



DEMOGRAFÍA Y GENÉTICA DE POBLACIONES DE LA
ORQUÍDEA TERRESTRE *Cyclopogon luteo-albus*
(A. Rich. y Galeotti) Schltr. EN FRAGMENTOS DE
BOSQUE DE NIEBLA DEL CENTRO DE VERACRUZ

TESIS QUE PRESENTA **LILIÁN JUÁREZ TÉLLEZ**
PARA OBTENER EL GRADO DE **DOCTOR EN ECOLOGÍA Y MANEJO DE**
RECURSOS NATURALES

Xalapa, Veracruz, México 2013

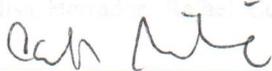
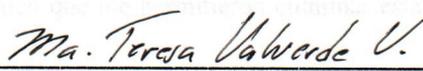
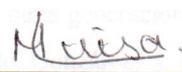


INECOL
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, A.C.

Aprobación final del documento de tesis de grado:

"Demografía y genética de poblaciones de la orquídea terrestre *Cyclopogon luteo-albus*

(A. Rich. & Galleotti) en fragmentos de Bosque de Niebla del centro de Veracruz"

	Nombre	Firma
Director	Dr. Carlos Montaña Carubelli	
Comité Tutorial	Dra. Teresa Valverde Valdés	
	Dra. María Luisa Martínez Vázquez	
Jurado	Dr. José G. García Franco	
	Dr. Luis E. Eguiarte Fruns	

RECONOCIMIENTO

Agradezco al Consejo de Ciencia y Tecnología por la beca de manutención otorgada durante seis años (número de registro ED03007) y por el apoyo financiero para los trabajos de campo y laboratorio a través de un proyecto asignado al Dr. Carlos Montaña Carubelli (número de proyecto 36642 V).

Al Consejo de Ciencia y Tecnología por la beca de ayudante de investigador asociada al Dr. Carlos Montaña Carubelli (número de expediente 393166629).

A Carlos Montaña Carubelli quien me guió y acompañó durante el camino a la cima y por las amenas charlas.

A Miriam Ferrer quien me rescató en un momento de crisis académica, por su disposición y valiosas sugerencias en el manuscrito de genética.

A Teresa Valverde por sus valiosas sugerencias y enseñanzas.

A María Luisa Martínez quien también me apoyó en un momento de crisis académica.

A Danaé Cabrera Toledo, Francisco Reyes Zepeda, Andrew Vovides, Julia Hernández, Sonia Galicia y Julia Hernández, por su ayuda en el laboratorio, a Jorge García Burgos, Antonio López, Carlo Sormani, Alejandro Abundis, Vicky y Mario Márquez por apoyo en campo. A Pablo Carrillo, Claudia Gallardo por su valioso apoyo, Phil Brewster, Carlos Yáñez, Luis Cervantes y Ricardo Ayala en la determinación de abejas y avispas, a Martín Mata por su ayuda en el laboratorio de cultivo *in vitro*. A los propietarios del terreno en Banderilla. A todo el personal administrativo, en especial a las asistentes del Departamento de B.E.: Gloria Martínez y Mary Salazar por su profesional apoyo y al equipo de la biblioteca por su excelente disposición: Felisa Herrador, Rafael Colorado, Ángeles Ferrer, Delfino Hernández y Patricia Ortiz.

A mi compañero de vida, Jorge García Burgos por su amor y apoyo económico que me permitieron culminar esta etapa.

A mis compañeros de generación: Itzel, Lizette, Danaé, Susana, Juan Pablo y Pepe; de otras generaciones: Karolina, Karla, Carla, Vania, Victor, Bernal, Lucía, Pita, Paco, Oswaldo Gómez y Rikardo González, y de Pronatura Veracruz. A los investigadores que me apoyaron en algún momento de mi formación académica: Miriam Ferrer, Marisa Martínez, Roger Guevara, Octavio Rojas, Oscar Ríos, Oscar Briones, Rogelio Macías, Andrew Vovides, Sergio Ibáñez, Gonzalo Castillo, Larissa Guillén, Gonzalo Castillo, Vinicio Sosa, Isabel Barois, Enrique Jardel, Luis Cervantes, Antonio Guillén, Luciana Porter, Mariano Ordano, Hugo Piña, Yareni Perroni, Juan García, Bertha Anguiano, Gabriela Garza, José Arévalo, Alejandro Meléndez y Gilberto Binquíst.

DEDICATORIA

A Jorge GB, el amor de mi vida

A mis padres y hermana

DECLARACIÓN

RESUMEN..... 13

Excepto cuando es explícitamente indicado en el texto, el trabajo de investigación contenido en esta tesis fue efectuado por Lilián Juárez Téllez como estudiante de la carrera de Doctor en Ecología y Manejo de Recursos Naturales entre septiembre de 2003 y abril del 2013, bajo la supervisión del Dr. Carlos Montaña Carubelli.

Problemática local de las orquídeas..... 22

Especie de estudio..... 25

Las investigaciones reportadas en esta tesis no han sido utilizadas anteriormente para obtener otros grados académicos, ni serán utilizadas para tales fines en el futuro.

Capítulo II..... 41

Dinámica poblacional de *Cyclopogon luteo-albus* (Orchilaceae) en un bosque de Niebla..... 41

Candidato: Lilián Juárez Téllez



Director de tesis: Carlos Montaña Carubelli



Abstract..... 42

Introducción..... 43

Métodos..... 47

Especie de estudio..... 49

Ensayos de germinación..... 50

Diagrama del ciclo de vida de *Cyclopogon luteo-albus*..... 52

Datos demográficos..... 53

Matrices de proyección poblacional..... 56

Tasa de crecimiento y estructura de tamaños..... 59

Sensibilidad, elasticidad y otros parámetros poblacionales..... 59

Variabilidad en la tasa de crecimiento poblacional..... 61

Probabilidades de cuasi-extinción..... 63

Resultados..... 59

Densidad y estructura poblacional..... 64

ÍNDICE

RESUMEN	13
ABSTRACT	14
Capítulo I	
Introducción.....	17
Orquídeas.....	18
Problemática local de las orquídeas.....	22
Especie de estudio.....	25
Literatura Citada.....	30
Capítulo II	
Dinámica poblacional de <i>Cyclopogon luteo-albus</i> (Orchidaceae) en el Bosque de Niebla del centro de Veracruz, México	
Resumen.....	41
Abstract.....	42
Introducción.....	43
Métodos.....	47
Especie de estudio.....	49
Ensayos de germinación.....	50
Diagrama del ciclo de vida de <i>Cyclopogon luteo-albus</i>	52
Datos demográficos.....	53
Matrices de proyección poblacional.....	56
Tasa de crecimiento y estructura de tamaños.....	59
Sensibilidad, elasticidad y otros parámetros poblacionales.....	59
Variabilidad en la tasa de crecimiento poblacional.....	61
Probabilidades de cuasi-extinción.....	63
Resultados.....	64
Densidad y estructura poblacional.....	64

Dinámica poblacional.....	65
Sensibilidad, elasticidad y otros parámetros poblacionales.....	66
Variabilidad en la tasa de crecimiento poblacional.....	67
Probabilidades de cuasi-extinción.....	68
Discusión.....	69
Estructura poblacional.....	69
Dinámica poblacional.....	70
Agradecimientos.....	77
Literatura Citada.....	96

Capítulo III

Genetic structure at patch level of the terrestrial orchid *Cyclopogon luteoalbus* (Orchidaceae) in a fragment cloud forest

Abstract.....	107
Introduction.....	107
Materials and Methods.....	108
Species and study sites.....	108
Sample collection.....	109
Enzymatic extraction and electrophoresis.....	109
Genetic diversity measurement.....	110
Genetic structure at fragment level.....	110
Evidence of recent bottlenecks.....	110
Spatial genetic structure at patch level.....	111
Results.....	111
Genetic diversity.....	111
Genetic structure at fragment level.....	112
Evidence of recent bottlenecks.....	112
Spatial genetic structure at patch level.....	112
Discussion.....	113
Genetic diversity.....	113

Genetic structure at fragment level.....	115
Spatial genetic structure at patch level.....	116
Acknowledgments.....	118
References.....	119

Capítulo IV

Discusión General y Conclusiones.....	124
Conclusiones.....	131
Literatura citada.....	134

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

Capítulo I

Figura 1.1. Inflorescencia de *Cyclopogon luteo-albus* con abeja Halictidae visitando flores en el sitio SBN (17/02/2007). La flecha muestra el polinario adherido al labro de la abeja (Fotografía: Phill Brewster)..... 27

Capítulo II

Figura 2.1. Ubicación de los sitios de estudio en los fragmentos de Bosque de Niebla cercanos a la Ciudad de Xalapa. SBN (Santuario del Bosque de Niebla) y MART (Martinica)..... 49

Figura 2.2. Ciclo de vida de *C. luteo-albus*. Los círculos representan las categorías de tamaño de acuerdo al área foliar total de la planta (cm^2): plántulas de $< 0.3 \text{ cm}^2$ con una raíz $< 1 \text{ cm}$ de largo (P), juveniles de $0.01\text{--}10.01 \text{ cm}^2$ (J1), juveniles de $10.02\text{--}26.64 \text{ cm}^2$ (J2), adultos de $26.65\text{--}64.25 \text{ cm}^2$ (A1), adultos de $64.26\text{--}93.6 \text{ cm}^2$ (A2), y adultos de $> 93.7 \text{ cm}^2$ (A3) y latentes (L). Las flechas representan transiciones entre categorías y la flecha punteada representa la fecundidad..... 53

Figura 2.3. A) Plantas de *C. luteo-albus* dispuestas de acuerdo a las categorías de tamaño consideradas (A3, A2, A1, J2 y J1, la flecha indica los frutos maduros), B) acercamiento de las raíces de un individuo adulto, C), ejemplo de la medición de las hojas de una planta adulta, D) hábitat de *C. luteo-albus* en el sitio SBN, Veracruz, E) avispas de la familia *Eurytomidae* que emergieron de ovarios florales (escala en mm), F) plantas adultas (la flecha indica el escapo con herbivoría en el sitio SBN, en 2010), G) semillas viables de *C. luteo-albus* (escala 5 mm), H) acercamiento de la avispa (*Eurytomidae*), e I) planta adulta de *C. luteo-albus* (la flecha indica el escapo emergiendo)..... 55

Figura 2.4. Estructura poblacional observada (n_t) y estructura estable de tamaños (EET, vector w) de las poblaciones SBN (a) y MART (b) para los años 2005-2009 y 2006-2009, respectivamente. Los valores de significancia (prueba Kolmogorov-Smirnov) se refieren a la comparación entre la estructura poblacional observada (n_t) barras en negro, y la estructura estable de tamaños (w), barras grises..... 86

Figura 2.5. Porcentaje de individuos que formaron frutos en un año o más durante el periodo 2005-2009 en SBN y durante 2006-2009 en Martinica..... 87

Figura 2.6. Diagrama del ciclo de vida de *Cyclopogon luteo-albus* para las poblaciones SBN (a) y MART (b). Los valores corresponden a las matrices promedio de transición (2005-2009 y 2006-2009, respectivamente). Las letras dentro de cada óvalo corresponden a la categoría de tamaño (ver definiciones de categorías de tamaño en Cuadro 2.1)..... 89

Figura 2.7. Triángulo demográfico en el que se ubican las poblaciones estudiadas de *C. luteo-albus* (construido con las elasticidades de las matrices de transición promedios) y otras especies de orquídeas terrestres. En las poblaciones de *C. luteo-albus*, los círculos consideran la etapa de latencia y los triángulos la omiten (SBN en gris y MART en negro)..... 90

Figura 2.8. Curvas de supervivencia ($\log lx$), (a); y valor reproductivo escalado a la primera categoría de tamaños ($Vx/V1$), (b), calculados a partir de las matrices promedios de las poblaciones SBN (periodo 2005-2009) y MART (periodo 2006-2009)..... 91

Figura 2.9. Distribución de frecuencias (a partir de 5000 simulaciones al azar con remplazo) de la desviación estándar de la tasa finita de crecimiento poblacional (λ) proyectada para cada población, en SBN combinando cuatro periodos anuales (2005-2009) (a), y en MART tres periodos anuales (2006-2009) (b). Los intervalos de confianza al 95% se muestran con guiones verticales que cruzan en el eje de las abscisas. El valor de la desviación estándar (λ_{obs}) se indica con una flecha..... 92

Figura 2.10. Distribución de frecuencias (a partir de 5000 simulaciones al azar con remplazo) de la diferencia entre la tasa finita de crecimiento poblacional de la población SBN y la población MART para los periodos anuales (a) 2006-2007, (b) 2007-2008, y (c) 2008-2009. Los intervalos de confianza al 95% se muestran con guiones verticales que cruzan en el eje de las abscisas y la flecha indica los valores observados de λ (θ_{obs})..... 94

Figura 2.11. Probabilidades de cuasi-extinción a través del tiempo para las poblaciones SBN (a) y MART (b), estimadas a partir de los datos demográficos de cuatro periodos anuales (2005-2009) y tres periodos anuales (2006-2009), respectivamente..... 95

Cuadro 2.1. Delimitación de las categorías de tamaño utilizadas para el estudio demográfico de *Cyclopogon luteo-albus* en el bosque de niebla de la zona central de Veracruz. Sólo las categorías de adultos pueden producir semillas..... 78

Cuadro 2.2. Matrices anuales de proyección poblacional de las poblaciones SBN (a-d) y promedio (e), y MART (f-h) y promedio (i), respectivamente, para los periodos 2005-2009 y 2006-2009. Se muestran también la estructura poblacional observada (n_t), la estructura estable de tamaños (w), el vector de los valores reproductivos específicos por categoría, escalado con respecto a la primera categoría de tamaño (v), la tasa finita de crecimiento poblacional λ , con sus intervalos de confianza al 95% (ICI y ICS, intervalos de confianza inferior y superior, respectivamente), y la mortalidad específica por categoría (q_x). Los valores subrayados son los elementos de la diagonal..... 79

Cuadro 2.3. Resumen de los parámetros demográficos obtenidos para las poblaciones SBN y Martinica de *C. luteo-albus*..... 84

Capítulo III

Figura 1. Spatial distribution of *C. luteoalbus* plants within patch SBN-1 with inset showing SBN fragment and the four patches existing inside it (*full squares*, the upper of them being the studied SBN-1 patch). Reproductive adults (*white triangles*), nonreproductive adults (*black triangles*), juveniles (*circles*), and seedlings (*stars*)..... 110

Figure 2. Correlograms showing kinship coefficients F_{ij} and their 95% confidence intervals (*vertical bars*), calculated by 1,000 permutations within each distance class. Kinship coefficients for all life cycle stages pooled (a), for seedlings b), for juveniles (c), for nonreproductive adults (d), and for reproductive adults (e). Data from *Cyclopogon lteoalbus* plants at patch SBN-1..... 114

Table 1. Genetic diversity statistics for patch SBN-1 and for three fragments in Veracruz (SBN, Martinica and Zongolica) of *Cyclopogon luteoalbus*..... 111

Table 2. Wright’s *F* statistics for three *Cyclopogon luteoalbus* populations in Veracruz cloud forest..... 112

Table 3. Expected (Exp.) and observed (Obs.) values for the number of loci showing higher expected heterozygosity under HW than under the drift-mutation equilibrium for the infinite allele model (IAM) and the stepwise mutation model (SMM), and *P* values for the Wilcoxon test comparing the observed and expected values..... 113

Table 4. Statistics of spatial genetic structure in *Cyclopogon luteoalbus* within SBN-1..... 116

Table 5. Allele frequency of 11 loci estimated for four life cycle stages (seedlings, juveniles, nonreproductive adults, and reproductive adults) of *Cyclopogon luteoalbus* individuals found at patch SBN-1 and at three fragments in central Veracruz (SBN, Martinica and Zongolica)... 118

Table 6. Single-class (f^2) and multi-class (ω) test and associated *P* values for the heterogeneity test of SGS between different life cycle stages of *Cyclopogon luteoalbus* at patch SBN-1 in Veracruz, Mexico..... 119

RESUMEN

Se estudió en esta tesis la demografía y la genética de poblaciones de *Cyclopogon luteo-albus*, una orquídea terrestre asociada al bosque de niebla de la región central de Veracruz, México. Se estudiaron dos poblaciones en fragmentos de bosque de niebla perturbado distanciados por ~8km, ambos sitios se encuentran muy próximos de la zona urbana (< 1km), y están inmersos en una matriz de plantaciones de café, zona urbana, pastizales, entre otros regímenes de uso de suelo. El estudio demográfico comprendió un periodo de 3 y 4 años en dos poblaciones, y mostró que sus tasas de crecimiento poblacional son menores que la unidad, por lo que las poblaciones no se encuentran en equilibrio numérico ($\lambda = 0.975$, $IC_{95\%}$ 0.960-0.984 y $\lambda = 0.956$, $IC_{95\%}$ 0.935-0.959). De hecho, existe una alta probabilidad de que sus tamaños poblacionales se reduzcan al 10% de su tamaño actual en los próximos 100 años. El análisis genético reveló altos niveles de variabilidad genética en *C. luteo-albus* ($H_o = 0.46$ y $H_E = 0.44$), lo cual coincide parcialmente con lo encontrado en especies de amplia distribución y con sistemas reproductivos preferencialmente de exocruza, y una diferenciación genética entre poblaciones moderada pero significativa ($F_{ST} = 0.13$). También se encontró una fuerte estructura genética espacial a escala fina entre las categorías del ciclo de vida y valores altos de endogamia en las plántulas, lo que coincide con un escenario de una restringida dispersión de semillas y polen, mediada por la distribución en parches de los sitios de reclutamiento (“sitios seguros”) y por el patrón de forrajeo de los polinizadores de *C. luteo-albus*. Los resultados muestran que, si bien la diversidad genética de la especie no se ha deteriorado, la viabilidad demográfica no está asegurada en los fragmentos estudiados. Esto implica que para conservar la especie es necesario asegurar el funcionamiento de fragmentos donde las poblaciones sean viables (posiblemente de mayor tamaño) y puedan, eventualmente, asegurar un flujo de semillas hacia otros fragmentos.

ABSTRACT

In this dissertation I studied the demography and population genetics of *Cyclopogon luteo-albus*, a terrestrial orchid found in the cloud forest of central Veracruz, México. Two populations separated by a distance of ~8km inside perturbed cloud forest fragments were studied, both sites are close to urban settlements (< 1km), and are immersed in a matrix of coffee plantations, urban settlements, pasture land, and other land use regimens. The demographic study, based on a 3 and 4 years dataset at two populations, showed that population growth rate were below unity and populations were not at numeric equilibrium ($\lambda = 0.975$, $IC_{95\%}$ 0.960-0.984 and $\lambda = 0.956$, $IC_{95\%}$ 0.935-0.959), with a high probability of populations size declining to a threshold of 10% its current size in the next 100 years. Genetic analysis of *C. luteo-albus* showed high genetic variability ($H_o = 0.46$ y $H_E = 0.44$), which is partially coincident with the fact that this is a widespread and preferentially outcrossing species, and with moderate but significant genetic differences between populations ($F_{ST} = 0.13$). In addition, a high spatial population genetic structure was found between life cycle sizes with high inbreeding coefficients on seedlings. This correlates with a restricted seed and pollen dispersal scenario, due to the patchy distribution of recruitment sites “safe sites” and to the foraging patterns of *C. luteo-albus* pollinators. The results show that while genetic diversity of the species has not been deteriorated, demographic population viability is not assured in the fragments studied. This implies that in order to conserve this species, is necessary to ensure the functioning of fragments where populations were viable (possibly larger population sizes) and eventually, ensure the flow of seeds to other fragments.

Capítulo I

Introducción

Introducción

La comprensión de los procesos próximos y últimos que determinan la distribución y abundancia de las especies es de gran relevancia en organismos sésiles que viven en ambientes fragmentados, ya que no pueden migrar ante condiciones desfavorables naturales o antropogénicas. El entendimiento de los procesos proximales, tales como los procesos ecológicos (i.e. dispersión de gametos, procesos demográficos) y los procesos últimos, tal como los procesos evolutivos (i.e. selección natural, eventos aleatorios), podrían ser importantes consideraciones para el desarrollo de programas de conservación de grupos carismáticos como las orquídeas (Kalisz, 2001; Silvertown y Charlesworth, 2001; Swartz y Dixon, 2009), porque están asociadas con la capacidad de persistencia a lo largo del tiempo y con el potencial evolutivo de las poblaciones (Wright, 1978; Forrest, *et al.* 2004; Metcalf y Pavard, 2006; Hutchings, 2010).

La forma de evaluar dicha capacidad de persistencia poblacional, es a través de la información obtenida de la demografía y genética de poblaciones. La demografía, es la base para entender la dinámica poblacional y las historias de vida de una especie y, para abordarla, se han utilizado herramientas numéricas, como los modelos de proyección matricial (Silvertown, *et al.* 1993; Crone, *et al.* 2011). Estos modelos describen el ciclo de vida y la variación en las tasas vitales de poblaciones no homogéneas, es decir, con estructuras de edades o tamaños. La genética de poblaciones, por su parte, analiza el grado de agregación de las frecuencias génicas, o estructura genética, al describir cómo se reparte la variación genética dentro y entre poblaciones (Wright, 1951). Dentro de una población, es posible vincular ambas disciplinas explorando la relación que existe entre la estructura genética y la estructura poblacional (Epperson, 2003). Sin

embargo, los estudios en orquídeas terrestres que utilizan simultáneamente ambas herramientas (e.g., análisis demográfico y análisis genético) aún son escasos (sólo 16 artículos, Chung, *et al.* 2011). Específicamente, en México, se considera que ambas disciplinas de la biología poblacional deben ser una prioridad en los estudios de orquídeas (Soto-Arenas, 2006).

En esta tesis, se aborda la demografía y la genética de poblaciones de una orquídea terrestre, *Cyclopogon lute-albus*, que habita en fragmentos de bosque de niebla, un tipo de vegetación que, debido a procesos naturales y antrópicos, se encuentra fragmentado e inmerso en una matriz de pastizales, cafetales y zonas urbanas. Este trabajo tiene la finalidad de determinar el estado actual de las poblaciones de estudio, desde un punto de vista demográfico, identificar los procesos demográficos que tienen mayor relevancia en la tasa finita de crecimiento poblacional, estimar el tiempo de persistencia demográfica de las poblaciones, y desde un punto de vista evolutivo, discernir los procesos ecológicos y evolutivos que moldean sus poblaciones.

Las orquídeas

Las orquídeas son un grupo de plantas con flores con una historia fósil escasa pero con un hallazgo reciente de un pedazo de ámbar cuyo interior exhibía un polinario de una orquídea adherido al cuerpo de una abeja. A partir de éste fósil y, con los análisis de reloj molecular se establece una fecha de origen de la familia Orchidaceae, que ocurrió hace 76-84 millones de años (Ramírez *et al.* 2007), una fecha intermedia a la estimada en otros estudios (~40 M.a., Bremer, 2000; ~110 M.a., Janssen y Bremer, 2004), pero que, a diferencia de estos la calibración interna está fundamentada tanto por la evidencia fósil de reciente descubrimiento como por el número de representantes de la familia Orchidaceae.

El fósil usado por Ramírez *et al.* (2007) reveló, una de las características ecológicas que más distingue a la familia Orchidaceae de otras familias de angiospermas, que es la interacción con otros organismos. De éstas, la relación planta-polinizador es una de las más estudiadas en el ámbito evolutivo desde que Charles Darwin, inspirado en ellas, las propone como una fuerte evidencia para la selección natural (Darwin, 1862; Micheneau, *et al.* 2009). Por otro lado, la interacción orquídea-micorriza también es de gran importancia, debido a que en las primeras etapas del ciclo de vida de una orquídea se presenta una etapa mico-heterótrofa inicial, donde la planta obtiene nutrientes a partir del hongo, y una vez que la planta comienza a fotosintetizar, comienza la etapa fototrófica (Roche *et al.* 2010; Rasmussen y Whigham, 1998). En algunos casos esta interacción es tripartita; es decir, las orquídeas tienen especificidad con hongos endófitos que a la vez son ectomicorrizas de otros grupos de plantas (Warcup, 1985; Rasmussen y Whigham, 1998).

Desde el punto de vista morfológico, hay una serie de atributos florales que, si bien no son exclusivos de este grupo, son un buen indicador de los cambios evolutivos que ha presentado el grupo en respuesta a las interacciones bióticas que mantiene; entre estos atributos está el labelo, pétalo modificado que difiere de los demás por su tamaño, color o forma y que generalmente es la parte más vistosa de la flor, la columna, estructura que une los órganos sexuales femeninos y masculinos, y los polinios, que son paquetes más o menos sólidos de polen con algún grado de agregación que forman un polinario (Hágsater, *et al.* 2005).

La familia Orchidaceae es una de las familias que junto con la familia Fabaceae y la Asteraceae albergan la mayor riqueza a nivel específico, con aproximadamente 25,000 especies, de las cuales el 70% son de hábito epífita (Dressler, 2005). Se han postulado varias hipótesis que explican dicha riqueza. Entre ellas está la partición fina del nicho, que considera la

especialización al hábitat epífita como una respuesta evolutiva a la disponibilidad de nichos (Gentry y Dodson, 1987); la especiación alopátrica, promovida tanto por la fragmentación natural del hábitat (Benzing, 1990), como por el modo de dispersión de las semillas que permitió establecer innumerables poblaciones fundadoras (Vásquez, *et al.* 2003); la alta especialización de los polinizadores (Tremblay, 1992); y las condiciones ambientales que, a principios del periodo Terciario favoreció la radiación adaptativa (Wikström y Kenrick, 2001).

No obstante la alta riqueza de especies y de formas de vida, las orquídeas se consideran un grupo sensible ante factores extrínsecos como cambios en los regímenes climáticos, y a factores ligados a la influencia humana (Koopowitz, *et al.* 2003; Swartz y Dixon, 2009). Respecto a estos últimos, las orquídeas han formado parte de la cultura humana, al tener un uso hortícola, medicinal, alimenticio, artístico y ceremonial (Halbinger y Soto, 1997; Castro y García-Franco, 2007; Solano-Gómez, *et al.* 2010). No obstante, las zonas tropicales que albergan una alta diversidad de orquídeas, coinciden con las zonas de mayor crecimiento humano, y el hábitat de muchas orquídeas se ha alterado por la conversión a un uso agrícola y/o ganadero, las quemadas no controladas y también por la demanda de ejemplares en el mercado local (Ackerman, 1985, IUCN/SSC Orchid Specialist Group, 1996; Soto-Arenas, *et al.* 2007; Swartz y Dixon, 2009).

A nivel poblacional, las orquídeas terrestres han llamado la atención por presentar marcadas fluctuaciones poblacionales causadas por la transición de una etapa fotosintética a una etapa de latencia o viceversa (Tamm, 1948, 1972; Wells, 1967; Wells, *et al.* 1991; Hutchings, 2010). En las orquídeas terrestres, se reconocen dos etapas en las historias de vida: 1) la etapa subterránea o latente, ésta ocurre en distintas etapas del ciclo de vida: durante la germinación de la semilla y hasta el establecimiento de la plántula (donde el mecanismo de nutrición es

micotrófico), y en plantas juveniles y/o adultas, donde la latencia es un estado diferenciado en el que se suspende de forma temporal el desarrollo y el crecimiento del tejido fotosintético, por lo que la planta prescinde de reproducirse sexualmente al menos durante una temporada (Lesica y Steele, 1994; Kull, 2002; Shefferson, 2002). El tiempo de duración de esta etapa se ha estudiado poco, pero puede variar desde unos meses hasta años (Hutchings, 2010); y 2) la etapa fotosintética, la cual inicia con el desarrollo de hojas durante el establecimiento de la plántula y puede continuar a lo largo de su vida (Rasmussen, 1995; Kull, 1992; Lesica and Steele, 1994; Shefferson, 2005). En la etapa fotosintética, el reclutamiento de individuos (i.e. individuos nuevos que se incorporan a la población), se considera una de las etapas más importante en las orquídeas, debido a la dependencia y especificidad que tienen las semillas con hongos micorrízicos para germinar (Calvo, 1993; Sanger y Waite, 1998; Batty, *et al.* 2001), y además, porque en muchas orquídeas terrestres los sitios de reclutamiento se concentran cerca de la planta madre (Peakall y Beattie, 1996; Diez, 2007).

El hecho de que los sitios de reclutamiento de las orquídeas terrestres se encuentren alrededor de la planta madre (Jerzakova y Malinova, 2005) ha despertado el interés hacia los estudios que ligan aspectos demográficos con la genética de poblaciones en este grupo utilizando un enfoque espacialmente explícito (Estructura Genética Espacial o EGE, Epperson, 2003). La EGE se relaciona con el grado de similitud genética entre los individuos con respecto a la distancia geográfica entre ellos, es decir, que se desarrolla una fuerte EGE cuando los genotipos no se encuentran distribuidos al azar. Este patrón se ha observado en orquídeas terrestres (Chung, 2004; Jacquemyn *et al.* 2006). Además, al analizar la EGE con la estructura demográfica (categorías de tamaños), se pueden relacionar los procesos próximos que la desarrollan, tales como los mecanismos de dispersión de gametos (semillas y/o polen) con los procesos últimos,

como flujo génico, deriva génica y selección, que actúan al interior de una población (Wright, 1943; Kalisz *et al.* 2001).

Problemática local de las orquídeas

La familia Orchidaceae es grupo exitoso debido a su gran riqueza taxonómica, la cual sigue incrementándose por nuevos descubrimientos, y porque ocupan casi cualquier ambiente (Kull y Kindlmann, 2006; Salazar, 2009; Castañeda-Zárate *et al.* 2012), pero también se ha considerado como un grupo vulnerable (Solís-Montero, *et al.* 2005; Swarts y Dixon, 2009). El concepto de vulnerable, se refiere a una categoría de riesgo de acuerdo a los criterios establecidos por los convenios internacionales o nacionales, tales como, los tamaños poblacionales pequeños, que están distribuidos en hábitats específicos, sus grandes fluctuaciones poblacionales, y a las altas probabilidades de disminuir sus poblaciones hasta un 10% del tamaño inicial en menos de 100 años (cuasi-extinción), entre otros (i.e. Shaffer, 1987; Convención Internacional en el Tratado de Especies en Peligro, CITES; NOM-059-SEMARNAT-2010). No obstante, al ser un grupo vegetal que enfrenta fuertes presiones antropogénicas como fragmentación del hábitat, comercio ilegal y cambio de uso de suelo, comparables a otros grupos como las cactáceas, lo reafirma como un grupo vulnerable (Solís-Montero, *et al.* 2005; Swarts y Dixon, 2009).

México cuenta con 1,263 especies de orquídeas, cifra que ha crecido en los últimos 20 años y se espera siga incrementándose conforme se describan nuevas especies (Soto-Arenas, *et al.* 2007; Espejo-Serna, 2012). La mayor diversidad de especies de orquídeas (~60%) se encuentra en el bosque de niebla (Hágsater, *et al.* 2005), un tipo de vegetación que constituye un valioso capital natural, pero con un elevado cambio de uso de suelo y una superficie ocupada en el país de menos del 1% (Rzedowski, 1996; INEGI, 2005; González-Espinosa, *et al.* 2012). Ante

este panorama, la conservación de las orquídeas constituye un reto por lo que surge la necesidad de intensificar los estudios sobre este grupo en diversos aspectos de su biología (Hágsater, *et al.* 2005; Swartz y Dixon, 2009).

En México, el estado de Veracruz cuenta con una de las áreas de mayor riqueza orquideológica en el área de Uxpanapa, entre el límite de Veracruz y Oaxaca. También la zona montañosa central es importante, ya que alberga al Bosque Mesófilo de Montaña (Rzedowski, 1996), llamado también Bosque de Niebla (BN, Williams-Linera, 2007). En México, la riqueza florística de esta formación vegetal se caracteriza por tener elementos holárticos y meridionales, siendo dominados en el dosel por algunos de afinidad boreal, y otros de origen tropical en el sotobosque (Villaseñor, 2012). El bosque de niebla presenta altos niveles de endemismos y, en México alberga al 60% de la flora orquideológica, la mayoría de cuyas especies son epífitas (dominadas por Bromeliaceae, Orchidaceae y Araceae), y contribuyen a la fisonomía que caracteriza a este tipo de vegetación (Rzedowski, 1996; Hágsater *et al.* 2005).

Actualmente, el Bosque de Niebla presenta una distribución análoga a un archipiélago, dando lugar a parches de bosques diferentes en su composición y estructura incluso en fragmentos contiguos (Vázquez-García, 1995). Los disturbios físicos naturales del Bosque de Niebla de la región de barlovento del Golfo de México por lo general se deben a huracanes, y en menor medida a incendios (Rzedowski, 1991; Arriaga, 2000; Asbjornsen, *et al.* 2005; Gamper *et al.* 2010). En la región central de Veracruz diversos estudios coinciden en que la superficie de BN ha disminuido en la última década, transformándose en potreros hasta el 37% de la cobertura original, a vegetación secundaria el 28%, a zonas urbanas y bosque perturbado el 18% y 17%, respectivamente (Williams-Linera, 2007; Muñoz-Villers y López-Blanco, 2008). Específicamente, el área que rodea la ciudad de Xalapa era la ruta de paso desde el puerto de

Veracruz y la ciudad de México desde finales del siglo XVI, lo que determinó un alto crecimiento poblacional durante la época colonial. A partir de esa época, se establecieron varias haciendas de café, caña de azúcar e industrias textiles en la vecindad de Xalapa, lo que fomentó la construcción de caminos y asentamientos humanos (Florescano, 1989).

En general, la fragmentación del hábitat disminuye el tamaño de las poblaciones, aumenta el aislamiento entre ellas y como consecuencia lleva a la erosión de la variabilidad genética (Honnay y Jacquemyn, 2007; Aguilar, *et al.* 2008). Probablemente también afecta otros factores ecológicos tales como los procesos de polinización pues se ha visto que las tasas de visitas disminuyen en fragmentos más aislados, afectando parámetros demográficos importantes como la fecundidad (Lovejoy, *et al.* 1986; Jacquemyn *et al.* 2005; Swartz y Dixon, 2009).

Asimismo, las alteraciones en los patrones de precipitación y los cambios en la dinámica del bosque de niebla por efecto del cambio climático proyecta alteraciones el hábitat y por lo tanto a las poblaciones de orquídeas (Zotz y Schmidt, 2006; Ponce-Reyes, *et al.* 2012). No obstante, el conocimiento sobre las respuestas ecológicas de las orquídeas en general frente al cambio climático aún es incipiente (Pfeifer, *et al.* 2006; Blinova y Chelewski, 2008).

Debido a la amplia diversidad de historias de vida que presentan las orquídeas, algunos autores proponen enfocar los esfuerzos de conservación en los hábitats más vulnerables. En este sentido, los esfuerzos de conservación se han enfocado en orquídeas epífitas y su conservación en las plantaciones de café (u otros sistemas manejados que mantienen la cobertura arbórea) y hábitats secundarios (Sosa y Platas, 1998; Solís-Montero, *et al.* 2005; Soto-Arenas, *et al.* 2005; Damon y Valle-Mora, 2008). También se sugiere aportar información demográfica (dinámica poblacional a largo plazo) y genética (variabilidad genética) para establecer criterios de

conservación específicos que asegure su persistencia y nos permitan conocer sus características ecológicas a mayor profundidad (Kull y Kindlmann, 2006; Gordon. A. Fox, Universidad de Florida, comunicación personal).

Especie de estudio

***Cyclopogon luteo-albus* (A. Rich. y Galeotti) Schltr. 1920 (Spiranθοideae: Cranichidae: Spiranthiniae) Clasificación según Dressler 1993.**

Dentro de la familia Orchidaceae la Tribu Cranichideae comprende cerca de 95 géneros y 1140 especies predominantemente terrestres distribuidas en casi todo el mundo (excepto en Antártica), pero la mayor diversidad de esta tribu se presenta en las regiones tropicales y subtropicales de América y Asia (Salazar, *et al.* 2003). El género *Cyclopogon* presenta alrededor de 60 especies distribuidas en América tropical y subtropical.

