

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DIVERSIDAD GENÉTICA, ESTRUCTURA GENÉTICA ESPACIAL
Y FLUJO DE POLEN DE *CARAPA GUIANENSIS* (MELIACEAE)
EN UN PAISAJE FRAGMENTADO DE BOSQUE HÚMEDO TROPICAL
EN EL PACÍFICO SUR DE COSTA RICA

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado
en Biología para optar por el grado de Magister Scientiae en Biología con énfasis en
Genética y Biología Molecular

DENNIS JIMÉNEZ VARGAS

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

Costa Rica

2012

Dedicatoria


Quiero dedicar este trabajo a mis padres Víctor Hugo e Isabel, a mis hermanos Melissa, Fabián, Noel y Ronald, a mis sobrinos Isaac, Juan Manuel y Misael, por brindarme su amor y apoyo incondicional en todos los proyectos de mi vida. A mi novia Leslie Calvo, por creer en mí y ser el impulso final que me permitió concluir este proceso. A quienes viven sin egoísmo y continúan luchando por tener un mundo mejor.

Agradecimientos


Quiero agradecer a Jorge Lobo Segura por ser guía y apoyo durante el desarrollo de esta investigación. A Alfredo Cascante Marín y Federico Albertazzi Castro por sus valiosos consejos. A todos los profesores que han participado en mi formación académica. A Amandine Bourg, Eric Fuchs, Federico Hernández, Jenny Muñoz, Jose P. Jiménez, Juan Moreira, Katharina Budde, Mayori Grimaldo y Wendy Solís por colaborar con el trabajo de laboratorio y de campo. A la familia Campos Espinosa por su hospitalidad.

Esta investigación fue posible gracias al apoyo del Programa Institucional Osa-Golfo Dulce (PIOSA) de la Universidad de Costa Rica; y a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (Proyecto “Análisis del flujo génico de árboles con sistemas contrastantes de polinización y dispersión de semillas en bosques fragmentados de zonas tropicales y templadas de Mesoamérica”; N° 111-A7-169)

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado y título de Maestría Académica en Biología con énfasis en Genética y Biología Molecular”



Ph.D. José Francisco Di Stéfano Gandolfi
Representante de la Decana
Sistema de Estudios de Posgrado




Ph.D. Jorge Lobo Segura
Director de Tesis




Dr. rer. nat. Federico Albertazzi Castro
Asesor



Ph.D. Alfredo Cascante Marín
Asesor



Ph.D. Gilbert Barrantes Montero
Representante del Director
Programa de Posgrado en Biología



Dennis Jiménez Vargas
Candidato

Índice

Contenido	Página
Portada	i
Dedicatoria y Agradecimientos	ii
Hoja de Aprobación	iii
Índice	iv
Resumen	v
Lista de Cuadros	vi
Lista de Figuras	viii
Abreviaturas	x
Introducción	1
Objetivo general	11
Objetivos específicos	12
Predicciones	13
Materiales y Métodos	14
Sitio de estudio	14
Estrategia de muestreo	15
Extracción de ADN	16
Análisis de marcadores genéticos	16
Diversidad genética	17
Estructura genética espacial a escala fina	19
Flujo de polen	23
Resultados	25
Diversidad genética	26
Estructura genética espacial a escala fina	29
Flujo de polen	35
Discusión	39
Diversidad genética	40
Estructura genética espacial a escala fina	46
Discrepancia genética de las progenies con el árbol más cercano	53
Flujo de Polen	55
Conclusiones y Recomendaciones	61
Referencias	65

Resumen

La pérdida y la fragmentación del hábitat son las mayores amenazas que los ecosistemas tropicales enfrentan en la actualidad, y en estos ecosistemas, los árboles se consideran particularmente vulnerables. Es necesario continuar con el estudio de más especies arbóreas, con el fin de visualizar patrones generales de impacto producto de la fragmentación, y para establecer estrategias de conservación adecuadas. Esta tesis pretende determinar los patrones de diversidad genética, estructura genética espacial a escala fina y flujo de polen en una población del árbol *Carapa guianensis* ubicada en un paisaje fragmentado de la zona de Mogos, Península de Osa, Costa Rica, utilizando 8 loci microsátélites. Estos análisis permiten describir las interacciones reproductivas entre árboles distribuidos a través de un paisaje fragmentado, y cómo estas interacciones afectan la composición genética de las progenies. En un área de muestreo de 625 ha, compuesta por un mosaico de los hábitats fragmento de bosque (baja densidad de *C. guianensis*), bosque de galería (alta densidad de *C. guianensis*) y potrero arbolado (matriz donde se distribuyen los fragmentos de bosque), se estudiaron 88 individuos reproductivos y 364 progenies de *C. guianensis*. La población de *C. guianensis* en Mogos presentó entre 2 y 12 alelos para los siete loci polimórficos, y un loci monomórfico. La diversidad genética en los individuos reproductivos y las progenies *C. guianensis* mostró niveles similares ($He \sim 0.40$); no obstante, al descomponer la contribución genética en las progenies, el polen contribuye con una mayor diversidad que los óvulos. La discrepancia genética de algunas progenies con el individuo reproductivo más cercano, principalmente en los hábitats fragmento de bosque y bosque de galería, es un indicio de que ocurre dispersión de algunas semillas desde un árbol lejano. Los individuos reproductivos mostraron una débil estructura genética espacial; sólo los individuos vecinos ($a < 25m$) presentan parentesco significativo. Por el contrario, todos los grupos de progenies presentan una fuerte estructura genética espacial, resultado que indica que la dispersión de semillas es mayormente restringida. Por último, el flujo de polen de *C. guianensis* en este paisaje fragmentado es extensivo, alcanzando distancias de más de 2km. No obstante, los resultados indican que los patrones reproductivos no son homogéneos a través del paisaje. En los hábitats potrero arbolado y fragmento de bosque (con baja densidad de árboles) es posible que los polinizadores de *C. guianensis* visiten una menor cantidad de árboles distintos e incrementen la frecuencia de visitas entre flores de un mismo árbol, lo que reduce la diversidad genética e incrementa la estructura genética espacial de las progenies; pero, la mayor separación espacial entre árboles, resulta en una mayor distancia promedio de flujo de polen ($569.4 \pm 190.1m$ en potrero arbolado y $779.4 \pm 162.6m$ en fragmento de bosque). En el hábitat bosque de galería (con alta densidad de árboles) es posible que los polinizadores de *C. guianensis* se desplacen con mayor frecuencia entre árboles distintos ubicados en el mismo vecindario, lo que aumenta la diversidad genética y reduce la magnitud de la estructura genética espacial de las progenies; pero, la corta separación entre individuos reproductivos resulta en una menor distancia promedio de flujo de polen ($419.3 \pm 180.m$ en bosque de galería). Entonces, es importante proteger a todos los árboles remanentes de esta especie, pues son capaces de contribuir con gametos durante los eventos reproductivos; sin embargo, es necesario evaluar el valor adaptativo de las progenies provenientes de los distintos hábitats, con el fin de determinar la viabilidad futura de esta especie.

Lista de Cuadros

Título	Página
Cuadro 1. Iniciadores de marcadores moleculares microsátélites de <i>Carapa guianensis</i>	17
Cuadro 2. <i>Carapa guianensis</i> : Número de individuos reproductivos (IR), número de IR con plántulas en periferia (<25m), número total de plántulas, número de IR con semillas en periferia (<25m) y número total de semillas; según hábitat, Mogos, Península de Osa. En paréntesis (mínimo-máximo de plántulas o semillas por cada IR)	26
Cuadro 3. Número de alelos según estadio de desarrollo y hábitat; y probabilidades de exclusión individual y multilocus (probabilidad combinada) para ocho loci microsátélites analizados en individuos de <i>Carapa guianensis</i> , Mogos, Península de Osa	27
Cuadro 4. Indicadores de diversidad genética en individuos de <i>Carapa guianensis</i> , según estadio de desarrollo y hábitat, Mogos, Península de Osa (n tamaño de muestra, promedio para los ocho loci microsátélites de: <i>Na</i> número de alelos por locus, <i>Ne</i> número efectivo de alelos, <i>Ho</i> heterocigosidad observada, <i>He</i> heterocigosidad esperada y <i>F</i> coeficiente de endogamia)	28
Cuadro 5. Número de progenies de <i>C. guianensis</i> que presentaron discrepancia genética respecto al individuo reproductivo más cercano (<25m), según tipo de progenie y hábitat, Mogos, Península de Osa. ID árbol = # identificación de IR más cercano	29
Cuadro 6. Valores del coeficiente de correlación y el coeficiente de coancestría en los intervalos de distancia utilizados en el análisis de estructura genética espacial de individuos reproductivos de <i>C. guianensis</i> , en un paisaje fragmentado, Mogos, Península de Osa	31

Cuadro 7. Resumen de los análisis de regresión del coeficiente de coancestría ρ sobre el logaritmo de la distancia entre pares de individuos; y estadística S_p para individuos de <i>C. guianensis</i> , según estadio de desarrollo y hábitat, en un paisaje fragmentado, Mogos, Península de Osa	35
Cuadro 8. Número de progenies de <i>C. guianensis</i> con asignación de paternidad según nivel de confianza, hábitat del árbol madre y origen del polen (interno, autogamia, externo) en un paisaje fragmentado, Mogos, Península de Osa	36
Cuadro 9. Número total de alelos para 8 loci microsatélites de <i>C. guianensis</i> reportados en 5 estudios diferentes (en blanco = locus no fue analizado)	43
Cuadro 10. Resumen de resultados de tres estudios genéticos publicados para <i>Carapa guianensis</i> en el Neotrópico donde se han utilizado marcadores microsatélites (N_e número efectivo de alelos; H_o heterocigosidad observada; F índice de fijación; tm tasa de exocruzamiento multi-locus)	44
Cuadro 11. Valores de la estadística S_p para una población de <i>Carapa guianensis</i> en la Amazonía de Brasil, según estadio de desarrollo y condición de extracción selectiva (Cloutier <i>et al.</i> 2007b)	52
Cuadro 12. Resumen de resultados de estudios que estiman el flujo de polen en 14 especies de árboles tropicales	59

Lista de Figuras

Título	Página
Figura 1. Ubicación de individuos reproductivos IR de <i>Carapa guianensis</i> muestreados en un paisaje fragmentado de bosque húmedo tropical ubicado en Mogos, Península de Osa, Costa Rica. Δ IR con progenies en periferia; \circ IR sin progenies en periferia; FB fragmento de bosque; BG bosque de galería; PA potrero arbolado; * terrenos con otras cualidades (cultivos; yolillal; plantación forestal)	25
Figura 2. Correlograma que muestra la estructura genética espacial a escala fina basada en (A) coeficiente de autocorrelación espacial r y (B) coeficiente de coancestría ρ , para la población de individuos reproductivos de <i>C. guianensis</i> en un paisaje fragmentado, Mogos, Península de Osa (LS límite superior y LI límite inferior del intervalo de confianza 95%)	30
Figura 3. Estructura genética espacial a escala fina de progenies de <i>C. guianensis</i> basados en coeficiente de autocorrelación espacial r , según estadio de desarrollo y hábitat, en un paisaje fragmentado, Mogos, Península de Osa. Barras en negrita (I) indican intervalo de confianza al 95%; * $p < 0.05$, $H_0: r = 0$ ($H_a: r \neq 0$); $\zeta_p < 0.05$, $H_0: r = 0$ ($H_a: r > 0$); PFB plántulas fragmento de bosque, PBG plántulas bosque de galería, SBG semillas bosque de galería, PPA plántulas potrero arbolado, SPA semillas potrero arbolado	33
Figura 4. Estructura genética espacial a escala fina de progenies de <i>C. guianensis</i> basados en coeficiente de coancestría ρ , según estadio de desarrollo y hábitat, en un paisaje fragmentado, Mogos, Península de Osa. Barras en negrita (I) indican intervalo de confianza al 95%; * $p < 0.05$, $H_0: r = 0$ ($H_a: r \neq 0$); $\zeta_p < 0.05$, $H_0: r = 0$ ($H_a: r > 0$); PFB plántulas fragmento de bosque, PBG plántulas bosque de galería, SBG semillas bosque de galería, PPA plántulas potrero arbolado, SPA semillas potrero arbolado.	34

Figura 5. Promedio (\pm error estándar) de distancia de flujo de polen entre individuos reproductivos de *Carapa guianensis* según nivel de confianza, hábitat del árbol madre (FB fragmento de bosque, BG bosque de galería, PA potrero arbolado) y origen del polen (interno: padre en mismo vecindario que árbol madre y externo: padre) en un paisaje fragmentado, Mogos, Península de Osa 37

Figura 6. Eventos de flujo de polen entre individuos reproductivos de *C. guianensis* ubicados en un paisaje fragmentado, Mogos, Península de Osa (a partir de análisis de paternidad con confianza de 80%) 38

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BG	Bosque de galería
DAP	Diámetro a la altura del pecho
EGE	Estructura genética espacial
FB	Fragmento de bosque
FBG	Progenies de bosque de galería
FFB	Progenies de fragmento de bosque
FPA	Progenies de potrero arbolado
IR	Individuo reproductivo
OPF	Osa Productos Forestales
PA	Potrero arbolado
PBG	Plántulas de bosque de galería
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Probabilidad de exclusión
PFB	Plántulas de fragmento de bosque
PPA	Plántulas de potrero arbolado
RFGD	Reserva Forestal Golfo Dulce
SBG	Semillas de bosque de galería
SFB	Semillas de fragmento de bosque
SPA	Semillas de potrero arbolado

DESCRIPTORES: *Carapa guianensis* (Meliaceae), Fragmentación del hábitat, Diversidad genética, Estructura genética espacial a escala fina, Flujo de polen, Microsatélites, Reserva Forestal Golfo Dulce.

Los ecosistemas tropicales presentan la mayor biodiversidad y complejidad en el planeta Tierra. Sin embargo, el cambio en el uso del suelo en estos ecosistemas ha generado un fuerte impacto sobre su biota nativa. La deforestación extensiva y la extracción selectiva de madera son las principales fuerzas destructivas; como consecuencia, muchos paisajes son heterogéneos, compuestos por fragmentos de bosque, ubicados generalmente en terrenos no aptos para el desarrollo de actividades productivas, y rodeados por extensas áreas de cultivos o pastizales (Saunders *et al.* 1991; Aldrich y Hamrick 1998; Couvet 2001; Ghazoul 2005; Lowe 2005; Aguilar *et al.* 2008). En estas condiciones, las especies tropicales se encuentran seriamente amenazadas; y en especial los árboles, pues sus poblaciones se mantienen vulnerables a eventos estocásticos ambientales, demográficos y genéticos (Álvarez-Buylla *et al.* 1996; Clarke y Young 2000; Collevatti *et al.* 2001; Lowe *et al.* 2005; Dick *et al.* 2008).

Muchas especies de árboles tropicales se caracterizan por presentar una baja densidad de individuos por unidad de área (<1 árbol/ha) (Ward *et al.* 2005; Dick *et al.* 2008) y una alta tasa de exocruzamiento (Álvarez-Buylla *et al.* 1996; Ghazoul 2005; Lowe *et al.* 2005; Ward *et al.* 2005; Aguilar *et al.* 2006); la combinación de ambas implica la necesidad de vecindarios reproductivos extensos (Ward *et al.* 2005; Dick *et al.* 2008). Además, muchas especies de árboles tropicales dependen de animales para los

procesos de polinización y dispersión de semillas, los que a su vez requieren de hábitats boscosos extensos y continuos para obtener suficientes recursos y para trasladarse a través del paisaje (Álvarez-Buylla *et al.* 1996; Hamrick 2004; Lowe *et al.* 2005; Aguilar *et al.* 2006).

Entonces, teóricamente la fragmentación del hábitat puede generar diversos efectos negativos sobre las poblaciones de árboles tropicales, como son reducción en el tamaño efectivo de la población (Fahrig 2003; Ouborg *et al.* 2006); pérdida de diversidad genética (Young *et al.* 1996; Couvet 2001; Lowe *et al.* 2005); aumento en el parentesco entre individuos en sucesivas generaciones, lo que puede derivar en depresión endogámica (Young *et al.* 1996; Couvet 2001; Cascante *et al.* 2002; Lowe *et al.* 2005; Ouborg *et al.* 2006); pérdida o modificación de las interacciones mutualistas con animales polinizadores y dispersores (Álvarez-Buylla *et al.* 1996; Hamrick 2004; Lowe *et al.* 2005), lo que puede cambiar el sistema de apareamiento, reducir la fecundidad de los individuos reproductivos, reducir la extensión de los vecindarios reproductivos, y cambiar en los patrones espaciales de dispersión y colonización (Álvarez-Buylla *et al.* 1996; Dick 2001; Cascante *et al.* 2002; Fuchs *et al.* 2003; Lowe *et al.* 2005; Aguilar *et al.* 2006); y finalmente, reducir la capacidad de establecimiento y reclutamiento de nuevos individuos (Jordano y Godoy 2002). A largo plazo, estos cambios pueden reducir los potenciales reproductivo y evolutivo de cada población, y finalmente desencadenar en su extinción (Couvet 2001; Dick 2001, Hamrick 2004; Ghazoul 2005; Ouborg *et al.* 2006).

Desde el punto de vista empírico, se ha determinado que las poblaciones de plantas en hábitats fragmentados experimentan una reducción significativa en la diversidad genética; un aumento en los niveles de auto-fertilización (Aguilar *et al.* 2008); una reducción en la producción de semillas y de frutos; y reducción en el número de visitas de polinizadores, la carga de polen y la cantidad de tubos polínicos en las flores (Aguilar *et al.* 2006). No obstante, algunas especies de árboles podrían amortiguar con cierto éxito los efectos negativos de la alteración del hábitat, pues su larga longevidad y su alta plasticidad fenotípica podrían permitir a los individuos sobrevivir hasta que ocurra la recuperación del hábitat. Por otro lado, existe evidencia de que, árboles ubicados en fragmentos, experimentan niveles de flujo de polen significativos, lo que podría contrarrestar los efectos de la deriva génica y de aislamiento entre poblaciones. Empero, estas condiciones son dependientes de la magnitud del deterioro del hábitat original (Hamrick 2004; Ghazoul 2005; Bacles *et al.* 2006).

