencias en las frecuencias alélicas entre árboles forofitos, se calculó el índice de fijación G_{ST} de Nei (Nei, 1986) y el índice estandarizado G'_{ST} (Hedrick, 2005), considerando a todas las bromelias dentro de un árbol forofito como una población en el análisis. El índice G_{ST} de Nei es un estadístico para marcadores multi-alélicos que se utiliza para medir la diferenciación genética entre poblaciones en relación a la diversidad genética total (Nei, 1986), mientras que el G'_{ST} de Hedrick es una corrección del G_{ST} de Nei que permite comparar los valores de estructura genética entre especies ya que divide el estimativo de Nei entre el valor máximo teórico basado en la heterocigosidad del marcador molecular (Hedrick, 2005). El G'_{ST} indica la estructura genética como un porcentaje de la estructura máxima posible (Hedrick, 2005). De manera similar en el análisis de diversidad genética, los valores de G_{ST} y G'_{ST} fueron calculados utilizando todos los individuos y excluyendo los clones. Todas las estimaciones se realizaron usando las librerías *mmod* (Winter, 2012) y *poppr* (Kamvar et al., 2014) del software R versión 4.1 (R Core Team, 2021).

Estructura genética fina

La relación entre el parentesco genético de los individuos y su distribución espacial se calculó mediante una autocorrelación espacial entre las bromelias. En el análisis se incluyeron las siguientes clases de distancias: 1, 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 200, 350, 400, 550 y 680 m para *A. mariae-reginae* y 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 200, 350, 400, 550 y 655 m para *W. ampla*. En *W. ampla*, la clase inicial difiere (de 0 a 2 m) debido a que la distancia de 0 a 1 m no cumplía con el número mínimo de comparaciones pareadas

necesarias ($n > 30$) (Epperson, 2000, 2005; Vekemans y Hardy, 2004). El parentesco genético entre todos los pares de bromelias dentro de todas las clases de distancia se calculó utilizando el coeficiente de coancestría (F_{ij}) propuesto por Loiselle *et al.* (1995), el cual mide la correlación entre la frecuencia de los alelos homólogos, p_i y p_j en un locus en pares de los individuos (Loiselle et al., 1995). Este coeficiente es una medida de correlación genética, por lo que valores cercanos a 0 indican poco parentesco, valores de 0.125 indica la relación entre medios hermanos y 0.25 hermanos completos o padres e hijos (Loiselle et al., 1995). Para determinar si el coeficiente de parentesco en cada clase de distancia difiere de lo esperado por el azar, los valores estimados de F_{ij} se compararon con los intervalos de confianza del 95% generados por 10 000 permutaciones aleatorias de individuos en el espacio. Para comparar la magnitud de la estructura genética fina utilizando todos los individuos y excluyendo los clones para cada especie y entre especies, se calculó el estadístico Sp propuesto por Vekemans y Hardy (2004):

$$Sp = -b_{\log} / (1 - F_{ij})$$

donde F_{ij} es el valor promedio del coeficiente de coancestría q_{ij} entre todos los individuos en la primera clase de distancia y b_{\log} es la pendiente de la regresión q_{ij} de la distancia espacial logarítmica entre todos los individuos. Todos los análisis de estructura genética fina se realizaron utilizando el software SPAGeDi 1.5 (Hardy y Vekemans, 2002).

RESULTADOS

Diversidad genética

Los resultados indican que la población de *A. mariae-reginae* presenta una mayor diversidad genética en términos de número de alelos efectivos y heterocigosidad en comparación con los individuos de *W. ampla* (Tabla 1). En *A. mariae-reginae*, se detectó la presencia de 18 individuos con genotipos multilocus idénticos, distribuidos en 8

genotipos distintos (2.25 individuos promedio por *genet*), todos los individuos con genotipos idénticos se encontraron dentro del mismo árbol, por lo que se consideraron clones. En *W. ampla* se identificaron 5 individuos con el mismo genotipo; sin embargo, sólo dos de ellos se encontraron dentro del mismo árbol por lo que sólo se consideró la presencia de un clon y la diversidad clonal sólo fue calculada en la población de *A. mariae-reginae* (Tabla 2). El análisis de diversidad clonal demostró que en *A. mariae-reginae* la diversidad genotípica es alta (Tabla 2) y que los genotipos idénticos están igualmente representados en la población (Tabla 2). Los parámetros de diversidad genética no difirieron cuando los clones se excluyeron del análisis (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros de diversidad genética de 8 loci polimórficos de individuos de *Aechmea mariae-reginae* y *Werauhia ampla* en el Área Natural Protegida Los Cerros de la Carpintera, Costa Rica. N: número de individuos; N_A: número de alelos promedio por locus (\pm DS desviación estándar); N_E: número de alelos efectivos (\pm DS); H_O: heterocigosidad observada (\pm DS); H_E: heterocigosidad esperada (\pm DS); F: coeficiente de endogamia (\pm DS). * p<0.05.

Especie	Individuos analizados	N	Na	Ne	Ho	He	F
<i>Aechmea mariae-reginae</i>	Todos los individuos	93	4.125 (0.895)	2.497 (0.232)	0.511 (0.041)	0.577 (0.036)	0.11 (0.081)
	Excluyendo clones	78	4.125 (0.895)	2.544 (0.260)	0.510 (0.040)	0.581 (0.037)	0.138 (0.081)
<i>Werauhia ampla</i>	Todos los individuos	94	2.750 (0.164)	1.730 (0.120)	0.334 (0.039)	0.401 (0.045)	0.175* (0.077)
	Excluyendo clones	89	2.750 (0.164)	1.732 (0.122)	0.332 (0.038)	0.401 (0.045)	0.181* (0.076)

Tabla 2. Parámetros de diversidad clonal de individuos de *Aechmea mariae-reginae* en el Área Natural Protegida Los Cerros de la Carpintera, Costa Rica. N: número de individuos; G: número de genotipos únicos; Ge: número de genotipos efectivos; S: índice de diversidad de Simpson; E: índice de equitatividad.

