



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

ÉXITO REPRODUCTIVO Y
ESTRUCUTRA GENÉTICA DE *Carica
papaya* EN LA SELVA FRAGMENTADA
DE LOS TUXTLAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

P R E S E N T A

MARIANA CHÁVEZ PESQUEIRA

DIRECTOR DE TESIS: DR. JUAN NÚÑEZ FARFÁN

MÉXICO, D.F.

ENERO, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

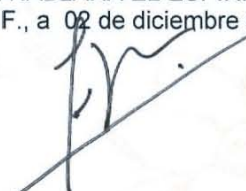
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de octubre de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** de la alumna **CHÁVEZ PESQUEIRA MARIANA** con número de cuenta **402116440** con la tesis titulada "**ÉXITO REPRODUCTIVO Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE CARICA PAPAYA EN LA SELVA FRAGMENTADA DE LOS TUXTLAS.**", realizada bajo la dirección del : **DR. JUAN NÚÑEZ FARFÁN**

Presidente: DR. MIGUEL MARTÍNEZ RAMOS
Vocal: DR. JUAN ENRIQUE FORNONI AGNELLI
Secretario: DR. JUAN NÚÑEZ FARFÁN
Suplente: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU
Suplente: DR. MAURICIO QUESADA AVENDAÑO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 02 de diciembre de 2009.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

Agradecimientos

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por la formación de gran calidad que recibí durante la maestría.

Este trabajo fue posible gracias al financiamiento del proyecto PAPIIT IN-224908 "Efecto de la fragmentación de la selva de Los Tuxtlas en la estructura genética de especies con diferentes historias de vida", así como al apoyo de la beca de maestría otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CoNaCyT) y a la beca del programa de fomento a la graduación otorgada por la Coordinación de Estudios de Posgrado (CEP) de la UNAM.

También agradezco a los miembros del comité tutorial por todo su apoyo y disposición para que se realizara esta tesis: Dr. Juan Núñez Farfán, Dr. Miguel Martínez Ramos y Dr. Mauricio Quesada Avendaño

Más agradecimientos...

Le agradezco muchísimo al Dr. Juan Núñez por todo su apoyo para que esta tesis se pudiera realizar (¡hasta por bajar las papayas más altas!). Siempre aprendo mucho estando contigo Juan, gracias.

A los miembros del comité, los Drs. Mauricio Quesada y Miguel Martínez por todos sus comentarios y sugerencias en los tutorales para mejorar la tesis y por su paciencia para hacer todos los trámites y papeleos a larga distancia.

Al Dr. Juan Fornoni, Dr. Daniel Piñero y la Dra. Graciela García, miembros del jurado, también les agradezco mucho sus correcciones y comentarios.

A todos los integrantes del laboratorio de Genética Ecológica y Evolución. A Rosalinda por toda su ayuda en el laboratorio y en cualquier cosa, ¡muchas gracias Rose! A Pili por compartir todo el estrés de la maestría y las materias y las salidas a Los Tuxtlas, y claro su amistad. A las chicas del cubi, Vania y Lilo por hacer más agradable las horas y horas metidas ahí. A Memo por su amistad y sus visitas que me hacen reír mucho. A Edson e Iván por su ayuda con las dudas genéticas y estadísticas. A Buches, Eunice, Gorch, Rafa, Yonatón, Etzel, LauLo, Elsa, Alfred, Armando por compartir la vida en el instituto y por su ayuda en el lab. y en las salidas a Los Tuxtlas a buscar papayas. ¡Muchas gracias a todos!

A Lupita que me enseñó todo sobre los micros y que me ayudo siempre que tenía dudas con la genética. De verdad ¡mil gracias y perdona tanta lata que te di! Aprendí mucho gracias a ti.

A mi familia, muchas gracias por toda su paciencia y apoyo para hacer mi maestría, sobre todo a mi madre que me aguanta todo. Te quiero ma.

A mis amigos. A Bere e Ile por estar ahí siempre y por ayudarme a contar semillas apestosas de papaya. A Brenda por ser una gran amiga desde hace tanto. A Eugenio, Fer, Dani, Irene, Carlitos que hacen más divertido el instituto. Y a todos los amigos que siempre andan por ahí alegrando momentos.

A Diego por hacer de los últimos meses, tiempos más felices. Quierote.

Finalmente agradezco a todos en la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas por su apoyo y amabilidad.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Predicciones	10
Material y método	11
Sistema de estudio	11
Especie de estudio	12
Muestreo	14
Análisis genéticos	14
Análisis de datos	17
Resultados	23
Éxito reproductivo	23
Diversidad y estructura genética	24
Distribución de sexos y tamaño efectivo de la población	28
Discusión	32
Éxito reproductivo	32
Diversidad y estructura genética	34
Tamaño efectivo de la población	40
Perspectivas	43
Conclusión	45
Literatura citada	46
Apéndice I	52
Apéndice II	54
Apéndice III	55

Resumen

La dispersión es un proceso que afecta la dinámica y evolución de las poblaciones naturales. En las últimas décadas la fragmentación del hábitat ha limitado los procesos de dispersión natural al interrumpir las interacciones de las plantas con sus polinizadores y dispersores. Esto puede reflejarse en cambios en el éxito reproductivo y estructura genética de las plantas, sobretodo en las especies dioicas, ya que dependen de agentes bióticos para la dispersión de su material genético. En este estudio se evaluó el efecto de la fragmentación del hábitat en el éxito reproductivo y la estructura genética de *Carica papaya*, una especie dioica que regenera en claros y que depende de animales para su polinización y dispersión de semillas. Se estudió la producción y capacidad germinativa de semillas tanto de poblaciones de hábitat fragmentado como continuo. Por otro lado, se utilizaron microsatélites de ADN como marcadores moleculares para determinar los niveles y patrones de diversidad y estructura genética de poblaciones fragmentadas y continuas de *C. papaya*, así como modificaciones en el tamaño efectivo de la población por cambios en la proporción de sexos entre hábitats. Los resultados revelaron un efecto negativo de la fragmentación del hábitat sobre el porcentaje de germinación, la diversidad genética y el tamaño efectivo. Estos resultados indican que la fragmentación del hábitat está alterando el sistema de apareamiento e incrementando la endogamia, poniendo en peligro la persistencia de poblaciones de esta especie en ambientes fragmentados.

Abstract

Dispersion is an important process for the dynamic and evolution of natural populations. In the last decades, habitat fragmentation has limited the process of natural dispersion by interrupting the interactions between plants and their pollinators and dispersers. This may reflect in changes in the reproductive success and genetic structure of plants, mainly in dioecious species which depend on biotic agents for the dispersion of their genetic material. In this study, we evaluated the effect of habitat fragmentation in the reproductive success and genetic structure of *Carica papaya*, a dioecious species that regenerates only in forest gaps and depends upon animals to achieve pollination and seed dispersion. We studied the seed production and germination capability of plants growing in continuous or fragmented populations. We used DNA microsatellites as molecular markers to assess genetic diversity and structure, as well as the sex ratio effect in the effective size of eight populations of this species in the continuous forest and in fragments of Los Tuxtlas rainforest. Our results indicate a negative effect of habitat fragmentation in the germination percentage, genetic diversity and effective size. These results suggest that habitat fragmentation is modifying the mating system and increasing inbreeding, threatening the persistence of *C. papaya*'s populations in fragmented forests.

Introducción

La biodiversidad a nivel global está siendo amenazada por varios procesos inducidos por el hombre. En particular, las selvas tropicales están sujetas a una cantidad de presiones y degradación que ha ido en aumento en los últimos años (Whitmore 1997, Trakhtenbrot *et al.* 2005). La acelerada deforestación en estos ecosistemas ha ocasionado una rápida pérdida y fragmentación de las selvas alrededor del mundo (Arroyo-Rodríguez y Mandujano 2006), ocasionando la aparición de paisajes con mosaicos de áreas despejadas de vegetación nativa y de fragmentos de selva.

En México se estima que entre el 80 y 90% de las selvas tropicales han sido taladas o severamente alteradas por diversas actividades productivas entre las que destaca la ganadería (Guevara *et al.* 2004). Esto ha provocado que las selvas se reduzcan y se transformen en una colección de fragmentos de varios tamaños y con diferentes historias de aislamiento (Estrada *et al.* 1993), los cuales se convierten en el único hábitat de las futuras poblaciones (Saunders *et al.* 1991, Hamilton 1999). La fragmentación de las selvas provoca cambios que interrumpen los procesos biológicos que originan y mantienen la biodiversidad y la dinámica del ecosistema (Didham *et al.* 1996), así como pérdidas en la diversidad y abundancia de especies, y reducciones en la conectividad entre las poblaciones (Estrada y Coates-Estrada 2001, Trakhtenbrot *et al.* 2005).

La inmovilidad de las plantas las convierte en organismos más vulnerables a los efectos de la fragmentación ya que conlleva a limitaciones decisivas en dos etapas críticas de su ciclo reproductivo: la reproducción sexual y la dispersión de su descendencia.

Ambos procesos requieren del movimiento de alguna estructura reproductiva (polen y/o semillas) a través del espacio, por lo que no sorprende que las plantas hayan desarrollado una gran variedad de mecanismos para utilizar a los animales como dispersores de polen y semillas (Price 2002). Sin embargo, la teoría sobre los efectos de la fragmentación del hábitat predice que los fragmentos de hábitat y la falta o disminución de la conectividad entre ellos, pueden alterar las interacciones que ocurren entre las plantas y los animales (Tscharntke y Brandl 2004, Hoffmeister *et al.* 2005, Knight *et al.* 2005). La modificación en la actividad de los polinizadores puede tener implicaciones importantes en el éxito reproductivo y en los sistemas de apareamiento de las plantas que polinizan (Quesada *et al.* 2004). La fragmentación del hábitat disminuye el número de insectos polinizadores y los niveles de polinización (Aizen y Feinsinger 1994), lo que puede reducir la cantidad y calidad de las semillas producidas y afectar negativamente la adecuación de las plantas, al reducir atributos como la viabilidad, el tamaño o la capacidad germinativa (Henríquez 2004). Es decir, los polinizadores son limitantes en el éxito reproductivo de las plantas y la fragmentación del hábitat afecta negativamente la producción de semillas de las poblaciones pequeñas y aisladas (Steffan-Dewenter y Tscharntke 1999), afectando también el potencial de dispersión por semillas.

Por otro lado, si en los fragmentos de selva se pierden animales que actúan como dispersores, se espera que disminuya el establecimiento de descendientes viables necesarios para que las plantas mantengan sus poblaciones (Cordeiro y Howe 2003). Aunado a esto, poblaciones con tamaños reducidos producen menos semillas y por lo tanto disminuye la probabilidad de que algunas de esas semillas se dispersen a grandes

distancias entre parches de hábitat (Soons 2003). Se ha reportado que el flujo génico, mediado por semillas, ha provocado diferenciación genética entre poblaciones adyacentes, indicando que los fragmentos intercambian semillas con menor frecuencia (Hamilton, 1999). Por otro lado, si los dispersores remueven menos frutos, las densidades de semillas y plántulas aumentan debajo de los padres e incrementa la probabilidad de una mortalidad denso dependiente de semillas y plántulas (Cordeiro y Howe 2003). Además, se ha reportado que semillas dispersadas de la selva continua hacia los fragmentos tienen menor probabilidad de germinar que aquellas dispersadas dentro de zonas continuas (Bruna 1999), comprometiendo la regeneración natural de los sitios fragmentados.