Por lo tanto, es importante continuar con el análisis de los efectos de la pérdida y la fragmentación del hábitat sobre las poblaciones de más especies de árboles, con el fin de determinar patrones generales de impacto y su relación con la variedad de características demográficas y ecológicas observadas en los árboles. Estos análisis deben cuantificar los niveles de diversidad genética y de cómo ésta se distribuye espacialmente; además, deben analizar los patrones de flujo génico (movimiento de polen y semillas) y el éxito reproductivo de la población (producción y reclutamiento de nuevos individuos) (Lowe *et al.* 2005; Ward *et al.* 2005; Ouborg *et al.* 2006); esta información es básica para establecer estrategias de conservación efectivas.

En la última década se han realizado mayores esfuerzos para determinar la estructura genética espacial y el flujo génico en poblaciones de plantas a nivel de paisaje (escala fina) (Dick *et al.* 2008). Se entiende por estructura genética espacial, a la distribución espacial no aleatoria de los genotipos de organismos de una especie, lo que se observa como la formación de parches de individuos genéticamente relacionados. En el caso de las poblaciones plantas, se espera que ocurra estructura genética espacial, debido a la naturaleza sésil de los individuos reproductivos y por sus mecanismos de flujo génico generalmente restringidos (Vekemans y Hardy 2004; Bacles *et al.* 2006; Dick *et al.* 2008). A escala fina, es decir, a distancias cortas (de metros a pocos kilómetros), la causa principal de la estructura genética espacial es la dispersión localizada de semillas, ya sea por dispersión conjunta de semillas relacionadas (i.e. dispersión de un fruto con muchas semillas) o por la permanencia de las semillas alrededor de árboles maternos (sombra de semillas) (Vekemans y Hardy 2004; Fuchs y Hamrick 2010a). Por otro lado, el flujo génico extensivo mediado por polen no puede eliminar la estructura genética creada por la dispersión limitada de semillas, sino sólo afectar el nivel de relación genética entre progenies (Dyer 2007). Entonces, los estudios de estructura genética espacial permiten describir indirectamente los patrones de flujo génico histórico en poblaciones de plantas (Fuchs y Hamrick 2010a).

Los acercamientos para el análisis de la estructura genética espacial a escala fina en poblaciones de plantas, requieren obtener información genética para múltiples loci e información de la localización geográfica para cada uno de los individuos; esta información se utiliza para calcular coeficientes de relación genética entre individuos

ubicados a determinada distancia geográfica (Hardy y Vekemans 2002; Peakall y Smouse 2006). Por otra parte, los acercamientos para el análisis del flujo génico contemporáneo en poblaciones de plantas, utilizan la información genética y geográfica de los individuos de una población para obtener estimativas de la distancia de movimiento del polen y de las semillas, ya sea de forma indirecta o directa; no obstante, los métodos directos son más robustos, y entre estos, el más utilizado involucra el uso de análisis de paternidad/maternidad, y posteriormente la determinación de las distancias de movimiento de genes y de curvas de probabilidad que representan dichos procesos (Dick *et al.* 2008; Jordano 2010).

La fragmentación del paisaje puede provocar, entonces, cambios en la estructura genética espacial a escala fina de poblaciones de plantas, como consecuencia de la alteración en los procesos de dispersión de semillas y polen. La reducción en la distancia de dispersión de semillas y polen, puede incrementar la magnitud de la estructura genética espacial a escala fina en las nuevas generaciones. A largo plazo, se formarán vecindarios de individuos con un alto parentesco, lo que podría aumentar la frecuencia de la endogamia biparental, derivar en la expresión de la depresión endogámica, y finalmente, reducir en el potencial reproductivo de la población. Por lo tanto, es importante estudiar el cambio en la estructura genética espacial a cohortes de individuos en diferentes estadios de desarrollo y provenientes de hábitats con diferentes grados de fragmentación (Fuchs y Hamrick 2010a).

En la Península de Osa, Costa Rica, se encuentra el último bosque lluvioso tropical de la costa pacífica de América Central. Esta zona presenta afinidad florística con Suramérica, se conocen alrededor de 2142 especies de plantas, de las cuales 700 especies corresponden a árboles. Durante el siglo pasado; la ocupación humana en la Península de Osa inició en zonas costeras; posteriormente se desarrollaron actividades que impactaron los bosques (e.g. minería, ganadería, agricultura y obtención de productos del bosque como madera y animales de caza). A partir del año 1957 se estableció la compañía Osa Productos Forestales (OPF), que inició la extracción de maderas finas; y con la introducción de la motosierra en el año 1960, se aceleró la tasa de deforestación en la Península; además en 1972 se introdujo la siembra mecanizada del arroz. Pero, el desarrollo de estas actividades de producción y de los caseríos se realizó de forma completamente desordenada. Debido a conflictos con los campesinos de la Península, la OPF no realizó la explotación extensiva de madera; esto llevó a la intervención del Gobierno, y gracias al esfuerzo de científicos y asociaciones conservacionistas se logró establecer el Parque Nacional Corcovado entre los años 1975 y 1978; y la Reserva Forestal Golfo Dulce (RFGD) en el año 1978. No obstante, el gobierno no dio seguimiento apropiado al uso de las tierras, y la deforestación continuó hacia zonas altas con terrenos de fuerte pendiente, destruyendo cuencas y aumentando la erosión (Barrantes *et al.* 1999).

Por capacidad del uso del suelo, el 70% del área de la Península de Osa debería mantenerse como bosque. Sin embargo, la explotación de la madera se ha mantenido como la solución a corto plazo para los problemas económicos de sus pobladores, aunque

utilizando esquemas insostenibles a largo plazo. Durante el periodo 1980-1985 se deforestaron 17650 ha, principalmente en zonas cercanas a ríos y humedales, con alta precipitación y escorrentía; y 20% de esta deforestación fue dentro de RFGD. A pesar del establecimiento de legislación forestal en el país, y que un estudio técnico del año 1992 había recomendado una extracción anual menor a 16000 m³ de madera en la Península; para el periodo 1997-1999 el volumen de extracción anual fue de 32500 m³ en planes de manejo forestal, valor que no incluye la tala ilegal. En general, el manejo forestal realizado en la Península ha sido deficitario, pues no considera los aspectos ecológicos básicos para asegurar el equilibrio natural, y los planes de manejo forestal se han realizado con irregularidades legales y omisiones de información. Como consecuencia, se han modificado la dinámica natural de regeneración y la estructura de la comunidad de los boques remanentes; y actualmente el paisaje de la Península de Osa se encuentra considerablemente fragmentado (Barrantes *et al.* 1999).

Algunas especies de árboles encontradas en la Península de Osa fueron aprovechadas con una mayor intensidad durante este manejo forestal; por ejemplo, para el periodo 1997-1999, las cuatro especies más explotadas fueron el “areno” (*Qualea paraensis*) con 555 árboles y 3785 m³, el “baco” (*Brosimum utile*) con 345 árboles y 2796 m³, el “nazareno” (*Peltogyne purpurea*) con 270 árboles y 1453 m³, y el “caobilla” (*Carapa guianensis*) con 250 árboles y 1170 m³; cabe resaltar el “ajo” (*Caryocar costaricense*), pues sólo 166 árboles fueron aprovechados, pero su volumen fue de 1655 m³. Muchas de estas especies presentan poblaciones de baja densidad; producen madera de buena calidad y tienen reducidas tasas de crecimiento anual, por lo que un árbol

alcanza el diámetro de corta cuando tiene una edad considerable (a veces más de un siglo); entonces, la tala de tantos individuos puede tener repercusiones muy negativas sobre estas especies (Barrantes *et al.* 1999).

De las anteriores, el “caobilla” o “bateo” (*Carapa guianensis* Aublet, Meliaceae) representa un modelo de estudio muy interesante en condiciones de fragmentación, debido a sus mecanismos de polinización y dispersión. Este árbol neotropical se distribuye desde Belice, Centroamérica, las Antillas y hasta la Amazonía Brasileña, donde es explotado para obtener madera y aceite de las semillas. *C. guianensis* se encuentra en bosques muy húmedos, principalmente en terrenos con inundaciones periódicas; los árboles adultos alcanzan el dosel, crecen hasta 45 m de altura y 2 m de diámetro a la altura del pecho (DAP), pero individuos con 0.6-1.0 m de DAP presentan alta capacidad reproductiva (2000 a 4000 semillas). Esta especie es monoica, las flores son muy pequeñas (diámetro < 0.5cm) y se ubican en inflorescencias terminales en las ramas; la polinización se debe probablemente a la acción de insectos (pequeñas abejas sin aguijón o mariposas) y se ha observado que muchos individuos reproductivos de la misma población florecen simultáneamente; no obstante, no se han publicado estudios formales sobre su polinización. De manera contrastante, *C. guianensis* produce frutos muy grandes y globosos (10-14cm de diámetro) que se abren cuando caen al suelo debajo de la copa del árbol, los frutos contienen 6-8 semillas grandes (4-5cm de diámetro; 25-35g de masa) cuya dispersión es secundaria, entre el 80-90% de las semillas son rápidamente removidas o comidas por mamíferos medianos con estrategia de recolección y almacenamiento de semillas en múltiples sitios (“scatter-hoarding”) como la guatusa y

el tepezcuinte, y otros consumidores como el chanco de monte; también, las semillas pueden ser dispersadas por la acción del agua (semillas flotantes) y la gravedad (en terrenos con pendiente) (Styles 1981; McHargue y Hartshorn 1991; Gentry 1993; Flores 1994; Guariguata *et al.* 2000; Guariguata *et al.* 2002; Klimas *et al.* 2007).

Se han publicado varios estudios previos de *Carapa guianensis*, donde se evaluaron los efectos de la tala selectiva sobre aspectos genéticos de sus poblaciones. Hall y colaboradores (1994) analizaron nueve poblaciones de *C. guianensis* en bosque natural o bajo tala selectiva, en la Región Caribe de Costa Rica; con seis marcadores isoenzimáticos determinaron niveles similares de diversidad genética en todas las poblaciones, y no encontraron diferencias en la tasa de exocruzamiento entre poblaciones en bosque natural y bajo tala selectiva; en ambos casos la tasa de exocruzamiento no difirió de uno (i.e. estas poblaciones presentaron alogamia). Dayanandan y colaboradores (1999) analizaron tres poblaciones de *Carapa guianensis* en la Región Caribe de Costa Rica, dos de ellas bajo tala selectiva y la otra en bosque no alterado; a partir de tres marcadores microsatélites, encontraron niveles similares de diversidad genética en adultos y juveniles en las tres poblaciones; también bajos niveles de endogamia tanto en adultos como en juveniles; en contraste, en la población que estuvo bajo procesos más intensos de explotación forestal, las cohortes de juveniles mostraron mayor distancia genética con respecto a los adultos, fenómeno que los autores atribuyen a la restricción del flujo génico. Cloutier y colaboradores (2007a, 2007b) estudiaron una población de *C. guianensis* en un bosque continuo ubicado en la Amazonía de Brasil; a partir de cuatro marcadores microsatélites, encontraron altos niveles de diversidad genética, bajos niveles

de endogamia, alta tasa de exocruzamiento y dispersión de polen a larga distancia (determinada con un método indirecto). Posteriormente, esta población fue sometida a un proceso de tala selectiva; entonces compararon los indicadores genéticos pre- y post- tala selectiva a partir de seis marcadores microsátélites. Después del proceso de tala selectiva, la población mostró niveles similares de diversidad genética, alta tasa de exocruzamiento, distancias de flujo de polen similares (determinada con un método indirecto) y débil estructura genética espacial para adultos. Los autores concluyen que la extracción selectiva en esta población brasileña de *C. guianensis* no parece producir un impacto genético negativo a corto plazo.

En resumen, los estudios genéticos de *C. guianensis* en hábitats alterados y naturales coinciden en que esta especie presenta alta diversidad genética y se reproduce principalmente por exocruzamiento; pero difieren en cuanto al efecto final sobre el flujo génico, quizá por diferencias en la intensidad de explotación. No obstante, se han utilizado acercamientos indirectos para determinar el flujo génico, los cuales resultan inconvenientes, pues se basan en modelos con supuestos difíciles de comprobar. Además, estos estudios se enfocan únicamente en dos regiones dentro del área de distribución de *C. guianensis* (Caribe de Costa Rica y Amazonía de Brasil) y se han realizado en bosques sujetos a extracción selectiva.

Por lo tanto, es importante expandir el estudio de *C. guianensis* a más poblaciones dentro de su área de distribución y con condiciones de mayor fragmentación, con el fin de conocer la diversidad genética, la estructura genética espacial y el flujo génico, utilizando

métodos directos y comparando individuos en diferentes estadios de desarrollo. La zona de Mogos, ubicada en la RFGD, Península de Osa, Costa Rica, presenta un paisaje mixto compuesto por tres tipos de hábitats distinguibles: *i)* fragmentos remanentes de bosque natural en lomas y cerros; *ii)* fragmentos de bosque de galería, zonas con inundaciones periódicas; y *iii)* una matriz de potrero arbolado donde se encuentran embebidos los fragmentos de bosque. En estos tres componentes del paisaje se pueden encontrar individuos reproductivos de *C. guianensis*; por consiguiente, esta zona es propicia para el desarrollo de investigaciones de este árbol en ambientes fragmentados.

Objetivo General

Determinar los patrones de diversidad genética, estructura genética espacial a escala fina y flujo de polen de *Carapa guianensis* en un paisaje fragmentado ubicado en la zona de Mogos, Península de Osa, Costa Rica

Objetivos Específicos

Determinar los niveles de diversidad genética de ocho marcadores microsatélites en la población de individuos reproductivos de *C. guianensis*.

Determinar y comparar la diversidad genética de ocho marcadores microsatélites para una muestra de progenies (semillas y plántulas) de *C. guianensis* provenientes de los tres hábitats en la zona de estudio.

Determinar los patrones de estructura genética espacial a escala fina para individuos reproductivos de *C. guianensis*.

Determinar y comparar los patrones de estructura genética espacial a escala fina para la muestra de progenies (semillas y plántulas) de *C. guianensis* en diferentes hábitats en la zona de estudio.

Determinar la procedencia del polen en un grupo de progenies (semillas y plántulas) de *C. guianensis* para obtener información sobre la distancia del flujo génico mediado por polen a través del paisaje.

Predicciones

Se espera una alta diversidad genética en la población de individuos reproductivos de *C. guianensis*, pues estos probablemente representan remanentes de la población existente previo a la intervención humana en el paisaje de Mogos.

Se espera en general una menor diversidad genética para progenies de *C. guianensis*, comparada con la diversidad de individuos reproductivos, pues las progenies son el producto de eventos reproductivos recientes y posteriores a la intervención humana en el paisaje de Mogos.

Para los individuos reproductivos de *C. guianensis* se espera una débil estructura genética espacial a escala fina, pues este patrón se ha encontrado en cohortes de adultos de varias especies arbóreas, y que resulta principalmente de la alta mortalidad denso-dependiente durante estadios iniciales de desarrollo.

Para las progenies de *C. guianensis*, se espera una fuerte estructura genética espacial, pues debido al gran tamaño de las semillas se espera una dispersión limitada; además la alteración del hábitat puede afectar la abundancia de los dispersores naturales y de polinizadores, lo que conlleva al cambio en los procesos reproductivos.

Se espera un movimiento limitado de polen a través de la matriz de potrero arbolado, i.e. entre fragmentos de bosque remanente, pues este ambiente puede ser desfavorable para el movimiento de los polinizadores de *C. guianensis*.

Materiales y Métodos

Sitio de estudio

La investigación se realizó en la zona de Mogos, corredor biológico Corcovado-Piedras Blancas, Reserva Forestal Golfo Dulce, Puntarenas, Costa Rica (8°46'25''N; 83°21'17''O). El área se clasifica como Bosque Húmedo Tropical según el sistema propuesto por Holdridge (Watson y Divney 1992) y su ámbito de elevación va desde el nivel del mar hasta 200 msnm. La zona pertenece a la Subregión del Pacífico Húmedo, con promedios de precipitación anuales de 4000 mm a más de 5000 mm; las lluvias son constantes durante todo el año, con una disminución durante los meses de diciembre a abril (Herrera 1985).

En este estudio se distinguen 3 hábitats principales: **i) fragmento de bosque:** remanente del bosque original, ubicado en lomas y cerros, con terrenos de poca pendiente a pendiente pronunciada, área entre 0.2-0.8 km², densidad de individuos reproductivos de *C. guianensis* de alrededor de 0.56-1.63 árboles/ha, alta diversidad de especies arbóreas, dosel con fuerte efecto de sombra sobre el sotobosque (excepto en bordes del fragmento); **ii) bosque de galería:** franja remanente del bosque original, ubicado en las márgenes de una quebrada, con ancho de alrededor de 50 m y longitud de alrededor de 700 m, ubicado en zona de poca pendiente, densidad de individuos reproductivos de *C. guianensis* de alrededor de 14-18 individuos/ha, especies arbóreas generalmente asociadas a ambientes riparios y mayores niveles de luz a nivel de sotobosque comparado con anterior; **iii)**

potrero arbolado: área donde se cambió el uso del suelo (de bosque a zona de producción ganadera y en menor escala agrícola), hábitat de mayor proporción en el área estudiada, formando una matriz donde se distribuyen fragmentos de bosque remanentes, terrenos de poca pendiente, densidad de individuos reproductivos de *C. guianensis* de alrededor de 0.56-1.63 individuos/ha, árboles utilizados como cerca viva y como sombra para el ganado, presenta altos niveles de luz a nivel del suelo.

Estrategia de muestreo

Se estableció un área de muestreo con dimensiones aproximadas de 2.5x2.5 km, constituida por un mosaico de los 3 hábitats descritos. En esta área se realizó un muestreo intensivo de individuos reproductivos de *C. guianensis* (DAP ≥ 20 cm), iniciando en octubre de 2006 y finalizando en junio de 2011, con 1 a 3 visitas al sitio de estudio por año. Para cada individuo reproductivo se determinó su posición geográfica utilizando un dispositivo GPS y se obtuvo una muestra de tejido foliar o del tronco (peridermis-floema), se almacenó en contenedor con hielo y se llevó al laboratorio para realizar los análisis genéticos. Adicionalmente, se muestreó un área circular de 25m de diámetro alrededor en cada individuo reproductivo, donde se buscaron progenies (plántulas y semillas). Para cada progenie se determinó su posición geográfica (respecto al individuo reproductivo más cercano) y se obtuvo una muestra de tejido (foliar para las plántulas o semillas completas), se almacenó en contenedor con hielo y se llevó al laboratorio para realizar los análisis genéticos.