Especie	N	G	Ge	S	E
<i>Aechmea mariae-reginae</i>	93	81	71.479	0.997	0.882

Estructura genética

Los análisis de estructura genética entre las poblaciones de bromelias entre árboles forofitos muestran que las diferencias en las frecuencias alélicas entre poblaciones de *A. mariae-reginae* incluyendo todos los genotipos multilocus y excluyendo los clones fueron mayores que en las poblaciones de *W. ampla* (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de estructura genética entre poblaciones de *Aechmea mariae-reginae* y *Werauhia ampla* entre árboles forofitos en dos niveles incluyendo todos los genotipos multilocus y excluyendo los clones de un bosque montano de Costa Rica. * $P < 0.05$

Especie	Individuos analizados	G _{ST} de Nei	G' _{ST} de Hedrick
<i>Aechmea mariae-reginae</i>	Todos los individuos	0.099*	0.225*
	Excluyendo clones	0.082*	0.194*
<i>Werauhia ampla</i>	Todos los individuos	0.074*	0.125*
	Excluyendo clones	0.073*	0.125*

Estructura genética fina

La distribución espacial de *A. mariae-reginae* consiste en promedio de 6 (\pm DS 4.33) bromelias por forofito en un rango de distancia entre 0.2 y 9.43 m dentro del árbol, mientras que en *W. ampla* se encontró un promedio de 4 bromelias (DS \pm 1.74) por forofito en un rango de distancia de entre 0.3 y 9.91 m dentro del árbol. Debido a que el 96% de las bromelias se encontraron a menos de 10 m entre sí en un mismo forofito, se consideró que el rango de distancia de entre 0 a 10 m como comparaciones dentro del mismo árbol, mientras que comparaciones entre 10 y 680 m fueron consideradas como comparaciones entre árboles forofitos (Fig. 1).

El análisis de autocorrelación genética espacial indica que en *A. mariae-reginae* los niveles de parentesco varían en función de la distancia. Los valores de coancestría entre los individuos de *A. mariae-reginae* dentro de los primeros 3 m de distancia fueron

altos y significativos ($F_{ij}= 0.100-0.163$) (Fig. 3a), entre los 4 a 25 m continuaron siendo significativos pero bajos ($F_{ij}=0.05-0.07$) (Fig. 3a) y a partir de los 50 m de distancia los valores de coancestría no difirieron de los esperado según una distribución aleatoria de los genotipos en el espacio (Fig. 3a). Cuando se excluyeron los clones de *A. mariae-reginae* del análisis de autocorrelación espacial los valores de parentesco disminuyeron en las primeras clases de distancia (1 a 25 m); sin embargo, fueron significativos y al igual que en el análisis que incluye a los clones a partir de los 50 m de distancia los valores de coancestría no difirieron de lo esperado por azar (Fig. 3c). En *W. ampla* no se identificó una estructura genética fina los valores de coancestría (F_{ij}) del análisis de autocorrelación genética no difirieron de lo esperado según una distribución aleatoria de los genotipos en el espacio en ninguna de las clases de distancia analizadas (incluyendo y excluyendo clones) (Figs. 3b, 3d). Consecuentemente, los valores de Sp en *A. mariae-reginae* ($Sp_{incluyendo\ clones}=0.0242$; $Sp_{excluyendo\ clones}=0.0211$) son superiores y difieren significativamente de los encontrados en *W. ampla* ($Sp_{incluyendo\ clones}=0.0084$; $Sp_{excluyendo\ clones}=0.0079$.) (Tabla 4).