Si la fragmentación del hábitat lleva a interrupciones en las interacciones bióticas y a tamaños poblacionales reducidos, los fragmentos contendrán individuos que posiblemente muestren una variación genética baja y un parentesco alto. Un acervo genético poco diverso ocasiona una baja en las oportunidades de apareamiento en los individuos aislados en los fragmentos, lo que puede originar un incremento en la frecuencia de endogamia biparental (entrega de polen de individuos cercanos o emparentados), en la homocigosis de la población, así como una pérdida general de variación genética. Estos cambios tienen consecuencias que van desde fallas en la fertilización o aborción de semillas durante el desarrollo del fruto (Ghazoul y Mcleish 2001), hasta un incremento en el riesgo de expresar genes deletéreos (depresión endogámica) o incluso fijarlos en las poblaciones (Ellstrand y Elam 1993, Cousens *et al.* 2008). Incluso, aunque el polen se transfiera entre individuos, es probable que la progenie

sea más endógama en los fragmentos, a pesar de que los polinizadores sean abundantes y visiten frecuentemente a las plantas (Kennedy 2007). Bajo este escenario, los fragmentos se convertirán en poblaciones aisladas con un tamaño efectivo poblacional pequeño, lo cual incrementa su vulnerabilidad a procesos estocásticos demográficos y genéticos (Nason *et al.* 1998). Aunado a esto, algunas especies de plantas ocurren en poblaciones pequeñas y geográficamente restringidas, como el caso de especies pioneras o nómadas que sólo pueden establecerse en claros. Estas poblaciones están aún más amenazadas por la estocasticidad demográfica, genética y ambiental. Si la fragmentación del hábitat limita la dispersión a larga distancia o aumenta las distancias posibles para la dispersión, la supervivencia a largo plazo de este tipo de especies será amenazada a menos que la dispersión se reestablezca (Trakhtenbrot *et al.* 2005).

Es por todo esto que, en ambientes fragmentados resulta esencial que se mantenga un cierto nivel de conectividad genética para la supervivencia regional de las especies; primero porque evita la endogamia y la pérdida de variación genética, permitiendo a las poblaciones mantener su potencial adaptativo, y segundo porque es importante para la re-colonización de parches de hábitat en donde las poblaciones se han extinguido, en la colonización de nuevos hábitats y en la migración y extensión de rangos (Soons 2003, Trakhtenbrot *et al.* 2005). Especies que habiten sitios propensos a disturbios deben ser capaces de dispersarse y de recolonizar hábitats, o corren el riesgo de extinguirse (Primack y Miao 1992, Cousens *et al.* 2008). Especies con poca capacidad de dispersión o alta dependencia de otros organismos para dispersarse, serán más afectadas

por la fragmentación del hábitat, ya que disminuye su éxito de migración (Pearson y Dawson 2005) y pone en peligro su persistencia.

Además de la dependencia de las plantas a polinizadores y dispersores para mantener una conectividad genética entre poblaciones, el sistema de apareamiento también es importante al considerar los efectos de la fragmentación del hábitat en las plantas. Por ejemplo, los efectos pueden ser aún más severos para las plantas dioicas. Incluso, el dioicismo es considerado el sistema de apareamiento más sensible a la fragmentación (Murcia 1996). En las plantas dioicas, los individuos producen flores masculinas o flores femeninas por lo que es necesario que ambos sexos estén presentes en el mismo fragmento para que logren reproducirse, a menos de que haya el suficiente flujo de polen entre fragmentos. Si la fragmentación, además de cambiar la densidad de flores modifica la distribución espacial de individuos sexualmente compatibles, las oportunidades de apareamiento bajarán, amenazando la viabilidad a largo plazo de las poblaciones que habitan fragmentos (Murcia 1996, Dick *et al.* 2008).

Por otro lado, procesos de deriva génica asociados a la fragmentación del hábitat, pueden impactar en la adecuación de las poblaciones por medio de cambios en la proporción de sexos, ya que ésta afecta la densidad de parejas potenciales y por lo tanto los patrones espaciales de flujo génico (Byers *et al.* 2005). Si se modifica el movimiento de polen y semillas, se alteran el flujo génico y los patrones históricos de subdivisión genética (Hamilton 1999) con consecuencias en el nivel de endogamia y el mantenimiento de la diversidad genética de las poblaciones de plantas dioicas (Dick *et al.* 2008). Además, como en este tipo de plantas sólo las femeninas dispersan semillas y las masculinas sólo el

polen, los tamaños efectivos poblacionales pueden reducirse marcadamente si la proporción de sexos es diferente de uno (Dick *et al.* 2008). El tamaño efectivo de la población será la mitad que el de las plantas hermafroditas para la misma abundancia, lo que aumenta el riesgo de efectos severos dados por la fragmentación del hábitat (Dick 2008), cuando la interacción con los polinizadores es afectada negativamente. Bajos repentinos en los tamaños efectivos de las poblaciones ocasionados por la fragmentación del hábitat, tendrán un efecto negativo en la diversidad genética de las poblaciones de especies que se reproducen por entrecruzamiento estricto (Aguilar *et al.* 2008).

En síntesis, la dispersión de polen y de semillas es un proceso muy importante para evitar la reducción de la conectividad entre poblaciones (Trakhtenbrot *et al.* 2005), sin embargo la fragmentación del hábitat puede provocar que muchas especies de plantas no logren exitosamente su proceso natural de dispersión y de reproducción (Primack y Miao 1992), sobre todo en especies que dependan de otros organismos para reproducirse y dispersarse, y que muestren distribuciones agrupadas.

Desde la década pasada, uno de los retos de la genética de la conservación ha sido evaluar el efecto de la fragmentación del hábitat en la biodiversidad de los ecosistemas (Saunders *et al.* 1991). Los marcadores moleculares se han utilizado desde hace varias décadas para estimar varios parámetros genéticos poblacionales de interés para los ecólogos. Dentro de éstos, los microsatélites de ADN han surgido recientemente como el tipo de marcador más popular y versátil para aplicaciones ecológicas (Selkoe y Toonen 2006), ya que son relativamente abundantes en los genomas y muestran altas tasas de mutación; además son marcadores codominantes y selectivamente neutros (Lowe *et al.*

2004). Analizar las respuestas de las especies más vulnerables se vuelve cada vez más importante para incrementar los esfuerzos de conservación.

Debido a que grandes áreas de selvas tropicales están siendo fragmentadas rápidamente, resulta urgente determinar las posibles consecuencias genéticas y reproductivas en especies que habitan en fragmentos. Hasta hoy, la literatura sugiere efectos negativos de la fragmentación del hábitat en la reproducción y diversidad genética de las plantas, sin embargo no se cuenta con información suficiente para ciertos tipos de plantas, como especies de corta vida (Aguilar *et al.* 2006, 2008). Por ello, el objetivo de este estudio es evaluar cómo responde *Carica papaya*, una especie de corta vida, dioica y de distribución agrupada, a la fragmentación del hábitat y cómo se refleja en su éxito reproductivo y en su diversidad y estructura genética en la selva fragmentada de Los Tuxtlas, Veracruz. Específicamente se evaluaron los efectos en la producción y calidad germinativa de semillas, así como, en la diversidad y estructura genética de poblaciones de selva continua y de fragmentos de selva, para determinar si la dispersión y la conectividad entre poblaciones son afectadas por su reducción y aislamiento. También se evaluó si la fragmentación de la zona tiene un efecto negativo en la distribución de sexos y en el tamaño efectivo de poblaciones de esta especie.

Predicciones

Dada la biología de *C. papaya*, y las predicciones teóricas de los efectos de la fragmentación del hábitat para las plantas y sus interactuantes, se espera que:

- Al ser una especie dioica y con reproducción por entrecruzamiento estricto, depende de la presencia de polinizadores para reproducirse; si los polinizadores son afectados por la fragmentación, se podría dar una baja en las polinizaciones y en la producción y calidad de las semillas de individuos que habiten fragmentos.
- Ya que sólo las plantas femeninas dispersan semillas y las masculinas el polen, si la fragmentación provoca una reducción en el número de individuos reproductivos y la proporción de sexos varía mucho de una proporción 1:1, el efecto en el flujo génico podría exacerbarse y el tamaño efectivo de la población podría reducirse.
- Por la distribución agrupada propia de la especie y por el aislamiento producto de la fragmentación del hábitat, las poblaciones de *C. papaya* podrían sufrir una reducción en la variabilidad genética, provocada por la falta de flujo génico y por endogamia local, así como un aumento en la diferenciación poblacional.

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 4,725 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 paisaje en la región de Los Tuxtlas ha sido severamente alterado en los últimos años. Se estima que el 75% de la vegetación original ha desaparecido y que el 20% restante está contenida principalmente en fragmentos aislados y sólo el 5% se encuentra representada en áreas grandes y protegidas, que en general se encuentran en elevaciones mayores a 800 msnm (Estrada y Coates-Estrada 1996). Los bosques en la zona son talados principalmente para crear tierras para la agricultura y sobre todo para el ganado, actividad sumamente importante en las zonas tropicales de México (Guevara *et al.* 1992), provocando que gran parte de la Reserva esté convertida en potreros y acahuales (Dirzo *et al.* 1997).

Especie de estudio

Carica papaya L. (Caricaceae) es una planta arborescente perennifolia, nativa del trópico americano, que llega a medir de 2 a 10 m de altura (Figura 1). Es una especie nómada que

regenera claros y tiene una longevidad que va de 3 a 15 años (OGTR 2003). Las especies nómadas se caracterizan por no poder crecer en el bosque cerrado y sólo mantenerse en sus bordes o en claros, dado que su germinación y establecimiento son intolerantes a la sombra, además de que requieren generalmente de temperaturas altas para la germinación de sus semillas. La mayoría de las especies nómadas son de vida corta y se les llega a denominar árboles herbáceos por su madera suave y ciclo de vida corto. Su necesidad de sitios más o menos abiertos para su crecimiento las categoriza como plantas de crecimiento secundario (Van Steenis 1958).

La especie es dioica y sus flores crecen en inflorescencias directamente en el tallo debajo del eje de las hojas. Las flores masculinas producen néctar abundante, constituido principalmente por sacarosa y gran cantidad de aminoácidos; sin embargo, las femeninas producen muy poco néctar y no contienen nectarios (OGTR 2003). Las polillas (Sphingidae: Lepidoptera) son los principales polinizadores y consumidores. La polinización ocurre después del crepúsculo, cuando la producción de fragancia floral es mayor (Martins sa); la limitación de polen es un factor importante para la adecuada producción de frutos (Martins sa). Como la mayoría de las especies dioicas, presenta frutos carnosos, lo cual es una estrategia eficiente para el movimiento de semillas a grandes distancias (Dick 2008). La especie florece y fructifica a lo largo de todo el año (observación personal). Las semillas germinan a las dos o tres semanas de sembradas y son viables hasta por tres años, por lo que constituyen un reservorio de genes en el banco de semillas de la selva. *Carica papaya* es considerada como una especie con potencial para reforestación en zonas degradadas de selva (OGTR 2003).

A pesar de la variedad tan amplia de papayas cultivadas, las papayas silvestres aún crecen en muchas partes de América, principalmente asociadas a bosques tropicales húmedos y sub-húmedos, y dentro de éstos, ocurren en su mayoría en sitios perturbados, tales como los claros o bordes (Paz y Vázquez-Yanes 1998). Las papayas silvestres de los bosques tropicales mexicanos se establecen rápidamente y sólo crecen en claros grandes y recientes dentro del bosque maduro así como en bosques secundarios (acahuales). Los árboles de papaya son relativamente abundantes en sitios abiertos creados por el hombre que no han sido arados para fines de agricultura. Los claros formados naturalmente en las selvas, con una edad de entre 1 y 5 años, usualmente presentan varios árboles de papaya (Paz y Vázquez-Yanes 1998).