Extracción de ADN

Para extraer ADN de tejido de hojas, tronco y embrión de la semilla se utilizó el Kit DNeasy Plant Mini (QIAGEN), el cual permite obtener el ADN total puro, que puede ser utilizado directamente en procesos de PCR muy confiables. El ADN purificado utilizando la Columna DNeasy Spin presenta un tamaño de hasta 40kb, con predominancia de fragmentos de 20-25kb. El ADN de esta longitud se desnaturaliza completamente para proceso de PCR y muestra alta eficiencia de amplificación.

Análisis de marcadores genéticos

Se realizó el análisis de ocho marcadores microsatélites desarrollados para *Carapa guianensis* (Dayanandan *et al.* 1999; Vinson *et al.* 2005) (Cuadro 1) utilizando iniciadores fluorocromados. El proceso de amplificación se realizó en un formato de PCR múltiple, utilizando el Kit Master Mix Multiplex (QIAGEN). Este producto permite el desarrollo de ensayos de PCR simples y rápidos, sin necesidad de optimizar la concentración de cada reactivo. Además, reduce el tiempo y manipulación en la preparación de la reacción e incrementa la reproducibilidad.

El volumen final de cada reacción de PCR fue de 12,5µl (6,25µl Master Mix Multiplex; 1,25µl Mezcla de Iniciadores 2µM; y 5,0 µl ADN). Se usó un protocolo de amplificación que consiste en 15min 95°C para activación de la ADN polimerasa Hot Start Taq (QIAGEN); 30 ciclos de amplificación (30s 94°C desnaturalización; 90s 57°C

unión de iniciadores, 60s 72°C extensión); 10min 72°C para extensión final. El producto de PCR se procesó en el analizador de ADN ABI 310 (Applied Biosystems) para la obtención de electroferogramas, que fueron posteriormente analizados con el programa GENEMARKER v1.95 (SoftGenetics).

Cuadro 1. Iniciadores de marcadores moleculares microsatélites de *Carapa guianensis*.

Locus	Motivo repetido	Secuencia de Iniciadores (5'-3')	Locus	Motivo repetido	Secuencia de Iniciadores (5'-3')
*Cg5	(AG) ₁₃ (AAT) ₁₃	F: 5'-TGCATTTCTTCTCCTTGCTTCTGG-3' R: 5'-TCTTGTACGTTGGCTCTTGCACATTC-3'	°Cg06	(CT) ₁₄	F: 5'-ACCCTCGCCTCCTTTGTT-3' R: 5'-TGAGTCGACATGTGTCaGCA-3'
*Cg6	(AAG) ₄ (AG) ₁₁	F: 5'-ACATTCTCTCTTTTTCTCTCAGC-3' R: 5'-TAGTGAAAAAGACTAGACCTCACAGT-3'	°Cg11	(AG) ₈	F: 5'-TGAGAGTGAGTTTGTGGGAAGA-3' R: 5'-TGCTTTTCAGTTGGGACACA-3'
*Cg7	(AG) ₁₂	F: 5'-AAGACTTCCCCCAGATTTGTTTT-3' R: 5'-TGTACCAGTTCAGTTGATGCTCA-3'	°Cg16	(CT) ₁₉	F: 5'-CAAGGCTATTGAGCGTGTGA-3' R: 5'-TCGAAGGGAGAGAAGCACAT-3'
°Cg01	(GAA) ₆	F: 5'-CTGGGACGTATTCTGCTG-3' R: 5'-GCAGCAGCACCTCTCTTT-3'	°Cg17	(AG) ₁₂	F: 5'-GATCAAACAACCCACCAACC-3' R: 5'-CATTGCGGGCTACACAGTT-3'

* Dayanandan *et al.* 1999 ° Vinson *et al.* 2005

Diversidad genética

Los patrones de diversidad genética de *C. guianensis* en la zona de Mogos, se estudiaron según estadio de desarrollo y hábitat, pues durante la secuencia de procesos de polinización, producción de semillas, dispersión, establecimiento y crecimiento de los individuos actúan diferentes fuerzas (e.g. selección natural, actividades humanas) que pueden modificar la composición genética de cada grupo. Para los individuos reproductivos **IR** se calcularon los siguientes parámetros genéticos: número de alelos (N_a), número efectivo de alelos (N_e), heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e) y el coeficiente de endogamia ($F = 1 - (H_o/H_e)$) utilizando el programa GenAlEx v6.41 (Genetic Analysis in Excel, Peakall y Smouse 2006); además se utilizó la

prueba de Chi-cuadrado de Equilibrio de Hardy-Weinberg para determinar la significancia del coeficiente de endogamia F .

Por otra parte, la información de las progenies (plántulas + semillas) fue agrupada según el hábitat de proveniencia, generando tres grupos, i.e. progenies de fragmento de bosque **FFB**, progenies de bosque de galería **FBG** y progenies de potrero arbolado **FPA**, con el fin de utilizar un tamaño de muestra representativo de cada hábitat. Luego, se calculó el coeficiente de endogamia ($F = 1 - (H_o/H_e)$) en cada grupo utilizando el programa GenAlEx v6.41 y mediante una prueba de Chi-cuadrado de Equilibrio de Hardy-Weinberg, se determinó la significancia del coeficiente de endogamia F . El programa MLTR (Ritland 2002), a través de un método de máxima verosimilitud, calcula las frecuencias alélicas de los óvulos y el polen que participan en la formación de una cohorte de progenies agrupadas en familias; es decir, permite conocer de forma independiente la contribución genética materna y paterna a estas progenies. Se determinaron las frecuencias alélicas de óvulos y polen para los grupos FFB, FBG, FPA; y con estas frecuencias se calcularon el número de alelos (N_a) y la heterocigosidad esperada (H_e) de óvulos y polen en cada grupo. Todos los indicadores genéticos determinados fueron promediados para los ocho loci microsatélites. Por último, se calcularon las probabilidades de exclusión (PE1 probabilidad de excluir un único parental, PE2 probabilidad de excluir al segundo parental dado un primer parental y PE3 probabilidad de excluir un par de parentales) para cada locus y multilocus (probabilidad combinada) utilizando el programa NM+ (Chybicki y Burczyk 2010).

Estructura genética espacial a escala fina

La información genética y espacial obtenida de individuos de *C. guianensis* se utilizó para determinar los patrones de estructura genética espacial a escala fina partiendo de 2 acercamientos diferentes: 1) el análisis de Autocorrelación Espacial implementado en el programa GenAlEx v6.41 (Peakall y Smouse 2006) y 2) el Análisis del Patrón Espacial de la Diversidad Genética implementado en el programa SPAGeDi v1.3d (Hardy y Vekemans 2002).

El primer acercamiento intenta explorar la relación existente entre variables genéticas y la localización espacial de los individuos basado en métodos multivariados de autocorrelación espacial (Smouse and Peakall 1999; Peakall *et al.* 2003, Double *et al.* 2005 y Smouse *et al.* 2008). Estos métodos utilizan un acercamiento que evalúa simultáneamente la señal espacial generada por múltiples loci genéticos, evitando los análisis de alelo-por-alelo o locus-por-locus, utilizados en otros métodos análogos (e.g. I de Moran). Al combinar alelos y loci se refuerza la señal espacial al reducir la variación estocástica entre loci. Este análisis genera un coeficiente de autocorrelación r , limitado por +1 y -1, y provee una medida de similitud genética entre pares de individuos cuya separación geográfica cae en intervalos de distancia especificados. No obstante, este coeficiente de autocorrelación r no es una medida de parentesco, aunque si se encuentra correlacionado con medidas de relación genética, por lo que representa una medida apropiada para el análisis de estructura genética espacial. Para probar estadísticamente el coeficiente de autocorrelación espacial r se utiliza un proceso permutación que ofrece el

programa GenAlEx v6.41. En cada permutación se asume que no hay estructura espacial, y los individuos son cambiados aleatoriamente entre las posiciones geográficas; luego se calcula un nuevo coeficiente rp . A partir de las permutaciones se genera una distribución ordenada de valores de rp , y se usan los valores percentil p-2.5 (Límite Inferior, LI) y percentil p-97.5 (Límite Superior, LS) como los límites del intervalo de confianza de 95%. Si el valor calculado de r esta fuera de estos límites, entonces se infiere estructura genética espacial significativa (prueba de 2-colas). Similarmente, GenAlEx v6.41 calcula la probabilidad de autocorrelación espacial positiva, como se predice cuando un organismo presenta dispersión restringida (prueba de 1-cola), asumiendo como hipótesis nula que r observado = r distribución aleatoria de genotipos en el espacio y como hipótesis alternativa que r observado > r distribución aleatoria de genotipos en el espacio.

El segundo acercamiento se basa en el cálculo de un coeficiente de coancestría ρ (Loiselle *et al.* 1995) por comparación entre pares de individuos y su relación con distancias geográficas. El coeficiente de coancestría ρ entre hermanos-completos equivale a 1/4 y entre medios-hermanos a 1/8. Para este análisis, el programa SPAGeDi v1.3d calcula 1) valores promedios del coeficiente de coancestría ρ para un juego de intervalos de distancia predeterminados (similar al análisis de autocorrelación espacial), y 2) regresiones lineales de la estadística ρ entre pares de individuos sobre distancias geográficas (o su logaritmo). Las pendientes de los análisis de regresión pueden usarse para calcular una medida que sintetiza la fuerza de la estructura genética espacial (la estadística Sp) que permite comparaciones entre grupos de individuos dentro de una población y entre poblaciones (Vekemans y Hardy 2004). La estadística Sp se calcula

como la razón $-b_\rho/(1-\rho_{(1)})$ donde b_ρ representa la pendiente de la regresión de ρ sobre el logaritmo de las distancias geográficas y $\rho_{(1)}$ representa el valor promedio de ρ en el primer intervalo de distancia (incluye a los vecinos más cercanos) (Vekemans y Hardy 2004). SPAGeDi v1.3d permite utilizar las frecuencias alélicas de la población total como una referencia para determinar con mayor exactitud el valor del coeficiente de coancestría ρ entre pares de individuos. Para probar estadísticamente el coeficiente de coancestría ρ , SPAGeDi v1.3d utiliza la opción de permutación, similar al acercamiento anterior. En cada permutación se asume que no hay estructura espacial, y los individuos son cambiados aleatoriamente entre las posiciones geográficas; luego se calcula un nuevo coeficiente de coancestría ρ . A partir de las permutaciones se genera una distribución ordenada de valores de ρ , y se usan los valores percentil p-2.5 (Límite Inferior, LI) y percentil p-97.5 (Límite Superior, LS) como los límites del intervalo de confianza de 95%. Si el valor calculado de ρ está fuera de estos límites, entonces se infiere estructura genética espacial significativa (prueba de 2-colas). Además, SPAGeDi v1.3d calcula la probabilidad de autocorrelación espacial como prueba de 1-cola, asumiendo como hipótesis nula que ρ observado = ρ distribución aleatoria de genotipos en el espacio y como hipótesis alternativa que ρ observado > ρ distribución aleatoria de genotipos en el espacio.

La estructura genética espacial a escala fina de los individuos reproductivos de *C. guianensis* se determinó utilizando ambos acercamientos en los siguientes 11 intervalos de distancia entre individuos: 0-25m, 26-50m, 51-75m, 76-100m, 101-150m, 151-200m, 201-250m, 251-300m, 301-1100m, 1101-1900m y 1901-2700m; con el fin de tener un

panorama amplio de relación genética entre individuos a través de todo el paisaje. Se realizaron 10000 permutaciones para determinar los intervalos de confianza de 95% tanto los valores de r como los valores de ρ (prueba de 2-colas) y para probar estadísticamente si los valores observados de r y ρ son mayores que los esperados bajo distribución espacial aleatoria de los individuos (prueba de dispersión restringida, 1-cola). Además, se calculó la estadística Sp utilizando el análisis de regresión implementado en SPAGeDi v1.3d.

La estructura genética espacial a escala fina de las progenies de *C. guianensis* se analizó de forma independiente para semillas y plántulas en cada hábitat, resultando en los grupos: plántulas de fragmento de bosque **PFB**, semillas fragmento de bosque **SFB**, plántulas de bosque de galería **PBG**, semillas de bosque de galería **SBG**, plántulas de potrero arbolado **PPA** y semillas de potrero arbolado **SPA**. Ambos acercamientos (r y ρ) fueron utilizados en cuatro intervalos de distancia entre progenies, con el fin de utilizar un número apropiado de pares de individuos para el cálculo de los coeficientes ($n > 30$ pares): 0-25m, que incluye progenies alrededor del mismo individuo reproductivo y que se espera sean hermanas debido a la dispersión restringida; 26-75m, que incluye progenies alrededor de individuos reproductivos cercanos dentro del mismo vecindario; 76-300m, que incluye progenies alrededor de individuos reproductivos lejanos dentro del mismo vecindario; y por último 301-2700m, que incluye progenies ubicadas en vecindarios diferentes. Se realizaron 10000 permutaciones para determinar los intervalos de confianza de 95% tanto los valores de r como los valores de ρ (prueba de 2-colas) y para probar estadísticamente si los valores observados de r y ρ son mayores que los

esperados bajo distribución espacial aleatoria de los individuos (prueba de dispersión restringida, 1-cola). Adicionalmente, se calculó la estadística Sp para cada grupo de progenies a partir de los análisis de regresión que permite el programa SPAGeDi v1.3d.

Flujo de Polen

La información genética y espacial obtenida de individuos de *C. guianensis* se utilizó para determinar el patrón de flujo de polen contemporáneo utilizando un método directo. En el primer paso, se realizó un análisis de asignación de paternidad (dado un parental conocido, i.e. se asume que el individuo reproductivo más cercano es el “árbol materno”) con el programa Cervus (Kalinowski *et al.* 2007). Este programa se basa en el proceso de exclusión de paternidad, utilizando un acercamiento de máxima verosimilitud. Cervus genera puntajes LOD (logaritmo natural de la razón de verosimilitud) para cada padre candidato, el cual expresa una razón entre la probabilidad de que un padre candidato sea el padre verdadero sobre la probabilidad de que un padre candidato no sea el padre verdadero. A través de la simulación de un análisis de paternidad, Cervus genera una distribución de puntajes LOD para casos donde el padre más probable es el padre verdadero y una distribución para casos donde el padre más probable no es el padre verdadero; comparando ambas distribuciones, Cervus define el valor crítico del puntaje LOD como el puntaje al cual todos los padres candidatos resultaron ser los verdaderos padres, con confianza del 80% y 95%.

Se realizó el análisis de asignación de paternidad para todas las progenies de *C. guianensis* encontradas en el área de estudio que contaban con la información de al menos cinco loci microsatélites y que no presentaban discrepancia genética con el individuo reproductivo más cercano (“árbol madre”). Además, se utilizaron a todos los individuos reproductivos (88 árboles) como padres candidatos. La simulación para determinar el valor crítico del puntaje LOD con confianza de 80% y 95% se realizó bajo las siguientes condiciones: frecuencias alélicas a partir de los genotipos reales, 95 padres candidatos; 50% de padres muestreados, 98% conocimiento de genotipos, 5% como tasa de error en determinación de genotipos y 10000 progenies simuladas; los valores críticos para los puntajes LOD resultaron en 4.62 para 80% de confianza y 5.90 para 95% de confianza.

Posteriormente, se utilizaron las asignaciones de paternidad (confianza de 95% y 80%) y la información de la ubicación geográfica de los individuos reproductivos involucrados, para determinar la cantidad de asignaciones en cada uno de los tres hábitats cuyo polen proviene de un individuo ubicado en el mismo vecindario que el árbol madre (origen interno) o en un vecindario distinto (origen externo) y para determinar la distancia asociada a cada evento reproductivo reconocido mediante el análisis de paternidad. Utilizando una prueba de chi-cuadrado de homogeneidad, se compararon los tres hábitats respecto al número de eventos de flujo de polen entre individuos del mismo vecindario (origen interno) y entre individuos de diferentes vecindarios (origen externo), para los resultados con confianza de 95% y con confianza de 80% individualmente.

Resultados

El esfuerzo de muestreo permitió analizar un total de 88 individuos reproductivos (DAP promedio $50.0 \pm 18.3\text{cm}$, ámbito 23-103cm) y 364 progenies de *Carapa guianensis*. Estas progenies se encontraron alrededor de 32 individuos reproductivos distintos distribuidos en todos los hábitats del paisaje muestreado (Figura 1, Cuadro 2), es decir, sólo un 36,4% del total de individuos reproductivos muestreados presentó progenies en una distancia reducida (<25m) en sus alrededores.