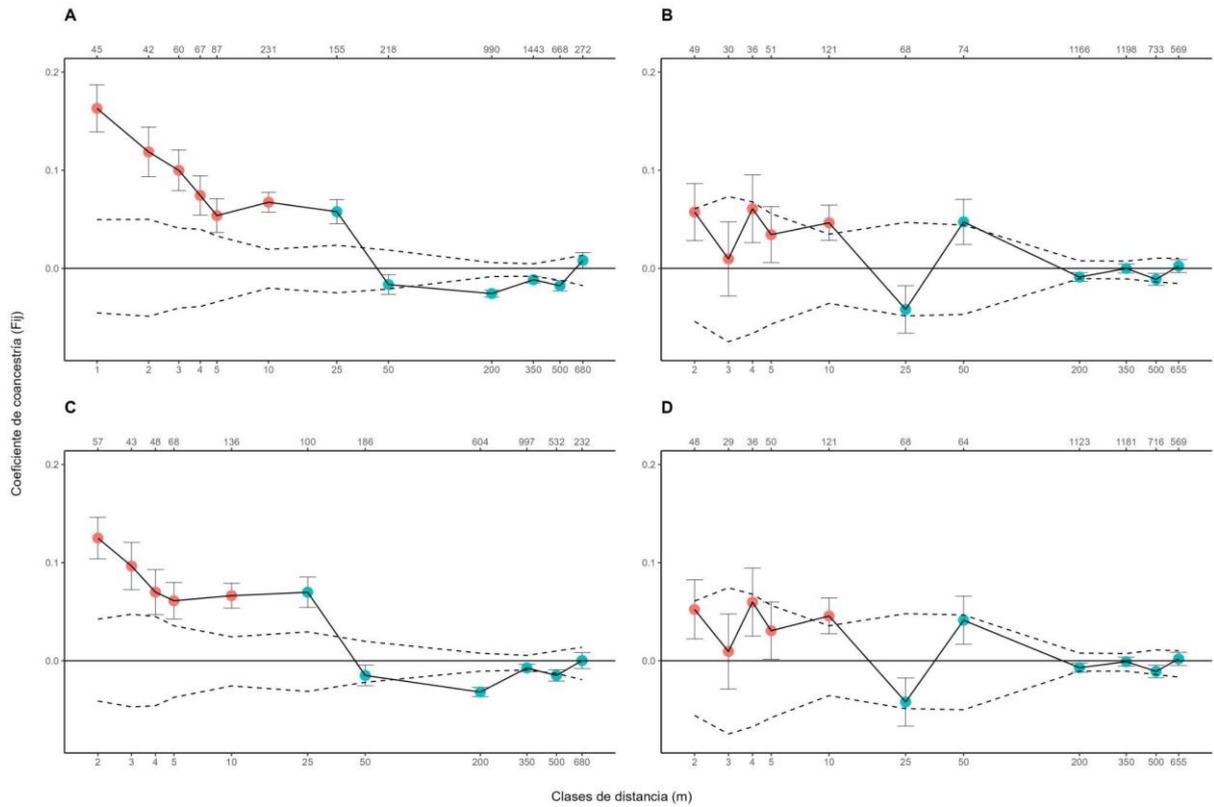


Figura 3. Autocorrelograma espacial del coeficiente de coancestría de Loiselle (F_{ij}) entre pares de individuos de *Aechmea mariae-reginae* incluyendo todos los individuos (A) y excluyendo los clones (C) y de *Werauhia ampla* incluyendo todos los individuos (B) y excluyendo los clones (D). Las líneas punteadas representan el intervalo de confianza al 95% bajo la hipótesis nula de no estructura genética. Los puntos naranjas representan los individuos que se encuentran dentro de un mismo forofito (de 0 a 10 m) y los puntos azules son las comparaciones entre individuos de forofitos distintos (de 25 a 680 m). Los números en el eje superior son el número de comparaciones entre individuos para cada clase de distancia.

Tabla 4. Valores de estructura genética en dos niveles incluyendo todos los genotipos multilocus y excluyendo los clones de *Aechmea mariae-reginae* y *Werauhia ampla* de un bosque montano de Costa Rica. El coeficiente de coancestría de Loiselle en la primera clase de distancia (*F_{ij}* 1), el coeficiente de la regresión lineal de los coeficientes de parentesco sobre la distancia logarítmica (*b_{log}*) y el estadístico *Sp*. * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$

Especie	Individuos analizados	<i>F_{ij}</i> (1)	<i>b_{log}</i>	<i>Sp</i>
<i>Aechmea mariae-reginae</i>	Todos los individuos	0.163** (0.037)	-0.020** (0.008)	0.024
	Excluyendo clones	0.125** (0.051)	-0.018** (0.008)	0.021
<i>Werauhia ampla</i>	Todos los individuos	0.057 (0.029)	-0.007* (0.002)	0.008
	Excluyendo clones	0.052 (0.026)	-0.007* (0.002)	0.007

DISCUSIÓN

Los resultados muestran que la diversidad y estructura genética son afectadas por el sistema reproductivo, de apareamiento y los vectores de dispersión de polen y semillas de las especies de epífitas analizadas. La diversidad y estructura genética fue mayor en la especie dioica polinizada por colibríes y con dispersión de semillas por aves (*A. mariae-reginae*), en comparación con la especie hermafrodita autocompatible polinizada por murciélagos y con dispersión de semillas por viento (*W. ampla*). En ambas especies de estudio se encontró propagación clonal, sin embargo, la presencia de clones no afectó a la diversidad y estructura genética. El sistema de apareamiento, el sistema reproductivo y los modos de dispersión de polen son los principales factores que afectan la diversidad genética de las poblaciones de plantas (Hamrick y Godt, 1997), siendo las especies con exocruzamiento obligado, las de mayor diversidad genética (Hamrick y Godt, 1997). A su vez, los principales factores que afectan la estructura genética son el sistema de apareamiento y la dispersión de semillas (Loveless y Hamrick, 1984; Hamrick y Godt,

1997; Vekemans y Hardy, 2004). Se espera que las poblaciones de especies con autofertilización y dispersadas por gravedad o animales, presenten mayor estructuración genética. Sin embargo, los resultados difieren al ser la especie dioica exo-cruzada y dispersada por aves (*A. mariae-reginae*) la que presenta mayor estructuración genética en comparación con la hermafrodita autocompatible (*W. ampla*) polinizada por murciélagos y con dispersión por viento. Este es uno de los primeros trabajos que comparan el efecto de los rasgos reproductivos sobre la diversidad y estructura genética en especies de bromelias epífitas simpátricas (Amici et al., 2019).

Los análisis de diversidad genética revelaron que *A. mariae-reginae* presentó altos valores de diversidad genética como se espera para una especie dioica con exocruzamiento obligado (Barrett, 2010; Cibrián-Jaramillo et al., 2009; Cristóbal-Pérez et al., 2022; Fuchs et al., 2023). La dioecia aumenta la probabilidad de apareamientos y recombinación genética entre individuos distintos a diferencia de las especies hermafroditas autocompatibles, lo que promueve la introducción de alelos a la población, aumentan los individuos heterocigotos y disminuye la probabilidad de depresión por endogamia (expresiones deletéreas por alelos recesivos en los individuos homocigotos de la población) (Barrett y Harder, 2017). *Aechmea mariae-reginae* es una especie polinizada por colibríes, principalmente de la especie *Lampornis calolaemus* (Cascante-Marín et al., 2020). En plantas con síndrome de polinización ornitófilico los colibríes pueden asegurar el flujo génico a largas distancias por su alta capacidad de movimiento (Rosas-Guerrero et al., 2014; Kessler et al., 2020; Gamba y Muchhala, 2023).

