

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA  
ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL**

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE *Sacoglottis  
holdridgei* Cuatrec. (HUMIRIACEAE) MEDIANTE  
MARCADORES AFLP's EN EL PARQUE NACIONAL ISLA  
DEL COCO, COSTA RICA**

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERIA FORESTAL CON EL  
GRADO ACADÉMICO DE LICENCIATURA**

**MONICA ARAYA SALAS**

**CARTAGO, COSTA RICA**

**AGOSTO, 2019**

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA  
ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL**

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE *Sacoglottis  
holdridgei* Cuatrec. (HUMIRIACEAE) MEDIANTE  
MARCADORES AFLP's EN EL PARQUE NACIONAL ISLA  
DEL COCO, COSTA RICA**

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERIA FORESTAL CON EL  
GRADO ACADÉMICO DE LICENCIATURA**

**MONICA ARAYA SALAS**

**CARTAGO, COSTA RICA  
AGOSTO, 2019**

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE *Sacoglottis holdridgei* Cuatrec.  
(HUMIRIACEAE) MEDIANTE MARCADORES AFLP's EN EL PARQUE  
NACIONAL ISLA DEL COCO, COSTA RICA**

Mónica Araya-Salas\*

**RESUMEN**

*Sacoglottis holdridgei* es la especie leñosa de mayor importancia en la ecología de los bosques del Parque Nacional Isla del Coco. A pesar de ser una especie endémica perteneciente a un ecosistema insular oceánico, no existen registros genéticos que evalúen su estado en el tiempo; lo cual, limita la capacidad de intervenir en su manejo y conservación a largo plazo. Por tanto, el objetivo principal de este estudio fue analizar la estructura de dos subpoblaciones naturales definidas por su rango altitudinal ( $P_1$ =Bosque Pluvial Premontano/  $P_2$ =Bosque Nuboso), mediante la aplicación de la técnica de AFLP's (Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados). Para ello, se colectó tejido foliar fresco de 70 individuos y se extrajo su ADN nuclear, mediante la combinación del protocolo CTAB y el protocolo DNeasy Plant Mini Kit de la casa comercial QIAGEN™. Las subpoblaciones fueron evaluadas con 12 combinaciones de imprimadores selectivos, de las cuales finalmente se seleccionaron siete (E-ATC/M-CAC, E-AGG/M-CAG, E-ATC/M-CAG, E-ATC/M-CTT, E-ATC/M-CGG, E-ACG/M-CTA y E-AGC/M-CTA), que permitieron el análisis de 122 fragmentos. Un 78,69% de los fragmentos resultaron polimórficos. La diversidad genética promedio fue de 0,201 ( $P_1=0,205$ ;  $P_2=0,197$ ). El análisis AMOVA mostró que la mayor variación genética se da dentro de subpoblaciones (97%). Asimismo, el análisis PCoA y el análisis de agrupamiento bayesiano, afirmaron la existencia de dos subpoblaciones relacionadas genéticamente que presentan una tendencia a una futura separación por la acción del tiempo y evolución. Se determinó que el grado de diferenciación genética entre poblaciones es escaso; lo cual indica que el flujo genético es de moderado a alto.

**Palabras clave:** Estructura genética, *Sacoglottis holdridgei*, AFLP, Costa Rica.



Esta obra se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Permisos más allá del alcance de esta licencia pueden estar disponibles en [monicka1914@gmail.com](mailto:monicka1914@gmail.com).

**POPULATION GENETIC STRUCTURE OF *Sacoglottis holdridgei* Cuatrec.  
(HUMIRIACEAE) THROUGH AFLP's MARKERS IN THE COCOS ISLAND  
NATIONAL PARK, COSTA RICA**

**ABSTRACT**

*Sacoglottis holdridgei* is the most important woody species in the ecology of the forests of Isla del Coco National Park. Despite being an endemic species belonging to an insular oceanic ecosystem, there are no genetic records that evaluate its status over time; which limits the ability to intervene in its management and long-term conservation. Therefore, the main objective of this study was to analyze the genetic structure in two natural subpopulations defined by their altitudinal range ( $P_1$  = Premontane Pluvial Forest /  $P_2$  = Cloud Forest), through the application of the AFLP's technique (Polymorphisms in the Length of Amplified Fragments). To do this, fresh foliar tissue from 70 individuals was collected and its nuclear DNA extracted, by combining the CTAB protocol and the commercially available DNeasy Plant Mini Kit from QIAGEN™. The populations were evaluated with 12 combinations of selective primers, from which seven were selected (E-ATC / M-CAC, E-AGG / M-CAG, E-ATC / M-CAG, E-ATC / M-CTT, E-ATC / M-CGG, E-ACG / M-CTA and E-AGC / M-CTA), these allowed the analysis of 122 fragments. The 78,69% of the fragments were polymorphic. The average genetic diversity obtained was 0.201 ( $P_1$  = 0,205;  $P_2$  = 0,197). The AMOVA analysis showed that the greatest genetic variation occurs within subpopulations (97%). Likewise, the PCoA analysis and Bayesian grouping analysis, affirmed the existence of two genetically related subpopulations that present a tendency to a future separation by action of time and evolution. It was determined that the degree of genetic differentiation among populations is scarce; which indicates that the genetic flow is moderate to high.

**Key words:** Genetic structure, *Sacoglottis holdridgei*, AFLP, Costa Rica.

\*Araya-Salas, M. (2019). *Estructura genética poblacional de Sacoglottis holdridgei Cuatrec. (Humiriaceae) mediante marcadores AFLP's en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica.* (Tesis de Licenciatura). Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 56 p.