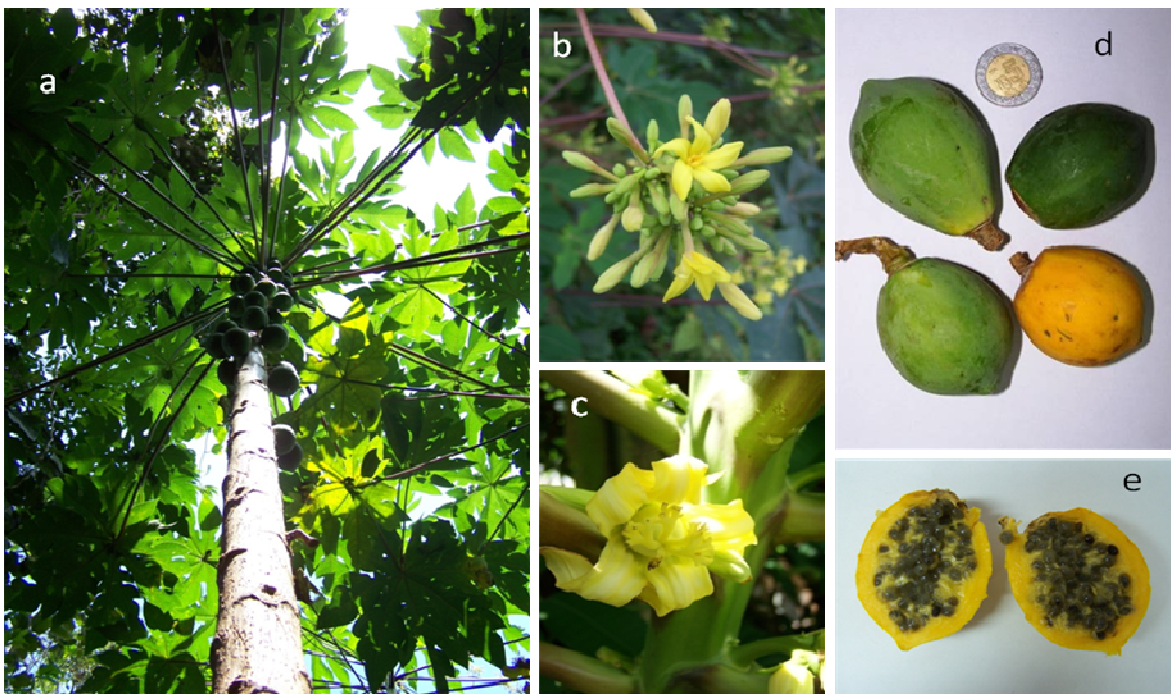


Figura 1. *Carica papaya*. (a) Planta femenina con frutos. (b) Inflorescencia masculina. (c) Flor femenina. (d) Frutos. (e) Fruto abierto mostrando las semillas.

Muestreo

Durante varias visitas a Los Tuxtlas entre los años 2007 y 2009, se estudiaron claros en la selva continua (dentro de los terrenos de la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas) y en fragmentos de la región en donde se encontraban individuos de *Carica papaya*. De todos los individuos presentes en cada sitio, se obtuvo una muestra de tejido foliar que se conservó en ultracongeladores a una temperatura de -70° C.

De las plantas reproductivas femeninas que presentaran frutos maduros se colectó una muestra y se contó el número de semillas por fruto para determinar el éxito reproductivo en términos de producción de semillas en los diferentes hábitats. En el caso de tener más de un fruto por individuo, se obtuvo un promedio por planta. De estas semillas, se sembró una muestra al azar de 90 semillas por individuo en 3 réplicas de 30 semillas por charola, para obtener el porcentaje de germinación y determinar posibles cambios en la calidad de las semillas entre individuos de selva continua y de fragmentos. Las semillas fueron sembradas en tierra obtenida de la región y las charolas fueron colocadas al azar en un invernadero de la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas.

Análisis genéticos

Para evaluar el efecto de la fragmentación del hábitat en la estructura genética y variación entre poblaciones de *C. papaya* se escogieron ocho poblaciones de todas las poblaciones muestreadas, cuatro de selva continua y cuatro de fragmentos que mostraran un número representativo de individuos ($N \approx 30$) y fueran comparables entre hábitats (Tabla 1, Figura 2). Se utilizó la técnica de electroforesis vertical en geles de acrilamida utilizando microsatélites de ADN, reportados para esta especie (Ocampo *et al.* 2006), como

marcadores moleculares. En la tabla 2 se muestran los 6 primers de microsatélite que se utilizaron para analizar 8 poblaciones de *C. papaya*.

Tabla 1. Poblaciones de *C. papaya* utilizadas para los análisis genéticos en los hábitats continuo y fragmentado (N = tamaño real de la población).

Hábitat	Población	N
Selva continua	Circuito 1	30
	Vigia 5	31
	Límite Norte	30
	Lyell	15
		N total = 106
Fragmento	Cerro Borrego	29
	Dos Amates	31
	Playa Escondida	30
	Ruiz Cortines	15
		N total = 105



Figura 2. Mapa de la región de Los Tuxtlas, Veracruz, México donde se muestran las ocho poblaciones muestreadas para los análisis genéticos de *Carica papaya*.

Tabla 2. Primers de microsatélites nucleares de *Carica papaya* utilizados.

Microsatélite	Secuencia repetida	Secuencia del primer 5´ - 3´	Número de alelos	Tamaño del alelo
mCpC1R2	(TC) ₂₄	F:GTCTATCTACCTCCCA R:GAGTGTTATCATAGTCTACA	8	260-284
mCpC1R6	(TG) ₁₀ (AG) ₇ (GA) ₁₀	F:CCAAAACGGAAAACAC R:ATCAAGCTCCCTTTCAC	6	269-281
mCpC1R8	(CT) _{20...} (AC) ₅	F:ATGGCTGAAGACAACCTC R:CTCAATAGCCCAATAACA	4	283-293
mCpC1R9	(CT) ₉	F:TAAAACCCTAACGAGCA R:CAAAGAGCAGACTTGGA	4	130-142
mCpC1R10	(TA) _{4...} (AG) ₁₈	F:CAGCAGAAAACAAGGG R:GGGTTCCGGTTTAGTT	4	341-349
mCpC1R11	(GA) ₅ ... (GA) ₁₃ ... A... (AG) ₄	F:GGTGCCTAATTTTCA R:ACTCGTAAAGAAAACCCA	4	219-229

Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo “mini-prep” de CTAB (Doyle y Doyle 1987) con algunas modificaciones (Apéndice I). Para las reacciones de PCR se utilizó un termociclador Thermo PX2 con las condiciones reportadas por Ocampo *et al.* (2006) (un ciclo de 5 minutos de desnaturalización inicial a 94° C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 46° C para la alineación, 45 segundos a 72° C para la polimerización, y un periodo final de elongación de 4 minutos a 72° C). Cada reacción de PCR contenía 7.5 µl de Ready Mix (20 mM Tris HCl, pH 8.3 con 100 mM KCl 3 mM MgCl₂, 0.002% de gelatina, 0.4 mM de mezcla de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, TTP), estabilizadores y 0.06 unidad/µl de Taq DNA polimerasa), 0.5 µl de cada primer, 5.5 µl de agua destilada y 1 µl de ADN en un volumen final de 15 µl. Los productos de PCR se corrieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 8% que contenían buffer TBE 1X y urea 8M (Apéndice II). A cada muestra se le adicionó 10 µl de buffer de carga de formamida al 95%. Los geles se corrieron a 300 V por 4 horas aproximadamente dependiendo del tamaño del primer. Los geles fueron teñidos con la técnica de AgNO₃ (Apéndice III) y una vez teñidos, fueron fotografiados con

una cámara digital, para posteriormente obtener el patrón de bandeo y construir la base de datos necesaria para los análisis genéticos. Para estimar el tamaño de las bandas se agregó 2 μ l de un marcador de peso molecular de 587 pb (DNA MicroMarker) al 10 % (1 μ l en 10 μ l de buffer de carga) en cada gel.

Para estimar la proporción de sexos se utilizó un marcador molecular propuesto por Urasaki *et al.* (2002) denominado PSDM (papaya sex determination marker), el cual es una región amplificada de secuencia característica (o SCAR por sus siglas en inglés) específica para las plantas macho y que permite una rápida determinación del sexo en *C. papaya* en individuos de cualquier edad. La reacción de PCR fue igual que la anteriormente descrita y las condiciones fueron las siguientes: 1 ciclo a 94° C por 5 minutos, 30 ciclos de 94° C por 1 minuto, 55° C por 1 minuto y 72° C por 1 minuto, seguidos de un periodo final de extensión a 72° C por 5 minutos. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1% y visualizados por tinción con bromuro de etidio. La presencia de banda en los geles representa a los individuos masculinos y su ausencia a las plantas femeninas.

Análisis de datos

Para analizar la existencia de diferencias en la producción de semillas entre individuos de selva continua y fragmentos se realizó una prueba de *t*, que permite contrastar hipótesis sobre medias (Durán *et al.* 2009). Para detectar diferencias en el porcentaje de germinación entre plantas de los diferentes hábitats, se utilizó la prueba no paramétrica *U* de Mann Whitney, análoga a la prueba de *t*, que se utiliza cuando no se cumplen los

supuestos de normalidad y homocedasticidad en los que se basan las pruebas paramétricas (Durán *et al.* 2009). Estos análisis se llevaron a cabo utilizando los paquetes estadísticos JMP (SAS Institute 2004) y STATISTICA 9 (Statsoft 2000).

Con los datos genéticos obtenidos para ocho poblaciones utilizando microsatélites de ADN como marcadores moleculares, se utilizaron los siguientes estimadores para medir la variación genética de las poblaciones en el hábitat fragmentado y en el hábitat continuo:

- 1) Porcentaje de loci polimórficos (P). Calcula la proporción de loci que fueron polimórficos con respecto al total de loci estudiados; se dice que un locus es polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común no excede del 95%.
- 2) Heterocigosis promedio esperada (He). Es la proporción promedio de loci heterocigos por individuo suponiendo apareamiento aleatorio. Para calcularla, primero se obtiene la heterocigosidad en cada locus como $He = 1 - \sum p_i^2$; (donde p_i es la frecuencia de cada uno de los alelos presentes en el locus), posteriormente se obtiene el promedio para todos los loci estudiados. Este estimador puede tomar valores de 0 (cuando no existe variación genética) a 1 (Hedrick 1999).
- 3) Heterocigosis promedio observada (Ho). Es la proporción promedio de loci heterocigos por individuo observado. Se calcula como $Ho = \sum p_{ij}^2$; donde p_{ij} es la frecuencia estimada del genotipo ij y Ho es la suma de las frecuencias de todos los heterocigotos (Hedrick 1999).

- 4) Número promedio de alelos por locus (A). Es el promedio del número de alelos presentes en cada uno de los loci estudiados.
- 5) Riqueza alélica. Es una medida del número de alelos independiente del tamaño de la muestra, por lo que permite comparaciones entre muestras de diferentes tamaños. Se obtiene estimando el número esperado de alelos en una sub-muestra de $2n$ genes, dado que $2N$ genes han sido muestreados ($N > n$), n es fijado como el número más pequeño de individuos para un locus en una muestra, la riqueza alélica es entonces calculada como: $R_s = \sum [1 - ((2N - N_i) / 2n) / (2N / 2n)]$ (para la riqueza alélica por locus y muestra); donde N_i es el número de alelos del tipo i entre los genes $2N$. Para la riqueza alélica por todas las muestras (R_t), la N es el número de todas las muestras de individuos genotipados en el locus bajo consideración (Goudet 2002).

La estructura genética de las poblaciones es una consecuencia de los patrones de entrecruzamiento dentro de las poblaciones y de la magnitud del intercambio genético entre éstas (Hartl y Clark 1989). Se obtuvieron los siguientes estimadores:

- 1) Coeficiente de endogamia (F) propuesto por Wright (1922). Mide la reducción en la heterocigosidad dentro de una población debido al apareamiento entre parientes con respecto a la heterocigosidad esperada en equilibrio de Hardy-Weinberg. Se calcula como $F = 1 - (H_o / H_e)$. Cuando $0 < F < 1$ se predice un exceso de homócigos con respecto a la hipótesis nula (equilibrio Hardy-Weinberg $F = 0$) mientras que cuando $-1 < F < 0$ se predice un exceso de heterócigos.