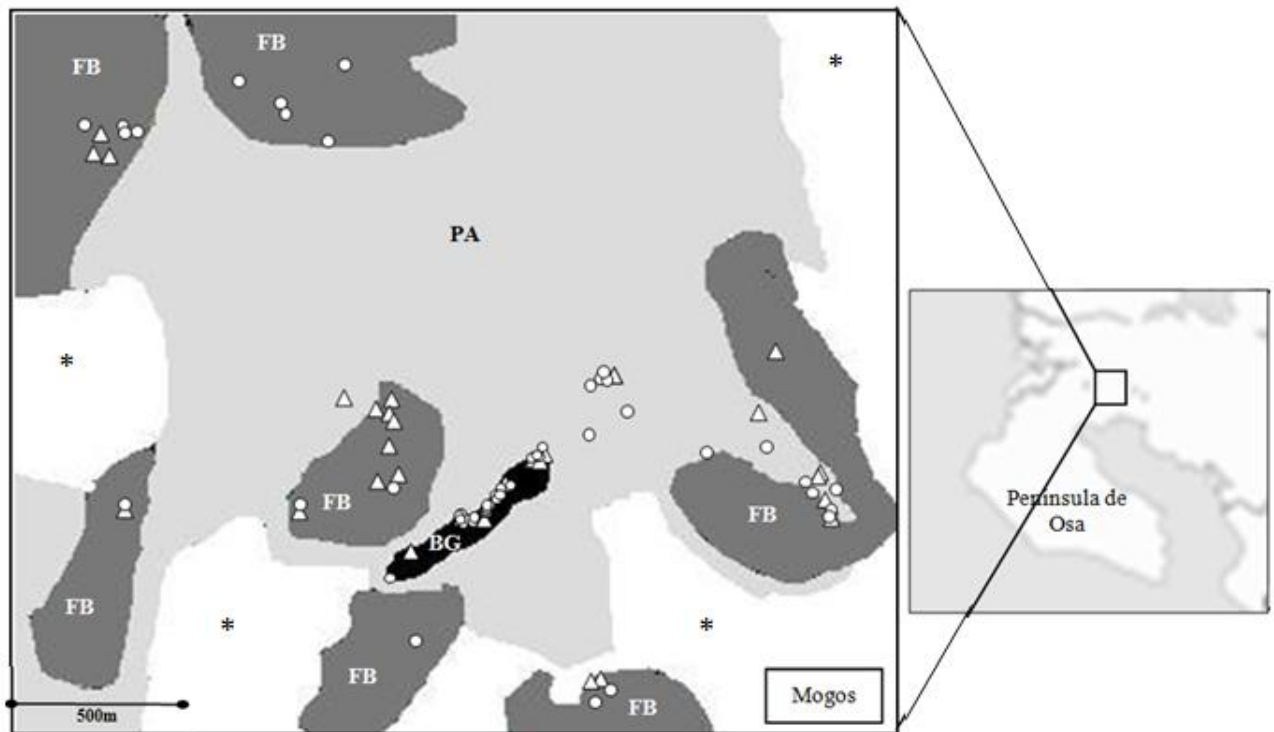


Figura 1. Ubicación de individuos reproductivos IR de *Carapa guianensis* muestreados en un paisaje fragmentado de bosque húmedo tropical ubicado en Mogos, Península de Osa, Costa Rica. Δ IR con progenies en periferia; o IR sin progenies en periferia; FB fragmento de bosque; BG bosque de galería; PA potrero arbolado; * terrenos con otras cualidades (cultivos; yolillal; plantación forestal)

Cuadro 2. *Carapa guianensis*: Número de individuos reproductivos (IR), número de IR con plántulas en periferia (<25m), número total de plántulas, número de IR con semillas en periferia (<25m) y número total de semillas; según hábitat, Mogos, Península de Osa. En paréntesis (mínimo-máximo de plántulas o semillas por cada IR).

Hábitat	Nº IR	Nº IR con plántulas	Nº Plántulas	Nº IR con semillas	Nº Semillas
Fragmento Bosque	35	16 (1-16)	92	3 (2-4)	8
Bosque Galería	36	8 (2-37)	116	2 (12-22)	34
Potrero Arbolado	17	5 (1-16)	47	5 (3-25)	67

Diversidad genética

La muestra total de individuos de *C. guianensis* presentó un locus microsatélite monomórfico (cg16), mientras que los restantes siete loci microsatélites mostraron entre 2 y 12 alelos (Cuadro 3). Las progenies provenientes de los hábitats fragmento de bosque FFB, bosque de galería FBG y potrero arbolado FPA comparten 36, 38 y 34 alelos, respectivamente, con los individuos reproductivos IR (total de 41 alelos); sin embargo, es importante resaltar que para 5 loci (cg5, cg7, cg01, cg06 y cg11), las progenies presentaron alelos adicionales que no se encontraron en los individuos reproductivos. Las progenies de bosque de galería presentaron el mayor número de alelos (44), mientras que las progenies de potrero arbolado presentaron el menor número de alelos (37). Por otra parte, las probabilidades de exclusión multilocus obtenidas con esta batería de loci microsatélites son relativamente altas; sin embargo, los loci cg16 y cg17 resultaron poco informativos.

Cuadro 3. Número de alelos según estadio de desarrollo y hábitat; y probabilidades de exclusión individual y multilocus (probabilidad combinada) para ocho loci microsatélites analizados en individuos de *Carapa guianensis*, Mogos, Península de Osa

Locus	Número de alelos						Locus	Probabilidad de Exclusión			
	IR	FFB	FBG	FPA	IR	PE1		PE2	PE3		
cg5	10	10	(0)	12	(2)	9	(0)	cg5	0.556	0.717	0.883
cg6	4	3	(0)	3	(0)	3	(0)	cg6	0.067	0.173	0.284
cg7	6	8	(2)	8	(2)	5	(1)	cg7	0.143	0.304	0.483
cg01	6	6	(1)	8	(2)	7	(2)	cg01	0.147	0.310	0.490
cg06	4	3	(0)	5	(0)	3	(0)	cg06	0.063	0.180	0.302
cg11	8	7	(0)	6	(0)	7	(0)	cg11	0.392	0.570	0.753
cg16	1	1	(0)	1	(0)	1	(0)	cg16	0.000	0.000	0.000
cg17	2	1	(0)	1	(0)	2	(0)	cg17	0.000	0.006	0.011
Total	41	39	(3)	44	(6)	37	(3)	Multilocus	0.827	0.961	0.996

IR	Individuos reproductivos	(#)	alelos ausentes en muestra de individuos reproductivos IR
FFB	Progenies fragmento de bosque	PE1	probabilidad de excluir un único parental
FBG	Progenies bosque de galería	PE2	probabilidad de excluir al segundo parental dado un primer parental
FPA	Progenies potrero arbolado	PE3	probabilidad de excluir un par de parentales

Los indicadores de diversidad genética calculados permiten inferir que los individuos reproductivos y las progenies de *C. guianensis* presentan niveles considerables de diversidad genética (Cuadro 4). En los individuos reproductivos, el coeficiente de endogamia F es positivo y difiere significativamente de cero, es decir, este grupo presenta una deficiencia de heterocigotos. Por otra parte, las progenies de *C. guianensis* ubicadas en los hábitats fragmento de bosque y potrero arbolado también presentan un coeficiente de endogamia F significativo, pero las progenies en el hábitat bosque de galería presentan un exceso de heterocigotos (i.e. F es reducido). No obstante, las tendencias de diversidad genética son similares en los tres hábitats (fragmento de bosque, bosque de galería y potrero arbolado), pues los niveles de heterocigosidad H_o son mayores al 40%, y en general, la diversidad genética fue mayor en polen que en óvulos para los tres hábitats (Cuadro 4); es decir, la diversidad genética encontrada en los individuos reproductivos de

C. guianensis está mejor representada en el polen que en los óvulos que formaron a las progenies estudiadas.

Cuadro 4. Indicadores de diversidad genética en individuos de *Carapa guianensis*, según estadio de desarrollo y hábitat, Mogos, Península de Osa (n tamaño de muestra, promedio para los ocho loci microsatélites de: *Na* número de alelos por locus, *Ne* número efectivo de alelos, *Ho* heterocigosidad observada, *He* heterocigosidad esperada y *F* coeficiente de endogamia)

Grupo	n	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>F</i>
IR	88	5.125 (1.060)	2.550 (0.727)	0.389 (0.103)	0.417 (0.110)	0.056* (0.019)
				Óvulos	Polen	
Grupo	n	<i>F</i>	<i>Na</i>	<i>He</i>	<i>Na</i>	<i>He</i>
FFB	100	0.035* (0.006)	3.125 (0.639)	0.345 (0.092)	4.750 (1.146)	0.440 (0.125)
FBG	150	-0.033 ^a (0.006)	2.375 (0.461)	0.387 (0.090)	5.500 (1.350)	0.402 (0.098)
FPA	114	0.069* (0.019)	2.500 (0.535)	0.383 (0.083)	4.500 (1.035)	0.423 (0.112)

IR	Individuos reproductivos	*	probabilidad < 0.001; Ho: F = 0
FFB	Progenies fragmento de bosque	^a	probabilidad >0.05; Ho: F = 0
FBG	Progenies bosque de galería	(#)	error estándar
FPA	Progenies potrero arbolado		

Se espera una dispersión a corta distancia de las progenies de *C. guianensis*, dado el gran tamaño de las semillas y sus mecanismos de dispersión. De ahí, se puede suponer que las progenies encontradas en la periferia (<25m de distancia) de un individuo reproductivo, son descendientes del mismo (hijos); es decir, son genéticamente afines (i.e. al menos un alelo de cada locus en una progenie dada, se encuentra en el genotipo del individuo reproductivo más cercano). No obstante, en este estudio se encontró que un

considerable número de individuos reproductivos presentaban en su periferia progenies genéticamente discrepantes, en uno o más loci (Cuadro 5). En general, este fenómeno se observó con mayor frecuencia en los hábitats de fragmento de bosque y bosque de galería, donde la mayoría de progenies discrepantes fueron plántulas. Destacan los individuos reproductivos identificados como 003, 004, 1516 y 398, pues más del 50% de las progenies encontradas en la periferia de estos individuos reproductivos resultaron genéticamente discrepantes.

Cuadro 5. Número de progenies de *C. guianensis* que presentaron discrepancia genética respecto al individuo reproductivo más cercano (<25m), según tipo de progenie y hábitat, Mogos, Península de Osa. ID árbol = # identificación de IR más cercano

Fragmento Bosque			Bosque Galeria			Potrero Arbolado		
ID Árbol	Plántula	Semilla	ID Árbol	Plántula	Semilla	ID Árbol	Plántula	Semilla
003	12		1169		1	1174		4
004	5		1173		1	796	2	
1500	1		1503	1				
1516	6		398	13				
448	1		607	1				
449	1		608	3				
799	1		610	4				
800	1							
Total	28	0		22	2		2	4

Estructura genética espacial a escala fina

Los individuos reproductivos IR de *C. guianensis* mostraron niveles de relación genética mayores de lo esperado al azar, únicamente en el intervalo de distancia más reducido (0-25 m), tanto en el acercamiento que usa el coeficiente de autocorrelación

espacial r (Fig.2.A) como en el acercamiento que usa el coeficiente de coancestría ρ (Fig.2.B), pues los valores de r y ρ se encuentran fuera del intervalo de confianza de 95% (Cuadro 6). No obstante, el valor promedio de ρ en este intervalo ($0.0579 < 1/16$) es menor al valor esperado para medios hermanos ($1/8$).

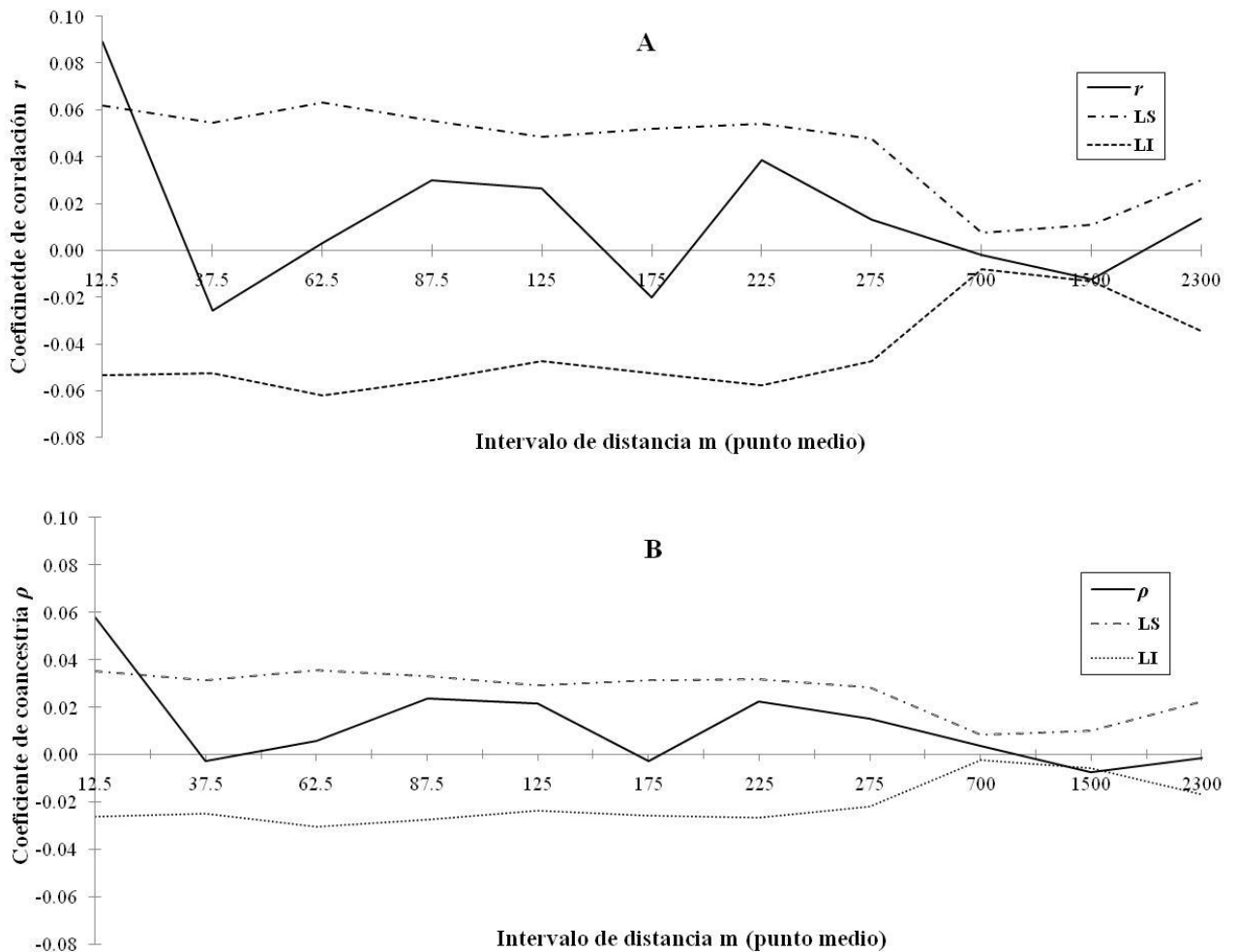


Figura 2. Correlograma que muestra la estructura genética espacial a escala fina basada en (A) coeficiente de autocorrelación espacial r y (B) coeficiente de coancestría ρ , para la población de individuos reproductivos de *C. guianensis* en un paisaje fragmentado, Mogos, Península de Osa (LS límite superior y LI límite inferior del intervalo de confianza 95%)

Nótese que para los individuos reproductivos, la tendencia de cambio del coeficiente de autocorrelación espacial r a través del paisaje es casi idéntica a la que presenta el coeficiente de coancestría ρ ; aunque r presenta una escala ligeramente mayor (Figura 2; Cuadro 6). Aparte de los valores significativos encontrados en el primer intervalo de distancia, sólo en el intervalo de distancia entre 1101-1900 m se encuentra un valor de ρ significativamente menor a lo esperado al azar; mientras que r se mantiene dentro del intervalo de confianza de 95% en los demás intervalos de distancia (Cuadro 6).

Cuadro 6. Valores del coeficiente de correlación y el coeficiente de coancestría en los intervalos de distancia utilizados en el análisis de estructura genética espacial de individuos reproductivos de *C. guianensis*, en un paisaje fragmentado, Mogos, Península

<i>d</i> mín- <i>d</i> máx	Intervalos distancia <i>d</i> (m)										
	0-25	26-50	51-75	76-100	101-150	151-200	201-250	251-300	301-1100	1101-1900	1901-2700
n	80	96	70	86	113	96	89	120	1801	1054	223
<i>r</i>	0.0892*^ç	-0.0259	0.0033	0.0298	0.0267	-0.0200	0.0387	0.0132	-0.0019	-0.0123	0.0137
LS	0.0618	0.0544	0.0634	0.0554	0.0485	0.0518	0.0539	0.0475	0.0074	0.0110	0.0300
LI	-0.0532	-0.0524	-0.0618	-0.0555	-0.0472	-0.0524	-0.0575	-0.0475	-0.0082	-0.0131	-0.0342
ρ	0.0579*^ç	-0.0028	0.0057	0.0235	0.0216	-0.0028	0.0224	0.0152	0.0037	-0.0076*	-0.0014
LS	0.0351	0.0313	0.0358	0.0332	0.0292	0.0315	0.0318	0.0284	0.0082	0.0098	0.0223
LI	-0.0264	-0.0250	-0.0305	-0.0274	-0.0239	-0.0258	-0.0269	-0.0220	-0.0025	-0.0060	-0.0169

r coeficiente de autocorrelación espacial (GenAlEx v6.41)
 ρ coeficiente de coancestría (SPAGeDi v1.3d)
LS límite superior intervalo de confianza 95%
LI límite inferior intervalo de confianza 95%

n número de pares de individuos en cada intervalo de distancia
***** probabilidad < probabilidad < 0.05 para $H_0: r=0$ o $\rho=0$ ($H_a: r, \rho \neq 0$, 2-colas)
ç probabilidad < probabilidad < 0.05 para $H_0: r=0$ o $\rho=0$ ($H_a: r, \rho > 0$, 1-cola)

de Osa

La estructura genética espacial de progenies de *C. guianensis* fue mayor comparada con la encontrada para individuos reproductivos. No obstante, en algunos intervalos de distancia no fue posible obtener estimativas confiables de los coeficientes

de correlación y de coancestría, pues los datos no permitían comparar al menos 30 pares de progenies en esas distancias.

Todos los grupos de progenies mostraron un coeficiente de autocorrelación espacial r significativo en el primer intervalo de distancia, que incluye pares de progenies ubicados en la periferia del mismo individuo reproductivo (Figura 3). Nótese que los valores de r en el primer intervalo de distancia son menores para las progenies ubicadas en el hábitat bosque de galería (PBG y SBG), mientras que el máximo se presenta en plántulas del hábitat potrero arbolado PPA. Las comparaciones entre progenies bajo individuos reproductivos cercanos dentro de un mismo vecindario (distancia 26-75m) fue sólo posible para plántulas en el hábitat fragmento de bosque PFB y PBG; a esta distancia r es aún significativamente mayor a lo esperado por azar. En el caso de las progenies ubicadas bajo individuos lejanos dentro del mismo vecindario (distancia 76-300m), sólo las semillas de potrero arbolado SPA presentaron r significativamente mayor. Por último, al comparar progenies ubicadas en vecindarios distintos (>300m), r fue significativamente menor a lo esperado al azar en 4 grupos de progenies (PFB, SGB, PPA y SPA).