Los valores de diversidad genética en *W. ampla* fueron menores en comparación con *A. mariae-reginae*. Núñez-Hidalgo (2021) demostró que la tasa de visitación de murciélagos polinizadores en *W. ampla* es baja (0.07 visitas/noche), sin embargo, los niveles de hercogamia (distancia en entre el estigma y las anteras) se reducen al final de

la vida de flor promoviendo la autofertilización tardía (índice de autocompatibilidad SCI=0.92; índice de autofertilización AFI=0.53), no obstante, este mecanismo de aseguramiento reproductivo puede reducir la diversidad genética como lo sugieren nuestros resultados. En otras especies de bromelias autocompatibles, predominantemente autógamas, se han reportado bajos valores de diversidad genética similares a *W. ampla* (Barbará et al., 2009; Cascante-Marín et al., 2014; Rogalski et al., 2017). En ambas especies de estudio se identificaron genotipos multilocus idénticos; en el caso de *A. mariae-reginae* se encontraron distribuidos dentro del mismo forofito, lo cual sugiere la propagación clonal de esta especie (Cascante-Marín et al., 2020). En el caso de *W. ampla* algunos genotipos multilocus idénticos se encontraron distribuidos en distintos forófitos, los cuales no se consideraron clones, ya que el alto porcentaje de homocigotos en la población y la fuerte endogamia pueden producir genotipos idénticos cuando las tasas de autogamia son muy altas (Charlesworth y Charlesworth, 1995; Volis et al., 2010; Hughes y Simons, 2015; Núñez-Hidalgo, 2021). No obstante, la presencia de clones no afectó las estimativas de diversidad genética (Cavallari et al., 2006; Barbará et al., 2009; Hmeljevski et al., 2015; Loh et al., 2015), posiblemente debido a la baja frecuencia de clones observados en ambas especies y que los genotipos de los clones fueron equitativamente distribuidos en la población (Tabla 2). En otras especies autoincompatibles del género *Aechmea*, se ha reportado alto grado de clonalidad debido a la forma de crecimiento de los ramets (Sampaio et al., 2002; Loh et al., 2015)

Los resultados muestran diferencias en los niveles de estructura génica entre las dos especies de estudio. Las frecuencias alélicas de poblaciones de *A. mariae-reginae* ubicadas entre forófitos presentaron el doble de la estructuración genética en comparación con las poblaciones de *W. ampla* (*A. mariae-reginae*: $G_{ST}= 0.099$ y $G'_{ST}= 0.21$ y *W. ampla*: $G_{ST}=0.0748$ y $G'_{ST}= 0.1254$). En *A. mariae-reginae*, se observaron altos niveles

de estructura genética fina a distancias entre 0 y 3 m que sugieren la presencia de medios hermanos, mientras que en *W. ampla* los valores de estructura no difieren de lo esperado por una distribución aleatoria de los genotipos en el espacio. En ambos casos, los niveles de EGF se mantienen de manera similar al excluir los clones del análisis. En *A. mariae-reginae* el coeficiente de coancestría (F_{ij}) en la primera clase de distancia (1 m) se redujo cuando se excluyeron los clones (de 0.163 a 0.125) probablemente porque los individuos genéticamente idénticos se distribuyen a distancias muy cortas entre ellos. De manera similar a lo registrado para la estructura genética entre árboles, la magnitud de la EGF es mayor en *A. mariae-reginae* en comparación con *W. ampla* ($Sp= 0.0242$, $Sp= 0.0084$, respectivamente). Estos resultados pueden estar asociados a diferencias en el modo de polinización y de dispersión de semillas entre las especies de estudio. *Aechmea mariae-reginae* al ser polinizada por *L. calolaemus* una especie territorial, no migratoria con rangos hogareños cortos (<3 ha) (Peters, 2011; Maglianesi et al., 2015; Cascante-Marín et al., 2020) la dispersión de genes vía polen puede ser limitada y ocurrir en distancias cortas (Krauss et al., 2017). Así mismo, la dispersión de semillas de *A. mariae-reginae* puede afectar la EGF y es similar a lo reportado en otras especies con frutos carnosos, multiovulados dispersados por aves ($Sp= 0.02$) (Torimaru et al., 2007; Gelmi-Candusso et al., 2017). Los individuos de *A. mariae-reginae* encontrados a 1 m de distancia entre ellos son medios hermanos ($F_{ij}=0.125$) (Fig. 3c), lo que sugiere que las semillas de un mismo fruto o varios frutos de la misma planta madre son depositados de forma agregada por su dispersor (Gelmi-Candusso et al., 2017). Además, los altos valores de coancestría ($F_{ij}= 0.06-0.163$) a distancias cortas (0 a 25 m), son un indicio de altos niveles de parentesco dentro de los árboles (Loiselle et al., 1995), posiblemente relacionado con el comportamiento de forrajeo de los dispersores de semillas. *Psilorhinus morio*, un ave social de la familia Corvidae (Howe, 2017), es el principal dispersor de *A. mariae-reginae*

(Cascante-Marín et al., 2020). Esta especie forma grupos familiares de aproximadamente 10 individuos que protegen territorios pequeños de 10 a 20 ha (Morrison y Slack, 1977; Lawton y Guindon, 1981; Williams et al., 1994) en los grupos familiares generalmente existe una hembra reproductiva que defiende el sitio de anidamiento y los otros miembros del grupo perchan y duermen en el mismo árbol o en árboles cercanos al nido (Williams et al., 1994; Hale et al., 2003; Williams y Rabenold, 2005). La temporada de anidación de *P. morio* inicia en abril-mayo (Lawton y Guindon, 1981) y el desarrollo inicial de los polluelos coincide con el periodo de fructificación de *A. mariae-reginae* (de junio a diciembre) (Cascante-Marín et al., 2020), este traslape fenológico y el comportamiento de defensa y estructura social puede explicar la estructuración genética entre forofitos cercanos (<25 m). De manera similar a lo que ocurre en algunos mamíferos dispersores, se ha observado que los sitios de percha de las aves son lugares donde la lluvia y la agrupación de semillas es alta (Guidetti et al., 2022). La ausencia de estructura genética en *W. ampla* es similar a lo encontrado en otras especies de bromelias epífitas con semillas dispersadas por viento (e.g., *Vriesea incurvata* y *V. minarum*) (Lavor et al., 2014; Aguiar-Melo et al., 2019). *Werauhia ampla* presenta semillas secas con apéndices plumosos, para especies con este tipo de semillas se han reportado valores muy bajos de estructura genética ($G_{ST}=0.079$) (Loveless y Hamrick, 1984). Esta morfología es común dentro de la subfamilia Tillandsioideae, principalmente en los géneros *Tillandsia*, *Vriesea* y *Werauhia* y se ha propuesto como un mecanismo para dispersarse largas distancias por viento y lograr establecerse en los forófitos adhiriéndose a la corteza (Wester y Zotz, 2011; Magalhães y Mariath, 2012).