## ACREDITACIÓN

### CONSTANCIA DE DEFENSA PÚBLICA DE PROYECTO DE GRADUACIÓN

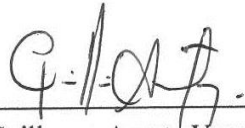
Trabajo final de graduación defendido públicamente ante el Tribunal Evaluador de la Escuela de Ingeniería Forestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica, y aprobado como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Forestal.

#### Miembros del Tribunal Evaluador



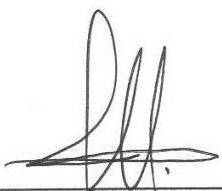
---

Fabiana Rojas Parajeles, M.Sc.  
Directora de Tesis



---

Luis Guillermo Acosta Vargas, MAP.  
Profesor Lector



---

José Pablo Jiménez Madrigal, Ph.D.  
Lector



---

Dorian Carvajal Vanegas, M.Sc.  
Coordinador de Trabajos Finales de  
Graduación



---

Mónica Araya Salas  
Estudiante

## **DEDICATORIA**

*A mis padres, por su apoyo  
incondicional durante todos estos años.*

## AGRADECIMIENTOS

*A mis padres por estar a mi lado y apoyarme durante este largo camino.*

*Al Ingeniero Luis Guillermo Acosta Vargas por brindarme esta gran oportunidad, por todos sus consejos y guía, por la confianza depositada, pero sobre todo por su amistad y apoyo.*

*A mi tutora, la Ingeniera Fabiana Rojas Parajeles por permitirme trabajar junto a ella, por compartir sus conocimientos y habilidades.*

*Se le agradece al Biólogo José Pablo Jiménez Madrigal, al Dr. Federico Albertazzi y a Esteban Herrera Herrera por colaborar en la formación de este proyecto.*

*A los funcionarios del PNIC, por hacer que me sintiera como en casa durante mi estancia.*

*A los Bomberos funcionarios en el tiempo de mi estadía en la isla por toda su ayuda en el trabajo de campo y por hacer todo el proceso muy entretenido.*

*A la Ingeniera Irene Corrales Retana por toda su ayuda en el trabajo de campo.*

*A la tripulación de las empresas Sea Hunter y Okeanos por el agradable viaje hacia la isla.*

*Al apoyo financiero brindado por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica (VIE) y al Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC), ya que este proyecto fue posible gracias a ambos.*

*Al apoyo logístico brindado por el Área de Conservación Marina Cocos (ACMC) y al Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigación en Innovación Forestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica.*

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	i
ABSTRACT.....	ii
CONSTANCIA DE DEFENSA PÚBLICA DE PROYECTO DE GRADUACIÓN.....	<b>¡Error!</b>
<b>Marcador no definido.</b>	
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
2.1 Área de estudio.....	3
2.2 Muestreo.....	3
2.3 Extracción del ADN nuclear .....	4
2.4 Electroforesis y cuantificación del ADN .....	5
2.5 Protocolo AFLP's (Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados).....	6
2.5.1 <i>Digestión y Ligación del ADN</i> .....	6
2.5.3 <i>Amplificación Pre-Selectiva</i> .....	6
2.5.4 <i>Amplificación Selectiva</i> .....	7
2.6 Análisis de datos .....	8
3. RESULTADOS .....	10
3.1 Diversidad genética.....	10
3.2 Estructura genética.....	12
3.2.1 <i>AMOVA y Coeficiente de Diferenciación Genética</i> .....	12
3.2.2 <i>Análisis de agrupamiento</i> .....	13
4. DISCUSIÓN.....	16
4.1 Diversidad genética.....	16
4.2 Estructura y diferenciación genética .....	22
4.3 Análisis de agrupamiento.....	24
4.4 Implicaciones para la conservación .....	27
5. CONCLUSIONES.....	29
6. RECOMENDACIONES .....	30
7. REFERENCIAS .....	31
8. APÉNDICES .....	45



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Perfil térmico de la reacción de Amplificación Pre-Selectiva del protocolo AFLP para la especie <i>S. holdridgei</i> en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica. ....	7
Cuadro 2. Perfil térmico de la reacción de Amplificación Selectiva del protocolo AFLPs para la especie <i>S. holdridgei</i> en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica. ....	8
Cuadro 3. Grado de polimorfismo detectado con siete combinaciones de imprimadores selectivos analizados en dos subpoblaciones naturales de <i>S. holdridgei</i> en el Parque Nacional de Isla del Coco, Costa Rica, 2019. ....	11
Cuadro 4. Parámetros estadísticos de diversidad genética fundamentada en 122 fragmentos analizados en dos subpoblaciones de <i>S. holdridgei</i> en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica, 2019. ....	12
Cuadro 5. Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) basado en marcadores AFLP's en dos subpoblaciones de <i>S. holdridgei</i> en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica, 2019. ....	12

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de los árboles <i>S. holdridgei</i> muestreados para el estudio de su estructura genética poblacional en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica, 2019.....	4
Figura 2. Identificación del $\Delta K$ más probable calculado con el programa Structure Harvester en la especie <i>S. holdridgei</i> en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica, 2019. ....	13
Figura 3. Dendrograma NJ basado en siete combinaciones de imprimadores selectivos AFLP's, en dos subpoblaciones naturales de <i>S. holdridgei</i> en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica, 2019. ....	14
Figura 4. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) con base en la distancia genética de Nei para 60 individuos de dos subpoblaciones naturales de <i>S. holdridgei</i> en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica, 2019.....	15

## ÍNDICE DE APÉNDICES

Apéndice 1. Diagrama de barras realizado para la probabilidad de agrupamiento poblacional ( $K$ ) calculada con el programa STRUCTURE en la especie <i>S. holdridgei</i> en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica, 2019.....	45
---	----

## 1. INTRODUCCIÓN

La Isla del Coco es un ecosistema insular, que cumple con la definición de “isla oceánica” propuesta por Alfred Russel Wallace en 1902 (Fernández-Palacios & Martín-Esquivel, 2001); reconocida por ser la única emersión de la placa tectónica Cocos (Rojas & Alvarado, 2012), y formada a partir de la erupción volcánica de un “hotspot” (punto caliente) perteneciente a la Dorsal Marina de Coco (Córtes, 2008; Malavassi, 1983; Montoya, 2007).