Cyclopogon luteo-albus (A. Rich. y Galeotti) Schltr. es una hierba perenne que forma una roseta de hasta 8 hojas pecioladas, elípticas-lanceoladas de 0.5 a 5 cm de ancho y 1 a 16 cm de largo. Presenta un sistema simple de raíces adventicias, ramificadas y tuberoideas que también funcionan como tejido de perennación cuando la planta pierde todo su follaje y entra en latencia o etapa subterránea (Gregg, 1991). En contraste con las orquídeas terrestres mico-heterótrofas (carentes de clorofila), las orquídeas terrestres fotosintéticas presentan ciclos de vida complejos que incluyen una etapa micotrófica o subterránea durante la germinación y una etapa fotosintética en el estado adulto (Rasmussen 1995, Tremblay y Hutchings 2003). En la primera, las diminutas semillas “tipo polvo” carecen de reservas por lo que requieren de la asociación obligada con un hongo micorrízico que les provee principalmente de carbohidratos para germinar. Una vez que se

forman los primordios foliares, es posible que la asociación con el mismo hongo permanezca y se prolongue hasta la etapa adultas (fidelidad), o bien que se presente una sucesión de hongos micorrízicos a lo largo de su vida (McCormick *et al.* 2006; Rasmussen, 1995). Una vez que la raíz cuenta con suficientes reservas, se forma el primordio foliar y comienza la etapa fotosintética, en la que se lleva a cabo el crecimiento, producción de hojas, lo cual ocurre durante la época de lluvias (de junio a noviembre), y producción de una inflorescencia individual durante diciembre y febrero.

Las hojas se reemplazan cada año (aunque algunas pueden permanecer hasta 2 años) y los individuos no pierden las hojas durante la reproducción. La floración ocurre durante el invierno en el mes de febrero y los frutos maduran en marzo. Las plantas que han alcanzado un tamaño reproductivo producen una inflorescencia durante la época invernal y las minúsculas semillas (<1 mm de largo) se dispersan por gravedad o viento a finales de invierno y principios de primavera. En la época reproductiva, cada inflorescencia contiene alrededor de 40.64 ± 14.1 flores (promedio \pm DS; $N = 17$) de color verdoso-pálido de 2 cm de largo y con un labelo de 3 mm de ancho. Las flores producen néctar y duran alrededor de 10 días. Los frutos contienen $2,510 \pm 1,593$ DS semillas ($N = 8$ frutos), que son dispersadas por viento o gravedad en la época seca del año (febrero-marzo).

De acuerdo con datos experimentales realizados en el mismo sitio SBN, durante el 2008, se observó que la auto-polinización es posible, pues una proporción promedio de 0.83 ± 0.23 DS de las flores que se mantuvieron en inflorescencias embolsadas produjeron frutos ($N = 14$), y una proporción similar de 0.85 ± 0.13 DS lo hizo en inflorescencias no-embolsadas ($N = 17$, producción de frutos, $t = -0.15$, $P > 0.05$). En 20 horas de observación floral en el sitio SBN

(febrero del 2007), se registraron visitas de las abejas *Caenaugochlora cupriventis* y *Augochlora* sp. (Halictidae), siendo la primera la que portaba el polinario en el labro (Figura 1.1).

Éste mecanismos de polinización coincide con las observaciones en otros *Cyclopogon*, donde las abejas Halictidae se posan en el labelo y debido a que su tamaño es mayor al de la flor, sólo introducen la parte bucal. Como la flor es angosta, las abejas deben empujar el sépalo dorsal y los pétalos laterales para introducirse en ella. Al intentar llegar al néctar, el cual se deposita en la base de la columna, las abejas presionan la superficie dorsal del viscidio con el labrum (debajo de la cabeza) quedando el polinario adherido al labrum de la abeja. (Singer y Coccuci, 1999; Singer y Sazima, 1999; Benítez-Vieyra *et al.* 2006; Juárez *et al.* 2011).



Figura 1.1. Inflorescencia de *Cyclopogon luteo-albus* con abeja Halictidae visitando flores en el sitio SBN (17/02/2007). La flecha muestra el polinario adherido al labro de la abeja (Fotografía: Phill Brewster).

Cyclopogon luteo-albus se distribuye en Veracruz (Acatlán, Banderilla, Otilpan, Rancho Viejo, Zongolica, Zontecomatlán), Hidalgo, Puebla, Oaxaca, Querétaro, Chiapas, Guerrero. Se debe mencionar que algunos registros tienen más de diez años de haber sido colectados, por lo que no hay seguridad que el hábitat todavía exista (Espejo-Serna, *et al.* 2005; R. Solano, CIDIIR Unidad Oaxaca, IPN, com. pers.). Su hábito es terrestre y se observa escasamente en acumulaciones de humus en rocas y árboles. Se distribuye en una amplia gama de tipos de vegetación, tales como en bosque de encino, pino-encino, bosque tropical caducifolio, pero en la región central de Veracruz generalmente se encuentra en acahuales maduros de bosque de niebla y en la sierra de Zongolica se observa en el bosque de niebla asociado a bosque tropical perennifolio (Díaz-Toribio, 2009; L. Juárez observación personal).

Dado que las poblaciones de *C. luteo-albus* se encuentran inmersas en fragmentos de bosque de niebla, un tipo de vegetación amenazado en la región central de Veracruz, es importante evaluar su estado de conservación de *C. luteo-albus* a partir del enfoque de dinámica poblacional y de la genética de poblaciones; de aquí que surjan las preguntas ¿cuál es la tasa de crecimiento poblacional?, ¿cuáles son los procesos demográficos que tienen mayor influencia sobre la dinámica poblacional?; dado el comportamiento demográfico actual de estas poblaciones, ¿cuál es el tiempo de persistencia poblacional (a partir del cálculo de su probabilidad de cuasi-extinción dada las condiciones demográficas actuales)?.

Desde un enfoque de genética de poblaciones, se formulan las preguntas, ¿cómo se reparte la variación genética dentro y entre las poblaciones de *C. luteo-albus*?, y al interior de una población, se pretende evaluar la estructura genética fina considerando la estructura de tamaños, así como identificar ¿cuáles son los factores ecológicos y evolutivos que producen dicha estructura?

La información demográfica y genética son los parámetros claves que permiten determinar el comportamiento demográfico y las implicaciones numéricas de sus características de historias de vida, y permiten estimar la probabilidad del tiempo de persistencia poblacional de las mismas.

En el Capítulo II de esta tesis, se presenta el análisis del estado poblacional de *C. luteo-albus* desde un enfoque de dinámica poblacional. Esto se aborda a través del uso de matrices de transición que describen los principales parámetros y procesos demográficos que determinan las tasas de crecimiento poblacional observadas en cuatro periodos (2005-2009) para una población, y en tres periodos (2006-2009) para una segunda población.

En el Capítulo III, se analiza la genética de poblaciones de *C. luteo-albus* en tres localidades, dos de ellas distanciadas por ~8 km lineales y la más alejada a ~100 km, usando marcadores aloenzimáticos. En este análisis, se describen los principales parámetros de variación y estructura genética dentro y entre poblaciones. Asimismo, se compara la estructura genética al interior de una de las poblaciones de estudio considerando aspectos demográficos, tales como la estructura de tamaños, para discernir sobre los posibles factores ecológicos y evolutivos que moldean la estructura genética. Estos aspectos se analizan bajo el contexto de la fragmentación del hábitat. A partir del escenario de fragmentación, cuya génesis permite inferir una breve historia de los cambios antrópicos que el bosque de niebla ha presentado desde el siglo XVI, el objetivo de este capítulo fue determinar la estructura genética de *C. luteo-albus* en dos escalas espaciales, a nivel población y a nivel de parche (dentro de una población), así como determinar los aspectos del ciclo de vida que esta orquídea terrestre producen en la estructura genética a un nivel más fino (entre categorías de tamaño). Por último, la importancia de obtener información demográfica y genética de la especie de estudio se discute en el Capítulo IV.

Literatura Citada

Ackerman, J.D. 1986. Coping with the epiphytic existence: pollination strategies. *Selbyana* 9: 52-60.

Ackerman, J.D., A. Sabat, J.K. Simmerman. 1996. Seedling establishment in an epiphytic orchid: an experimental study of seed limitation. *Oecologia* 106: 192–198.

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

Asbjornsen, H., N. Velázquez-Rosas, R. García-Soriano, C. Gallardo-Hernández. 2005. Deep ground fires cause massive above- and below-ground biomass losses in tropical montane cloud forests in Oaxaca, Mexico. *Journal of Tropical Ecology* 21: 427-434.

Arriaga, L. 2000. Types and causes of tree mortality in a tropical montane cloud forest of Tamaulipas, Mexico. *Journal of Tropical Ecology* 16: 623:636.

Batty, A.L., K.W. Dixon, M. Brundrett, K. Sivasithamparam. 2001. Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a Mediterranean bushland. *New Phytologist* 152: 511-520.

Benítez-Vieyra, S. A.M. Medina, E. Glinos, A.A. Cocucci. 2006. Pollinator-mediated selection on floral traits and size of floral display in *Cyclopogon elatus*, a sweet bee-pollinated orchid. *Functional Ecology* 20: 948-957.

Benzing, D.H. 1990. Epiphytism: a preliminary overview, Vascular epiphytes. General biology and related biota. Cambridge University Press.

Blanco, M.A. 2002. Notes on the natural history of *Cyclopogon obliquus* (Orchidaceae: Spiranthinae) in Costa Rica. *Lakesteriana* 5: 3-8.

- Blinova I., F-M. Chelewski. 2008. Subarctic warming and its influence on the growth of orchid population in the extreme North-East of Europe (Murmansk region). *Journal of Europäischer Orchideen* 40: 663-680.
- Bremer, K. 2000. Early Cretaceous lineages of monocot flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 97: 4707–4711.
- Brundrett, M.C. 2007. Role of symbiotic relationships in Australian terrestrial orchid conservation. *Australian Plant Conservation* 15: 2-7.
- Calvo, R. 1993. Evolutionary demography of orchids: intensity and frequency of pollination and the cost of fruiting. *Ecology* 74: 1033-1042.
- Castañeda-Zárate, M., J. Viccón-Esquivel, S. E. Ramos-Castro, R. Solano-Gómez. 2012. Registros nuevos de Orchidaceae para Veracruz, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83: 281-284.
- Castro, B.G., J.G. García-Franco. 2007. Vanilla (*Vainilla planiflora* Andrews) crop systems used in the Totonacapan area of Veracruz, Mexico: Biological and productivity evaluation. *Journal of Food, Agriculture y Environment* 5: 136-142.
- Challenger, A. 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. CONABIO, México.
- Crone, E.E., E.S. Menges, M.M. Ellis, T.Bell, P. Bierzychudek, J. Ehrlén, T.N. Kaye, T.M. Knight, P. Lesica, W.F. Morris, G. Oostermeijer, P.F. Quintana-Ascencio, A. Standley, T. Ticktin, T. Valverde, J.L. Williams. 2011. How do plant ecologists use matrix population models? *Ecology Letters* 14: 1-8.
- Chung M.Y., J.D. Nason, M.G. Chung. 2004. Spatial genetic structure in populations of the terrestrial orchid *Cephalanthera longibracteata* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 91:52-57.

Chung, MY., JD. Nason, M.G. Chung. 2011. Significant demographic and fine-scale genetic structure in expanding and senescing populations of the terrestrial orchid *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 98: 2027-2039.

Damon, A., J. Valle-Mora. 2008. Retrospective spatial analysis of the pollination of two miniature epiphytic orchids with different pollination strategies in a coffee plantation in Soconusco, Chiapas, Mexico. *Botanical Journal of Linnean Society* 158: 448-459.

Darwin, C. 1862. On the many contrivances why British orchids are fertilised. Jhon Murray, Albemarle street. London.

Diez, J.M. 2007. Hierarchical patterns of symbiotic orchid germination linked to adult proximity and environmental gradients. *Journal of Ecology* 95: 159-170.

Dressler, R.L. 1981. *The Orchids: Natural History and Classification*, 1st ed. Harvard University Press, Mass. U.S.A.

Díaz-Toribio, M. 2009. Orquídeas terrestres como indicadores de calidad ambiental en fragmentos de bosque mesófilo de montaña. Tesis de Maestría. INECOL, Veracruz, México.

Dressler, R.L. 2005. How many orchid species? *Selbyana* 26: 155-158.

Espejo-Serna, A. 2012. El endemismo en las Liliopsida mexicanas. *Acta Botánica Mexicana* 100: 195-257.

Espejo-Serna, A., A.R. López-Ferrari, R. Jiménez-Machorro, L. Sánchez-Saldaña. 2005. Las orquídeas de los cafetales de México: una opción para el uso sustentable de ecosistemas tropicales. *Revista de Biología Tropical* 53: 73-84.

Epperson, P.K. 2003. *Geographical Genetics*. Princeton University Press. UK.

Espejo-Serna, A., A.R. López-Ferrari, R. Jiménez-machorro. 2005. Las orquídeas de los cafetales en México: una opción para el uso sostenible de ecosistemas tropicales. *Revista de Biología Tropical* 53: 73-84.

Florescano, M.S. 1989. El agua y la industrialización de Xalapa y su región durante el siglo XIX. *La Palabra y el Hombre* 70: 175-192.

Forrest, A.D., M.L. Hollingsworth, P.H. Hollingsworth, C. Sydes, R.M. Bateman. 2004. Population genetic structure in European populations of *Spiranthes romanzoffiana* set in the context of other genetic studies on orchids. *Heredity* 92: 218-227.

Gentry, A.H., C. Dodson. 1987. Contribution of non-trees to the species richness of a tropical rainforest. *Biotropica* 19: 149-156.

Gamper, H.A., S. Koptur, J. García-Franco, A.P. Stapper. 2010. Alteration of forest structure modifies the distribution of scale insect, *Stigmacoccus garmilleri*, in Mexican tropical montane cloud forest. *Journal of Insect Science* 11: 1-14.

García-Soriano, R. 2003. Demografía, manejo y conservación de *Artorima erubescens*, en Oaxaca, orquídea endémica del sur de México. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán., México.

Gregg, K.B. 1991. Variation in behavior for populations of the orchids *Cleistres divaricata*, an assessment using transition matrix models *En: Wells T.C.E. and J.H. Willems (eds.). Population ecology of terrestrial orchids.* Academic Publishing, The Netherlands.

González-Espinosa, M., J.A. Meave, N. Ramírez-Marcial, T. Toledo-Aceves, F.G. Lorea-Hernández, G. Ibarra-Manríquez. 2012. Los bosques de niebla de México: conservación y restauración de su componente arbóreo. *Ecosistemas* 21: 36-52.

- Hágsater, E., M. Á. Soto-Arenas, G. A. Salazar-Chávez, R. Jiménez-Machorro, M. A. López-Rosas, R. L. Dressler. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México.
- Halbinger, F., M. Soto. 1997. *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr. *En*: Hágsater, E., M. Soto, E. Greenwood, R. L. Dressler, P. J. Cribb, J. Rzedowski, P. M. Catling, C. J. Sheviak, and F. Chiang (eds.), *Laelias of México*. *Orquídea (Méx.)* 15: 133–142.
- Hamilton, L.S., J.O. Juvik, F.N. Scatena. 1995 (eds.) *Tropical montane cloud forests*. Springer New York.
- Harper, J.L. 1980. Plant demography and ecological theory. *Oikos* 35:244-253.
- Hutchings, M.J. 2010. The population biology of the early spider orchid *Ophrys sphegodes* Mill. III. Demography over three decades. *Journal of Ecology* 98: 867-878.
- Honnay, O., H. Jacquemyn. 2007. Susceptibility of common and rare plant species to the genetic consequences of habitat fragmentation. *Conservation Biology* 21: 823-831.
- Instituto Nacional de Geografía y Estadística INEGI, 2005. Superficie continental (Kilometros cuadrados). <http://www.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx>. fecha de consulta 26 de septiembre de 2012.
- IUCN/SSC Orchid Specialist Group. 1996. *Orchids Status survey and conservation action plan*. IUCN, Gland Switzerland and Cambridge, UK.
- Jacquemyn H., R. Bryns, M. Hermy, J.H. Willems. 2005. Does nectar reward affect rarity and extinction probabilities of orchid species? An assessment using historical records from Belgium and the Netherlands. *Biological Conservation* 121: 257-263.
- Janssen, T., K. Bremer. 2004. The age of major monocot groups inferred from 8001. rbcL sequences. *Botanical Journal of Linnean Society* 146: 385–398.
- Jersakova J., T. Malinova. 2007. Spatial aspects of seed dispersal and seedling recruitment in orchids. *New Phytologist* 176:237-241

Kalisz, S., J.D. Nason, F.A. Hanzawa, S.J. Tonsor. 2001. Spatial population genetic structure in *Trillium grandiflorum*: the role of dispersal, mating, history, and selection. *Evolution* 55:1560-1568.

Kull, T. 1992. Population dynamics of the north temperate orchids *En*: Kull T. and J. Arditti. (eds.) *Orchid Biology: reviews and perspectives VIII*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands. P. 139-165.

Kull, T., P. Kindlmann. 2006. Conservation Biology of orchids: Introduction to the special issue. *Biological Conservation* 129: 1-3.

Lesica, P., M. B. Steele. 1996. A method for monitoring long-term population trends: an example using rare arctic-alpine plants. *Ecological Applications* 6: 879-887.

Lovejoy, T.E., R.O.R. Bierregard, A.B.Jr. Rylands, J.R. Malcolm, C.E., Quintanella, L.H. Harper, K.S., Brown, A.H.Jr. Powell, G.V.N., Powell, H.O.R., Schubart, M.B. Hays. 1986. Edge and other effects of isolation on Amazon forest fragments *En*: Soulé M.E. (ed.). *Conservation biology: the science of scarcity and diversity*. Sinauer, Sunderland, Mass. p. 257-285.

Metcalf, C.J., S. Pavard. 2006. Why evolutionary biologist should be demographers. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 205-212.

Micheneau, C., S.D. Johnson, M.F. Fay. 2009. Orchid pollination: from Darwin to the present day *Botanical Journal of Linnean Society* 161: 1-19.

Muñoz-Villers L.E., J. López-Blanco. 2008. Land use/cover changes using landsat tm/etm images in a tropical and biodiverse mountainous area of central-eastern Mexico. *International Journal of Remote Senses* 29:71-93.

Peakall R., A.J. Beattie. 1996. Ecological and genetic consequences of pollination by sexual deception in the orchid *Caladenia tentaculata*. *Evolution* 50:2207-2220.

- Pfeifer, M., K. Wiegand, W. Heinrich, G. Jetschke. 2006. Long term demographic fluctuations in an orchid species driven by weather: implications for conservation planning. *Journal of Ecology* 43: 313-324.
- Ramírez, S. R., B. Gravendeel, R. B. Singer, C. R. Marshall, N. E. Pierce. 2007. Dating the origin of Orchidaceae from a fossil orchid and its pollinator. *Nature* 448: 1042-1045.
- Rasmussen, H.N., D.F. Whigham, 1998. The underground phase: a special challenge in studies of terrestrial orchid populations. *Botanical Journal of Linnean Society* 126: 49-64.
- Rzedowski, J. 1996. Análisis preliminar de la flora vascular de los Bosques Mesófilos de Montaña. *Acta Botánica Mexicana* 35: 25-44.
- Roche, S.A., R.J. Carter, R. Peakall, L.M. Smith, M.R. Whitehead, C.C. Linde. 2010. A narrow group of monophyletic *Tullasnella* (*Tulanesllaceae*) symbiont lineages are associated with multiple species of *Chiloglottis* (Orchidacea): Implications for orchid diversity. *American Journal of Botany* 97: 1313-1327.
- Salazar, G. 2009. Conservación y propagación de orquídeas. Biodiversidad del ecosistema del Pedregal de San Ángel. *En: Antonio Lot, Zenón Cano-Santana (eds.) Universidad Nacional Autónoma de México.*
- Sanger, N.P., S. Waite. 1998. The phenology of *Ophrys sphegodes* (the early Spider Orchid): what annual censuses can miss. *Botanical Journal of the Linnean Society* 126: 75-81.
- Shaffer, M. 1987. Minimum viable populations: coping with uncertainty *En: Soulé M.E. (ed.). Viable populations for conservation. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.*
- Shefferson R. P., T. Kull, and T. Kadri. 2005. Adult whole-plant dormancy induced by stress in long-lived orchids. *Ecology* 86: 3099-3104.
- Silvertown, J., D. Charlesworth. 2001. *Introduction to plant population biology*, 4th ed. Blackwell, Oxford.
- Silvertown, J., M. Franco. 1993. Plant Demography and habitat: a comparative approach. *Plant Species Biology* 8: 67-73.

- Singer, R.B., A.A. Coccuci. 1999. Pollination mechanism in southern Brazilian orchids are exclusively or mainly pollinated by halictid bees. *Plant Systematics and Evolution* 217: 101-117.
- Solano-Gómez, R., G. Cruz-Lustre, A. Martínez-Feria, L. Lagunes-Rivera. 2010. Plantas utilizadas en la celebración de la Semana Santa en Zaachila, Oaxaca. *Polibotánica* 29: 263-279.
- Solís-Montero, L., A. Flores-Palacios, A. Cruz-Angón. 2005. Shade coffee plantations as refuges for tropical wild orchids in central, Veracruz. *Conservation Biology* 19: 908-916.
- Sosa, V., T. Platas. 1998. Extinction and persistence of rare orchids in Veracruz, Mexico. *Conservation Biology* 12: 451-455.
- Soto-Arenas, M. 1996. Regional Accounts: Mexico *En: IUCN/SSC Orchid Specialist Group. 1996. Orchids Status survey and conservation action plan. IUCN, Gland Switzerland and Cambridge, UK.*
- Soto, M.A., E. Hágsater, R. Jiménez, G.A. Salazar, R. Solano, R. Flores, E.I. Contreras. 2007. Las orquídeas de México: catálogo digital. Instituto Chinoin, A.C., México, D.F.
- Soto-Arenas, M. A, R. Solano-Gómez, E. Hágsater. 2007. Risk of extinction and patterns of diversity loss in mexican orchids. *Lankesteriana* 7: 114-121.
- Swarts, N.D., K.W. Dixon. 2009. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany* 104: 543-556.
- Tamm, C. O. 1972. Survival and flowering of some perennial herb. *Oikos* 23: 23-28.
- Tamm, C. O. 1948. Observations on reproduction and survival of some perennial herbs. *Botanic Notes* 305-321.
- Tremblay R.L. 1992. Trends in pollination biology of the Orchidaceae. *Evolution and Systematics. Canadian Journal of Botany* 70:642–650.

- Vásquez, R., P.L. Ibisch, B. Gerkmann. 2003. Diversity of Bolivian Orchidaceae - a challenge for taxonomic, floristic and conservation research. *Organisms, Diversity and Evolution* 3: 93-102.
- Volis, S., G. Bohrer, G. Oostermeijer, P.V. Tienderen. 2005. Regional consequences of local population demography and genetics in relation to habitat management in *Gentiana pneumonanthe*. *Conservation Biology* 19: 357-367.
- Warcup, J.H. 1985. *Rhizanthella gardneri* (Orchidaceae), its *Rhizoctonia* endophyte and close association with *Melauca uncinata* (Mrtaceae) in Western Australia. *New Phytologist* 99: 273-280.
- Wells, T. C. E. 1967. Changes in a population of *Spiranthes spiralis* (L.)Chevall.at Knocking Hoe National Nature Reserve, Bedfordshire. *Journal of Ecology* 55:83-99.
- Wikström, N., Savolainen, V., M.C. Chase. 2001. Evolution of the angiosperms: calibrating the family tree. *Proceedings of the Royal Society of London* 268: 2211–2220.
- Williams-Linera, G. 2007. El bosque de niebla del centro de Veracruz: Ecología, historia y destino en tiempos de fragmentación y cambio climático. INECOL, CONABIO, Xalapa, Veracruz, Mexico.
- Wright, S. 1951. The genetic structure of populations. *Annals of Eugenetics* 16: 97-159.
- Wright S. 1978. *Evolution and the genetics of populations*.Vol. 4. University of Chicago Press, Chicago, London.
- Zotz, G., G. Schmidt. 2006. Population decline in the epiphytic orchid *Aspasia principissa*. *Biological Conservation* 129: 82-90.

Capítulo II

Dinámica poblacional de *Cyclopogon luteo-albus* (Orchidaceae) en el Bosque de Niebla del centro de Veracruz, México

Juárez, L., C. Montaña.

RESUMEN

Se realizó un estudio demográfico de dos poblaciones de *Cyclopogon luteo-albus*, que es una orquídea terrestre localmente abundante en el bosque de niebla de la región central de Veracruz; este tipo de vegetación en la actualidad enfrenta un continuo proceso de fragmentación de origen antrópico. Se construyeron matrices anuales de proyección poblacional y de elasticidad con 7 y 6 categorías de tamaño (con y sin la categoría de latencia) para el periodo 2005-2009 en el sitio Santuario del Bosque de Niebla (SBN) y 2006-2009 en el sitio Martinica (MART) y se realizó un análisis para calcular la probabilidad de cuasi-extinción de cada población. En general, *C. luteo-albus* mostró bajas tasas de crecimiento poblacional. Los valores de elasticidad fueron mayores para las entradas matriciales correspondientes a la permanencia, seguidos del crecimiento y la fecundidad. Las tasas finitas de crecimiento poblacional anuales no variaron marcadamente en el tiempo al interior de cada población, pero se encontraron diferencias significativas entre ambas poblaciones sólo para el periodo 2006-2007, cuando λ fue de 0.988 ($IC_{95\%} = 0.947-0.992$) en SBN y de $\lambda = 1.001$ ($IC_{95\%} = 0.976-1.022$) en MART. Probablemente esta diferencia se debió a que, durante este periodo, la población de MART presentó tasas de mortalidad bajas y una alta permanencia en la categoría de adulto 1. La demografía de ambas poblaciones sugiere que si las condiciones actuales se mantienen podrían extinguirse al disminuir su tamaño poblacional al 10% de su tamaño actual en menos de 100 años. Los estudios demográficos, pueden ser una herramienta importante para determinar las escalas de las unidades de conservación que permitan mantener los procesos ecológicos, así como proponer pautas para la conservación de fragmentos de bosque de niebla capaces de sostener poblaciones grandes de *C. luteo-albus*.

Palabras claves: conservación, demografía de plantas, elasticidad, latencia, orquídea terrestre, tasa de crecimiento poblacional, viabilidad poblacional.

ABSTRACT

We conducted a demographic study of two populations of *Cyclopogon luteo-albus*, a locally abundant terrestrial orchid that inhabits the cloud forest of central Veracruz; the latter is a type of vegetation that currently faces a continuous process of anthropogenic fragmentation. Annual population projection matrices and elasticity matrices were constructed with 7 and 6 size categories (with and without a dormant category) for the period 2005-2009 in Santuario del Bosque de Niebla (SBN) and from 2006-2009 in Martinica (MART) and the probability of quasi-extinction was calculated for each population. The two populations of *C. luteo-albus* showed low rates of population growth in most years. Elasticity values were highest for the matrix entries corresponding to stasis, followed by growth and fecundity. It was also found that the dormant stage does not contribute significantly to population growth rate. Finite rates of annual population growth did not vary much over time within each population. Significant differences were found between the λ values of both populations only for the period 2006-2007, $\lambda = 0.988$ ($CI_{95\%} = 0.947-0.992$) in SBN and $\lambda = 1.001$ ($CI_{95\%} = 0.976-1.022$) in MART. These differences could be accounted for by the low mortality rate and a high stasis shown by the adult 1 category. In conclusion, the quasi-extinction probabilities calculated showed that under current conditions, both populations could become extinct because a reduction of their population size to a 10% of its current size in less than 100 years. Demographic studies may be an important tool for determine the scales of conservation unities in order to protect the ecological processes, and also to propose strategies of cloud forest fragments conservation that may sustain large *C. luteo-albus* populations.

Keywords: conservation, plant demography, elasticity, dormancy, terrestrial orchid, population growth rate, population viability.

Introducción

En México el Bosque de Niebla (BN) es uno de los ecosistemas más amenazados. La superficie original del BN ha desaparecido en más del 50% de su superficie original y en la actualidad ocupa menos del 1 % del territorio nacional (Challenger, 1998). Este tipo de vegetación ha estado sujeto a un constante cambio durante siglos como resultado de un proceso de fragmentación (Rzedowski, 1978), un fenómeno complejo que involucra la pérdida del hábitat, el aumento en el número y grado de aislamiento de los fragmentos y la disminución en el tamaño de las poblaciones remanentes (Fahrig, 2003).

En la región central de Veracruz, una de las principales causas de la fragmentación del BN ha sido la deforestación para la introducción de plantaciones de café, la cual fue muy pronunciada en el último cuarto del siglo XIX, mientras que en la segunda mitad del siglo XX se orientó a la creación de pastizales inducidos para la crianza de ganado (Challenger, 1998; Muñoz-Villers y López-Blanco, 2008). En la actualidad esta región es un mosaico de fragmentos de BN, que albergan alrededor de la mitad de las especies de orquídeas conocidas para México (IUCN/SSC, 1996), así como cafetales de sombra, los cuales se consideran refugios importantes de algunas poblaciones de orquídeas epífitas (Lugo 1998; Williams *et al.* 1995), y pastizales y asentamientos urbanos.

La conversión del BN a cafetales puede tener diversas consecuencias en la demografía de las orquídeas terrestres que ahí habitan, ya que su transformación implica la eliminación definitiva del estrato más bajo del sotobosque. Esto, además de eliminar el tamaño poblacional, restringe el número y el área de los sitios de reclutamiento, ya que las orquídeas terrestres suelen demandar condiciones específicas de sustrato para su establecimiento (Rasmussen, 1995; Sosa y

Platas 1998; McCormick *et al.*, 2006). En los fragmentos de bosque, el efecto de borde disminuye el reclutamiento y/o supervivencia de plántulas debido a cambios microambientales, tales como el incremento en la radicación solar, la disminución de la humedad del suelo y del aire, y la competencia interespecífica con especies invasoras (Jules, 1998; Douterlungne, *et al.* 2008). Esto último es más grave en especies con individuos longevos, cuyas poblaciones presentan bajas tasas de reclutamiento y de crecimiento poblacional (Oostermeijer *et al.* 1996). La fragmentación también aumenta el aislamiento de las poblaciones y con ello promueve una disminución en la fecundidad, debido a la limitada disponibilidad de polinizadores y la disminución del flujo génico entre ellas, lo que incrementa la probabilidad de deriva génica y endogamia, con consecuencias negativas sobre la diversidad genética, especialmente en especies con un sistema de entrecruzamiento obligado (Aguilar *et al.* 2008; Honnay y Jacquemyn, 2007; Oostermeijer, 2003).

Los estudios demográficos cuantifican los cambios numéricos de las poblaciones a lo largo del tiempo y son una herramienta que proporciona información del estado actual. Los primeros estudios sobre dinámica poblacional de orquídeas se realizaron con especies terrestres de regiones Holárticas (Wells, 1967; Tamm, 1972; Hutchings, 2010). Uno de los primeros estudios en el que se implementó un modelo matricial de proyección poblacional fue el de *Ophrys sphegodes* (Waite y Hutchings, 1991). Este modelo incluyó explícitamente una de las etapas más enigmáticas del ciclo de vida de las orquídeas terrestres, que es la etapa de latencia, en la cual la planta pierde sus hojas, permanece viva bajo la superficie del suelo y pospone la reproducción sexual al menos durante una temporada (Lesica y Steele, 1994). Los estudios posteriores han sugerido que la latencia puede actuar como una estrategia de amortiguamiento en contra de años con estrés ambiental (Kull, 2002; Shefferson, 2005; Shefferson y Tali, 2007).

En México, los estudios que exploran el comportamiento demográfico de orquídeas terrestres aún son escasos. Solo se tienen noticia de un estudio, sobre *Cypripedium irapeanum* realizado en Valsequillo, Puebla (Gutiérrez-Paredes, 2000) y de algunos estudios sobre la transición de semilla a plántula en orquídeas terrestres del Pedregal de San Ángel, en la Ciudad de México (Ortega-Larrocea *et al.* 2009). Los estudios demográficos con especies epífitas mexicanas son más numerosos, entre los que se encuentra el de *Laelia speciosa*, *Artorima erubescens*, *Oncidium poikilostalix*, *O. crista galli*, *Guarianthe aurantiaca*, *Ryncholaelia glauca*, *Jaquiniella leucomelana*, *J. teretifolia* y *Lycaste aromatica* (Hernández-Apolinar, 1992; García-Soriano, 2004; García-González *et al.* 2011; Maldonado-Flores, 2006; Mondragón 2009; Flores-Palacios y García-Franco, 2003; Winkler *et al.* 2009). En general, los estudios que utilizan matrices de proyección poblacional para las orquídeas epífitas han mostrado, en su mayoría, que la persistencia de sus poblaciones está sujeta a perturbaciones naturales, como la caída de ramas, mientras que en la orquídeas terrestre *Cypripedium irapeanum*, está sujeta a la apertura de claros (Sosa y Platas, 1998; Gutiérrez-Paredes, 2000; Solís-Montero, *et al.* 2005).

De forma complementaria a los estudios demográficos, y cuando existen datos de más de cuatro años, es deseable evaluar el tiempo de persistencia de una población a través de un análisis de viabilidad (PVA, Morris y Doak, 2002). Este análisis estima el riesgo relativo de extinción (cuasi-extinción), un enfoque más realista que la estimación del riesgo absoluto de extinción ya que evalúa la probabilidad de que una población disminuya su tamaño población a un umbral tal (i.e. <10 %), que la probabilidad de extinción se acerque a 1. Los PVA en orquídeas mexicanas aún son escasos y sólo se conoce el estudio de la orquídea epífita *Guarianthe aurantiaca* (Mondragón, 2009). En especies longevas con ciclos de vida complejos que requieren de censos de largo plazo como las orquídeas terrestres, aún no existe información por lo que es necesario

recabar dicha información para determinar el comportamiento futuro de sus poblaciones (Nicolé *et al.* 2005).

En la región central de Veracruz, *Cyclopogon luteo-albus* (A. Rich. y Galeotti) Schltr. es una orquídea terrestre abundante. Se distribuye en forma agregada en los fragmentos de bosque de niebla debido a las condiciones especiales de suelo que requiere para el desarrollo de las micorrizas con las que se asocia a partir de la germinación de sus semillas (Rasmussen, 1995). Un estudio previo mostró que algunas poblaciones de *C. luteo-albus* tienen una considerable diversidad genética, la cual podría mantenerse a largo plazo bajo las condiciones actuales de fragmentación (Juárez, *et al.* 2011); no obstante, no existen datos sobre la viabilidad demográfica de las poblaciones de esta especie. Se eligió esta especie debido a que presenta tamaños poblacionales grandes con respecto a otras orquídeas terrestres de la zona de estudio, con una notable estructura de tamaños.

En este trabajo se estudió el comportamiento demográfico en dos poblaciones de *C. luteo-albus*, contestando las siguientes preguntas: a) ¿cuál es la tasa de crecimiento poblacional en dos localidades, esta tasa presenta variación en el tiempo (entre años) y espacio (entre poblaciones), y cuáles son los procesos demográficos que tienen mayor influencia sobre la dinámica poblacional?; b) dado el comportamiento demográfico actual de estas poblaciones, ¿cuál es la probabilidad de cuasi-extinción de cada población a lo largo del tiempo?

Las poblaciones de estudio son fragmentos de bosque de niebla en la región central de Veracruz, ambos fragmentos se encuentran protegidos desde hace algunas décadas en un santuario y en una reserva privada. El Santuario de Bosque de Niebla, SBN, está protegido desde

hace 45 años, mientras que el otro fragmento (Martinica, MART) forma parte de una reserva privada desde hace 20 años.

