



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“EFECTO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL
HÁBITAT EN EL ESTABLECIMIENTO DE
PLÁNTULAS Y SISTEMA DE APAREAMIENTO
DE *Nectandra ambigens* (Lauraceae) EN LA
SELVA DE LOS TUXTLAS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

MARIANA CHÁVEZ PESQUEIRA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN



2007



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.

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios Profesionales



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e .

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

"Efecto de la fragmentación del hábitat en el establecimiento de plántulas y sistema de apareamiento de Nectandra ambigens (Lauraceae) en la selva de Los Tuxtlas"

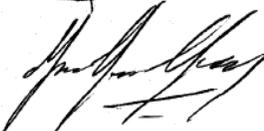
realizado por **Chávez Pesqueira Mariana**, con número de cuenta **40211644-0**, quien opta por titularse en la opción **Tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau 

Propietario Dr. Eduardo Morales Guillaumin 

Tutor(a)
Propietario Dr. Juan Servando Núñez Farfán 

Suplente Dr. Zenón Cano Santana 

Suplente Dra. María Graciela García Guzmán 

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., a 14 de marzo del 2007
COORDINADOR DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA


DR. ZENÓN CANO SANTANA



Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Chávez Pesqueira Mariana 55 59 20 28 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 40211644-0</p>
<p>2. Datos del tutor Dr Juan Servando Núñez Farfán</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dr Daniel Ignacio Piñero Dalmau</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dr Eduardo Morales Guillaumin</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Dr Zenón Cano Santana</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Dra María Graciela García Guzmán</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Efecto de la fragmentación del hábitat en el establecimiento de plántulas y sistema de apareamiento de <i>Nectandra ambigens</i> (Lauraceae) en la selva de Los Tuxtlas 72 p 2007</p>

Agradecimientos

Le agradezco mucho al Dr. Juan Núñez por todo su apoyo y disposición para que se pudiera realizar esta tesis y por todo lo que aprendí de él.

También a los doctores Juan Fornoni, Eduardo Morales y Graciela García, por todo su apoyo y ayuda en el taller, después del taller y en la revisión de la tesis.

A los Drs. Daniel Piñero y Zenón Cano por aceptar ser mis sinodales y por sus sugerencias para mejorar la tesis.

Al Dr. Ronald Ferrera y a la M. en C. Ma. Encarnación Lara del laboratorio del área de Microbiología del Colegio de Posgraduados con sede en Montecillo por aislar e identificar a los microorganismos patógenos de las plántulas.

A los chicos del taller por su ayuda en el campo y en el laboratorio, y por su amistad: Pili, Lilo, Mariana, Bernardo y Ariana.

También les agradezco mucho a todos los integrantes del laboratorio de Genética Ecológica y Evolución: Jesús, Sandra, Elsa, Pedro, Lupita, Eder, Etzel, Diego, Jonathan, Rafa B., Rafa T., Vania, Eunice, Laura Lorena, Alfredo, Armando, Jorge y Miguelón.

A todos los que me ayudaron en el campo a medir plantitas y en el laboratorio a moler y correr geles, gracias, de verdad muchas muchas gracias!

A todos mis amigos que estuvieron conmigo en el proceso: Brenda, Ile, Bere, Memo, Miry, Eugenio, Carlitos, Fer, Daniel, Lay, Diego, Yislem, etc., etc.

Pero sobre todo quiero agradecer a mi mamá, a mi papá, a mi hermana Pata y a mi abuela por todo su cariño, apoyo y paciencia.

Y finalmente, a todos en la estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas” por su apoyo y amabilidad.

Este trabajo fue posible gracias al proyecto SEMARNAT- CONACYT 2002-01-C01-00355 del cual fui becaria.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	4
Fragmentación del hábitat	4
Efecto de la fragmentación del hábitat en árboles tropicales	6
<i>Semillas y plántulas</i>	6
<i>Interacciones bióticas</i>	8
<i>Biología reproductiva</i>	12
<i>Extracción maderera</i>	14
Hipótesis	15
Material y Método	17
Sitio de estudio	17
Sistema de estudio	18
Diseño experimental	21
Electroforesis	22
Análisis de datos	24
<i>Supervivencia</i>	24
<i>Vigor</i>	24
<i>Herbivorismo y patógenos</i>	25
<i>Sistema de apareamiento</i>	26
Resultados	27
Masa de la semilla	27
Supervivencia	28
Vigor	32
Presencia de daño por herbívoros y patógenos	38
Sistema de apareamiento	44
Discusión	45
Supervivencia	45
Masa de la semilla	46
Vigor	47
Interacciones bióticas	49
Sistema de apareamiento	51
Conservación	53
Conclusiones	56
Literatura citada	57
Apéndice I	65
Apéndice II	69
Agradecimientos	70

Resumen

En las selvas tropicales, la fragmentación del hábitat modifica los valores de temperatura, humedad relativa del aire y suelo, así como la disponibilidad de luz en el sotobosque. Estos cambios ambientales pueden afectar la riqueza y abundancia de las especies de plántulas y alterar sus interacciones con enemigos naturales. En este estudio se analizó el efecto de la fragmentación en el establecimiento de plántulas del árbol tropical *Nectandra ambigens* (Lauraceae). Se colectaron, pesaron y germinaron semillas de seis árboles madre (familias), y se transplantaron a sitios de selva continua y fragmentos de la región de Los Tuxtlas en el estado de Veracruz, México. Periódicamente, durante 540 días, se registró su supervivencia, vigor (altura, número de hojas y área foliar) y presencia de daño por insectos herbívoros y microorganismos patógenos. El diseño permitió evaluar los efectos del hábitat (selva vs. fragmento), sitio, familia (árboles) y masa de la semilla, así como las interacciones bióticas en la supervivencia de las plántulas. Los resultados muestran que la supervivencia fue mayor en los fragmentos que en la selva no perturbada. El número de hojas producidas por las plántulas y su altura fueron mayores en los fragmentos. El ataque por patógenos y herbívoros fue mayor en la selva y se observó una asociación entre el ataque por microorganismos patógenos y el herbivorismo. La masa de la semilla tuvo un efecto positivo en la longevidad de las plántulas en ambos hábitats. Las plántulas de *N. ambigens* tuvieron mayor probabilidad de establecerse en sitios fragmentados.

La biología reproductiva de los árboles tropicales puede también ser alterada por la fragmentación del hábitat al reducir el número de individuos y aislar a las poblaciones. Para poner a prueba esto, se obtuvieron las tasas de entrecruzamiento para árboles tanto de selva continua como de fragmentos. Los resultados no mostraron diferencias sugiriendo que la especie se reproduce sólo por entrecruza y la fragmentación del hábitat no tiene aún un efecto negativo sobre el sistema de apareamiento de *N. ambigens*. Asimismo, el valor de la heterocigosis mostró que no existen diferencias en cuanto a la variación genética entre progenies de selva continua y fragmentos en la región de Los Tuxtlas, Veracruz, manteniendo una variación alta en ambos hábitats.

Introducción

Las selvas tropicales son el ecosistema terrestre más diverso y complejo que existe, contienen más de 100 especies de árboles por hectárea y en algunos casos se pueden encontrar más de 200 (Turner, 2001). Recientemente, el mantenimiento de la biodiversidad en las selvas tropicales se ha visto amenazado por los procesos de fragmentación; es decir, por la transformación de hábitat continuo a varios remanentes pequeños y aislados (Young *et al.*, 1996), rodeados de vegetación altamente modificada debido a acciones antropogénicas (Saunders *et al.*, 1991). Los cambios provocados por la fragmentación pueden causar la interrupción de procesos biológicos que originan o mantienen la biodiversidad y la dinámica del ecosistema (Didham *et al.*, 1996).

Particularmente, los árboles tropicales son susceptibles a los efectos de la fragmentación. Como plántulas, su establecimiento en los fragmentos puede ser afectado por la reducción del área y el efecto de borde, ya que éstos modifican los valores de temperatura, humedad relativa del aire y del suelo, así como, la disponibilidad de luz en el sotobosque (Ruiz, 2003). La fragmentación también puede alterar algunos aspectos de la interacción de las plántulas con otros organismos tales como patógenos e insectos herbívoros (Benítez-Malvido *et al.*, 1999). Como adultos, son también vulnerables debido a sus bajas densidades, y a su sistema de auto-incompatibilidad y altas tasas de exogamia (Cascante *et al.*, 2002). El proceso de fragmentación puede causar cambios en la estructura genética de las poblaciones de árboles remanentes (Nason y Hamrick, 1997), debido a que el número de genotipos disponibles decrece con respecto al original de la población por la pérdida de individuos reproductivos y por la alta probabilidad de apareamiento entre parientes. A la larga, esto lleva a pérdidas en la variabilidad genética en las poblaciones de árboles remanentes dadas por factores asociados a endogamia y deriva génica (Cascante *et al.*, 2002).

El objetivo de este trabajo fue comparar el establecimiento de plántulas del árbol tropical *Nectandra ambigens* (Lauraceae) en selva no perturbada y en fragmentos producidos por actividades agrícolas y ganaderas en la región de Los Tuxtlas, Veracruz, en cuanto a supervivencia, vigor y ataque por insectos herbívoros y microorganismos patógenos. Asimismo, se determinó la importancia de la masa de la semilla frente a los diferentes factores ambientales (fragmentos y selva continua). Por otra parte, se obtuvieron las tasas de entrecruzamiento y la heterocigosis de progenies tanto de fragmentos, como de selva continua, para obtener información sobre el sistema de apareamiento y la variación genética de la especie, y conocer el efecto de la fragmentación en este árbol de gran valor biológico y comercial en la zona.

Antecedentes

Fragmentación del hábitat

Muchas actividades de nuestra sociedad afectan la dinámica y la estructura genética de las poblaciones naturales (Makholela *et al.*, 2003). En la actualidad, la perturbación provocada por el cambio de uso de suelo en las zonas tropicales es más intensa que nunca, dando como resultado la destrucción y fragmentación de diversos hábitats naturales (Lawrence, 2003). La *fragmentación del hábitat* es un proceso resultado de la deforestación y consiste en la formación de parches de vegetación original inmersos en una matriz de vegetación alterada, generalmente formada por zonas de explotación humana (Guevara, *et al.*, 2004).

Actualmente, se estima que en México, entre el 80 y 90% de las selvas húmedas han sido taladas o severamente alteradas por diversas actividades productivas, entre las que destaca la ganadería (Guevara, *et al.*, 2004), provocando su reducción y transformación a una colección de fragmentos de varios tamaños y con diferentes historias de aislamiento (Estrada *et al.*, 1993). Sin embargo, a pesar de la extensa deforestación y grado de fragmentación en la región de Los Tuxtlas, ésta continúa manteniendo uno de los últimos reductos de selva húmeda de la costa del Golfo de México, en donde todavía quedan poblaciones vigorosas de especies arbóreas (Guevara, *et al.*, 2004).

La fragmentación del hábitat expone a los organismos que permanecen en el fragmento a condiciones de un ecosistema circundante diferente (Murcia, 1995). La mayor parte de los cambios provocados por la fragmentación se deben al *efecto de borde* (Tabarelli, *et al.*, 2004), el cual provoca cambios en las condiciones bióticas y abióticas, afectando a los organismos presentes en fragmentos (Murcia, 1995). Por un lado, los sitios fragmentados sufren un incremento en la temperatura del aire e incidencia de luz y una

reducción en la humedad relativa del aire y suelo, debido a su cercanía a potreros y zonas de vegetación secundaria (Scariot, 2000). Por otro lado, también cambia la abundancia y distribución de especies, así como el establecimiento y desarrollo de interacciones bióticas, tales como la depredación, competencia, parasitismo, herbivorismo, polinización y dispersión entre fragmentos y selva continua (Murcia, 1995).

Otra consecuencia de la fragmentación es el aumento en la intensidad del viento hacia el interior de los fragmentos. Esto provoca un incremento en la probabilidad de daño y muerte de los árboles, y por lo tanto, en la tasa de formación de claros, alterando la regeneración y dinámica natural del ecosistema (Laurance 1991, Saunders 1991, Laurance *et al.*, 1998). Se sabe que este efecto llega a tener un alcance de hasta 100m dentro de los fragmentos (Ferreira *et al.*, 1997), provocando pérdida de biomasa en fragmentos recién formados y una fuente significativa de emisiones de carbono que contribuyen al efecto invernadero (Laurance *et al.*, 1998).

En cuanto a la estructura genética de las poblaciones, la reducción y aislamiento espacial de las poblaciones, provocados por la fragmentación del hábitat, llevan a la erosión de la variación genética y a un aumento en la divergencia genética interpoblacional debido a un incremento en la deriva génica y endogamia, a la reducción del flujo génico entre poblaciones y a un incremento en la probabilidad de extinción local (Young, *et al.*, 1996).

Los efectos genéticos provocados por la fragmentación pueden ser más complejos para las plantas debido a su hábito sésil, diferencias en su longevidad, tiempo generacional, abundancia previa a la fragmentación, amplia variedad de sistemas de apareamiento, posibilidad de flujo génico tanto por polen como por semillas, y a sus interacciones con polinizadores y dispersores, que a su vez pueden ser afectados también por la fragmentación (Young *et al.*, 1996).

La interrupción en la interacción planta/polinizador aunada a una baja densidad de adultos, hacen a los árboles tropicales vulnerables a la fragmentación del hábitat a nivel del paisaje (Nason y Hamrick, 1997).

Efecto de la fragmentación del hábitat en árboles tropicales

Semillas y plántulas

La germinación y el establecimiento de plántulas representan las fases más críticas en el ciclo de vida de los árboles tropicales y de las plantas en general (Córdova, 1985; Kitajima y Fenner, 2000). Durante estas etapas del desarrollo los procesos demográficos son muy dinámicos (Harper, 1980), y juegan un papel relevante en los procesos de sucesión y de reclutamiento de las plantas (Khurana y Singh, 2004).

Las selvas tropicales son dinámicas y continuamente se regeneran gracias a la ocurrencia de claros que estimulan el crecimiento de plántulas de árboles hasta alcanzar el dosel. Esto ocurre en ciclos que duran aproximadamente un siglo o más, pero cambios en el ambiente pueden afectar la supervivencia y establecimiento de las plántulas, y por lo tanto, la estructura y composición de las especies del dosel por grandes periodos de tiempo (Whitmore, 1998). La remoción de hábitat primario en las selvas tropicales reduce la probabilidad de que las semillas de especies primarias dispersadas o que se encuentren en el banco de semillas, cuenten con las condiciones apropiadas para germinar y establecerse; bajo estas circunstancias, las especies pioneras o herbáceas invasoras son favorecidas aumentando en abundancia y alterando la composición y estructura natural del ecosistema (Lowe *et al.*, 2005).

Las principales causas naturales de mortalidad de plántulas de árboles incluyen varios factores bióticos y abióticos (Kitajima y Fenner, 2000), tales como depredadores, sequía, baja intensidad lumínica y competencia, entre otros (Turner, 2001). En las selvas tropicales, la fragmentación del hábitat, al modificar los valores de temperatura, humedad relativa del aire y suelo, así como la disponibilidad lumínica en el sotobosque (Ruiz, 2003), puede alterar el establecimiento de plántulas en fragmentos. Se ha visto que la composición de formas de vida y la estructura del banco regenerativo en fragmentos, tiende a convertirse en una comunidad de plántulas pobre en especies; la pérdida de diversidad de especies en el sotobosque, pero especialmente de plántulas de árboles, amenaza el mantenimiento de la biodiversidad y pone en peligro la regeneración futura de las selvas, ya que los árboles son los principales componentes de la diversidad, estructura y función de los bosques tropicales (Benítez-Malvido y Martínez-Ramos, 2003).

Las plantas aprovisionan a sus semillas con diferentes cantidades de reservas para lograr el establecimiento de sus plántulas (Saverimuttu y Westoby, 1996). Cuando las plántulas crecen con bajos niveles de luz (<1%), como es el caso del sotobosque de las selvas, generalmente la supervivencia muestra una relación positiva con la masa de la semilla (Leishman y Westoby, 1994) aunque ésta se pierde con el tiempo (Saverimuttu y Westoby, 1996). Semillas grandes, es decir, aquellas que presentan grandes reservas, producen plántulas más grandes, lo que las hace menos sensibles a niveles bajos de luz que especies de semillas pequeñas (Osunkoya *et al.*, 1993; Saverimuttu y Westoby, 1996). La supervivencia de especies de semillas grandes en la sombra se basa en la combinación de patrones de asignación de biomasa y la densidad de los tejidos que confieren resistencia a la pérdida de tejido por herbívoros y patógenos (Kitajima y Fenner, 2000), de hecho, se ha

sugerido que la masa de la semilla puede representar una adaptación de las plantas a ambientes sombreados (Paz y Martínez-Ramos, 2003).

El hecho de que la masa de la semilla esté correlacionada positivamente con la tolerancia de las plántulas a la sombra y otros factores de estrés (Westoby *et al.*, 1996; Osunkoya *et al.*, 1993), confiere a las plántulas provenientes de semillas grandes una mayor probabilidad de sobrevivir y establecerse en sitios sombreados (Paz y Martínez-Ramos, 2003; Saverimuttu y Westoby, 1996). Varios estudios han encontrado que especies de plantas con semillas grandes se establecen más fácilmente en un amplio rango de condiciones que especies de semillas pequeñas, que son más dependientes de perturbación para establecerse (Foster y Janson, 1985; Osunkoya *et al.*, 1993; Burke y Grime, 1996; Saverimuttu y Westoby, 1996).

Sin embargo, se ha observado que la fragmentación del hábitat, a través de su efectos sobre el tamaño de las poblaciones vegetales, en combinación con su grado de aislamiento, puede reducir la cantidad y calidad de las semillas producidas y tener un efecto negativo sobre la adecuación biológica de las plantas, al reducir atributos como la viabilidad, tamaño o capacidad germinativa (Henríquez, 2004). Asimismo, se ha encontrado que las semillas dispersadas de la selva continua hacia los fragmentos tienen menor probabilidad de germinar que aquellas dispersadas dentro de zonas continuas (Bruna, 1999), lo que compromete la regeneración natural de sitios fragmentados.