Santamarta-Cerezal (2017), afirma que estos ecosistemas se caracterizan por poseer la capacidad de evolucionar de forma singular e independiente de los ecosistemas continentales; y que aspectos como el tamaño del área y el grado de aislamiento geográfico influyen y limitan el intercambio del flujo genético disponible (Carrillo & Granadilla, 2010; Esparza-Olguín, 2004; Fernández-Palacios *et al.*, 2001; Montoya, 2007), fomentando la aparición de especies endémicas (Montoya, 2007; Traveset, 1999). Eso avala el alto porcentaje de endemismo vegetal presente en la isla (30%); en el que destacan las especies *Sacoglottis holdridgei*, *Cecropia pieltieri* y *Euterpe precatoria* (UICN, 2017).

En este tipo de especies, es de particular interés la vulnerabilidad que presentan ante perturbaciones externas, que contribuyen a la ocurrencia de consecuencias evolutivas como la erosión genética (Klug, Cummings & Spencer, 2006; Poulin, 2006). Por tanto, para prevenir y/o reducir las probabilidades del deterioro genético irreversible es imperante conocer y determinar su estado en el tiempo; razón por la cual, diversos autores destacan la trascendencia del estudio de la diversidad y estructura genética de las especies (FAO, 2001; Lammi, Siikamäk & Mustajärvi, 1999), ya que funcionan como parámetro base en el proceso del planteamiento de estrategias de conservación y manejo de los recursos genéticos a largo plazo. Esto, debido a que determinan la proporción y distribución de la variación genética (frecuencias alélicas) dentro y entre poblaciones (Eguiarte, Aguirre, Scheinva, González & Souza, 2010).

Para incursionar en el estudio de la genética de poblaciones, destaca el uso de marcadores genéticos moleculares como herramienta de análisis ampliamente recomendada debido a que, no están influenciados por el efecto del ambiente, son capaces de revelar variaciones directas en las secuencias de ADN e identifican, según el tipo de marcador utilizado, tanto individuos

dominantes como codominantes (Valadez & Kahl, 2000). En los últimos años, uno de los métodos más destacados es el de Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP's por sus siglas en inglés), ya que combina la eficacia del método de la Reacción en Cadena Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) con el de Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP's por sus siglas en inglés); permitiendo analizar grandes cantidades de fragmentos o polimorfismos en el ADN, sin requerir información previa de la secuencia que se está analizando (Weising, Nybom, Pfenninger, Wolff & Kahl, 2005).

Con base en esto, y a pesar de que el Parque Nacional Isla de Coco es considerado un laboratorio natural para el estudio de la evolución de las especies y Patrimonio Mundial de la Humanidad (1997) (Trusty, Kesler & Delgado, 2006), no existen registros genéticos para ninguna de las especies vegetales que conforman sus bosques. De manera que, la única información disponible se limita a estudios de estructura y composición florística (Bonilla, 2017; Porras-Jiménez, 2012; Porras-Jiménez, Acosta-Vargas, Castillo-Ugalde & Quesada-Monge, 2014; Zamora, 2008).

*Sacoglottis holdridgei* (Cuatrecasas, 1964) conocida comúnmente como “Palo de Hierro” es la especie leñosa de mayor importancia en la isla, ya que “es la única especie con distribución espacial tanto vertical como horizontal continua” (Porras-Jiménez *et al.*, 2014); y la que presenta los mayores porcentajes de abundancia y dominancia (Acosta-Vargas, 2016). *S. holdridgei* funciona como “especie de servicio” en el bosque nuboso, ya que domina el dosel y permite que las especies *Cyathea alfonisiana* (Porras-Jiménez *et al.*, 2014) y *Epidendrum insulanum* Schltr Schltr (catalogada como “Casi Amenazada” por la UICN) (Bogarin, Warner, Gigot, & Savolainen, 2008), se desarrollen en el sotobosque. Estudios previos denotan cierto nivel de preocupación en cuanto su futuro, ya que las tasas de regeneración, mortalidad y reclutamiento presentan valores críticos con respecto a algunas de las especies de la familia Melastomataceae, con las cuales conviven en constante competencia; debido a que, podría escalar a un posible futuro cambio de estructura y composición florística (Acosta-Vargas, 2016; Bonilla, 2017).

Teniendo en cuenta la importancia y peso ecológico de esta especie en el ecosistema, la presente investigación tiene como objetivo analizar la estructura genética poblacional de *Sacoglottis holdridgei* Cuatrec. (Humiriaceae) mediante marcadores moleculares AFLP's en el Parque Nacional Isla del Coco.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente proyecto de investigación cuenta con el permiso de la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO), para el acceso de los recursos genéticos y bioquímicos de la biodiversidad costarricense en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica; mediante la resolución N° R-CM-ITCR-012-2018-0T de la Oficina Técnica.

### 2.1 Área de estudio

El Parque Nacional Isla del Coco (PNIC) es parte del Área de Conservación Marina Cocos (ACMC) y se ubica entre las coordenadas 05° 30' - 05° 34'N y 87° 01' - 87° 06'O, a 532 km de Cabo Blanco en el Océano Pacífico, al Oriente de Costa Rica (Porrás-Jiménez, 2012).