- 2) Estadísticos F de Wright. Describen la estructura genética a diferentes niveles: población, subpoblación e individuo. Son tres: F_{IS} , F_{ST} , F_{IT} y se definen como $F_{IS} = (H_S - H_i) / H_S$; $F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$; $F_{IT} = (H_T - H_i) / H_T$; donde H_i es la heterocigosis observada de un individuo en una subpoblación dada, H_S es la heterocigosis esperada de un individuo en una subpoblación equivalente en la que todos los apareamientos ocurran al azar y H_T es la heterocigosis esperada de un individuo si la población total no estuviera subdividida y los apareamientos fueran al azar. F_{IT} mide la reducción de la heterocigosis observada de un individuo que se encuentra en una subpoblación con respecto a la esperada de un individuo en una población no subdividida con apareamientos al azar y con las mismas frecuencias alélicas. Permite medir el grado de endogamia total en la población. F_{ST} mide la reducción en la heterocigosis esperada de un individuo que se encuentra en una subpoblación con respecto a la esperada de un individuo que se encontrara en una población no subdividida y con apareamientos al azar; es una medida de la diferenciación genética entre subpoblaciones, ya que mide la reducción en la heterocigosis de un individuo que se encuentra en una subpoblación debido a apareamientos no azarosos, en comparación con un subpoblación ideal en la que todos los apareamientos ocurran al azar.
- 3) R_{ST} . Es un estimador de diferenciación poblacional propuesto por Slatkin (1995) similar al F_{ST} , pero que toma en cuenta la distancia evolutiva entre alelos. Este estimador se recomienda al usar marcadores moleculares como los microsatélites de ADN ya que muestran una alta tasa de mutación y evolucionan bajo un modelo

de mutación “paso a paso” (stepwise mutation) por lo que las diferencias en tamaño entre los alelos están relacionadas a las distancias evolutivas entre alelos (Michalakis y Excoffier 1996), mientras que el estimador F_{ST} toma en cuenta la probabilidad de identidad de dos genes y este decrece cuando la tasa de mutación aumenta (Hedrick 1999).

Con el valor que se obtiene de R_{ST} se puede obtener una estimación indirecta del flujo genético (Slatkin 1995) con la fórmula: $N_m \approx \frac{1}{4} (1/R_{ST} - 1)$. Valores de $N_m > 1$ indican que las poblaciones se comportan como una población panmíctica y el flujo génico restringe el efecto de la deriva génica, mientras que valores de $N_m < 1$ indican que las subpoblaciones tienen un alto grado de diferenciación genética (Hartl y Clark 1989).

También se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) para determinar la distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones de *C. papaya* (Michalakis y Excoffier 1996). Todos los estimadores antes mencionados se obtuvieron con el programa Arlequín versión 3.11 (Excoffier *et al.* 2005). Las comparaciones entre el hábitat de selva continua y de fragmentos de estos estimadores se realizaron con el programa FSTAT (Goudet 2002), que permite comparar ciertos estimadores entre grupos de poblaciones (riqueza alélica, H_e , H_o , F y F_{ST}).

Para poner a prueba la hipótesis de aislamiento por distancia se realizó una correlación entre pares de distancias genéticas y geográficas usando el procedimiento de permutaciones de Mantel (Mantel 1967, Smouse *et al.* 1986). El indicador de distancia genética que se utilizó fue $R_{ST} / (1 - R_{ST})$ que es la medida de correlación adecuada según Rousset (1997). El análisis se llevó a cabo con el Macro para Excell XLSTAT.

Finalmente, para calcular el tamaño efectivo (N_e) de las distintas poblaciones de *C. papaya* y considerando que en organismos dioicos la mitad de los gametos proviene de los individuos de un sólo sexo, el tamaño efectivo dependerá del número de individuos de cada uno: $1 / N_e = \frac{1}{4} N_f + \frac{1}{4} N_m$ lo que significa $N_e = 4 N_f N_m / (N_f + N_m)$, donde N_f es el número de plantas femeninas y N_m el número de plantas masculinas (totales de una población). El número restrictivo será el del sexo menos representado (Hedrick 1999). Asimismo, con los datos genéticos separados por sexo, también se realizaron los análisis de diversidad genética para detectar diferencias dadas por cambios en la distribución de sexos entre los diferentes hábitats. Este análisis se realizó con el programa Arlequin versión 3.11 (Excoffier *et al.* 2005) y las comparaciones entre individuos agrupados por sexo de estos estimadores se realizaron con el programa FSTAT (Goudet 2002).

Resultados

Se visitaron un total de 34 claros dentro de la región de Los Tuxtlas, que presentaron individuos de *Carica papaya*: 16 en zonas no perturbadas de selva y 17 en zonas de fragmentos. Sólo 25 de estos claros (12 en selva continua y 13 en fragmentos) presentaron individuos reproductivos y en los casos en que las plantas femeninas tuvieron frutos, se tomó una muestra. En total se colectaron frutos de 82 plantas a lo largo de todo el estudio, 39 de individuos de selva continua y 43 de los diferentes fragmentos.

Éxito reproductivo

Los resultados muestran que los frutos derivados de individuos presentes en fragmentos producen una cantidad significativamente mayor de semillas ($\bar{x} = 443$) que los frutos de individuos de selva continua ($\bar{x} = 375$) ($t = -2.3684$; g. l. = 80; $p = 0.0002$) (Figura 3).

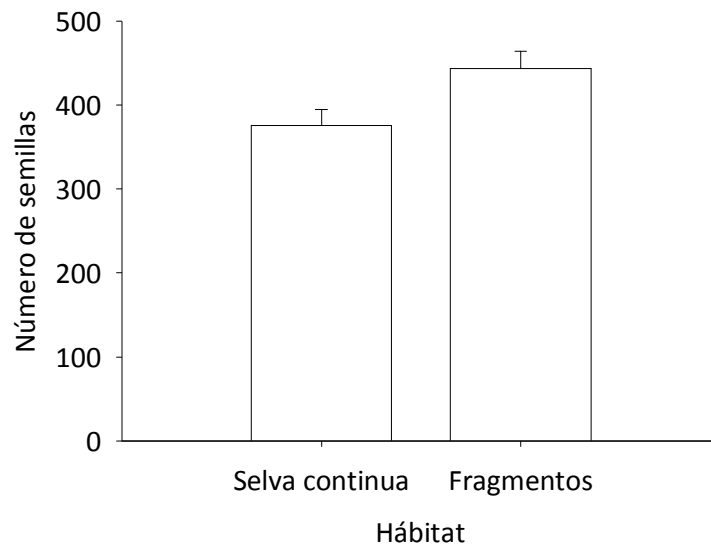


Figura 3. Número de semillas promedio (+ 1 E. E.) por individuo femenino de *Carica papaya* en selva continua y en fragmentos de la región de Los Tuxtlas.

Por el contrario, se encontró que las semillas de frutos provenientes de la selva continua tienen una probabilidad mayor de germinar (16.26 %) que las provenientes de fragmentos (5.91 %) ($U = 30.5$; $Z = -2.837$; $p = 0.0032$), mostrando para ambos hábitats un porcentaje bajo de germinación (Figura 4).

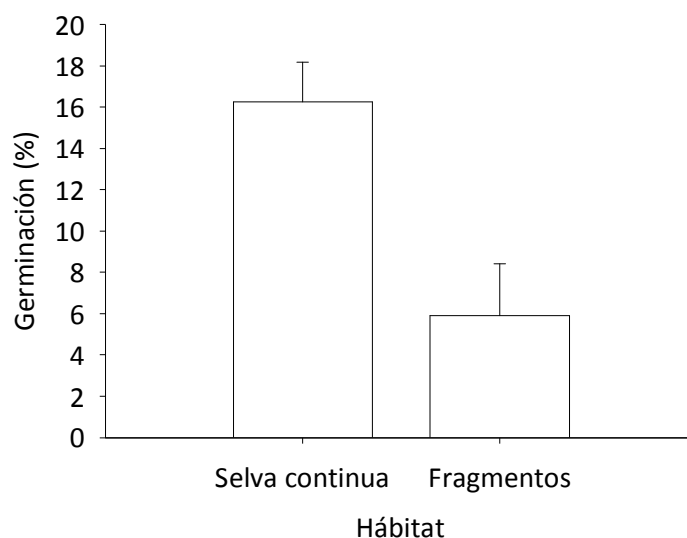


Figura 4. Porcentaje de germinación de semillas de frutos (+ 1 E. E.) de individuos de *Carica papaya* de selva continua y de fragmentos de la región de Los Tuxtlas.

Diversidad y estructura genética

Para los análisis genéticos, se realizaron pruebas con 18 primers de microsatélites nucleares reportados para *C. papaya* (Ocampo *et al.* 2006), obteniendo buena resolución en 6 de ellos y mostrando variación entre individuos. Los datos genéticos obtenidos para las ocho poblaciones de los dos hábitats se muestran en la tabla 3.

Todos los loci fueron polimórficos, tanto en el hábitat de selva continua, como en los fragmentos. El número de alelos no mostró diferencias significativas entre hábitats, siendo en promedio de cinco para ambos hábitats. En ambos hábitats la heterocigosis

observada tuvo un valor menor a la esperada. Sin embargo, las poblaciones ubicadas en fragmentos de selva mostraron valores menores de heterocigosis que las de la selva continua. Un resultado similar se obtuvo para la riqueza alélica (Tabla 4).

Tabla 3. Medidas de variación genética por hábitat y global. %P = porcentaje de loci polimórficos; A = número promedio de alelos por locus; H_o = heterocigosis observada; H_e = heterocigosis esperada (\pm D. E.).

Hábitat	Población	%P	A	H_o	H_e
Selva continua	Circuito 1	100	5.000 (1.673)	0.333 (0.2033)	0.6899 (0.1146)
	Vigia 5	100	4.833 (1.602)	0.4032 (0.2650)	0.7426 (0.0685)
	Lyell	100	4.333 (1.506)	0.3000 (0.1966)	0.6065 (0.1475)
	Límite Norte	100	4.667 (1.211)	0.4833 (0.1516)	0.7523 (0.0478)
	Selva continua global	100	5.000 (1.673)	0.3915 (0.1377)	0.7528 (0.0686)
Fragmento	Dos Amates	100	4.000 (1.095)	0.1935 (0.1257)	0.5279 (0.1698)
	Playa	100	4.000 (0.000)	0.2111 (0.1529)	0.5984 (0.0563)
	Escondida	100	3.000 (0.6320)	0.2126 (0.1369)	0.4154 (0.1754)
	Cerro Borrego	100	3.333 (0.8160)	0.3333 (0.1333)	0.5183 (0.1868)
	Fragmento global	100	5.000 (1.673)	0.2238 (0.1060)	0.6632 (0.0774)
Global	100	5.000 (1.673)	0.3080 (0.0998)	0.7277 (0.0610)	

Al comparar los estimadores de variación genética entre los dos grupos de poblaciones, es decir, las que pertenecían a la selva continua o a los fragmentos de selva, se encontraron diferencias significativas en la riqueza de alelos y en la heterocigosis

observada y esperada, teniendo en todos los casos valores más altos en la selva continua. En el caso del coeficiente de endogamia (F) no se encontró diferencia entre los dos hábitats (Tabla 5), sin embargo, su valor positivo nos habla de una deficiencia general de individuos heterocigos en todas las poblaciones estudiadas de *C. papaya* de la región de Los Tuxtlas. El estadístico F_{ST} fue significativamente mayor en los fragmentos lo que significa una mayor diferenciación entre las poblaciones de ese hábitat (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación entre hábitats de los estimadores de variación genética.