Interacciones bióticas

En los trópicos, más que en cualquier otro lugar, las plantas están involucradas en muchas interacciones con animales, hongos y microorganismos (Laurance y Bierregaard, 1997). La

pérdida y aislamiento de las poblaciones puede afectar las interacciones bióticas y la estabilidad de los ecosistemas (Steffan-Dewenter y Tschamntke, 1999). Se sabe que el proceso de fragmentación influye en la abundancia y diversidad de insectos, incluyendo muchas especies de herbívoros, alterando las interacciones de las plantas con éstos (Didham *et al.*, 1996; Kareiva, 1987), y otros organismos (Benítez-Malvido *et al.*, 1999).

Las hojas de muchas plantas de diferentes especies en las selvas tropicales son atacadas por insectos herbívoros y microorganismos patógenos (García-Guzmán y Dirzo, 2004; Eubanks *et al.*, 2005; Benítez-Malvido y Lemus-Albor, 2005). A pesar de esto, pocos estudios han investigado los efectos potenciales de estas interacciones en la adecuación de las plantas (Eubanks *et al.*, 2005) o el impacto que la fragmentación puede producir en estas interacciones.

El herbivorismo puede tener numerosos efectos negativos en la adecuación de las plantas al disminuir el crecimiento, la reproducción y la habilidad competitiva (Coley y Barone, 1996). En plántulas, el herbivorismo puede tener un impacto profundo en los individuos y ser un agente selectivo importante (de la Cruz y Dirzo, 1987). Se ha observado que daños al meristemo apical, así como la continua pérdida de tejido foliar por herbívoros decrece las probabilidades de supervivencia de las plántulas (Clark y Clark, 1985).

Por otra parte, el ataque por patógenos foliares también puede afectar la dinámica de la población hospedera por medio de efectos directos en la supervivencia, crecimiento y fecundidad de los individuos y a través de efectos indirectos por el impacto en herbívoros, polinizadores y dispersores de frutos y semillas (Gilbert, 2002). La actividad de los patógenos está influenciada por las condiciones de temperatura y humedad, ya que pueden afectar la supervivencia del inóculo, la germinación de la espora, la infección o la esporulación, por lo que pueden mostrar reducciones en sus números provocadas por la

falta de hospederos o cambios en las condiciones climáticas (Burdon *et al.*, 1989; García-Guzmán y Dirzo, 2001, 2006). Existen evidencias de que en las selvas tropicales la actividad de oomicetos y de hongos habitantes del suelo y que causan ahogamiento (damping-off) en plántulas de árboles es mayor en microambientes húmedos y sombreados, como en el sotobosque, que en sitios más abiertos (Augspurger, 1984; Kitajima y Augspurger, 1989; O'Hanlon-Manners y Kotanen, 2004), como son los fragmentos. Por lo tanto, la mortalidad de plántulas provocada por estos microorganismos patógenos es mayor en áreas sombreadas que en zonas de claros, sugiriendo que la luz y las condiciones más secas no son favorables para el desarrollo de oomicetos y hongos patógenos, o que el balance de energía de las plantas que crecen en zonas más abiertas les permite desarrollar una tolerancia más efectiva al ataque, ya que en condiciones de sombra, el bajo balance de carbono, hace difícil mantener rasgos defensivos y tolerar las pérdidas de tejido debido al ataque de enfermedades (Dobson y Crawley, 1994; Augspurger, 1984).

El efecto combinado del daño por herbívoros y patógenos puede afectar el desempeño de las plántulas por la reducción del área fotosintética crítica en condiciones de limitación de carbono (García-Guzmán y Dirzo, 2001). En un estudio sobre la infección causada por patógenos foliares y su asociación con el herbivorismo en una selva tropical, Benítez-Malvido *et al.* (1999), encontraron que la fragmentación del hábitat afectó el establecimiento de la asociación herbívoro-patógeno. En plántulas de dos especies de árboles tropicales (*Pouteria caimito* y *Chrysophyllum pomiferum*), la mayoría de daño provocado por hongos estuvo asociado con insectos herbívoros. Esta asociación fue mucho mayor en selva continua que en los fragmentos, facilitando la infección por el patógeno. Esto sugiere que, al menos en estas dos especies, la abundancia de herbívoros que fomentan o facilitan la infección es reducida en los fragmentos.

Se ha demostrado que en la selva de Los Tuxtlas un alto porcentaje de las hojas de plántulas del árbol tropical del dosel *Nectandra ambigens*, son dañadas por herbívoros y patógenos (71%), mientras que una pequeña proporción son sólo dañadas por patógenos (5%) o herbívoros (19%) (García-Guzmán, 1990).

La fragmentación también puede afectar otras interacciones de las plantas con diferentes organismos como depredadores de semillas y dispersores (Cascante *et al.*, 2002). La depredación de las semillas afecta el número y la calidad de semillas para la regeneración; en fragmentos pequeños se ha observado que disminuye la cantidad de semillas depredadas (Chacoff *et al.*, 2004). También se ha visto que el flujo génico, mediado por semillas, ha provocado diferenciación genética entre poblaciones adyacentes indicando que los fragmentos intercambian semillas con poca frecuencia (Hamilton, 1999).

Otra interacción que se ve afectada por la fragmentación del hábitat es la polinización. Aizen y Feinsinger (1994) reportaron una disminución en el número de insectos polinizadores, niveles de polinización y de producción de frutos en dos especies de fabáceas en ambientes fragmentados con respecto al bosque continuo. La interrupción de asociaciones entre plantas, polinizadores y dispersores de semillas, aunada a la baja densidad de árboles adultos provocadas por la fragmentación del hábitat, pueden favorecer la extinción local de especies de árboles tropicales (Nason y Hamrick, 1997). Si la fragmentación del hábitat afecta el movimiento de los polinizadores y dispersores, los fragmentos se volverán unidades aisladas genética y demográficamente, con tamaños efectivos poblacionales pequeños (Young *et al.*, 1996; Nason y Hamrick, 1997).

Biología reproductiva

Como adultos, la respuesta de los árboles tropicales a la fragmentación depende de un número de factores especie-específicos y generales que afectan los patrones de conectividad reproductiva y genética entre poblaciones fragmentadas a largo plazo. La abundancia de árboles, así como sus síndromes de dispersión de polen y semillas, son particularmente importantes en la supervivencia en paisajes tropicales perturbados (Nason y Hamrick, 1997).

La disminución en el número de individuos reproductivos en una población, por la reducción de área, afecta negativamente el número de donadores potenciales de polen y por lo tanto la variación genética de la población (Nason y Hamrick, 1997). La disminución del flujo de genes provoca un incremento en la endogamia y la consecuente diferenciación entre las poblaciones remanentes (Cascante *et al.*, 2002), de hecho, el incremento en los niveles de endogamia es una de las consecuencias con más potencial deletéreo en las poblaciones ya que, redistribuye la variación alélica individual al reducir la proporción de heterócigos (Lowe *et al.*, 2005).

Si consideramos que los árboles tropicales generalmente son de vida larga, los efectos de la genética de poblaciones en bosques fragmentados pueden ser difíciles de observar directamente, ya que en general los árboles maduros se establecieron antes de que ocurrieran los procesos de deforestación y fragmentación (Hamilton, 1999). Trabajar con las progenes de los árboles nos acerca más a entender los efectos directos de la fragmentación sobre la biología reproductiva de los árboles y especialmente en su sistema de apareamiento.

El sistema de apareamiento en los árboles, es decir qué tanto se entrecruzan o autofecundan, tiene una importante influencia en la cantidad y distribución de la variación genética entre y dentro de las poblaciones (Hamrick y Godt, 1996). El entrecruzamiento representa una manera de mantener la variación genética y de disminuir el número de individuos homocigos para genes recesivos deletéreos (Loveless y Hamrick, 1984); sobre todo en los trópicos, donde la mayoría de los árboles son auto-incompatibles y cerca del 90% dependen de animales (generalmente insectos) como polinizadores (Bawa, 1990; Laurance y Bierregaard, 1997; Dick *et al.*, 2003).

Ya que grandes áreas de selvas tropicales están siendo fragmentadas rápidamente como resultado de actividades humanas, ha incrementado el interés de estudiar las consecuencias genéticas y reproductivas en las especies de árboles tropicales (Nason y Hamrick, 1997). El análisis de isoenzimas ha sido una herramienta de gran importancia para entender y resolver cuestiones de evolución a través del estudio de los estados reproductivos del ciclo de vida de las plantas, y su biología. La ventaja más importante del uso de las isoenzimas sobre otros tipos de marcadores moleculares, es la relativa abundancia de loci polimórficos que pueden ser usados como marcadores genéticos (Pérez y Piñero, 1997).

Estudios genéticos sobre el sistema de apareamiento usando isoenzimas como marcador, han mostrado que la mayoría de las especies de árboles tropicales tienen tasas de entrecruzamiento altas. Las tasas de entrecruzamiento estimadas para poblaciones de hábitats de bosque continuo son generalmente mayores de 0.8 (Nason y Hamrick, 1997). Lee (2000) comparó las tasas de entrecruzamiento del árbol tropical *Dryobalanops aromatica* en tres diferentes tipos de bosque (primario, talado y artificial), encontrando la tasa más alta en el bosque primario. Otros estudios (Murawski *et al.*, 1994; Hall *et al.*,

1996) también han reportado reducciones en las tasas de entrecruzamiento de árboles tropicales en sitios talados o perturbados. Fuchs *et al.* (2003), mediante un análisis genético en el que también utilizaron isoenzimas como marcadores moleculares, encontraron que la progenie de árboles de *Pachira quinata* en poblaciones continuas experimentó menores niveles de afinidad genética, una tendencia a mayores niveles de exogamia y/o más padres que las progenies de árboles aislados en Guanacaste, Costa Rica.

Sin embargo, a pesar de que la fragmentación causa pérdidas de diversidad genética e incrementa la endogamia, también se ha demostrado que árboles aislados muestran niveles de diversidad genética, producción de semillas y ciertos parámetros del vigor de sus plántulas, similares a los de árboles de poblaciones continuas, sugiriendo que los árboles aislados podrían jugar un papel importante como puentes entre fragmentos para que exista flujo génico (Cascante *et al.*, 2002), y no como “the living dead” (Janzen, 1986), es decir, como árboles que sólo persisten por su longevidad pero no contribuyen a la regeneración de los bosques. Incluso, autores como Young *et al.* (1996) piensan que la fragmentación del hábitat puede incrementar más que reducir el flujo génico interpoblacional y provocar una alta variación genética en las poblaciones, haciéndolas viables y con potencial evolutivo.

Extracción maderera

Gran proporción de selvas tropicales fragmentadas han enfrentado la extinción local y regional de especies de árboles (Tabarelli *et al.*, 2004). Para los árboles, la degradación del hábitat primario resulta de dos procesos principales: la fragmentación de los bosques a parches y la perturbación del hábitat por procesos de extracción como la tala selectiva (Lowe *et al.*, 2005).

La fragmentación provoca que los árboles de interés comercial queden más accesibles a la tala, por lo que la composición de las poblaciones de árboles tropicales en los fragmentos se ve más afectada por la extracción maderera (Lawrence, 2003). Se puede decir que los árboles más amenazados son aquellos que combinan madera valiosa, altas tasas de entrecruzamiento, semillas dispersadas por vertebrados y alta sensibilidad a los efectos de borde, fuego, competencia con lianas y especies ruderales. Dado que la explotación de las selvas tropicales es inevitable, los sistemas de manejo de los bosques que aumenten eventos de entrecruzamiento y que minimicen la endogamia, tendrán un impacto vital en su manejo sustentable (Lee, 2000). Hoy en día, la restauración ecológica debe jugar un papel fundamental en la conservación de la biodiversidad (Young, 2000).

Las preguntas que surgieron para llevar a cabo este trabajo son:

- ¿Cómo afecta la fragmentación del hábitat el establecimiento de plántulas de *Nectandra ambigens*? Específicamente, ¿cómo afecta en su supervivencia, vigor (crecimiento, número de hojas y área foliar) y en el ataque por insectos herbívoros y microorganismos patógenos?
- ¿Es la masa de la semilla determinante en el establecimiento y supervivencia de las plántulas de diferentes hábitats (fragmento vs. selva continua)?
- ¿Existen diferencias en las tasas de entrecruzamiento de las progenies de árboles de selva continua y de fragmentos?

Hipótesis

Las hipótesis planteadas en este estudio son:

- a. Si el ambiente sombreado y húmedo, como el sotobosque de las selvas tropicales, beneficia el ataque por parte de insectos herbívoros y posiblemente de patógenos foliares (Benítez-Malvido y Martínez-Ramos, 2003; Ruiz, 2003), se espera que la fragmentación del hábitat, al provocar cambios al ambiente del sotobosque, como mayor incidencia de luz y menor humedad, disminuya los ataques por parte de estos organismos en las plántulas de fragmentos. Asimismo, el herbivorismo podría ser menor debido a la pérdida de diversidad de insectos herbívoros en sitios fragmentados (Didham, 1996), reduciendo también las probabilidades de infección por patógenos (García-Guzmán y Dirzo, 2001). La distancia entre fragmentos y la selva continua también podría contribuir en reducir los ataques en plántulas de fragmentos al afectar el potencial de dispersión.

- b. A pesar de ser una especie de árbol tolerante a condiciones de sombra, las plántulas de *Nectandra ambigens* se benefician al encontrarse en condiciones de mayor iluminación (del Amo, 1985; Martínez-Ramos, 1985), por lo que se espera que las plántulas presentes en fragmentos muestren un mayor crecimiento en altura y área fotosintética.
- c. Lo anterior sugiere que las plántulas en fragmentos, al ser menos atacadas y más vigorosas, muestren una mayor supervivencia a lo largo del estudio.
- d. Se espera que la masa de la semilla tenga un efecto positivo en el establecimiento de plántulas en el sotobosque de la selva y un efecto nulo o no significativo en los fragmentos donde las condiciones son más favorables.
- e. Finalmente, se espera que la fragmentación del hábitat afecte los patrones de apareamiento y éxito reproductivo de árboles tropicales al afectar la actividad de los polinizadores y el entrecruzamiento, por lo que las progenies derivadas de árboles en zonas fragmentadas tendrán una tasa de entrecruzamiento menor en comparación con las plántulas presentes en zonas no perturbadas de selva.

Material y Método

Sitio de estudio

El estudio se llevó a cabo en la Reserva de la Biosfera de Los Tuxtlas ubicada en la planicie costera del Golfo de México, al sur del estado de Veracruz (18° 05' y 18° 45' norte y 94° 35' y 95° 30' oeste) (Guevara *et al.*, 2004). El clima de la región es cálido y húmedo, con una temperatura media anual de entre 24 y 26° C; el promedio de lluvia anual es de 4725 mm con una temporada seca relativamente corta (marzo-mayo) (Soto y Gama, 1997). La vegetación predominante en la región es la selva alta perennifolia (Dirzo *et al.*, 1997), caracterizada por vegetación perenne y árboles que exceden los 30 m de altura (Ibarra *et al.*, 1997). El sotobosque se encuentra cubierto con plántulas de un gran número de especies de árboles, palmas y lianas, así como de varias especies de helechos y otras hierbas (Dirzo *et al.*, 1997). Las especies más abundantes son la palma *Astrocaryum mexicanum* en el sotobosque, *Pseudolmedia oxyphyllaria* en el estrato medio y *Nectandra ambigens* en el estrato superior (Bongers *et al.*, 1998). Gran parte de la Reserva está convertida en potreros y acahuales, resultado de acciones antropogénicas como la ganadería, por lo que en la actualidad lo que antes era bosque continuo, ahora se reduce a algunos remanentes aislados o fragmentos (Dirzo *et al.*, 1997).

Para este estudio se utilizaron cuatro sitios experimentales: dos ubicados dentro de los terrenos de la Estación de Biología Tropical de la UNAM “Los Tuxtlas” (18°35.240' norte, 95°04.62' oeste), y que corresponden a *selva continua*, y los otros dos sitios ubicados en los *fragmentos* remanentes de selva llamados “Cola de Pescado” (18°39.792' norte, 95°08.754' oeste) (Fragmento 1) y “Cerro Borrego” (18°37.958' norte, 95°05.164' oeste) (Fragmento 2) ubicados dentro de la Reserva de la Biosfera de Los Tuxtlas (Figura 1).

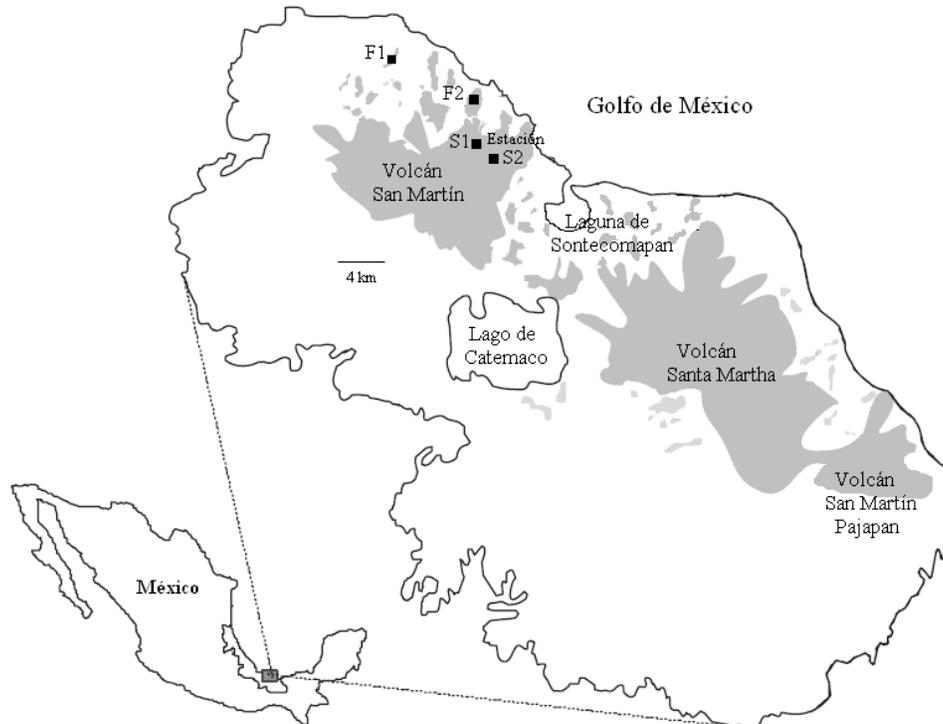


Figura 1. Sitio de estudio. Región de Los Tuxtlas, Veracruz, México. Se señalan los sitios experimentales: F1 (Fragmento 1 "Cola de Pescado"), F2 (Fragmento 2 "Cerro Borrego"), S1 (Selva 1) y S2 (selva 2) (los dos últimos dentro de la Estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas").