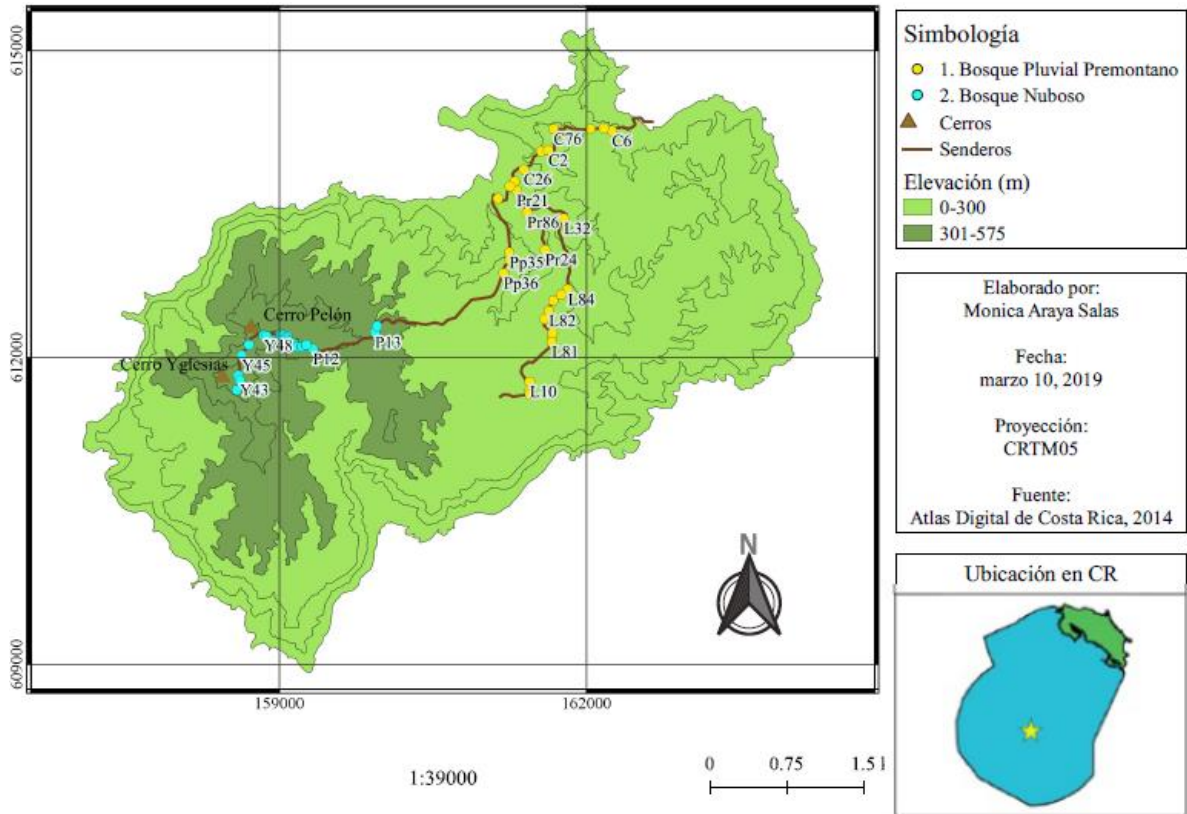
El PNIC posee clima tropical húmedo, con una temperatura promedio anual de 24,3 °C (IMN, 2018) y una precipitación promedio anual de 7000 mm (SINAC, 2016). Se sitúa en la zona de vida Pluvial Premontano (bp-P) transición a basal (Bolaños & Watson, 1993). Su cobertura boscosa es en su mayoría de carácter pluvial premontano, con la presencia de un pequeño porcentaje de bosque nuboso (SINAC, 2016); y sus suelos son de origen exclusivamente volcánicos con pequeños depósitos de tipo aluvial (Malavassi, 1983).

### 2.2 Muestreo

Se seleccionaron dos subpoblaciones naturales de *S. holdridgei*; la primera con un rango altitudinal de los 0-300 msnm en el bosque pluvial Premontano y la segunda con un rango altitudinal aproximadamente de los 301-575 msnm en el bosque Nuboso.

En cada subpoblación se eligieron 35 individuos (n=35) mediante un muestreo completamente aleatorio (Figura 1). Para ello, se creó una red de puntos aleatorios aplicando un área de amortiguación equivalente a 30 m en cada uno de los principales senderos del PNIC (Bahía Chatham, Bahía de Llanos de Palo de Hierro, Cerro Pelón, Presa del Río Genio y Cerro Yglesias). Se utilizó la capa de senderos del Parque “isladelcocosenderCRTM05.shp” del ATLAS Digital de Costa Rica (2014). De esta manera, los individuos de la Subpoblación 1 (Bosque Pluvial Premontano) están definidos por la nomenclatura: Bahía Chatham (C), Bahía

de Llanos de Palo de Hierro (L), Cerro Pelón (Pp), Presa del Río Genio (Pr); y los de la Subpoblación 2 (Bosque Nuboso) por la nomenclatura: Cerro Pelón (P) y Cerro Yglesias (Y).



**Figura 1.** Ubicación de los árboles *S. holdridgei* muestreados para el estudio de su estructura genética poblacional en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica, 2019.

Se colectaron al menos ocho brotes jóvenes de tejido foliar fresco por individuo. Cada muestra fue empacada en bolsas herméticas tipo Ziploc debidamente rotuladas con su respectivo código (número de árbol y subpoblación) y transportadas con hielo, para posteriormente ser almacenadas a  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se trasladaron al Laboratorio de Genética Molecular Forestal del Centro de Investigación en Innovación Forestal (CIF), ubicado en la sede Central del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.