MÉTODOS

Sitios de estudio.- El Santuario del Bosque de Niebla (SBN) pertenece al Jardín Botánico Francisco Javier Clavijero del Instituto de Ecología, A.C., ubicado en la Ciudad de Xalapa, Veracruz (19° 31' 05'' N, 96° 56' 03'' O, 1,350 m s.n.m., 1,517 mm de precipitación anual y 18 °C de temperatura media anual). Forma parte del Área Natural Protegida Estatal Parque Francisco Javier Clavijero, decretada en 1975, que fue cedida en comodato al Instituto de Ecología A.C. en 1996. SBN, es un área de 30 ha, protegida desde 1976, y en la actualidad se encuentra inmersa en la ciudad de Xalapa, capital de Veracruz, México (Figura 2.1). En este sitio, *C. luteo-albus* se distribuye en colonias o parches e individuos solitarios. Es una de las orquídeas terrestres más abundante con respecto a otras especies, como *Pelexia funckiana*, *Calanthe calanthoides*, *Habenaria* sp., *Sarcoglotis* sp.

Esta localidad es un fragmento cuyo dosel está dominado por *Liquidambar styraciflua*, *Quercus leiophylla* y *Carpinus carolineana*, principalmente. En los estratos inferiores abundan los arbustos *Palicourea padifolia*, *Piper auritum*, *Moussonia deppeana*, *Cestrum miradoreense*. Algunos árboles de antiguos usos agropecuarios son *Coffea arabica* (café), *Citrus aurantium* (naranja), *Psidium guajava* (guayaba) y *Eriobotrya japonica* (níspero) (INECOL, 2004; Williams-Linera, 2007).

Martinica (MART, 19° 34' 49'' N, 96° 56' 28'' O, 1,550 m s.n.m., 1,470 mm de precipitación anual aunque puede alcanzar 2,270 mm y 17°C de temperatura media anual), es un pequeño fragmento de BN, de ca. 10 ha, inmerso en la localidad de Banderilla, al noroeste de la ciudad de Xalapa, a 8 km lineales del SBN. Este terreno es una propiedad privada y sus dueños lo han mantenido sin explotación agropecuaria desde hace 20 años. Este sitio es aledaño al Cerro La Martinica (Mapa 1), un fragmento de 52 ha que en 2005 fue decretado como área natural protegida por su diversidad biológica y por los servicios ambientales que ofrece. En esta zona, la vegetación del dosel es similar al SBN, siendo dominado en el dosel por *Liquidambar styraciflua*, *Quercus corrugata*, *Q. leiophylla*, *Q. xalapensis* y *Carpinus carolineana*, principalmente. En los estratos inferiores abundan los arbustos *Palicourea padifolia*, *Piper hispidum*, *Cestrum miradoreense*, *Simplocos coccinea*, *Moussonia deppeana*, entre otros (SEDESMA, 2006).

Ambas localidades presentan un clima templado húmedo C(fm), con tres temporadas climáticas al año, una relativamente seca y fría que se extiende de noviembre a marzo con heladas entre diciembre y enero, una temporada seca-cálida de abril a mayo y una temporada húmeda-templada de junio a octubre. Las principales amenazas para la persistencia de estas áreas naturales son la tala ilegal de árboles, como *Liquidambar styraciflua*, y diversas especies de *Quercus*, la presencia de especies invasoras como algunas gramíneas y el helecho *Pteridium aquilinum*, como la extracción de “efecto hormiga” de hojarasca y epífitas (i.e. orquídeas y bromelias), y la extracción de agua de manantiales en Martinica (SEDESMA, 2006; L. Juárez, observación personal).

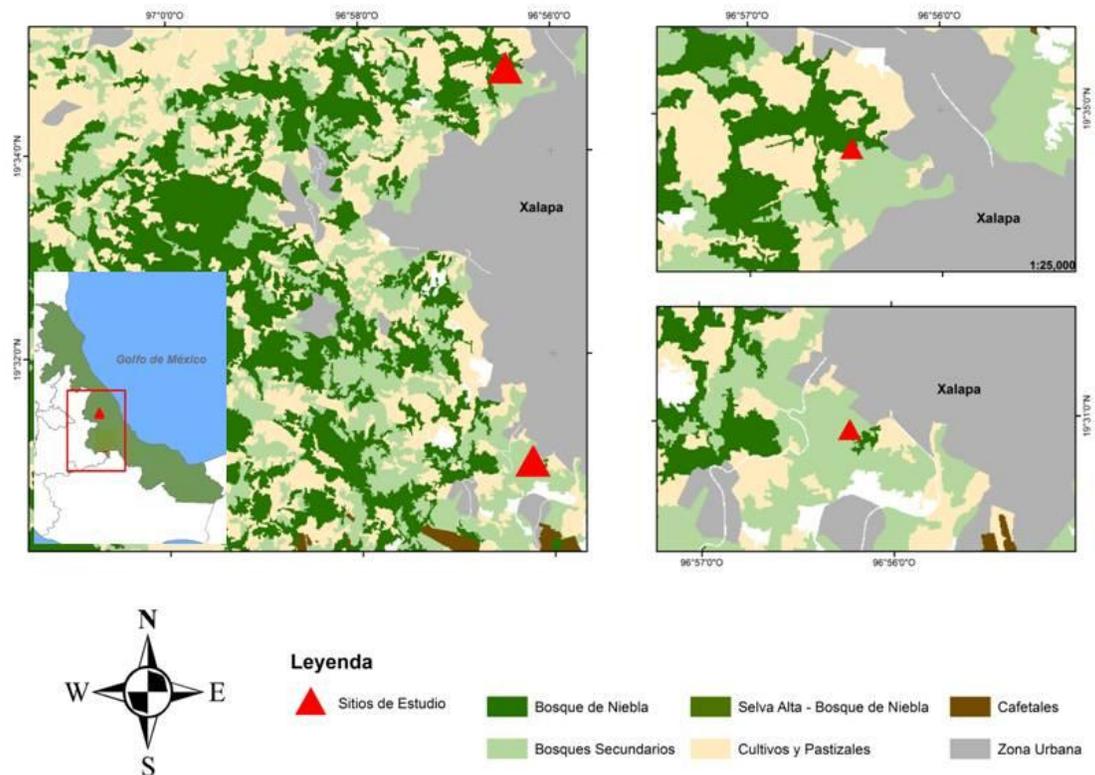


Figura 2.1. Ubicación de los sitios de estudio en los fragmentos de Bosque de Niebla cercanos a la Ciudad de Xalapa (triángulos). SBN (Santuario del Bosque de Niebla, inferior derecha) y MART (Martinica, superior derecha) y ambos sitios, izquierda.

Especie de estudio.- *Cyclopogon luteo-albus* (A. Rich. y Galeotti) Schltr. (Orchidoideae: Cranichideae) es una especie de origen neotropical que se distribuye en México. En la región central de Veracruz se encuentra en fragmentos de BN y es abundante en zonas de transición entre selva mediana y bosque de niebla (Espejo-Serna *et al.* 2005).

Los individuos de *C. luteo-albus* forman una roseta perenne de hasta 8 hojas elíptico-lanceoladas de 0.5 a 5 cm de ancho y 1 a 16 cm de largo. Presenta un sistema simple de raíces adventicias, ramificadas y tuberoideas que también funcionan como tejido de perennación cuando la planta pierde todo su follaje. En esta etapa llamada latencia, la planta se mantiene viva por

debajo de la superficie del suelo y (Lesica y Steele, 1994; Kull, 2002; Shefferson, 2005). La latencia es un estado diferenciado en el que se suspende de forma temporal el desarrollo y crecimiento del tejido no-subterráneo; puede ser inducida por daño físico derivado de la herbivoría o por condiciones ambientales adversas, como sequía (Tamm, 1972; Kull, 1995). En este estudio, la latencia se consideró en el modelo demográfico que más adelante, se presenta como la categoría de “latente”. Las plantas pueden entrar en latencia y sobrevivir algunos años en ese estado. La latencia la entendemos aquí como

En esta especie, la propagación vegetativa es poco común; sólo 5 de los más de 500 individuos estudiados en este estudio demográfico tuvieron raíces que los conectaran entre ellos (observación personal), por lo que la inspección multilocus de alrededor de 340 individuos permitió descartar esta posibilidad. Sin embargo, en un estudio sobre genética de poblaciones realizado en estas poblaciones, se confirmó que la ausencia de genotipos repetidos al inspeccionar 340 individuos de *C. luteo-albus*, lo que permitió descartar esta posibilidad.

Ensayos de germinación.- Para determinar si *C. luteo-albus* forma banco de semillas, se realizaron experimentos de germinación en condiciones controladas. Para la germinación de semillas de orquídeas se utilizan medios simbióticos o asimbióticos *in vitro*. El primer medio consiste en germinar las semillas en un medio de cultivo con hongos micorrízicos, mientras que el segundo medio, consiste en germinar las semillas en ausencia del hongo, ya que el medio de cultivo provee los nutrimentos necesarios para que la semilla germine (Rasmussen, 1995).

Los experimentos que se han llevado a cabo en México en medios asimbióticos específicos con algunas especies de orquídeas epífitas (*Oncidium tigrinum*, Baltazar, 2004; *Mormodes tuxtlensis*,

Cuitlauzina pendula y *Lycaste skinneri*, Salazar-Rojas, 2004; *Euchile mariae*, Suarez-Quijada, *et al.* 2007) arrojan resultados contrastantes obtuvieron alrededor del 90% de germinación en periodos de entre 0.5 y 4 semanas. Por otro lado, los experimentos con medios simbióticos *in vitro* en semillas de orquídeas terrestres tropicales (*Spiranthes brevilabris* y *Habenaria macroceratitis*, Stewart y Kane, 2006, 2007) obtuvieron entre el 50 y 60% de germinación dándose la emergencia y elongación de la primera hoja en periodos de entre 7 y 12 semanas, por su parte, el experimento con medios asimbióticos con una orquídea terrestre tropical (*Cyrtopodium punctatum*) se obtuvo alrededor del 80% de germinación en 25 semanas de cultivo (Dutra, 2008).

Para *C. luteo-albus*, se inició un experimento de germinación de semillas con medios asimbióticos en el mes de mayo de 2007. Se colectaron semillas de frutos inmaduros para evitar posibles fuentes de contaminación y se mantuvieron en bolsas de papel de estraza con sílica gel a temperatura ambiente por dos semanas hasta que los frutos maduraron y liberaron las semillas dentro de las bolsas. Antes de iniciar el experimento se evaluó la viabilidad de las semillas mediante una inspección visual al microscopio óptico para verificar la presencia de embrión. Cada fruto contenía en promedio 2,510 semillas \pm 1,593 SD ($N= 8$ frutos) con embrión y aproximadamente el 10% sin embrión. Las semillas que presentaban un embrión evidente y redondo se consideraron viables (Stewart y Kane, 2007).

Se utilizaron dos medios de cultivo asimbiótico para poner a germinar las semillas (medio Knudson y Knudson 2, Rasmussen, 1995) y se sembraron 100 semillas en cada caja de Petri ($N= 10$) en condiciones asépticas por cada medio de cultivo ($N= 30$). Las cajas se mantuvieron en condiciones de obscuridad total (0/24 h Luz/Oscuridad) a una temperatura promedio de 25 °C (± 2) en una cámara de germinación y se examinaron cada semana durante tres meses:

posteriormente se realizaron revisiones mensuales durante 1 año para descartar la posible formación de un banco de semillas, pero en ningún caso se registró germinación. En un futuro es necesario llevar a cabo experimentos con distintos medios de cultivo y/o fotoperiodos, así como realizar siembras de semillas con medios simbióticos o colectar los frutos con las semillas en mayor estado de maduración.

Diagrama del ciclo de vida de *Cyclopogon luteo-albus*.- El diagrama del ciclo de vida de *C. luteo-albus* es una herramienta útil para visualizar las etapas del ciclo de vida de la especie y las transiciones demográficas que involucran su estudio a nivel poblacional (Figura 2.2). En *C. luteo-albus*, la floración y fructificación se producen durante el invierno y la dispersión de semillas se da en la primavera siguiente. La etapa subterránea o micotrófica que involucra desde la germinación de la semilla hasta el establecimiento de la plántula no ha sido estudiada en esta especie, pero suponemos que es relativamente rápida de aproximadamente cuatro meses, como lo sugieren los resultados *in vitro* de algunas orquídeas tropicales epífitas (como *Oncidium tigrinum*, Baltazar, 2004; *Mormodes tuxtensis*, *Cuitlauzina pendula*, *Lycaste skinneri* y *Euchile mariae*, Salazar-Rojas, 2004) y de otras orquídeas terrestres (i.e. menos de cuatro meses, como en *Spiranthes brevilabris*, Stewart y Kane, 2007). No obstante, consideramos que para que se forme el protocormo (etapa de desarrollo del embrión previo a la formación del primordio foliar) en condiciones naturales se requiere de un periodo de crecimiento de algunos meses antes de que produzca los primordios foliares. De este modo, las semillas producidas en el año t dan lugar a las plántulas que se registran como recién emergidas en el año $t + 1$.

Las categorías de tamaño se establecieron a partir de la estimación del área foliar de cada planta (Calvo, 1990, explicado en la siguiente sección).

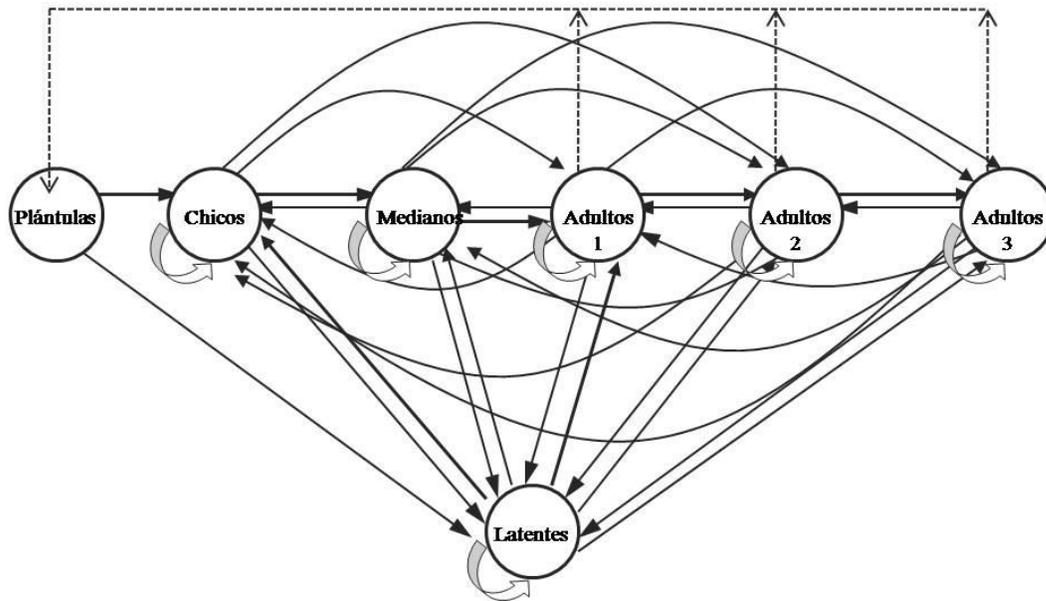


Figura 2.2. Ciclo de vida de *C. luteo-albus*. Los círculos representan las categorías de tamaño de acuerdo al área foliar total de la planta (cm^2): plántulas de $< 0.3 \text{ cm}^2$ con una raíz $< 1 \text{ cm}$ de largo (P), juveniles de $0.01\text{--}10.01 \text{ cm}^2$ (J1), juveniles de $10.02\text{--}26.64 \text{ cm}^2$ (J2), adultos de $26.65\text{--}64.25 \text{ cm}^2$ (A1), adultos de $64.26\text{--}93.6 \text{ cm}^2$ (A2), y adultos de $> 93.7 \text{ cm}^2$ (A3) y latentes (L). Las flechas representan transiciones entre categorías y la flecha punteada representa la fecundidad.

Datos demográficos

Se utilizaron modelos poblacionales matriciales basados en cuatro transiciones anuales para la población SBN (2005-2009) y tres transiciones anuales para MART (2006-2009). Esta diferencia se debió a que inicialmente el proyecto contemplaba un análisis de viabilidad poblacional para la

localidad SBN, un predio protegido, y posteriormente se extendió a un segundo predio privado (MART), donde se gestionó que se eliminara la perturbación antrópica a lo largo del trabajo de campo.

En cada población se ubicaron y marcaron los individuos de *C. luteo-albus* (en SBN, $N=591$ y en MART, $N=336$), dentro de un área de 0.4 ha en 10 cuadros permanentes no contiguos de 20×20 m cada uno (Figura 2.3. - D), y cada año se realizaron mediciones del área foliar en los individuos marcados y en los nuevos (Kéry y Gregg, 2004). El área foliar se estimó con la ecuación para un rombo utilizada por Calvo (1990) para *Cyclopogon cranichoides*:

$$AF = \frac{\sum A_i L_i}{2} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde, i adquiere valores de 1 a n (n = número de hojas de la planta), A_i = ancho de la hoja i , en cm, L_i = largo de la hoja i , en cm.

Los individuos de *C. luteo-albus* se clasificaron en siete categorías de tamaños definidas de acuerdo con su área foliar total y su estado de desarrollo (plántula, no reproductivo, reproductivo o latente, Figura 2.3. - A-C, Cuadro 2.1). Para esto, se obtuvo el AFT de cada planta y se definió el tamaño (cm^2) mínimo a partir del cual una planta se reproduce (produce una inflorescencia). Éste tamaño se utilizó como referencia para distinguir los individuos adultos (A1, A2, y A3, Figura 2.3. – F e I) de los juveniles (J1 y J2). Las plántulas (P), se determinaron como aquellas plantas con primordios foliares distintivos $< 0.3 \text{ cm}^2$ y por una pequeña raíz < 1 cm de largo; juveniles 1 (J1), de $0.01\text{--}10.01 \text{ cm}^2$; juveniles 2 (J2), de $10.02\text{--}26.64 \text{ cm}^2$; adultos 1 (A1), de $26.65\text{--}64.25 \text{ cm}^2$; adultos (A2) de $64.26\text{--}93.6 \text{ cm}^2$, y adultos (A3), de $> 93.7 \text{ cm}^2$ y latentes (L) (Figura 2.3. - A y B).

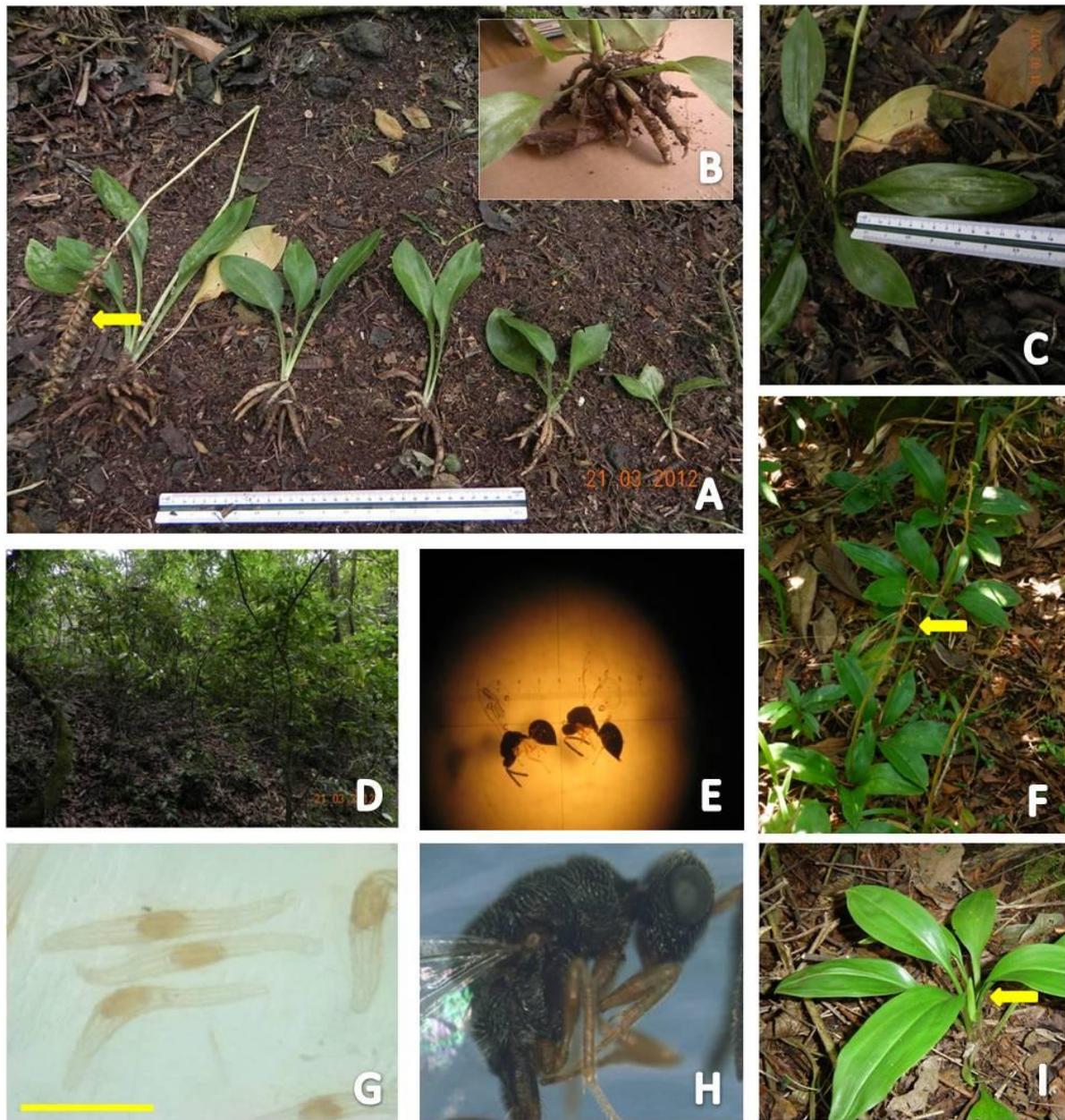


Figura 2.3. A) Plantas de *C. luteo-albus* dispuestas de acuerdo a las categorías de tamaño consideradas (A3, A2, A1, J2 y J1, la flecha indica los frutos maduros), B) acercamiento de las raíces de un individuo adulto, C), ejemplo de la medición de las hojas de una planta adulta, D) hábitat de *C. luteo-albus* en el sitio SBN, Veracruz, E) avispas de la familia *Eurytomidae* que emergieron de ovarios florales (escala en mm), F) plantas adultas (la flecha indica el escapo con herbivoría en el sitio SBN, en 2010, Figura 2.3. - F), G) semillas viables de *C. luteo-albus* (escala 5 mm), H) acercamiento de la avispa (*Eurytomidae*), e I) planta adulta de *C. luteo-albus* (la flecha indica el escapo emergiendo).

Matrices de proyección poblacional.- Se construyeron matrices de proyección poblacional clasificadas por categorías de tamaño (Lefkovitch, 1965) para calcular las tasas finitas de crecimiento poblacional anual (λ , Caswell, 2001). Este modelo proyecta el número de individuos en cada categoría de tamaño en el tiempo $t+1$ a partir de la estructura poblacional en el tiempo t y el conocimiento de las probabilidades de transición y las contribuciones entre categorías, según la siguiente ecuación:

$$n_{t+1} = An_t \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde A es una matriz cuadrada, no negativa, cuyos elementos $a_{i,j}$ representan las probabilidades de transición o la contribución de los individuos de la clase de tamaño j a la clase i entre el tiempo t y el $t + 1$, y n_t y n_{t+1} son los vectores que contiene el número de individuos por clase de tamaño en el tiempo t y $t+1$, respectivamente.

El producto de $A*n_t$, genera un nuevo vector que representa el tamaño y la estructura poblacional en el tiempo $t+1$. Después de varias iteraciones de esta multiplicación, la estructura proporcional del vector resultante converge en una estructura estable de tamaños (w , autovector derecho de la matriz A), un vector de valores reproductivos específicos por categoría (v , autovector izquierdo de la matriz) y una tasa finita de crecimiento poblacional constante (λ , autovalor dominante de A).

En términos generales, una matriz de transición está compuesta por cuatro diferentes tipos de entradas: a) fecundidad, dispuesta en la primera fila de la matriz, que representan el aporte de plántulas *per capita* de cada categoría de adultos a la siguiente generación; b) estasis, que son los elementos dispuestos en la diagonal de la matriz y representan la probabilidad de persistencia en la misma categoría de tamaño de un año a otro; c) crecimiento, que son los elementos colocados

por debajo de la diagonal principal y representan la probabilidad de que los individuos pasen a categorías de mayor tamaño de un año a otro; y d) retrogresión, que son los elementos por encima de la diagonal (excluyendo la primera fila), que representan la probabilidad de que los individuos retrocedan a categorías de menor tamaño de un año a otro. Adicionalmente, en el presente estudio se consideró a la categoría de plantas latentes, en donde se agrupó a las plantas que perdieron las hojas pero que permanecieron vivas entre t y $t + 1$ (Waite y Hutchings, 1991; Nicolé *et al.* 2005). En los casos en los que se añadió esta categoría, la matriz resultante tuvo una fila y una columna adicionales. Un segundo enfoque para ubicar en la matriz a las plantas latentes fue considerar a la latencia ya no como una categoría más sino como una forma de retrogresión o disminución de tamaño, de tal manera que si una planta redujo su área foliar hasta perderla por completo, se interpretó como una reducción individual de tamaño y se le ubicó entonces en la categoría de los juveniles más pequeños (J1), teniendo así una matriz de solo seis categorías de tamaño (P, J1, J2, A1, A2 y A3).

La fecundidad se puede estimar mediante dos métodos: el mecanicista y el empírico (Menges, 1990; Valverde 1995). El primero utiliza datos detallados de los diferentes procesos involucrados en la reproducción: producción de frutos y semillas, depredación de semillas, porcentaje de germinación y establecimiento en condiciones naturales o experimentales (Menges, 1990; Valverde 1995). En el segundo, las plántulas reclutadas en un área en el tiempo $t+1$ se asignan a los adultos existentes en cada categoría en el tiempo t con base en su esfuerzo reproductivo individual en el tiempo t . En este caso, el número de plántulas producidas por el individuo i en el tiempo $t+1$ se puede obtener multiplicando el número de plántulas encontradas en el tiempo $t+1$ por el cociente del número de frutos producido por el individuo i de la categoría j entre el número de frutos producidos por todos los individuos de la población en el tiempo t (ver

ecuación 3 más abajo). La fecundidad *per capita* de los individuos de una clase de tamaño se obtiene sumando las fecundidades de todos los individuos de esa clase y dividiéndola entre el número de individuos de esa clase (fecundidad anónima de Caswell, 2001).

En este estudio se utilizó el método empírico, debido a la dificultad de observar la germinación de las semillas *in situ* (Figura 2.3. - G) y a que no se obtuvo germinación en los experimentos *in vitro* con medios de cultivo asimbióticos. De esta manera, el cálculo de la fecundidad *per cápita* de los individuos de la categoría j (F_j); es decir, la contribución individual promedio de los adultos de esa categoría al reclutamiento de plántulas, se llevó a cabo a partir de la siguiente ecuación:

$$F_j = \frac{\sum pl(f_{ij} / F)}{N_j} \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde, F_j es la fecundidad *per capita* de los individuos de la categoría j en el tiempo t ,

f_{ij} es el número de frutos producidos por el individuo i de la categoría j ,

pl es el número total de plántulas encontradas en el área de muestreo en el tiempo $t+1$,

N_j es el número de adultos de la categoría j en el tiempo, y

$$F = \sum_i \sum_j f_i \quad (\text{Ec. 4})$$

donde, F es el número total de frutos de todos los individuos i de la categoría j en el tiempo t .

Tasa de crecimiento poblacional y estructura de tamaños.- Se calcularon las tasas de crecimiento poblacional (λ), la estructura estable de tamaños (vector w) y los valores reproductivos específicos por categoría de tamaño (vector v) de las matrices de transición anuales usando el programa STAGECOCH (Cochran y Ellner, 1992). Para saber si la estructura de tamaños observada difería de la estructura estable de tamaños proyectada para cada periodo, se utilizó la prueba de bondad de ajuste Kolmogorov-Smirnov, debido a que las categorías de tamaño se analizan en una escala ordinal, donde la categoría de menor tamaño corresponde a las plántulas y la de mayor tamaño corresponde a los adultos 3 y entonces asume que hay cierta dependencia entre ellas (Zar, 1999). Para determinar si la tasa de crecimiento poblacional no difería del equilibrio numérico (i.e. si los intervalos de confianza de λ incluían a $\lambda=1$), para cada valor de λ se calculó el intervalo de confianza al 95% a través de un remuestreo con reemplazo de los individuos de cada población, usando el lenguaje de programación R (Versión R 2.12.0, Venables y Smith 2004; Mayberry y Elle, 2010). Para cada matriz de transición, se realizó un remuestreo con reemplazo de los individuos, lo que consiste en crear 1000 matrices de transición y obtener de cada una su respectivo valor de λ , y de esta forma graficar la distribución de frecuencias de los valores de λ para cada sitio y año (Verhulst, *et al.* 2008).

Sensibilidad, elasticidad y otros parámetros poblacionales.- La sensibilidad es una medida del efecto que tendría un pequeño cambio absoluto en cada uno de los elementos de la matriz poblacional sobre la tasa de crecimiento de la población (Caswell y Trevisan, 1994). La elasticidad es una medida del efecto que tendría un cambio relativo o proporcional de los elementos de la matriz sobre la tasa de crecimiento de la población al dividirse cada elemento entre el valor de λ (de Kroon, *et al.* 1986; Caswell, 2001). La sumatoria de las elasticidades de la

matriz es igual a la unidad, lo que permite valorar el impacto relativo que tendrían modificaciones de cada probabilidad de transición o de cada contribución sobre la tasa de crecimiento poblacional, y permite hacer comparaciones entre poblaciones, entre años y entre especies.

Las sensibilidades (s_{ij}) de λ a cambios en cada a_{ij} se pueden calcular según la siguiente ecuación (Caswell, 2001):

$$s_{ij} = \frac{\delta \lambda}{\delta a_{ij}} = \frac{v_i w_j}{\langle v, w \rangle} \quad (\text{Ec. 5})$$

donde s_{ij} mide la sensibilidad absoluta de λ a cambios pequeños en a_{ij} , v y w son los autovectores izquierdos y derechos de A respectivamente, y $\langle v, w \rangle$ es el producto escalar entre v y w . Por otro lado, las elasticidades se pueden calcular a partir de las sensibilidades, como sigue:

$$e_{ij} = s_{ij} \frac{a_{ij}}{\lambda} \quad (\text{Ec. 6})$$

Los datos de las elasticidades se sumaron por proceso demográfico (estasis, crecimiento, fecundidad y retrogresión, ver Silvertown, *et al.* 1993) para sumar 1 y poderse comparar con otros estudios.

Por otro lado, se incluyó un análisis de la importancia de la latencia en la dinámica poblacional (Waite y Hutchings 1991; Nicolé *et al.* 2005). Para determinar la influencia de la latencia en la demografía de *C. luteo-albus*, se construyó una matriz de 6×6 , que excluía esta

etapa (en este caso, a los individuos que entran en latencia se les representa como parte de la transición hacia la categoría J1).

Además de los valores de λ , las sensibilidades y elasticidades, también se calcularon los siguientes parámetros: la tasa reproductiva neta (R_0 , número de descendientes que se espera que produzca un individuo promedio de la categoría inicial, a lo largo de su vida), la longevidad máxima (L , la edad esperada de muerte condicionada al paso por el estadio de plántula), la edad a la madurez sexual o edad a la primera reproducción (a), y una medida del tiempo generacional, que es la edad promedio a la cual se reproducen los individuos de una cohorte (μ_I). También, se obtuvo la proporción de sobrevivientes que llegan a la categoría x (l_x), y los valores reproductivos escalados con respecto al valor reproductivo de las plántulas. Todos estos parámetros, así como las sensibilidades y elasticidades, se calcularon con el programa STAGECOCH (Cochran y Ellner, 1992).

Variabilidad en la tasa de crecimiento poblacional.- Para determinar si la demografía de *C. luteo-albus* varió significativamente entre años y entre poblaciones, se emplearon métodos de remuestreo bootstrap (Verhulst *et al.* 2008; Caswell, 2001) implementados con el lenguaje de programación R (Versión 2.12.0, Venables y Smith, 2004).

Se evaluaron las diferencias temporales en las tasas de crecimiento poblacional al interior de cada población, y entre las dos poblaciones para cada año (i.e. comparación para cada matriz anual), y en el periodo 2006-2009 (comparación de las matrices promedio 2006-2009 de los dos sitios).

Para evaluar si hubo diferencias en las tasas de crecimiento al interior de cada población en el tiempo (entre años), se utilizó la Desviación Estándar de las tasas de crecimiento poblacionales ($\lambda_{i,j}$, Verhulst *et al.* 2008). El subíndice i de λ identifica a la población (s para SBN y m para Martinica), mientras que el subíndice j identifica al periodo anual (en SBN hubo cuatro transiciones anuales en el periodo 2005-2009 y en Martinica hubo tres transiciones en el periodo 2006-2009). El número de individuos encontrados cada año en cada sitio es $N_{s,t1}$; $N_{s,t2}$; $N_{s,t3}$ y $N_{s,t4}$ para las cuatro transiciones de SBN; y $N_{m,t1}$; $N_{m,t2}$ y $N_{m,t3}$ para las tres transiciones de Martinica. Ejemplo: para la población de Martinica se agruparon los $N_{m,j}$ individuos de los tres años y a partir de ese conjunto se remuestrearon aleatoriamente y con reemplazo $N_{m,t1}$ individuos, con los que se construyó una nueva matriz de transición del año 1 y se calculó la correspondiente $\lambda_{m,t1}$. Luego se remuestrearon $N_{m,t2}$ y $N_{m,t3}$ individuos y se calcularon las correspondientes $\lambda_{m,t2}$ y $\lambda_{m,t3}$. Por último se calculó la DS de $\lambda_{m,t1}$, $\lambda_{m,t2}$ y $\lambda_{m,t3}$. El proceso se repitió 5000 veces, se construyó la distribución de frecuencias de los 5000 valores de DS y se verificó si el valor de la DS observado (es decir la DS de las lambdas observadas) caía dentro del intervalo de confianza del 95% de esas observaciones. En el caso de SBN se usó el mismo procedimiento, pero considerando cuatro transiciones en lugar de tres (Verhulst, *et al.* 2008).

Para evaluar si hubo diferencias en la tasa de crecimiento entre las dos poblaciones en cada uno de los años de estudio, se utilizó el estadístico $\theta = \lambda_{s,t} - \lambda_{m,t}$, (donde $\lambda_{i,t}$ es el valor de la tasa de crecimiento de la población i en el año t , el subíndice s identifica a la población de SBN y el subíndice m identifica a la población de Martinica). Para cada año se agruparon los $N_{s,t}$ individuos de SBN y los $N_{m,t}$ individuos de Martinica, (es decir se construyó una matriz agrupada de las dos poblaciones para cada año) y a partir de ese conjunto se remuestrearon aleatoriamente y con reemplazo N_s individuos y N_m individuos. Se construyó una matriz de transición con cada

uno de esos dos grupos de individuos, se calcularon las correspondientes tasas de crecimiento anuales (λ_s y λ_m) y se calcularon sus diferencias con $\theta = \lambda_s - \lambda_m$. Este proceso se repitió 5000 veces, se construyó la distribución de frecuencias de esas 5000 diferencias y para conocer su significancia, se verificó si el valor de θ observado caía dentro del intervalo de confianza del 95% de esas observaciones (Verhulst, *et al.* 2008). La ventaja de este método de remuestreo, es que las simulaciones se construyen con cada individuo a partir de la base de datos original y no considera el tipo de distribución estadístico (Caswell, 2001).

Probabilidad de cuasi-extinción. Finalmente, para calcular la viabilidad poblacional de las poblaciones estudiadas de *C. luteo-albus*, se obtuvo su probabilidad de cuasi-extinción. Esta probabilidad se define como la probabilidad de que la población disminuya a niveles críticos - por ejemplo, una reducción de hasta el 10% del tamaño poblacional inicial en algún periodo de tiempo definido (Ginzburg *et al.* 1982). Las proyecciones de los tamaños poblacionales obtenidos se basan en un modelo estocástico, en el cual las matrices anuales obtenidas de las observaciones de campo se eligen aleatoriamente en cada iteración de la proyección (Morris y Doak, 2002). Para éste análisis se utilizó la rutina de la Caja 7.6 (Morris y Doak, 2002) en MATLAB 7.5 para Windows. Cada una de las matrices anuales tenía la misma probabilidad de aparecer en cada iteración. Las simulaciones se hicieron para un periodo de 100 años, y el tamaño poblacional “crítico” al que se consideró “extinta” una población fue de 10 % de tamaño poblacional inicial.