Se ha propuesto que los diferentes mecanismos de dispersión de semillas son estrategias de las plantas para: (1) evitar la competencia entre plántulas y los enemigos naturales de la planta madre (efecto Janzen-Connell) (Janzen, 1970; Connell, 1971); (2)

colonizar nuevos sitios; y (3) para ser dispersadas a sitios particulares con condiciones microambientales favorables (Howe y Smallwood, 1982). Sin embargo, en las plantas angiospermas epífitas la competencia interespecífica y la cercanía de la planta madre (efecto Janzen-Connell) no se considera como un factor de riesgo tan importante en comparación con otros factores como las condiciones microclimáticas y la disponibilidad de forofitos (Mondragón Chaparro et al., 2015). La distribución espacial en tres dimensiones de las plantas epífitas dentro de los forofitos permite que los individuos se agrupen y estén rodeados de más individuos a diferencia de las plantas terrestres, debido a la cercanía de los individuos se ha propuesto que la estructura genética en las poblaciones de plantas epífitas podría ser mayor que en las plantas terrestres (Trapnell et al., 2004). En este estudio se observó que las bromelias de ambas especies presentan una distribución agrupada, sin embargo, los mecanismos de dispersión de semillas son el factor principal que determina la estructura genética de las poblaciones.

CONCLUSIONES

Este estudio revela que la diversidad y la estructura genética es afectada por el sistema de apareamiento y la dispersión de semillas. La diversidad genética fue mayor en la especie dioica con exocruzamiento obligado *A. mariae-reginae* en comparación con la hermafrodita autocompatible predominantemente autógama *W. ampla*. Mientras que la estructura genética a escala fina se explica por la vía de polinización y de dispersión de semillas. La EGF en *A. mariae-reginae*, a pesar de tener altos valores de diversidad genética, fue fuerte ya que es polinizada por colibríes territoriales y presenta frutos multiovulados que promueven la dispersión de varias semillas emparentadas juntas que son dispersados por aves sociales altamente territoriales que forrajean y defienden distancias muy cortas. De manera contraria en *W. ampla* a pesar de presentar baja

diversidad genética con altos índices de endogamia y ser predominantemente autógena, los individuos de la población no presentan estructuración génica debido a que sus semillas secas y plumosas son dispersadas más eficientemente lejos de la planta materna por viento.

Referencias

- Aguiar-Melo, C., C. M. Zanella, M. Goetze, C. Palma-Silva, L. D. Hirsch, B. Neves, A. F. da Costa, y F. Bered. 2019. Ecological niche modeling and a lack of phylogeographic structure in *Vriesea incurvata* suggest historically stable areas in the southern Atlantic Forest. *American Journal of Botany* 106: 971–983.
- Amici, A. A., N. M. Nadkarni, E. DiBlasi, y J. Seger. 2019. Contrasting effects of host tree isolation on population connectedness in two tropical epiphytic bromeliads. *American Journal of Botany* 106: 1602–1611.
- Barbará, T., G. Martinelli, C. Palma-Silva, M. F. Fay, S. Mayo, y C. Lexer. 2009. Genetic relationships and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical ‘inselbergs’: *Alcantarea glaziouana*, *A. regina*, *A. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* 103: 65–77.
- Barrett, S. C. H., y L. D. Harder. 2017. The Ecology of Mating and Its Evolutionary Consequences in Seed Plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 48: 135–157.
- Benzing, D. H., B. Bennett, G. Brown, M. Dimmitt, H. Luther, I. Ramirez, R. Terry, y W. Till. 2000. Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation. Cambridge University Press.
- Bruijnzeel, L. A., y E. J. Veneklaas. 1998. Climatic Conditions and Tropical Montane Forest Productivity: The Fog Has Not Lifted Yet. *Ecology* 79: 3–9.
- Cáceres González, D., K. Schulte, M. Schmidt, y G. Zizka. 2013. Diversity and levels of endemism of the Bromeliaceae of Costa Rica – an updated checklist. *PhytoKeys* 29: 17–62.
- Camacho, M., y L. Orozco. 1998. Patrones fenológicos de doce especies arbóreas del bosque montano de la Cordillera de Talamanca, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 46: 533–542.
- Cascante Marín, A. 2020. Plantas del Dosel del Bosque: Guía para la identificación de géneros de plantas epífitas con flores de Costa Rica. *Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica*.
- Cascante-Marín, A., y S. Núñez-Hidalgo. 2023. A Review of Breeding Systems in the Pineapple Family (Bromeliaceae, Poales). *The Botanical Review* 89: 308–329.