### 2.3 Extracción del ADN nuclear

Para la extracción de ADN nuclear, se aplicó el protocolo de extracción CTAB (Lodhi, Ye, Weeden & Reish, 1994) en combinación con la química del DNeasy Plant Mini Kit de la casa

comercial QIAGEN™ (2016), mediante la utilización de columnas de la casa comercial Omega Bio-Tek® (Araya-Salas, 2018).

Se colocó de cada muestra, 100 mg de tejido foliar fresco en tubos Eppendorf de 2 ml, previamente macerado con nitrógeno líquido. Se agregó 250 µl de tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM (pH 8,0); NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM, CTAB 2 %, Mercaptoetanol 0,2 % y PVP 2 %) y se volvió a macerar el tejido manualmente con un pistilo, para después añadir 500 µl del mismo tampón de extracción e incubar a 65 °C durante 20 minutos. Una vez concluida la incubación, se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente y se agregó 750 µl de cloroformo octanol (24:1). Se mezclaron los componentes mediante inversión de los tubos 20 veces. Después, se centrifugó a 6000 rpm por 15 minutos en una centrifuga modelo 5424 de la casa comercial Eppendorf y se transfirieron 400 µl del sobrenadante a una columna de retención de ADN (HiBind DNA Mini Column). Las columnas fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 2 minutos, se descartó el sobrenadante y se reservó la columna.

Se transfirió la columna a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml y se añadió 15 µl de tampón de elusión AE del kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit de la casa comercial QIAGEN® (2016). Se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente para posteriormente centrifugar a 8000 rpm durante un minuto. Se añadieron 15 µl más del mismo de tampón de elusión, y se dejó reposar durante 10 minutos para centrifugar nuevamente a 8000 rpm durante un minuto. Finalmente, se desechó la columna y se agregó 4 µl de ARNasa al producto obtenido. Las muestras debidamente rotuladas se almacenaron a -20 °C.

#### **2.4 Electroforesis y cuantificación del ADN**

Se realizó un análisis electroforético, en gel de agarosa al 2% con tampón TAE 1X, a 100 voltios constantes durante 30 minutos. Se utilizó una cámara ENDURO™ Gel XL (Labnet Intenational, Inc), en la cual se colocó 3 µl de tampón de carga 6X (New England BioLabs) junto con 5 µl del ADN extraído. En cada 100 ml de tampón TAE 1X con agarosa, se agregó un 1 µl de Gel Red. Para visualizar las bandas de ADN se utilizó un fotodocumentador Gel Doc™ XR+ de la casa comercial BIO-RAD mediante el programa Quantity One 1-D Analysis v. 4.6.8.



Para evaluar la concentración de ADN en las bandas observadas en la electroforesis, se evaluó cada muestra a 260 nm en el espectrofotómetro NanoDrop™ Lite, marca Thermo Fisher Scientific Inc., utilizando 1 µl de cada muestra.

## **2.5 Protocolo AFLP's (Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados)**

El ADN extraído se procesó con base en la metodología propuesta por Vos *et al.* (1995) con algunas modificaciones. El protocolo fue previamente validado en un estudio anterior de investigación estudiantil realizado por Araya-Salas (2018), para la especie *S. holdridgei*.

### *2.5.1 Digestión y Ligación del ADN*

Para llevar a cabo la restricción del ADN se estandarizaron las muestras a una concentración de 50 ng/µl en un volumen final de 20 µl. Se utilizaron las enzimas EcoRI-HF y MseI (ambas de la marca New England BioLabs). En un tubo de 0.5 ml se agregó 10 µl de cada muestra de ADN, tampón CutSmart a 1X (New England BioLabs) y enzima MseI a 5 U. Se incubaron las muestras a 37 °C durante 2 horas en un termociclador Mastercycler Eppgradient de la casa comercial Eppendorff, y seguidamente se desactivó la enzima por calor a 65°C durante 15 minutos. Posteriormente, se agregó la enzima EcoRI a 10 U y se volvió a incubar durante 2 horas a 37 °C, para después desactivar de igual manera esa enzima a 65 °C durante 15 minutos.

Antes de realizar la ligación, se linearizaron los adaptadores EcoRI y MseI a 65 °C durante 15 minutos en un termociclador Mastercycler Eppgradient de la casa comercial Eppendorf e inmediatamente se colocaron en una gradilla fría durante 5 minutos. La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl, se colocaron en un tubo de 0.5 ml 10 µl del ADN digerido; ADN T4 ligasa a 0,01 U/µl (Thermo Scientific), tampón T4 ligasa a 1X (Thermo Scientific), adaptador EcoRI a 0,5 µM, adaptador MseI a 5 µM y ATP a 0,06 mM. Se incubó a 16 °C durante 2 horas y 30 minutos. Finalmente, los productos fueron almacenados a -20 °C.

### *2.5.3 Amplificación Pre-Selectiva*

Se llevó a cabo la PCR para los imprimadores preselectivos, a partir de los productos ligados, en un volumen final de 50 µl. Primeramente, se linearizaron los imprimadores M-C y E-A a 95 °C durante 5 minutos. La reacción consistió en 5 µl de ADN ligado y diluido 1:10, tampón PCR

Go Taq Flexi a 1X (Promega), MgCl<sub>2</sub> a 3 mM, dNTPs a 0,2 mM, imprimador M-C a 0,2 μM, imprimador E-A a 0,2 μM y 1U de Taq polimerasa Go Taq Flexi (Promega). La reacción se incubó en el termociclador Mastercycler Eppgradient de la casa comercial Eppendorf durante 1 hora y 10 minutos. El perfil térmico utilizado, se presenta a continuación en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Perfil térmico de la reacción de Amplificación Pre-Selectiva del protocolo AFLP para la especie *S. holdridgei* en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica, 2019.