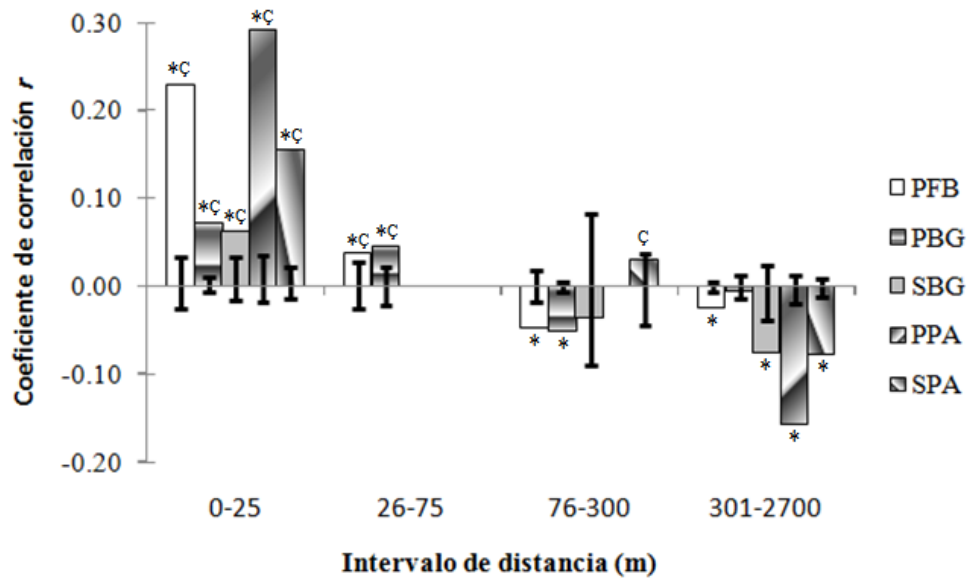


Figura 3. Estructura genética espacial a escala fina de progenies de *C. guianensis* basados en coeficiente de autocorrelación espacial r , según estadio de desarrollo y hábitat, en un paisaje fragmentado, Mogos, Península de Osa. Barras en negrita (I) indican intervalo de confianza al 95%; * $p < 0.05$, $H_0: r = 0$ ($H_a: r \neq 0$); $^c p < 0.05$, $H_0: r = 0$ ($H_a: r > 0$); PFB plántulas fragmento de bosque, PBG plántulas bosque de galería, SBG semillas bosque de galería, PPA plántulas potrero arbolado, SPA semillas potrero arbolado.

Los resultados de estructura genética espacial para las progenies de *C. guianensis* utilizando el coeficiente de coancestría ρ son similares a los obtenidos en el análisis de autocorrelación espacial r (Figura 4). Los valores de ρ son significativos para todos los grupos de progenies en el primer intervalo de distancia (0-25 m). Para los grupos PFB y PPA ρ se encuentra entre los valores esperados para pares de hermanos-completos y medios-hermanos (1/4-1/8); mientras que para los grupos PBG, SBG y SPA ρ es menor que el valor esperado para medios-hermanos (1/8). Además, se observa que ρ es menor (en el primer intervalo de distancia) para ambos grupos de progenies encontrados en el hábitat bosque de galería (PBG y SBG). En el caso del grupo PFB, el valor de ρ se

mantiene significativo en el segundo intervalo de distancia (26-75 m), aunque su magnitud es menor respecto al intervalo de distancia anterior. Por último, al comparar progenies ubicadas en la periferia de árboles lejanos dentro del mismo vecindario (76-300 m) y en vecindarios distintos (>300m), ρ fue significativamente menor a lo esperado al azar en todos los grupos de progenies (PFB, PBG, SGB, PPA y SPA).

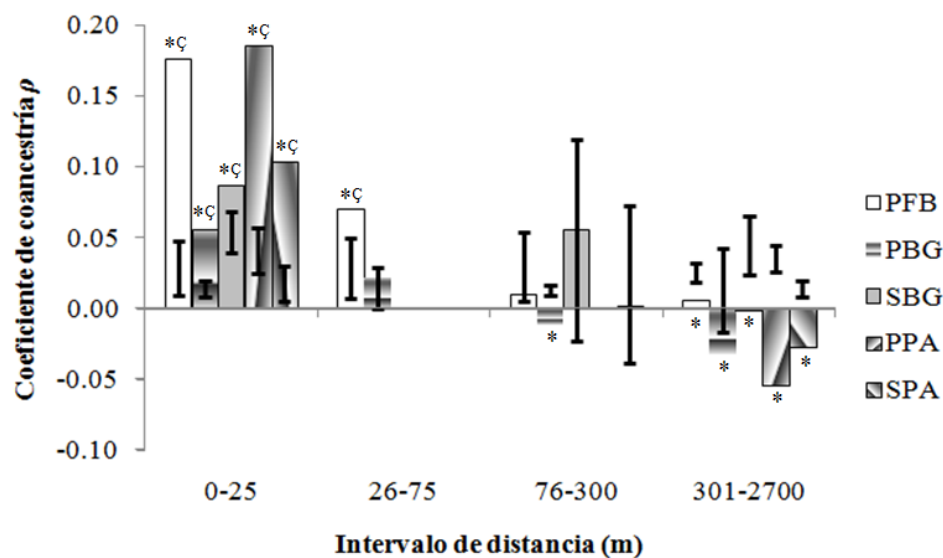


Figura 4. Estructura genética espacial a escala fina de progenies de *C. guianensis* basados en coeficiente de coancestría ρ , según estadio de desarrollo y hábitat, en un paisaje fragmentado, Mogos, Península de Osa. Barras en negrita (**I**) indican intervalo de confianza al 95%; * $p < 0.05$, $H_0: r = 0$ ($H_a: r \neq 0$); $\zeta p < 0.05$, $H_0: r = 0$ ($H_a: r > 0$); PFB plántulas fragmento de bosque, PBG plántulas bosque de galería, SGB semillas bosque de galería, PPA plántulas potrero arbolado, SPA semillas potrero arbolado.

La estadística S_p permite comparar la estructura genética espacial de diferentes grupos de individuos ya que sintetiza la información en una única medida, incluso si la estrategia de muestreo fue diferente (Vekemans y Hardy 2004). La estructura genética espacial de los individuos reproductivos de *C. guianensis* es menor a la encontrada para

las progenies. Por otra parte, el grupo plántulas de potrero arbolado (PPA) presenta mayor estructura genética espacial. Los grupos PFB, PBG y SPA muestran similares niveles de estructura genética espacial, mientras que el grupo SBG presenta la menor estructura genética espacial dentro de las progenies de *C. guianensis* (Cuadro 7).

Cuadro 7. Resumen de los análisis de regresión del coeficiente de coancestría ρ sobre el logaritmo de la distancia entre pares de individuos; y estadística Sp para individuos de *C. guianensis*, según estadio de desarrollo y hábitat, en un paisaje fragmentado, Mogos, Península de Osa

Grupo	b	Intervalo confianza b (95%)		$\rho_{(1)}$	Sp
		LI	LS		
IR	-0.0086*	-0.0053	0.0040	0.0579	0.0092
PFB	-0.0242**	-0.0053	0.0039	0.1762	0.0294
PBG	-0.0248*	-0.0034	0.0027	0.0557	0.0263
SBG	-0.0175**	-0.0096	0.0054	0.0868	0.0192
PPA	-0.0472**	-0.0061	0.0040	0.1858	0.0580
SPA	-0.0257**	-0.0049	0.0032	0.1042	0.0287
b	pendiente de la recta de regresión $\rho / \ln(\text{distancia geográfica})$				
sp	$-b_{\rho}/(1-\rho_{(1)})$				
*	p<0.05 (Ho: obs = esp)				
**	p<0.001 (Ho: obs = esp)				

Flujo de polen

De las 364 progenies de *C. guianensis* estudiadas en el paisaje de Mogos, se logró asignar paternidad a un total de 44 progenies (12%) con una confianza de 95% y 87 progenies (24%) con una confianza de 80% (Cuadro 8). Estas asignaciones de paternidad representan eventos reproductivos entre IR de *C. guianensis*, i.e. flujo de polen realizado.

Los tres hábitats presentan diferencias significativas en cuanto al número de eventos reproductivos cuyo polen tiene origen interno con aquellos cuyo polen tiene origen externo, tanto al 95 % de confianza ($\chi^2 = 8.89$; gl = 2; p = 0.012) como al 80 % de confianza ($\chi^2 = 12.95$; gl = 2; p = 0.002); es decir, en los hábitats de fragmento de bosque FB y potrero arbolado PA, en un mayor número de eventos reproductivos el polen tiene un origen externo, i.e. desde individuos reproductivos ubicados en un vecindario diferente al del árbol madre, y que implica el movimiento de polinizadores a través de la matriz de potrero arbolado; por el contrario, en el hábitat bosque de galería, en un mayor número de eventos reproductivos, el polen tiene un origen interno, i.e. desde individuos reproductivos ubicados en el mismo vecindario de bosque de galería.

Cuadro 8. Número de progenies de *C. guianensis* con asignación de paternidad según nivel de confianza, hábitat del árbol madre y origen del polen (interno, autogamia, externo) en un paisaje fragmentado, Mogos, Península de Osa

Hábitat	Asignación Confianza 95%				Total	Hábitat	Asignación Confianza 80%			Total
	Interno	Autogamia	Externo				Interno	Autogamia	Externo	
FB	3	0	10		13	FB	4	1	21	26
BG	10	0	3		13	BG	21	1	12	34
PA	5	1	12		18	PA	9	1	17	27

FB	Fragmento de bosque	Interno	Polen desde padre ubicado en mismo vecindario que madre
BG	Bosque de galería	Autogamia	Auto-fertilización
PA	Potrero arbolado	Externo	Polen desde padre ubicado en diferente vecindario que madre

La distancia de flujo de polen entre individuos reproductivos de *C. guianensis* en el paisaje fragmentado de Mogos muestra un amplio ámbito de variación (Figura 5). En el hábitat bosque de galería, el flujo de polen se da mayormente entre individuos ubicados en ese mismo fragmento (Cuadro 8), y por ende, el promedio total de la distancia de flujo

de polen es el menor entre los tres hábitats; por el contrario, en el hábitat fragmento de bosque, el flujo de polen se da mayormente entre individuos ubicados en vecindarios diferentes (Cuadro 8), y por lo tanto, el promedio total de la distancia de flujo de polen es el mayor entre los tres hábitats. La mayor distancia de flujo de polen en este análisis se presentó entre un árbol madre ubicado en el hábitat potrero arbolado y un donador de polen ubicado en un fragmento de bosque a 2182m.

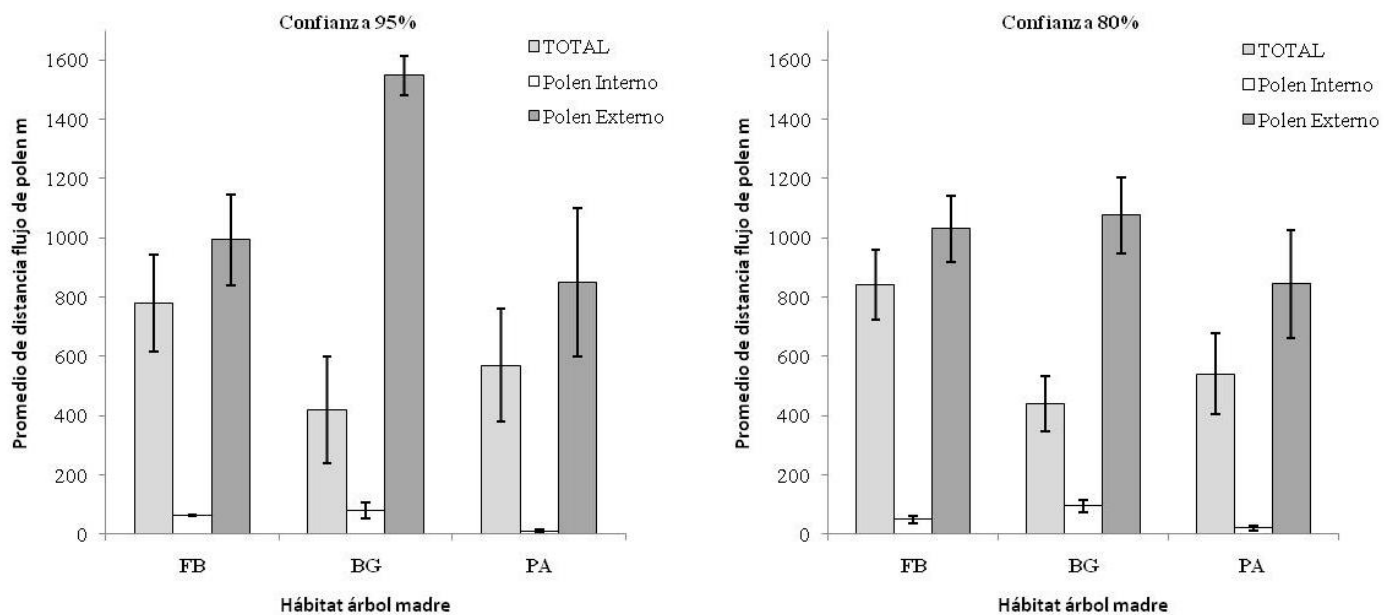


Figura 5. Promedio (\pm error estándar) de distancia de flujo de polen entre individuos reproductivos de *Carapa guianensis* según nivel de confianza, hábitat del árbol madre (FB fragmento de bosque, BG bosque de galería, PA potrero arbolado) y origen del polen (interno: padre en mismo vecindario que árbol madre y externo: padre en otro vecindario que árbol madre) en un paisaje fragmentado, Mogos, Península de Osa

Al analizar más detalladamente las asignaciones de paternidad con nivel de confianza del 80%, se observa un patrón de reproducción muy interesante en la población de *C. guianensis* en el paisaje fragmentado de Mogos (Figura 5). Existe flujo de polen a través de todo el paisaje, a pesar del alto grado de intervención humana. Tanto los individuos reproductivos ubicados en fragmentos de bosque (remanente y galería), como los individuos reproductivos ubicados en el potrero arbolado, son capaces de exportar y recibir polen hacia y desde cualquier región del área estudiada; es decir, los polinizadores de *C. guianensis* son capaces de moverse a través de la matriz de potrero arbolado manteniendo la conexión entre los árboles, incluso en distancias mayores a 2 km.

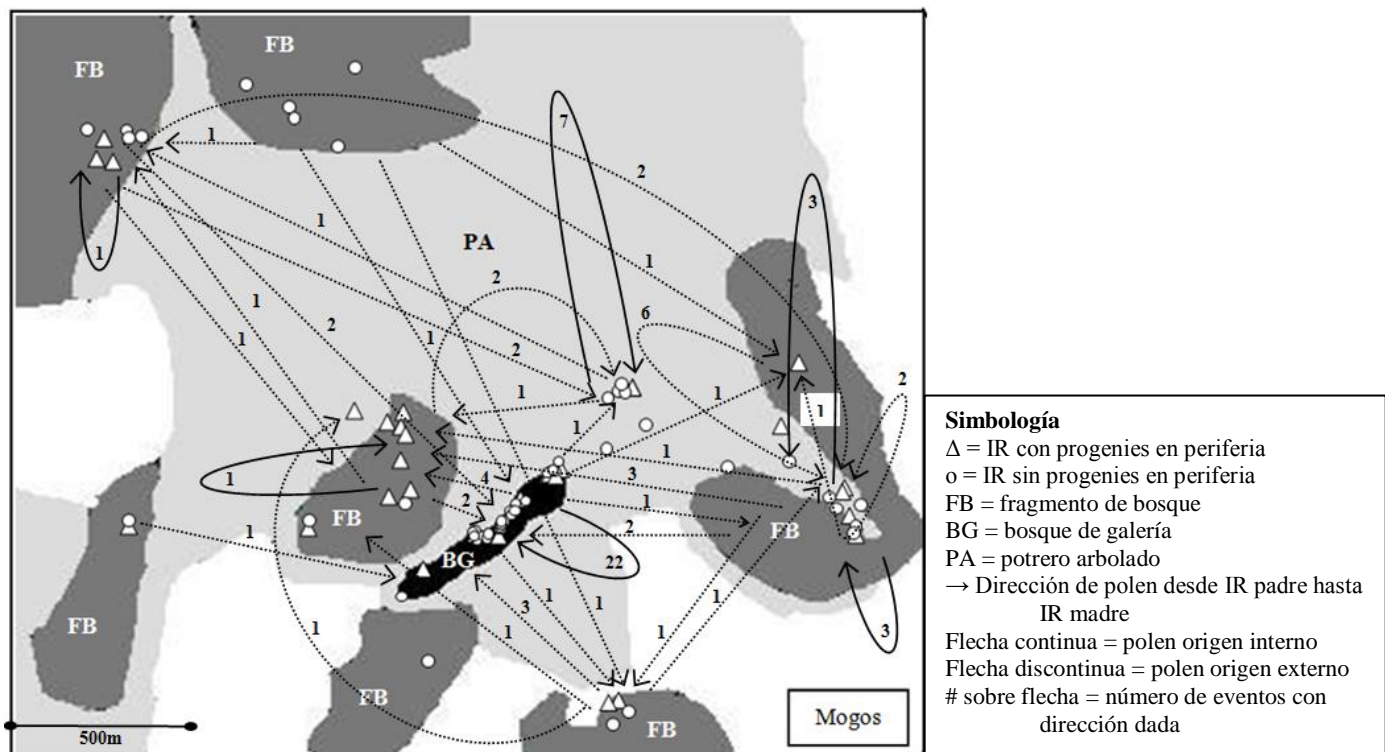


Figura 6. Eventos de flujo de polen entre individuos reproductivos de *C. guianensis* ubicados en un paisaje fragmentado, Mogos, Península de Osa (a partir de análisis de paternidad con confianza de 80%).