Sistema de estudio

Nectandra ambigens (Blake) C. K. Allen (Lauraceae) es una especie de árbol tropical que llega a medir de 20 a 35 m de altura. Se distribuye en el sureste de México, Honduras y Guatemala, y es uno de los árboles dominantes en la región de Los Tuxtlas (Dirzo *et al.*, 1997b; Piñero *et al.*, 1977; Bongers *et al.*, 1998). La especie es hermafrodita, con flores color rosa pálido y se sabe poco de su polinización, aunque se piensa que las abejas son los principales vectores del polen (Dirzo *et al.*, 1997b). Produce frutos de septiembre a noviembre cada dos o tres años. Los frutos presentan forma elipsoide, miden de 2.5 a 3.5 cm de largo y de 2.3 a 2.6 cm de ancho, en estado inmaduro son de color verde y al madurar se tornan negros. Poseen una sola semilla en

su interior, la cual puede ser depredada por invertebrados (Sánchez, 1995). Las semillas son dispersadas principalmente por gravedad, aunque una pequeña fracción es dispersada secundariamente por animales (Martínez-Ramos, 1985). Los monos aulladores (*Allouatta palluata*) y los tucanes (*Ramphastos sulfuratus*) consumen la pulpa madura de los frutos dejando caer la semilla *in situ*, sin embargo, hay observaciones que sugieren que ocasionalmente los tucanes tragan los frutos completos y podrían defecar la semilla a cierta distancia (Sánchez, 1995). La germinación de las semillas se da aproximadamente un mes después de que los frutos caen produciendo una densa alfombra de plántulas, con más de cien plántulas por metro cuadrado bajo el árbol madre (Dirzo *et al.*, 1997b). Sin embargo, la supervivencia de plántulas de la misma cohorte después de tres años es baja (Martínez-Ramos, 1994). Las plántulas presentes dentro de la selva, al estar adaptadas a condiciones de baja intensidad lumínica, muestran un crecimiento muy lento, en algunos casos inapreciable y estadísticamente no significativo; sin embargo, si se someten a condiciones más favorables de iluminación, como son las encontradas en los claros de la selva, son capaces de responder de una manera inmediata, tanto en crecimiento, como en un aumento en la tasa de reposición de hojas y área foliar (del Amo, 1985). Las hojas de las plántulas y adultos de *N. ambigens* son atacadas por herbívoros (principalmente larvas de ortópteros y lepidópteros) y por los hongos patógenos *Colletotrichum* sp. y *Phomopsis* sp., que causan manchas necróticas (García-Guzmán y Dirzo, 2001). Recientemente, Lara y Ferrera-Cerratos (datos no publicados), aislaron a partir de plántulas de *N. ambigens* con síntomas de marchitamiento por hongos y oomicetos, cepas de los géneros *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. y *Phytophthora cinnamomi*. Estos hongos y oomicetos comúnmente atacan a muchas especies de plantas y pueden causar su muerte como resultado de la obstrucción de agua y nutrientes provocada por el

daño presente en los haces vasculares de la raíz (Agrios, 1997). Se ha visto que los insectos herbívoros juegan un papel importante en el establecimiento de las plántulas, ya que al producir daño foliar, pueden facilitar la infección por hongos patógenos en esta especie (Dirzo *et al.*, 1997; García-Guzmán y Dirzo, 2001).

Nectandra ambigens es un árbol muy apreciado por la gente de la zona por la calidad y durabilidad de su madera, y es una de las especies de árbol más talada en la región. En los fragmentos de selva actualmente es difícil encontrar a la especie, ya que estas zonas quedan más accesibles para la tala.



Figura 2. *Nectandra ambigens*. a) distribución de la especie en México; b) rama con inflorescencias; c) flores; d) frutos. Tomado de Pennington y Sarukhán (1998).

Diseño experimental

En septiembre de 2004 se colectaron frutos de seis árboles adultos de *Nectandra ambigens* localizados en terrenos de la Estación de Biología Tropical de la UNAM “Los Tuxtlas”. De cada árbol se obtuvo una muestra de aproximadamente 400 frutos. Éstos se limpiaron y sus semillas, una vez pesadas en una balanza electrónica, se sembraron en charolas de plástico numeradas con suelo obtenido de la selva. Se registró la posición de cada semilla en las charolas y éstas se colocaron en el invernadero de la Estación. Se sembró un total de 2,195 semillas. Después de dos meses, las plántulas germinadas fueron etiquetadas y transplantadas al azar a cuatro sitios experimentales: dos en selva continua (en terrenos de la Estación) y dos en los fragmentos de Cola de Pescado (Fragmento 1) y Cerro Borrego (Fragmento 2) (dentro de la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas), siguiendo un diseño de bloques al azar. Los sitios fueron rodeados con alambre de púas para evitar el paso de ganado. Cada sitio tuvo dos bloques. En total, se transplantaron 1,018 plántulas y las seis familias fueron representadas equitativamente en todos los sitios y bloques. De noviembre de 2004 a mayo de 2006, cada dos o tres meses, se monitoreó la supervivencia de las plántulas. Asimismo, en nueve ocasiones (Tabla 1), se registró su altura, número de hojas, área foliar y presencia de ataque por herbívoros y patógenos. Cabe mencionar que el área foliar sólo fue medida en los primeros cinco censos.

En cada censo se verificó si una planta estaba viva (1) o si había muerto (0). La altura fue medida con un flexómetro desde el suelo hasta el meristemo apical de cada plántula. Para medir el área foliar se midió largo y ancho de todas las hojas de cada individuo con un vernier digital. Posteriormente para sacar el área foliar se utilizó un modelo de regresión lineal: $\text{Área} = 0.582 + 0.5857 (L \times A)$ ($R^2 = 0.98$, $P < 0.0001$, $n =$

100), y las áreas de todas las hojas eran sumadas para obtener el área foliar total por plántula.

El ataque por parte de microorganismos patógenos y/o herbívoros fue registrado como presente o ausente (1 o 0).

Tabla 1. Fechas en las que se llevaron a cabo los censos de las plántulas de *N. ambigens* transplantadas a los sitios experimentales en la región de Los Tuxtlas, Veracruz.

Censo	Fecha	Días
1	Noviembre 2004	0
2	Marzo 2005	119
3	Mayo 2005	189
4	Agosto 2005	290
5	Octubre 2005	341
6	Diciembre 2005	388
7	Febrero 2006	444
8	Marzo 2006	490
9	Mayo 2006	540

Electroforesis

Para analizar la variación genética de las plántulas de los diferentes hábitats (selva continua y fragmentos) y obtener las tasas de entrecruzamiento, se utilizó la técnica de electroforesis horizontal de isoenzimas en geles de almidón al 12% peso/volumen.

De las hojas de las plántulas que quedaron en el invernadero de cada madre, y que germinaron después del trasplante, se obtuvo el tejido para obtener la tasa de entrecruzamiento de las madres de selva continua. De los fragmentos “Ruiz Cortines” (18°36.571’ norte, 95°5.730’ oeste), y “Domingo” (18°35.567’ norte, 95°4.798’ oeste), se obtuvieron las muestras de plántulas de zonas fragmentadas. Se colectó tejido de alrededor de 30 individuos de seis diferentes árboles tanto para los fragmentos, como para la selva, teniendo en total aproximadamente 180 individuos para analizar por hábitat.

El tejido colectado se mantuvo en tanques de nitrógeno líquido hasta llegar al laboratorio donde se almacenó en un ultracongelador a una temperatura de -70° C. Aproximadamente 1 cm^2 de tejido foliar por plántula se maceró con buffer de extracción para *Abies* (3:1 de buffer YO y buffer VEG II, respectivamente) (Yeh y O'Malley, 1980; Cheliak y Pitel, 1984). El extracto obtenido se absorbió en wicks de papel filtro de $2 \times 10\text{mm}$. Se realizaron pruebas usando diferentes sistemas de buffer para los corrimientos, de los cuales se eligieron dos por mostrar buena resolución. Las electroforesis se realizaron en los sistemas: Poulik (pH 8.6) (Hakim-Elahi, 1976) y D-Maíz (pH 6.5) (Stuber *et al.*, 1988). Se ensayaron un total de 23 enzimas, de las cuales se escogieron siete por presentar actividad. Finalmente, sólo se trabajó con cinco, ya que dos (RUB y MNR) resultaron monomórficas. El sistema D-Maíz (Stuber *et al.*, 1988) fue usado para la enzima malato deshidrogenada (MDH: E.C.1.1.1.37), mientras que el sistema Poulik (Hakim-Elahi, 1976) fue usado para las enzimas peroxidasa anódica y catódica (APX, CPX: E.C.1.11.1.7), esterasa (EST: E.C.3.1.1) y fosfatasa ácida (ACPH: E.C.3.1.3.2).

Una vez teñidos los geles, fueron fotografiados con una cámara digital para posteriormente registrar por medio de lectura visual el patrón de bandeo. Para la interpretación de los geles se asignó el número 1 al locus con mayor migración anódica (más rápida), el número 2 al siguiente por debajo y así sucesivamente. El mismo criterio se utilizó en la designación de los alelos. En total se analizaron 9 loci con 2 o 3 alelos cada uno.

En el Apéndice I se muestra una descripción más detallada del método, así como las recetas de los buffers utilizados, de las soluciones de tinción para las enzimas ensayadas y de los sistemas de corrimiento.

Análisis de datos

Supervivencia

Para analizar la supervivencia de las plántulas a lo largo del estudio, se utilizó un modelo de regresión semiparamétrico (Proportional Hazards) propuesto por Cox (1972). Este modelo consiste en una regresión que examina el efecto de diversas variables (hábitat, familia, masa de la semilla), sobre la supervivencia. El modelo es semiparamétrico ya que no hace suposiciones sobre la distribución de la tasa instantánea de mortalidad, pero supone que las covariables se distribuyen normalmente. Estima una tasa instantánea de mortalidad por individuo suponiendo que las covariables afectan la mortalidad de manera multiplicativa. Es una herramienta flexible para evaluar la relación de las distintas variables que predicen un resultado de varios eventos en el tiempo; y tiene mucho en común con modelos lineales y logísticos (Vittinghoff *et al.*, 2005).

Vigor

Las medidas de vigor tomadas a las plántulas a lo largo del estudio, es decir, la altura, número de hojas y área foliar, se analizaron por medio de un análisis de varianza multivariado (MANOVA) de medidas repetidas. El MANOVA es una extensión de la prueba ANOVA y se utiliza cuando se cuenta con múltiples variables de respuesta y se está interesado en saber si hay diferencias entre grupos considerando las variables simultáneamente (Quinn y Keough, 2002). Este análisis aplicado a datos longitudinales, supone que las medidas son múltiples variables dependientes que están correlacionadas en los mismos sujetos. Los modelos MANOVA enfatizan la parte fija del modelo. Se estima un modelo que explica la estructura de las medias, considerando las covarianzas intra-grupo/sujeto como errores aleatorios; es decir, como la parte de la varianza de las

variables dependientes que no puede ser explicada por la pertenencia a un determinado grupo. En su aplicación a medidas repetidas, la parte fija del modelo es expandida. A fin de ajustar curvas de crecimiento polinómicas de un determinado grado, el conjunto de variables explicativas, entre las que la primera solo representa la pertenencia a un grupo concreto, se amplía con variables intra-sujeto que corresponden a los diferentes puntos temporales (Arnau y Balluerka, 2004).

Herbivorismo y patógenos

Para analizar la presencia de daño foliar por herbívoros y patógenos a las plántulas a lo largo del estudio se utilizaron regresiones logísticas. El objetivo primordial que resuelve esta técnica es el de modelar cómo influye en la probabilidad de aparición de un suceso, habitualmente dicotómico, la presencia o no de diversos factores y el valor o nivel de los mismos. Este tipo de situaciones se aborda mediante técnicas de regresión. Sin embargo, la metodología de la regresión lineal no es aplicable ya que la variable de respuesta sólo presenta dos valores, como puede ser presencia/ausencia de algún factor (daño por herbívoros o patógenos, en este caso). El modelo de regresión logística permite predecir la proporción de una de las dos categorías de la variable dependiente dicotómica en función de una o más variables independientes (Vittinghoff *et al.*, 2005). En particular, se analizó si una plántula era atacada (1) por herbívoros o patógenos foliares, o no (0). El modelo evalúa si $\beta_1 = 0$. El modelo completo fue: $g(x) = \beta_0$ (intercepto) + β_1 (hábitat) + β_2 (sitio, hábitat) + β_3 (bloque, sitio, hábitat) + β_4 (censo) + ... + β_n . $g(x)$ es el logaritmo natural de la probabilidad de ataque con relación a la probabilidad de no ataque (i.e., $g(x) = \ln (u/(1-u))$). El modelo se pone a prueba empleando una prueba de verosimilitud (log-likelihood), $G^2 = -2$ (log-likelihood del modelo reducido – log-likelihood del modelo completo). La reducción de la desviación atribuible a la inclusión de variables que predicen en el modelo completo se prueba

mediante una ji cuadrada. Para probar los coeficientes individuales (β_i) se empleó una prueba de razón de verosimilitud (likelihood ratio test) para la partición de la desviación (Quinn y Keough, 2002).

Todos los análisis antes descritos se realizaron usando el paquete estadístico JMP (SAS Institute, 2004).

Sistema de apareamiento

A partir de los genotipos de la progenie de seis árboles pertenecientes a selva continua y seis árboles de fragmentos obtenidos con electroforesis de isoenzimas, se estimaron las tasas de entrecruzamiento (t) utilizando el programa MLTR, versión 2.4 (Ritland, 2002), para conocer sobre el sistema de apareamiento de *N. ambigens*. Se llevaron a cabo 100 “bootstraps” para estimar los errores estándar de t . El rango de valores de t va de 0 a 1; 1 significa que la especie se aparea sólo por entrecruza y 0 que no existe entrecruzamiento. Valores intermedios corresponden a estrategias mixtas de apareamiento.

También se calculó la heterocigosis promedio (H) para las progenies de selva continua y fragmentos utilizando el programa TFGA (Miller, 1997). Suponiendo equilibrio de Hardy-Weinberg, la frecuencia de heterocigotos para cada locus es $H = 1 - \sum p_i^2$, donde p_i es la frecuencia de i -ésimo alelo y p_i^2 la frecuencia del homocigoto A_iA_i . El valor de H promediado para todos los loci es la heterocigosis promedio. Cuando $H = 1$, indica que todos los individuos son heterocigotos (Futuyma, 1998). Para saber si existen diferencias entre los valores de la heterocigosis de progenies de árboles de selva continua y de fragmentos se realizó una prueba de t con límites de confianza de 95% en el programa JMP (SAS Institute, 2004).

Resultados

Masa de la semilla

Se colectó un total de 2,195 semillas de seis árboles (familias) de *Nectandra. ambigens* de la selva de Los Tuxtlas, Veracruz, de las cuales 1,018 (46.37%) germinaron dos meses después y se emplearon para los experimentos de trasplante. La masa promedio de las semillas colectadas fue de 4.01g y de las germinadas 4.23g, y se observó variación significativa entre familias (Tabla 2, Figura 3); mediante un análisis de la varianza (ANOVA) considerando a las familias como un efecto aleatorio, es posible “partir” la varianza fenotípica de la masa de la semillas en sus componentes genéticos (familia) y ambiental, y estimar la heredabilidad (h^2). Se detectaron diferencias significativas en la masa promedio de las semillas ($F = 25.3997$; g.l. = 5; $P < 0.0001$) (Tabla 3). La familia explica un 14.65% de la varianza fenotípica total (Tabla 3); suponiendo que las semillas de una madre son medios hermanos, la heredabilidad es igual a: $h^2 = 4\sigma_g^2 / (\sigma_e^2 + \sigma_g^2) = 4\sigma_g^2 / \sigma_p^2$, donde σ_g^2 es la varianza genética y σ_p^2 es la varianza fenotípica total, indicando que el límite superior de la heredabilidad (h^2) (Lawrence, 1984) de la masa de la semilla es 0.663.

Tabla 2. Número y masa de las semillas sembradas y germinadas en el invernadero de la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas” por familia.