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Ciclo</b>
Desnaturalización inicial	72	2	1
Desnaturalización	94	0,5	
Hibridación	56	0,5	20
Extensión	72	2	
Extensión final	72	5	1
Almacenamiento	4	∞	-

Fuente: Araya-Salas (2018).

La amplificación preselectiva se evaluó por medio de un análisis electroforético a 100 voltios constantes durante 30 minutos, en un gel de agarosa al 2%, con tampón TAE 1X. Se agregó a 100 ml de agarosa, 1 μl de Gel Red y 5 μl del producto pre-amplificado mezclado con 3 μl de tampón de carga 6X (New England BioLabs). Una vez verificado el barrido de ADN, se diluyó el producto obtenido en el PCR de la amplificación pre-selectiva en una proporción de 1:20.

#### 2.5.4 Amplificación Selectiva

Anterior a este estudio, se realizó un tamizaje de imprimadores en el cual se evaluaron 72 combinaciones de imprimadores; obteniendo amplificación en 18 de ellas (Araya-Salas, 2018). Los imprimadores selectivos utilizados para la enzima EcoRI fueron: AAG, AAC, ACC, ACT, AGC, AGG y ATC. Y los imprimadores para la enzima MseI fueron: CAC, CAA, CAG, CTT, CAT, CGG, CTA, CTC y CTG. De esta manera, en la presente investigación se evaluaron 12 de esas 18 combinaciones, debido a que mostraron una mejor amplificación. Las 12 combinaciones evaluadas en las dos subpoblaciones fueron: E-ATC/M-CAC, E-AGG/M-CAG, E-ATC/M-CAG, E-ATC/M-CTT, E-ATC/M-CGG, E-ACG/M-CTA, E-ATC/M-CAA, E-AGC/M-CTT, E-AGG/M-CTC, E-ATC/M-CAT, E-ACG/M-CGG y E-AGC/M-CTA.

Primeramente, los imprimadores se linearizaron a 95 °C durante 5 minutos y se colocaron en una gradilla fría por 5 minutos. La reacción se realizó en un volumen final de 20 ul y estuvo constituida por 5 µl de ADN preamplificado y diluido a 1:20, concentraciones finales de tampón PCR a 1X (Promega), MgCl<sub>2</sub> a 1 mM, dNTPs a 0,2 mM, imprimadores selectivos EcoRI-NNN a 10 µM, y MseI-NNN a 10 µM, y Taq polimerasa Go Taq Flexi (Promega) a 1U. Las muestras se incubaron durante 2 horas y 45 minutos en un termociclador Mastercycler Eppgradient de la casa comercial Eppendorf. El perfil térmico usado se muestra a continuación.

**Cuadro 2.** Perfil térmico de la reacción de Amplificación Selectiva del protocolo AFLP's para la especie *S. holdridgei* en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica, 2019.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Ciclo</b>
Desnaturalización inicial	94	2	1
Desnaturalización	94	0,5	
Hibridación	66	0,5	15
Extensión	72	2	
Desnaturalización	94	0,5	
Hibridación	56	0,5	23
Extensión	72	2	
Extensión final	60	30	1
Almacenamiento	10	∞	-

Fuente: Araya-Salas (2018).

Los fragmentos del PCR selectivos se visualizaron con el analizador de fragmentos QIAxcel de la casa comercial QIAGEN® en el Laboratorio de Genética Molecular Forestal del Centro de Investigación en Innovación Forestal (CIF), del ITCR.

## **2.6 Análisis de datos**

De los 70 individuos muestreados, cinco individuos pertenecientes a cada una de las subpoblaciones (P1=L7, L79, L80, L85, Pp37 / P2=P51, P52, P62, P73, P74) no amplificaron para ninguna de las combinaciones probadas, por lo cual, los análisis se hicieron con un total de 60 individuos. A su vez, de las 12 combinaciones de imprimadores selectivos evaluadas, se

escogieron siete combinaciones para el análisis final; ya que fueron las que generaron una mayor cantidad de bandas y presentaron mejor resolución. Mediante la construcción de una matriz binaria de presencia (1) /ausencia (0), se determinó la totalidad de las bandas presentes para cada combinación de imprimadores selectivos EcoRI-NNN/MseI-NNN, en un rango de tamaño molecular de entre 200 y 700 pares de bases (pb). Para ello, se utilizó un umbral de detección intermedio para la magnitud de intensidad de la fluorescencia; que es el umbral definido por defecto en el programa QIAxcel Screen Gel v.1.5 y recomendado según el fabricante, debido a que este programa adapta este parámetro a cada una de las muestra detectando la señal más alta y el múltiplo del nivel de ruido estimado en el electroferograma (QIAGEN, 2016); descartando los fragmentos de baja intensidad considerados como “ruido” y se evita la posibilidad de ignorar algún pico importante para el marcador al subir el umbral (Araya-Valverde, Murillo-Gamboa, Aguilar & Rocha, 2005; Crespillo, Luque, Paredes & Barrio, 2012).

Se utilizó el programa GenAlEx v.6.503 (Peakall & Smouse, 2012), para evaluar la diversidad genética poblacional mediante el cálculo de las frecuencias de los fragmentos reportados por locus, el porcentaje de fragmentos polimórficos y el índice de diversidad haplotípica ( $h$ ) (Nei, 1987). Mediante un Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) (Escoffier, Smouse & Quattro, 1992), se evaluó la estructura genética inter e intra poblacional utilizando la matriz de distancias genéticas de Nei (1978), con 999 permutaciones. Y se determinó el coeficiente de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ), con el programa AFLP.surv v.1.0 (Vakemans, 2001).