RESULTADOS

Densidad y Estructura poblacional

Las densidades poblacionales de *C. luteo-albus* de 0.13 ± 0.22 DE individuos/m² en SBN y de 0.08 ± 0.15 DE individuos/m² en Martinica, aunque no presentaron diferencias significativas entre sitios ($U = 47.5$, $P \geq 0.05$), en ambas poblaciones, la estructura de tamaños observada difirió significativamente de la estructura estable de tamaños (prueba Kolmogorov-Smirnov; $P < 0.001$, Figura 2.4a). En SBN, la estructura poblacional estuvo dominada por individuos juveniles pequeños y adultos pequeños (J1 y A1). Sin embargo, la abundancia de los primeros fue muy variable (69.86% CV), con un pico en su frecuencia en 2005 con respecto a otras categorías como los latentes o adultos A1. Tanto en SBN como en MART, el coeficiente de variación promedio para la abundancia de los adultos (A1-A3) fue de 18.2% y 22% CV, mientras que para el resto de las categorías (P, L, J1, J2) fue de 55.7% 44.6% CV, respectivamente (Figura 2.4.a y b). En SBN y MART, la categoría de plántulas fue la menos representada, no obstante, su frecuencia relativa promedio fue la tercera más variable entre años (34.8% y 46.81% CV, respectivamente), después de los individuos latentes (95.36% y 52.1% CV) y los Juveniles 1.

En MART, la categoría de latentes fue la única que presentó un ligero aumento en su frecuencia a lo largo del tiempo y una variabilidad similar a la categoría J1 (52.14% y 53.58% CV, datos no mostrados), mientras que la abundancia relativa de todas las categorías de adultos fue similar, a excepción de los Adultos 1 que presentaron un pico en su frecuencia en 2007 (Figura 2.4b).

Dinámica poblacional

Durante el periodo de estudio, se observaron individuos que no se reprodujeron, así como individuos que formaron frutos en uno o más años, aunque más de la mitad de los adultos produjeron frutos en un solo año (Figura 2.5). El promedio anual del número de frutos que produjeron los individuos reproductivos fue de 30.6 ± 13.9 en SBN y de 29.9 ± 14.9 en MART no presentaron diferencias significativas entre ellos ($t = -0.15$, $P >= 0.05$). Los valores de fecundidad fueron en aumento al incrementar el tamaño de las plantas (Cuadro 2.2a-i, vectores v). En ambas poblaciones, las categorías de tamaño P y J1 obtuvieron los valores más altos de mortalidad (en SBN 51% y 20% y en MART 44% y 19%, respectivamente) (Cuadro 2.2e y i). Las plantas que realizaron una transición a latentes mostraron mortalidad en la mayoría de los años, con algunas excepciones (Cuadro 2.2h). Sin embargo, la probabilidad de muerte nunca fue superior a la de las plántulas.

En ambas poblaciones, las matrices anuales presentaron valores altos de permanencia (estasis) en la misma categoría para las categorías de tamaño A3, seguida de la categoría de tamaño A1 (Cuadro 2.2a-i). El valor más alto de estasis en A1 se presentó en MART durante 2006-2007 (Cuadro 2.2f). La retrogresión se observó en la mayoría de las categorías (excepto en las plántulas), pero fue poco frecuente de los adultos A2 y A3 hacia J1.

En la mayoría de las matrices anuales de ambas poblaciones, las tasas de crecimiento poblacional estuvieron significativamente por debajo de la unidad, mostrando que las poblaciones de *C. luteo-albus* tanto en SBN como en MART están en decremento numérico (Cuadro 2.2a-i). La única excepción fue la población de MART en 2006-2007 ($\lambda = 1.001$, $IC_{95\%} 0.976-1.022$, Cuadro 2.2f), cuyos intervalos de confianza al 95% indican que dicho valor de λ no difiere de la

unidad y que, por tanto, la población estaría en equilibrio numérico si se mantuviera el comportamiento demográfico de este periodo.

En general, los individuos de todas las categorías de tamaño pueden transitar a la categoría de latentes, y a su vez, los individuos en latencia pueden transitar hacia cualquier otra categoría de tamaño (excepto a la de plántulas, Figura 2.6a y b), también permanecer como latentes o morir. Las matrices promedio que consideraron a la categoría de latencia mostraron un valor de λ similar al de las matrices que no la consideraron (Cuadro 2.3, SBN con latencia, $\lambda=0.956$, IC_{95%} 0.935–0.959; y sin latencia, $\lambda=0.951$, IC_{95%} 0.930-0.954 y MART con latencia, $\lambda=0.978$, IC_{95%} 0.960-0.984; y sin latencia, $\lambda=0.970$, IC_{95%} 0.950-0.977). Entonces, la etapa de latencia no parece haber contribuido de manera importante a la dinámica poblacional. Debido a esto, la etapa de latencia se excluyó en los análisis de viabilidad poblacional que se presentan más abajo.

Sensibilidad, elasticidad y otros parámetros poblacionales

El análisis de elasticidad basado en las matrices promedio y representado en el triángulo demográfico de ambas poblaciones mostró que la supervivencia, seguida del crecimiento, fueron los procesos demográficos que tuvieron la mayor contribución a λ , independientemente de que se considere a la etapa de latencia o no (Supervivencia = 71% y 69%, Crecimiento = 28% y 30% para SBN y MART, respectivamente, Figura 2.7), mientras que la contribución de la fecundidad fue baja en ambos casos (1.3%). No se presentaron mayores diferencias en el patrón de las elasticidades cuando se omitió la latencia (Supervivencia = 73% y 68%, Crecimiento = 26% y 31% para SBN y MART, respectivamente; Figura 2.7, color negro).

Según las matrices promedio, tanto para SBN (2005-2009) como para MART (2006-2009), se obtuvieron curvas de supervivencia ($\log lx$, Figura 2.8a) del tipo III, según la clasificación de Deevey (1947). El valor reproductivo (escalado según el valor de la categoría 1) fue mayor en SBN que en MART (Figura 2.8b). En ambas poblaciones se obtuvieron valores bajos de la tasa reproductiva neta (R_0): de $R_0= 0.18$ individuos en SBN y 0.33 individuos en MART.

La edad promedio a la que se alcanza la madurez sexual (a) fue de 5.4 ± 13 DE (SBN) y 4.5 ± 9.5 DE (MART) años. La edad promedio a la cual se reproducen los individuos de una cohorte (tiempo generacional, μ_l) fue de 22 ± 17 DE y 32 ± 28 DE años, para SBN y MART, respectivamente, y la longevidad máxima promedio (L) fue de 28 ± 17 DE años y 39 ± 29 DE años, respectivamente (Cuadro 2.3).

Variabilidad en la tasa de crecimiento poblacional

Al interior de las poblaciones, la tasa de crecimiento poblacional obtenida a través del análisis de las matrices anuales no varió significativamente entre años en ninguna de las dos poblaciones (Figura 2.9a y b). Por otro lado, sólo se encontraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento poblacional entre ambas poblaciones para el periodo 2006-2007 (Figura 2.10a; $\lambda=0.988$ en SBN y $\lambda=1.001$, en MART, Cuadro 2.2b y f, respectivamente). Para este periodo, SBN fue significativamente menor que la unidad, representando a una población decreciente y MART presentó un valor de λ que no difirió de la unidad. No obstante, no se encontraron diferencias significativas en los valores de λ de las matrices promedio.

Probabilidades de cuasi-extinción

El análisis de viabilidad poblacional mostró que, bajo las condiciones demográficas y ambientales actuales, tanto la población de SBN como la de MART disminuirían a un 10 % de su tamaño inicial en menos de 100 años. De acuerdo con la simulación, en 47 años SBN tendrá una probabilidad de 0.2 de que su población disminuya al 10% de su tamaño inicial, y una probabilidad de 1.0 de que lo haga en 60 años (Figura 2.11a). MART parece tener probabilidades de permanencia un poco mayores, ya que tendrá una probabilidad del 0.2 de que su población disminuya al 10% después de 67 años y en 90 años y una probabilidad del 1.0 de que lo haga en 90 años (Figura 2.11b).

DISCUSIÓN

Los análisis prospectivos a través de modelos matriciales proveen una forma precisa de evaluar las contribuciones de los distintos estadios del ciclo de vida y de los diferentes procesos demográficos a la tasa de crecimiento poblacional (λ). Asimismo, los modelos matriciales permiten evaluar si la población está creciendo o decreciendo, a partir de lo cual es posible generar una guía para dirigir los esfuerzos de conservación de las poblaciones. Avances recientes en esta área han llevado a incorporar el efecto de la variación o estocasticidad ambiental y proyectar el tiempo que transcurrirá para que la población disminuya hasta un umbral de cuasi-extinción, convirtiéndose en una herramienta bastante detallada para los análisis demográficos de viabilidad poblacional (Benton y Grant, 1999; Caswell, 2000; Morris y Doak, 2002). En los siguientes párrafos exploraremos en mayor detalle las implicaciones de los análisis demográficos aquí presentados.

Estructura poblacional

La estructura poblacional observada de *C. luteo-albus* fue variable año con año (i.e. una alta proporción de individuos juveniles J1 en 2005 y A1 en SBN, y una mayor proporción de individuos A1 y A3 en MART), lo que difiere de otras orquídeas terrestres en las que predominan los individuos juveniles (Gutiérrez-Paredes, 2000; Hutchings, *et al.* 1998). No obstante, la baja frecuencia de plántulas registrada en ambas poblaciones es una condición frecuente en las orquídeas (Ackerman *et al.* 1996; Gutiérrez-Paredes, 2000). La explicación al bajo reclutamiento, a pesar de la gran cantidad de semillas que producen las orquídeas, se ha relacionado con la baja

probabilidad de encontrar “sitios seguros”, micrositios óptimos para la germinación y establecimiento (Harper, 1977; Jersakova y Malinova, 2007; Winkler *et al.* 2009), donde se encuentren los recursos edáficos (incluyendo a los hongos micorrízicos) necesarios para el desarrollo de la etapa micoheterótrofa o etapa de germinación (Rasmussen, 1995). Por otro lado, la alta proporción de individuos pequeños (J1) registrada en SBN durante el primer año de estudio (2005), sugiere que a pesar de haber observado un año con elevado reclutamiento (o un probable reflejo de años anteriores con buen reclutamiento), esto no es suficiente para mantener a una poblacional estable o en crecimiento (Martínez-Ramos y Álvarez-Buylla, 1995). La estructura poblacional es un reflejo de la dinámica demográfica de la población, reflejada en las tasas de natalidad y mortalidad específicas de las categorías de tamaño/edad, que a su vez responden a factores extrínsecos impuestos por el ambiente. Debido a la variabilidad ambiental, es común que las poblaciones estén lejos del equilibrio, en el sentido de que la estructura poblacional observada comúnmente difiere de la estructura estable de tamaños (Gutiérrez-Paredes, 2000; Valverde y Silvertown, 1998).

Dinámica poblacional

El análisis de la dinámica poblacional de *C. luteo-albus*, permitió conocer algunas características de su historia de vida, como la edad promedio a la madurez o a la primera reproducción (Cochran y Ellner, 1992), parámetros que permiten clasificarla como una orquídea de larga vida. Las especies de vida larga, presentan una edad tardía a la madurez, lo que implica que la asignación de recursos se concentre más en la supervivencia que en la reproducción. Este es el caso de *C. luteo-albus* que en promedio requiere de un periodo relativamente largo (4.5 ± 9.5 años en

MART y 5.4 ± 13 años en SBN, según las matrices promedio) para almacenar suficientes reservas antes de reproducirse (Silvertown y Charlesworth, 2001).

A lo largo del periodo de estudio, el comportamiento demográfico de ambas poblaciones mostró que las dos poblaciones están decreciendo (i.e. $\lambda < 1$). La disminución en el tamaño poblacional en orquídeas se ha relacionado con la incidencia de distintas perturbaciones naturales. Por ejemplo, la orquídea epífita *Lepanthes eltoroensis* mostró poblaciones con un comportamiento demográfico hacia el decremento poblacional ($\lambda < 1$) después de un huracán. No obstante, la resiliencia de la población le permitió una rápida recuperación al siguiente año (Benítez y Tremblay, 2003). En la zona en la que se llevó a cabo el presente estudio, los huracanes son poco frecuentes (~30 huracanes en el periodo de 1866 a 2005), pero las ráfagas de viento de hasta 50 km/h que se presentan sobre todo durante la temporada de “nortes” provocan la caída de ramas lo que, a su vez, daña físicamente a las plantas reproductivas de *C. luteoalbus* (observación personal). Sin embargo, en estudios posteriores se debe corroborar el posible efecto que podría tener la mortalidad por daño físico de los adultos reproductivos sobre la tasa de crecimiento.

Asimismo, las perturbaciones de origen humano podrían provocar cambios directos en el hábitat y, en algunos casos, podrían favorecer a la presencia de algunas especies de orquídeas (i.e. aquellas asociadas a comunidades de pastizales donde el fuego les resulta favorable), o bien, afectar negativamente la supervivencia de las plantas (Coates *et al.* 2005). Se ha sugerido que los ambientes perturbados favorecen el parasitismo, como en la orquídea terrestre *Aulosepalum pyramidale* donde la totalidad de las plantas reproductivas fueron parasitadas por avispa de la familia *Eurytomidae* (Salazar, 2009). Durante 2005, en las poblaciones estudiadas de *C. luteoalbus* también se registraron ovarios florales parasitados por el mismo agente (avispa)

Eurytomidae, Chalcidoidea, Figura 2.3. – E y H). No obstante, esta interacción afectó a menos del 1% de los individuos muestreados (en SBN). Por otro lado, la herbivoría causada por caracoles también puede afectar a las orquídeas, como *Lycaste aromatica* y *Ophrys apifera*; en ésta última, tal efecto redujo hasta el 10% su tamaño poblacional. En 2010, se registró daño por herbivoría en las estructuras reproductivas de *C luteo-albus* en la totalidad de las inflorescencias (probablemente por caracoles, observación personal), lo que redujo la fecundidad para ese periodo, tal como se ha registrado en otros estudios (Winkler, *et al.* 2005; Wells y Cox, 1991). Sin embargo, es necesario continuar con los estudios a largo plazo para medir la posible respuesta de las poblaciones de estudio ante estos factores y otros relacionados con la perturbación humana local (i.e. frecuencia e intensidad del pisoteo humano, poda selectiva del sotobosque; observación personal).

El comportamiento demográfico no varió de manera substancial al interior de cada población a lo largo del periodo de estudio. Y la comparación entre poblaciones mostró que sólo en uno de los tres periodos anuales de estudio se observaron diferencias significativas entre ellas en términos del valor de λ (2006-2007, Figura 2.10a), en el que MART tuvo una tasa de crecimiento poblacional que no difirió de la unidad ($\lambda = 1.001$, IC 95%, 0.976–1.022), mientras que SBN presentó una λ marginal pero significativamente menor que la unidad ($\lambda = 0.988$, IC 95%, 0.947-0.992). Ambos sitios, comparten alrededor del 70% de las especies arbustivas y hierbas, ambos sitios se encuentra a menos de 1 km lineal de la zona urbana, ambos tienen un nivel similar de compactación del suelo - 11 kg/cm², una comunidad de árboles similar, condiciones climáticas y efectos antrópicos similares (Álvarez-Aquino, *et al.* 2005). Las diferencias en el comportamiento demográfico entre SBN y MART, probablemente se debió a que, en SBN se ha registrado una mayor densidad de semillas de especies herbáceas en el suelo

con respecto a una zona aledaña a MART (Álvarez-Aquino, *et al.* 2005). Si el banco de semillas es un reflejo de la comunidad vegetal, entonces es posible que la alta densidad de hierbas (nativas e invasoras) en SBN, tuviera un efecto negativo sobre la dinámica poblacional de *C. luteo-albus* debido a la competencia inter-específica.

Otra característica de la historia de vida de *C. luteo-albus* que se exploró en este estudio, fue la etapa de latencia (Tamm, 1956; Hutchings, 2010; Shefferson y Tali, 2007). Se ha demostrado que las plantas vasculares entran en latencia como una respuesta fisiológica individual al estrés ambiental, aunque estudios a nivel poblacional han mostrado que la latencia tiene efectos sobre la tasa de crecimiento poblacional (como medida de adecuación), por lo cual es posible considerarla como un proceso demográfico más. Se ha postulado que la latencia puede implicar costos a corto plazo asociados con la supervivencia y la reproducción, ya que: a) la porción latente de la población no se reproduce sexualmente, al menos durante una temporada (menor fecundidad), y b) la supervivencia de los individuos provenientes de esta etapa es considerablemente menor con respecto a la de los individuos provenientes de etapas fotosintéticas (menor supervivencia). Una menor supervivencia y reproducción, claramente se pueden traducir en tasas de crecimiento poblacional más bajas en un corto plazo. Sin embargo, se ha sugerido que la latencia podría ser una estrategia que actúa a largo plazo permitiendo que la población pueda amortiguar el efecto de condiciones ambientales desfavorables “storage effect” (Chesson, 1984; Lesica y Steele, 1994; Shefferson, *et al.* 2003; Shefferson, *et al.* 2005).

Al parecer, en *C. luteo-albus*, así como en otras orquídeas terrestres, la latencia es un evento relativamente frecuente, pero muy variable, ya que a lo largo del estudio (cinco años), la porción de la población de *C. luteo-albus* en latencia varió de 4.4% y hasta el 26%. Por Ejemplo, en *Cypripedium irapeanum* sólo el 4% de la población se encontró en latencia (Gutiérrez-Paredes,

2000) mientras que en *C. calceolus* se encontró entre 19-67% (Shefferson, *et al.* 2001). Sin embargo, los valores de elasticidad en ambas poblaciones mostraron que hay una fuerte contribución a λ de la permanencia de los individuos de las categorías adultas, pero la etapa de latencia no tiene tal efecto. Así, la latencia podría ser una respuesta fisiológica al estrés ambiental, sin mayor relevancia demográfica para la población (Lesica y Steele, 1994). Esto sugiere que los esfuerzos de conservación dirigidos hacia las poblaciones de *C. luteo-albus* deben (además de evaluar el efecto de la introducción de nuevos individuos a la población) priorizar la supervivencia de adultos. Es decir, tratar de asegurar que las plantas lleguen a adultas y permanezcan en ese estado es muy significativo para la tasa de crecimiento poblacional, debido a que una vez que alcanzan el tamaño potencialmente reproductivo, sus tasas de mortalidad disminuyen considerablemente. Esto contrasta con lo que se ha observado en otras orquídeas terrestres, como *Ophrys sphegodes*, donde el asegurar la transición de plantas latentes hacia adultos reproductivos ayuda a que exista un aporte de alrededor de la mitad del total de las semillas de la población (Wells, 1981).

Respecto a las curvas de supervivencia, ambas poblaciones de *C. luteo-albus* presentaron el mismo patrón, i.e. Tipo III, con una mortalidad más intensa al inicio de la vida y que disminuye hacia las etapas adultas, lo cual es común en plantas de semillas pequeñas (Begon *et al.* 2006; Hutchings, 1987; Waite y Hutchings, 1991; Willems y Melsers, 1998). Esta información se complementa con la gráfica de los valores reproductivos, en la que los individuos de categorías pequeñas presentaron bajas probabilidades de llegar a la madurez. Posteriormente, el valor reproductivo se fue incrementando conforme los individuos aumentan de tamaño (asíntota, Figura 2.8b).

En general, los análisis prospectivos (i.e. las elasticidades), evalúan las consecuencias que tendría sobre λ la modificación puntual de las tasas vitales. Al analizar los valores de elasticidad expresados en tres procesos demográficos principales -- crecimiento, permanencia y fecundidad - - y graficarlos en el triángulo demográfico (Silvertown *et al.*, 1993), las poblaciones de *C. luteo-albus* se ubican en la misma región del triángulo en la que se encuentran hierbas iteróparas de larga vida, como la cebolla *Allium monanthrum*, la hierba anual *Disporum smilacinum*, la hierba venenosa *Podophyllum peltatum* y la hierba *Chamaelirium luteum* (Silvertown *et al.*, 1993). Con respecto a otras orquídeas, *C. luteo-albus* difiere de *Cyripedium calceolus*, una orquídea extremadamente longeva (223.6 ± 147.6 DE años en promedio) cuyo principal mecanismo de persistencia es la supervivencia (elasticidad de la estasis 0.98, Nicolé *et al.* 2005; Silvertown y Franco, 1993). Asimismo, contrasta con la orquídea de vida corta *Ophrys sphegodes* (longevidad < 2.3 años), que habita en zonas abiertas y en la que la fecundidad y el crecimiento son los procesos que tienen mayor relevancia para la persistencia de sus poblaciones (Waite y Hutchings, 1991); y *C. luteo-albus* se ubica relativamente cerca de *C. irapeanum* y *Cyripedium acaule*, orquídeas que pasa una parte de su ciclo de vida en estado de latencia. La edad promedio a la madurez de esta última es mayor que la de la especie de estudio (11.1 años vs. 5.4 ± 13 años en SBN y 4.5 ± 9.5 años en MART). Sin embargo, el comportamiento demográfico de sus adultos (mayor supervivencia que tránsito a otras categorías de tamaño) es similar al de *C. luteo-albus* (Cochran y Ellner, 1992; Gutiérrez-Paredes, 2000).

El análisis de viabilidad poblacional mostró que, de continuar las tendencias demográficas observadas, ambas poblaciones podrían disminuir hasta alcanzar un tamaño de 10 % del tamaño poblacional actual (es decir, el observado en 2009, $N = 441$ en SBN y $N = 332$ en MART), en menos de 100 años, sugiriéndose en SBN una disminución más rápida que en MART.

En conclusión, las poblaciones estudiadas están declinando y se espera que a largo plazo estén cerca de la extinción si las condiciones actuales se mantienen. Al parecer, la permanencia en las mismas categorías y específicamente, la permanencia de los Adultos 1, podría ser un mecanismo para mantener la tasa de crecimiento, por lo que las prácticas de manejo podrían dirigirse a introducir individuos, asegurar que las plántulas y los juveniles lleguen a adultos, por ejemplo a través de programas de repoblación y/o de control de especies invasoras que al parecer podrían competir con *C. luteo-albus* (i.e. poda de pastos invasores u otras especies, como el helecho *Pteridium aquilinum*). Sin embargo, para confirmar cuál elemento de la matriz, o bien qué proceso demográfico contribuyó a generar los cambios observados en λ para ese año, sería necesario llevar a cabo un análisis retrospectivo (Caswell, 2000; Martínez-Ballesté *et al.* 2005).

En vista de que los análisis de probabilidad de cuasi-extinción muestran que ambas poblaciones tienen una tendencia a la desaparición en menos de 100 años, surge la pregunta de si estas poblaciones son estables o seniles de acuerdo a la etapa de sucesión de la vegetación (Oostermeijer, 2000), o bien, si este tipo de comportamiento demográfico es común en otras poblaciones de esta especie, y si lo fuera, cómo se mantiene a nivel regional: ¿quizás a través de un balance entre poblaciones que se extinguen y poblaciones que surgen a partir de la colonización de nuevos espacios? Y también como metapoblaciones no equilibradas, donde las extinciones rebasan a las colonizaciones (Harrison, 1991). Esto abre el tema del posible comportamiento metapoblacional de *C. luteo-albus* que, en asociación con la distribución naturalmente fragmentada de los bosques de niebla, surge como una posibilidad real que sería importante explorar a futuro en la dinámica regional.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio es parte de las investigaciones doctorales de LJ financiadas por el CONACYT mediante una beca doctoral (LJ) y fondos de investigación (CM). Roger Guevara programó los scripts en R para los análisis bootstrap. Martín Mata proveyó instalaciones y asesoramiento para los estudios de germinación. Claudia Gallardo, Jorge García B., Carlo Sormani, Alejandro Abundis, Antonio López C. y Mario Márquez prestaron valiosa ayuda durante el trabajo de campo. Gerardo Salazar, Victoria Sosa, Javier García-Cruz, Martín Mata, Francisco Reyes-Zepeda, Danaé Cabrera-Toledo, Ana Lucía Castillo M., Juan García Chávez, Orlik Gómez, Milton Díaz-Toribio, Juan Pablo Esparza y Carlos Yáñez aportaron su apoyo en distintas etapas del desarrollo de este trabajo. Ricardo Ayala contribuyó con la determinación taxonómica de las abejas. Lizette Cicero, Phill Brewster y Luis Cervantes contribuyeron en las fotografías de los insectos.

Cuadro 2.1. Delimitación de las categorías de tamaño utilizadas para el estudio demográfico de *Cyclopogon luteo-albus* en el bosque de niebla de la zona central de Veracruz. Sólo las categorías de adultos pueden producir semillas.

Categoría	Área Foliar Total (cm ²)
Plántulas (P)	< 0.3 (con raíz < 1 cm)
Latentes (L)	sólo raíz
Juveniles 1 (J1)	0.01 – 10.01
Juveniles 2 (J2)	10.02 – 26.64
Adultos 1 (A1)	26.65 – 64.25
Adultos 2 (A2)	64.26 – 93.6
Adultos 3 (A3)	> 93.7

Nota: Para el análisis que no consideró a la categoría Latentes, los individuos latentes se sumaron a la categoría de Juveniles 1 (J1), conformando así matrices de dimensiones 6 × 6.

Cuadro 2.2. Matrices anuales de proyección poblacional de las poblaciones SBN (a-d) y promedio (e), y MART (f-h) y promedio (i), respectivamente, para los periodos 2005-2009 y 2006-2009. Se muestran también la estructura poblacional observada (n_t), la estructura estable de tamaños (w), el vector de los valores reproductivos específicos por categoría, escalado con respecto a la primera categoría de tamaño (v), la tasa finita de crecimiento poblacional λ , con sus intervalos de confianza al 95% (ICI y ICS, intervalos de confianza inferior y superior, respectivamente), y la mortalidad específica por categoría (q_x). Los valores subrayados son los elementos de la diagonal.

a)

SBN 2005-2006	P	L	J1	J2	A1	A2	A3	n_t	w	v	
	P	0	0	0	0	0.032	0.091	0.145	0.027	0.028	1.00
	L	0.375	<u>0.400</u>	0.324	0.222	0.165	0.100	0.061	0.025	0.269	1.48
	J1	0.312	0.333	<u>0.380</u>	0.120	0.009	0	0	0.423	0.198	1.29
$\lambda=0.959$	J2	0	0.133	0.116	<u>0.314</u>	0.067	0.020	0.020	0.183	0.119	1.88
ICI=0.946	A1	0	0.067	0.020	0.324	<u>0.533</u>	0.240	0.122	0.174	0.215	2.17
ICS=0.991	A2	0	0	0.004	0.009	0.126	<u>0.440</u>	0.183	0.085	0.085	2.30
	A3	0	0	0	0	0.087	0.160	<u>0.571</u>	0.083	0.083	2.48
	q_x	<i>0.313</i>	<i>0.067</i>	<i>0.156</i>	<i>0.009</i>	<i>0.010</i>	<i>0.040</i>	<i>0.041</i>			
	N	16	15	250	108	103	50	49	591		

b)

SBN 2006-2007	P	L	J1	J2	A1	A2	A3	n_t	w	v	
	P	0	0	0	0	0.023	0.079	0.126	0.027	0.058	1.00
	L	0.066	<u>0.197</u>	0.075	0.108	0.070	0.021	0.044	0.256	0.065	1.96
	J1	0.400	0.352	<u>0.478</u>	0.095	0.018	0	0	0.214	0.113	1.29
$\lambda=0.988$	J2	0	0.162	0.218	<u>0.283</u>	0.087	0.021	0	0.133	0.080	2.39
ICI=0.947	A1	0	0.091	0.142	0.378	<u>0.385</u>	0.130	0.133	0.205	0.194	2.63
ICS=0.992	A2	0	0.028	0.016	0.067	0.219	<u>0.369</u>	0.222	0.083	0.190	2.90
	A3	0	0.028	0	0.027	0.184	0.434	<u>0.578</u>	0.081	0.298	2.94
	q_x	<i>0.533</i>	<i>0.141</i>	<i>0.067</i>	<i>0.041</i>	<i>0.035</i>	<i>0.022</i>	<i>0.022</i>			
	N	15	142	119	74	114	46	45	555		

c)

SBN 2007-2008	P	L	J1	J2	A1	A2	A3	n_t	<i>w</i>	<i>v</i>	
	P	0	0	0	0	0.012	0.043	0.054	0.023	0.033	1.00
	L	0	<u>0.263</u>	0.115	0.037	0.044	0.032	0.014	0.109	0.046	4.14
	J1	0.416	0.246	<u>0.230</u>	0.099	0.018	0	0	0.233	0.053	2.20
$\lambda=0.916$	J2	0	0.193	0.139	<u>0.358</u>	0.088	0.016	0	0.155	0.072	3.90
ICI=0.878	A1	0	0.228	0.098	0.284	<u>0.447</u>	0.159	0.110	0.218	0.232	5.00
ICS=0.946	A2	0	0.035	0	0.074	0.219	<u>0.270</u>	0.247	0.120	0.219	5.22
	A3	0	0.018	0	0	0.123	0.460	<u>0.534</u>	0.139	0.341	5.09
	<i>q_x</i>	<i>0.583</i>	<i>0.018</i>	<i>0.418</i>	<i>0.148</i>	<i>0.061</i>	<i>0.063</i>	<i>0.096</i>			
	N	12	57	122	81	114	63	73	522		

d)

SBN 2008-2009	P	L	J1	J2	A1	A2	A3	n_t	<i>w</i>	<i>v</i>	
	P	0	0	0	0	0.009	0.031	0.044	0.018	0.022	1.00
	L	0	<u>0.225</u>	0.017	0.014	0.042	0.014	0.012	0.091	0.030	7.10
	J1	0.250	0.100	<u>0.543</u>	0.029	0	0	0.024	0.129	0.043	3.87
$\lambda=0.968$	J2	0	0.150	0.087	<u>0.544</u>	0.068	0.058	0.024	0.154	0.114	8.14
ICI=0.949	A1	0	0.250	0.087	0.264	<u>0.641</u>	0.191	0.096	0.265	0.322	9.18
ICS=0.982	A2	0	0.125	0	0.088	0.119	<u>0.573</u>	0.096	0.154	0.198	9.14
	A3	0	0.025	0	0	0.111	0.132	<u>0.734</u>	0.188	0.269	9.37
	<i>q_x</i>	<i>0.750</i>	<i>0.125</i>	<i>0.263</i>	<i>0.059</i>	<i>0.017</i>	<i>0.029</i>	<i>0.012</i>			
	N	8	40	57	68	117	68	83	441		

e)

SBN promedio 2005-2009		P	L	J1	J2	A1	A2	A3	n_t	<i>w</i>	<i>v</i>
	P	0	0	0	0	0.019	0.061	0.093	0.024	0.041	1.00
	L	0.110	<u>0.271</u>	0.133	0.096	0.080	0.042	0.033	0.120	0.089	2.17
	J1	0.345	0.258	<u>0.408</u>	0.086	0.011	0	0.006	0.260	0.090	2.19
$\lambda=0.956$	J2	0	0.160	0.140	<u>0.375</u>	0.078	0.029	0.011	0.157	0.093	2.26
ICI=0.935	A1	0	0.159	0.087	0.313	<u>0.502</u>	0.180	0.115	0.212	0.250	6.09
ICS=0.959	A2	0	0.047	0.005	0.060	0.171	<u>0.413</u>	0.187	0.108	0.183	4.46
	A3	0	0.018	0	0.007	0.126	0.297	<u>0.605</u>	0.119	0.250	6.09
	<i>q_x</i>	<i>0.545</i>	<i>0.088</i>	<i>0.226</i>	<i>0.060</i>	<i>0.031</i>	<i>0.039</i>	<i>0.043</i>			
	N	13	64	137	83	112	57	63	527		

f)

MART 2006-2007		P	L	J1	J2	A1	A2	A3	n_t	<i>w</i>	<i>v</i>
	P	0	0	0	0	0.032	0.089	0.092	0.018	0.036	1.00
	L	0.166	<u>0.200</u>	0.030	0.085	0.083	0.090	0.063	0.060	0.095	2.07
	J1	0.333	0	<u>0.181</u>	0.014	0.011	0	0	0.098	0.024	1.97
$\lambda=1.001$	J2	0	0.600	0.484	<u>0.314</u>	0.047	0.022	0.012	0.208	0.139	2.20
ICI=0.976	A1	0	0.150	0.212	0.471	<u>0.642</u>	0.477	0.240	0.250	0.477	2.27
ICS=1.022	A2	0	0	0	0.085	0.142	<u>0.204</u>	0.265	0.131	0.132	2.37
	A3	0	0	0	0.014	0.059	0.204	<u>0.392</u>	0.235	0.094	2.35
	<i>q_x</i>	<i>0.500</i>	<i>0.050</i>	<i>0.091</i>	<i>0.014</i>	<i>0.012</i>	<i>0.000</i>	<i>0.025</i>			
	N	6	20	33	70	84	44	79	336		

g)

MART 2007-2008		P	L	J1	J2	A1	A2	A3	n_t	<i>w</i>	<i>v</i>
	P	0	0	0	0	0.010	0.041	0.077	0.041	0.029	1.00
	L	0	<u>0.357</u>	0.100	0.107	0.233	0.208	0.173	0.083	0.219	2.88
	J1	0.357	0.071	<u>0.100</u>	0.071	0.021	0.041	0.021	0.029	0.061	1.66
$\lambda=0.947$	J2	0.142	0.142	0.200	<u>0.375</u>	0.109	0.021	0.087	0.165	0.156	3.10
ICI=0.901	A1	0	0.107	0.200	0.232	<u>0.270</u>	0.083	0.065	0.404	0.147	3.10
ICS=0.972	A2	0	0.071	0	0.071	0.160	<u>0.145</u>	0.196	0.142	0.127	3.00
	A3	0	0.214	0	0.017	0.197	0.437	<u>0.434</u>	0.136	0.262	3.17
	<i>q_x</i>	<i>0.500</i>	<i>0.036</i>	<i>0.400</i>	<i>0.125</i>	<i>0.007</i>	<i>0.063</i>	<i>0.022</i>			
	N	14	28	10	56	137	48	46	339		

h)

MART 2008-2009		P	L	J1	J2	A1	A2	A3	n_t	<i>w</i>	<i>v</i>
	P	0	0	0	0	0.017	0.020	0.053	0.022	0.024	1.00
	L	0	<u>0.641</u>	0.055	0.040	0.112	0	0.026	0.208	0.130	3.45
	J1	0.571	0	<u>0.444</u>	0.020	0.016	0	0	0.056	0.038	1.26
$\lambda=0.972$	J2	0.142	0.059	0.166	<u>0.408</u>	0.048	0.090	0.026	0.152	0.091	1.74
ICI=0.946	A1	0	0.104	0.055	0.224	<u>0.645</u>	0.181	0.066	0.193	0.256	3.33
ICS=0.987	A2	0	0.089	0	0.020	0.048	<u>0.477</u>	0.146	0.137	0.145	3.42
	A3	0	0.104	0	0	0.112	0.250	<u>0.720</u>	0.233	0.313	3.63
	<i>q_x</i>	<i>0.286</i>	<i>0.000</i>	<i>0.278</i>	<i>0.286</i>	<i>0.016</i>	<i>0.000</i>	<i>0.013</i>			
	N	7	67	18	49	62	44	75	322		

i)

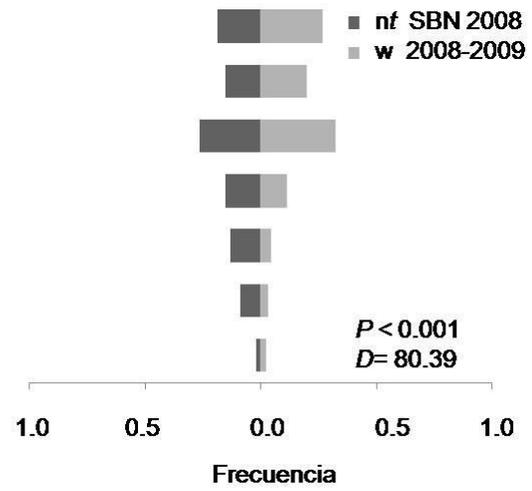
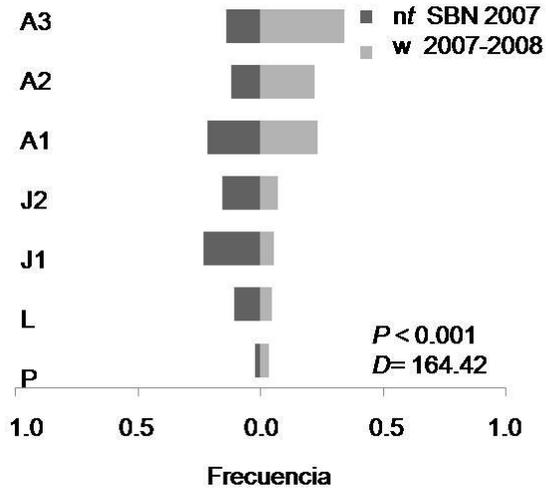
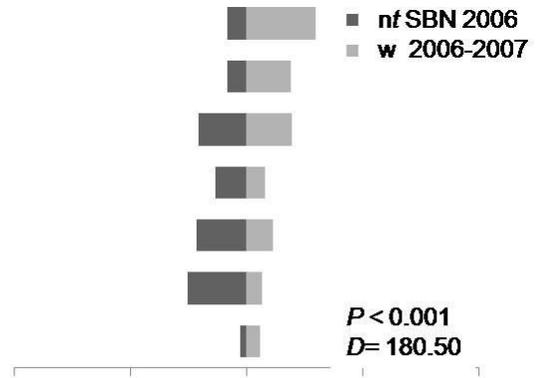
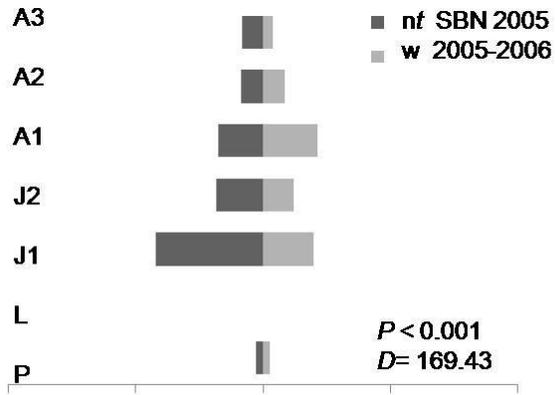
MART											
promedio 2006-2009											
	P	L	J1	J2	A1	A2	A3	n_t	w	v	
	P	0	0	0	0	0.020	0.050	0.074	0.027	0.042	1.00
	L	0.055	<u>0.399</u>	0.061	0.077	0.143	0.009	0.087	0.115	0.152	2.35
	J1	0.420	0.023	<u>0.242</u>	0.035	0.016	0.013	0.007	0.061	0.047	1.55
$\lambda=0.975$	J2	0.095	0.267	<u>0.283</u>	<u>0.365</u>	0.068	0.044	0.042	0.176	0.150	2.04
ICI=0.960	A1	0	0.120	0.155	0.309	<u>0.519</u>	0.247	0.124	0.284	0.281	2.63
ICS=0.984	A2	0	0.053	0	0.059	0.117	<u>0.275</u>	0.202	0.136	0.128	2.73
	A3	0	0.106	0	0.010	0.123	0.297	<u>0.515</u>	0.201	0.197	2.90
	q_x	<i>0.429</i>	<i>0.029</i>	<i>0.256</i>	<i>0.142</i>	<i>0.012</i>	<i>0.021</i>	<i>0.020</i>			
	N	9	38	20	58	94	45	67	332		

Cuadro 2.3. Resumen de los parámetros demográficos obtenidos para las poblaciones SBN y Martinica de *C. luteo-albus*.