- Cascante-Marín, A., G. Oostermeijer, J. Wolf, y E. J. Fuchs. 2014. Genetic Diversity and Spatial Genetic Structure of an Epiphytic Bromeliad in Costa Rican Montane Secondary Forest Patches. *Biotropica* 46: 425–432.
- Cascante-Marín, A., C. Trejos, R. Madrigal, y E. J. Fuchs. 2020. Genetic diversity and reproductive biology of the dioecious and epiphytic bromeliad *Aechmea mariae-reginae* (Bromeliaceae) in Costa Rica: implications for its conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society* 192: 773–786.
- Cascante-Marín, A., C. Trejos Hernández, A. Cascante-Marín, y C. Trejos Hernández. 2019. Diversidad y vulnerabilidad de la flora orquideológica de un bosque montano nuboso del Valle Central de Costa Rica. *Lankesteriana* 19: 31–55.
- Cavallari, M. M., R. C. Forzza, E. A. Veasey, M. I. Zucchi, y G. C. X. Oliveira. 2006. Genetic Variation in Three Endangered Species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Espinhaço, Brazil, Detected using RAPD Markers. *Biodiversity & Conservation* 15: 4357–4373.
- Charlesworth, D., y B. Charlesworth. 1995. QUANTITATIVE GENETICS IN PLANTS: THE EFFECT OF THE BREEDING SYSTEM ON GENETIC VARIABILITY. *Evolution* 49: 911–920.
- Connell, J. H. 1971. On the role of the natural enemies in preventing competitive exclusion in some marine animals and in rain forest trees. *Dynamics of populations* 298(312).
- Cristóbal-Pérez, E. J., E. J. Fuchs, U. Olivares-Pinto, y M. Quesada. 2020. Janzen-Connell effects shape gene flow patterns and realized fitness in the tropical dioecious tree *Spondias purpurea* (ANACARDIACEAE). *Scientific Reports* 10: 4584.
- Dick, C. W. 2008. New interpretations of fine-scale spatial genetic structure. *Molecular Ecology* 17: 1873–1874.
- Dick, C. W. 2010. Phylogeography and Population Structure of Tropical Trees. *Tropical Plant Biology* 3: 1–3.
- Doyle, J. J., y J. L. Doyle eds. . 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *PHYTOCHEMICAL BULLETIN* 19: 11–15.
- Epperson, B. K. 2005. Estimating dispersal from short distance spatial autocorrelation. *Heredity* 95: 7–15.
- Epperson, B. K. 2000. Spatial genetic structure and non-equilibrium demographics within plant populations. *Plant Species Biology* 15: 269–279.
- Fuchs, E. J., y James. L. Hamrick. 2010. Spatial genetic structure within size classes of the endangered tropical tree *Guaiacum sanctum* (Zygophyllaceae). *American Journal of Botany* 97: 1200–1207.
- Gamba, D., y N. Muchhala. 2023. Pollinator type strongly impacts gene flow within and among plant populations for six Neotropical species. *Ecology* 104: e3845.

- Gelmi-Candusso, T. A., E. W. Heymann, y K. Heer. 2017. Effects of zoochory on the spatial genetic structure of plant populations. *Molecular Ecology* 26: 5896–5910.
- Gigant, R. L., A. De Bruyn, T. M'sa, G. Viscardi, L. Gigord, A. Gauvin-Bialecki, T. Pailler, et al. 2016. Combining pollination ecology and fine-scale spatial genetic structure analysis to unravel the reproductive strategy of an insular threatened orchid. *South African Journal of Botany* 105: 25–35.
- Givnish, T. J., M. H. J. Barfuss, B. V. Ee, R. Riina, K. Schulte, R. Horres, P. A. Gonsiska, et al. 2014. Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 71: 55–78.
- Goetze, M., R. B. Louzada, M. das G. L. Wanderley, L. M. de Souza, F. Bered, and C. Palma-Silva. 2013. Development of microsatellite markers for genetic diversity analysis of *Aechmea caudata* (Bromeliaceae) and cross-species amplification in other bromeliads. *Biochemical Systematics and Ecology* 48: 194–198.
- González-Astorga, J., A. Cuz-Angón, A. Flores-Palacios, y A. P. Vovides. 2004. Diversity and Genetic Structure of the Mexican Endemic Epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* 94: 545–551.
- Guidetti, B. Y., S. Dardanelli, F. M. L. Miño, y G. C. Amico. 2022. Artificial perches for birds in deforested areas favour a seed rain similar to woodland remnants. *Plant Ecology* 223: 1261–1274.
- Haber, W. A., y R. D. Stevenson. 2004. Diversity, migration, and conservation of butterflies in northern Costa Rica. 8. DIVERSITY, MIGRATION, AND CONSERVATION OF BUTTERFLIES IN NORTHERN COSTA RICA, 99–114. University of California Press.
- Hale, A. M., D. A. Williams, y K. N. Rabenold. 2003. Territoriality and Neighbor Assessment in Brown Jays (*Cyanocorax Morio*) in Costa Rica. *The Auk* 120: 446–456.
- Hamrick, J. L., y M. J. W. Godt. 1997. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 351: 1291–1298.
- Hardy, O. J., L. Maggia, E. Bandou, P. Breyne, H. Caron, M.-H. Chevallier, A. Doligez, et al. 2006. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. *Molecular Ecology* 15: 559–571.
- Hardy, O. J., y X. Vekemans. 2002. spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2: 618–620.
- Hedrick, P. W. 2005. A Standardized Genetic Differentiation Measure. *Evolution* 59: 1633–1638.