Se generó un diagrama de barras, utilizando el programa de agrupamiento bayesiano *STRUCTURE* v.2.3.4. (Pritchard, Stephens & Donnelly, 2000) para verificar si verdaderamente existe una estructura poblacional definida, asignando probabilísticamente los individuos muestreados a grupos genéticos ( $K$ ) que oscilan de entre 1 y 10. Los análisis se llevaron a cabo bajo un modelo mixto con frecuencias alélicas correlacionadas, considerando 100 iteraciones por  $K$ . El valor de  $\Delta K$  (Evanno, Regnaut & Goudet, 2005) se procesó con el programa *Structure Harvester* (Earl & vonHoldt, 2012). Con la matriz de distancias genéticas linealizadas, se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) para obtener una visualización espacial de la estructura poblacional usando GenAlEx; además, de un dendrograma *NJ* (Neighbour Joining) (Saitou & Nei, 1987) con el programa SplitsTree v.5.0.12.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 Diversidad genética**

Para el total de los 60 individuos analizados mediante el uso de siete combinaciones de imprimadores selectivos, se obtuvieron 122 fragmentos con un tamaño que varió de entre 200 y 700 pares de bases (pb), de los cuales 78,69 % resultaron ser de tipo polimórfico (Cuadro 4). Se determinó, que los imprimadores selectivos analizados revelaron en promedio 17,43 bandas por locus.

Del total de bandas diferentes obtenidas en ambas subpoblaciones, 96 de ellas resultaron ser polimórficas en la Subpoblación 1 y 96 en la Subpoblación 2; con un promedio de 13,71 bandas por locus, respectivamente. Detectando tan solo una única banda monomórfica por subpoblación (Cuadro 3).

Las combinaciones de imprimadores selectivos que presentaron el mayor número de bandas fueron E-AGC/M-CTA, E-ATC/M-CAC y E-ACG/M-CTA. Asimismo, se revelaron un total de 25 bandas únicas en cada una de las subpoblaciones muestreadas; destacando que, la combinación que presentó el mayor número de bandas únicas fue E-ATC/M-CTT con un total de siete bandas presentes en la Subpoblación 1 y seis en la Subpoblación 2. En contraste, la combinación E-ATC/M-CAC no mostró presencia de bandas únicas en la Subpoblación 2 (Cuadro 3).

A continuación, en el Cuadro 3 se presenta el perfil de polimorfismos presentados para cada una de las combinaciones de imprimadores selectivos probadas en cada una de las subpoblaciones analizadas.

**Cuadro 3.** Grado de polimorfismo detectado con siete combinaciones de imprimadores selectivos analizados en dos subpoblaciones naturales de *S. holdridgei* en el Parque Nacional de Isla del Coco, Costa Rica, 2019.

<b>Combinación de imprimador</b>	<b>Bandas diferentes totales</b>	<b>Bandas polimórficas</b>	<b>Bandas monomórficas</b>	<b>Bandas únicas</b>
<b>Subpoblación 1</b>				
E-ATC/M-CAC	18	18	0	5
E-AGG/M-CAG	12	12	0	1
E-ATC/M-CAG	12	12	0	4
E-ATC/M-CTT	15	15	0	7
E-ATC/M-CGG	9	9	0	2
E-ACG/M-CTA	17	17	0	4
E-AGC/M-CTA	14	13	1	2
Promedio	13,86	13,71	0,11	3,88
Total	97	96	1	25
<b>Subpoblación 2</b>				
E-ATC/M-CAC	13	13	0	0
E-AGG/M-CAG	15	15	0	4
E-ATC/M-CAG	14	14	0	6
E-ATC/M-CTT	14	14	0	6
E-ATC/M-CGG	9	9	0	2
E-ACG/M-CTA	14	13	1	1
E-AGC/M-CTA	18	18	0	6
Promedio	13,87	13,71	0,11	3,88
Total	97	96	1	25

Subpoblación 1, Bosque Pluvial Premontano; Subpoblación 2, Bosque Nuboso.

Se determinó un valor promedio de 0,201 para la diversidad genética poblacional de *S. holdridgei*. Este parámetro fue muy similar para ambas subpoblaciones; destacando que, aunque la Subpoblación 2 es la que muestra el valor más alto de diversidad alélica ( $h=0,205$ ) (Cuadro 4), ambas subpoblaciones presentan la misma cantidad de bandas diferentes y fragmentos polimórficos (Cuadro 3).

**Cuadro 4.** Parámetros estadísticos de diversidad genética fundamentada en 122 fragmentos analizados en dos subpoblaciones de *S. holdridgei* en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica, 2019.

Subpoblación	NDB	PFP (%)	<i>h</i>	DE ( <i>h</i> )
1	97	78,69	0,197	0,015
2	97	78,69	0,205	0,016
Promedio	97	78,69	0,201	0,010

NDB, número de bandas diferentes; PFP, porcentaje de fragmentos polimórficos; *h*, Índice de diversidad haplotípica, DE, desviación estándar.

### 3.2 Estructura genética

#### 3.2.1 AMOVA y Coeficiente de Diferenciación Genética

Para determinar la variación genética dentro y entre subpoblaciones, se hizo una comparación de los individuos pertenecientes a ambas subpoblaciones utilizando los resultados jerárquicos del AMOVA. De esta manera, se tiene que la mayor variación genética se concentra dentro de las subpoblaciones (97%) (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) basado en marcadores AFLP's en dos subpoblaciones de *S. holdridgei* en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica, 2019.