Discusión

Sólo una baja proporción (~1/3) de los individuos reproductivos de *C. guianensis* en el área de estudio presentaba progenies en su periferia (<25m), ya fueran recién dispersadas (semillas) o establecidas (plántulas) (Cuadro 2). Este resultado se puede deber a la combinación de tres razones principales: *i*) Se ha documentado que individuos de *C. guianensis* con DAP entre 20-30 cm son capaces de producir flores, pero no frutos (Cloutier *et al.* 2007b), y alrededor del 10% de los árboles de Mogos se encontraban en este rango de tamaño; entonces, es probable que estos individuos contribuyan únicamente con polen durante los eventos reproductivos. *ii*) A pesar que se ha reportado floración simultánea entre individuos de *Carapa guianensis* (Hall *et al.* 1994), es posible que algunos individuos en esta población presenten patrones de fenología reproductiva variable (Styles 1981), es decir, que producen flores o frutos en ciclos irregulares, fenómeno que ya ha sido reportado en otras especies de árboles tropicales (Newstrom *et al.* 1994). *iii*) Los vectores de dispersión bióticos y abióticos de semillas de *C. guianensis* podrían actuar rápidamente y apartar las semillas de su posición inicial en la sombra de semillas del árbol madre; en experimentos de exclusión de mamíferos dispersores de semillas de *C. guianensis* en la región Caribe de Costa Rica, se encontró que los roedores y otros mamíferos de mediano tamaño remueven (consumen o dispersan) casi todas las semillas en un periodo breve (menos de 3 semanas) luego de que estas fueron depositadas en el suelo del bosque (Guariguata *et al.* 2000; Guariguata *et al.* 2002). Además, las semillas presentan buena flotabilidad (Hall *et al.* 1994), por lo que pudieron ser removidas por los cauces de agua permanentes y temporales.

Alternativamente, la alteración del hábitat podría afectar negativamente la reproducción de *C. guianensis*, disminuyendo la producción de semillas (e.g. por limitación de polen) o reduciendo el reclutamiento de nuevos individuos (e.g. expresión de la depresión endogámica) (Cascante *et al.* 2002; Fuchs *et al.* 2003; Aguilar *et al.* 2006). No obstante, en estudios genéticos previos de *C. guianensis* en bosques fragmentados se reportan tasas de exocruzamiento muy altas en cohortes de semillas ($tm > 0.90$) (Cuadro 10), evidencia de flujo de polen a pesar de la alteración del hábitat (Hall *et al.* 1994; Cloutier *et al.* 2007a y 2007b); y a partir de los resultados de este estudio, es evidente que los individuos de *C. guianensis* son capaces de recibir y exportar polen en el paisaje fragmentado de Mogos (Cuadro 8, Figuras 5 y 6). No obstante, con la información disponible, no es posible descartar si algunas progenies de *C. guianensis* experimentan depresión endogámica en hábitats con diferentes condiciones.

Diversidad genética

Se ha documentado en varias especies de plantas, que la fragmentación del hábitat tiene un efecto negativo sobre su diversidad genética; y que en plantas con mayor longevidad, como en el caso de árboles, este efecto es más evidente en individuos jóvenes (semillas y plántulas) que en individuos adultos (Aguilar *et al.* 2008). Los tres grupos de progenies de *C. guianensis* estudiadas en el paisaje de Mogos, carecían de algunos alelos presentes en los individuos reproductivos: 7 alelos en progenies de potrero arbolado, 5 alelos en progenies de fragmento de bosque, 3 alelos en progenies de bosque de galería. Sin embargo, los tres grupos de progenies presentaron alelos adicionales, que están

ausentes en los individuos reproductivos: 3 alelos en progenies de fragmento de bosque y potrero arbolado, y 6 alelos en progenies de bosque de galería (Cuadro 3). Entonces, la combinación de ambas situaciones resulta en un promedio de número de alelos por locus N_a similar entre los grupos estudiados: 5.13 ± 3.00 en individuos reproductivos, 4.88 ± 3.36 en progenies de fragmento de bosque, 5.50 ± 3.82 en progenies de bosque de galería y 4.63 ± 2.83 en progenies de potrero arbolado (\pm desviación estándar).

La ausencia de algunos alelos en las progenies puede deberse a una combinación de varios factores: *i*) un resultado de fenología reproductiva variable en los árboles con esas variantes genéticas, los cuales no se reprodujeron durante el periodo de estudio; *ii*) un efecto de muestreo, que impidiera obtener progenies con esas variantes genéticas en el momento justo que se encontraban bajo los árboles; y *iii*) un efecto de las condiciones del hábitat, en donde las posibilidades de reproducción de los árboles con esas variantes genéticas y la dispersión de sus genes en todos los hábitats del paisaje son reducidas. Por otra parte, la presencia de alelos adicionales es, con alta probabilidad, resultado del flujo génico desde árboles ubicados fuera del área de estudio; de manera alterna, a pesar del muestreo intensivo dentro del área de estudio (~625 ha), los individuos reproductivos que heredaron estos alelos quizás no fueron encontrados y analizados.

Al descomponer el aporte que los óvulos y el polen realizan a la diversidad genética de las progenies de *Carapa guianensis* en los tres hábitats estudiados en Mogos, se observó que la contribución del polen a la diversidad genética es mayor que de los óvulos (Cuadro 4). La proporción de árboles con progenies en su periferia (“árboles

madre”) fue reducido en los tres hábitats: 46% de árboles en fragmento de bosque, 22% de árboles en bosque de galería y 29% de árboles en potrero arbolado; es decir, el número de individuos maternos que contribuyeron con la mayoría de los óvulos que formaron las progenies estudiadas fue reducido en relación al número total de árboles reproductivos en cada hábitat, y por lo tanto, es de esperar una menor diversidad en estos gametos. La mayor diversidad genética en el polen indica que una alta cantidad de individuos reproductivos contribuyen con gametos masculinos durante los eventos de reproducción en todos los hábitats estudiados, es decir, que el flujo génico mediado por polen de *C. guianensis* es extensivo a pesar de la fragmentación. Sin embargo, los indicadores de diversidad genética, y en especial el coeficiente de endogamia F , muestran una ligera tendencia de reducción de la heterocigosidad en los hábitats potrero arbolado y fragmento de bosque.

El promedio de número de alelos por locus N_a para la muestra total de *C. guianensis* en Mogos (N_a 6.4 ± 3.5 alelos/locus), es menor en comparación con lo reportado en otras poblaciones de esta especie donde se han analizado algunos de estos marcadores moleculares microsatélites: 14.7 ± 5.7 alelos/locus en zona Caribe de Costa Rica; 10.25 ± 5.6 y 11.2 ± 4.8 alelos/locus en la Amazonía de Brasil (Cuadro 9). Destaca el locus cg5, pues presenta un número de alelos considerablemente menor en la zona de Mogos comparada con la zona Caribe de Costa Rica; contrariamente, el locus cg11 presenta muchos alelos en la zona de Mogos; por último, los loci cg06, cg16 y cg17 son menos variables en la zona de Mogos en comparación con la Amazonía de Brasil.

Cuadro 9. Número total de alelos para 8 loci microsatélites de *C. guianensis* reportados en 5 estudios diferentes (en blanco = locus no fue analizado).

Locus	Número de Alelos de Marcadores Microsatélites				
	A	B	C*	D	E
cg5	12	28			13
cg6	4	4			
cg7	9	12			9
cg01	9		3	3	4
cg06	5		5	13	12
cg11	9		2		
cg16	1		5	16	17
cg17	2		6	9	12
Región	C.R. Pac.	C.R. Car.	Br. Ama.	Br. Ama.	Br. Ama.
A	Este estudio		C.R. Pac.	Costa Rica, Pacífico	
B	Dayanandan <i>et al.</i> 1999		C.R. Car.	Costa Rica, Caribe	
C	Vinson <i>et al.</i> 2005		Br. Ama.	Brasil, Amazonia	
D	Cloutier <i>et al.</i> 2007a		*	n = 12 individuos	
E	Cloutier <i>et al.</i> 2007b				

La heterocigosidad de los individuos reproductivos de *C. guianensis* en Mogos ($H_o \sim 0.389$) es menor que la reportada para *C. guianensis* en el Caribe de Costa Rica ($H_o \sim 0.56-0.72$) y en la Amazonía de Brasil ($H_o \sim 0.65-0.68$) (Cuadro 10). Por otro lado, la muestra de individuos reproductivos, las progenies de fragmento de bosque y las progenies de potrero arbolado de *C. guianensis* en Mogos presentan una deficiencia significativa de heterocigotos, pues los valores del coeficiente de endogamia F obtenidos son significativamente mayores que cero (Cuadro 4). No obstante, valores similares de F se encontraron en una población de *C. guianensis* en la Amazonía de Brasil (Cuadro 10), incluso en grupos de individuos de diferentes edades, y tanto antes como después de la intervención humana (extracción selectiva).

Cuadro 10. Resumen de resultados de tres estudios genéticos publicados para *Carapa guianensis* en el Neotrópico donde se han utilizado marcadores microsatélites (*Ne* número efectivo de alelos; *Ho* heterocigosidad observada; *F* índice de fijación; *tm* tasa de exocruzamiento multi-locus)

Ubicación	Hábitat	N° Loci	Marcador	Estadio	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>F</i>	<i>tm</i>	
<i>C. guianensis</i> Caribe Costa Rica 1	Explotación	tres	MS	Adultos	3.87 (0.71)	0.68 (0.08)	0.02 (0.02)	-	
				Juveniles	4.97 (1.20)	0.72 (0.12)	-0.11 (0.03)		
	Natural	tres	MS	Adultos	4.07 (1.89)	0.62 (0.20)	0.01 (0.08)	-	
				Juveniles	3.14 (1.25)	0.56 (0.22)	-0.05 (0.02)		
	<i>C. guianensis</i> Amazonía Brasil 2	Natural	cuatro	MS	Adultos	-	-	0.029	0.918 ^a (0.033)
					Semillas	4.04 (0.93)	0.68 (0.11)	0.03 (0.03)	
<i>C. guianensis</i> Amazonía Brasil 3	Pre-explotación	seis	MS	Adultos	-	0.65 (0.18)	0.059* (0.033)	0.939 ^a (0.027)	
				Juveniles	-	0.68 (0.17)	0.048* (0.023)		
				Plántulas	-	0.65 (0.19)	0.079* (0.034)		
				Semillas	-	0.68 (0.21)	0.025* (0.022)		
	Post-explotación	seis	MS	Adultos	-	0.67 (0.24)	0.056 (0.042)	0.927 ^a (0.033)	
				Semillas	-	0.67 (0.18)	0.049* (0.013)		

1	Dayanandan <i>et al.</i> 199 ^a	-	Información no detallada
2	Cloutier <i>et al.</i> 2007a	*	Ho: $F=0$ ($p<0.05$)
3	Cloutier <i>et al.</i> 2007b	^a	Ho: $tm=1$ ($p<0.05$)
MS	Microsatélites	(#)	error

Las diferencias genéticas observadas entre las poblaciones de *C. guianensis* pueden deberse a procesos biogeográficos, demográficos y genéticos a los que estas poblaciones han sido sometidas durante generaciones, y que posiblemente han diferido a través de su distribución actual en el Neotrópico. Algunos procesos implican

generalmente una reducción en la diversidad genética, como son: efecto fundador y dispersión a larga distancia durante la colonización de nuevas áreas; eventos de cuello de botella demográficos y genéticos posteriores, en muchas ocasiones producidos por cambios ambientales; y fijación de diferentes alelos por deriva génica. Por otra parte, a través del proceso de mutación se generan alelos diferentes en cada población, incrementando la diversidad genética y produciendo diferenciación entre poblaciones (Hedrick 2005). Más recientemente, las actividades humanas se han realizado con diferente intensidad en cada población; en el caso de Mogos, los procesos de extracción selectiva de madera y de tala de bosque pudieron producir la pérdida de diversidad genética que ya no se encuentra en los individuos remanentes de *C. guianensis*; sin embargo, este efecto no puede ser evaluado con la información disponible. El nivel significativo de endogamia observado en *C. guianensis*, tanto en adultos como en progenies, se debe probablemente a auto-fertilización o endogamia biparental (Hedrick y Miller 1992). En el caso del locus *cg5*, Dayanandan y colaboradores (1999) reportan un total de 28 alelos, un número considerablemente mayor a lo observado en Mogos; no obstante, estos autores reportan alelos con diferencias de tamaño de 1pb, los cuales podrían corresponder a errores enzimáticos durante los procesos de amplificación de los marcadores (e.g. adición de nucleótidos por la *Taq* polimerasa) o de su determinación (i.e. electroforesis en geles de poliacrilamida), y no necesariamente alelos reales independientes.

Estructura genética espacial a escala fina

La estructura genética espacial dentro de poblaciones, ocurre primariamente a través de la dispersión localizada de genes, en especial de semillas (Vekemans y Hardy 2004; Fuchs y Hamrick 2010a). Los individuos reproductivos de *Carapa guianensis* en Mogos presentan estructura genética espacial reducida, pues sólo se encontraron valores del coeficiente de autocorrelación r y del coeficiente de coancestría ρ por encima del intervalo de confianza de 95% en el primer intervalo de distancia (0-25m); es decir, que los árboles vecinos presentan un grado de parentesco mayor que lo esperado al azar; pero el valor de coeficiente de coancestría en este intervalo (0.0579) es muy inferior al esperado para medios hermanos (1/8). Este patrón de relación genética desaparece rápidamente, pues ya en el segundo intervalo de distancia (26-50m) los valores de r y ρ se encuentran dentro del intervalo de confianza de 95% (Figura 2, Cuadro 6). Otras especies de árboles han mostrado también reducida estructura genética espacial en cohortes de adultos (Vekemans y Hardy 2004). La reducción en la estructura genética espacial se espera, incluso en especies que presentan dispersión de semillas restringida, si existen procesos demográficos y ecológicos que conllevan a la eliminación de muchos individuos durante estadios iniciales (plántulas y juveniles), como son el auto-raleo, la competencia intra-específica, la depredación y el parasitismo; procesos que permiten la sobrevivencia y establecimiento final de pocos individuos provenientes de cada sombra de semillas (Fuchs y Hamrick 2010a).

Las progenies de *Carapa guianensis* en Mogos mostraron una estructura genética espacial más fuerte que la observada en individuos reproductivos; el gran tamaño de las semillas de *C. guianensis* y los mecanismos bióticos y abióticos de dispersión de estas, pueden favorecer una distribución localizada, condición que explica observar estructura genética significativa en el primer intervalo de distancia (0-25m) para todos los grupos de progenies (Figuras 3 y 4). Sin embargo, la intensidad de la estructura genética espacial para las progenies no es homogénea en los tres hábitats del paisaje de Mogos (Cuadro 7).

En el primer intervalo de distancia (0-25), es decir, entre progenies en la periferia del mismo individuo reproductivo, los coeficientes de autocorrelación espacial r y de coancestría ρ fueron mayores para las plántulas y semillas en potrero arbolado, y plántulas en fragmento de bosque, lo que permite inferir que estas progenies representan principalmente una mezcla de hermanos-completos ($\rho=1/4$) y de medios-hermanos ($\rho=1/8$) (Figuras 3 y 4). Por otro lado, ambos grupos de progenies (plántulas y semillas) en el hábitat bosque de galería, presentaron coeficientes de autocorrelación espacial r y de coancestría ρ considerablemente menores en este mismo intervalo de distancia, con valores de ρ cercanos a la mitad de lo esperado para medios-hermanos (1/16). Entonces, el grado de parentesco entre una progenie y sus vecinas depende la ubicación espacial de esa progenie en el paisaje, y estas diferencias se deben probablemente a la variación en los patrones de reproducción (flujo de polen) de los individuos reproductivos de *C. guianensis* según el hábitat (Cuadro 8, Figuras 5 y 6).

Las diferencias en los patrones de flujo de polen entre los individuos reproductivos de *C. guianensis* posiblemente resultan del cambio en los patrones de forrajeo de los insectos polinizadores según las condiciones que presenta cada hábitat (Álvarez-Buylla *et al.* 1996; Hamrick 2004; Lowe *et al.* 2005; Aguilar *et al.* 2006). Los hábitats potrero arbolado y fragmento de bosque presentan una baja densidad de árboles de *C. guianensis* (menos de 2 árboles/ha). Los polinizadores podrían visitar una menor variedad de individuos reproductivos, e incluso aumentar la proporción de autofertilización, pues requieren gastar mucha energía para desplazarse entre árboles distanciados. Entonces, este comportamiento genera una reducción en la variedad de polen que llega a cada árbol, y por ende, aumenta la similitud genética entre las progenies. Empero, cuando suceden eventos de exocruzamiento, el flujo de polen se da a larga distancia (Vekemans y Hardy 2004).

Por el contrario, en condiciones de alta densidad de individuos reproductivos, como ocurre en el bosque de galería (14-18 árboles/ha), los polinizadores encuentran muchos recursos florales, y por lo tanto, se mueven con mayor frecuencia entre los árboles disponibles en el mismo vecindario y a menor distancia, pues este comportamiento favorece la eficiencia energética. Entonces, un árbol madre puede recibir polen de una mayor cantidad de fuentes distintas, produciendo una cohorte de semillas con alta heterogeneidad genética, y por ende, menor relación genética. Además, los eventos de exocruzamiento con árboles ubicados en otros vecindarios, reducen aún más el nivel de relación genética entre las progenies. Por otra parte, en condiciones de alta densidad de individuos, puede existir un mayor traslape en la sombra de semillas de

árboles vecinos, lo que también reduce la estructura genética. En poblaciones de otras especies de plantas, también se ha encontrado estructura genética espacial más fuerte en condiciones de baja densidad de individuos que en condiciones de alta densidad de individuos (Vekemans y Hardy 2004).

En relación a la estructura genética entre progenies en el segundo intervalo de distancia (26-75 m), que representa progenies de individuos reproductivos en el mismo vecindario, sólo fue posible estimar los valores de los coeficientes de autocorrelación espacial r y de coancestría ρ para las plántulas de fragmento de bosque y plántulas de bosque de galería, debido a la ubicación espacial de los grupos de progenies en cada hábitat (Figuras 3 y 4). Ambos grupos de progenies presentan una tendencia similar a la encontrada en el intervalo de distancia anterior, pues ambos coeficientes (r y ρ) son significativos para plántulas de fragmento de bosque; mientras que en plántulas de bosque de galería sólo el coeficiente de autocorrelación espacial r es significativo, pero no así el coeficiente de coancestría ρ . Similar a lo expuesto anteriormente, la variación entre los hábitats en la densidad de individuos reproductivos y la intervención humana puede explicar la diferencia en la magnitud de la estructura genética espacial en el segundo intervalo de distancia.