Parámetro	Periodo	Población SBN	MART
λ	2005-2006	0.959	-
IC		0.946-0.991	
λ	2006-2007	0.988	1.001
IC		0.947-0.992g	0.976-1.022
λ	2007-2008	0.916	0.947
IC		0.878-0.946	0.901-0.972
λ	2008-2009	0.968	0.972
IC		0.949-0.982	0.949-0.982
λ	2005-2009p	0.956	-
IC		0.935-0.959	
λ	2005-2009p*	0.952	-
IC		0.930-0.954	
λ	2006-2009p	-	0.975
IC			0.960-0.984
λ	2006-2009p*	-	0.970
IC			0.950-0.977
L	matriz p	28 ± 17DS	39 ± 29DS
(a)	matriz p	5.4 ± 13DS	4.5 ± 9.5DS
μ_1	matriz p	22 ± 17DS	32 ± 28DS
$R_0=$	matriz p	0.18	0.23

Simbología: Tasa de crecimiento poblacional, λ , Intervalo de confianza al 95%, IC; Longevidad máxima, L; Edad a la madurez (años), (a); Tiempo generacional (años), μ_1 ; Tasa reproductiva neta, R_0 ; la letra p corresponde a la matriz promedio; p* corresponde a la matriz promedio que omite la etapa de latencia; matriz p: la matriz promedio correspondiente a cada población (2005-2009 para SBN y 2006-2009 para MART).

a)



b)

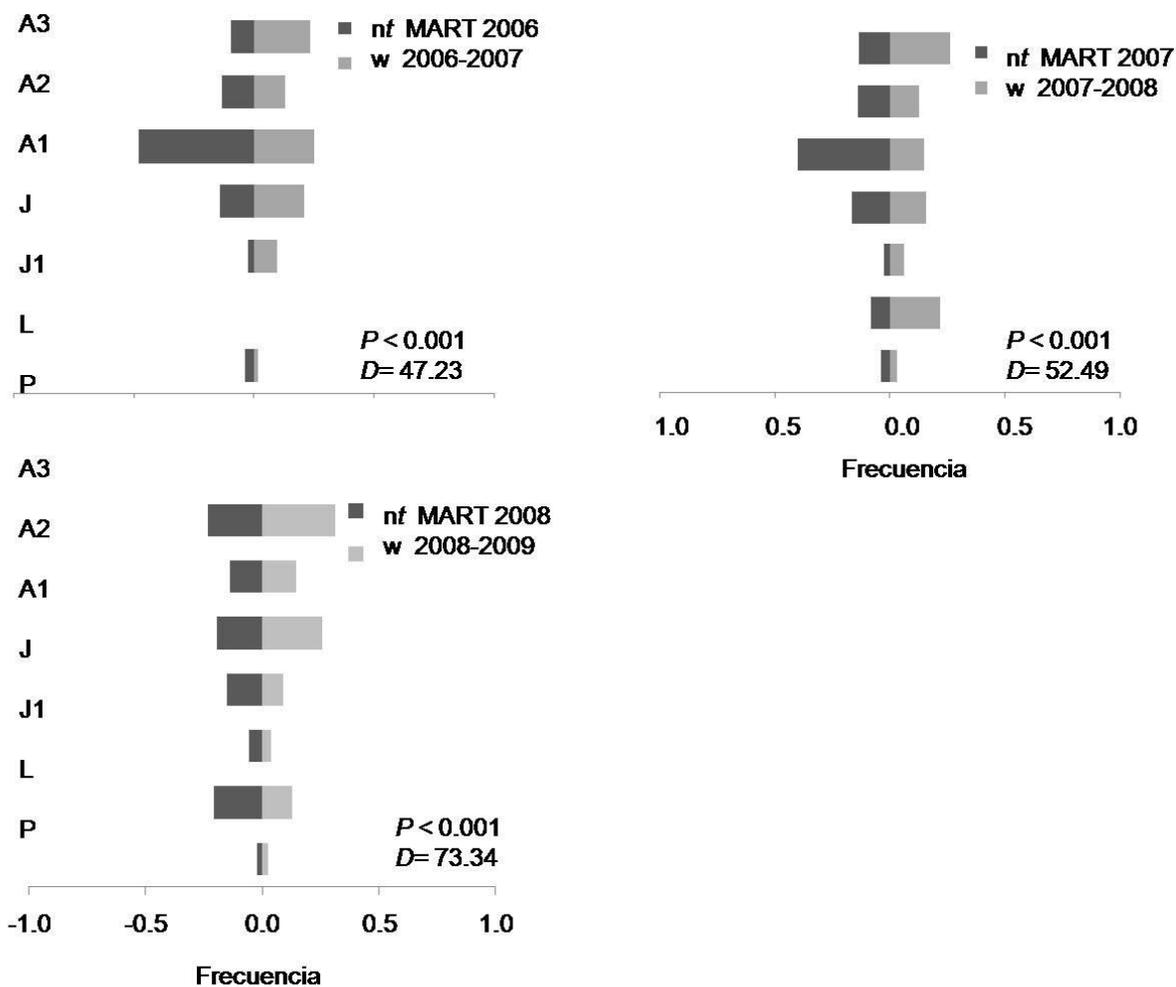
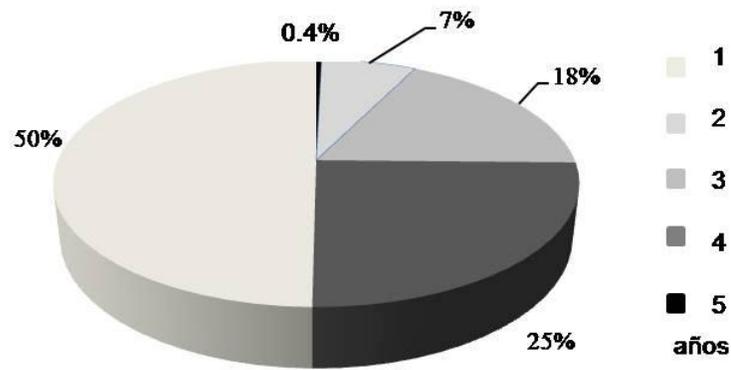


Figura 2.4. Comparación entre la estructura poblacional observada (n_t) y la estructura estable de tamaños (vector w) de las poblaciones SBN (a) y MART (b) para los años 2005-2009 y 2006-2009, respectivamente. El valor de $D=$ corresponde a los valores de significancia a través de la prueba Kolmogorov-Smirnov. La estructura poblacional observada (n_t) barras en negro, y la estructura estable de tamaños (w), barras grises.

a)



b)

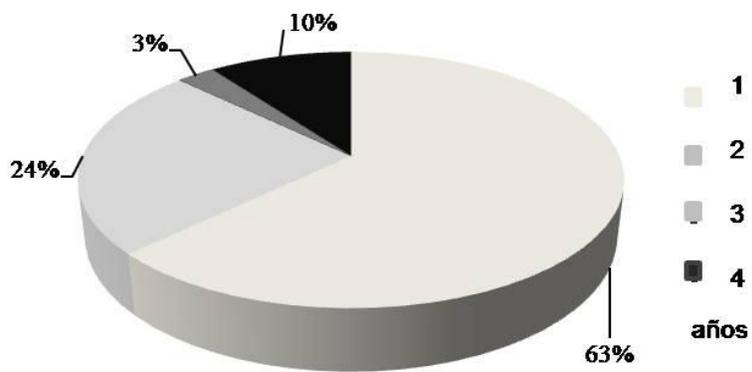
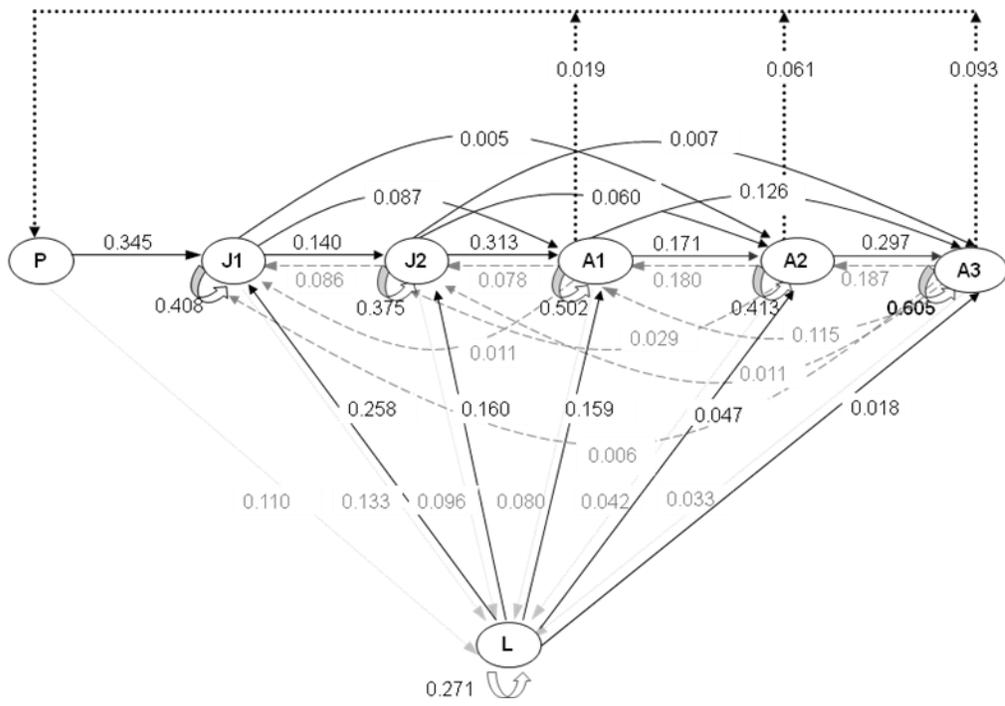


Figura 2.5. Porcentaje de individuos que formaron frutos en un año o más durante el periodo 2005-2009 en SBN y durante 2006-2009 en Martinica.

a)



b)

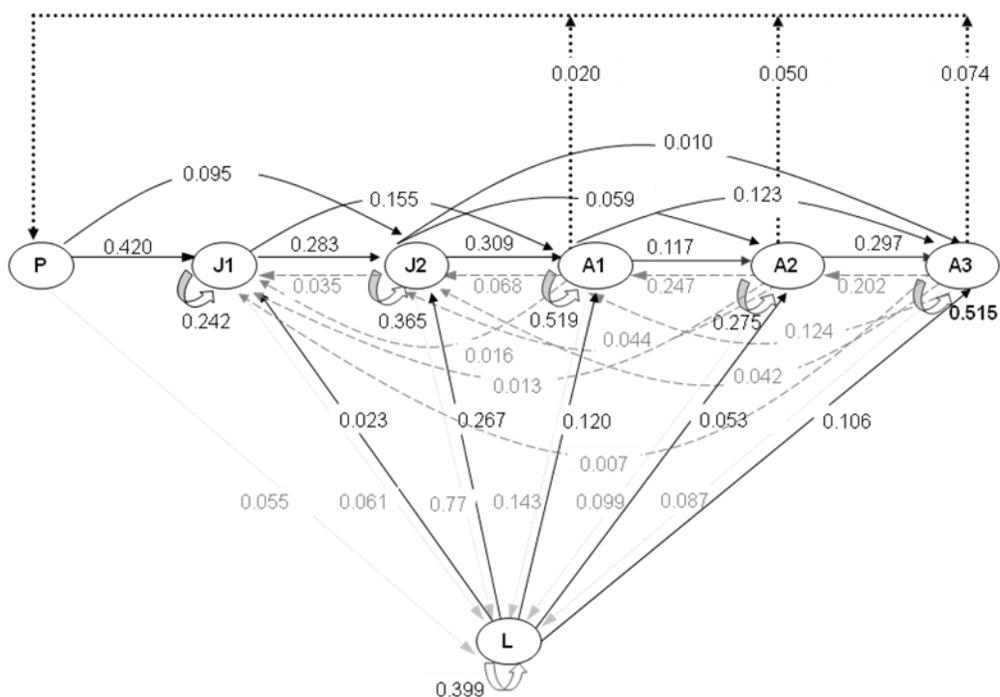


Figura 2.6. Diagrama del ciclo de vida de *Cyclopogon luteo-albus* para las poblaciones SBN (a) y MART (b). Los valores corresponden a las matrices promedio de transición (2005-2009 y 2006-2009, respectivamente). Las letras dentro de cada óvalo corresponden a la categoría de tamaño (ver definiciones de categorías de tamaño en Cuadro 2.1).

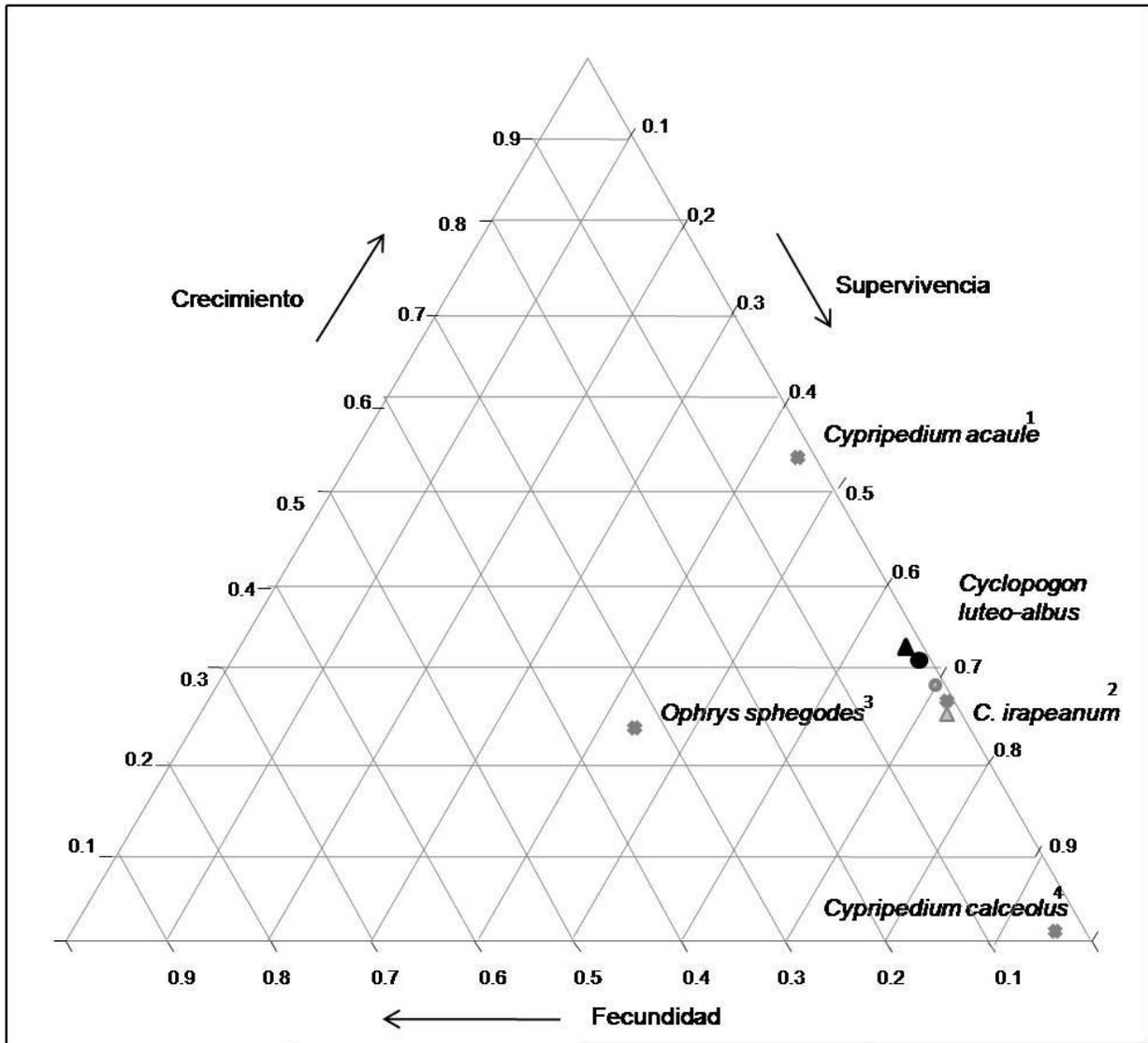
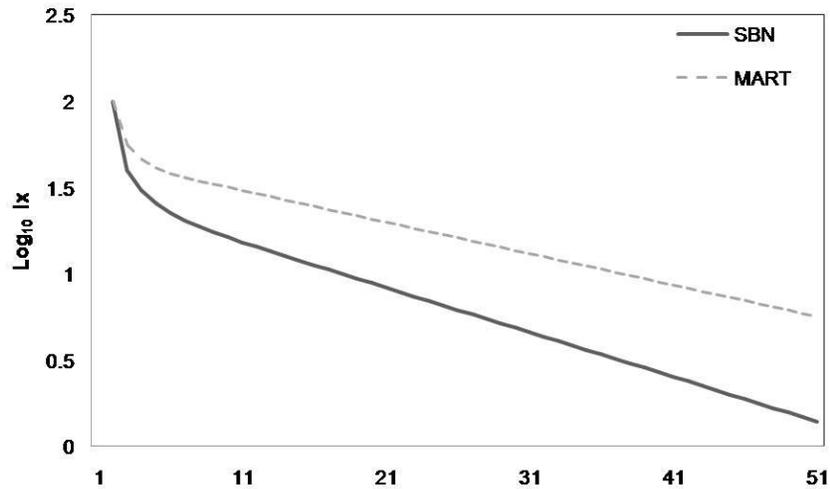


Figura 2.7. Triángulo demográfico en el que se ubican las poblaciones estudiadas de *C. luteo-albus* (construido con las elasticidades de las matrices de transición promedio) y otras especies de orquídeas terrestres. En las poblaciones de *C. luteo-albus*, los círculos consideran la etapa de latencia y los triángulos la omiten (SBN en gris y MART en negro). Los subíndices indican la referencia bibliográfica.

Referencias: *Cypripedium acaule*¹, Cochran, 1986; *Cypripedium irapeanum*², Gutiérrez-Paredes, 2000; *Ophrys sphegodes*³, Waite y Hutchings, 1991; *Cypripedium calceolus*⁴, Nicolé *et al.* 2005.

a)



b)

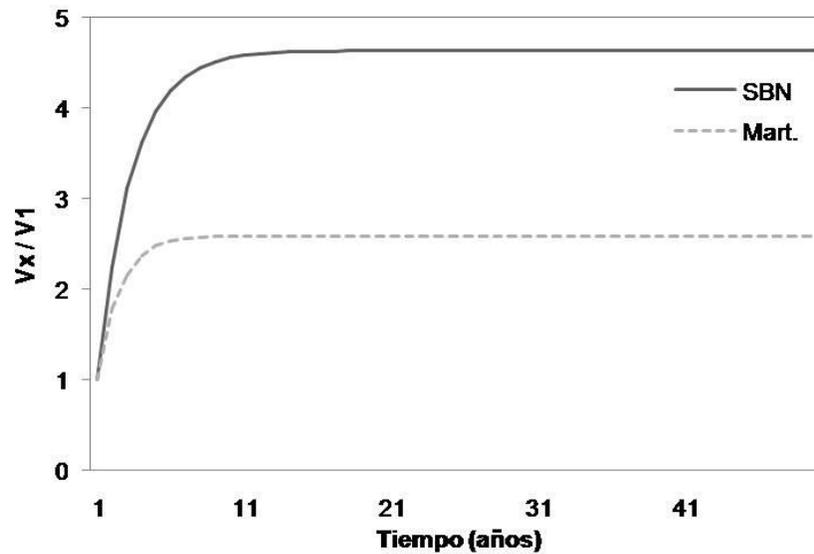


Figura 2.8. Curvas de supervivencia ($\log l_x$), (a); y valor reproductivo escalado a la primera categoría de tamaños (V_x/V_1), (b), calculados a partir de las matrices promedio de las poblaciones SBN (periodo 2005-2009) y MART (periodo 2006-2009). La curva de supervivencia muestra una mortalidad más intensa al inicio de la vida que disminuye hacia las etapas adultas. El valor reproductivo muestra a los individuos de categorías pequeñas con bajas probabilidades de llegar a la madurez, y éste se incrementa conforme los individuos aumentan de tamaño.

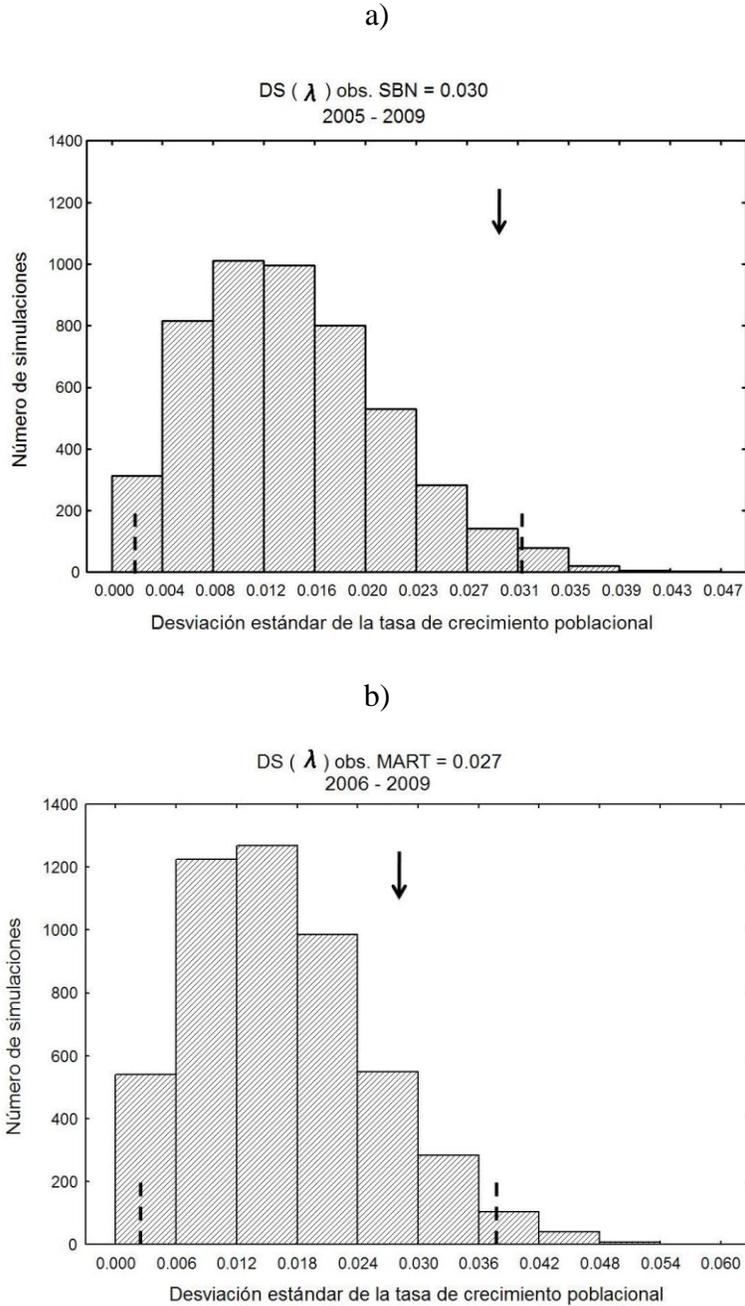
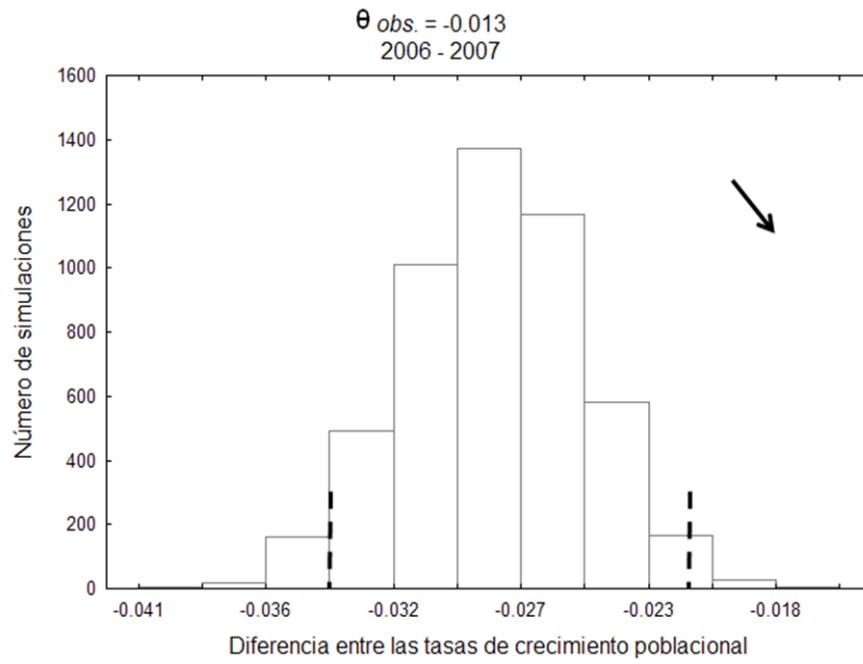
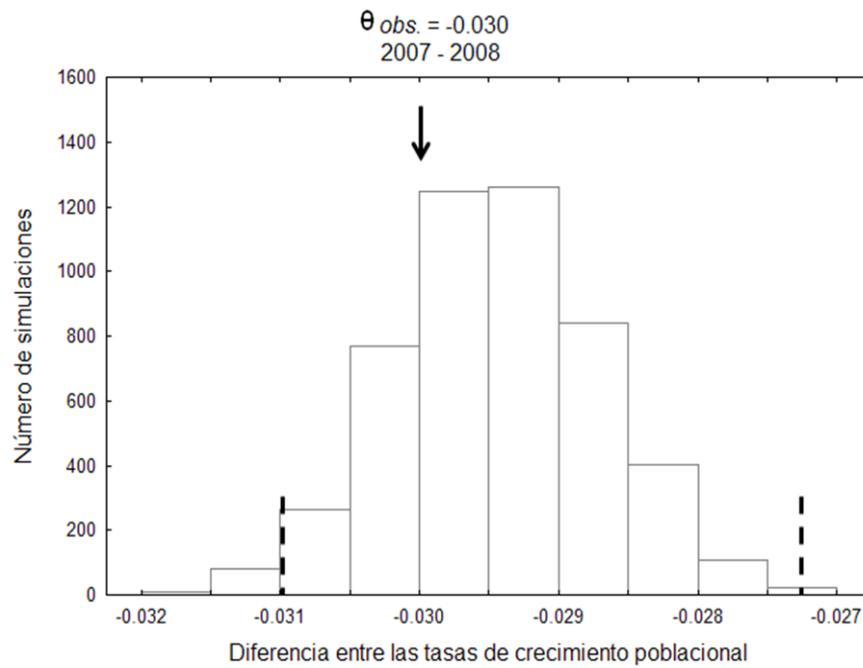


Figura 2.9. Análisis que muestra si la variación en las tasas finitas de crecimiento poblacionales (λ_{obs}) observadas a lo largo del periodo de estudio, fue significativa. Se verifica si el valor de la DS de λ_{obs} (indicado con una flecha) cae dentro de los intervalos de confianza al 95% (marcados con guiones verticales que cruzan en el eje de las abscisas). La distribución de frecuencias corresponde a las desviaciones estándar de λ , obtenidas a partir de 5000 simulaciones al azar con remplazo. Para realizar las simulaciones, en SBN se agruparon las bases de datos de los cuatro periodos anuales (2005-2009) (a), mientras que para MART, se agruparon las bases de datos de tres periodos anuales (2006-2009) (b).

a)



b)



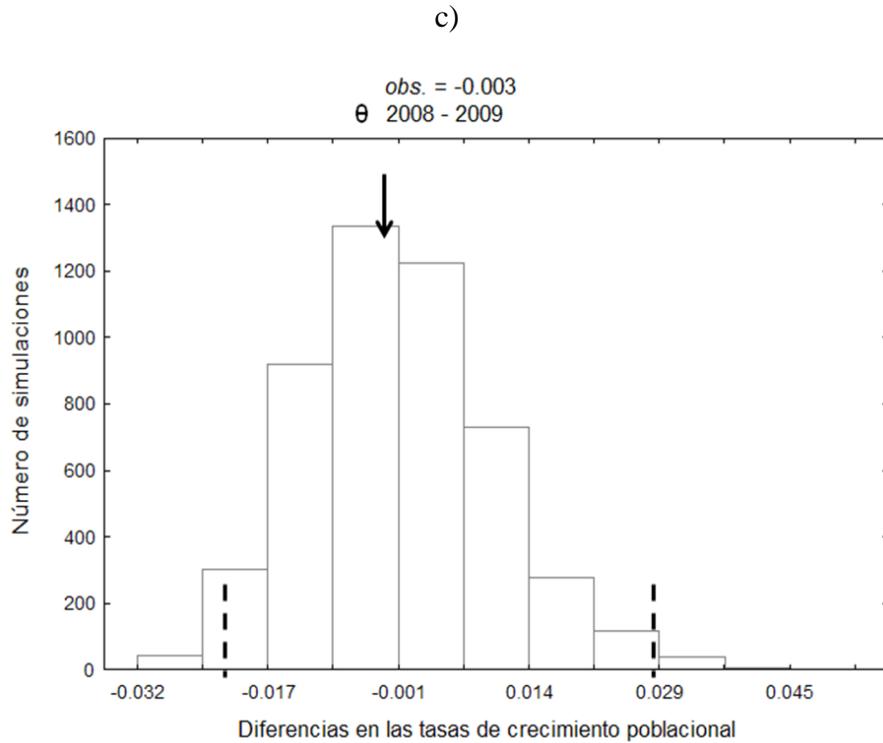
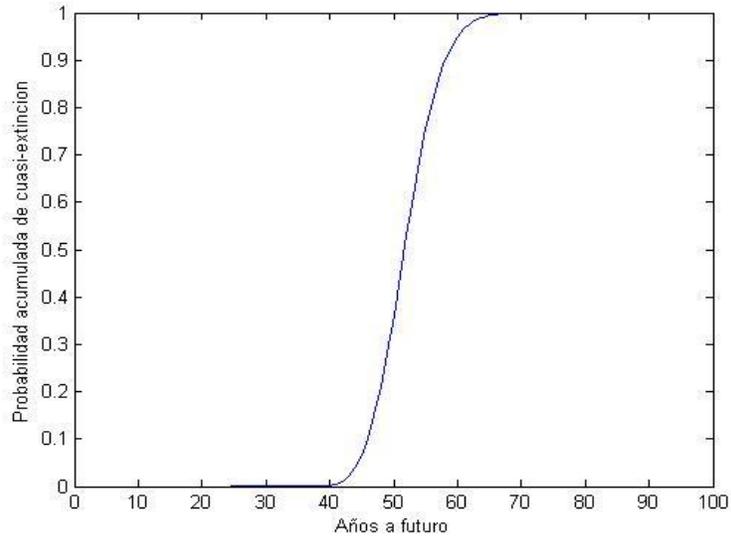


Figura 2.10. Análisis que prueba si las tasas finitas de crecimiento poblacional entre SBN y MART, presentaron diferencias significativas para un mismo periodo anual. Se verificó si el valor de θ observado caía dentro del intervalo del confianza del 95% (marcados con guiones verticales que cruzan en el eje de las abscisas). La distribución de frecuencias corresponde a las diferencias de λ de SBN y MART para los periodos anuales (a) 2006-2007, (b) 2007-2008, y (c) 2008-2009, obtenidas a partir de 5000 simulaciones al azar con remplazo. La flecha indica el valor de la diferencia observada de λ (θ_{obs}) para cada periodo anual.

a)



b)

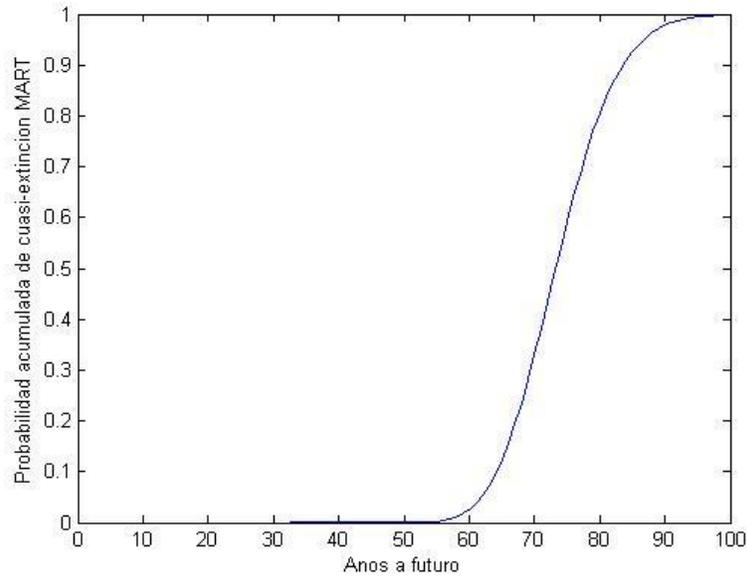


Figura 2.11. Probabilidades de cuasi-extinción a través del tiempo para las poblaciones SBN (a) y MART (b), estimadas a partir de los datos demográficos de cuatro periodos anuales (2005-2009) y tres periodos anuales (2006-2009), respectivamente.