Árbol madre	No. de semillas colectadas	No. de semillas germinadas	Masa de las semillas germinadas (g)	Masa de las semillas no germinadas (g)
1	417	229	4.70	4.70
2	272	104	4.22	3.93
3	404	208	3.55	3.05
4	344	140	4.18	3.35
5	427	184	4.10	3.81
6	331	153	4.65	4.47
Total Promedio	2,195	1,018	4.23 ± 0.034	3.86 ± 0.041

Tabla 3. Análisis de la varianza (ANOVA) de la masa de la semilla considerando a la familia como un efecto aleatorio. *** $P < 0.001$

Fuente	g. l.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Varianza fenotípica	Proporción de la varianza total
Familia	5	95.467	19.093	25.399***	0.129	0.146
Error	860	646.482	0.751		0.751	0.853
Total	865	741.950			0.880	1.0

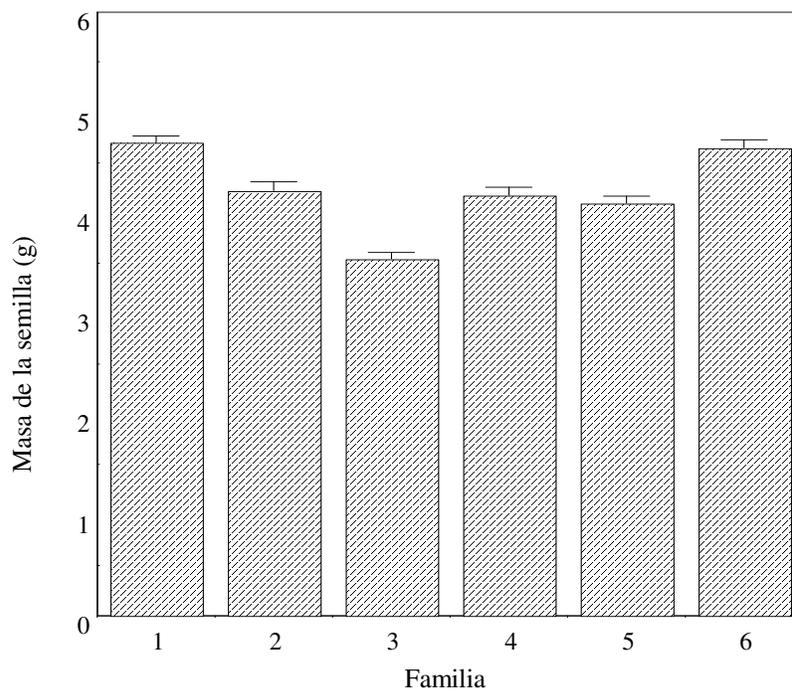


Figura 3. Masa promedio (en gramos) (+ E. E.) de las semillas de las plántulas de *N. ambigens* transplantadas por familia en la región de Los Tuxtlas, Veracruz.

Supervivencia

En total, 486 plántulas (47.7%) de las 1018 transplantadas sobrevivieron al final del estudio, es decir, un año y medio después de ser trasplantadas. La supervivencia de las plántulas de *Nectandra ambigens* mostró variación significativa entre hábitats, sitios dentro de hábitats, bloques dentro de sitios y hábitats (siendo siempre mayor en los

fragmentos), y entre familias; la masa de la semilla de la que derivó la plántula también afecta la probabilidad de supervivencia (Tabla 4). La supervivencia fue significativamente mayor a través del estudio en los fragmentos (Figura 4 y 5), donde sobrevivieron 301 plántulas (58.9%), mientras que en la selva continua sólo sobrevivieron 185 (36.5%).

Tabla 4. Análisis de la supervivencia de plántulas de *N. ambigens* transplantadas a sitios en selva continua y fragmentos en la región de Los Tuxtlas, Veracruz.

Factor	g.l.	χ^2	P
Hábitat	1	50.2683701	<0.0001
Sitio (hábitat)	2	25.3241705	<0.0001
Bloque(sitio, hábitat)	4	64.2981449	<0.0001
Familia	5	14.6703227	0.0119
Masa semilla	1	28.4652256	<0.0001

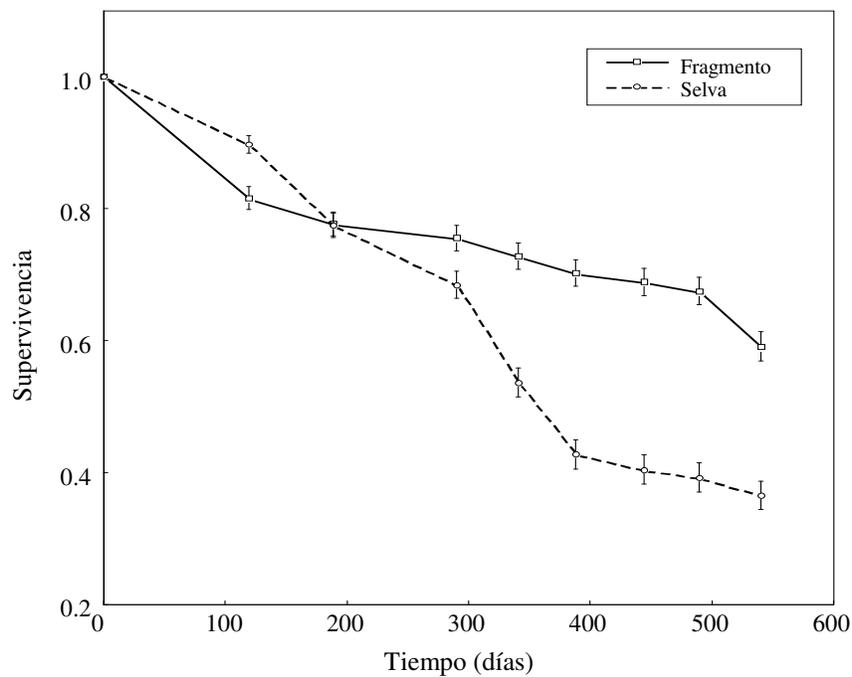


Figura 4. Proporción de plántulas (\pm E. E.) de *N. ambigens* supervivientes por hábitat a lo largo de 540 días en la región de Los Tuxtlas, Veracruz.

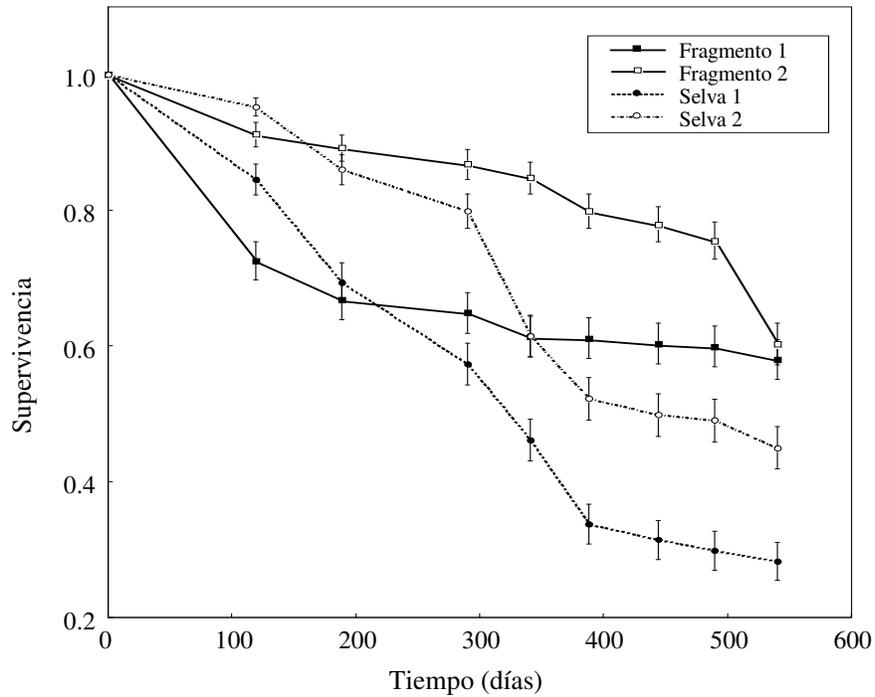


Figura 5. Proporción de plántulas (\pm E. E.) de *N. ambigens* supervivientes por sitio en cada hábitat a lo largo de 540 días en la región de Los Tuxtlas, Veracruz.

En cuanto a la supervivencia por familias, se encontró que la masa de la semilla tiene un efecto significativo sobre ella (Tabla 4) y que en general, las plántulas pertenecientes a familias con mayor masa promedio en sus semillas, tuvieron una mayor supervivencia en comparación con las familias con masas más pequeñas (Tabla 2, Figura 6).

Independientemente de la familia y del hábitat, las plántulas que sobrevivieron al final del estudio, es decir, después de 540 días, fueron plántulas provenientes de semillas con mayor masa (Tabla 5 ; Figura 7).

Tabla 5. Análisis de supervivencia de plántulas derivadas de semillas en diferentes categorías de masa.

Efecto	g. l.	χ^2	P
Masa de la semilla	1	38.5879	<0.0001

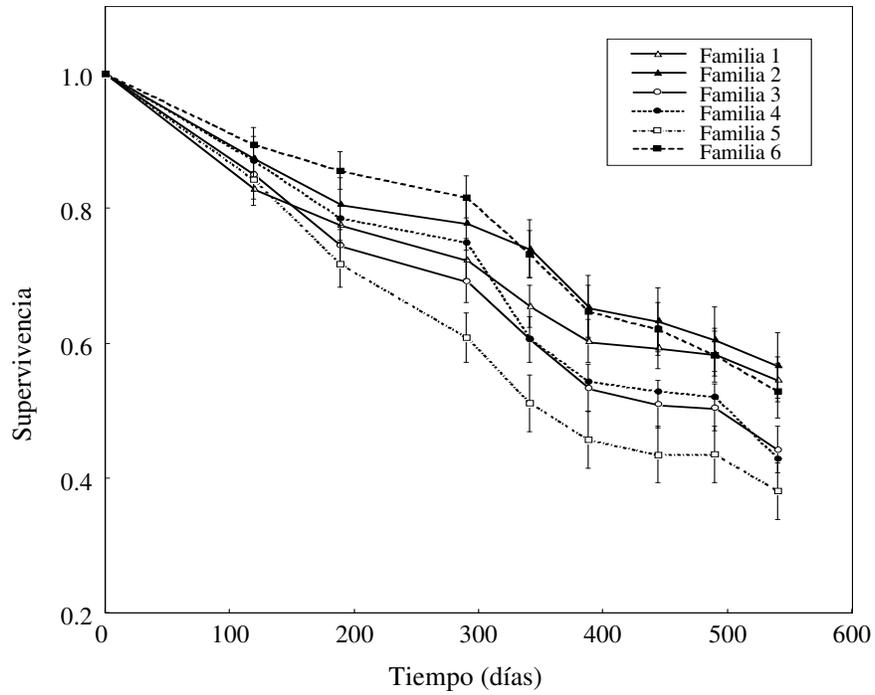


Figura 6. Proporción de plántulas (\pm E. E.) supervivientes por familia a lo largo de 540 días en la región de Los Tuxtlas, Veracruz.

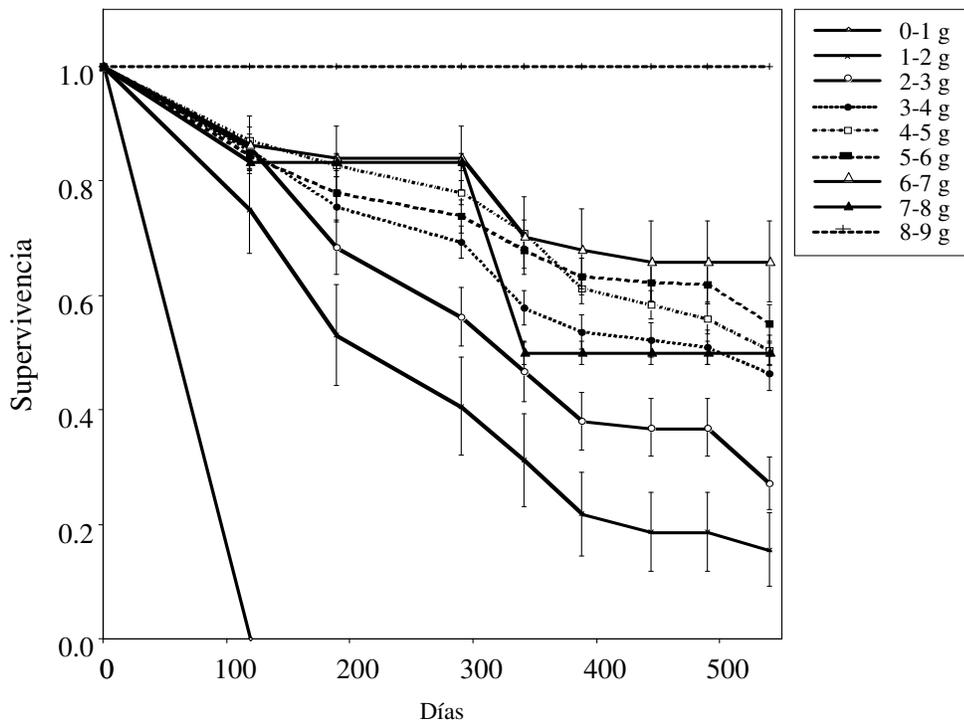


Figura 7. Supervivencia de las plántulas (\pm E. E.) transplantadas de *N. ambigens* a fragmentos y selva continua de la región de Los Tuxtlas, Veracruz, en relación a la masa de sus semillas.

Vigor

Número de hojas

El número de hojas fue significativamente diferente entre hábitats (Tabla 6). Durante los primeros seis censos (noviembre 2004-diciembre 2005) el número de hojas promedio por plántula fue similar en los fragmentos y en la selva continua, pero a partir del sexto censo, la producción de hojas aumentó significativamente en las plántulas de los fragmentos llegando a 5 hojas en promedio para mayo del 2006, mientras que en la selva hubo pérdidas de hojas llegando a un promedio de menos de 3 hojas para la misma fecha (Figura 8).

Tabla 6. Resultados del MANOVA de medidas repetidas para el número de hojas por plántula de *Nectandra ambigens*, en sitios de selva continua y fragmentos en la región de Los Tuxtlas durante 540 días (9 censos). El análisis resume los efectos entre sujetos (factores principales) así como, las diferencias ajustadas a lo largo del tiempo (dentro de los sujetos). T = tiempo; H = hábitat; S = sitio; B = bloque; MS = masa de la semilla.

Efecto	g.l.	F	P
Hábitat	1	58.954	<0.0001
Sitio (hábitat)	2	1.960	0.1420
Bloque (sitio, hábitat)	4	1.884	0.1120
Familia	5	5.267	<0.0001
Masa semilla	1	10.029	0.0016
Error	473		
Tiempo	8	4.764	<0.0001
T x H	8	31.134	<0.0001
T x S (H)	16	7.539	<0.0001
T x B (S, H)	32	2.662	<0.0001
T x F	40	1.796	0.0017
T x MS	8	5.275	<0.0001
Error	466		

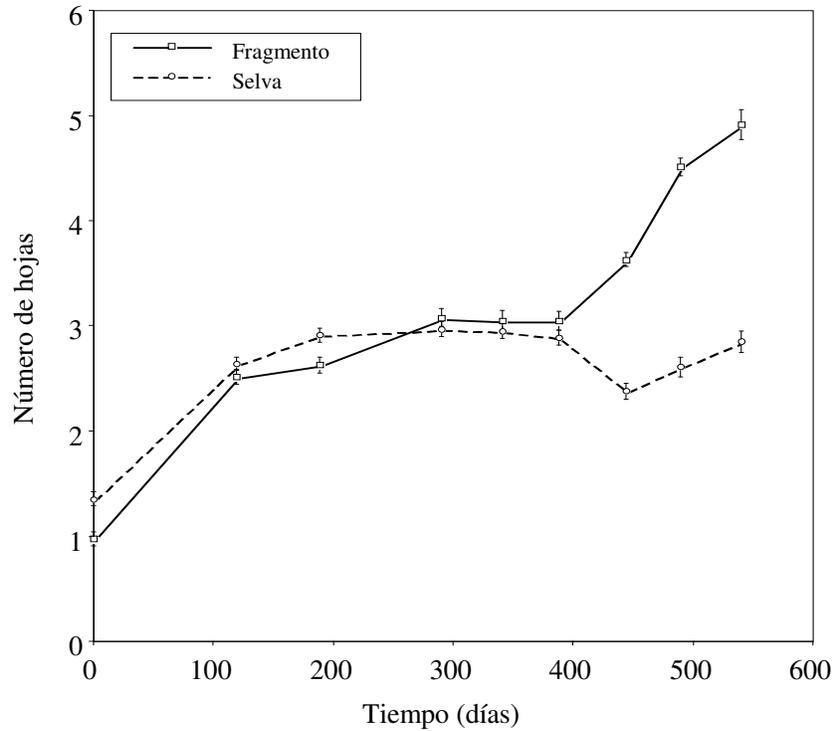


Figura 8. Número de hojas promedio (\pm E. E.) de las plántulas de *N. ambigens* por hábitat, en la región de Los Tuxtlas, Veracruz.

Área foliar

El área foliar de las plántulas no mostró diferencias significativas entre los fragmentos y la selva continua (Tabla 7; Figura 9). Sin embargo, en la última medición de área foliar (octubre 2005) las plántulas supervivientes de la selva tuvieron en promedio, un área foliar de 49.03 cm², mientras que las de fragmento tenían 61.31 cm².

Tabla 7. Resultados del MANOVA de medidas repetidas para el área foliar por plántula de *Nectandra ambigens*, en sitios de selva continua y fragmentos en la región de Los Tuxtlas durante 341 días (5 censos). El análisis resume los efectos entre sujetos (factores principales) así como, las diferencias ajustadas a lo largo del tiempo (dentro de los sujetos). T = tiempo; H = hábitat; S = sitio; B = bloque; MS = masa de la semilla.