- Hmeljevski, K. V., M. S. dos Reis, y R. C. Forzza. 2015. Patterns of Gene Flow in *Encholirium horridum* L.B.Sm., a Monocarpic Species of Bromeliaceae From Brazil. *Journal of Heredity* 106: 93–101.
- Howe, H. F. 2017. Fruit-eating birds in experimental plantings in southern Mexico. *Journal of Tropical Ecology* 33: 83–88.
- Howe, H. F., y J. Smallwood. 1982. Ecology of Seed Dispersal. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 201–228.
- Hughes, P. W., y A. M. Simons. 2015. Microsatellite evidence for obligate autogamy, but abundant genetic variation in the herbaceous monocarp *Lobelia inflata* (Campanulaceae). *Journal of Evolutionary Biology* 28: 2068–2077.
- Janzen, D. H. 1970. Herbivores and the Number of Tree Species in Tropical Forests. *The American Naturalist* 104: 501–528.
- Kessler, M., S. Abrahamczyk, y T. Krömer. 2020. The role of hummingbirds in the evolution and diversification of Bromeliaceae: unsupported claims and untested hypotheses. *Botanical Journal of the Linnean Society* 192: 592–608.
- Krauss, S. L., R. D. Phillips, J. D. Karron, S. D. Johnson, D. G. Roberts, and S. D. Hopper. 2017. Novel Consequences of Bird Pollination for Plant Mating. *Trends in Plant Science* 22: 395–410.
- Lavor, P., C. van den Berg, C. M. Jacobi, F. F. Carmo, y L. M. Versieux. 2014. Population genetics of the endemic and endangered *Vriesea minarum* (Bromeliaceae) in the Iron Quadrangle, Espinhaço Range, Brazil. *American Journal of Botany* 101: 1167–1175.
- Lawton, M. F., y C. F. Guindon. 1981. Flock Composition, Breeding Success, and Learning in the Brown Jay. *The Condor* 83: 27–33.
- Legendre, P., y L. Legendre. 2012. Numerical Ecology. Elsevier.
- Loh, R., F. R. Scarano, M. Alves-Ferreira, y F. Salgueiro. 2015. Clonality strongly affects the spatial genetic structure of the nurse species *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb. (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 178: 329–341.
- Loh, R., F. R. Scarano, M. Alves-Ferreira, y F. Salgueiro. 2020. Fine-scale spatial genetic structure, neighbourhood size and gene dispersal in clonal plants: exploring the best possible estimates. *Botanical Journal of the Linnean Society* 192: 760–772.
- Loiselle, B. A., V. L. Sork, J. Nason, y C. Graham. 1995. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *PSYCHOTRIA OFFICINALIS* (RuBIACEAE). *American Journal of Botany* 82: 1420–1425.
- Loveless, M. D., y J. L. Hamrick. 1984. Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15: 65–95.

- Luna, R., B. K. Epperson, y K. Oyama. 2005. Spatial genetic structure of two sympatric neotropical palms with contrasting life histories. *Heredity* 95: 298–305.
- Magalhães, R. I., y J. E. A. Mariath. 2012. Seed morphoanatomy and its systematic relevance to Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Plant Systematics and Evolution* 298: 1881–1895.
- Maglianesi, M. A., K. Böhning-Gaese, y M. Schleuning. 2015. Different foraging preferences of hummingbirds on artificial and natural flowers reveal mechanisms structuring plant–pollinator interactions. *Journal of Animal Ecology* 84: 655–664.
- McCaughey, D. E. 1997. The Relative Contributions of Seed and Pollen Movement to the Local Genetic Structure of *Silene alba*. *Journal of Heredity* 88: 257–263.
- Meirmans, P. G. 2020. genodive version 3.0: Easy-to-use software for the analysis of genetic data of diploids and polyploids. *Molecular Ecology Resources* 20: 1126–1131.
- Mondragón Chaparro, D. M., M. T. Valverde Valdés, y M. Hernández Apolinar. 2015. Population ecology of epiphytic angiosperms: A review. *Tropical Ecology*, 56(1), 01–39.
- Morales, J. 2003. Bromeliaceae. Manual of Plants of Costa Rica, 297-375. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.
- Morrison, M. L., y R. D. Slack. 1977. Flocking and Foraging Behavior of Brown Jays in Northeastern Mexico. *The Wilson Bulletin* 89: 171–173.
- Nazareno, A. G., A. L. Alzate-Marin, y R. A. S. Pereira. 2013. Dioecy, more than monoecy, affects plant spatial genetic structure: the case study of *Ficus*. *Ecology and Evolution* 3: 3495–3508.
- Nei, M. 1986. Definition and Estimation of Fixation Indices. *Evolution* 40: 643–645.
- Núñez-Hidalgo, S. M. 2021. Sistemas reproductivos en bromelias epífitas del género *Werauhia* J.R. Grant (Bromeliaceae: Tillandsioideae): aseguramiento reproductivo y mecanismos de coexistencia reproductiva. *Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica*.
- Palma-Silva, C., M. M. Cavallari, T. Barbará, C. Lexer, M. A. Gimenes, F. Bered, y M. H. Bodanese-Zanettini. 2007. A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliad species. *Molecular Ecology Notes* 7: 654–657.
- Peakall, R., y P. E. Smouse. 2006. genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288–295.
- Peters, J. 2011. Purple-throated Mountain-gem (*Lampornis calolaemus*), version 1.0. *Neotropical Birds*.

- R Core Team. 2021. R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Richter, M. 2008. Tropical mountain forests. Distribution and general features. In S. R. Gradstein, J. Homeier, and D. Gansert [eds.], *The tropical mountain forest: patterns and processes in a biodiversity hotspot*, Biodiversity and Ecology Series, Göttingen University Press, Göttingen.
- Richter, M., y J. Kluge. 2008. Diversity and endemism in tropical montane forests - from patterns to processes. In S. R. Gradstein, J. Homeier, and D. Gansert [eds.], *The tropical mountain forest: patterns and processes in a biodiversity hotspot*, Biodiversity and Ecology Series, Göttingen University Press, Göttingen.
- Rogalski, J. M., A. Reis, M. Rogalski, T. Montagna, y M. S. dos Reis. 2017. Mating System and Genetic Structure Across All Known Populations of *Dyckia brevifolia*: A Clonal, Endemic, and Endangered Rheophyte Bromeliad. *Journal of Heredity* 108: 299–307.
- Rosas-Guerrero, V., R. Aguilar, S. Martén-Rodríguez, L. Ashworth, M. Lopezaraiza-Mikel, J. M. Bastida, y M. Quesada. 2014. A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators? *Ecology Letters* 17: 388–400.
- Sampaio, M. C., L. E. Perissé, G. A. de Oliveira, y R. I. Rios. 2002. The contrasting clonal architecture of two bromeliads from sandy coastal plains in Brazil. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 197: 443–451.
- SINAC. 2012. Plan General de Manejo para la Zona Protectora Cerros de La Carpintera.
- Smith, L. B., y R. J. Downs. 1979. Bromelioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monograph* 14: 1493–2142.
- Torimaru, T., N. Tani, Y. Tsumura, N. Nishimura, y N. Tomaru. 2007. EFFECTS OF KIN-STRUCTURED SEED DISPERSAL ON THE GENETIC STRUCTURE OF THE CLONAL DIOECIOUS SHRUB ILEX LEUCOCLADA. *Evolution* 61: 1289–1300.
- Torres, E., M.-L. Riofrío, y J. M. Iriondo. 2019. Complex fine-scale spatial genetic structure in *Epidendrum rhopalostele*: an epiphytic orchid. *Heredity* 122: 458–467.
- Trapnell, D. W., J. L. Hamrick, y J. D. Nason. 2004. Three-dimensional fine-scale genetic structure of the neotropical epiphytic orchid, *Laelia rubescens*. *Molecular Ecology* 13: 1111–1118.
- Vekemans, X., y O. J. Hardy. 2004. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology* 13: 921–935.
- Volis, S., M. Zaretsky, y I. Shulgina. 2010. Fine-scale spatial genetic structure in a predominantly selfing plant: role of seed and pollen dispersal. *Heredity* 105: 384–393.