Literatura Citada

- Álvarez-Aquino, C., G. Williams-Linera, A.C. Newton. 2005. Disturbance effects on the seed bank of mexican cloud forest fragments. *Biotropica* 37: 337-342.
- Baltazar, G.R. 2004. Micropropagación de *Oncidium tigrinum* Llave y Lex (Orchidaceae) a partir de protocormos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz.
- Begon, M., C.R. Townsend, J.L. Harper. 2006. Ecology. From individuals to ecosystems. 4th ed. Blackwell Publishing, UK.
- Benítez, R.J., R.L. Tremblay 2003. Efecto de remoción y relocalización de *Lepanthes eltoroensis* Stimson, después de un huracán. *Lankesteriana* 7: 67-70.
- Benton T.G., A. Grant, 1999. Elasticity analysis as an important tool in evolutionary and population ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 14:467-471.
- Calvo, R.N. 1990. Four year growth and reproduction of *Cyclopogon cranichoides* (Orchidaceae) in south Florida. *American Journal of Botany* 77: 736-741.
- Calvo, R.N., C.C. Horvitz. 1990. Pollinator limitation, cost of reproduction, and fitness in plants: a transition-matrix demographic approach. *The American Naturalist* 136: 499-516.
- Caswell, H. 2001. Matrix Population Models. Construction, Analysis and Interpretation 2nded. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Caswell, H. 2000. Prospective and retrospective perturbation analyses: their roles in conservation biology. *Ecology* 81: 619-627.
- Caswell, H., M.C. Trevisan. 1994. Sensitivity analysis of periodic matrix models. *Ecology* 75: 1299-1303.
- Challenger, A. 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. CONABIO, México.

Chesson, P.I. 1984. The storage effect in stochastic population models. *Lecture Notes in Biomathematics* 54: 76-89.

Coates, F., I.D. Lunt, R.L. Tremblay. 2005. Effects on disturbance on population dynamics of the threatened orchid *Prasophyllum correctum* D.L. Jones and implications for grassland management in south-eastern Australia. *Biological Conservation* 129: 59-69.

Cochran, M.E. 1986. Consequences of pollination by chance in the pink lady's-slipper *Cypripedium acaule*. Ph D. Dissertation. The University of Tennessee, Knoxville, Tennessee, USA:

Cochran, M.E., S. Ellner. 1992. Simple methods for calculating age-based life history parameters for stage-structured populations. *Ecological Monographs* 62: 345–364.

Damon, A., J. Valle-Mora. 2008. Retrospective spatial analysis of the pollination of two miniature epiphytic orchids with different pollination strategies in a coffee plantation in Soconusco, Chiapas, Mexico. *Botanical Journal of Linnean Society* 158: 448-459.

Dressler, R.L. 1981. *The orchids, natural history and classification*. Harvard University Press.

Douterlungne, D., S.I. Levy-Tacher, D.J. Golicher, F.R. Dañobeytia. 2008. Applying indigenous knowledge to the restoration of degraded tropical rain forest clearings dominated by bracken fern. *Restoration Ecology* 18: 322-329.

Dutra, D. Reproductive biology and asymbiotic seed germination of *Cyrtopodium punctatum*, an endangered Florida orchid. Tesis de Maestría. Universidad de Florida, USA.

Ebert, T.A. 1999. *Plant and animal populations: Methods in demography*. Academic Press, San Diego.

Espejo-Serna, A., A.R. López-Frerrari, R. Jiménez-Machorro. 2005. Las orquídeas de los cafetales de México: una opción para el uso sostenible de ecosistemas tropicales. *Journal of Tropical Biology* 53: 73-84.

Fahrig, L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 34: 487–515.

Flores-Palacios, A., J.G. García-Franco. 2003. Effects of floral display and plant abundance on fruit production of *Ryncholaelia glauca* (Orchidaceae). *Revista de Biología Tropical* 51: 71-78.

García-Soriano, R. 2003. Demografía, manejo y conservación e *Artorima erubescens*, en Oaxaca, orquídea endémica del sur de México. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yuc.

García-González, A., Damon A., L.G. Esparza-Olguín, J. Valle-Mora. 2011. Population structure of *Oncidium poikilostalix* (Orchidaceae), in coffee plantations in Soconusco, Chiapas, México *Lankesteriana* 11: 23-32.

Ginzburg, L.R., L.B. Slobodkin, K. Johnson, A.G. Bindman. 1982. Quasi-extinction probabilities as a measure of impact of population growth. *Risk Analysis* 2: 171-181.

Godínez-Álvarez, H., T. Valverde. 2003. Demographic trends in Cactaceae. *The Botanical Review* 69: 173-203.

Gutiérrez-Paredes, C.C. 2000. Estudio demográfico de *Cypripedium irapeanum* (Orchidaceae) en el valle de Valsequillo, Puebla. Tesis de Licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, Pue.

Hágsater, E., M. Á. Soto-Arenas, G. A. Salazar-Chávez, R. Jiménez-Machorro, M. A. López-Rosas, R. L. Dressler. 2005. *Las orquídeas de México*. Instituto Chinoín, México.

Hernández-Apolinar, M. 1992. Dinámica poblacional de *Laelia speciosa*(HBK) Schltr. (Orchidaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

Harper, J.L. 1977. *Population Biology of Plants*. Academic Press London.

Harrison, S. 1991. Local extinction in a metapopulation context: an empirical evaluation *Biological Journal of Linnean Society* 42: 73-88.

Hernández-Apolinar, M. 1997. Crecimiento y reproducción de *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) en Usila, Oaxaca. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

- Honnay, O., H. Jacquemyn. 2007. Susceptibility of common and rare plant species to the genetic consequences of habitat fragmentation. *Conservation Biology* 21: 823-831.
- Hutchings, M.J. 2010. The population biology of the early spider orchid *Ophrys sphegodes* Mill. III. Demography over three decades. *Journal of Ecology* 98: 867-878.
- IUCN/SSC Orchid Specialist Group. 1996. Orchids Status survey and conservation action plan. Gland Switzerland and Cambridge, UK.
- Jersakova J, T. Malinova. 2007. Spatial aspects of seed dispersal and seedling recruitment in orchids. *New Phytologist* 176: 237-241.
- Juárez, L., C. Montaña, M. Ferrer. 2011. Spatial population genetic structure of the terrestrial orchid *Cyclopogon luteoalbus* (Orchidaceae) in the cloud forest in central Veracruz, Mexico. *Plant Systematics and Evolution* 297: 237-251.
- Jules, E.S. 1998. Habitat fragmentation and demographic changes in a common plant: *Trillium* in old-growth forest. *Ecology* 79:1645-1656.
- Kroon, de H., A. Praisner, J. van Groenendael, H. Caswell. 1986. Elasticity: the relative contribution of demographic parameters to population growth rate. *Ecology* 67: 1427-1441.
- Kéry M., K.B. Gregg. 2003. Effect of life-state on detectability in demography study of the terrestrial orchid *Cleistes bifaria*. *Ecology* 91: 265-273.
- Leftkovich, L.P. 1965. The study of population growth in organisms grouped by stages. *Biometrics* 21: 1-18.
- Leeson, E. C. Haynes, T.C.E. Wells. 1991. Studies of the phenology and dry matter allocation of the *Dactylorhiza fuchsii*. Population ecology of terrestrial orchids *En: Wells T.C. E. and J.H. Willems.* 125-138. Academic Publishing, The Netherlands.
- Lesica, P.B., M. Stele. 1994. Prolonged dormancy in vascular plants and implications for monitoring studies. *Natural Areas Journal* 14: 209-212.
- Lugo, A. E. 1988. Estimating reductions in the diversity of tropical forest species *En: Wilson E.O. (ed.) Biodiversity* 58-70p. National Academic Press, Washington, D.C.

Koopowitz, H., P.S. Lavarack, K.W. Dixon. 2003. The nature of threats to orchid conservation
En: Dixon, K.W., S.P. Kell, R.L. Barret, P.J. Cribb (eds.). Orchid Conservation, Natural History Publications (Borneo). Kota Kinabalu, Sabah.

Maldonado-Flores, C. 2006. Patrón de distribución espacial y dinámica poblacional de *Oncidium crista galli*, una especie de orquídea epífita de Chiapas. Tesis de Maestría. Centro de Interdisciplinario de Investigaciones para el desarrollo Integral Regional, CIDIIR. Unidad Oaxaca.

Math works, Inc. (2008) MATLAB. Reference guide. The mathworks, Natick.

Martínez-Ramos, M., E. Álvarez-Buylla. 1995. Ecología de poblaciones de plantas en selvas húmedas de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 56: 121-153.

Martínez-Ballesté, A., C. Martorell, M. Martínez-Ramos, J. Caballero. 2005. Applying retrospective demographic models to assess sustainable use: the maya management of Xa'an palms. *Ecology and Society* 10(2): 17. <http://www.ecologyandsociety.org/vol10/iss2/art17/i>.

Mayberry, R., E. Elle. 2010. Conservation of rare plant requires different methods in different habitats: demographic lessons from *Actea elata*. *Oecologia* 164: 1121-1130.

McCormick, M.K, D.F. Whigham, D. Sloan, K. O'Malley, B. Hodkinson. 2006. Orchid-fungus fidelity: a marriage meant to last? *Ecology* 87: 903-911.

Meagher, T.R. 1982. The population biology of *Chamaelirium luteum*, dioecious member of the lily family: Life histories studies. *Ecology* 63: 1701-1711.

Menges, E.S. 1990. Population viability analysis for an endangered plant. *Conservation Biology* 4: 52-62.

Mondragón, D. 2009. Population viability analysis for *Guarianthe aurantiaca*, an ornamental epiphytic orchid harvested in Southeast México *Plant Species Biology* 24: 35-41.

Morris, W.F., D.F. Doak. 2002. *Quantitative Conservation Biology. Theory and practice population viability analysis.* Sinauer Associates Inc., Publishers. Sunderland, Mass.

Muñoz-Villers, L.E., J. López-Blanco. 2008. Land use/cover changes using landsat tm/etm images in a tropical and biodiverse mountainous area of central-eastern Mexico. *International Journal of Remote Sensing* 29: 71-93.

Nicolé, F., E. Brzosko, I. Till-Bottraud. 2005. Population Viability analysis of *Cypripedium calceolus* in a protected area: longevity, stability and persistence. *Journal of Ecology* 93: 716-726.

Oostermeijer, J.G.B., M.L. Brugman, E.R. de Boer, J.C.M. den Nijs. 1996. Temporal and spatial variation in the demography of *Gentiana pneumonanthe* a rare perennial herb. *Journal of Ecology* 84: 156-166.

Oostermeijer, J.G.B. 2003. Threats to Rare Plant Persistence *En:* Brigham, C. A. y M. W. Schwartz (eds.) Population viability in plants. Conservation, management and modeling of rare plants. Springer. California.

Ortega-Larrocea, M.P., A. Martínez-Palacios y V.M. Chávez-Ávila. 2009. Conservación y propagación de orquídeas *En:* Biodiversidad del ecosistema del Pedregal de San Ángel. Antonio Lot, Zenón Cano-Santana (eds.) Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

INECOL. 2004. Plan de manejo del Santuario del Bosque de Niebla del Jardín Botánico Francisco Javier Clavijero. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Veracruz.

SEDESMA. 2006. Programa de manejo del área natural protegida “La Martinica” Banderilla, Veracruz. Secretaría de Desarrollo Social y Medio Ambiente, Gobierno del Estado. Xalapa, Veracruz.

Raijmann, L.E.L., N.C.V. Leeuwen, R. Kersten, J.G.B. Oostermeijer, H.C.M.D. Nijs, S.B.J. Menken. 1994. Genetic variation and outcrossing rate in relation to population size in *Gentiana pneumonanthe* L. *Conservation Biology* 8: 1014–1026.

Rasmussen, H.N. 1995. Terrestrial orchids. From seed to micoheterotrophy. Cambridge University Press. NY.

Rzedowski, J. 1978. La Vegetación de México. Limusa, México.

Salazar, G. 2009. Conservación y propagación de orquídeas *En: Biodiversidad del ecosistema del Pedregal de San Ángel*. Antonio Lot, Zenón Cano-Santana (eds.) Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

Salazar-Rojas, M. 2004. Micropropagación de *Mormodes tuxtlensis*, Salazar, *Cuitlauzina pendulala* Llave y Lex y, *Lycaste skineri* (Batem. Ex Lind.) Lind (Orchidaceae) a partir de protocormos. Tesis de Licenciatura Benemérita Universidad de Puebla. Puebla, Pue.

Shefferson R.P., B.K. Sandercock, J. Proper, S.R. Beissinger. 2001. Estimating dormancy and survival of a rare herbaceous perennial using mark-recapture models. *Ecology* 82: 145-156.

Shefferson R.P, J. Proper, S.R., Beissinger, E.L. Simms. 2003. Life history trade-offs in a rare orchid: the cost of flowering, dormancy, and sprouting. *Ecology* 84: 1199-1206.

Shefferson R.P., T. Kull, T. Kadri. 2005. Adult whole-plant dormancy induced by stress in long-lived orchids. *Ecology* 86: 3099-3104.

Shefferson, R.P. K. Tali. 2007. Dormancy is associated with decreased survival in the burnt orchid, *Neotinea ustulata*. *Journal of Ecology* 95: 217-225.

Silvertown, J., D. Charlesworth. 2001. *Introduction to plant population biology*, 4th ed. Blackwell, Oxford.

Silvertown, J., M. Franco. 1993. Plant Demography and habitat: a comparative approach. *Plant Species Biology* 8: 67-73.

Silvertown, J., M. Franco, I. Pisanty, A. Mendoza. 1993. Comparative plant demography-relative importance of life-cycle components to the finite rate of increase in woody and herbaceous perennials. *Journal of Ecology* 81: 465-476.

Sosa, V., T. Platas. 1998. Extinction and persistence of rare orchids in Veracruz, Mexico. *Conservation Biology* 12: 451-455.

Stewart, S.L., M.E. Kane. 2006. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86: 147-158.

Stoutamire, W.P. 1974. Terrestrial orchid seedling *En*: Withner, C.L. (ed.) The orchids, Scientific studies. NY., U.S.A.

Suárez-Quijada, I., M. Hernández-Altamirano, V.M. Chávez-Ávila, E. Sandoval-Zapotitla, A. Martínez-Palacios. 2007. Propagación *in vitro* de *Euchile mariae* (Ames) Withner (Orchidaceae). *Lankesteriana* 7: 388-393.

Tamm, C.O. 1956. Further observation on the survival and flowering of some perennial herbs. *Oikos* 7: 274-292.

Tremblay, R. L., M. J. Hutchings. 2003. Population dynamics in orchid conservation: analytical methods, based on the rare species *Lepanthes eltoroensis* *En*: Kingsley, W., K.W. Dixon, S. P. Kell, R.L. Barret, P.J. Cribb. (eds.), *Orchid Conservation*, Natural History Publications (Borneo). Kota Kinabalu, Sabah.

Valverde, T. 1995. *Metapopulation Dynamics of Primula vulgaris*. The Open University, Milton Keynes (UK). Ph.D. Dissertation.

Valverde, T., J. Silvertown. 1998. Variation in the demography of a woodland understorey herb (*Primula vulgaris*) along the forest regeneration cycle: projection matrix analysis. *Journal of Ecology* 86: 545-562.

Van Groenendael, J., H. de Kroon, H. Caswell. 1998. Projection matrices in population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 3: 264-269.

Venables W.N, D.M, Smith. 2004. An introduction to R 2.0.1. The R development core team. Available at <http://www.r-project.org>.

Verhulst, J., C. Montaña, M.C. Mandujano, M. Franco. 2008. Demographic mechanism in the coexistence of two closely related perennials in a fluctuating environment. *Oecologia* 156: 95-105.

Waite, S., M.J. Hutchings. 1991. The effect of different management regimes on the population dynamics of *Ophrys sphegodes*: analysis and description using matrix models. *Population ecology of terrestrial orchids* *En*: Wells, T. C. E. and J. Willems (eds.), Academic Publishing, The Hage.

Wells, T.C.E. 1981. Population ecology of terrestrial orchids *En: Syng. H. (ed.) The Biological Aspects of Rare Plant Conservation*, Wiley, Chichester, N.Y. Pp. 281-295.

Wells, T.C.E., R. Cox. 1991. Demography and biological studies on *Ophrys apifera*: some results from a 10 year study. *Population Ecology of Terrestrial Orchids En: Wells T.C.E. and J.H. Willems (eds.), Population ecology of terrestrial orchids. SPB Academic Publishing, The Hague.* P. 47-61.

Wells, T.C.E., J.H. Willes. 1991. *Population ecology of terrestrial orchids. Academic publishing, The Hage.*

Williams-Linera, G., V. Sosa, T. Platas. 1995. The fate of epiphytic orchids after fragmentation of a Mexican cloud forest. *Selbyana* 16: 36-40.

Williams-Linera, G. 2003. Temporal and spatial phenological variation of understory shrubs in a tropical montane cloud forest. *Biotropica* 35: 28-36.

Williams-Linera, G. 2007. El bosque de niebla del centro de Veracruz: Ecología, historia y destino en tiempos de fragmentación y cambio climático. INECOL. CONABIO. México.

Willems J.H., C. Melsers. 1998. Population dynamics and life-history of *Coeloglossum viridae* (L.) Hartm.: an endangered orchid species in The Netherlands. *Botanical Journal of Linnean Society* 126: 83:93.

Winkler, M., K. Hülber, P. Hietz. 2009. Population dynamics of epiphytic orchids in a metapopulation context. *Annals of Botany* 104: 995-1004.

Winkler, M., K. Hülber, K. Mehlreter, J. García-Franco, P. Hietz. 2005. Herbivory in epiphytic bromeliads, orchids and ferns in a Mexican montane forest. *Journal of Tropical Ecology* 21: 147-154.

Zar J. 1999. *Biostatistical analysis. Editorial Prentice-Hall. Upper Saddle River, N.J.*

CAPÍTULO III

Genetic structure at patch level of the terrestrial orchid *Cyclopogon luteoalbus* (Orchidaceae) in a fragment cloud forest

Plant Systematics and Evolution

Genetic structure at patch level of the terrestrial orchid *Cyclopogon luteoalbus* (Orchidaceae) in a fragmented cloud forest

Lilian Juárez · Carlos Montaña · Miriam M. Ferrer

Received: 7 March 2011 / Accepted: 13 July 2011 / Published online: 9 August 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Genetic differentiation in space can be detected at various scales. First, habitat fragmentation can produce a mosaic genetic structure. Second, life history aspects of a species such as dispersion, mating system, and pollination can generate a genetic structure at a finer level. The interplay of these levels has rarely been studied together. In order to assess the effects of forest fragmentation we analyzed the genetic structure at two spatial scales of the terrestrial orchid *Cyclopogon luteoalbus*, which lives in patches inside forest fragments in a cloud forest of eastern Mexico. We hypothesized high differentiation between forest fragments and strong spatial genetic structure within fragments under this scenario of strong fragmentation and restricted dispersal patterns. Using 11 allozymic loci we found high genetic diversity at fragment level with moderate differentiation among fragments, and at patch level, strong and variable spatial genetic structure among life cycle stages with high inbreeding coefficients. We also found bottlenecks indicating recent population size reductions. While both inbreeding and restricted seed dispersal may explain the strong spatial genetic structure at patch level, reduction in population size may explain the genetic structure at fragment level. However, the levels of genetic diversity indicate that some between-fragment gene flow has occurred. Bottlenecks and high inbreeding at patch level may result in local extinctions, but as long as an

important number of fragments remain, patch recolonization through immigration is possible in *C. luteoalbus*.

Keywords Allozymes · Autocorrelation · Heterozygosity · Inbreeding · Outcrossing rate · Spatial genetic structure

Introduction

Genetic structure is defined by differences in allele frequency within and among populations (Loveless and Hamrick 1984). It can be detected at landscape, population, or patch level (Epperson 1993; Fenster et al. 2003; Manel et al. 2003) and is influenced by ecological factors (Kalisz et al. 2001) such as pollinator availability (Van Rossum and Triest 2006), pollination mechanism (Hamrick and Godt 1996), habitat availability (Sun and Wong 2001), and breeding system and dispersal mechanisms (Hamrick et al. 1993; Kalisz et al. 2001; Wright 1943). At landscape and population scales, isolation by distance (due to genetic drift associated with limited gene flow) may also influence genetic structure (Wright 1943). Another factor that is becoming important for genetic structure is habitat fragmentation, as isolation contributes to genetic differentiation between fragmented populations and diminishes genetic variation (Aguilar et al. 2008).

At fine scale or patch level, spatial genetic structure (SGS) is promoted when relatedness decreases with distance and genotypes are not randomly distributed within a population (Epperson 1993). SGS can be the result of limited gene flow, genetic drift, microenvironmental selection, breeding system, dispersal mechanisms, and inherently ecological proximal causes acting at that level (Hamrick et al. 1993; Kalisz et al. 2001; Wright 1943).

L. Juárez · C. Montaña (✉)
Red de Biología Evolutiva, Instituto de Ecología A.C.,
Apartado Postal 63, 91000 Xalapa, Veracruz, Mexico
e-mail: carlos.montana@inecol.edu.mx

M. M. Ferrer
Departamento de Ecología Tropical, Universidad Autónoma
de Yucatán, Km. 15.5 Carretera Mérida Xmatkuil,
97000 Mérida, Yucatán, Mexico

SGS in terrestrial orchids has been attributed to: (1) the presence of pollinaria, because this ensures that seeds within a capsule are full sibs, (2) seedling establishment aggregated around mother plants where the necessary mycorrhiza are found (this mechanism was inferred by Chung et al. 2004a for *Cephalanthera longibracteata*, and by Jacquemyn et al. 2006 for *Orchis purpurea*), (3) pollination among near neighbors or flowers of the same plant promoting inbreeding (e.g., *Caladenia tentaculata*, Peakall and Beattie 1996 and *Cymbidium goeringii*, Chung et al. 1998), (4) clonal propagation (e.g., *Cremastra appendiculata*, Chung et al. 2004b), and (5) recent founding of the population (e.g., *Spiranthes spiralis*, Machon et al. 2003 and *Cymbidium goeringii*, Chung et al. 1998). Also, SGS may vary with life cycle stage or cohort age (Álvarez-Buylla et al. 1996; Epperson 1993; Kalisz et al. 2001); for instance, SGS in seedlings may be lower than in adults when after-establishment thinning preferentially eliminates full sibs or highly related seedlings (Kalisz et al. 2001; Tonsor et al. 1993). In these cases, seeds produced by adults are highly inbred because seeds produced in pollinaria are full siblings and seedlings mostly establish near established plants.

Distributed mostly in the mountains of eastern Mexico, cloud forest is home to half of the orchids known in Mexico (IUCN/SSC 1996), but this vegetation type has been subjected to a long and strong deforestation process to make grazing lands, coffee plantations, and urban settlements, particularly since the 19th century until now. In cloud forest, as in most tropical forests, fragmentation may disrupt genetic processes of some species, diminishing the genetic diversity of remnant populations as local drift and/or inbreeding increases and gene flow decreases (Aguilar et al. 2008; Honnay and Jacquemyn 2007). Orchidaceae is one of the largest angiosperm families (17,000–35,000 species), with around one-third of the species displaying terrestrial growth habit (Dressler 1993). *Cyclopogon luteoalbus* (A. Rich. & Galleoti) Schltr. is a locally abundant terrestrial orchid patchily distributed in remnant cloud forest fragments of very variable sizes but larger than 2 ha that are immersed in a matrix of coffee plantations, pasturelands, and urban settlements in the mountains of eastern Mexico. As its generational time is 25 years, as shown by a demographic study from 2005 to 2009 (Juárez and Montaña, unpublished data), it is expected that its current genetic structure has been affected by the long and strong fragmentation process.

This genetic study of *C. luteoalbus* was conducted, at both fragment and patch (within-fragment) levels, in the cloud forest of central Veracruz. In this highly fragmented landscape we hypothesized high genetic differentiation between fragments as a consequence of limited gene flow, and strong spatial genetic structure at patch level because seedling establishment occurs nearby already established

plants. We also expected to find differences among the SGS of the different life stages due to nonrandom thinning of individuals in transitions from each life stage to the next one.

Materials and methods

Species and study sites

Cyclopogon luteoalbus (Orchidoideae: Cranichideae) is a Neotropical species distributed from Mexico to El Salvador. It is composed of a rosette (fewer than eight leaves) and a simple system of tuberoid roots. Clonal propagation is rare (5 out of 500 revised individuals in a 5-year demographic study had connecting roots; Juárez and Montaña, unpublished data). Flowering occurs synchronously in winter (February), while fruits are set in March. Nectar-producing flowers last 10 days. Fruits contain $2,510 \pm 1,593$ SD seeds ($N = 8$ fruits), which are wind-dispersed during the dry season. The species has a mixed mating system: autonomous self-pollination is possible, as corroborated experimentally (0.83 ± 0.23 SD fruit set in bagged inflorescences, $N = 14$ and 0.85 ± 0.13 SD fruit set in nonbagged inflorescences, $N = 17$), and outcrossing is promoted by sequential opening of flower within inflorescences. Two halictid bees (*Caenaugochlora cupriventris* and *Augochlora* sp.) are potential pollinators. Five-year (2005–2009) demographic studies conducted in two populations (where the fate of a total of 950 individuals was monitored) showed that the generational time of *C. luteoalbus* is around 25 years (Juárez and Montaña, unpublished data).

The species lives in unevenly distributed patches inside forests fragments of eastern Mexico. In a surface area of approximately $15 \text{ km} \times 15 \text{ km}$ (which included the SBN and Martinica study sites), Díaz-Toribio (2009) reported the presence of *C. luteoalbus* in 14 cloud forest fragments of more than 2 ha surface area. The mean surface area of and the mean distance between the 14 fragments were 13.3 ± 10.7 SD ha and 4.8 ± 2.7 SD km. The values of some soil parameters were: litter depth 5.7 ± 1.8 SD cm, pH 4.6 ± 0.8 SD, herbaceous cover 52.6 ± 22.2 SD%, total N 1.2 ± 0.6 SD%, total C 18.7 ± 12.7 SD%, C/N 14.2 ± 2.5 SD, available P 3.9 ± 3.4 SD ppm, and K 0.8 ± 0.4 SD cmol/kg ($N = 14$ in all cases). Most probably the patchy distribution inside fragments is due to the very special soil conditions needed for the development of the mycorrhizae required for seed germination (Rasmussen 1995). These soil conditions under forest canopies may be locally absent for natural reasons or may have been eliminated by management in forested areas used for shadow coffee plantations, where under a canopy of native and

introduced trees, the understory is permanently eliminated with consequent loss of the upper soil layer. The eventual use of fertilizers (mainly phosphorus) and/or pesticides also affects soil conditions. Even if coffee plantation is abandoned, reconstruction of these upper soil layers may take several decades (or even centuries).

According to Rzedowski (1978), cloud forest in the mountains of eastern Mexico has been occupied and exploited by man during centuries. Forest clearing for maize and bean cultivation was done during pre-Columbian times, and for cane sugar cultivation since colonial times (16th century). Challenger (1998) mentions that deforestation for introduction of coffee plantations was very pronounced between the last quarter of the 19th century and 1960. Using satellite images of a watershed which included two of our three study sites, Muñoz-Villers and López-Blanco (2008) documented a process of forest conversion to grazing and agriculture lands that occurred in central Veracruz between 1990 and 2003 (this process began by the mid 20th century and is still going on). In this 1,325 km² watershed (1,316 of which has the potential to sustain several types of forest, but mainly cloud forest) these authors report that there remained only 561 km² of forests in 1990 and that this figure had decreased to 487 km² in 2003. This variation was due to a small increase in oak–pine (25 km²) and conifer (48 km²) forests due to reforestation programmes and to a decrease from 427 to 279 km² of cloud forest cleared to be used as pasture and agriculture lands. These anthropogenic changes in natural habits had led to fragmentation (a complex process that involves habitat loss, an increase in number of patches, a decrease in patch size, and patch isolation; Fahrig 2003) of the original continuous habitat for cloud forest orchids, affecting the connection between them.

The study was conducted in three cloud forest fragments in the central part of the State of Veracruz, Mexico [Santuario del Bosque de Niebla (SBN), Martinica, and Zongolica sites]. SBN is a 30-ha protected area (since 1975) located 2.5 km southwest from the City of Xalapa (19°31′05″N, 96°56′03″W, 1,350 m a.s.l., 1,517 mm rainfall, 18°C mean annual temperature). The dominant species at the forest canopy are: *Liquidambar styraciflua*, *Quercus xalapensis*, and *Carpinus caroliniana*, and at the understory are *Palicourea padifolia* and *Piper auritum* with some remnants of farming such as coffee, orange, loquat, and guava. Martinica is located 8 km northwest from SBN at the outskirts of the City of Banderilla (19°34′49″N, 96°56′28″W, 1,550 m a.s.l., 1,470 mm rainfall, 16°C mean annual temperature), comprising ca. 10 ha of privately owned land that has not been farmed for the last 20 years. The vegetation is similar to SBN.

Zongolica is a ca. 50 ha nonprotected area located ca. 200 km northwest from Martinica and SBN, in the Sierra

Zongolica, in western Veracruz (18°39′00″N, 96°49′49″W, 1,330 m a.s.l., 2,270 mm rainfall, 17°C mean annual temperature). Cloud forest in this zone is mixed with tropical semi-evergreen forest and is subjected to illegal wood extraction, clearing for farming purposes, and browsing by goats at the understory. Canopy dominant species include *Alchornea latifolia*, *Cupania dentata*, and *Guettarda elliptica*.

The size of the studied populations is variable (Martinica ca. 1,500, SBN ca. 1,000, and Zongolica ca. 200 plants/ha).

SBN was partially used (away from the sites occupied by patches of *C. luteoalbus*) for coffee and citrus plantations from the 19th century until the 1970s. In contrast, at Martinica and particularly Zongolica, deforestation was triggered by conversion of cloud forest into pasturelands that began in the second half of the 20th century.

Sample collection

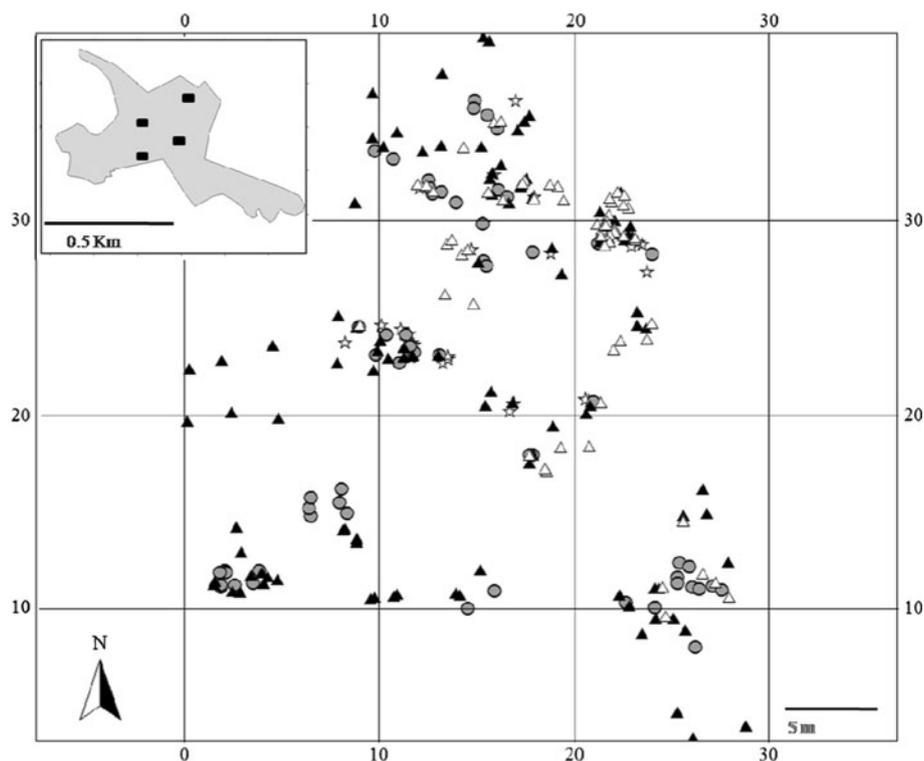
At fragment level, leaf tissue from 30 reproductive adults from each of the three fragments (SBN, Martinica, and Zongolica) was collected.

At patch level, SGS was analyzed in the largest patch within SBN (SBN-1 henceforth) containing 258 individuals in a plot of 30 m × 40 m (Fig. 1). At SBN-1 all individuals were sampled and mapped using Cartesian coordinates. Four life cycle stages were used to categorize individuals as follows: 31 recruits or seedlings (nonreproductive with only one tuberoid root), 60 juveniles (nonreproductive individuals with foliar area <25.0 cm²), 106 nonreproductive adults (nonreproductive individuals with foliar area >25.1 cm²), and 61 reproductive adults (displaying reproductive structures at least once during 2005–2007 with foliar area >25.1 cm²). No additional *C. luteoalbus* plants were observed in the immediate neighborhood of the patch. Maximum distance between individuals was 8.3 m, and spatial analysis (not shown) using the *K* statistic (Ripley 1976) after 19 Monte Carlo simulations indicated that individuals were aggregated.

Enzymatic extraction and electrophoresis

Three hundred milligrams of foliar tissue from sampled individuals (transported in ice from field and stored at –70°C) were ground in a mortar and pestle, adding 250 µl extraction buffer consisting of 0.05 mM Tris–HCl pH 7.5, 2% PVP-40, 5% sucrose, and 0.1% β-mercaptoethanol, modified from Soltis et al. (1983). Homogenized tissue embedded in wicks (2 × 20 mm) was placed in starch gels (11.5% w/v) and run in an electrophoresis chamber with constant current of 35 and 50 mA for the R (Chao-Luan et al. 1999) and PK buffer systems (Soltis et al. 1983) at

Fig. 1 Spatial distribution of *Cyclopogon luteoalbus* plants within patch SBN-1 with inset showing SBN fragment and the four patches existing inside it (full squares, the upper of them being the studied SBN-1 patch). Reproductive adults (white triangles), nonreproductive adults (black triangles), juveniles (circles), and seedlings (stars). Axes scale in meters



4°C during 9 and 7 h, respectively. Six legible loci were found in the R system: anodic peroxidase (*Apx-1*, *Apx-2*, and *Apx-3*), phosphoglucoisomerase (*Pgi*), esterase (*Est*), and acid phosphatase (*Acph*) and five in the PK system: malate dehydrogenase (*Mdh*), malic enzyme (*Me*), diaphorase (*Dia*), and glutamate oxalacetate transaminase (*Got-1* and *Got-2*). Loci and alleles were designated with ascending ordered numbers and letters, respectively, from the most anodally to the most cathodally migrating. No genotype was identical, thus clonal propagation was ruled out in the *C. luteoalbus* sampled individuals.