Efecto	g.l.	F	P
Hábitat	1	2.137	0.1443
Sitio (hábitat)	2	0.687	0.5030
Bloque (sitio, hábitat)	4	4.137	0.0026
Familia	1	3.734	<0.0001
Masa semilla	5	10.830	0.0500
Error	630		
Tiempo	4	8.075	<0.0001
T x H	4	7.222	<0.0001
T x S (H)	8	1.790	0.0749
T x B (S, H)	16	1.043	0.4065
T x F	4	2.028	0.0003
T x MS	20	2.475	0.0888
Error	627		

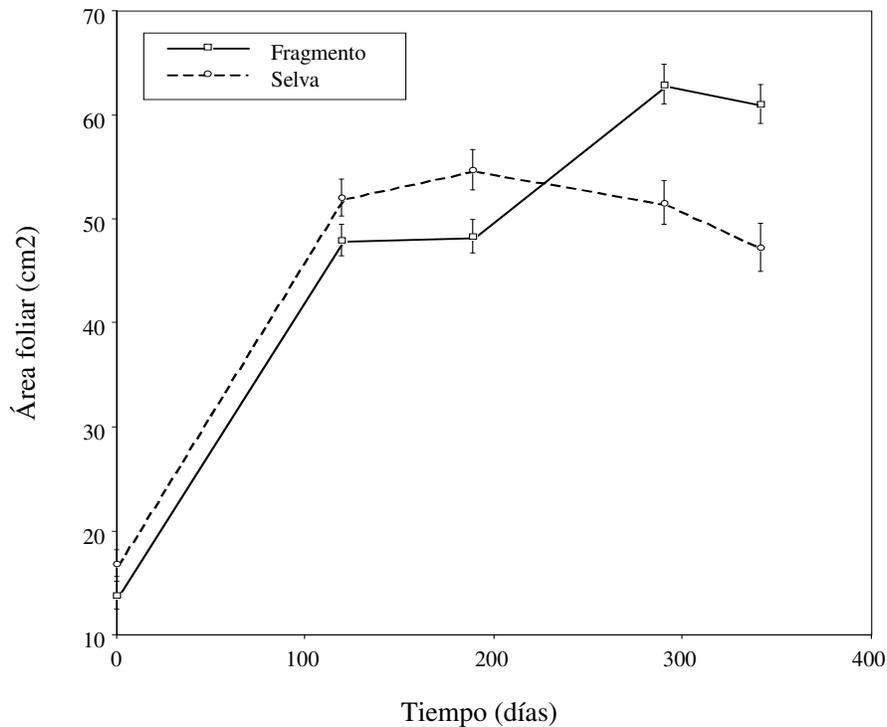


Figura 9. Área foliar promedio (\pm E. E.) de las plántulas de *N. ambigens* entre hábitats en la región de Los Tuxtlas, Veracruz.

Altura

En cuanto a la altura, se encontraron diferencias significativas entre plántulas de selva continua y de fragmentos (Tabla 8); Las plántulas transplantadas a los fragmentos mostraron un mayor crecimiento en altura que las transplantadas a la selva continua (Figura 10). En promedio, después de 18 meses de emerger las plántulas en los fragmentos alcanzaron una altura de 13.5 cm, mientras que las de la selva continua En promedio las plántulas supervivientes de *N. ambigens* llegaron a medir 22.31 cm de altura 18 meses después de emerger.

Tabla 8. Resultados del MANOVA de medidas repetidas para la altura de las plántulas de *Nectandra ambigens*, en sitios en selva continua y fragmentos en la región de Los Tuxtlas durante 540 días (9 censos). El análisis resume los efectos entre sujetos (factores principales) así como, las diferencias ajustadas a lo largo del tiempo (dentro de los sujetos). T = tiempo; H = hábitat; S = sitio; B = bloque; MS = masa de la semilla.

Efecto	g.l.	F	P
Hábitat	1	3.857	0.050
Sitio (hábitat)	2	2.662	0.070
Bloque (sitio, hábitat)	4	2.123	0.076
Familia	5	18.021	<0.0001
Masa semilla	1	43.014	<0.0001
Error	473		
Tiempo	8	8.291	<0.0001
T x H	8	9.108	<0.0001
T x S (H)	16	2.798	0.0002
T x B (S, H)	32	1.687	0.0097
T x F	40	2.372	<0.0001
T x MS	8	6.856	<0.0001
Error	466		

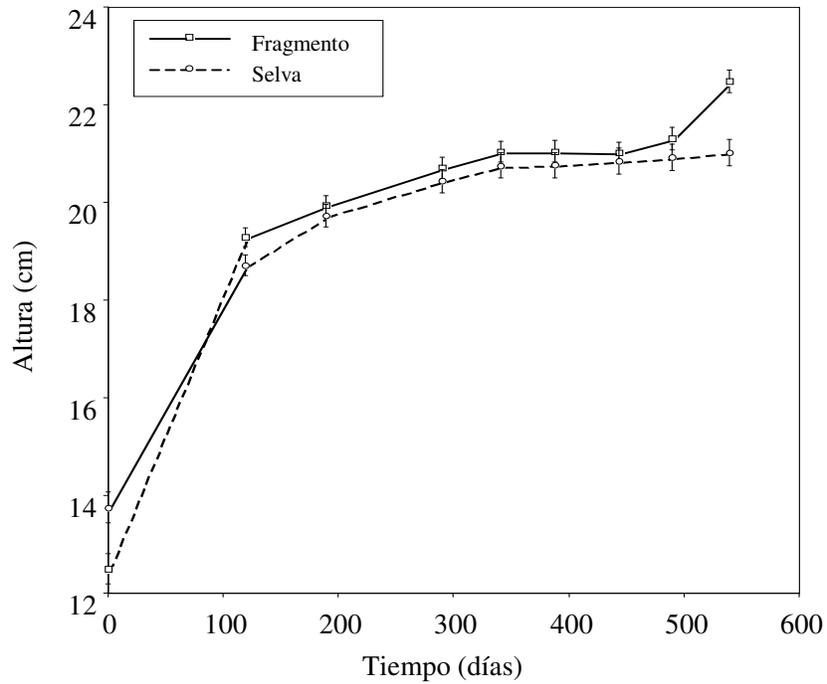


Figura 10. Altura promedio (\pm E. E.) de las plántulas de *N. ambigens* por hábitat, en la región de Los Tuxtlas, Veracruz.

Para las tres medidas de vigor tomadas a las plántulas de *N. ambigens*, es decir, número de hojas, área foliar y altura, se encontraron diferencias significativas entre familias y un efecto significativo de la masa de la semilla (Tablas 6, 7 y 8; Figuras 11, 12 y 13).

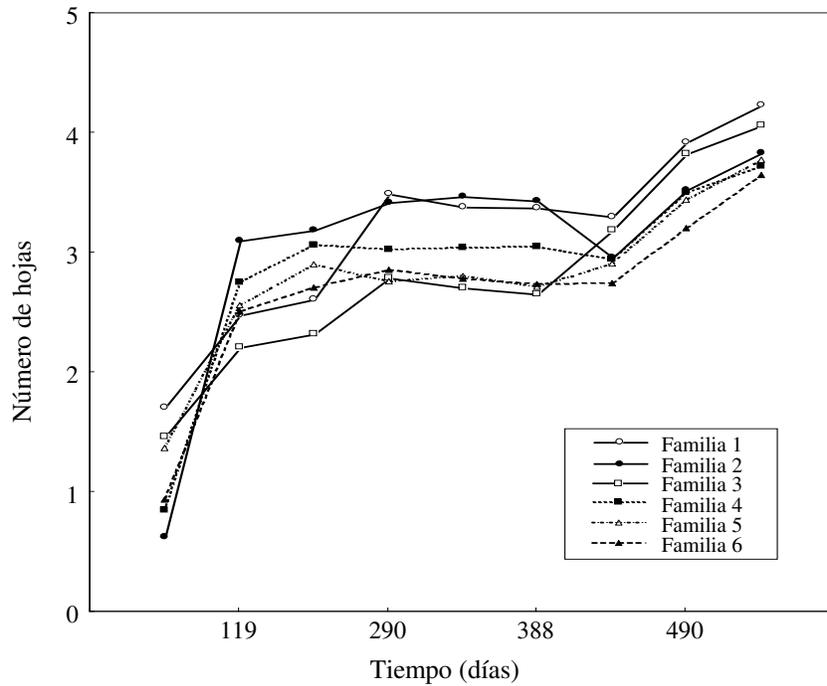


Figura 11. Número de hojas promedio de las plántulas de *N. ambigens* de distintas familias maternas, en la región de Los Tuxtlas, Veracruz.

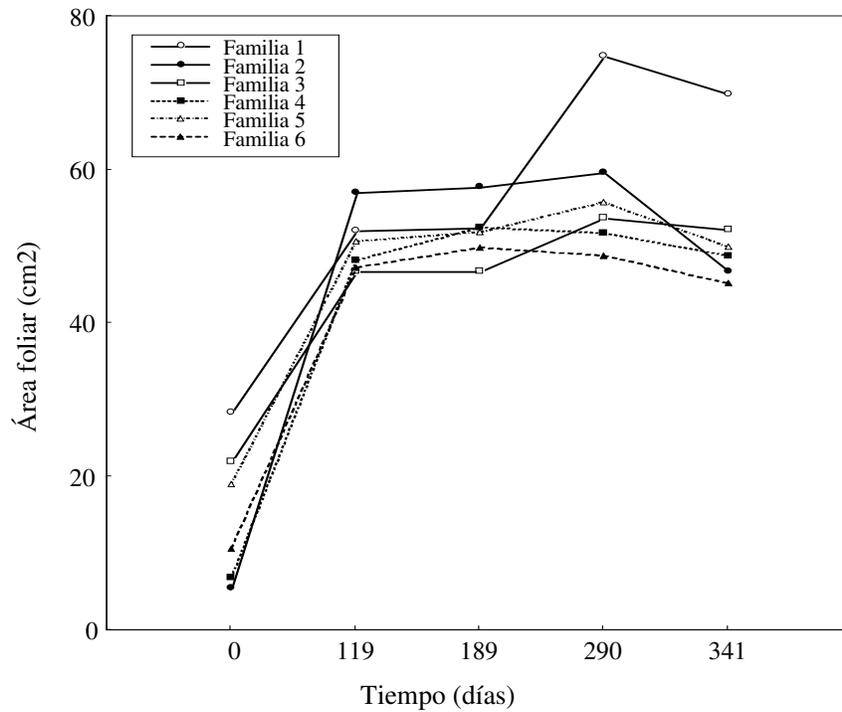


Figura 12. Área foliar promedio de las plántulas de *N. ambigens* de distintas familias maternas, en la región de Los Tuxtlas, Veracruz.

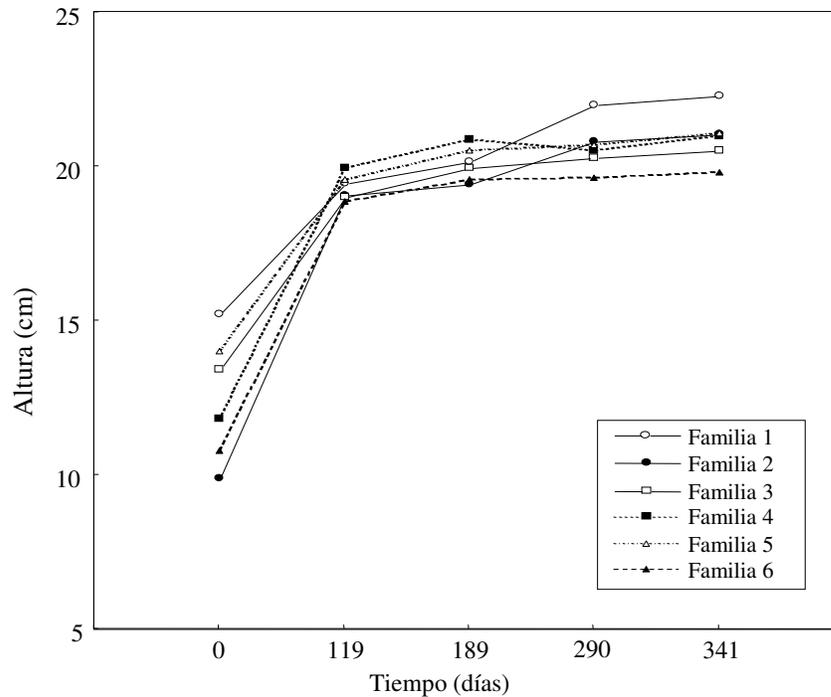


Figura 13. Altura promedio de las plántulas de *N. ambigens* de distintas familias maternas, en la región de Los Tuxtlas, Veracruz.

Presencia de daño por herbívoros y patógenos

Las plántulas con presencia de daño por microorganismos patógenos foliares e insectos herbívoros (forrajeros y minadores) fueron significativamente mayores en los sitios de selva continua que en los fragmentos a través del tiempo, y entre hábitats (Tablas 9, 10 y 11; Figuras 14, 15, 16 y 17).

Tabla 9. Resultados de la regresión logística del daño por la presencia de herbivorismo en plántulas de *N. ambigens*, en la región de Los Tuxtlas, Veracruz.

Efecto	g.l.	χ^2	P
Hábitat	1	35.499	<0.0001
Censo	1	1328.268	<0.0001
Hábitat × censo	1	0.113	0.7361
Sitio (hábitat)	2	21.665	<0.0001
Bloque(hábitat, sitio)	4	5.045	0.2827
Sitio × censo (hábitat)	2	0.923	0.6302
Bloque × censo (hábitat, sitio)	4	4.733	0.3158

Tabla 10. Resultados de la regresión logística del daño por la presencia de patógenos foliares en plántulas de *N. ambigens*, en la región de Los Tuxtlas, Veracruz.

Efecto	g.l.	χ^2	P
Hábitat	1	94.801	<0.0001
Censo	1	982.482	<0.0001
Hábitat × censo	1	45.998	<0.0001
Sitio (hábitat)	2	6.022	0.0492
Bloque (hábitat, sitio)	4	18.395	0.0010
Sitio × censo (hábitat)	2	0.165	0.9207
Bloque × censo (hábitat, sitio)	4	37.134	<0.0001

Tabla 11. Resultados de la regresión logística del daño por la presencia de minadores en plántulas de *N. ambigens*, en la región de Los Tuxtlas, Veracruz.

Efecto	g.l.	χ^2	P
Hábitat	1	2.008	0.1564
Censo	1	297.854	<0.0001
Hábitat × censo	1	11.064	<0.0009
Sitio (hábitat)	2	0.630	0.7297
Bloque (hábitat, sitio)	4	2.488	0.6466
Sitio × censo (hábitat)	2	5.910	0.0521
Bloque × censo (hábitat, sitio)	4	7.417	0.1154

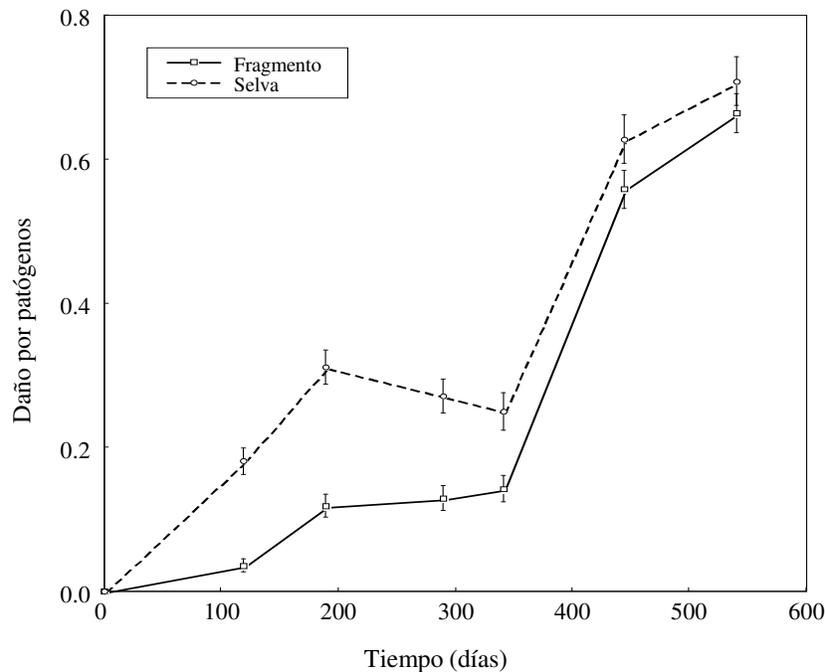


Figura 14. Proporción promedio (± 1 E.E.) de plántulas de *N. ambigens* con daño por microorganismos patógenos en la selva continua y en los fragmentos a lo largo del tiempo de estudio (540 días), en la región de Los Tuxtlas, Veracruz.

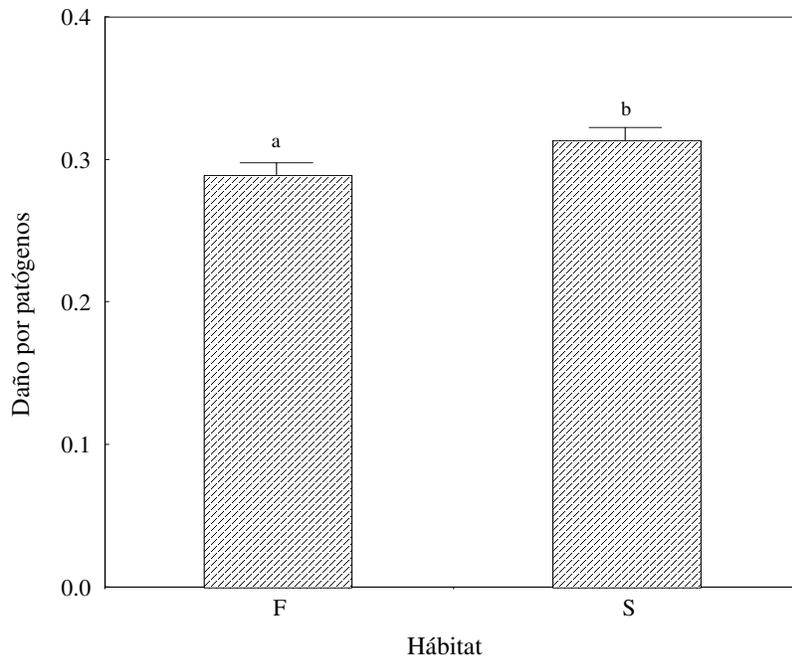


Figura 15. Proporción promedio (± 1 E.E.) de plántulas con presencia de daño por microorganismos patógenos en ambos hábitats, en la región de Los Tuxtlas, Veracruz. (F = fragmento; S = selva). Las diferentes letras indican diferencias significativas.