Los coeficientes de autocorrelación espacial r y de coancestría ρ para las progenies ubicadas a mayor distancia, pero dentro del mismo vecindario (76-300m), se encuentran dentro, o son menores, que el intervalo de confianza de 95%, para las plántulas de fragmento de bosque, plántulas de bosque de galería y semillas de bosque de

galería de *C. guianensis* (Figuras 3 y 4). Es decir, a más de 76 m dentro del mismo vecindario, las progenies presentan muy poca relación genética. En las semillas de potrero arbolado, el coeficiente r es significativamente mayor que lo esperado al azar en este mismo intervalo de distancia, pero el coeficiente ρ no es significativo. Por último, no se pudieron obtener resultados en este intervalo para las plántulas de potrero arbolado. De estos resultados se puede inferir que las progenies de *C. guianensis* pierden cualquier indicio de estructura genética espacial a partir de este intervalo de distancia (76-300m), aún cuando se encuentran en el mismo vecindario. Por último, los valores de los coeficientes de relación genética en el último intervalo de distancia (301-2700m) están por debajo del intervalo de confianza de 95% para todos los grupos de progenies de *C. guianensis* estudiados en Mogos, resultado esperado, pues a esta distancia las progenies se encuentran en vecindarios distintos.

La estadística S_p permite sintetizar la estructura genética espacial a escala fina con el fin de realizar comparaciones dentro y entre poblaciones de la misma, o diferentes especies (Vekemans y Hardy 2004). Los resultados de la estadística S_p para los grupos de individuos de *Carapa guianensis*, permiten confirmar que las progenies presentan una estructura genética espacial más fuerte que los individuos reproductivos; de hecho, la estadística S_p para los grupos de progenies representa entre 2 y 6 veces la estadística S_p para los individuos reproductivos (Cuadro 7). Además, las diferencias en la estadística S_p son también considerables entre grupos de progenies ubicados en diferentes hábitats del paisaje; por ejemplo, la estadística S_p para las plántulas de potrero arbolado representa entre 2 y 3 veces la estadística S_p para los restantes grupos de progenies, es decir, el

grupo plántulas de potrero arbolado presenta un patrón más fuerte de estructura genética espacial. Estas observaciones son muy importantes, pues demuestran que la diversidad genética y los patrones de reproducción son heterogéneos a nivel espacial dentro del paisaje de la localidad de Mogos. Además, son heterogéneos entre diferentes estadios de desarrollo.

Las estadísticas Sp calculadas en este estudio, pueden compararse a las mismas estadísticas calculadas a partir de la información genética reportada por Cloutier y colaboradores (2007b) para una población de *C. guianensis* en la Amazonía de Brasil. Fue posible calcular la estadística Sp para cohortes de individuos en diferentes estadios de desarrollo, antes y después del proceso de extracción selectiva a la que fue sometida esta población (Cuadro 11). La estructura genética espacial en los adultos de esta población aumentó luego del proceso de extracción selectiva; los individuos juveniles mostraron una estructura genética espacial similar a los adultos, fenómeno que apoya la hipótesis de reducción en la estructura genética espacial al aumentar la edad de las cohortes; finalmente, las plántulas mostraron un patrón más fuerte de estructura genética espacial. Los valores de la estadística Sp para los adultos de *C. guianensis* antes y después del proceso de extracción en la población de la Amazonía, son ligeramente menores que el valor de Sp encontrado para los individuos reproductivos en Mogos (Cuadro 7). Pero, la tendencia en ambas poblaciones es similar: reducida estructura genética espacial en cohortes de adultos y fuerte estructura genética espacial en cohortes de progenies jóvenes. Por consiguiente, es posible que los procesos demográficos, genéticos y ecológicos que degeneran los patrones de estructura genética espacial, sean similares a través del ámbito

de distribución de esta especie. No obstante, para esta población de la Amazonía de Brasil (Cloutier *et al.* 2007b), los autores no brindan información suficiente para evaluar la estadística Sp en progenies recientes luego del proceso de extracción selectiva, información importante si se desea determinar el impacto global sobre esta población.

Cuadro 11. Valores de la estadística Sp para una población de *Carapa guianensis* en la Amazonía de Brasil, según estadio de desarrollo y condición de extracción selectiva (Cloutier *et al.* 2007b)

Estadio	n	Sp
Pre-extracción		
Adultos	199	0.0045
Juveniles	82	0.0048
Plántulas	84	0.0188
Post-extracción		
Adultos	139	0.0063

Vekemans y Hardy (2004) determinaron la estadística Sp en 47 especies de plantas, como indicador de magnitud de la estructura genética espacial. Encontraron que la estadística Sp está significativamente relacionada con el sistema de apareamiento, la forma de vida y la densidad de individuos. De manera congruente, la estadística Sp para los individuos reproductivos de *C. guianensis* en Mogos se encuentra dentro del ámbito reportado para *i*) especies con sistema de apareamiento por exocruzamiento, *ii*) especies con forma de vida arbórea, y *iii*) especies con alta densidad. También, Vekemans y Hardy (2004) reportan tendencias no significativas de relación de la estadística Sp con el tipo de polinizador y tipo de dispersión. La estadística Sp para los individuos reproductivos de *C. guianensis* en Mogos, se encuentra dentro del ámbito reportado para especies polinizadas por animales y especies dispersadas por vectores abióticos (e.g gravedad o viento).

Discrepancia genética de las progenies con el árbol más cercano

Un resultado muy interesante de esta investigación fue encontrar, en la periferia y bajo la copa de algunos individuos reproductivos, muchas progenies genéticamente discrepantes, principalmente en los hábitats fragmento de bosque y bosque de galería (Cuadro 5). Sin embargo, este resultado parece estar en contradicción con los resultados de estructura genética espacial en el primer intervalo de distancia, principalmente en el hábitat fragmento de bosque, pues 28 progenies (28%) son genéticamente discrepantes con el individuo reproductivo más cercano; y sin embargo, los coeficientes r y ρ son muy altos (mezcla de hermanos-completos y medios-hermanos). En el hábitat bosque de galería, 24 progenies (16%) son genéticamente discrepantes con el individuo reproductivo más cercano, pero los coeficientes r y ρ son menores.

La discrepancia genética puede ser el producto de varias situaciones no excluyentes. Primero, pudieron existir problemas experimentales en el laboratorio que llevaran a determinar genotipos erróneamente; sin embargo, se observó que estos marcadores microsatélites son bastante consistentes dentro y entre individuos; además, algunas progenies son discrepantes hasta para 4 loci, lo que indica que la discrepancia genética puede tener un origen distinto. La razón más probable para la discrepancia genética, es entonces la dispersión de las progenies desde la sombra de semillas de un árbol lejano, que posteriormente se establecieron cerca de otro árbol no emparentado.

Como se mencionó previamente, las semillas de *C. guianensis* son rápidamente removidas por mamíferos de mediano tamaño, principalmente roedores (Guariguata *et al.* 2002); estos animales almacenan las semillas en el suelo, muchas veces en sitios con condiciones apropiadas para la germinación, y las distribuyen espacialmente lejos del árbol fuente y de forma aleatoria; luego, algunas de estas semillas almacenadas pudieron escapar de la depredación, y entonces germinaron y establecieron (Vander Wall y Beck 2011). Ambos hábitats de bosque presentan condiciones apropiadas para la permanencia de los animales dispersores de semillas de *C. guianensis*. Además, las características físicas de ambos hábitats de bosque propician la dispersión de semillas de *C. guianensis* por medios abióticos: en el hábitat fragmento de bosque hay muchos terrenos con pendiente pronunciada y con cauces de agua estacionales, facilitando la dispersión de semillas por gravedad o por agua; en el hábitat bosque de galería hay un cauce de agua permanente e inundaciones periódicas fuera de este cauce, que pudieron dispersar las semillas. Por el contrario, el hábitat potrero arbolado carece de cobertura boscosa, por lo que la presencia de animales dispersores es poco probable. Por último, el traslape en la sombra de semillas de individuos reproductivos diferentes ocurre en hábitats con alta densidad de individuos; entonces, es posible encontrar progenies en la cercanía de un árbol que no fueron producidas por el mismo, sino por un árbol cercano no emparentado; esta situación probablemente se presenta en el hábitat bosque de galería. Empero, estos efectos no son muy fuertes a través de todo el paisaje, pues si la dispersión de semillas es frecuente, y existe mucho traslape en la sombra de semillas de individuos reproductivos diferentes, se espera la ausencia de estructura genética espacial.

El análisis detallado de las discrepancias genéticas y de la estructura genética espacial permite explicar estas contradicciones. Los coeficientes de relación genética que utilizan los análisis de estructura genética espacial, son valores promedio de relación genética entre pares de progenies ubicadas a determinada distancia. Sin embargo, estos promedios están encubriendo heterogeneidad en el grado de parentesco entre las progenies. En el hábitat fragmento de bosque, 23 progenies discrepantes se concentraron en tres árboles, mientras que cinco árboles presentaron sólo 1 progenie discrepante (Cuadro 5) y ocho árboles no presentaron progenies discrepantes. En el bosque de galería, 20 progenies discrepantes se concentraron en 3 árboles, mientras cinco árboles presentaron 1 progenie discrepante (Cuadro 5) y un árbol no presentó progenies discrepantes. Entonces, la alta discrepancia en algunos individuos reproductivos es compensada por ausencia de discrepancia en otros individuos reproductivos (mayor similitud genética entre pares de progenies), por lo que el promedio de los coeficientes de relación genética entre progenies cercanas es aún significativo.

Flujo de polen

El análisis de paternidad utilizado para estudiar el flujo de polen de *C. guianensis* en Mogos permitió asignar paternidad a 44 progenies con confianza de 95% y 87 progenies con confianza de 80% de un total de 364 progenies analizadas (Cuadro 8); aunque estas asignaciones sólo representan un porcentaje menor al 25% del total de progenies, los resultados reflejan apropiadamente el patrón general de reproducción de *C. guianensis* en el paisaje de Mogos, pues el análisis de paternidad se realizó bajo

condiciones muy estrictas, i.e. el padre asignado en cada caso tiene muy alta probabilidad de ser el padre verdadero. No obstante, este acercamiento presenta un inconveniente, pues asume que el árbol más cercano es la “madre” (productor de la semilla), y el árbol asignado el “padre” (donador de polen); y es posible que en algunos casos el árbol más cercano sea en realidad el donador de polen, y dicha progenie fuera dispersada, como semilla, desde otro árbol. Pero, dadas las características de las semillas y su modo de dispersión, es bastante probable que, para una progenie dada, el árbol más cercano sea su “madre”.

Contrario a la predicción inicial, los polinizadores de *C. guianensis* son capaces de desplazarse a través del paisaje fragmentado de Mogos, incluso a través de la matriz de potrero arbolado, y de esta forma mantener el flujo de polen entre árboles ubicados en los tres hábitats estudiados, con distancias de hasta 2182 m (Figuras 5 y 6). Sin embargo, los tres hábitats presentan diferencias significativas respecto al origen del polen que participa en los eventos reproductivos. En el hábitat bosque de galería, los “árboles madre” reciben una mayor proporción de polen de individuos ubicados en este mismo hábitat. Por otra parte, tanto en el hábitat fragmento de bosque como en el hábitat potrero arbolado, los “árboles madre” reciben una mayor proporción de polen proveniente de individuos ubicados en vecindarios diferentes y a distancias considerables (hasta 2 km) (Cuadro 8, Figuras 5 y 6). Como consecuencia, la distancia promedio de flujo de polen es mayor en árboles ubicados en los hábitats fragmento de bosque y potrero arbolado.

Los resultados de flujo de polen complementan los resultados de estructura genética espacial a escala fina. Como se mencionó en el apartado de estructura genética espacial, es posible que los polinizadores de *C. guianensis* presenten patrones de forrajeo diferentes según las condiciones de cada hábitat; en áreas con mayor densidad de árboles (mayor cantidad de recursos), como el caso del bosque de galería, muchos desplazamientos se dan a corta distancia, permitiendo que los árboles allí ubicados reciban polen desde muchos árboles ubicados en el mismo vecindario; como consecuencia, el promedio total de las distancias de flujo de polen son reducidas (420-440 m). Por el contrario, en áreas con baja densidad de individuos, los polinizadores visitan una menor cantidad de árboles diferentes, e incluso pueden aumentar la frecuencia de la auto-fertilización, lo que reduce la diversidad del polen; pero los desplazamientos de los polinizadores entre árboles distintos se dan a larga distancia; por lo tanto, el promedio total de las distancias de flujo de polen son mayores (779-842 m en fragmento de bosque y 540-570 m en potrero arbolado).

Se pudo determinar que tres progenies, una en cada hábitat estudiado, resultaron de eventos de auto-fertilización, a partir del análisis de asignación de paternidad con confianza de 80% (Cuadro 8). Empero, es posible que muchas progenies no asignadas, principalmente las provenientes del hábitat potrero arbolado, sean el producto de eventos de auto-fertilización, pues a partir de una inspección visual de los genotipos de estas progenies, se observó que muchas presentaban los mismos alelos que el árbol más cercano. Mientras tanto, este patrón no fue claro en progenies provenientes de los dos hábitats con remanentes de bosque. Por otra parte, muchas de las progenies no asignadas

a los árboles muestreados, pudieron producirse a partir de polen proveniente de árboles ubicados en la periferia del área muestreada; hipótesis muy probable dada la capacidad de movimiento de polen a larga distancia observada en Mogos y sustentada por la presencia de alelos adicionales en las progenies.

Las distancias de flujo de polen de *C. guianensis* en la población de Mogos son mucho mayores que las estimadas para una población de la Amazonía de Brasil (~ 70-270 m) (Cloutier *et al.* 2007a y 2007b) (Cuadro 12). No obstante, los acercamientos utilizados para estimar el flujo de polen en ambas poblaciones presentan diferencias muy importantes. En esta investigación se utilizó un método directo basado en análisis de paternidad, que permite determinar eventos de reproducción entre individuos reproductivos con una alta confiabilidad. Cloutier y colaboradores (2007a y 2007b) utilizaron el acercamiento “Twogener” (dos-generaciones), método indirecto que estima la diferenciación genética Φ_{FT} entre las nubes de polen en diferentes árboles madre, y a partir de Φ_{FT} se estima la distancia de flujo de polen (Smouse *et al.* 2001); no obstante, los resultados de Twogener dependen de la densidad efectiva de individuos reproductivos, dato difícil de determinar en condiciones naturales.

Los resultados de flujo de polen de la población de *Carapa guianensis* en el paisaje de Mogos, sirven como apoyo al patrón observado en un considerable número de especies de árboles tropicales en paisajes fragmentados: flujo de polen a muy larga distancia a pesar de la alteración del hábitat, con movimiento de polinizadores a través de áreas sin cobertura vegetal, incluso por varios kilómetros. Algunos ejemplos donde

también se ha observado este patrón son *Albizia lebbbeck*, *Cecropia obtusifolia*, *Dinizia excelsa*, *Dipteryx panamensis*, *Guaiacum sanctum*, *Hymenaea courbaril* y *Swietenia humilis*. Estos resultados contrastan con los estudios de poblaciones en paisajes con bosque continuo de las especies neotropicales *Dipteryx panamensis* y *Swietenia macrophylla*, y de la especie asiática *Neobalanocarpus heimii*: el flujo de polen se da principalmente entre vecinos cercanos, y por ende, las distancias de flujo de polen son reducidas (<250m) (Cuadro 12).

Cuadro 12. Resumen de resultados de estudios que estiman el flujo de polen en 14 especies de árboles tropicales.

Especie	Condición paisaje	Distancia flujo de polen	Ubicación	Método*	Fuente
<i>Carapa guianensis</i>	Bosque continuo	69 - 218 m	Para, Brasil	Twogener	Cloutier <i>et al.</i> 2007a
<i>Carapa guianensis</i>	Bosque continuo	75 - 265 m	Para, Brasil	Twogener	Cloutier <i>et al.</i> 2007b
<i>Albizia lebbbeck</i>	Bosque fragmentado	44-100% polen externo 60 - 450 m	Sierra Bermeja, Puerto Rico	Paternidad categórica	Dunphy y Hamrick 2004
<i>Cecropia obtusifolia</i>	Bosque fragmentado	27% > 6 km 9.6% > 14 km	Los Tuxlas, Mexico	Paternidad fraccional	Kaufman <i>et al.</i> 1998
<i>Dinizia excelsa</i>	Bosque fragmentado	128 - 3200 m	Manaus, Brasil	Paternidad categórica	Dick 2001
<i>Dipteryx panamensis</i>	Bosque continuo	240.1 (± 192.6)m	Sarapiquí, Costa Rica	Paternidad categórica	Hanson <i>et al.</i> 2008
	Bosque fragmentado	342.8 (±286.9) m			
	Potrero	317.5 (±385.7) m			
	Potrero aislado	556.9 (±761.1) m			
<i>Guaiacum sactum</i>	Bosque fragmentado	1276 (± 91.8) m	Cuajiniquil, Costa Rica	Paternidad fraccional	Fuchs y Hamrick 2010b
<i>Hymenaea courbaril</i>	Bosque fragmentado	62% > 800 m 42% > 600m	Sierra Bermeja, Puerto Rico	Paternidad categórica	Dunphy <i>et al.</i> 2004
<i>Swietenia humilis</i>	Bosque fragmentado	40% < 300 m máximo ~ 4500 m	Punta Ratón, Honduras	Paternidad fraccional	White <i>et al.</i> 2002
<i>Swietenia macrophylla</i>	Bosque continuo	< 200m	Zona Norte, Costa Rica	Exclusión simple	Lowe <i>et al.</i> 2003
<i>Neobalanocarpus heimii</i>	Bosque continuo	191.2 (±104.9) m máximo ~ 664 m	Pasoh, Malasia	Paternidad categórica	Konuma <i>et al.</i> 2000
<i>Bursera simarouba</i>	Bosque fragmentado	320 - 361 m	Sierra Bermeja, Puerto Rico	Twogener	Dunphy y Hamrick 2007
<i>Dinizia excelsa</i>	Bosque continuo	188 - 212 m	Manaus, Brasil	Twogener	Dick <i>et al.</i> 2003
<i>Sextonia rubra</i>	Bosque fragmentado	1264 - 1509 m			
<i>Sextonia rubra</i>	Bosque extracción selectiva	65 - 89 m	Paracou, Guyana Francesa	Twogener	Veron <i>et al.</i> 2005
<i>Symphonia globulifera</i>	Bosque extracción selectiva	27 - 53 m	Paracou, Guyana Francesa	Twogener	Degen <i>et al.</i> 2004
<i>Vouacapoua americana</i>	Bosque extracción selectiva	51 - 166 m	Paracou y Nouragues, Guyana Francesa	EGE	Dutech <i>et al.</i> 2002

Paternidad Análisis de paternidad
 Twogener Análisis de dos-generaciones
 EGE Estructura Genética Espacial

Al igual que el análisis realizado para *Carapa guianensis* en Brasil (Cloutier *et al.* 2007a y 2007b), en otras especies de árboles tropicales se ha intentado estimar la distancia de flujo de polen a través de métodos indirectos (Cuadro 12). En *Bursera simarouba*, *Dinizia excelsa*, *Sextonia rubra* y *Symphonia globulifera* se utilizó el acercamiento “Twogener”; las distancias de flujo de polen estimadas fueron menores a los 400 m en todos los estudios; excepto para la población de *Dinizia excelsa* en un paisaje fragmentado, donde se estimó la distancia de flujo de polen entre 1200-1500 m. Otro acercamiento indirecto se utilizó para estimar el flujo de polen en *Vouacapoua americana*, basado en la estructura genética espacial. En este acercamiento, el inverso de la pendiente de regresión entre los coeficientes de relación genética y la distancia geográfica, se utiliza para calcular el flujo génico histórico, que luego se descompone en la contribución de semillas y de polen. Al igual que “Twogener”, este acercamiento asume condiciones que difícilmente se cumplen en poblaciones naturales; y por lo tanto, los resultados de ambos acercamientos deben tomarse con cautela.