Estimador	Selva continua	Fragmentos	P
Riqueza alélica	4.591	3.498	0.0110
Heterocigosis observada (H_o)	0.392	0.223	0.0284
Heterocigosis esperada (H_e)	0.752	0.663	0.0110
Coeficiente de endogamia (F)	0.453	0.579	0.0990
Estadístico F_{ST}	0.065 (I.C. 95%: 0.033-0.096)	0.272 (I.C. 95%: 0.181-0.377)	0.0051

El análisis molecular de la varianza (AMOVA) mostró que la mayoría de la variación se encuentra repartida dentro de las poblaciones (87.11 %), el 12.39 % entre las poblaciones y sólo el 0.51 % de la variación es debida al hábitat (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis molecular de la varianza (AMOVA). Distribución de la variación genética entre hábitats, entre poblaciones y dentro de poblaciones de *C. papaya* en la región de Los Tuxtlas, Veracruz. * $P < 0.05$.

Origen de la variación	g. l.	Suma de cuadrados	Componente de la varianza	% de la variación
Entre hábitats	1	874.45	0.65	0.51
Entre poblaciones (dentro de los hábitats)	6	5653.76	16.03	12.39*
Dentro de las poblaciones	414	47204.94	114.02	87.11*

Los estimados de diferenciación poblacional mostraron valores bajos indicando poca diferenciación entre hábitats. El estadístico F_{ST} tuvo un valor global de 0.17 y R_{ST} de 0.12. Con base en el valor de R_{ST} , se obtuvo una estimación indirecta de flujo génico (N_m) con un valor global de 1.83 indicando flujo génico entre poblaciones. El valor para el hábitat de selva es de 3.59 y para los fragmentos de 0.66. En la tabla 6 se reporta una matriz con los valores pareados de R_{ST} entre las poblaciones y el estimado de flujo génico entre pares de poblaciones.

Tabla 6. Matriz con los valores pareados de R_{ST} y N_m (sub diagonal) para las poblaciones de *Carica papaya*. En negritas se encuentran los valores no significativos ($P > 0.05$).

$N_m \backslash R_{ST}$	Cto. 1	Vigia 5	Lyell	Límite Nte.	D. Amates	Playa Esc.	C. Borrego	R. Cortines
Cto. 1		0.0265	0.0104	0.1048	0.0512	0.1319	0.1163	0.2244
Vigia 5	18.3016		0.0352	0.1001	0.0814	0.0838	0.1706	0.1661
Lyell	47.342	13.7031		0.1122	0.0071	0.0663	0.0757	0.2513
Límite Nte.	4.2668	4.4987	3.9545		0.0821	0.2268	0.1423	0.0502
D. Amates	9.2495	5.6354	69.9168	5.5873		0.1343	0.0166	0.2101
Playa Esc.	3.2896	5.4604	7.0351	1.704	3.2214		0.2013	0.2852
C. Borrego	3.797	2.4298	6.0988	3.0119	29.6191	1.983		0.3019
R. Cortines	1.7273	2.5106	1.4891	9.4518	1.8794	1.2526	1.1558	

La prueba de Mantel no resultó significativa ($r = 0.201$; $p = 0.310$) lo que indica la inexistencia de aislamiento por distancia en las poblaciones estudiadas de *C. papaya*, es decir, la diferenciación genética entre poblaciones no sigue un patrón de aislamiento por distancia geográfico (Figura 5). También se llevó a cabo la prueba tomando en cuenta el factor hábitat y tampoco resultó significativa ($r = 0.115$; $p = 0.474$).

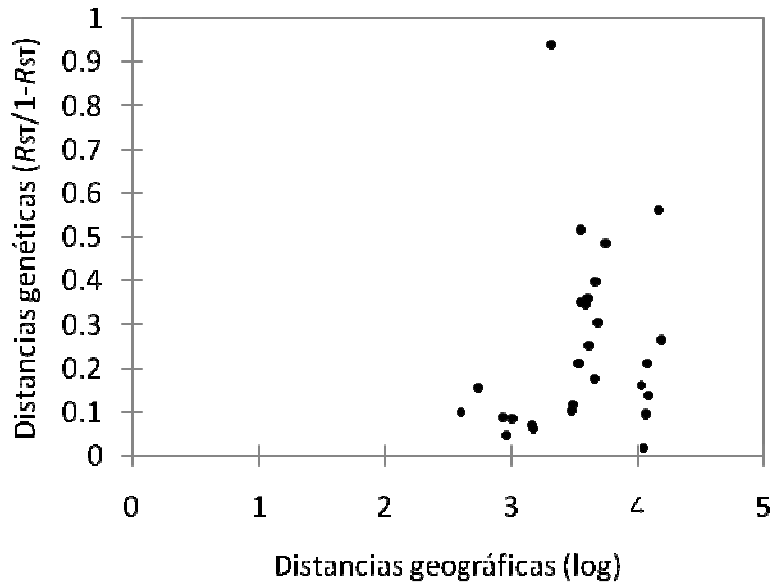


Figura 5. Relación entre las distancias geográficas y genéticas de las poblaciones de *C. papaya* en la región de Los Tuxtlas, Veracruz.

Distribución de sexos y tamaño efectivo de la población

Para obtener el tamaño efectivo de la población se utilizó un marcador molecular (SPDM) que permitió distinguir el sexo de todos los individuos analizados genéticamente (Figura 6). La frecuencia de aparición de los sexos resultó igual entre el hábitat fragmentado y el de la selva continua ($\chi^2 = 0.003$; $p = 0.9580$), mostrando la misma proporción de plantas masculinas y femeninas en ambos hábitats, con un mayor número de hembras, pero sin desviarse significativamente de una proporción 1:1 (Tabla 7; Figura 7). Sin embargo, a nivel de población sí se encontró variación en cuanto a la distribución de los sexos ($\chi^2 = 25.623$; $p = 0.0012$) (Figura 8). El tamaño efectivo de las poblaciones resultó, casi en su mayoría, en valores cercanos a su tamaño observado. Sólo las poblaciones de Límite Norte

y Ruiz Cortines mostraron un tamaño efectivo bajo, sobre todo para la población del hábitat fragmentado (Ruiz Cortines) (Tabla 7).

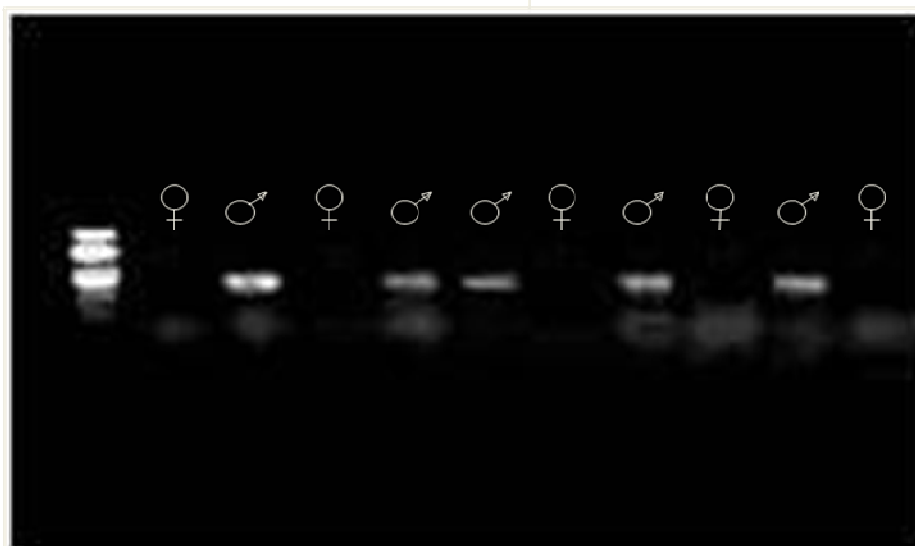


Figura 6. Gel de agarosa mostrando el patrón de bandeo del marcador SPDM para individuos de *C. papaya*, donde la ausencia de banda representa a los individuos femeninos y la presencia a los masculinos.

Tabla 7. Número de plantas femeninas y masculinas de *C. papaya* en poblaciones de selva continua (S) y fragmentos (F) en la región de Los Tuxtlas, mostrando el tamaño efectivo para cada población.

Hábitat	Sitio	Plantas femeninas	Plantas masculinas	Tamaño efectivo de la población (N_e)
S	Circuito 1	11	19	27.8
	Vigia 5	22	9	25.5
	Límite Norte	25	5	16.6
	Lyell	9	6	14.4
	Total	67	39	98.6
F	Dos Amates	19	12	28.8
	Playa Esc.	13	17	29.4
	Cerro Borrego	21	8	23.1
	Ruiz Cortines	13	2	6.9
	Total	66	39	97.5

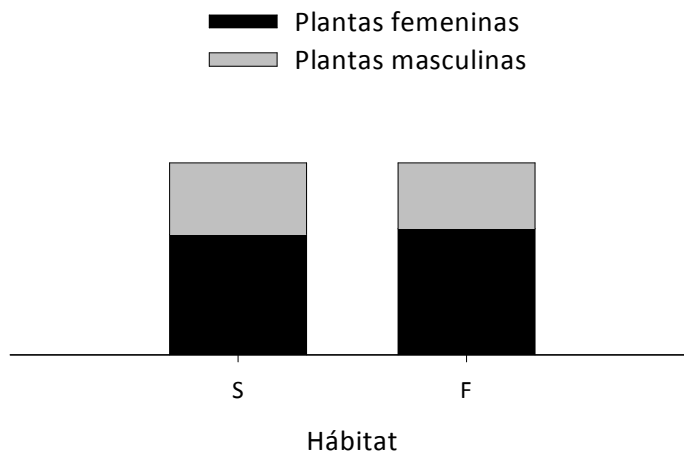


Figura 7. Proporción de sexos en individuos de *C. papaya* en el hábitat de selva (S) y fragmentos (F) de la región de Los Tuxtlas.

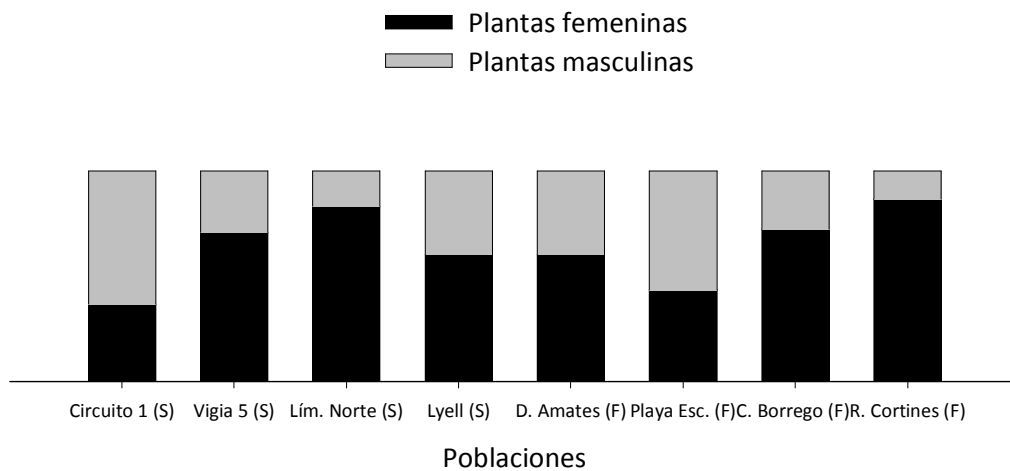


Figura 8. Proporción de sexos entre poblaciones de *C. papaya* en la región de Los Tuxtlas.

En cuanto a los análisis de la diversidad genética entre los individuos agrupados por sexo, no se encontraron diferencias significativas entre las medidas de variación genética entre plantas femeninas y plantas masculinas (Tabla 8, Tabla 9).