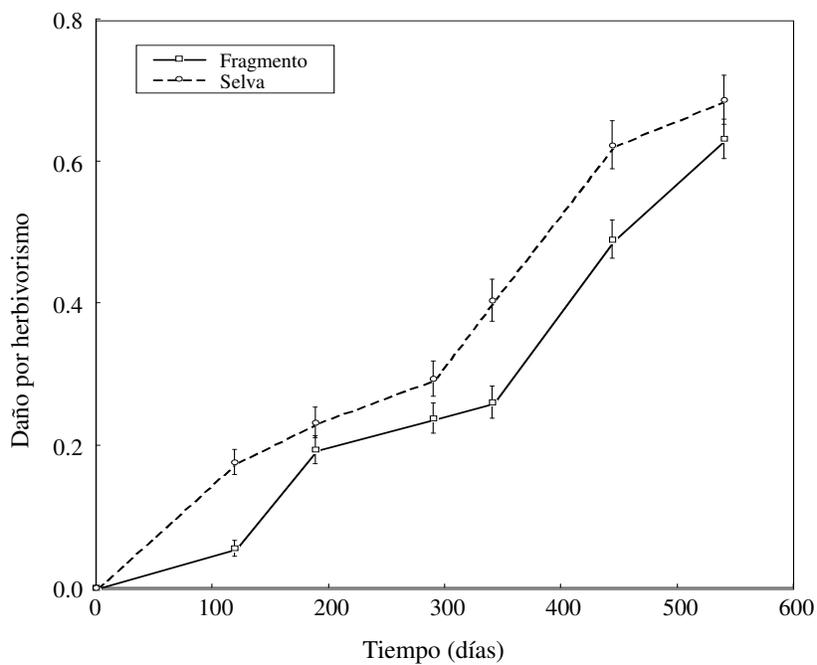


Figura 16. Proporción promedio (± 1 E. E.) de plántulas de *N. ambigens* con daño por herbivorismo en la selva continua y en los fragmentos a lo largo del tiempo de estudio (540 días), en la región de Los Tuxtlas, Veracruz.

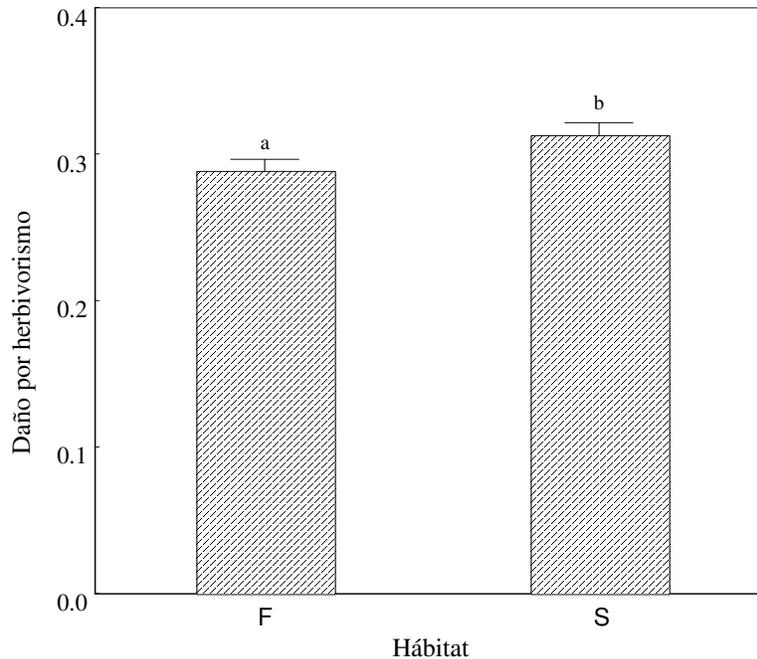


Figura 17. Proporción promedio (+ 1 E. E.) de plántulas con presencia de daño foliar por herbívoros en ambos hábitats, en la región de Los Tuxtlas, Veracruz. (F = fragmento; S = selva). Las diferentes letras indican diferencias significativas.

Las plántulas de *Nectandra ambigens* mostraron ataques por microorganismos patógenos (Figura 18). Para identificar a estos microorganismos se llevó a cabo un análisis macroscópico (detección de síntomas en planta y raíz) y un análisis microscópico (organismos aislados a partir de trozos de raíz en medio Papa dextrosa agar (PDA) y V8) (ver Apéndice II). A diferencia de otro estudio donde se dice que *Colletotrichum* sp. y *Phomopsis* sp., son los patógenos que atacan principalmente las hojas de *N. ambigens* (García-Guzmán y Dirzo, 2001), al aislar los organismos se logró la identificación de algunas cepas de *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. y dos cepas de *Phytophthora cinnamomi*.

Durante las mediciones a las plántulas en los diferentes censos, no se observó a los herbívoros que consumieron el tejido foliar; sin embargo la literatura dice que los principales consumidores en esta especie son larvas de ortópteros y lepidópteros

(García-Guzmán y Dirzo, 2001). Además de la remoción de tejido foliar por insectos forrajeros, se observó otro tipo de herbivorismo causado por minadores; este daño fue menos frecuente y se presentó en el envés de las hojas (Figura 18).

En ambos hábitats se encontró que las plántulas atacadas por herbívoros también presentaron frecuentemente daño por patógenos foliares; incluso la proporción de plántulas con daño por herbívoros y patógenos foliares fue casi el triple de las que sólo estuvieron atacadas por herbívoros o patógenos foliares (Figuras 19 y 20).



Figura 18. a) hoja de plántula de *N. ambigens* con síntomas de daño causado por *Phomopsis* sp. y *Colletotrichum* sp.; b) plántula de *N. ambigens* muerta posiblemente a causa de la infección de hongos habitantes del suelo; c) herbivorismo por insectos forrajeros; c) herbivorismo por minadores

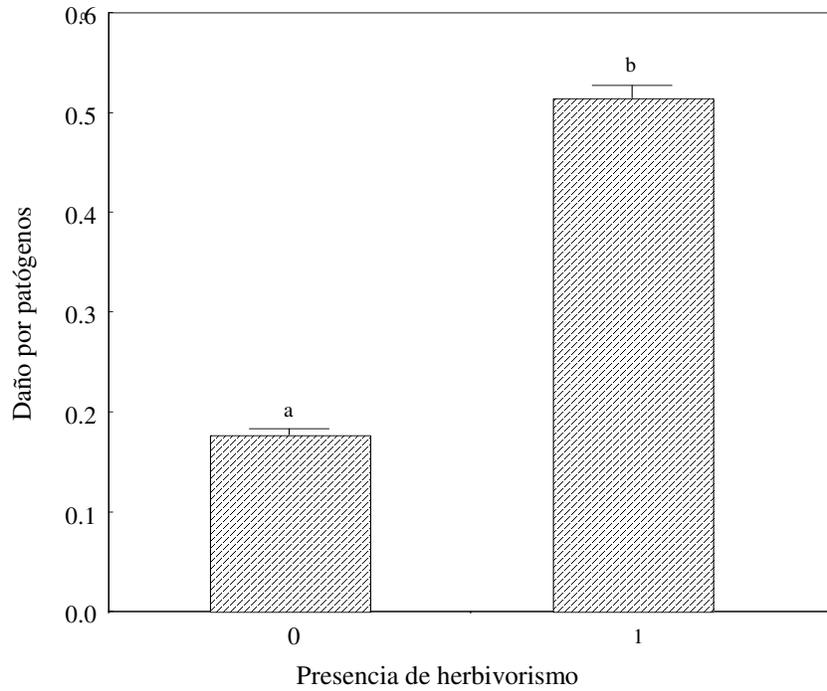


Figura 19. Proporción (± 1 E. E.) de plántulas dañadas por patógenos foliares sin estar dañadas por herbivorismo (0) y plántulas dañadas por patógenos y herbivorismo (1). Las diferentes letras indican diferencias significativas.

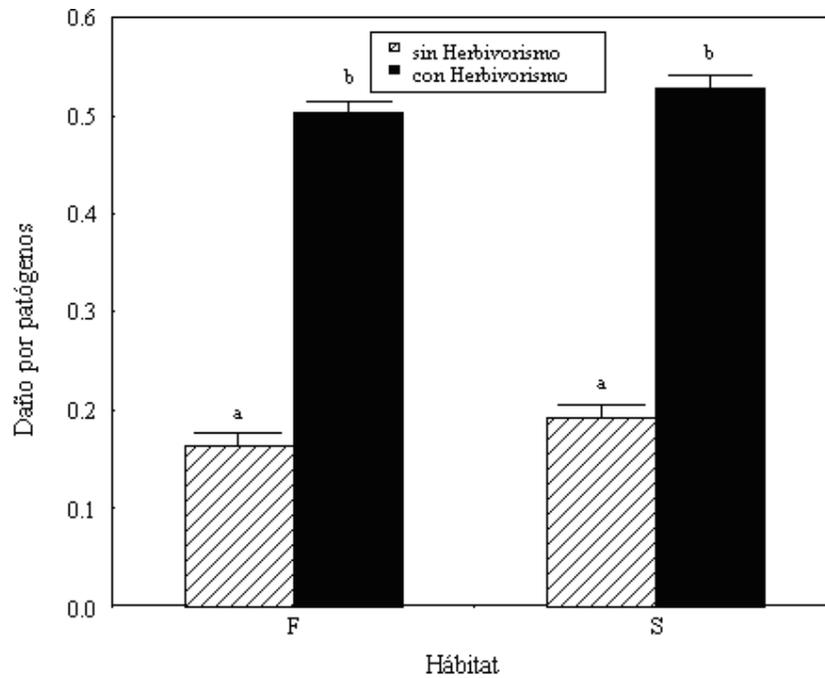


Figura 20. Proporción de plántulas con presencia de daño por patógenos en ambos hábitats, en relación a sí presentaban o no daño por herbivorismo. Las diferentes letras indican diferencias significativas. (F = fragmento; S = selva continua).

Sistema de apareamiento

Se analizaron un total de seis progenies de la selva continua y seis progenies de fragmentos para obtener información de la variación genética y sistema de apareamiento de *N. ambigens*. Un total de 30 hijos de cada madre fueron analizados para nueve loci enzimáticos y se obtuvieron los genotipos multilocus.

En ambos hábitats la tasa de entrecruzamiento fue indistinguible de 1 y no existen diferencias (Tabla 12).

Tabla 12. Tasas de entrecruzamiento (\pm E. E.) multilocus (t_m) y singlelocus (t_s) de las progenies de *N. ambigens* por hábitat, en la región de Los Tuxtlas, Veracruz.

Hábitat	t_m	t_s
Selva ($n=180$)	1.200 ± 0.002	1.200 ± 0.004
Fragmentos ($n=180$)	1.200 ± 0.002	1.200 ± 0.014
• Ruiz Cortines ($n=120$)	1.200 ± 0.002	1.153 ± 0.021
• Domingo ($n=60$)	1.200 ± 0.002	1.200 ± 0.002

Se detectó un ligero decremento en la variación genética (heterocigosis) en la progenie de fragmentos en comparación con la H de la selva continua. La heterocigosis promedio observada fue de 0.4438 y 0.3685 para selva y fragmentos, respectivamente (Tabla 13); sin embargo, por medio de una prueba de t no se detectaron diferencias significativas entre los valores de heterocigosis de progenies de la selva continua y de fragmentos de la región de Los Tuxtlas (Prueba de $t = -1.5386$; $p = 0.1490$, $N = 360$).

Tabla 13. Heterocigosis esperada y observada para progenies de *N. ambigens* en la selva continua y en los fragmentos.

Hábitat	N	H_o	H_e
Selva Continua	180	0.4438	0.4452
Fragmentos	180	0.3673	0.3685
Global	360	0.4055	0.4068

Discusión

El entendimiento de la respuesta de los árboles tropicales a las perturbaciones causadas por actividades humanas es un componente importante en el esfuerzo por manejar y restaurar las selvas. La comprensión de la ecología y genética de la germinación de semillas y del establecimiento de plántulas así como del análisis de tasas de entrecruzamiento, constituye un marco más amplio para entender el potencial regenerativo y evolutivo de los árboles tropicales y de las plantas en general. Los resultados del presente estudio señalan claramente que la regeneración de *Nectandra ambigens* puede facilitarse en sitios fragmentados de la selva de Los Tuxtlas.

Supervivencia

Se encontró que la supervivencia de las plántulas de *Nectandra ambigens* fue mayor en el hábitat fragmentado que en la selva continua, sugiriendo que los cambios ambientales producidos por la fragmentación sí tienen un efecto sobre éstas y están beneficiando la permanencia de plántulas de esta especie en el sotobosque de los fragmentos. El ligero aumento en la incidencia de luz al sotobosque y en la temperatura de los fragmentos, hacen de éstos un ambiente propicio para la supervivencia de las plántulas de esta especie. De hecho, los resultados muestran que las plántulas supervivientes en los fragmentos fueron el doble de la cantidad que sobrevivió en el sotobosque de la selva continua. Sin embargo, hay que mencionar que los sitios en donde se transplantaron las plántulas utilizadas en este estudio estaban rodeados por alambre de púas para evitar el paso de animales grandes como ganado, por lo que las plántulas presentes naturalmente en los fragmentos podrían ser dañadas o aplastadas por el ganado o incluso animales silvestres presentes en las áreas que rodean a los fragmentos de la región de Los Tuxtlas, reduciendo su probabilidad de sobrevivir. A pesar de esto, en otros estudios en

donde también se comparó la supervivencia de plántulas de árboles tropicales tolerantes a la sombra (*Gustavia superba*, *Aspidospermum cruenta* y *Virola surinamensis*) en sitios con dosel cerrado y en sitios más abiertos, se encontró que las plántulas transplantadas a los sitios con mayor incidencia de luz mostraron una mayor supervivencia (Howe, 1990; Molofsky y Fisher, 1993).

Masa de la semilla

La masa en las semillas (endospermo) actúa como suplemento de reservas de nutrientes necesarios para el establecimiento de las plántulas (Metcalf y Grubb, 1995). El árbol tropical *Nectandra ambigens* produce, en general, semillas grandes (4.01 g en promedio), aunque se encontró variación en la masa de las semillas entre familias, indicando varianza genética y/o efectos maternos no nucleares en esta especie.

Hipotéticamente, se considera que las semillas grandes confieren ventajas en la supervivencia en hábitats sombreados y que semillas pequeñas confieren ventajas de crecimiento en hábitats abiertos (Paz y Martínez-Ramos, 2003). En este estudio la masa de las semillas resultó ser un factor importante en la supervivencia de las plántulas de *N. ambigens* en ambos hábitats (selva continua y fragmentos). Este efecto de la masa de la semilla en la supervivencia, está asociado con un desempeño en caracteres de crecimiento. La masa de la semilla afecta positivamente la producción de hojas y la altura (Leishman y Westoby, 1994; Metcalf y Grubb, 1995; Bonfil, 1998; Hewitt, 1998; Paz y Martínez-Ramos, 2003).

No se cumplió la hipótesis de que la masa de la semilla tendría un efecto nulo en la supervivencia y longevidad de las plántulas de fragmentos y un efecto positivo en la selva en donde las condiciones son menos favorables en el sotobosque en cuanto a luz

incidente, temperatura y humedad, sino que la masa de la semilla resulta ventajosa en ambos hábitats, y en sitios más favorables determinan tasas de supervivencia más altas.

No obstante que la masa de la semilla pudiera no ser objeto de selección en las condiciones naturales, el hecho de que exista varianza genética permite anticipar el potencial de respuesta a la selección, siempre que las condiciones favorezcan.

Vigor

En cuanto al vigor, se encontró que el número de hojas de las plántulas y su altura fueron significativamente mayores en los fragmentos que en la selva continua, como consecuencia del ligero aumento en la incidencia de luz en el sotobosque (Ruíz, 2003) y a que esta especie, a pesar de ser tolerante, refleja un aumento en su altura, así como en la producción de hojas y por lo tanto, en el área fotosintética, cuando se encuentra en condiciones más favorables de luz (del Amo, 1985). El hecho de que el área foliar no haya resultado una medida de vigor significativamente diferente entre hábitats, ni sitios, probablemente se debe a que sólo se medía a las plántulas supervivientes; es decir, las plantas parecen tener un umbral de tejido para capturar carbono, abajo del cual no sobreviven (más aún si son depredadas o infectadas por patógenos); por ello, no resulta sorprendente que no haya diferencias entre hábitats. Existen sin embargo, otros factores que resultan importantes en las medidas de vigor como la variación espacial de escala moderada (sitios dentro de hábitats) y a escala muy pequeña (bloques dentro de sitios). Por otra parte, cabe mencionar que el área foliar se midió sólo en los cinco primeros censos (durante 11 meses), mientras que el número de hojas se midió nueve veces a lo largo de 19 meses. Si el área foliar se hubiera medido las mismas veces que el número de hojas, es posible que se hubiera encontrado una diferencia significativa entre el área foliar de plántulas de selva continua y fragmentos, ya que el número de hojas está

relacionado con el área foliar y éste fue significativamente mayor en los fragmentos al finalizar el estudio; incluso en la figura 8 se puede observar cómo el área foliar comienza a incrementarse en los fragmentos en la última medición.

Otro estudio encontró resultados similares; Molofsky y Fisher (1993), encontraron que las plántulas de tres especies de árboles tropicales de Panamá fueron en promedio 30% más altas en sitios de dosel más abierto (claros) que en el sotobosque de la selva con dosel cerrado. El hábitat también tuvo un efecto en la cantidad de área foliar producida; las plántulas transplantadas a claros produjeron más área foliar. Sin embargo, es importante señalar que las plántulas de *N. ambigens* utilizadas en este estudio provenían de árboles madre de la selva continua y fueron transplantadas a los sitios experimentales ya como plántulas. Cascante *et al.* (2002), encontraron en un estudio utilizando progenies de árboles tanto de poblaciones continuas como fragmentadas, que las semillas de poblaciones continuas tuvieron mayor posibilidad de germinar y producir plántulas más vigorosas es decir, con mayor área foliar y biomasa, que las plántulas de la progenie de árboles aislados, concluyendo que la fragmentación afecta la variación genética y por tanto, el vigor de la progenie en el árbol tropical *Samanea saman*. Sería necesario hacer un estudio similar con progenies de *N. ambigens*, tanto de selva continua como de fragmentos, para conocer el efecto de la fragmentación en el vigor de las plántulas germinadas naturalmente en ambos hábitats.

En este estudio también se encontró un efecto significativo de la familia y de la masa de la semilla sobre las tres medidas de vigor tomadas a las plántulas de *N. ambigens* estudiadas, indicando también la existencia de varianza genética en la especie.