Conclusiones y Recomendaciones

- Los resultados de esta investigación indican que en el paisaje fragmentado de Mogos, Península de Osa, la población de *Carapa guianensis* presenta flujo de polen importante a distancias considerables, lo que supone que el movimiento de los posibles polinizadores no se ha visto limitado por la alteración del hábitat. No obstante, la densidad de individuos reproductivos de *Carapa guianensis* en las diferentes zonas del paisaje puede influenciar los niveles de flujo de polen y los patrones de estructura genética espacial de las progenies.
- Esta población de *Carapa guianensis* muestra niveles considerables de diversidad genética. Las progenies presentan niveles similares de diversidad genética que los individuos reproductivos. No obstante, las progenies provenientes del potrero arbolado mostraron una ligera reducción en la diversidad genética. Los individuos reproductivos, y los grupos de progenies provenientes de los hábitats fragmento de bosque y potrero arbolado, presentan un coeficiente de endogamia F significativo ($F > 0$), posiblemente como resultado de auto-fertilización y endogamia biparental (reproducción entre árboles emparentados).
- Los individuos reproductivos de *Carapa guianensis* muestran una reducida estructura genética espacial; únicamente los vecinos (a menos de 25m) presentan coeficientes de relación genética significativos. Por el contrario, las progenies de *C. guianensis* muestran una fuerte estructura genética espacial, incluso a una

distancia de 75m, lo que representa entre 2 y 6 veces la estructura observada en los individuos reproductivos. Esto demuestra la dispersión limitada de las progenies de *C. guianensis*. Pero, en estadios de desarrollo posteriores, se pierde la estructura genética espacial.

- En los hábitats fragmento de bosque y bosque de galería, se encontró una cantidad considerable de progenies de *Carapa guianensis* genéticamente discrepantes con el individuo reproductivo más cercano; la causa más probable de este fenómeno es la dispersión de semillas, pues ambos hábitats favorecen la acción de los vectores bióticos y abióticos. No obstante, la dispersión de las progenies no es suficiente para eliminar la fuerte estructura genética espacial observada.
- El flujo de polen de *Carapa guianensis* en el paisaje fragmentado de Mogos es extensivo, y por lo tanto, puede reducir los efectos negativos de la deriva génica en este paisaje fragmentado. Los insectos polinizadores de esta especie son capaces de desplazarse a través de la matriz de potrero arbolado, y como consecuencia, individuos reproductivos ubicados en los diferentes fragmentos de bosque remanente o aislados en la matriz de potrero, son capaces de exportar y recibir polen hacia y desde todo el paisaje. Entonces, es importante proteger a todos los individuos reproductivos de esta especie, pues son capaces de contribuir con gametos en los eventos reproductivos.

- Los patrones de reproducción no son homogéneos a través de todo el paisaje. Por un efecto de baja densidad de individuos reproductivos en los hábitats fragmento de bosque y potrero arbolado, es probable que los polinizadores de *Carapa guianensis* visiten una menor cantidad de árboles distintos e incrementen la frecuencia de visitas entre flores del mismo árbol, favoreciendo la autofertilización; entonces, los árboles en estos dos hábitats, reciben polen con una menor diversidad genética. Como consecuencia, la estructura genética espacial de las progenies en ambos hábitats es muy fuerte, y la diversidad genética es ligeramente menor. Por otra parte, como los árboles se encuentran más separados espacialmente, suceden con mayor probabilidad eventos de polinización a larga distancia, lo que resulta en una mayor distancia promedio de flujo de polen.
- El hábitat bosque de galería, por el contrario, presenta una alta densidad de individuos reproductivos de *Carapa guianensis*; condición que favorece que los polinizadores se desplacen con mayor frecuencia entre árboles ubicados en el mismo vecindario, y por lo tanto, los árboles en este hábitat reciben polen con mayor diversidad genética. Además, es posible que se exista traslape entre la sombra de semillas de vecinos. Como consecuencia, la estructura genética espacial de las progenies en este hábitat, se mantiene significativa por la dispersión limitada de semillas, pero presenta una menor magnitud; y la diversidad genética de las progenies es mayor. Por otro lado, como los individuos reproductivos se encuentran a corta distancia, los eventos de polinización con

vecinos cercanos son frecuentes, lo que resulta en una menor distancia promedio de flujo de polen.

- Para determinar con mayor precisión la viabilidad futura de la población de *Carapa guianensis* en Mogos, y en el resto de la Península de Osa, es importante analizar la capacidad de reclutamiento de nuevos individuos y evaluar el valor adaptativo de las progenies provenientes de los distintos hábitats. De igual forma, es necesario evaluar la viabilidad a largo plazo de las poblaciones de los animales polinizadores y dispersores de *C. guianensis* en el paisaje fragmentado de Mogos; además, se deben evaluar los cambios en el comportamiento de dichos animales, pues de estos depende el éxito reproductivo del árbol.

Referencias

- Aguilar, R., L. Ashworth, L. Galetto, y M. Aizen. 2006. Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology Letters* 9: 968-980.
- Aguilar, R., M. Quesada, L. Ashworth, Y. Herrerías-Diego y J. Lobo. 2008. Genetic consequences of habitat fragmentation in plants populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Molecular Ecology* 17: 5177-5188.
- Aldrich, P. y J. Hamrick. 1998. Reproductive Dominance of Pasture Trees in a Fragmented Tropical Forest Mosaic. *Science* 281: 103-105.
- Álvarez-Buylla, E., R. García-Barrios, C. Lara-Moreno, y M. Martínez-Ramos. 1996. Demographic and Genetic Models in Conservation Biology: Applications and Perspectives for Tropical Rain Forest Tree Species. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 27: 387-421.
- Bacles, C., A. Lowe y R. Ennos. 2006. Effective seed dispersal across a fragmented landscape. *Science* 311: 628.
- Barrantes, G., Q. Jiménez, J. Lobo, T. Maldonado, M. Quesada y R. Quesada. 1999. Evaluación de los Planes de Manejo Forestal autorizados en el periodo 1997-1999 en la Península de Osa. Cumplimiento de Normas Técnicas, Ambientales e Impacto sobre el Bosque Natural. Informe Para Fundación Cecropia. 96p.
- Cascante, A., M. Quesada, J. Lobo y E. Fuchs. 2002. Effects of Dry Tropical Forest Fragmentation on the Reproductive Success and Genetic Structure of the Tree *Samanea saman*. *Conservation Biology* 16: 1-11.
- Chybicki, I., y J. Burczyk. 2010. NM+: software implementing parentage-based models for estimating gene dispersal and mating patterns in plants. *Molecular Ecology Resources* 10: 1071-1075.
- Clarke, A. y G. Young. 2000. Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations. Cambridge University Press, UK. 438p.

- Cloutier, D., M. Kanashiro, A. Ciampi y D. Schoen. 2007b. Impact of selective logging on inbreeding and gene dispersal in an Amazonian tree population of *Carapa guianensis* Aubl. *Molecular Ecology* 16: 797-809.
- Cloutier, D., O. Hardy, H. Caron, A. Ciampi, B. Degen, M. Kanashiro y D. Schoen. 2007a. Low Inbreeding and High Dispersal Distances in Populations of Two Amazonian Forest Tree Species. *Biotropica* 39: 406-415.
- Collevatti, R., D. Grattapaglia y J. Hay. 2001. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10: 349-356.
- Couvet, D. 2001. Deleterious Effects of Restricted Gene Flow in Fragmented Populations. *Conservation Biology* 16: 369-376.
- Dayanandan, S., J. Dole, K. Bawa y R. Kesseli. 1999. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). *Molecular Ecology* 8: 1585-1592.
- Degen, B., E. Bandou y H. Caron. 2004. Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Symphonia globulifera* in French Guiana. *Heredity* 93: 585-591.
- Dick, C. 2001. Genetic rescue of remnant tropical trees by an alien pollinator. *Proceedings of the Royal Society B*. 268: 2391-2396.
- Dick, C., G. Etchelecu y F. Austerlitz. 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.
- Dick, C., O. Hardy, A. Jones y R. Petit. 2008. Spatial Scales of Pollen and Seed-Mediated Gene Flow in Tropical Rain Forest Trees. *Tropical Plant Biology* 1: 20-33.
- Double, M., R. Peakall, N. Beck y A. Cockburn. 2005. Dispersal, philopatry and fidelity: dissecting local genetic structure in superb fairy-wrens (*Malurus cyaneus*) *Evolution* 59: 625-635.
- Dunphy, B. y J. Hamrick. 2004. Gene flow among established Puerto Rican populations of the exotic tree species, *Albizia lebbbeck*. *Heredity* 94: 418-425.

- Dunphy, B. y J. Hamrick. 2007. Estimation of gene flow into fragmented populations of *Bursera simaruba* (Burseraceae) in the dry-forest life zone of Puerto Rico. *American Journal of Botany* 94: 1786-1794.
- Dunphy, B., J. Hamrick y J. Schwager. 2004. A comparison of direct and indirect measures of gene flow in the bat-pollinated tree *Hymenaea courbaril* in the dry forest zone of southwestern Puerto Rico. *International Journal of Plant Sciences* 165: 427-436.
- Dutech, C., J. Seiter, P. Petronelli, H. Joly y P. Jarne. 2002. Evidence of low gene flow in a neotropical clustered tree species in two rainforest stands of French Guyana. *Molecular Ecology* 11: 725-738.
- Dyer, R. 2007. Powers of discerning: Challenges to understanding dispersal processes in natural populations. *Molecular Ecology* 16: 4881-4882.
- Fahrig, L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 34: 487-515.
- Flores, E. 1994. *Carapa guianensis*. *Arboles y Semillas del Neotrópico* 3: 27-56.
- Fuchs, E. y J. Hamrick. 2010a. Spatial genetic structure within size classes of the endangered tropical tree *Guaiacum sanctum* (Zygophyllaceae). *American Journal of Botany* 97: 1200-1207.
- Fuchs, E. y J. Hamrick. 2010b. Mating system and pollen flow between remnant populations of the endangered tropical tree, *Guaiacum sactum* (Zygophyllaceae). *Conservation genetics* 12: 175-185.
- Fuchs, E., J. Lobo y M. Quesada. 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.
- Gentry, A. 1993. *A Field Guide to the Families and Genera of Woody Plants of Northwest South America*. The University of Chicago Press, USA. 895p.
- Ghazoul, J. 2005. Pollen and seed dispersal among dispersed plants. *Biological Reviews* 80: 413-443
- Guariguata, M., H. Arias-Le Claire y G. Jones. 2002. Tree Seed Fate in a Logged and Fragmented Forest Landscape, Northeastern Costa Rica. *Biotropica* 34: 405-415

- Guariguata, M., J. Rosales y B. Finegan. 2000. Seed Removal and Fate in Two Selectively Logged Lowland Forests with Contrasting Protection Levels. *Conservation Biology* 14: 1046-1054.
- Hall, P., L. Orrell y K. Bawa. 1994. Genetic Diversity and Mating System in a Tropical Tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). *American Journal of Botany* 81: 1104-1111.
- Hamrick, J. 2004. Response of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecology and Management* 197: 323-335.
- Hanson, T., S. Brunsfeld, B. Finegan y L. Waits. 2008. Pollen dispersal and genetic structure of the tropical tree *Dipteryx panamensis* in a fragmented Costa Rican landscape. *Molecular Ecology* 17: 2060-2073.
- Hardy O. y X. Vekemans. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2: 618-620.
- Hedrick, P. 2005. *Genetics of Populations*. 3ed. Jones and Bartlett Publishers, Inc. USA. 737p.
- Hedrick, P. y P. Miller. 1992. Conservation genetics: Techniques and fundamentals. *Ecological Applications* 2: 30-46.
- Herrera, W. 1985. *Clima de Costa Rica*. UNED. San José. Costa Rica. 118 p.
- Jordano, P. 2010. Pollen, seeds, and genes: the movement ecology of plants. *Heredity* 105: 329-330.
- Jordano, P. y J. Godoy. 2002. Frugivore-generated Seed Shadows: a Landscape View of Demographic and Genetic Effects. p. 305-321. En: D. Levey, W. Silva y M. Galletti (eds). *Seed Dispersal and Frugivory: Ecology, Evolution and Conservation*. CAB International.
- Kalinowski, S., M. Taper y T. Marshall. 2007. Revising how the computer CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1106.

- Kaufman, S., P. Smouse, y E. Alvarez-Buylla. 1998. Pollen-mediated gene flow and differential male reproductive success in a tropical pioneer tree, *Cecropia obtusifolia* Bertol. (Moraceae): a paternity analysis. *Heredity* 81: 164-173.
- Klimas, C., K. Kainer y L. Wadt. 2007. Population structure of *Carapa guianensis* in two types in the southwestern Brazilian Amazon. *Forest Ecol. Manage.* 250: 256-265.
- Konuma, A., Y. Tsumura, C. Lee, S. Lee y T. Okuda. Estimation of gene flow in the tropical-rainforest tree *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae), inferred from paternity analysis. *Molecular Ecology* 9: 1843-1852.
- Loiselle, B., V. Sork, J. Nason y C. Graham. 1995. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 82: 1420-1425.
- Lowe, A. 2005. Editorial: Population genetics of neotropical trees focus issue. *Heredity* 95: 243-245.
- Lowe, A., B. Jourde, P. Breyne, N. Colpaert, C. Navarro, J. Wilson y S. Cavers. 2003. Fine-scale genetic structure and gene flow within Costa Rican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*). *Heredity* 90: 268-275.
- Lowe, A., D. Boshier, M. Ward, C. Bacles y C. Navarro. 2005. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity* 95: 255-273.
- McHargue, L. y G. Hartshorn. 1991. *Carapa guianensis* (Meliaceae) (Cedro Macho, Caobilla). p. 209-210. En: D. Janzen (ed). *Historia Natural de Costa Rica*. Editorial de la Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- Newstrom, L., G. Frankie y H. Baker. 1994. A New Classification for Plant Phenology Based on Flowering Patterns in Lowland Tropical Rain Forest Trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica* 26: 141-159.
- Ouborg, N., P. Vergeer y C. Mix. 2006. The rough edges of the conservation genetics paradigm for plants. *Journal of Ecology* 94: 1233-1248.
- Peakall, R. y P. Smouse. 2006. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.

- Peakall, R., M. Ruibal, y D. Lindenmayer. 2003. Spatial autocorrelation analysis offers new insights into gene flow in the Australian bush rat, *Rattus fuscipes*. *Evolution* 57: 1182-1195.
- Ritland, K. 2002. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. *Heredity* 88: 221-228.
- Saunders, D., R. Hobbs y C. Margules. 1991. Biological Consequences of Ecosystem Fragmentation: A Review. *Conservation Biology* 5: 18-32.
- Smouse, P. y R. Peakall. 1999. Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity* 82: 561-573.
- Smouse, P., R. Dyer, R. Westfall y V. Sork. 2001. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. I. Male gamete heterogeneity among females. *Evolution* 55: 260-271.
- Smouse, P., R. Peakall y E. Gonzales. 2008. A heterogeneity test for fine-scale genetic structure. *Molecular Ecology* 17: 3389-3400.
- Styles, B. 1981. Swietenioideae. En Pennington, T., B. Styles y D. Taylor. *Meliaceae. Flora Neotropica Monograph* 28: 406-418. The New York Botanical Garden Press.
- Vander Wall, S. y M. Beck. 2011. A Comparison of Frugivory and Scatter-Hoarding Seed-Dispersal Syndromes. *Botanical Review* 1-22, DOI: 10.1007/s12229-011-9093-9.
- Vekemans, X. y O. Hardy. 2004. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology* 13: 921-935.
- Veron, V., H. Caron y B. Degen. 2005. Gene flow and mating system of the tropical tree *Sextonia rubra*. *Silvae genetica* 54: 275-280.
- Vinson, C., C. Azevedo, I. Sampaio y A. Ciampi. 2005. Development of microsatellite markers for *Carapa guianensis* (Aublet), a tree species from the Amazon forest. *Molecular Ecology Notes* 5: 33-34.
- Ward, M., C. Dick, R. Gribel y A. Lowe. 2005. To self, or not to self... A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees. *Heredity* 95: 246-254.

- Watson, V. y T. Divney. 1992. Informe sobre el mapa de ordenamiento territorial de la Península de Osa. 44 pp.
- White, G., D. Boshier y W. Powell. 2002. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: An example from *Swietenia humilis* Zuccarini. PNAS 99: 2038-2042.
- Young, A., T. Boyle, A. Brown. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. Trends Ecology and Evolution 11: 413.