Tabla 8. Medidas de variación genética por sexo. %*P* = porcentaje de loci polimórficos; *A* = número promedio de alelos por locus; *Ho* = heterocigosis observada; *He* = heterocigosis esperada (± D. E.).

Sexo	%<i>P</i>	<i>A</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>
Plantas femeninas	100	5.000 (1.673)	0.28270 (0.12751)	0.72046 (0.05234)
Plantas masculinas	100	5.000 (1.673)	0.32323 (0.09212)	0.72643 (0.06459)

Tabla 9. Comparación entre hábitats de los estimadores de variación genética entre plantas femeninas y masculinas de *C. papaya*.

Estimador	Plantas femeninas	Plantas masculinas	<i>P</i>
Riqueza alélica	2.261	2.389	0.4220
Heterocigosis observada (<i>Ho</i>)	0.282	0.323	0.7300
Heterocigosis esperada (<i>He</i>)	0.726	0.720	0.4550
Coefficiente de endogamia (<i>F</i>)	0.467	0.560	0.2380
<i>F_{ST}</i>	0.203	0.112	0.2670

Discusión

Los resultados de este estudio sugieren que reproductiva y genéticamente *Carica papaya* es altamente vulnerable a los efectos de la fragmentación del hábitat, con reducciones en el éxito reproductivo y diversidad genética, así como en modificaciones del tamaño efectivo de las poblaciones que habitan en los fragmentos de selva de la región de Los Tuxtlas,.

Éxito reproductivo

Se ha reportado que la fragmentación del hábitat, a través de su efecto en el tamaño de las poblaciones vegetales y en combinación con el grado de aislamiento, pueden reducir la cantidad y calidad de semillas producidas y el éxito reproductivo de las plantas, ya que afectan atributos como la viabilidad, tamaño o capacidad germinativa (Steffan-Dewenter y Tschardtke 1999, Aguilar y Galetto 2004, Henríquez 2004). Estos cambios pueden deberse a que muchas especies de animales dispersores (de polen y semillas) son altamente susceptibles a la fragmentación del hábitat y pueden extinguirse localmente de los parches de selva remanentes afectando directamente a las plantas que dependen de ellas para reproducirse (Wright y Duber 2001). Los individuos de *C. papaya* que habitan en fragmentos de selva en Los Tuxtlas, produjeron frutos con un mayor número de semillas que aquellos que habitan en la selva continua de la Estación de la UNAM. Este resultado es contrario al reportado por varios autores que demuestran una reducción en la producción de semillas en ambientes fragmentados (Aizen y Feinsinger 1994, Steffan-Dewenter y Tschardtke 1999, Donaldson *et al.* 2002); sin embargo, estas semillas

mostraron un menor porcentaje de germinación (5.91% en semillas de fragmentos contra 16.26% en semillas de la selva continua). Este resultado sugiere que las plantas que viven en los fragmentos de selva quizá tengan más recursos, como por ejemplo mayor disponibilidad de luz o de nutrientes en el suelo, incluso mayores a los que existen en los claros de la selva conservada, lo que les permite producir frutos con una mayor cantidad de semillas; sin embargo estas plantas pueden tener una mayor probabilidad de entrecruzarse con individuos emparentados ya que sus poblaciones se encuentran aisladas y alejadas de otros fragmentos, lo que afectaría el proceso de polinización natural si la diversidad y comportamiento de los polinizadores es modificada también por el aislamiento. Si en los fragmentos es mayor la probabilidad de entrecruzamiento con individuos emparentados, podrían ocurrir fallas antes o durante la fertilización por depresión endogámica (Wilcock y Neiland 2002), reflejándose en una producción de semillas que se desarrollan con una menor probabilidad de ser viables y germinar. Los resultados encontrados en este estudio son consistentes con lo encontrado por el meta-análisis sobre el efecto de la fragmentación del hábitat en el éxito reproductivo de 89 especies de plantas (Aguilar *et al.* 2006); sus resultados indican que la reproducción sexual es afectada negativamente por la fragmentación del hábitat, reflejado principalmente en semillas de baja calidad.

En cuanto a la germinación, la teoría sugiere que la remoción de hábitat primario en las selvas tropicales aumentaría la probabilidad de que las semillas de especies secundarias, encuentren las condiciones apropiadas para germinar y establecerse, aumentando su abundancia y alterando la composición y estructura natural del

ecosistema (Lowe *et al.* 2004). Sin embargo, tales ventajas no se alcanzan si las semillas producidas no son de buena calidad. Es decir, aquellas especies con historia de vida similar a *Carica papaya* podrían beneficiarse del ambiente cambiante producto de la fragmentación del hábitat, sin embargo este tipo de hábitat puede imponer selección en caracteres asociados al sistema reproductivo. Además, es importante analizar los efectos del cambio en el paisaje sobre la genética de las especies, para entender qué tan viable sería la germinación y el establecimiento en los ambientes fragmentados.

Diversidad y estructura genética

Existe controversia sobre los efectos generales de la fragmentación del hábitat sobre los parámetros genéticos de las plantas. Aunque la teoría predice que para especies tropicales, la reducción del hábitat provocará que las poblaciones aisladas sufran efectos genéticos asociados a la reducción del tamaño poblacional tales como deriva génica y endogamia, algunos autores, señalan que son pocos los estudios que reportan estos efectos (Kramer *et al.* 2008). Sin embargo, Aguilar *et al.* (2008) realizaron un meta-análisis con el que concluyen que la fragmentación del hábitat tiene un efecto negativo sobre la diversidad genética de las plantas, aunque aclaran que su estudio no incluye un número representativo de especies de corta vida (como la papaya), ya que no existen los estudios suficientes, y dado esto, sus generalizaciones deben tomarse con cautela.

El sistema de apareamiento en las plantas, 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). Las plantas con sistema de apareamiento por entrecruza presentan una manera de mantener la variación genética

y de disminuir el número de individuos homocigos para genes recesivos deletéreos, en comparación con plantas que se autofecundan (Loveless y Hamrick 1984). Sin embargo, en un ambiente fragmentado, plantas con la capacidad de autofecundarse pueden tener ventaja sobre especies con reproducción estricta por entrecruzamiento, como es el caso de las especies dioicas como *C. papaya*, ya que éstas no tienen la posibilidad de autofecundarse en caso de quedar aisladas de otros individuos reproductivos. En su meta-análisis, Aguilar *et al.* (2008) sugieren que la fragmentación del hábitat está cambiando los patrones de apareamiento de las plantas incrementando la autofertilización en especies autocompatibles, lo que resulta preocupante al pensar en el futuro de las especies autoincompatibles o dioicas en paisajes fragmentados.

La variación genética, al ser la materia prima sobre la cual puede actuar la selección natural y dar origen a adaptaciones, es considerada como indicador de la buena “salud” de una población si está presente, mientras que su ausencia limitaría la capacidad de respuesta de una población a un medio cambiante en el corto y largo plazo (Young *et al.* 1996, Amos y Harwood 1998). Las poblaciones de *C. papaya* que se encuentran presentes en fragmentos de selva en la región de Los Tuxtlas mostraron una variación genética (heterocigosis) significativamente menor, en comparación con las poblaciones que habitan en la selva continua. El aislamiento de estas poblaciones puede comprometer su permanencia en los fragmentos donde el ambiente es cambiante, ya que su capacidad de respuesta puede estar limitada. Asimismo, la riqueza alélica resultó mayor en la selva continua, lo que significa que se están perdiendo alelos en las poblaciones que habitan en los fragmentos. Estos resultados indican que en los fragmentos se recibe un menor flujo

de genes proveniente de otras poblaciones ($N_m = 0.66$ en fragmentos vs. $N_m = 3.59$ en selva), o que la deriva génica ha sido más intensa que en la selva continua. Es posible que los polinizadores que quedan aislados en los fragmentos puedan estar forrajeando sólo entre plantas cercanas, aumentando la probabilidad de apareamiento entre individuos emparentados, en comparación con lo que se esperaría en poblaciones de un hábitat continuo donde los polinizadores tienen más recursos. Bajo este escenario, no resulta raro encontrar una menor diversidad de alelos y una disminución de la variación genética en el hábitat fragmentado, lo que además cumple con las predicciones teóricas de la fragmentación del hábitat.

A pesar de estos resultados, cabe mencionar que *C. papaya* mostró niveles altos de heterocigosis esperada (H_e), en comparación con especies con caracteres de historia de vida similares (angiosperma, perenne de vida corta, con entrecruzamiento obligado y dispersión biótica), donde los valores no son mayores a 0.2 según una revisión de Hamrick y Godt (1996). Sin embargo, esta revisión se basó en estudios que emplearon isoenzimas como marcadores moleculares y en el presente estudio se utilizaron microsatélites de ADN que resultan marcadores más variables, lo que podría explicar los valores de heterocigosis encontrados en esta especie. Si comparamos los valores obtenidos de *C. papaya* en Los Tuxtlas, con un estudio donde se utilizaron los mismos microsatélites en los que se basó esta tesis, los valores son similares; Ocampo (2007) comparó la diversidad genética de *C. papaya* en 13 regiones geográficas del Caribe, que se consideran posibles puntos de origen de la especie y encontró valores altos de heterocigosis esperada (entre 0.69 y 0.50) en regiones de Venezuela, Colombia y las Antillas. Los resultados obtenidos

para *C. papaya* en la región de Los Tuxtlas ($He = 0.72$), son similares a los valores más altos reportados por Ocampo (2007). Quizá, si se incorporaran datos de México en su estudio, podría considerarse a México como el sitio de origen de la papaya por los altos niveles de diversidad, como se ha sugerido por algunos autores (Candolle 1908, Purseglove 1968, Storey 1976, OGTR 2003), aunque se requeriría una filogenia para conocer el origen de la especie.

Por otro lado, la heterocigosis observada (Ho) fue menor a la esperada (He) en ambos hábitats y significativamente menor en los fragmentos, lo que resulta un indicador indirecto de que las poblaciones analizadas no se encuentran en equilibrio, con posibles efectos de deriva génica o endogamia. De hecho, los coeficientes de endogamia (F) indican una deficiencia de heterocigotos tanto en las poblaciones de selva continua como en las de fragmentos. Entre hábitats, los fragmentos muestran una tendencia a una deficiencia de heterocigotos mayor que en la selva continua, lo que no sorprende ya que éstos presentan una menor variación genética. Este resultado resulta interesante ya que en el meta-análisis realizado por Aguilar *et al.* (2008) sobre los efectos de la fragmentación sobre la diversidad genética de las plantas, los autores no detectan un efecto significativo sobre el coeficiente de endogamia, sólo observan un aumento de este valor en estudios que utilizaron progenies. El corto ciclo de vida y sistema de apareamiento de *C. papaya*, parecen ser determinantes en cómo la fragmentación del hábitat afecta de manera negativa a esta especie y en por qué en esta especie sí se detecta un aumento de la endogamia.

El estadístico F_{ST} del hábitat fragmentado resultó significativamente mayor, lo que sugiere que las poblaciones que se encuentran dentro de este hábitat son diferentes entre sí, en cuanto a la distribución de su variación genética, y que son diferentes con respecto a las poblaciones que se encuentran dentro del hábitat de la selva continua que muestran una variación más similar entre ellas. Esto puede estar asociado a la disminución de la variación genética en los fragmentos y a que cada uno muestra cierta variación que no es compartida con los demás, aunque ambos hábitats se encuentran estructurados. Esto podría continuar aumentando la diferenciación entre las poblaciones de los fragmentos y en consecuencia entre los hábitats. Sin embargo, también debe tomarse en cuenta el efecto de la distancia entre las poblaciones, es decir, la ubicación geográfica de las poblaciones de selva podrían explicar la falta de diferenciación entre esas poblaciones ya que se encuentran más cercanas entre sí que las poblaciones que conforman el hábitat fragmentado.