Todo esto nos lleva a sugerir que el vigor de las plántulas de *N. ambigens* es beneficiado en los fragmentos de la región de Los Tuxtlas, sin embargo un estudio

donde las plántulas fueran medidas durante más tiempo sería necesario para reafirmar estos resultados.

Interacciones bióticas

La fragmentación del hábitat también mostró tener efectos en las interacciones de insectos herbívoros y patógenos foliares con las plántulas de *N. ambigens*. Los ataques tanto de patógenos foliares como de herbívoros fueron mayores en la selva continua, probablemente debido a que la fragmentación del hábitat modifica las condiciones ambientales del sotobosque en los fragmentos y hace menos propicio la actividad de estos organismos. En cambio, la humedad y sombra características del sotobosque de la selva, favorecen la presencia y actividad de microorganismos patógenos y herbívoros (Augspurger, 1984; Benítez-Malvido y Martínez-Ramos, 2003), por lo que las plántulas presentes en ésta, están siendo más atacadas. En el caso de los herbívoros, probablemente los cambios ambientales, así como el aislamiento de los fragmentos reducen la diversidad y abundancia de insectos herbívoros, y pueden alterar su conducta de dispersión, por lo que se encontró un menor ataque por parte de éstos en las plántulas transplantadas a los fragmentos de Cerro Borrego y Cola de Pescado.

En un estudio similar sobre herbivorismo en plántulas de árboles tropicales en la selva fragmentada del Amazonas, también se encontró que el herbivorismo fue mayor en la selva continua que en fragmentos probablemente por el cambio en las condiciones ambientales y el distanciamiento entre fragmentos y el hábitat continuo (Benitez-Malvido, 1995), afectando el desempeño de los insectos herbívoros.

En el caso del ataque por patógenos, se encontró que las plántulas de *N. ambigens* son atacadas por varios agentes patogénicos. Hongos que causan manchas foliares (García-Guzmán y Dirzo, 2001), patógenos que provocan defoliación total y

muerte de las plántulas, y otros que causan cáncer en los tallos (G. García-Guzmán, com. pers.). En este estudio se llevó a cabo el aislamiento de hongos y oomicetos a partir de plántulas que presentaban síntomas de defoliación y marchitamiento. Sin embargo, no se llevaron a cabo pruebas de patogenicidad que permitieran corroborar que los microorganismos aislados fueran los agentes causales de los daños observados. Entre los microorganismos aislados se encontró al oomiceto *Phytophthora cinnamomi* que es reconocido por atacar a un gran número de especies en sistemas forestales y agrícolas y causan ahogamiento (damping-off) en plántulas (Agrios, 1997). Este tipo de daño y muerte en las plántulas sí fue observado en las plántulas del experimento, sin embargo, el daño no fue frecuente. Los niveles de ataque por herbívoros fueron generalmente bajos, aunque algunas hojas si eran consumidas casi en su totalidad. En general, a pesar de la presencia de patógenos y herbívoros, el área dañada por plántula no fue muy grande, la mayoría de las hojas presentaron un área menor del 5% dañada. Incluso, García-Guzmán y Dirzo (2001) reportaron que el nivel de área foliar dañada por estos organismos en plantas representativas del sotobosque de la selva de Los Tuxtlas es bajo (menor al 12%).

En un estudio previo con esta especie (García-Guzmán y Dirzo, 2001) se encontró una asociación del ataque por herbívoros y de la infección por patógenos foliares. En este estudio se corroboraron esos resultados, es decir, se encontró que las plántulas que presentaron ataque por parte de herbívoros eran con mayor probabilidad atacadas por patógenos, ya que el daño producido por los herbívoros puede facilitar la infección de patógenos. Esto se encontró tanto en la selva continua como en los fragmentos.

Sistema de apareamiento

La alta tasa de entrecruzamiento obtenida para *N. ambigens* indica que la fragmentación no ha afectado la diversidad genética o incremento de la endogamia en esta especie.

La tasa de entrecruzamiento de las progenies tanto de árboles de selva continua como de fragmentos de *N. ambigens*, es comparable a las reportadas para varias especies de árboles tropicales (Gibson *et al.*, 1996; Nason y Hamrick, 1997; James *et al.*, 1998; Lee, 2000; Fuchs *et al.*, 2003) Posiblemente, *N. ambigens* sea una especie auto-incompatible obligada ya que los valores de las tasas de entrecruzamiento fueron elevados en ambos sitios. Sin embargo, sería necesario hacer un estudio más grande y con progenies de varios fragmentos de distintos tamaños para corroborar los resultados encontrados en este estudio. A pesar de esto, la alta tasa de entrecruzamiento encontrada en los árboles de fragmentos puede estar indicando que aún en condiciones de aislamiento, los árboles de *N. ambigens* tienen contacto suficiente con otros individuos para mantener una alta variación genética.

Actualmente existen resultados contrastantes sobre los efectos de la fragmentación del hábitat en la estructura genética de los árboles tropicales. La teoría predice que para especies tropicales, la reducción del hábitat y de la densidad poblacional, provocará que las poblaciones aisladas sufran efectos genéticos asociados a la reducción del tamaño poblacional, tales como procesos asociados a deriva génica y endogamia. Asimismo, la fragmentación del hábitat y la tala de árboles, incrementan el aislamiento entre los parches e individuos reduciendo el flujo de genes entre éstos (Lowe *et al.*, 2005). Jump y Peñuelas (2006) llevaron a cabo una revisión de varios estudios sobre los efectos de la fragmentación del hábitat en especies de árboles tropicales, y encontraron que pocos estudios apoyan las predicciones teóricas de la fragmentación, lo que lleva a pensar que los árboles, en particular los que son

polinizados por viento, son resistentes a los efectos de la fragmentación y no son tan vulnerables a cambios ambientales. Sin embargo, estos mismos autores demostraron en su estudio que la fragmentación ha llevado a cuellos de botella y a la interrupción de procesos reproductivos en el árbol *Fagus sylvatica*, provocando niveles significativamente elevados de endogamia, divergencia poblacional y diversidad genética reducida entre poblaciones de esta especie, cuyo principal vector de polinización es el viento, sufriendo un impacto negativo en su estructura genética.

Asimismo, Lowe *et al.* (2005) hicieron una revisión de estudios sobre los efectos de la fragmentación en 23 especies de árboles tropicales pero sólo encontraron efectos limitados en árboles adultos de cinco especies. Sin embargo, estudios con plántulas establecidas después del evento de fragmentación han mostrado patrones alterados de flujo génico en poblaciones remanentes (ver revisión en Jump y Peñuelas, 2006), indicando que la fragmentación puede afectar la estructura genética de las poblaciones adultas futuras.

En el presente estudio no se encontraron efectos de la fragmentación sobre el sistema de apareamiento de *N. ambigens*; es decir, no se encontraron diferencias entre hábitats en las tasas de entrecruzamiento. Sin embargo, se encontró que es una especie que se entrecruza predominantemente y probablemente sea auto-incompatible, lo que puede comprometer su mantenimiento si las selvas siguen fragmentándose y aislándose cada vez más. No se sabe mucho sobre el vector de polinización en esta especie, sin embargo se cree que es polinizada por abejas (Dirzo *et al.*, 1997b) y no por viento, lo que puede comprometer aún más su estabilidad si la fragmentación altera la actividad, abundancia o comportamiento de los polinizadores.

Probablemente, la alta tasa de entrecruzamiento encontrada en la progenie de árboles de *N. ambigens* en los fragmentos pueda deberse a que esta especie aún se

encuentra bien representada en la región de Los Tuxtlas. Otra posibilidad es que los árboles al tener tiempos generacionales grandes, puedan responder lentamente a los efectos de la fragmentación, sin embargo en generaciones sucesivas la variación genética dentro de los fragmentos disminuirá y la variación entre éstos aumentará por deriva génica, lo que podría llevar a extinción de las poblaciones en los fragmentos representando la pérdida de variación genética a nivel de especie (Laurance y Bierregaard, 1997).

Los valores de heterocigosis (H) encontrados en este estudio para la progenie de *N. ambigens* en la selva continua y en los fragmentos, son altos comparados con los valores promedios obtenidos por Hamrick y Godt (1996) para especies dicotiledóneas, de amplia distribución, de entrecruzamiento predominantemente y que dispersan sus semillas por gravedad, como la especie estudiada. Esto sugiere que la fragmentación del hábitat no ha disminuido la variación genética de la especie en esta región, ya que tampoco se encontraron diferencias significativas entre la heterocigosis de las progenies de árboles de selva continua y de fragmentos.

Conservación

Actualmente las selvas tropicales en México se encuentran representadas en su mayoría por remanentes, y éstos constituyen la única posibilidad para conservar este ecosistema. La conservación de la selva en la región de Los Tuxtlas es de gran importancia, ya que por su posición latitudinal, convergen allí muchas especies de origen tropical, de origen templado y endémicas (Dirzo *et al.*, 1997).

Conocer sobre los procesos de germinación y establecimiento de plántulas no sólo es importante para entender otros procesos como el reclutamiento y la sucesión de plantas, sino que también es importante para la conservación y el manejo exitosos, y

lograr introducir, re-introducir y aumentar las poblaciones de especies en planes de restauración (Khurana y Singh, 2001).

Las especies más vulnerables a sufrir reducciones poblacionales por presiones de tala y fragmentación son aquellas con baja habilidad de regeneración en áreas con disturbios humanos (Tabarelli *et al.*, 2004). El establecimiento de plántulas es de crucial importancia en los procesos de regeneración natural (Souza y Válio, 2001); en este estudio, *Nectandra ambigens* mostró ser una especie resistente a los efectos de la fragmentación; el hecho de que el vigor de las plántulas de *N. ambigens* fuera mayor en los fragmentos y que el ataque por organismos tales como patógenos y herbívoros fuera menor en las plántulas de los fragmentos, hacen de este árbol una especie con altas probabilidades de sobrevivir y establecerse en fragmentos de selva, y por tanto, una especie para tomar en cuenta en programas de restauración y regeneración en la zona de Los Tuxtlas, siempre y cuando los sitios perturbados que se quieran restaurar aún conserven dosel, ya que en zonas totalmente abiertas como son los pastizales, la alta incidencia de luz y la falta de humedad seguramente no permitirían la supervivencia de plántulas de esta especie.

Actualmente es incierto si los árboles presentes en los fragmentos mantienen niveles funcionales de conectividad genética con el paisaje circundante (Laurance y Bierregaard, 1997). Sin embargo, es importante tomar en cuenta el sistema de apareamiento de las plantas para proponer programas de manejo. *N. ambigens* es una especie arbórea con alta tasa de entrecruzamiento, por lo que en teoría, se necesitaría que las poblaciones de estos árboles tengan un número viable de individuos para que exista intercambio de genes y se mantenga la variación genética. Es decir, la presencia de árboles tropicales podría disminuir a menos de que exista el suficiente movimiento de polen y semillas entre fragmentos.

Otro aspecto importante a considerar para la conservación de esta especie es el área de los fragmentos, ya que el área es una influencia importante en el número y composición de especies de árboles y la distancia entre éstos (Hill y Curran, 2003). Lo ideal sería conservar fragmentos con grandes áreas que soporten gran cantidad de árboles, o conservar varios fragmentos pequeños y cercanos que puedan actuar como puentes o “stepping stones” entre poblaciones de árboles. Los corredores de hábitat también podrían proveer “avenidas” para la dispersión de genes entre parches y contener individuos que contribuyan a las dinámicas locales de parches adjuntos. De manera similar, la matriz circundante puede contener árboles remanentes que actúen como focos importantes de depósito de semillas y de movimiento de polen y semillas a fragmentos cercanos (Laurance y Bierregaard, 1997). Sin embargo, dada la gran variabilidad de factores limitantes provocados por la fragmentación, es esencial identificar los factores limitantes específicos de la especie a estudiar y del lugar para poder diseñar planes de manejo eficaces (Holl, 1999). En este caso, las distancias entre los fragmentos analizados y la selva continua no fueron mayores a 4 km. Esta distancia podría no ser limitante para los vectores de polen, dándonos otra explicación para la alta tasa de entrecruzamiento entre progenies de fragmentos y otra consideración que tomar en cuenta al proponer planes de conservación.

Conclusiones

Dadas las altas tasas actuales de degradación y fragmentación de zonas tropicales, son de vital importancia las investigaciones sobre los efectos de la fragmentación en las especies tropicales (Young *et al.*, 1996).

En este estudio se encontró que la fragmentación del hábitat expone a las plántulas del árbol tropical *Nectandra ambigens* a un ambiente diferente al de la selva continua. Los cambios en las condiciones ambientales en el sotobosque de los fragmentos favorecen la supervivencia de plántulas de esta especie, al promover el crecimiento y al ser menos atacadas por microorganismos patógenos e insectos herbívoros. Todo esto sugiere a *N. ambigens* como una especie de árbol importante a considerar en planes de restauración y regeneración de sitios fragmentados, ya que además es una de las especies más abundantes en la región y representa un componente importante en la estructura de la selva de Los Tuxtlas.

Además, se encontró que *N. ambigens* es una especie con una alta tasa de entrecruzamiento, y hasta ahora, la fragmentación parece no tener un efecto en ésta, pero si la región sigue talándose y fragmentándose, la especie podría ser vulnerable a extinción local.

Esto me lleva a sugerir investigaciones que analicen las consecuencias tanto ecológicas como genéticas de la fragmentación a través de estudios experimentales, que ayuden a entender la respuesta de los organismos a la fragmentación del hábitat y a sugerir estrategias de manejo adecuadas para su conservación. La presencia de selva continua y de fragmentos en la región de Los Tuxtlas, hacen de este lugar un sistema ideal para evaluar los efectos de la fragmentación del hábitat.

Literatura citada

Agrios, G. N. 1997. Plant Pathology. 4^a edición. Academic Press, San Diego, California, EUA, 635 pp.

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

Augspurger, C. K. 1984. Seedling survival of tropical tree species: interactions of dispersal distance, light-gaps, and pathogens. *Ecology* 65: 1705-1712.

Aizen M. A. y Feinsinger, P. 1994. Forest fragmentation, pollination, and plant reproduction in a Chaco dry forest, Argentina. *Ecology* 75: 330–351.

Bawa, K. S. 1990. Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 399-422.

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

Benítez-Malvido, J. y Martínez-Ramos, M. 2003. Impact of forest fragmentation on understory plant species richness in Amazonia. *Conservation Biology* 17: 389-400.

Benítez-Malvido, J., García-Guzmán, G., Kossmann-Ferraz, I. 1999. Leaf-fungal incidence and herbivory on tree seedlings in tropical rainforest fragments: an experimental study. *Biological Conservation* 91: 143-150.

Benítez-Malvido, J. 1995. The ecology of seedlings in Central Amazonian forest fragments. Ph D. dissertation, University of Cambridge, Cambridge, UK.

Bonfil, C. 1998. The effects of seed size, cotyledon reserves, and herbivory on seedling survival and growth in *Quercus rugosa* and *Q. laurina* (Fagaceae). *American Journal of Botany* 85: 79-87.

Bongers, F., Popma, J., Meave del Castillo, J. y Carabias, J. 1988. Structure and floristic composition on the lowland rain forest of Los Tuxtlas, Mexico. *Vegetatio* 74: 55-80.

Bruna, E. M. 1999. Seed germination in rain forests fragments. *Nature* 402:139.

Burdon, J. J., Jarosz, A. M. y Kirby, G. C. 1989. Pattern and patchiness in plant-pathogen interactions – causes and consequence. *Annual Review of Ecology and Systematics* 20: 119-136.

Burke M. J.W. y Grime J.P. 1996. An experimental study of plant community invasibility. *Ecology* 77:776–790.

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

Chacoff, N. P., Morales, J. A. y Vaquera, M. del P. 2004. Efecto de la fragmentación sobre la aborción y depredación de semillas en el Chaco Serrano. *Biotropica* 36: 109-117.

Clark, D. y Clark, D. 1985. Seedling dynamics of a tropical tree: impacts of herbivory and meristem damage. *Ecology* 66: 1884-1892.

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

Córdova, B. 1985. Demografía de Árboles Tropicales. En: A. Gómez-Pompa y S. del Amo R. (editores) Investigaciones sobre la regeneración de selvas altas en Veracruz, México. Editorial Alhambra Mexicana, México D. F., vol II: 103-128.

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

de la Cruz, M. y Dirzo, R. 1987. A survey of the standing levels of herbivory in seedlings from a Mexican rain forest. *Biotropica* 19(2): 98-106.

del Amo R., S. 1985. Algunos aspectos de la influencia de la luz sobre el crecimiento de estados juveniles de especies primarias. En: A. Gómez-Pompa y S. del Amo R. (editores) Investigaciones sobre la regeneración de selvas altas en Veracruz, México. Editorial Alhambra Mexicana, México D. F., vol II: 79-91.

Dick, C. W., Etchelecu, G. y 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: 753-764.

Didham, R. K., Ghazoul, J., Store, N., Davis, A.J. 1996. Insects in fragmented forests: a functional approach. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 255-260.

Dirzo, R., González-Soriano, E. y Vogt, R. C. 1997. Introducción general. En: González, S. E., Dirzo, R. y Vogt, R. C. (eds.) Historia Natural de Los Tuxtlas. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. Págs. 3-6.

Dirzo, R., Ibarra-Manríquez, G. y Sánchez-Garduño, C. 1997 (b). *Nectandra ambigens*. En: González, S. E., Dirzo, R. y Vogt, R. C. (eds.) Historia Natural de Los Tuxtlas. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. Págs. 124-129.

Dobson, A. y Crawley, M. 1994. Pathogens and the structure of plant communities. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 393-398.

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

Estrada, A., Coates-Estrada, R., Meritt, D., Montiel, S. y Curiel, D. 1993. Patterns of frugivore species richness and abundance in forest islands and in agricultural habitats at Los Tuxtlas, Mexico. *Vegetatio* 107/108: 245-257.

Eubanks, M. D., Carr, D. E. y Murphy, J. F. 2005. Variation in the response of *Mimulus guttatus* (Scrophulariaceae) to herbivore and virus attack. *Evolutionary Ecology* 19: 15-27.