- Wester, S., y G. Zotz. 2011. Seed comas of bromeliads promote germination and early seedling growth by wick-like water uptake. *Journal of Tropical Ecology* 27: 115–119.
- Williams, D. A., M. F. Lawton, y R. O. Lawton. 1994. Population growth, range expansion, and competition in the cooperatively breeding brown jay, *Cyanocorax morio*. *Animal Behaviour* 48: 309–322.
- Williams, D. A., y K. N. Rabenold. 2005. Male-biased dispersal, female philopatry, and routes to fitness in a social corvid. *Journal of Animal Ecology* 74: 150–159.
- Willig, M. R., y S. J. Presley. 2016. Biodiversity and metacommunity structure of animals along altitudinal gradients in tropical montane forests. *Journal of Tropical Ecology* 32: 421–436.
- Winter, D. J. 2012. mmod: an R library for the calculation of population differentiation statistics. *Molecular Ecology Resources* 12: 1158–1160.
- Wöhrmann, T., y K. Weising. 2011. In silico mining for simple sequence repeat loci in a pineapple expressed sequence tag database and cross-species amplification of EST-SSR markers across Bromeliaceae. *Theoretical and Applied Genetics* 123: 635–647.
- Wright, S. 1943. Isolation by Distance. *Genetics* 28: 114–138.
- Zanella, C. M., A. Janke, G. M. Paggi, M. Goetze, M. S. Reis, y F. Bered. 2012. Microsatellites in the Endangered Species *Dyckia distachya* (Bromeliaceae) and Cross-Amplification in Other Bromeliads. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 15859–15866.
- Zotz, G. 2016. *Plants on Plants – The Biology of Vascular Epiphytes*. Springer International Publishing, Cham.

ANEXO

Tabla S1. Condiciones de amplificación por PCR de loci.

Especie	Locus	Ciclos alineamiento	Temperatura alineamiento	Referencia
<i>Aechmea mariae-reginae</i>	Ac01	30	50	Goetze et al. , 2013
	Ac55			
	Acom_71.3		56	Wöhrmann & Weising, 2011
	Acom_78.4			
	Ac11		57	Goetze et al. , 2013
	Ac25			
	Acom_82.8			Wöhrmann & Weising, 2011
	Acom_109.6			
<i>Werauhia ampla</i>	Ac11	25	57	Goetze et al. , 2013
	VgC01			Palma-Silva et al., 2007
	VgA04			Palma-Silva et al., 2007
	Ac25	30	50	Goetze et al. , 2013
	Acom_101.1		55	Wöhrmann & Weising, 2011
	Dd10			Zanella et al., 2012
	Acom_78.4		56	Wöhrmann & Weising, 2011
	Acom_12.12		60	

Tabla S2. Parámetros de diversidad genética de por locus de individuos de *Aechmea mariae-reginae* en Costa Rica. N: número de individuos; N_A: número de alelos promedio por locus; N_E: número de alelos efectivos; H_O: heterocigosidad observada; H_E: heterocigosidad esperada; F: coeficiente de endogamia.

Locus	N	Na	Ne	Ho	He	F
Ac01	92	4.000	2.668	0.500	0.625	0.200
Ac11	93	3.000	2.216	0.516	0.549	0.059
Ac25	93	3.000	2.094	0.462	0.522	0.115
Ac55	92	10.000	2.863	0.337	0.651	0.482
Acom 109.6	89	3.000	2.789	0.719	0.641	-0.121
Acom 82.8	92	5.000	3.743	0.565	0.733	0.229
Acom 71.3	93	3.000	1.785	0.409	0.440	0.071
Acom_78.4	93	2.000	1.823	0.581	0.451	-0.286

Tabla S3. Parámetros de diversidad genética de por locus de individuos de *Werauhia ampla* en Costa Rica. N: número de individuos; N_A : número de alelos promedio por locus; N_E : número de alelos efectivos; H_O : heterocigosidad observada; H_E : heterocigosidad esperada; F: coeficiente de endogamia.

Locus	N	N_A	N_E	H_O	H_E	F
Ac11	91	3.000	2.000	0.374	0.500	0.253
Acom_12.12	90	3.000	1.380	0.278	0.275	-0.010
VgC01	91	3.000	1.210	0.187	0.173	-0.078
VgA04	91	3.000	1.815	0.527	0.449	-0.175
Acom_101.1	91	3.000	2.239	0.341	0.553	0.384
Acom_78.4	91	2.000	1.729	0.385	0.422	0.088
Ac25	91	2.000	1.933	0.374	0.483	0.226
Dd10	91	3.000	1.537	0.209	0.349	0.402