Genetic diversity measurements

For all fragments and SBN-1 we measured: (1) percentage of polymorphic loci (P), (2) mean number of alleles per locus (A), (3) observed mean heterozygosity (H_O), and (4) expected mean heterozygosity (H_E) (Hartl and Clark 2007). Hardy–Weinberg equilibrium for genotype frequency was tested using the Monte Carlo method (Weir 1990). Comparisons of H_O and H_E among life cycle stages and populations were done with Kruskal–Wallis nonparametric analysis of variance (ANOVA) (Zar 1999). Additionally, inbreeding coefficients (F_{IS}) were estimated for each of the life cycle stages and populations, and significant differences from 0 for each estimator were determined by chi-squared tests following Weir (1990).

Genetic structure at fragment level

Genetic variation among and within fragments was assessed with the Weir and Cockerham (1984) modified estimators of Wright (1965) F statistics. Departures from 0 for each locus were determined by chi-squared tests following Weir (1990) for F_{IS} and F_{IT} and Workman and Niswander (1970) for F_{ST} . Confidence intervals (95%) of F statistics were obtained from bootstrapping for all loci, and from jackknifing for single-locus estimates. All these analyses were done using TFGA 1.3 (Miller 1997). To test for isolation by distance, the coefficient of regression between pairwise F_{ST} values and pairwise geographical distances was calculated and compared with those obtained from 1,000 permutations of individual genotypes among fragments (Hardy and Vekemans 2002).

Evidence of recent bottlenecks

After a bottleneck, the heterozygosity expected under Hardy–Weinberg equilibrium (H_E) should be greater than that expected under mutation–drift equilibrium (H_{eq}) in more than 50% of loci (Cornuet and Luikart 1996). This hypothesis was assessed at each fragment and for each life cycle stage at SBN-1 using the BOTTLENECK program 1.2 (Cornuet and Luikart 1996).

Table 1 Genetic diversity statistics for patch SBN-1 and for three fragments in Veracruz (SBN, Martinica, and Zongolica) of *Cyclopogon luteoalbus*

	<i>N</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>F_{IS}</i>	–	+
Life cycle stage								
Seedlings	28.36	100	2.00	0.365	0.443	0.176**	3	0
Juveniles	51.18	100	2.20	0.404	0.463	0.127***	5	0
Nonreproductive adults	92.18	100	2.20	0.425	0.473	0.101***	3	2
Reproductive adults	53.18	100	2.20	0.410	0.453	0.095***	3	2
Mean	56.22	100	2.15	0.401	0.458	0.125		
SD	26.48		0.10	0.026	0.013	0.037		
Fragments								
SBN	27.70	100	2.27	0.415	0.442	0.061 ns	2	1
Martinica	26.30	100	2.00	0.509	0.461	–0.104*	1	2
Zongolica	25.30	100	2.10	0.479	0.433	–0.106*	1	2
Mean	26.43	100	2.12	0.468	0.445	–0.05		
SD	1.20		0.13	0.048	0.014	0.09		

If all loci are found in every plant, *N* will equal the number of plants, but it will decrease if some loci are missing in some individuals. Number of loci (total 11 loci) displaying significant deviations from Hardy–Weinberg equilibrium: heterozygosity deficiency (–) and heterozygosity excess (+) *N* average number of genotypes analyzed, *P* percentage of polymorphic loci, *A* number of alleles per locus, *H_O* and *H_E* mean observed and expected heterozygosity, respectively, *F_{IS}* inbreeding coefficient

Asterisks indicate the probability of χ^2 under the null hypothesis that *F_{IS}* is equal to zero (Weir 1990), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Spatial genetic structure at patch level

To analyze SGS by life cycle stage, the number of distance classes to be used for kinship analyses was obtained using Sturge's rule (Legendre and Legendre 1998). These distance intervals were chosen to maximize the number of pairs of plants (at each life cycle stage) contained in the distance interval. The chosen lags were 2 m for the first 11 classes and 25, 30, and 40 m for the last three distance classes. Pairs of seedlings were found only in 8 distance classes, while pairs of individuals of the remaining life cycle stages were found in all 14 distance classes.

The mean kinship coefficients (F_{ij}) proposed by Loiselle et al. (1995) were estimated for pairs of individuals within each of the 14 distance intervals using the program SPA-GeDI 1.3 (Hardy and Vekemans 2002). The coefficients of the regressions (b_F) between the kinship coefficients and the logarithm of the distances between paired individuals were estimated within each life cycle stage and also for all individuals in the pooled dataset. SGS is significant when the slopes of these regressions are negative and different from 0. The hypothesis that SGS is significant was tested by comparing the values of the slopes with those obtained from 1,000 permutations of individual genotypes. To allow nonstatistical assessment of differences between different studies, the S_p statistics were estimated using the formula $S_p = -b_F/(F_1 - 1)$, where F_1 is the average kinship

coefficient for the shortest distance class (Vekemans and Hardy 2004).

SGS differences between life cycle stages were made using autocorrelation coefficients (which are another measure of SGS) between geographical distance and genetic similarity using the heterogeneity test proposed by Smouse et al. (2008, GENEALEX 6.4). Significance of the between life cycle stages differences in autocorrelation coefficients within each distance class were tested with the t^2 statistic using sequential Bonferroni correction, while the significance of between life cycle stages differences in autocorrelation coefficients in the pooled dataset was tested using the multiclass test statistic ω (Peakall and Smouse 2006).

Results

Genetic diversity

At both fragment and patch level all loci were polymorphic ($P = 100\%$), with mean number of alleles per locus of 2.12 ± 0.13 and 2.15 ± 0.10 (Table 1), respectively. Genetic diversity was high with mean H_O of 0.46 ± 0.04 and 0.40 ± 0.02 at fragment and patch level, respectively (Table 1). The observed heterozygosity at fragment level was higher than expected, but at patch level the reverse was true.

Hardy–Weinberg equilibrium was found in only 2 out of 11 loci in the patch- and fragment-level analysis. At fragment level, 4 and 5 loci had deficiency and excess of heterozygotes, respectively, while at patch level these figures were 14 and 4, respectively. There were no significant differences in genetic diversity among fragments [Kruskal–Wallis tests: $H_{(2,31)} = 1.19$, $P = 0.55$ and $H_{(2,31)} = 0.21$, $P = 0.89$ for H_O and H_E , respectively]. Similarly, no significant differences were found for genetic diversity among different life cycle stages [Kruskal–Wallis tests: $H_{(3,44)} = 0.64$, $P = 0.88$ and $H_{(3,44)} = 1.06$, $P = 0.78$ for H_O and H_E , respectively].

At fragment level H_O was 0.415, 0.509, and 0.479 (SBN, Martinica, and Zongolica fragments, respectively). The average of H_O over life cycle stages at patch level was 0.401, decreasing from 0.41 in reproductive adults to 0.365 in seedlings.

At fragment level, F_{IS} was negative and different from 0 (except for at SBN, Table 1). At patch level, all F_{IS} values for life cycle stages were positive and significantly different from 0 (Table 1). The value of F_{IS} for seedlings was 1.86 times higher than that of reproductive adults, while the F_{IS} values of juveniles and nonreproductive adults were 1.34 and 1.07 times higher than that of reproductive adults (Table 1). Allele frequencies are given in Appendix 1.

Genetic structure at fragment level

CIs (95%) for the mean values of F_{IT} and F_{IS} included zero, while mean values of F_{ST} were positive and significantly different from zero, indicating that ca. 12% of genetic diversity was distributed among fragments (Table 2). The F_{ST} value between the SBN and Zongolica fragments was the highest ($F_{ST} = 0.208$), followed by the F_{ST} value between the SBN and Martinica fragments, which was two times higher than the F_{ST} value between Martinica and Zongolica ($F_{ST} = 0.128$ and 0.066, respectively). The distance between the SBN and Martinica fragments is ca. 8 km, while Martinica and Zongolica are more than 100 km apart. No isolation by distance was found: the slope ($b = 0.000013$) of the regression between paired F_{ST} values and geographic distance did not differ from that obtained from permutation test ($P = 0.67$).

Evidence of recent bottlenecks

Both within fragments and within all life cycle stages at SBN-1, most of the 11 loci analyzed had higher expected heterozygosity under Hardy–Weinberg (HW) equilibrium than under drift–mutation equilibrium (Table 3). Similar results were obtained using the infinite allele model and the stepwise mutation model.

Table 2 Wright's F statistics for three *Cyclopogon luteoalbus* populations in Veracruz cloud forest

Loci	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}
<i>Got-1</i>	0.363***	0.167*	0.235***
<i>Got-2</i>	−0.432***	−0.006 ns	−0.423***
<i>Apx-1</i>	0.331*	0.374***	−0.067 ns
<i>Apx-2</i>	0.123*	0.068 ns	0.059 ns
<i>Apx-3</i>	0.102***	−0.001 ns	0.103*
<i>Me</i>	0.388***	0.092*	0.326***
<i>Pgi</i>	0.250***	0.266***	−0.022 ns
<i>Acph</i>	−0.272***	0.054 ns	−0.344***
<i>Dia</i>	0.419***	0.249***	0.226***
<i>Mdh</i>	−0.214***	0.029 ns	−0.251***
<i>Est</i>	−0.493***	0.006 ns	−0.502***
Mean	0.068 ns	0.128*	−0.069 ns
SD	0.10	0.04	0.09
Upper limit 95% CI	0.240	0.029	0.087
Lower limit 95% CI	−0.121	0.053	−0.223

ns not significant, CIs confidence intervals

Probability of the χ^2 goodness-of-fit test with respect to Hardy–Weinberg equilibrium: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

Spatial genetic structure at patch level

Spatial genetic structure analyses indicated significant positive autocorrelation for all life cycle stages (and for the pooled data set) at the shortest distance class (Fig. 2a–e). Different life cycle stages showed different levels of relatedness at the shortest distance class, which includes the following significant kinship coefficients (F_{ij}): 0.142 ± 0.023 SE for all life cycles pooled (Fig. 2a), 0.03 ± 0.025 SE (marginally significant, $P = 0.052$, Fig. 2b) for seedlings, 0.192 ± 0.041 SE (Fig. 2c) for juveniles, 0.22 ± 0.044 SE (Fig. 2d) for nonreproductive adults, and 0.154 ± 0.027 SE (Fig. 2e) for reproductive adults. Significant slopes of the regression between the logarithm of distances and the kinship coefficients for the pooled data set ($b_F = -0.045$, $P < 0.001$), for seedlings ($b_F = -0.023$, $P < 0.05$), and for juveniles, nonreproductive adults, and reproductive adults ($b_F = -0.067$, -0.062 , and -0.059 , $P < 0.001$, respectively; Table 4) confirmed that genetic relatedness decreases with distance. The S_p value for the pooled data set was 0.053, increasing from seedlings to juveniles to reproductive adults and then decreasing slightly in nonreproductive adults ($S_p = 0.024$, 0.084, 0.08, and 0.069, respectively; Table 4), suggesting that spatial genetic structure increases with age.

The heterogeneity test was not significant after Bonferroni sequential correction for within distance–class comparisons between the life cycle stages (Appendix 2). However, the global test (ω) was significant for all

Table 3 Expected (Exp.) and observed (Obs.) values for the number of loci showing higher expected heterozygosity under HW than under drift–mutation equilibrium for the infinite allele model (IAM) and the stepwise mutation model (SMM), and *P* values for the Wilcoxon test comparing the observed and expected values

	IAM		SMM			
	Number of loci with heterozygosity excess		<i>P</i> value	Number of loci with heterozygosity excess		<i>P</i> value
	Exp.	Obs.	Wilcoxon test	Exp.	Obs.	Wilcoxon test
Life cycle stage						
Seedlings	4.67	11	0.0002	5.24	11	0.0002
Juveniles	4.60	11	0.0002	5.37	10	0.0005
Nonreproductive adults	4.39	11	0.0002	5.14	11	0.0002
Reproductive adults	4.64	11	0.0002	5.25	10	0.0007
Fragments						
SBN	4.99	11	0.0002	5.66	9	0.004
Martinica	4.27	10	0.0005	4.77	10	0.0005
Zongolica	4.38	9	0.0009	4.94	8	0.0068

Results from bottleneck analyses in SBN-1 patch, and in three fragments of *Cyclopogon luteoalbus* from cloud forest of Veracruz. Only the Wilcoxon test is reported, as all other tests used by BOTTLENECK program (sign, standardized departure, and Wilcoxon tests) gave similar results

comparisons between life cycle stages except seedlings versus reproductive adults, suggesting differences in strength for SGS (Appendix 2).

Discussion

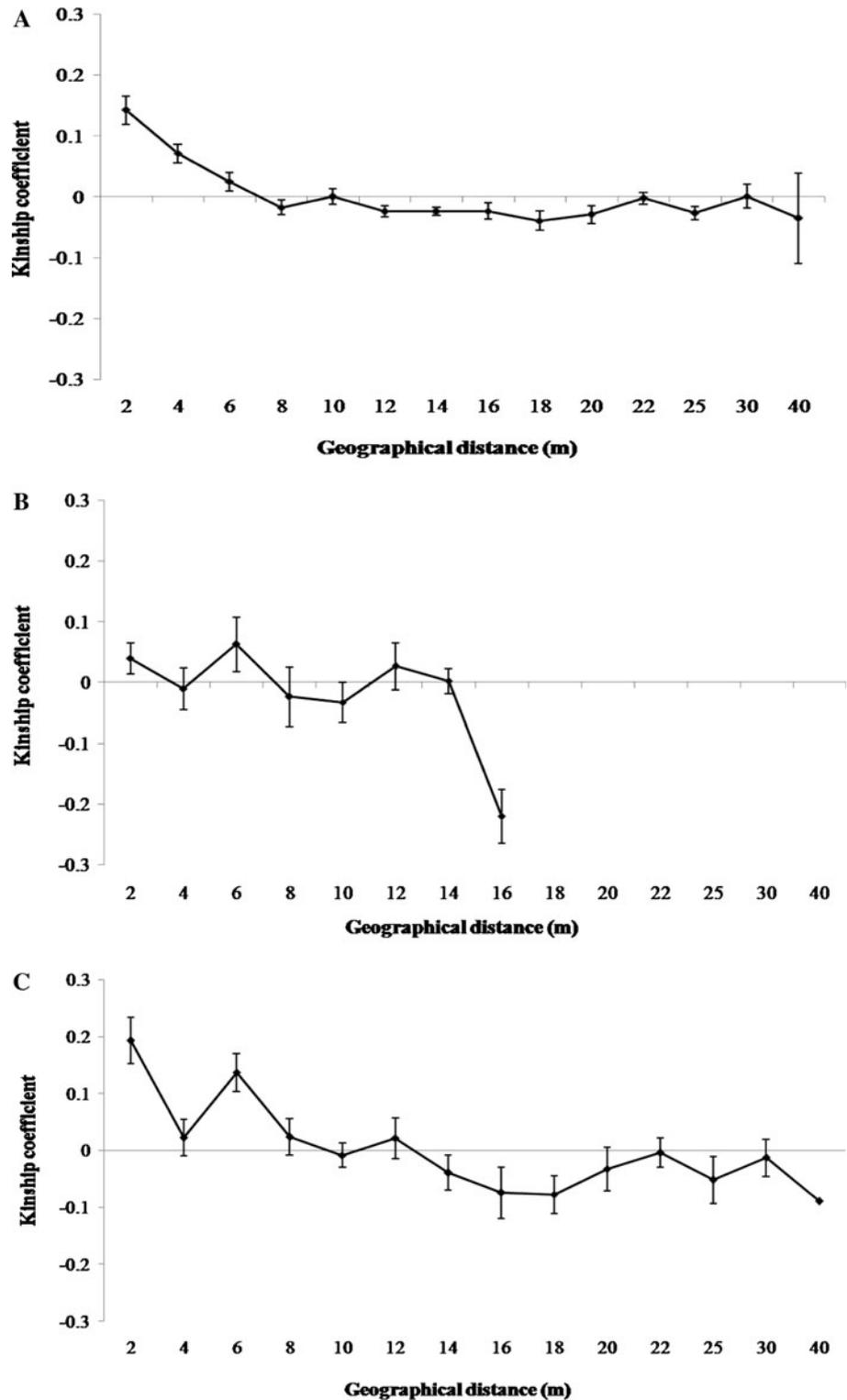
Genetic diversity

The high genetic diversity found in *C. luteoalbus* is partially explained by the fact that only polymorphic loci were considered here. Comparing the average values of H_O (0.46 and 0.40 in the fragments and at patch SBN-1) with those obtained in other studies in which only polymorphic loci were analyzed and <5 populations were studied, *C. luteoalbus* genetic diversity was higher than that observed for a narrowly distributed and obligated outcrossing orchid ($H_O = 0.33 \pm 0.02$, $N = 2$, *Pleurothallis fabiobarossii*, Borba et al. 2001), similar to a widespread and preferentially outcrossing orchid ($H_O = 0.46 \pm 0.15$, $N = 3$, *Govenia superba*, García-Cruz et al. 2009) but lower than another widespread and preferentially outcrossing orchid ($H_O = 0.52 \pm 0.18$, $N = 2$, *Govenia mutica*, García-Cruz et al. 2009), lower than that for orchids with mechanical barriers to self-pollination ($H_O = 0.61$, $N = 1$, *Bulbophyllum bidentata*, and $H_O = 0.49$, $N = 1$, *B. rupicolum*,

Azevedo et al. 2007), but higher than that for orchids where pollination by deceit prevents inbreeding ($H_O = 0.21 \pm 0.06$, $N = 5$, *Sophranitis sincorana*, Borba et al. 2007). However, some caution about these comparisons should be applied, because only polymorphic loci were analyzed and only between 36% and 55% of those found in the cited species were shared with those used in *C. luteoalbus*. High genetic diversity seems to be related with cross-pollination, and it has also been related to high outcrossing rates and floral synchrony as a result of increased gene flow via pollen (Domínguez et al. 2005; Ferrer et al. 2004), and this could be true in *C. luteoalbus*, a species with synchronous blooming and whose negative F_{IS} values indicate high outcrossing rates.

Between-fragment gene flow through pollen exchange is expected in species with a mechanism of pollination by deceit which promotes long-distance pollen flow. In food-rewarding species such as *C. luteoalbus*, pollinator foraging pattern is spatially limited as pollinators spend more time foraging within the same patch (Cozzolino and Widmer 2005). Although this foraging pattern promotes local mating and positive inbreeding coefficients at patch level (as was found in *C. luteoalbus*), the high genetic diversity and negative F_{IS} values (indicating high outcrossing rates) found at fragment level suggest that some interpatch and interfragment pollen exchange is

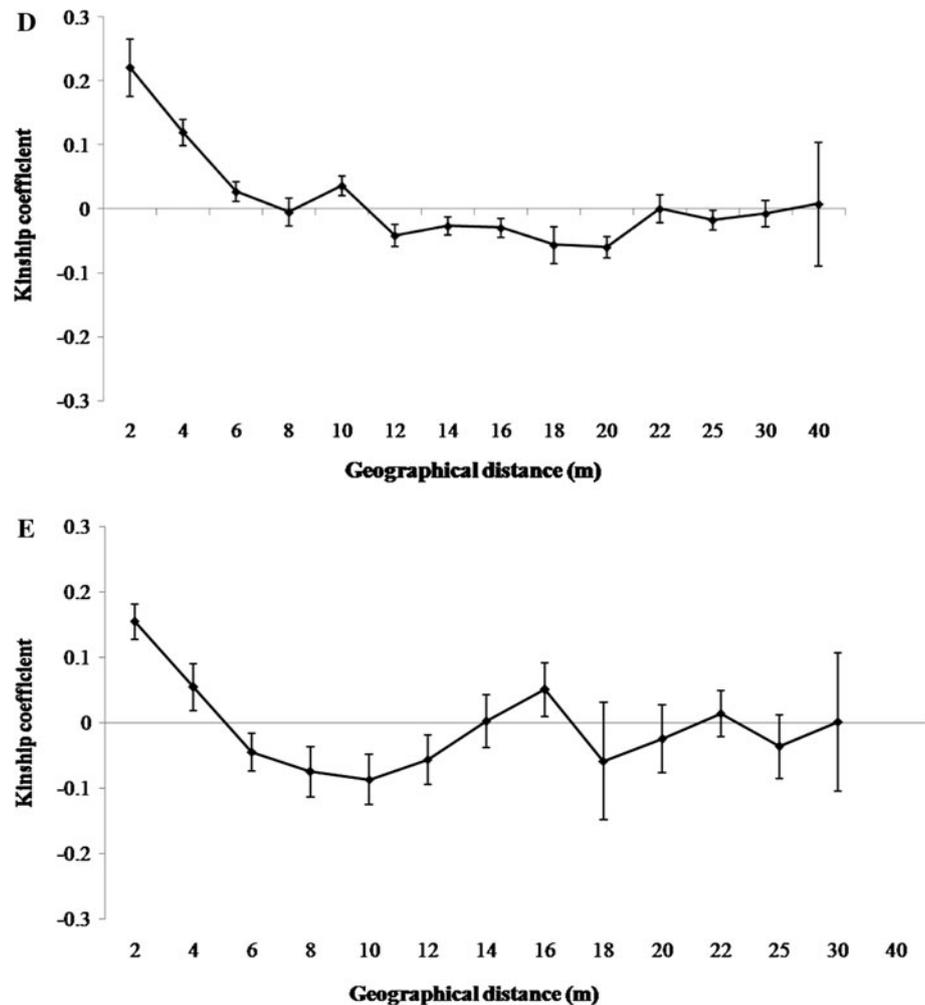
Fig. 2 Correlograms showing kinship coefficients F_{ij} and their 95% confidence intervals (vertical bars), calculated by 1,000 permutations within each distance class. Kinship coefficients for all life cycle stages pooled (a), for seedlings (b), for juveniles (c), for nonreproductive adults (d), and for reproductive adults (e). Data from *Cyclopogon luteoalbus* plants found at patch SBN-1



occurring as in other terrestrial orchids (*Caladenia tentaculata*, Peakall and Beattie 1996). Also, even if seed dispersal is leptokurtic, some between-fragment gene flow through wind-dispersed seeds (that may travel long distances) has been found (Jersakova and Malinova

2007). This is also possible in *C. luteoalbus*, as a between-fragment distance of 4.8 ± 2.7 SD km has been reported by Díaz-Toribio (2009) for 14 fragments in a $15 \text{ km} \times 15 \text{ km}$ area which included the SBN and Martinica fragments.

Fig. 2 continued



Bottleneck analyses showed evidence of recent reductions in effective population size of *C. luteoalbus* at both fragment and patch level. A decrease in genetic diversity is expected after a reduction of effective population size (Aguilar et al. 2008; Ghazoul 2005; Honnay and Jacquemyn 2007) due to random fixation and loss of alleles and consequent reduction of heterozygosity, but this would be evident in *C. luteoalbus* if monomorphic loci were also included in this analysis. Genetic diversity is also affected if the efficiency of pollinator services decreases as a consequence of fragmentation (Aguilar et al. 2008; Ghazoul 2005; Honnay and Jacquemyn 2007). In *C. luteoalbus* the effect of reduction of population size and genetic drift in the remnant fragments are counterbalanced by gene flow among them. Also, the high genetic diversity in *C. luteoalbus* could be partially due to selection favoring heterozygotes, as discussed in the next subsection.

It is interesting to note that the inbreeding coefficient F_{IS} is negative at the Martinica and Zongolica fragments (but not significant at the SBN fragment), while it is positive and significant at the SBN-1 patch (Table 1). This suggests

that within-fragment heterozygotes are favored by natural selection (Lewontin 1974; Mitton and Grant 1984) while at patch level local mating inside family groups favors a Wahlund effect.

Genetic structure at fragment level

Genetic differences between fragments were found to be moderate ($F_{ST} = 0.12 \pm 0.04$ SD). However, no evidence of isolation by distance was found. First, the F_{ST} = value for *C. luteoalbus* falls within the range of F_{ST} values for data reported for allozyme studies made in 70 orchid species (G_{ST} or F_{ST}) of 0.012–0.75 (Forrest et al. 2004). This considerable variation has been attributed to a high variability in life histories characteristics such as reproductive strategies and generation times, and to the degree of isolation (Forrest et al. 2004). Bottlenecks and isolation have been found to increase genetic structure among populations, resulting in among-population differentiation in allelic frequencies (Honnay and Jacquemyn 2007).

Table 4 Statistics of spatial genetic structure in *Cyclopogon luteoalbus* within SBN-1

Life cycle stage	F_{ij} at 2 m	b_F (slope)	S_p
Seedlings	0.039	-0.023*	0.024
Juveniles	0.192	-0.067*	0.084
Nonreproductive adults	0.220	-0.062*	0.080
Reproductive adults	0.154	-0.059*	0.069
All samples	0.142	-0.045*	0.053

The kinship coefficient (F_{ij}) between individuals in the shortest distance class, and the slope (b_F) of the regression between the kinship coefficients and the logarithm of the distances between paired individuals

* $P < 0.05$

SBN fragment, which is immersed in an urban matrix and surrounded by coffee plantations, is the more differentiated fragment, as shown by the larger F_{ST} value between this fragment and Martinica and Zongolica ($F_{ST} = 0.128$ and $F_{ST} = 0.208$, respectively). Moreover, larger portions of SBN (away from the sites where *C. luteoalbus* is present) were used for coffee and citrus plantations from the 19th century until the 1970s. In contrast, at Martinica and particularly Zongolica, deforestation began more recently (the second half of the 20th century) by the conversion of cloud forest into pasturelands.

This moderate but significant genetic differentiation suggests that, even if *C. luteoalbus* is a locally abundant species, colonization of new fragments depends on (1) specific habitat requirements (see “Species and study sites”), and (2) even if abandoned, coffee plantation physicochemical soil properties may remain unsuitable for orchid colonization as the continuous removal of understory during coffee cultivation eliminates soil surface layers. The lack of suitable sites for recruitment of *C. luteoalbus* individuals in grazing lands, urban environments, and present or past coffee plantations confined this species to settle on relatively undisturbed cloud forest fragments, which are becoming less frequent.

Despite the fragmentation process, there is still some between-fragment gene flow that hinders the development of stronger differentiation between them. This is suggested by the small F_{ST} values and by the lack of evidence of isolation by distance (i.e., there was no progressive increase of genetic differentiation with geographic distance). In this sense, it is important to note that the fragmentation process has developed unevenly in space and time and so its probable effect on F_{ST} values is by now spatially variable. Taking into account that the generational time of *C. luteoalbus* is 25 years, it can be expected that, in places where fragmentation started in the 18th or early 19th century for coffee cultivation, its current effect should be

stronger than in places that were cleared during the last decades of the 20th century to be used as pasturelands.

Spatial genetic structure at patch level

As we expected, strong spatial genetic structure was found at patch SBN-1. The S_p statistic for all life cycle stages pooled ($S_p = 0.05 \pm 0.02$ SD) was similar to that found for mixed mating species ($S_p = 0.03 \pm 0.03$ SD, $N = 7$) and herbaceous plants ($S_p = 0.04 \pm 0.06$ SD, $N = 24$) but higher than those expected for species with gravity seed dispersal and animal-dispersed pollen ($S_p = 0.02 \pm 0.01$ SD, $N = 17$ and $S_p = 0.01 \pm 0.01$ SD, $N = 6$, respectively), as reported by Vekemans and Hardy (2004).

The short distance at which SGS was detected (<6 m) falls within the range recorded for five other terrestrial orchids (range of minimal distance at which SGS equals zero in the correlograms: 5–16 m; Peakall and Beattie 1996; Chung et al. 1998, 2005; Chung et al. 2004a, b). This distance reflects the spatial structure of the family group derived from restricted seed and pollen dispersal (Sokal and Wartenberg 1983).

Inbreeding in SBN-1 ($F_{IS} = 0.12$) could be a consequence of the foraging behavior of the pollinators that promotes local mating. In *C. congestus*, the halictid bee *Pseudoaugochloropsis graminea* visits 1–4 flowers per inflorescence and 1–2 inflorescences per visit on a patch (Singer and Sazima 1999). As a similar foraging pattern was observed in bee visitors to *C. luteoalbus* (*Caenagochlora cupriventis* and *Augochlora* sp.; Juárez and Montaña, personal observation), capsules set within an inflorescence could be derived from both geitonogamous pollination and within-patch pollination. On the other hand, experimental and observational studies show that seed dispersal is highly leptokurtic in orchids, as most of the seeds are dispersed by gravity near to the mother plant (Chung et al. 2005; Jersakova and Malinova 2007). Both the pollination mechanism and the leptokurtic seed dispersal may lead to outcrossed, biparental-inbred, and self-fertilized seeds (and also to a Wahlund effect derived from within-patch breeding). All these factors may serve to explain the strong spatial genetic structure.

Four scenarios involving proximal causes such as pollen and seed dispersal have been envisaged in the literature for SGS development: (1) strong SGS and inbreeding, when dispersal of both pollen and seeds is limited (Caujapé-Castells and Pedrola-Monfort 1997; Chung et al. 2004a), (2) weak SGS without inbreeding, when dispersal of both pollen and seeds is widespread (Epperson and Allard 1984), (3) SGS without inbreeding, when pollen dispersal is random and seed dispersal limited (Hamrick and Nason 1996), and (4) SGS absent, when pollen dispersal is limited but seed dispersal is not (Chung et al. 2003a). The case of

C. luteoalbus seems to point to the first scenario where SGS is promoted by restricted pollen and seed dispersal.

SGS varies across life cycle stages because demographic processes affect each life cycle stage differently (Jacquemyn et al. 2007; Kalisz et al. 2001). If reproductive adults have strong SGS, within-patch mating will result in marked SGS in the other stages (Kalisz et al. 2001). According to Kalisz et al. (2001) the lower SGS of seedlings as compared with other life cycle stages can be due to historical contingencies, local selection, or random processes. The current reproductive cohort could have been the product of a single population founding event (that triggered a genetic bottleneck; Nei et al. 1975; Cornuet and Luikart 1996), creating a pattern of genetic structure in adults that is decaying in offspring cohorts. Microlocal environmental conditions (such as fine-scale genetic interactions of mycorrhizal associations; Taylor and Bruns 1999) may favor survival of spatial aggregates of relatives. Kalisz et al. (2001) mention that also balancing selection favoring increasing levels of heterozygosity with age could partially explain differences between offspring and adults.

Also the differences in SGS among life cycle stages suggest a differential reproductive contribution over time which is due to the fact that a different set of adults reproduce each year. In other words, each year seedlings descend from the same set of adults while juveniles and adults (recruited from different cohorts of seedlings) descend from a different set of adults, and are established close to their mother plant. Five-year demographic data of *C. luteoalbus* show that only 0.4% of adults set fruits all years while 50% set fruits only 1 out of the 5 years (7, 18, and 25% set fruit in 4, 3, and 2 out of 5 years, respectively; Juárez and Montaña, unpublished data).

Because inbreeding and the consanguinity level affect the kinship coefficient (F_{ij}) (coancestry coefficient sensu Crow and Kimura 1970), the expected values of 0.250 for full sibs and 0.125 for half-sibs under random mating (Loiselle et al. 1995) must be corrected (Weir et al. 2006). Seedlings and juveniles at SBN-1 are not originated by random mating ($F_{IS} = 0.176$ and 0.127 , respectively; Table 1), and their expected F_{ij} values are 0.213 and 0.222 assuming mating between full sibs, 0.106 and 0.111 assuming mating between half-sibs, 0.053 and 0.055 assuming mating between first cousins, and 0.027 and 0.028 assuming mating between second cousins (estimated from Crow and Kimura 1970, eqn 3.3.1, p. 69). The observed values of the mean kinship coefficient for seedlings and juveniles at 0–2 m distance class were $F_{ij} = 0.039$ and 0.192 , respectively, suggesting that recruited seedlings are most likely progeny from first or second cousins while juveniles are most likely progeny from full siblings. The kinship coefficient of seedlings is lower than that of juveniles, which suggests differential survival favoring closely related individuals.

Differences in the length of residence in each life cycle stage can contribute to between life cycle stages SGS changes: seedlings came from only one cohort and remain at this stage only 1 year, while juveniles came from at least five cohorts (minimum age of first reproduction is 5 years) and may remain more than 5 years at this stage. The accumulation of juveniles during this time interval arising from within-patch mating may reinforce the juvenile SGS, and a similar reasoning applies for adult stages.

The heterogeneity test shows that SGS of seedlings and reproductive adults do not differ (Appendix 2), most probably due to the genetic similarity between reproductive adults and their progeny and to the fact that seedlings of different mother plants are more or less evenly distributed in space because their seed shadows largely overlap inside the patch. Afterwards, the mechanisms described above may be responsible for creating the difference between SGS of seedlings and the other life cycle stages (Tonsor et al. 1993; Kalisz et al. 2001).

After fragmentation, plants from a formerly continuous population remain isolated in patches and inbreeding becomes the predominant mechanism of mating. As plants of these patches senesce and die, genetic variability is eroded and inbreeding depression may appear. Seedlings produced in these populations have a high inbreeding coefficient which decreases as life cycle develops, probably due to the expression of deleterious allele combinations at different life cycle stages or due to the negative effects of fragmentation, as Aguilar et al. (2008) suggests.

Nevertheless, the genetic viability of populations with a history of bottlenecks and isolation may not be severely affected by inbreeding because deleterious alleles in the homozygous condition are purged by natural selection (Wallace 2003).

In conclusion, this study shows the existence of spatial genetic structure inside patches, and this coincides with a scenario where gene flow via pollen and seed dispersal is restricted. Also, there are high levels of genetic diversity and moderate between-fragment genetic differentiation that points to a scenario of moderate gene flow via between-fragment pollen and seed dispersal. At patch level, local mating may result in high levels of autogamy, geitonogamy or biparental inbreeding. By contrast, all the few between-fragment matings are between unrelated plants. The negative effects of fragmentation revealed by recent bottlenecks and the high inbreeding coefficients (that decrease as the life cycle develops) may result in local extinctions at patch or even fragment level (when there are few and/or small patches in the fragment).

However, as long as pollinator services remain in an important number of fragments bearing suitable habitats, long-distance pollen and seed dispersal (even if not very frequent) will counterbalance negative effects of

fragmentation by promoting gene flow and fragment recolonization. Our information was collected in one element of the current landscape mosaic (forest fragments), but management of other elements of the mosaic (shadow coffee plantations) may put in motion another process of colonization and local extinctions. In these plantations the canopy is never removed but the understory is regularly cleared to improve coffee production. However, the vagaries of coffee prices trigger temporary abandonment of these clearing practices in periods of low prices, when coffee grains are not collected. During these periods (whose timing and duration are unpredictable, but can last for a couple of decades) *C. luteoalbus* (and many other herbaceous species) can colonize the understory and contribute to regional gene flow until the clearing practices are reestablished.

As the current structure of the fragmented landscape is sufficient to maintain adequate genetic diversity, stopping

the fragmentation process seems necessary to improve the viability of *C. luteoalbus* populations in the cloud forests of central Veracruz.

Acknowledgments This study is part of L.J.'s PhD dissertation funded by a CONACyT PhD scholarship and a CONACyT research grant to C.M. Daniel Piñero, Luis Eguiarte, Oscar Ríos, and Octavio Rojas commented on early versions of the manuscript. Jorge García, Francisco Reyes, Dánae Cabrera, and Juan Pablo Esparza helped with laboratory and field work, Phil Brewster with pictures, and Ricardo Ayala determined bee specimens. Julia Hernández helped in genetic analysis performed at the Laboratorio de Genética de Poblaciones, INECOL (Instituto de Ecología, A.C.).

Appendix 1

See Table 5.