Ferreira, L. V. y Laurance, W. F. 1997. Effects of forest fragmentation on mortality and damage of selected trees in Central Amazonia. *Conservation Biology* 11: 797-801.

Foster, S. A. y Janson, C. H. 1985. The relationship between seed size and establishment conditions in tropical woody plants. *Ecology* 66: 773-780.

Fuchs, E. J., Lobo, J. A. y 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: 149-157.

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

García-Guzmán, G., Dirzo, R. 2001. Patterns of leaf-pathogen infection in the understory of a Mexican rain forest: incidence, spatiotemporal variation, and mechanisms of infection. *American Journal of Botany* 88: 634-645.

García-Guzmán, G. y Dirzo, R. 2004. Incidence of leaf pathogens in the canopy of a Mexican tropical wet forest. *Plant Ecology* 172: 41-50.

García-Guzmán, G. y Dirzo, R. 2006. Influence of plant abundance on disease incidence in a Mexican tropical forest. *Ecoscience* 13: 523-530.

García-Guzmán, G. 1990. Estudio sobre ecología de patógenos en el follaje de plantas en la selva de Los Tuxtlas. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.

Gibson, J. P. y Wheelwright, N. T. 1996. Mating system dynamics of *Ocotea tenera* (Lauraceae), a gynodioecious tropical tree. *American Journal of Botany* 83: 890-894.

Gilbert, G. S. 2002. Evolutionary ecology of plant diseases in natural ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* 40: 13-43.

Guevara S., J. Laborde y G. Sánchez-Ríos. 2004. Los Tuxtlas. El Paisaje de la Sierra. Instituto de Ecología, A.C. Unión Europea. Xalapa, Ver., 288 pp.

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

Hall, P., Walker, S. y Bawa, K. 1996. Effect of forest fragmentation on genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Pithecellobium elegans*. *Conservation Biology* 10: 757-768.

Hamilton, M. B. 1999. Tropical tree gene flow and seed dispersal. *Nature* 401: 129-130.

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

Harper, J. L. 1980. Plant demography and ecological theory. *Journal of Ecology* 555: 247-270.

Henríquez C. A. 2004. Efecto de la fragmentación del hábitat sobre la calidad de las semillas en *Lagaperia rosea*. *Revista Chilena de Historia Natural* 77: 177-184.

Hill, J. L. y Curran, P. J. 2003. Area, shape and isolation of tropical forest fragments: effects on tree species diversity and implications for conservation. *Journal of Biogeography* 30: 1391-1403.

Holl, K. D. 1999. Factors limiting tropical rain forest regeneration in abandoned pasture: seed rain, seed germination, microclimate and soil. *Biotropica* 31: 229-242.

Howe, H. F. 1990. Survival and growth of juvenile *Virola surinamensis* in Panamá: effects of herbivory and canopy closure. *Journal of Tropical Ecology* 6: 259-280.

Ibarra-Márquez, G., Ricker, M., Angeles, G., Sinaca-Colin, S. y Sinaca-Colin, M.A. 1997. Useful plant of the Los Tuxtlas Rain Forest (Veracruz, México): consideration of their market potential. *Economic Botany* 51: 362-376.

James, T., Vege, S., Aldrich, P. y Hamrick, J. L. 1998. Mating systems of three tropical dry forest tree species. *Biotropica* 30: 587-594.

Jump, A. S. y Peñuelas, J. 2006. Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 8096-8100.

Kareiva, P. 1987. Habitat fragmentation and the stability of predator-prey interactions. *Nature* 326: 388-390.

Khurana, E. y Singh, J. S. 2004. Germination and seedling growth of five tree species from tropical dry forest in relation to water stress: impact of seed size. *Journal of Tropical Ecology* 20: 385-396.

Khurana, E. y Singh, J. S. 2001. Ecology of seed and seedling growth for conservation and restoration of tropical dry forest: a review. *Environmental Conservation* 28: 39-52.

Kitajima, K. y Fenner, M. 2000. Ecology of seedling regeneration in: Fenner, M. (ed.), *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*, 2a. edición Pakeman, R. J. CABI Publishing. Wallingford, Reino Unido. 410 pp.

Kitajima, K. y Augspurger, C. K. 1989. Seed and seedling ecology of a monocarpic tropical tree, *Tachigalia versicolor*. *Ecology* 70: 1102-1114.

Laurance W. F. 1991. Edge effects in tropical forest fragments: Application of a model for the desing of Nature Reserves. *Biological Conservation*. 57: 205-199.

Laurance, W. F. y Bierregaard, R. O. (eds.) 1997. Tropical forest remnants. Ecology, management, and conservation of fragmented communities. The University of Chicago Press, Chicago, EUA. 6321 pp.

Laurance, W., Ferreira, L., Rankin de Merona, J. y Laurance, S. 1998. Rain forest fragmentation and the dynamics of Amazonian tree communities. *Ecology* 79: 2032-2040.

Lawrence, D. 2003. The response of tropical tree seedlings to nutrient supply: meta-analysis for understanding a changing tropical landscape. *Journal of Tropical Ecology* 19: 239-250.

Lawrence, M. J. 1984. The genetical analysis of ecological traits. En: Shorrocks, B. (editor) *Evolutionary Ecology*. Blackwell Scientific Publication, Oxford. 418 pp.

Lee, S. L. 2000. Mating system parameters of *Dryobalanops aromatica* Gaertn. f. (Dipterocarpaceae) in three different forest types and a seed orchard. *Heredity* 85: 338-345.

Leishman, M. R., y Westoby, M. 1994. The role of large seed mass in shaded conditions: experimental evidence. *Functional Ecology* 8:205-214.

Loveless, M. D. y Hamrick, J. L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15: 65-95.

Lowe, A. J., Boshier, D., Ward, M., Bacles, C. F. E. y Navarro, C. 2005. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity* 95: 255-273.

Lowe, A., Harris, S. y Ashton P. 2004. *Ecological genetics: design, analysis and application*. Blackwell Publishing. Oxford, Reino Unido. 344 pp.

Makholela, T., van der Bank, H. y Balkwill, K. 2003. A preliminary study of allozyme variation in three rare and restricted endemic *Barleria greenii* (Acanthaceae) populations. *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 141-154.

Martínez-Ramos, M. 1994. Regeneración natural y diversidad de especies arbóreas en selvas húmedas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 54: 179-224.

Martínez-Ramos, M. 1985. Claros, ciclos vitales de los árboles tropicales y regeneración natural de las selvas altas perennifolias En: A. Gómez-Pompa y S. del Amo R. (editores) Investigaciones sobre la regeneración de selvas altas en Veracruz, México. Editorial Alhambra Mexicana, México D. F., vol II: 191-239.

Miller, M. P. 1997. Tools for population genetic analices (TFPGA) 1.3: A Windows program for the análisis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.

Molofsky, J. y Fisher, B. L. 1993. Habitat and predation effects on seedling survival and growth in shade-tolerant tropical trees. *Ecology* 74: 261-265.

Murawski, D. A., Gunatilleke, I. A. U. N. y Bawa, K. S. 1994. The effect of selective logging on inbreeding in *Shorea megistophylla* (Dipterocarpaceae) from Sri Lanka. *Conservation Biology* 8: 997-1002.

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

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

O'Hanlon-Manners, D. L. y Kotanen, P. M. 2004. Evidence that fungal pathogens inhibit recruitment of a shade-intolerant tree, white birch (*Betula papyrifera*), in understory habitats. *Oecologia* 140: 650-653.

Osunkoya, O. O., Ash, J. E., Graham, A. W. y Hopkins, M. S. 1993. Growth of tree seedlings in tropical rain forests of North Queensland, Australia. *Journal of Tropical Ecology* 9: 1-18.

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

Pennington, T. D. y Sarukhán, J. 1998. Árboles tropicales de México. Manual para la identificación de las principales especies. 2ª edición, Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo de Cultura Económica, México, D. F.

Pérez, N. y Piñero, D. 1997. Isoenzimas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 77-84.

Piñero, D., Sarukhán, J. y González, E. 1977. Estudios demográficos en plantas. *Astrocaryum mexicanum* Liebm. 1. Estructura de las poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 37: 69-118.

Quinn, G. P. y Keough, M. J. 2002. *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido. 537 pp.

Ritland, K. 2002. Extensions of models for the estimations of mating systems using n independent loci. *Heredity* 88: 221-228.

Ruiz G., B. 2003. Impacto de la fragmentación sobre los factores del ambiente físico y los patrones de herbivoría en plantas de la selva de los Tuxtlas, Veracruz. Tesis Profesional, Biología, Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F.

SAS Institute. 2004. *JMP. Statistics and Graphics Guide*, version 5.1. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina

Sánchez C., M. 1995. Ecología de la depredación y dispersión en semillas de *Nectandra ambigens* en Los Tuxtlas. Tesis Profesional, Biología, Facultad de Ciencias. UNAM. México, D. F.

Saunders, D. A., Hobbs, R. J. y Margules, C. R. 1991. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conservation Biology* 5: 18-32.

Saverimuttu, T. y Westoby, M. 1996. Seedling longevity under deep shade in relation to seed size. *Journal of Ecology* 84: 681-689.

Scariot, A. 2000. Seedling mortality by litterfall in Amazonian forest fragments. *Biotropica* 32(4a):662-669.

Soto, M. y Gama, L. 1997. Climas. En: González-Soriano, E., Dirzo, R. y Vogt, R. Eds. *Historia Natural de Los Tuxtlas*. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. Pp 7-23

Souza, R. P. y Válio, I. F. M. 2001. Seed size, seed germination and seedling survival of Brazilian tropical tree species differing in successional status. *Biotropica* 33: 447-457.

Steffan-Dewenter, I. y Tschkarntke, T. 1999. Effects of habitat isolation on pollinator communities and seed set. *Oecología*. 121:432-440.

Stuber, C. W., Wendel, J. F., Goodman, M. M. y Smith, J. S. C. 1988. Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). Technical Bulletin No. 286. North Carolina State University. Raleigh, North Carolina. 87 pp.

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

Turner, I. M. 2001. *The ecology of trees in the tropical rain forest*. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido. 298 pp.

Vaartaja, O. 1962. The relationship of fungi to survival of shaded tree seedlings. *Ecology* 43: 547-549.

Vittinghoff, E., Glidden, D. V., Shiboski, S. C. y McCulloch, C. E. 2005. Regression methods in biostatistics. Linear, logistic, survival, and repeated measures models. Springer, Berlín. 340 pp.

Westoby, M., Leishman, M. y Lord, J. 1996. Comparative ecology of seed size and dispersal. *Philosophic Trans. R. Soc. Lond. B.* 351:1309–1318

Whitmore, T. C. 1998. Potential impact of climatic change on tropical rain forest seedlings and forest regeneration. *Climatic Change* 39: 429-438.

Young, A., Boyle, T. y Brown, T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 413-418.

Young, T. P. 2000. Restoration ecology and conservation biology. *Biological Conservation* 92: 73-83.

APÉNDICE I

Electroforesis de isoenzimas

La electroforesis en gel de almidón tiene cuatro pasos fundamentales: 1) la extracción proteica, 2) la separación de las proteínas, 3) la tinción y 4) la interpretación de los geles.

La extracción de proteínas se realiza macerando tejido vegetal con nitrógeno líquido. Posteriormente se agrega un buffer de extracción, el cual evita que las enzimas liberadas de los compartimientos celulares sean inactivadas por metabolitos secundarios. Los extractos obtenidos de cada individuo son absorbidos en tiras de papel filtro (wicks) y almacenados en tubos *Eppendorf* dentro de un ultracongelador hasta su posterior uso. Previo a la separación de las proteínas se prepara el gel de almidón con el buffer especificado para el sistema de corrimiento que se va a utilizar. Los geles al 12 % peso/volumen se preparan utilizando 60 g de almidón, 10 de sacarosa que se aforan a 500mL con el buffer del gel. La mezcla se agita constantemente sobre fuego hasta que hierva. Posteriormente, mediante una bomba de vacío se extrae el aire y el líquido se vacía en un molde previamente armado y se deja enfriar.

La separación de las enzimas tiene lugar una vez que los extractos (en los wicks) son “cargados” en el gel, el cual es colocado en una charola con el buffer apropiado y sometido a un amperaje/voltaje específico durante un tiempo determinado según el sistema que se utilice.

Después se realiza la tinción, para ello es necesario cortar el gel en rebanadas de aproximadamente 2 mm de grosor. Cada rebanada es sumergida en una solución que contiene un sustrato específico y los cofactores necesarios, para que una única enzima lleve a cabo su reacción y se haga visible. Los geles se dejan reposar (en la mayoría de los casos) y posteriormente se interpretan.

Buffers de extracción

Buffer de extracción para *Abies*

¾ de buffer YO y ¼ de buffer VEG II

Buffer YO (Yeh y O'Malley, 1980)

10 ml de solución Tris-ácido cítrico:

1.57 g Trizma base, 0.83 g de ácido cítrico

Aforar a 100ml con H₂O destilada

Ajustar pH a 7

0.05 g de NADP

0.05 g de NAD

0.018 g de ácido ascórbico

0.034 g d EDTA

0.1 g de albúmina sérica bovina

0.33 ml de 2-Mercaptoentanol

Aforar a 100 ml con H₂O destilada

Buffer VEG II (Cheliak y Pitel, 1984)

0.31 g de ácido bórico

2 ml de tergitol 15-S-9

2 g de PEG 8000

7 g de PVP 40

1 g de PVP 360

0.88 g de ácido ascórbico

0.02 g de NAD

0.1 g de albúmina sérica bovina

0.005 g de pyridoxal 5 fosfato

0.27 g de sacarosa

0.19 g de cisterna-HCl

0.66 ml de 2-Mercaptoetanol

Aforar a 100 ml con H₂O destilada

Ajustar el pH a 7.1 con NaOH

Sistemas de corrimiento

Sistema D Maíz (Stuber et al., 1988)

Buffer del electrodo (pH 6.5)	
0.065 M Histidina (H8000)	10.088 g
0.007 M Ácido cítrico (monohidratado)	1.5 g

Ajustar el pH a 6.5
Aforar a 1000 ml con H₂O destilada

Buffer del gel
1 parte de buffer del electrodo
3 partes de H₂O destilada

Correr a 30 mA, 7 horas.

Sistema Poulik (Hakim-Elahi, 1976)

Buffer del electrodo (pH 8.6)	
Ácido bórico	18.55 g
NaOH	4 g

Ajustar el pH con 1M Ácido bórico o 1M NaOH
Aforar a 1000 ml con H₂O destilada

Buffer del gel (pH 8.1)	
Ácido cítrico (monohidratado)	0.63 g
Sigma 7-9	2 g

Ajustar el pH con 4 M Ácido cítrico
Aforar a 1000 ml con H₂O destilada

Correr a 60 mA de 4-5 horas.

Enzimas utilizadas

MDH (malato deshidrogenada, E.C.1.1.1.37) (Vallejos, 1983)

Pesar:	
B-NAP (DPN)	8 mg
NBT	8 mg
NaCN	25 mg
Añadir:	
0.2 M Tris-HCl pH 8	50 ml
1M DL-Malato pH 7.8	5 ml
PMS 1%	0.1 ml

Incubar en oscuridad a temperatura ambiente.

APX (Peroxidasa anódica, E.C.1.11.1.7) (Hakim-Elahi, 1978)

Pesar:

3-Amini-9-Ethylcarbazole 50 mg

Añadir:

Dimetilformamida 3.5 ml

H₂O destilada 45 ml

Peróxido de Hidrógeno 3% 0.5 ml

Cloruro de calcio 1% 1 ml

1 M Acetato de sodio pH5 2.5 ml

Incubar en oscuridad a temperatura ambiente.

CPX (Peroxidasa catódica, E.C.1.11.1.7) (Hakim-Elahi, 1978)

Pesar:

3-Amini-9-Ethylcarbazole 50 mg

Añadir:

Dimetilformamida 3.5 ml

H₂O destilada 45 ml

Peróxido de Hidrógeno 3% 0.5 ml

Cloruro de calcio 1% 1 ml

1 M Acetato de sodio pH 5 2.5 ml

Incubar en oscuridad a temperatura ambiente.

ACPH (Fosfatasa ácida, E.C.3.1.3.2) (Hakim-Elahi, 1976)

Pesar:

Fast Garnet GBC SALT 75 mg

Añadir:

1 M Acetato de sodio pH 5 4 ml

H₂O destilada 40 ml

MgCl₂ 10% 1 ml

α -naphthyl acid phosphate (sodium salt) 1% 2 ml

Incubar en oscuridad a temperatura ambiente.

EST (Esterasa, E.C.3.1.1.1) (Hakim-Elahi, 1976)

Pesar:

Fast Blue BB SALT 75 mg

Añadir:

Acetato de α -naftilo 1% 3 ml

H₂O destilada 45 ml

Buffer de fosfatos pH 6 5 ml

Incubar en oscuridad a temperatura ambiente.

APÉNDICE II

Aislamiento e identificación de los posibles agentes causales de marchitez de las plántulas

Se realizó un análisis microbiológico en los laboratorios del Área de Microbiología del Colegio de Postgraduados con sede en Montecillo, México, a cargo de la M. en C. María Encarnación Lara Hernández y el Dr. Ronald Ferrera-Cerrato, utilizando material vegetativo (plántulas de *Nectandra ambigens* procedentes de la selva de Los Tuxtlas, Veracruz, que mostraran síntomas de marchitamiento).

Se analizaron 26 plántulas que mostraron marchitez parcial o total. La raíz y cuello de las plantas fueron cortados en trozos de 0.5 cm, que previa desinfección con hipoclorito de sodio al 1 % y perfecto secado, fueron sembrados en cajas de Petri con medio papa dextrosa agar (PDA) y V8. En cada caja se dispusieron de cinco a siete trozos de tejido.

Una vez manifestado el crecimiento micelial, éste fue transferido a nuevas cajas de Petri para su purificación. Las cepas de crecimiento puro fueron analizadas microscópicamente, poniendo especial interés a las que presentaron características típicas de organismos patógenos, y se identificaron.