El análisis molecular de la varianza mostró que la variación genética se encuentra repartida principalmente dentro de las poblaciones (82%), lo que podría estar relacionado a la estructura propia de la especie; es decir, su historia de vida sugiere una estructuración genética fuerte por ser una colonizadora de claros; ya se ha reportado que los ambientes parchados muestran una demografía que puede estar acompañada por una estructura genética dinámica y espacialmente compleja resultado de una dispersión de semillas y reclutamiento no aleatorio (Alvarez-Buylla *et al.* 1996). El valor no significativo obtenido para el factor entre hábitats de la AMOVA puede deberse principalmente a la distribución geográfica de las poblaciones estudiadas, ya que se encuentran relativamente cercanas y

no existe una barrera geográfica que pudiera ocasionar una diferenciación significativa entre las poblaciones agrupadas dentro de los dos hábitats, además de que no se encontró un efecto de aislamiento por distancia en las poblaciones.

El flujo de genes resulta un factor determinante en la estructura genética espacial de las especies, sobretodo en las especies que muestran una distribución agregada y que presentan entrecruzamiento estricto, como la papaya. El flujo génico calculado para *C. papaya* en las ocho poblaciones estudiadas de la región de Los Tuxtlas ($N_m = 1.83$), sugiere un flujo génico suficiente para evitar diferenciación entre poblaciones por deriva génica. Sin embargo, este estimado es tomando en cuenta todas las poblaciones estudiadas, pero si comparamos los estimados por hábitat, el flujo génico resulta mayor en la selva, indicando una baja dispersión hacia los fragmentos, probablemente ocasionada por un efecto negativo de la fragmentación sobre los polinizadores. Por otro lado hay que considerar que la estimación de flujo génico utilizada es indirecta y podría constituir sólo flujo génico histórico de la región (Lowe *et al.* 2004), oscureciendo los efectos presentes de la fragmentación del hábitat. Incluso hay quienes consideran que el flujo génico calculado a partir de estimadores de diferenciación poblacional, como F_{ST} o R_{ST} , debe interpretarse con reservas ya que este método hace suposiciones acerca de las poblaciones que difícilmente se cumplen naturalmente (Whitlock y McCauley 1998).

El aislamiento de las poblaciones ocasionado por la fragmentación del hábitat tiene consecuencias genéticas y ecológicas que deben ser consideradas en la biología de la conservación (Ellstrand y Elam 1993); en este caso, la fragmentación del hábitat parece estar afectando negativamente el éxito reproductivo (en cuanto a porcentaje de

germinación) y la diversidad genética (en riqueza alélica y heterocigosis) de las poblaciones de *C. papaya* presentes en los fragmentos, lo que podría comprometer la persistencia de las poblaciones que queden aisladas en la región de Los Tuxtlas. Incluso, por los requerimientos ambientales para el establecimiento de la especie, los potreros o zonas perturbadas por la fragmentación (al ser parecidos al ambiente de un claro) serían lugares ideales, sin embargo, reproductiva y genéticamente, *C. papaya* no se beneficia, ya que a pesar del aislamiento físico, hay que considerar la serie de interacciones complejas que contribuyen a la persistencia de las especies y que podrían ligar a la fragmentación con la extinción.

Tamaño efectivo

El tamaño efectivo de una población determina la tasa de pérdida de variación genética por deriva. Un gran tamaño efectivo (cercano al tamaño poblacional observado) reduce la pérdida de variación por deriva génica y mantiene la diversidad por largo tiempo (Moreno-Letelier 2007). Para la mayoría de las poblaciones de *C. papaya*, se encontró que el tamaño efectivo estimado resultó cercano al observado, sin embargo la población del fragmento Ruiz Cortines mostró un valor muy pequeño con sólo dos machos (13% de la población total). Un efecto que es importante considerar en poblaciones con un valor de N_e reducido, y que resulta de gran importancia en la biología de la conservación, es la depresión por endogamia, es decir, la reducción en la adecuación de los individuos producto de apareamientos entre parientes, ya que puede exponer alelos deletéreos a la acción de la selección natural, reduciendo aún más la variación genética (Amos y Harwood

1998). A pesar de que el fragmento Ruiz Cortines muestra un bajo N_e , no muestra un valor de heterocigosis menor en comparación a los demás fragmentos, esto se debe a que el valor de heterocigosis obtenido es una medida actual de la variación en esa población y el valor de N_e no es actual, ya que incluye a todos los individuos de la población incluso a los juveniles; sin embargo, en las siguientes generaciones el tamaño efectivo de la población podría disminuir la variación genética (si el claro persiste por más tiempo). Además, es importante considerar que las poblaciones de *C. papaya* podrían actuar como una metapoblación, donde generalmente el N_e de cada subpoblación es pequeño, y en los procesos de extinción y recolonización puede perderse mucha variación genética (Moreno-Letelier 2007), por lo que la dispersión será crucial para que la dinámica metapoblacional ocurra: diversificación genética subpoblacional, recolonización de sitios donde una subpoblación ha desaparecido y establecimiento de nuevas subpoblaciones (Trakhtenbrot *et al.* 2005).

Asimismo, es importante considerar que aunque sólo la mutación puede generar nueva variación genética dentro de una población, la dispersión puede aportar esa variación proveniente de otros sitios, por lo que no sólo el tamaño efectivo de la población es determinante para el mantenimiento de la variación genética y la adecuación, sino también la posibilidad de intercambiar genes por dispersión de individuos o gametos de poblaciones cercanas. Esto hace posible que poblaciones muy pequeñas puedan persistir a lo largo del tiempo gracias al efecto de rescate de los migrantes (Cruzan 2001); sin embargo, en escenarios donde la dispersión no sea posible o

esté limitada, como en el caso de las poblaciones aisladas por la fragmentación del hábitat, la variación no podrá llegar de otras poblaciones y ésta se reducirá.

A la fecha, resultan más claros los efectos negativos de la fragmentación del hábitat sobre la biología reproductiva y diversidad genética de las plantas. Sin embargo, las predicciones de las respuestas de las plantas a los efectos teóricos de la fragmentación, aún deben basarse en función de las características propias de las especies; principalmente deben tomarse en cuenta el sistema de apareamiento, tipo de dispersión, distribución geográfica y ciclo de vida. Las características de *Carica papaya*, la hacen más susceptible a la fragmentación del hábitat, en comparación con otras especies de plantas: su dioicismo, su dependencia de dispersores bióticos de polen y semillas, su distribución agrupada, y su corto ciclo de vida, ponen en peligro su permanencia en sitios fragmentados. Esfuerzos por conservar a esta especie en la región de Los Tuxtlas deberían basarse en la conservación de las especies que interactúan con ella para los procesos de dispersión, así como la conservación de su hábitat para que las poblaciones tengan conexión entre sí. Para el caso de poblaciones que se encuentren en fragmentos alejados, los corredores biológicos también podrían funcionar para que la especie pueda lograr exitosamente su dispersión, lo que aseguraría la permanencia de la especie.

Perspectivas

Los resultados de este trabajo sugieren nuevas preguntas para el tema de la fragmentación del hábitat y sus efectos sobre *C. papaya*. Por ejemplo, sería necesario conocer más sobre la biología de la polinización para entender mejor cómo es afectada la interacción planta-polinizador por la fragmentación. También evaluar la interacción de *C. papaya* con sus dispersores de semillas, para comprender mejor ambos procesos de dispersión y sus efectos sobre los patrones de flujo génico.

Obtener mayor información sobre los procesos demográficos de esta especie también sería importante para conocer cómo su dependencia de los claros impacta la distribución de su variación genética y la conectividad entre poblaciones.

Por otro lado, sería muy importante realizar análisis genéticos en las progenies para conocer el efecto directo de la fragmentación del hábitat sobre el sistema de apareamiento y corroborar la reducción en la variación genética producto de la fragmentación.

Conocer más sobre *C. papaya* es importante y relevante porque es una especie que probablemente se originó en el sur de México y actualmente se cultiva en todas las zonas tropicales del mundo. Entender la biología de la papaya silvestre y los efectos de la fragmentación del hábitat sobre ella, es importante para conservar sus poblaciones y su germoplasma.

Dado el gran impacto que tiene actualmente la fragmentación del hábitat sobre todos los ecosistemas, es importante realizar estudios que incorporen evaluaciones

genéticas y ecológicas que permitan entender los posibles caminos evolutivos de las plantas en ambientes fragmentados y poder así sugerir planes de conservación viables a largo plazo. Sobre todo, resulta necesario considerar la importancia de conservar las interacciones que permiten la conectividad de las poblaciones y los procesos evolutivos.

Conclusiones

- Los individuos de *C. papaya* que habitan en poblaciones fragmentadas de Los Tuxtlas producen frutos con un mayor número de semillas, sin embargo, estas semillas tienen un menor porcentaje de germinación.
- La fragmentación del hábitat tiene un efecto negativo en la diversidad genética de las poblaciones fragmentadas de *C. papaya*.
- La estructuración genética de *C. papaya* está asociada su establecimiento en claros, mostrando la mayoría de la variación genética dentro de las poblaciones.
- Cambios en la proporción de sexos reducen el tamaño efectivo de poblaciones de *C. papaya* aisladas por la fragmentación.

Literatura citada

Aguilar, R. y Galetto, L. 2004. Effects of forest fragmentation on male and female reproductive success in *Cestrum parqui* (Solanaceae). *Oecologia* 138: 513-520.

Aguilar, R., Ashworth, L., Galetto, L. y Aizen, M. A. 2006. Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology Letters* 9: 968-980.

Aguilar, R., Quesada, M., Ashworth, L., Herrerias-Diego, Y. y Lobo, J. 2008. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Molecular Ecology* 17: 5177-5188.

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

Alvarez-Buylla, E., Chaos, A., Piñero, D. y Garay, A. 1996. Demographic genetics of a pioneer tropical tree species: patch dynamics, seed dispersal, and seed Banks. *Evolution* 50: 1155-1166.

Amos, W. y Harwood, J. 1998. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 353:188-186.

Arroyo-Rodríguez, V. y Mandujano, S. 2006. The importance of tropical rain forest fragments to the conservation of plant species diversity in Los Tuxtlas, Mexico. *Biodiversity and Conservation* 15: 4159-4179.

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

Byers, D. L., Warsaw, A. y Meagher, T. R. 2005. Consequences of prairie fragmentation on the progeny sex ratio of a gynodioecious species, *Lobelia spicata* (Campanulaceae). *Heredity* 95: 69-75.

Candolle, A. 1908. Origin of cultivated plants. D. A. Appleton & Co. Nueva York, E.U.A.

Cordeiro, N. J. y Howe, H. F. 2003. Forest fragmentation severs mutualism between seed dispersers and an endemic African tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 14052-14056.

Cousens, R., Dytham, C. y Law, R. 2008. Dispersal in plants. A population perspective. Oxford University Press. 240 páginas.

Cruzan, M. B. 2001. Population size and fragmentation thresholds for the maintenance of genetic diversity in the herbaceous endemic *Scutellaria montana* (Lamiaceae). *Evolution* 55:1569-1480.