Table 5 Allele frequency of 11 loci estimated for four life cycle stages (seedlings, juveniles, nonreproductive adults, and reproductive adults) of *Cyclopogon luteoalbus* individuals found at patch SBN-1 and at three fragments in central Veracruz (SBN, Martinica, and Zongolica)

Locus	Allele	Life cycle stage				Population		
		Seedlings	Juveniles	Nonreproductive adults	Reproductive adults	SBN	Martinica	Zongolica
<i>Got-1</i>	a	0.8462	0.8404 (–)	0.7118	0.8868	0.8519 (–)	0.5714 (–)	0.4231
	b	0.15	0.1596	0.2882	0.1132	0.1481	0.4286	0.5769
<i>Got-2</i>	a	0.4750	0.5694	0.6250	0.6759	0.6304	–	0.6786 (+)
	b	0.5250	0.4306b	0.3750	0.3241	0.3696	–	0.3214
<i>Dia</i>	a	0.6667	0.4792	0.6118 (+)	0.6977	0.2778	0.7143	0.8833
	b	0.3333	0.5208	0.3882	0.3023	0.4074	0.2857	0.1167
	c	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.3148	0.0000	0.0000
<i>Est</i>	a	0.7333	0.7203	0.6538	0.6639 (+)	0.5667	0.4833 (+)	–
	b	0.2667	0.2797	0.3462	0.3361	0.4333	0.5167	–
<i>Mdh</i>	a	0.5323	0.5000	0.5051	0.4569 (+)	0.4655 (+)	0.6667	0.5862
	b	0.4677	0.5000	0.4949	0.5431	0.5345	0.3333	0.4138
<i>Apx-1</i>	a	0.5769 (–)	0.5114 (–)	0.4247 (–)	0.4464 (–)	0.1667	0.7115	0.7353
	b	0.4231	0.4886	0.5753	0.5536	0.8333	0.2885	0.2647
<i>Apx-2</i>	a	0.6935 (–)	0.5268 (–)	0.6857 (–)	0.5492	0.8000	0.6481	0.5200
	b	0.3065	0.4732	0.3134	0.4508	0.2000	0.3519	0.4800
<i>Apx-3</i>	a	0.7097	0.5882	0.6404	0.5104 (–)	0.7321	0.6042	0.7045
	b	0.2903	0.4118	0.3596	0.4896	0.2679	0.3958	0.2955
<i>Acph</i>	a	0.6207	0.6724 (–)	0.5931	0.6356	0.6833	0.4333 (+)	0.5167 (+)
	b	0.3793	0.3276	0.4069	0.3644	0.3167	0.5667	0.4833
<i>Me</i>	a	0.7143 (–)	0.7143 (–)	0.6180 (–)	0.5700 (–)	0.5536 (–)	0.3333	0.2500 (–)
	b	0.2857	0.2245	0.3539	0.3900	0.3929	0.6667	0.7500
	c	0.0000	0.0612	0.0281	0.0400	0.0536	0.0000	0.0000
<i>Pgi</i>	a	0.5500	0.4153	0.5316 (+)	0.6548	0.6538	0.7143	0.1500
	b	0.4500	0.5508	0.4421	0.3333	0.3462	0.2813	0.7167
	c	0.0000	0.0339	0.0263	0.0119	0.0000	0.0000	0.1333

Signs in parenthesis indicate significant excess (+) or deficiency (–) of heterozygotes

Appendix 2

See Table 6.

Table 6 Single-class (r^2) and multiclass (ω) test and associated P values for the heterogeneity test of SGS between different life cycle stages of *Cyclopogon luteoalbus* at patch SBN-1 in Veracruz, Mexico

Distance class	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	ω	P
Interval (m)	0–2	2–4	4–6	6–8	8–10	10–12	12–14	14–16	16–18	18–20	20–22	22–25	25–30	30–40		
Life cycle stages pairs																
Seedlings versus juveniles																
r^2	11.14	1.71	2.35	9.64	2.23	2.60	1.72	1.31	2.48	1.52	3.75	1.67	11.14	1.71	70.51	0.01
P	0.01	0.19	0.12	0.01	0.15	0.11	0.23	0.29	0.12	0.08	0.01	0.05	0.01	0.19		
Seedlings versus reproductive adults																
r^2	8.55	4.36	0.05	1.22	1.65	0.26	0.05	5.50	2.64	0.82	0.35	0.81	8.55	4.36	37.76	0.06
P	0.01	0.02	0.85	0.24	0.22	0.67	0.78	0.04	0.12	0.77	0.98	0.87	0.01	0.02		
Seedlings versus nonreproductive adults																
r^2	4.08	0.17	2.91	1.16	4.29	0.15	1.81	6.55	1.69	0.84	2.07	0.27	4.08	0.17	41.76	0.02
P	0.05	0.68	0.10	0.32	0.04	0.71	0.22	0.03	0.17	0.55	0.14	0.94	0.05	0.68		
Juveniles versus reproductive adults																
r^2	0.61	1.08	10.52	5.97	0.12	3.07	3.62	11.02	0.17	1.31	8.49	1.94	0.61	1.08	62.38	0.01
P	0.40	0.35	0.01	0.01	0.78	0.09	0.06	0.01	0.68	0.31	0.01	0.15	0.40	0.35		
Juveniles versus nonreproductive adults																
r^2	4.05	2.02	25.82	20.47	20.29	6.25	12.33	14.35	0.41	0.90	0.60	3.08	4.05	2.02	73.57	0.01
P	0.04	0.18	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.45	0.34	0.47	0.09	0.04	0.18		
Reproductive adults versus nonreproductive adults																
r^2	3.15	9.77	8.88	7.64	22.80	1.82	6.88	1.53	0.65	0.00	1.96	1.37	3.15	9.77	65.50	0.01
P	0.07	0.01	0.02	0.01	0.01	0.20	0.02	0.22	0.37	0.90	0.16	0.27	0.07	0.01		

ω values in bold are significant at $P < 0.05$. P values of r^2 must be compared with $0.0035 = 0.05/14$, which is the Bonferroni-corrected significance level (equivalent with 0.05 for only one comparison) for comparison within each of the 14 distance classes

References

- Aguilar R, Quesada M, Ashworth L, Herrerias-Diego Y, Lobo J (2008) Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Mol Ecol* 17(24):5177–5188
- Álvarez-Buylla ER, Chaos Á, Piñero D, Garay AA (1996) Demographic genetics of a pioneer tropical tree species: patch dynamics, seed dispersal, and seed banks. *Evolution* 50:1155–1166
- Azevedo MTA, Borba EL, Semir JO, Solferini VN (2007) High genetic variability in neotropical myophilous orchids. *Bot J Linn Soc* 153(1):33–40
- Borba E, Felix J, Solferini V, Semir J (2001) Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: Evidence from isozyme markers. *Am J Bot* 88(3):419–428
- Borba EL, Funch RR, Ribeiro PL, Smidt EC, Silva-Pereira V (2007) Demography, and genetic and morphological variability of the endangered *Sophranitis sincorana* (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, Brazil. *Plant Syst Evol* 267(1):129–146
- Caujapé-Castells J, Pedrola-Monfort J (1997) Space-time patterns of genetic structure within a stand of *Androcymbium gramineum* (Cav.) McBride (Colchicaceae). *Heredity* 79(4):341–349
- Challenger A (1998) Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. CONABIO, México
- Chao-Luan L, Wang Q, Jiang S, Ge S, Wang K (1999) Genetic diversity of allozymes in populations of *Cycas panzhihuaensis* l. Zhou & sy. Yang. In: Paper presented at the biology and conservation of cycads—proceedings of the 4th international conference on cycad biology, Sichuan, Beijing
- Chung MY, Chung GM, Chung MG, Epperson B (1998) Spatial genetic structure in populations of *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae). *Genes Genet Syst* 73(5):281–285
- Chung MY, Nason JD, Epperson BK, Chung MG (2003a) Temporal aspects of the fine-scale genetic structure in a population of *Cinnamomum insularimontanum* (Lauraceae). *Heredity* 90(1):98–106
- Chung MY, Nason JD, Chung MG (2004a) Spatial genetic structure in populations of the terrestrial orchid *Cephalanthera longibracteata* (Orchidaceae). *Am J Bot* 91(1):52–57
- Chung MY, Nason JD, Chung MG (2004b) Implications of clonal structure for effective population size and genetic drift in a rare terrestrial orchid *Cremastra appendiculata*. *Conserv Biol* 18:1515–1524
- Chung MY, Nason JD, Chung MG (2005) Spatial genetic structure in populations of the terrestrial orchid *Orchis cyclochila* (Orchidaceae). *Plant Syst Evol* 254(3):209–219
- Cornuet J, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144(4):2001–2014

- Cozzolino S, Widmer A (2005) Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends Ecol Evol* 20(9):487–494
- Crow JF, Kimura M (1970) An introduction to population genetics theory. Harper & Row, NY
- Díaz-Toribio M (2009) Orquídeas terrestres como indicadoras de calidad ambiental en fragmentos de bosque mesófilo de montaña. Master Thesis. INECOL, Veracruz, Mexico
- Domínguez C, Abarca C, Eguiarte L, Molina-Freaner F (2005) Local genetic differentiation among populations of the mass-flowering tropical shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *New Phytol* 166(2):663–672
- Dressler RL (1993) Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides, Portland
- Epperson BK (1993) Recent advances in correlation analysis of spatial patterns of genetic variation. *Evol Biol* 27:95–155
- Epperson BK, Allard RW (1984) Allozyme analysis of the mating system in lodgepole pine populations. *J Hered* 75(3):212–214
- Fahrig L (2003) Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annu Rev Ecol Syst* 34:487–515
- Fenster CB, Vekemans X, Hardy OJ (2003) Quantifying gene flow from spatial genetic structure data in a metapopulation of *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). *Evolution* 57(5):995–1007
- Ferrer MM, Eguiarte LE, Montaña C (2004) Genetic structure and outcrossing rates in *Flourensia cernua* (Asteraceae) growing at different densities in the south-western Chihuahuan desert. *Ann Bot* 94(3):419–426
- Forrest AD, Hollingsworth ML, Hollingsworth PM, Sydes C, Bateman RM (2004) Population genetic structure in European populations of *Spiranthes romanoffiana* set in the context of other genetic studies on orchids. *Heredity* 92:218–227
- García-Cruz J, González-Astorga J, Sosa V, Hernández-González O (2009) Genetic diversity in six *Govenia* (Orchidaceae) species with different pollinator attraction strategies. *Int J Plant Sci* 170(7):894–905
- Ghazoul J (2005) Pollen and seed dispersal among dispersed plants. *Biol Rev* 80(3):413–443
- Hamrick JL, Godt MJW (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philos Trans R Soc Lond B* 351(1345):1291–1298
- Hamrick JL, Nason JD (1996) Consequences of dispersal in plants. In: Rhodes OE, Chesser RK, Smith MH (eds) *Population dynamics in ecological space and time*. University of Chicago Press, Chicago, pp 203–236
- Hamrick JL, Murawski DA, Nason JD (1993) The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. *Plant Ecol* 107(1):281–297
- Hardy OJ, Vekemans X (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol Ecol* 2:618–620
- Hartl DL, Clark AG (2007) *Principles of population genetics*, 4th edn. Sinauer Associates, Sunderland
- Honnay O, Jacquemyn H (2007) Susceptibility of common and rare plant species to the genetic consequences of habitat fragmentation. *Conserv Biol* 21(3):823–831
- IUCN/SSC Orchid Specialist Group (1996) *Orchid status survey and conservation action plan*. World Conservation Union, New York
- Jacquemyn H, Brys R, Vandepitte K, Honnay O, Roldán-Ruiz I (2006) Fine-scale genetic structure of life history stages in the food-deceptive orchid *Orchis purpurea*. *Mol Ecol* 15(10):2801–2808
- Jacquemyn H, Brys R, Vandepitte K, Honnay O, Roldán-Ruiz I, Wiegand T (2007) A spatially explicit analysis of seedling recruitment in the terrestrial orchid *Orchis purpurea*. *New Phytol* 176(2):448–459
- Jersakova J, Malinova T (2007) Spatial aspects of seed dispersal and seedling recruitment in orchids. *New Phytol* 176(2):237–241
- Kalisz S, Nason JD, Hanzawa FM, Tonsor SJ (2001) Spatial population genetic structure in *Trillium grandiflorum*: The roles of dispersal, mating, history, and selection. *Evolution* 55(8):1560–1568
- Legendre P, Legendre L (1998) *Numerical ecology*, 2nd edn. Elsevier, Amsterdam
- Lewontin RC (1974) *The genetic basis of evolutionary change*. Columbia University Press, NY
- Loiselle BA, Sork VL, Nason J, Graham C (1995) Spatial genetic structure of a tropical understory shrub *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *Am J Bot* 82:1420–1425
- Loveless MD, Hamrick JL (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annu Rev Ecol Syst* 15(1):65–95
- Machon N, Bardin P, Mazer SJ, Moret J, Godelle B, Austerlitz F (2003) Relationship between genetic structure and seed and pollen dispersal in the endangered orchid *Spiranthes spiralis*. *New Phytol* 157(3):677–687
- Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends Ecol Evol* 18(4):189–197
- Miller MP (1997) Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: a windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data (computer software distributed by the author)
- Mitton JB, Grant MC (1984) Associations among protein heterozygosity, growth rate, and developmental homeostasis. *Ann Rev Ecol Syst* 15:479–499
- Muñoz-Villers LE, López-Blanco J (2008) Land use/cover changes using landsat tm/etm images in a tropical and biodiverse mountainous area of central-eastern Mexico. *Int J Remote Sens* 29(1):71–93
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29:1–10
- Peakall ROD, Beattie AJ (1996) Ecological and genetic consequences of pollination by sexual deception in the orchid *Caladenia tentaculata*. *Evolution* 50(6):2207–2220
- Peakall ROD, Smouse PE (2006) Genalex 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6(1):288–295
- Rasmussen HN (1995) *Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press, UK
- Ripley BD (1976) The second-order analysis of stationary point processes. *J Appl Probab* 13:255–266
- Rzedowski J (1978) *La Vegetación de México*. Limusa, Mexico City
- Singer RB, Sazima M (1999) The pollination mechanism in the ‘*Pelexia* alliance’ (Orchidaceae: Spiranthinae). *Bot J Linn Soc* 131(3):249–262
- Smouse PE, Peakall R, Gonzales E (2008) A heterogeneity test for fine scale genetic structure. *Mol Ecol* 17(14):3389–3400
- Sokal RR, Wartenberg DE (1983) A test of spatial autocorrelation analysis using an isolation-by-distance model. *Genetics* 105(1):219–237
- Soltis DE, Haufler CH, Darrow DC, Gastony GJ (1983) Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *Am Fern J* 73:9–27
- Sun M, Wong KC (2001) Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme marker. *Am J Bot* 88(12):2180–2188
- Taylor DL, Bruns TD (1999) Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the ‘cheating’ orchids *Corallorhiza maculata* and *C. mertensiana*. *Mol Ecol* 8:1719–1732
- Tonsor SJ, Kalisz S, Fisher J (1993) A life-history based study of population structure: seed bank to adults in *Plantago lanceolata*. *Evolution* 47:833–843
- Van Rossum F, Triest L (2006) Fine-scale genetic structure of the common *Primula elatior* (Primulaceae) at an early stage of population fragmentation. *Am J Bot* 93(9):1281–1288

- Vekemans X, Hardy OJ (2004) New insights of fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. 13:921–935
- Wallace LE (2003) The cost of inbreeding in *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae). *Am J Bot* 9(2):235–242
- Weir BS (1990) Genetic data analysis: methods for discrete population analysis. Sinauer Associates, Sunderland
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38(6):1358–1370
- Weir BS, Anderson AD, Hepler AB (2006) Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges. *Nat Rev Genet* 7:771–780
- Workman PL, Niswander JD (1970) Population studies on southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. *Am J Hum Genet* 22(1):24–29
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28(2):114–138
- Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19:395–420
- Zar J (1999) Biostatistical analysis. Prentice-Hall, Upper Saddle River

CAPÍTULO IV

Discusión General y Conclusiones

El bosque de niebla es uno de los ecosistemas más amenazados a nivel mundial. Algunas de las causas de esta amenaza están relacionadas con su estrecha distribución geográfica, su alta biodiversidad por unidad de área y los servicios ambientales que proporciona (Bubb *et al.* 2004; Martínez, *et al.* 2009; Ponce-Reyes, *et al.* 2012). En México, casi la totalidad del bosque de niebla se encuentra excluida de las áreas legalmente protegidas y una de las principales amenazas a su persistencia en la región central de Veracruz es la urbanización y fragmentación (Muñoz-Villers y López-Blanco, 2008; CONABIO, 2010).

Una consecuencia directa de la fragmentación es la creación de un mayor número de fragmentos cada vez más aislados, lo cual repercute tanto en los procesos ecológicos como evolutivos que se dan en estos fragmentos. Por ejemplo, se interrumpen los procesos funcionales que el bosque de niebla tiene como ecosistema (i.e. en la dinámica hidrológica, disminuye la cantidad y calidad del agua, Holwerda, *et al.* 2010; Martínez, *et al.* 2009); también se presenta una disminución en la biodiversidad que altera la estructura y las interacciones biológicas (i.e. la pérdida de grupos funcionales tiene implicaciones demográficas en las poblaciones y en la dinámica de regeneración del bosque, Terborgh *et al.* 2008). A nivel poblacional, la fragmentación aumenta el grado de aislamiento entre las poblaciones, lo que implica un menor éxito reproductivo al quedar restringido el movimiento de los polinizadores y dispersores, y por lo tanto, el flujo génico (Young, *et al.* 1996; Aguirre y Dirzo, 2008; Newman, *et al.* 2013). También se disminuyen los tamaños poblacionales y con ello, aumenta la probabilidad de extinción por azar (i.e. estocasticidad demográfica y genética), de endogamia en la progenie y la deriva génica (Young, *et al.* 1996; Aguilar, *et al.* 2008). Todos estos factores promueven la pérdida de la variación genética, lo que implica una menor capacidad de adaptación a las nuevas condiciones ambientales (Frankham, 2005; Pertoldi, *et al.* 2007).

En un paisaje dominado por pastizales, cultivos de café y zonas urbanas, los fragmentos de bosque de niebla podrían representar sitios que a largo plazo no aseguren la viabilidad de las poblaciones locales. Las orquídeas terrestres que aún persisten en estos fragmentos podrían quedar expuestas a los efectos negativos de la fragmentación, por lo que es importante evaluar el estado demográfico y genético de sus poblaciones. Específicamente, al determinar cuál es la tasa de crecimiento poblacional, será posible estimar cuál es el tiempo de persistencia de la población a lo largo del tiempo, y conocer los procesos demográficos que tienen mayor influencia sobre la dinámica poblacional, lo que puede ayudar a diseñar estrategias de conservación. Asimismo, desde un enfoque de genética de poblaciones, describir la estructura genética dentro y entre las poblaciones, así como al interior de una población, considerando aspectos demográficos (estructura de tamaños), permitirá identificar los factores ecológicos y evolutivos que producen dicha estructura, así como sus niveles de variación genética.

El análisis demográfico de *C. luteo-albus* mostró que en un periodo de cinco años, las tasas de crecimiento poblacionales anuales sugieren que las poblaciones se encuentran en decremento numérico, y que la supervivencia y el crecimiento fueron los procesos demográficos que tuvieron la mayor contribución a λ . Esta información permitió proyectar que ambas poblaciones de estudio estarán cerca de la extinción en un plazo de ~100 años. No obstante dicho panorama demográfico, las poblaciones de *C. luteo-albus* mostraron una alta variación genética y moderada diferenciación entre poblaciones, lo que sugiere que a pesar de la situación fragmentada del bosque de niebla, las poblaciones de *C. luteo-albus* mantiene niveles de variación genética que no ponen en riesgo su potencial evolutivo (Chung y Chung, 1999). Por lo tanto, los factores demográficos aparentemente son de importancia más inmediata para la persistencia de sus poblaciones (Lande, 1988). Al interior de la población SBN, el análisis genético permitió confirmar que existe una estructura genética a escala fina en la población

debido a una dispersión restringida de semillas y polen, un patrón que al parecer es común en orquídeas terrestres (Chung, *et al.* 2011). Sin embargo, si la fragmentación del bosque de niebla reduce la disponibilidad de los polinizadores o la cantidad de apareamientos al azar, tal como se ha registrado en selvas tropicales, las poblaciones presentarán un efecto fuerte al asilamiento y pérdida del hábitat incrementando las tasas de autofecundación y los niveles de endogamia con consecuencias adversas para la diversidad genética (Aguilar, *et al.* 2008; Aguirre y Dirzo, 2008; Chung, *et al.* 2011).

La información demográfica generada a partir de modelos matriciales se debe interpretar tomando en cuenta los supuestos del análisis, en los que las tasas vitales se mantienen constantes en el tiempo. Por tanto, sería importante analizar otros modelos con la finalidad de comparar distintos supuestos, tales como, la posibilidad de regulación dependiente de la densidad, lo cual representa un escenario más realista en especies con altas densidades poblacionales (Álvarez-Buylla *et al.* 1996). Para probar si existen procesos de regulación dependientes de la densidad en la especie de estudio, se podría analizar si hay un efecto de la densidad de las plantas reproductivas (Meléndez-Ackerman y Ackerman, 2001) sobre el número de plántulas reclutadas. Esta información sería relevante en el contexto de historias de vida de *C. luteo-albus* y también para incorporarla en los modelos de simulaciones con fines de manejo, reintroducción y/o restauración ecológica, lo que permitiría definir tanto la categoría de tamaño como el número de individuos a utilizarse en dichos programas.

La escasa variabilidad demográfica de las poblaciones a lo largo del tiempo, sugiere que, para la intensidad de variación ambiental registrada (media = 1,327 mm de precipitación, intervalo 1197-1440, para el periodo 2005-2009), no hay un efecto en la variación demográfica

de las poblaciones, al contrario de lo que ocurre en ambientes áridos donde la variación ambiental está determinada por los pulsos de lluvia.

Si consideramos que el bosque de niebla de la región central de Veracruz se seguirá fragmentado a través del tiempo, se espera que algunos fragmentos de bosque de niebla queden más aislados entre sí y con una mayor exposición al efecto de borde (Ponce-Reyes, *et al.* 2012). Desde una perspectiva de ecología de comunidades, esto significaría que se favorecería la presencia de especies de sucesión secundaria de rápido crecimiento, demandantes de luz, con mecanismos de dispersión por viento, generalistas en cuanto a sus polinizadores, incluso podrían verse favorecidas especies invasoras. Por otro lado, las orquídeas del sotobosque (como *C. luteo-albus*), que generalmente se establecen en el interior del bosque, requieren de condiciones de alta humedad, de la presencia de las micorrizas y frecuentemente son de lento crecimiento, por lo que podrían quedar restringidas a los fragmentos remanentes y sus poblaciones probablemente ya no serán viables al quedar cada vez más aisladas en fragmentos más pequeños y con mayor exposición al efecto de borde (Ramussen, 1995; Jules, 1998).

La exploración de la amplitud ecológica de *C. luteo-albus*, complementada con estudios de plasticidad fenotípica ayudaría a conocer a qué nuevas condiciones podría adaptarse esta especie (Nicotra *et al.* 2010). Respecto a la información genética, dada la moderada pero significativa estructura genética de *C. luteo-albus* entre poblaciones, es recomendable realizar análisis directos de flujo génico, tales como los análisis de dispersión de polen (con polvos fluorescentes o tasa de remoción de polinarios) y semillas (medios de cultivo en cajas de Petri dispuestas a distintas distancias de la planta madre, Machon *et al.* 2003). Si *C. luteo-albus* es una especie que a pesar de su alta dispersión de semillas y/o polen, es vulnerable a un incremento en la endogamia, los esfuerzos de conservación se deberían enfocar a mantener la conectividad y el

flujo génico entre los fragmentos (Suárez-Montes, *et al.* 2010). Asimismo, sería importante realizar estudios genéticos con otros marcadores moleculares, lo que permitiría analizar de manera más fina el polimorfismo, pues la información generada en este estudio sólo analiza una porción mínima del genoma y podría estar sobrestimando la diversidad genética. Los estudios de paternidad/parentesco, permitirían hacer inferencias sobre el flujo génico actual y el tamaño efectivo poblacional, y además permitirían probar si el micrositio alrededor de la planta madre restringe la dispersión de su progeñe, o bien, si este sitio constituye un “sitio seguro” para la misma (Jacquemyn *et al.* 2007). El uso de otros marcadores moleculares y de un mayor número de loci también permitirá analizar si la especie de estudio ha pasado por cuellos de botella, y evaluar de forma directa el efecto de la fragmentación, si se incrementara el número de poblaciones analizadas y se compararan entre ambientes, e.g. continuo vs. fragmentado (Suárez-Montes, *et al.* 2010).

Dado que los análisis demográficos sugieren que las poblacionales de *C. luteo-albus* están en decremento numérico, sería importante que los programas de conservación estuvieran dirigidos a la protección y/o mantener tamaños poblacionales grandes que permitan mantener su viabilidad. Los estudios que incorporan simultáneamente datos demográficos y genéticos en poblaciones de hierbas perennes han mostrado que aún con tasas de crecimiento estables o en crecimiento, las poblaciones pequeñas son vulnerables a la extinción debido a los efectos genéticos, como la depresión por endogamia o la deriva génica (Oostermeijer, 2000; Picó y Quintana-Asencio, 2005).

Dado que en la región central de Veracruz la principal amenaza al bosque de niebla es la fragmentación, probablemente los esfuerzos de conservación deban reforzarse con proyectos que promuevan la conectividad entre dichos fragmentos. Esto sería posible, por ejemplo, a través de

proyectos de restauración ecológica del bosque de niebla, por ejemplo con técnicas de nucleación; es un conjunto de técnicas tales como, trasposición de suelos, lluvia de semillas, creación de perchas artificiales, que promueven la regeneración vegetal natural y la conectividad entre fragmentos. Tiene como objetivo acelerar los procesos ecológicos, tales como regeneración vegetal y los mecanismos de polinización entre fragmentos, así como mantener la diversidad y estructura del sistema (Reis, *et al.* 2003; SER, 2005). En este sentido, *C. luteo-albus*, podría ser un buen candidato para este tipo de proyectos, ya que presenta interacciones múltiples tales como asociaciones micorrícicas e interacciones con polinizadores, por lo que su presencia contribuye a la diversidad del bosque de niebla.

Se espera que este trabajo forme parte de los estudios pioneros a largo plazo de poblaciones de orquídeas en México, ya que sólo existe un estudio donde se tienen más de 5 años de datos demográficos (Hernández-Apolinar, en preparación). Por ésta razón, se sugiere continuar con el estudio a largo plazo en las poblaciones ya monitoreadas, lo que permitiría detectar variación ambiental, por ejemplo, conocer si hay años con condiciones ambientales que favorezcan aspectos demográficos como un mayor reclutamiento, así como explorar si las poblaciones están sujetas a mecanismos de regulación dependiente de la densidad, lo que podría explicar las diferencias entre las poblaciones de *C. luteo-albus*.

Perspectivas:

Los resultados de esta investigación representan una primera aproximación al estudio de la ecología de esta orquídea terrestre que; si bien los resultados no son concluyentes, son los primeros estudios en México que incluyen simultáneamente aspectos demográficos y de genética

de poblaciones para una especie de este tipo. No obstante, para que este estudio sea la base para desarrollar un programa de conservación más extenso, debe incorporar un análisis más detallado sobre los siguientes aspectos:

- a) Aumentar el número de poblaciones de colecta genética con la finalidad de determinar aspectos sobre aislamiento por distancia y estructura genética poblacional. Asimismo, aumentar el número de estudios demográficos en distintos fragmentos de bosque de niebla de la región con la finalidad de detectar la posible respuesta de los procesos demográficos a la variación espacial.
- b) Probar si los procesos de regulación dependientes de la densidad en las plantas reproductivas tienen un efecto sobre el número de plántulas reclutadas (i.e. a mayor densidad de plantas reproductivas menor reclutamiento, Meléndez-Ackerman y Ackerman, 2001).
- c) Enriquecer la información sobre la historia de vida de *C. luteo-albus*, incluyendo aspectos tales como, el sistema reproductivo, a través de experimentos que incluyan polinización artificial (tratamientos: autopolinización, geitonogamia, apomixis, exogamia, control).
- d) Implementación de programas de manejo del hábitat a través de técnicas de restauración ecológica en fragmentos de bosque de niebla, con la finalidad de fomentar la conectividad entre los fragmentos inmersos en la matriz del paisaje.

Conclusiones

La orquídea terrestre *C. luteo-albus*, tiene un ciclo de vida complejo: éste incluye dos etapas principales, la etapa fotosintética, donde la planta produce hojas y, la etapa latente, que ocurre cuando las plantas no tienen hojas pero permanece viva su raíz.

En el Capítulo II se planteó determinar los procesos demográficos que más influencia tienen sobre la tasa finita de crecimiento poblacional de dos poblaciones de *C. luteo-albus*.

Al considerar la etapa de latencia como un proceso demográfico, se comprobó que su aporte relativo a la tasa de crecimiento poblacional es prácticamente imperceptible. Al igual que en otras plantas del sotobosque y de larga vida, el proceso demográfico principal fue la supervivencia, el cual se considera un mecanismo de persistencia poblacional en la especie de estudio.

El análisis matricial sugiere que las poblaciones de *C. luteo-albus* están decreciendo a pesar de la alta supervivencia de adultos, a partir de lo cual se propone que esta etapa del ciclo de vida se debe priorizar, ya que una vez que las plantas llegan a adultas disminuyen las tasas de mortalidad. Asimismo, el análisis de probabilidad de extinción en cada población, mostró un panorama donde ambas poblaciones reducirán sus tamaños poblacionales al 10%; es decir, a un nivel de cuasi-extinción, en menos de 100 años.

En el Capítulo III se discuten aspectos sobre la genética de poblaciones de tres poblaciones de *C. luteo-albus*. Se concluyó que las poblaciones albergan una alta diversidad genética y existe una moderada diferenciación entre ellas. Este resultado difiere de lo que se esperaba, dadas la historia de fragmentación del bosque de niebla de la región central de

Veracruz. Esto demuestra, por un lado, que la matriz actual de fragmentos de bosque de niebla, pastizales, cafetales y zona urbana, no han constituido hasta la fecha un obstáculo suficiente para interrumpir el flujo génico entre las poblaciones de *C. luteo-albus*. Sin embargo, el estudio genético a escala fina, brinda evidencia de que la dispersión de semillas y polen es restringida (<6m) y que la endogamia se manifiesta en todas las etapas del ciclo de vida.

Algunos rasgos de las historias de vida de *C. luteo-albus* se comparten con otras orquídeas terrestres:

- 1) Los sitios de reclutamiento cerca de la planta madre, o “sitios seguros”, permiten la germinación y reclutamiento de las plántulas a través de las asociaciones micorrízicas.
- 2) La dispersión del polen es restringida debido a que las abejas Halictidae, en el caso de *C. luteo-albus*, forrajean dentro del mismo parche y probablemente se promueva la geitonogamia.
- 3) La endogamia detectada en la progenie en la población del SBN-1 podría ser una consecuencia de los apareamientos locales (debido al patrón de forrajeo de los polinizadores), muy posiblemente se ve magnificada por efecto de la fragmentación (Aguilar, *et al.* 2008). Esto es de gran relevancia porque, aunque las poblaciones de *C. luteo-albus* albergan una alta diversidad genética, el estudio demográfico sugiere que éstas se encuentran en declive.

Dado que los fragmentos de vegetación se vuelven cada vez más pequeños y aislados en la región central de Veracruz, es relevante resaltar la importancia de los programas de conservación que consideran la dinámica ecológica y evolutiva de especies de interés. Los análisis de estructura genética a escala fina y los estudios demográficos de *C. luteo-albus* pueden ser una herramienta importante para determinar las escalas de las unidades de conservación que permitan mantener los procesos genéticos y demográficos, así como proponer pautas para la

conservación de procesos ecológicos, como las interacciones bióticas y así asegurar la provisión de los servicios ecosistémicos (i.e. polinización) que llevan a cabo estos bosques.

Literatura Citada

Aguirre, A., R. Dirzo. 2008. Effects of fragmentation on pollinator abundance and fruit set of an abundant understory palm in a Mexican tropical forest. *Conservation Biology* 141: 375–384.

Frankham, 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation* 126: 131- 140.

Arriaga, L. 2000. Types and causes of tree mortality in a montane cloud forest of Tamaulipas, Mexico. *Journal of Tropical Ecology* 16: 623-636.

Bowles, M., L. Zettler, T. Bell, P. Kelsey. 2005 Relationships between soil characteristics, distribution and restoration potential of the federal threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nutt.) Lindl. *The American Midland Naturalist* 154: 273-285.

Bubb, P., May, I., Miles, L., Sayer, J., 2004. *Cloud Forest Agenda*. UNEP-WCMC, Cambridge, UK. http://unep-wcm.or/resources/publications/UNEP_WCMC_bio_serires/20.htm.

Chung, MY., JD. Nason, M.G. Chung. 2011. Significant demographic and fine-scale genetic structure in expanding and senescing populations of the terrestrial orchid *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) *American Journal of Botany* 98: 2027-2039.

Chung MY., MG. Chung, 1999. Allozyme diversity and population structure in Korean populations of *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) *Journal of plant research* 112: 139-144.

CONABIO, 2010. El bosque mesófilo de montaña en México: Amenazas y oportunidades para su conservación y manejo sostenible. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F., México.

Holwerda, F.L., A. Bruijnzeel, L.E. Muñoz-Villers, M. Equihua, H. Asbjorsen. 2010. Rainfall and cloud water interception in mature and secondary lower montane cloud forest of central Veracruz, Mexico. *Journal of Hydrology* 384: 84-96.

Frankham, R. 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation* 126: 131-140.

- Jules, E.S. 1998. Habitat fragmentation and demographic changes in a common plant: *Trillium* in old-growth forest. *Ecology* 79:1645-1656.
- Martínez, M.L., O. Pérez-Maqueo, G. Vázquez, G. Castollo-Campos, J. García-Franco, K. Mehtreter, M. Equihua, R. Langrave. 2009. Effect of land use change on biodiversity and ecosystem services in tropical montane cloud forest of Mexico. *Forest Ecology and management* 258: 1856-1863.
- Meléndez-Ackerman E. J. and J. D. Ackerman. 2001. Density-dependent variation in breeding system and reproductive success in a terrestrial orchid. *Plant Systematics and Evolution* 227:27-36.
- Machon, N., P. Bardin, S.J. Mazer, J. Moret, B. Godelle, F. Austerlitz. 2003. Relationship between genetic structure and seed and pollen dispersal in the endangered orchid. *New Phytologist* 3: 677-687.
- Muñoz-Villers L.E., J. López-Blanco. 2008. Land use/cover changes using landsat tm/etm images in a tropical and biodiverse mountainous area of central-eastern Mexico. *International Journal of Remote Senses* 29:71-93.
- Newman, B.J., P. Ladd, M. Brundrett, K.W. Dixon. 2013. Effects of habitat fragmentation on plant reproductive success and population viability at the landscape and habitat scale. *Biological Conservation* 159: 16-23.
- Nicotra, A.B., O.K. Atkin, S.P. Bonser, A.M. Davidson, E.J. Finnegan, U. Mathesius, P. Poot, M.D. Purugganan, C.L. Richards, F. Valladares, M. van Kleunen. 2010. Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends in plant Science* 15: 684-692.
- Oostermeijer, J.G.B. 2000. Population viability analysis of the rare *Gentiana pneumonanthe*: importance of genetics, demography, and reproductive biology. *En: Young AG, Clarke GM (eds) Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Pertoldi, C., R. Bijlsma, V. Loeschcke. 2007. Conservation genetics in a globally changing environment: Present problems, paradoxes and future challenges. *Biodiversity Conserv.* 16: 4147-4163.

Picó F.X., P.F., Quintana-Asencio. 2005. Análisis de factores demográficos y genéticos para la conservación de poblaciones de plantas en un hábitat fragmentado. Ecosistemas. <http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp>.

Ponce-Reyes, P., V.H. Reynoso_Rosales, J.E.M. Watson, J. Van Derwal, R.A. Fuller, R. L. Pressy, H.P. Possingham. 2012. Vulnerability of cloud forest reserves in Mexico to climate change. *Nature Climate Change* 2: 448-452.

Rasmussen, H.N. 1995. *Terrestrial orchids. From seed to micoheterotrophy*. Cambridge University Press. NY.

Reis, A., F.C. Bechara, M.B. Espindola, N.K. Vieira, L.L. Souza. 2003. Restoration of damaged land areas: using nucleation to improve sucesional processes. *The Brazilian Journal of Nature Conservation* 1: 85-92.

Suárez-Montes, P. J. Fornoni, J. Núñez-Farfán. 2010. Conservation genetics of the endemic mexican *Heliconia uxpanapensis* in the Los Tuxtlas Torpical rain Forest. *Biotropica* 43: 114-121.

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