- Dick, C. W. 2008. New interpretations of fine-scale spatial genetic structure. *Molecular Ecology* 17: 1873-1876.
- Dick, C. W., Hardy, O. J., Jones, A. J. y Petit, R. J. 2008. Spatial scales of pollen and seed-mediated gene flow in tropical rain forest trees. *Tropical Plant Biology* 1: 20-33.
- 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.
- Donaldson, J., Nänni, I., Zachariades, C. y Kemper, J. 2002. Effects of habitat fragmentation on pollinator and plant reproductive success in Renosterveld shrublands of South Africa. *Conservation Biology* 16: 1267-1276.
- Doyle, J. J. y Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem Bull* 19: 11-15.
- Durán, A., Cisneros, A. E. y Vargas, A. 2009. Bioestadística. Segunda Edición. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 260 páginas.
- Ellstrand, N. C. y Elam, D. R. 1993. Population genetics consequences of small populations size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 217-242.
- 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.
- Estrada, A y Coates-Estrada, R. 1996. Tropical rain forest fragmentation and wild populations of primates at Los Tuxtlas, Mexico. *International Journal of Primatology* 17: 759-783.
- Estrada, A. y Coates-Estrada, R. 2001. Bat species richness in live fences and in corridors of residual rain forest vegetation at Los Tuxtlas, Mexico. *Ecography* 24:94-102.
- Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Ghazoul, J. y McLeish, M. 2001. Reproductive ecology of tropical forest trees in logged and fragmented habitats in Thailand and Costa Rica. *Plant Ecology* 153: 334-345.

Goudet, J. 2002. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (versión 2.9.3.2) Institute of Ecology, Lausanne, Suiza. Disponible en: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>

Guevara, S., Meave, J., Moreno-Casasola, P. y Laborde, J. 1992. Floristic composition and structure of vegetation under isolated trees in neotropical pastures. *Journal of Vegetation Science* 3: 655-664.

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 páginas.

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.

Hartl, D. L. y Clark, A. G. 1989. Principles of Population Genetics. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts EUA. 682 páginas.

Hedrick, P. 1999. Genetics of populations. Segunda edición. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury, Massachusetts. 551 páginas.

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.

Hoffmesiter, T. S., Vet, L. E. M., Biere, A., Holsinger, K. Filser, J. 2005. Ecological and evolutionary consequences of biological invasion and habitat fragmentation. *Ecosystems* 8: 657-667.

Ibarra, 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.

Kennedy, B. F. 2007. Habitat fragmentation and mating system evolution of a native wildflower. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias. Universidad Simon Fraser, Canadá.

Knight, T. M., Steets, J. A., Vamosi, J. C., Mazer, S. J., Burd, M., Campbell, D. R., Dudash, M. R., Johnston, M. O., Mitchell, R. J. y Ashman, T. L. 2005. Pollen limitation of plant reproduction: pattern and process. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 36: 467-497.

Kramer, A. T., Ison, J. L., Ashley, M. V. y Howe, H. F. 2008. The paradox of forest fragmentation genetics. *Conservation Biology* 22: 878-885.

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., Harris, S. y Ashton, P. (Editores). 2004. Ecological genetics. Blackwell Publishing, Oxford, Reino Unido. 326 páginas.

Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.

Martins, D. J. sin año. Pollination Ecology of Papaya (*Carica papaya*) on small-holder farms in Kenya. Case studies on conservation of pollination services as a component of agricultural biological diversity. Disponible en: www.fao.org/ag/AGP/agps/C-CAB/Castudies/pdf/6-011.pdf

Michalakis, Y. Y Excoffier, L. 1996. A generic estimation of population subdivision using distance between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics* 142: 1061-1064.

Moreno-Letelier, A. 2007. Tamaño efectivo poblacional. p.63-84. En: Ecología molecular (Eguiarte, L.E, Souza V. y Aguirre X. compiladores) Instituto Nacional de Ecología. México. D.F. p.592

Murcia, C. 1996. Forest fragmentation and the pollination of neotropical plants. En: Tropical forest remnants: ecology, management and conservation of fragmented communities. Laurance, W. y Bierregaard, R. (editors). The University of Chicago Press. Chicago E. U. A. 610 páginas.

Nason, J. D., Herre, E. A. y Hamrick, J. L. 1998. The breeding structure of a tropical keystone plant resource. *Nature* 391: 685-687.

Ocampo, J., Dambier, D., Ollitrault, P., Coppens, G., Brottier, P., Froelicher, Y. & Risterucci, A. 2006. Microsatellite markers in *Carica papaya* L.: isolation, characterization and transferability to *Vasconcellea* species. *Molecular Ecology Notes* 6: 212-217.

Ocampo, J. 2007. Papaya genetic diversity assessed with microsatellite markers in germplasm from the Caribbean region. *Acta Horticulturae* ISHS 740: 93-101.

OGTR (Office of the Gene Technology Regulator), 2003. The Biology and Ecology of Papaya (paw paw), *Carica papaya* L., in Australia.

Paz, L. y Vázquez-Yanes, C. 1998. Comparative seed ecophysiology of wild and cultivated *Carica papaya* trees from a tropical rain forest region in Mexico. *Tree Physiology* 18: 277-280.

Pearson, R. G. y Dawson, T. P. 2005. Long-distance plant dispersal and habitat fragmentation: identifying conservation targets for spatial landscape planning under climate change. *Biological Conservation* 123: 389-401.

Price, P. W. 2002. Species interactions and the evolution of biodiversity en: Plant-Animal Interactions. An Evolutionary Approach. Herrera, C y Pellmyr, O. Editores. Blackwell Publishing. 313 páginas.

Primack, R. B. y Miao, S. L. 1992. Dispersal can limit local plant distribution. *Conservation Biology* 6: 513-519.

Purseglove, J. W. 1968. Tropical crops. Longman, London. Páginas 45-51.

Quesada, M., Stoner, K., Lobo, J., Herrerías-Diego, Y., Palacios-Guevara, C., Munguía-Rosas, M., O-Salazar, K. y Rosas-Guerrero, V. 2004. Effects of forest fragmentation on pollinator activity and consequences for plant reproductive success and mating patterns in bat-pollinated Bombacaceous trees. *Biotropica* 36: 131-138.

Rousset, F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145: 1219-1228.

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

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

Selkoe, K. A. y Toonen, R. J. 2006. Microsatellites for ecologist: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters* 9: 615-629

Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.

Smouse, P. E., Long, J. C. y Sokal, R. R. 1986. Multiple regression and correlation extensions of the Matel test of matrix correspondence. *Systematics Zoology* 35: 627-632.

Soons, M. B. 2003. Habitat fragmentation and connectivity: Spatial and temporal characteristics of the colonization process in plants. Tesis doctoral. Universidad de Utrecht.

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.

Statsoft, Inc. 2000. STATISTICA for Windows.

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

Storey, W. B. 1976. Papaya. En: Evolution of crop plants. Editado por N. W. Simmonds. Longman, Londres, Reino Unido. Páginas 21-24.

Trakhtenbrot, A., Nathan, R., Perry, G. y Richardson, D. M. 2005. The importance of long-distance dispersal in biodiversity conservation. *Diversity and Distributions* 11: 173-181.

Tschardtke, T. y Brandl, R. 2004. Plant-insect interactions in fragmented landscapes. *Annual Review of Entomology* 49: 405-430.

Urasaki, N., Tokumoto, M., Tarora, K., Ban, Y., Kayano, T., Tanaka, H., Oku, H., Chinen, I. y Terauchi, R. 2002. A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 104:281-285.

Van Steenis, C. G. G. J. 1958. Rejuvenation as a factor for judging the status of vegetation types. The biological nomad theory. En: Proceedings of the symposium on humid tropics vegetation, Kandy, UNESCO, Paris.

Whitlock, M. C. y McCauley, D. E. 1998. Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \neq 1/(4N_m+1)$. *Heredity* 82: 117-125.

Whitmore, T. C. 1997. Tropical forest disturbance, disappearance, and species loss, en: Tropical Forest Remnants. Ecology, Management, and Conservation of Fragmented Communities. Laurance, W. F. y Bierregaard, R. O. Jr, The University of Chicago Press. 589 páginas.

Wilcock, C. y Neiland, R. 2002. Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. *Trends in Plant Science* 17: 270-277.

Wright, S. J. 1922. Coefficients of inbreeding and relationship. *American Naturalist* 56: 336-338.

Wright, S. J y Duber, H. C. 2001. Poachers and forest fragmentation alter seed dispersal, seed survival, and seedling recruitment in the palm *Attalea butyraceae*, with implications for tropical tree diversity. *Biotropica* 33: 583-595.

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.

Apéndice I

Extracción de ADN en plantas Método "miniprep"

1. En un tubo Eppendorf de 2.0 ml poner alrededor de 1 g de tejido foliar y moler con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, eliminando el máximo de fibras.
2. Agregar al tubo 1 ml de buffer CTAB 2X.
3. Incubar en baño maría a 60° C durante 10 min. (agitar los tubos cada 3 min.).
4. Centrifugar a 10,000 rpm por 8 min. y trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo.
5. Agregar a cada tubo 600 µl de CTAB 2X de cloroformo:octanol 24:1, agitar hasta homogeneizar y centrifugar a 7000 rpm durante 12 min. A 4° C (10 a 15 min. hasta que el sobrenadante quede transparente).
6. Trasladar 400 µl del sobrenadante a un tubo nuevo. Este paso es fundamental para obtener un ADN limpio, se debe evitar recuperar material de la difase que se forma.
7. Precipitar el ADN con 2/3 del volumen final (400 µl) de isopropanol frío y dejar reposar de 30 a 12 horas a -20° C.
8. Centrifugar a 9000 rpm durante 5 min. a 4° C. Eliminar el sobrenadante.
9. Limpiar el pellet agregando 1 ml de etanol al 70 % frío y centrifugar a 7000 rpm durante 5 min. a 4° C.
10. Eliminar el sobrenadante, dejar secar un rato y resuspender el pellet con 60 µl de agua.

Buffer de extracción CTAB 2X (100 ml):

10 ml de Tris-HCl 1 M
28 ml de NaCl 5 M
4 ml de EDTA pH 8 0.5 M
2 gr de CTAB 2%
300 µl de 2-mercaptoetanol (hasta el momento de usar el buffer)

Aforar a 100 ml.

Tris-HCl 1 M (1 litro):

121.1 gr de Tris
800 ml de agua bidestilada

Agitar y agregar HCl hasta que el pH sea 8
Aforar a 1 litro.

NaCl 5 M (100 ml):

Disolver 29.2 gr de NaCl en 100 ml de agua (agregar poco a poco el polvo).

EDTA 0.5 M (100 ml):

18.6 gr de EDTA sal sódica

80 ml de agua

Ajustar el pH con NaOH.

Aforar a 100 ml.

Apéndice II

Electroforesis en geles desnaturizantes de acrilamida

Gel de acrilamida al 8 % (50 ml) (21 cm x 20 cm):

50 ml de acrilamida al 8 %
42 μ l de TEMED
150 μ l de APS al 10 %

Acrilamida al 8 % Urea 7 M (200 ml):

70 ml de agua bidestilada
20 ml de TBE 10x
84 gr de urea
40 ml de acrilamida 19:1

Buffer de carga desnaturizante (100 ml):

96 ml de formamida al 95 %
4 ml de EDTA 0.5 M pH 8
25 mg de azul de bromofenol
25 mg de xilene cianol

Apéndice III

Tinción con la técnica de AgNO_3

1. Colocar los geles en un recipiente con 100 ml de solución fijadora y agitar por 5 minutos. Enjuagar tres veces con agua destilada.
2. Agregar 100 ml de AgNO_3 y agitar de 5 a 10 minutos. Enjuagar tres veces con agua destilada. La plata puede utilizarse varias veces.
3. Agregar 100 ml de revelador con 500 μl de formaldehído al 37 %. Agitar hasta que las bandas sean visibles. Enjuagar una vez.
4. Agregar 100 ml de solución detenedora.

Solución fijadora (1 litro):

100 ml de alcohol
5 ml de ácido acético

Aforar a 1 litro.

AgNO_3 al 0.2 % (1 litro):

2 gr de AgNO_3
1 litro de agua

Revelador 4x (1 litro):

120 gr de NaOH
1 litro de agua

Se diluye a 1x para su uso.

Solución detenedora (Stopper) (1 litro):

60 gr de EDTA (dihidratado)
1 litro de agua

BLOODY HELL, WE MISSED ONE!