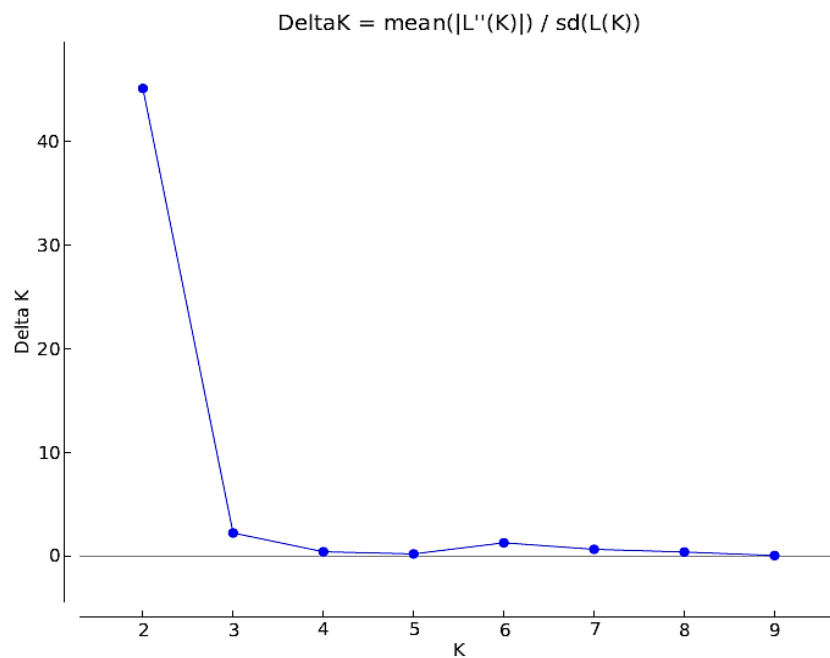
Análisis	GL	SS	MS	Est. Var.	V (%)
Entre subpoblaciones	1	4,828	4,828	0,077	3
Dentro de subpoblaciones	58	146,774	2,531	2,531	97
Total	59	151,602		2,607	100

GL, grados de libertad; SS, suma de la desviación al cuadrado; MS, media de la desviación al cuadrado; Est. Var, Estadístico de Varianza; V (%), porcentaje de la varianza total.

La estimación de la diferenciación genética mediante el coeficiente de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) fue de 0,076 con una significancia de 0,001; mientras que con el coeficiente de correlación  $\phi_{PT}$  (medida de conectividad entre poblaciones) fue de 0,029 con una significancia de 0,001. Asimismo, se determinó que la distancia genética de Nei (1978) entre subpoblaciones corresponde a un promedio de 2,5 %, encontrando un porcentaje de similitud de 97,5 %.

### 3.2.2 Análisis de agrupamiento

Con el fin de visualizar y comprender la relación genética existente entre los individuos de ambas subpoblaciones de *S. holdridgei*, se ejecutaron tres diferentes métodos de agrupamiento con un modelo estadístico de análisis distinto cada uno. De esta manera, el análisis de agrupamiento bayesiano realizado con el programa *STRUCTURE* identificó que un modelo de dos poblaciones fue capaz de capturar mejor la variación de los datos respecto a la estructura genética de *S. holdridgei*; ya que existe un pico muy pronunciado para  $\Delta K=2$  (Figura 2).



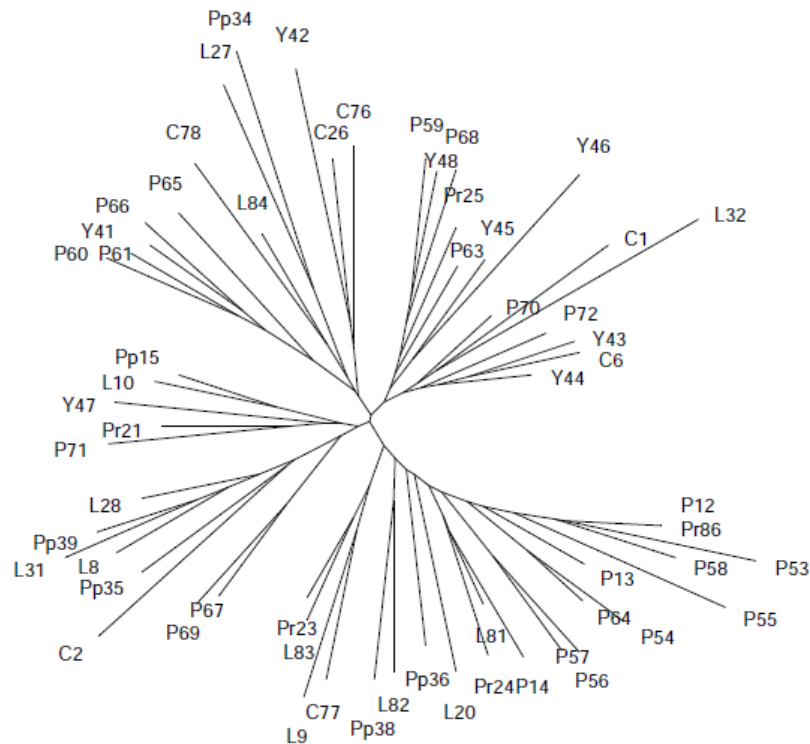
**Figura 2.** Identificación del  $\Delta K$  más probable calculado con el programa *Structure Harvester* en la especie *S. holdridgei* en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica, 2019.

Asimismo, en el Apéndice 1 se puede observar la asignación de probabilidades para las 60 muestras en cada grupo inferido por el programa *STRUCTURE* para el número de poblaciones de  $K=2$  a  $K=5$ , confirmando las poblaciones  $K$  más probables y representativas (Figura 2); en donde cada individuo se ve representado por una línea vertical. La longitud determinada por cada color indica la probabilidad que tiene el individuo de pertenecer a cada población. De esta manera, los datos reflejan, una alta probabilidad de la presencia de una población con poca



estructura, compuesta por dos subpoblaciones que apenas comienzan a mostrar signos de divergencia en la especie ( $K=2$ ).

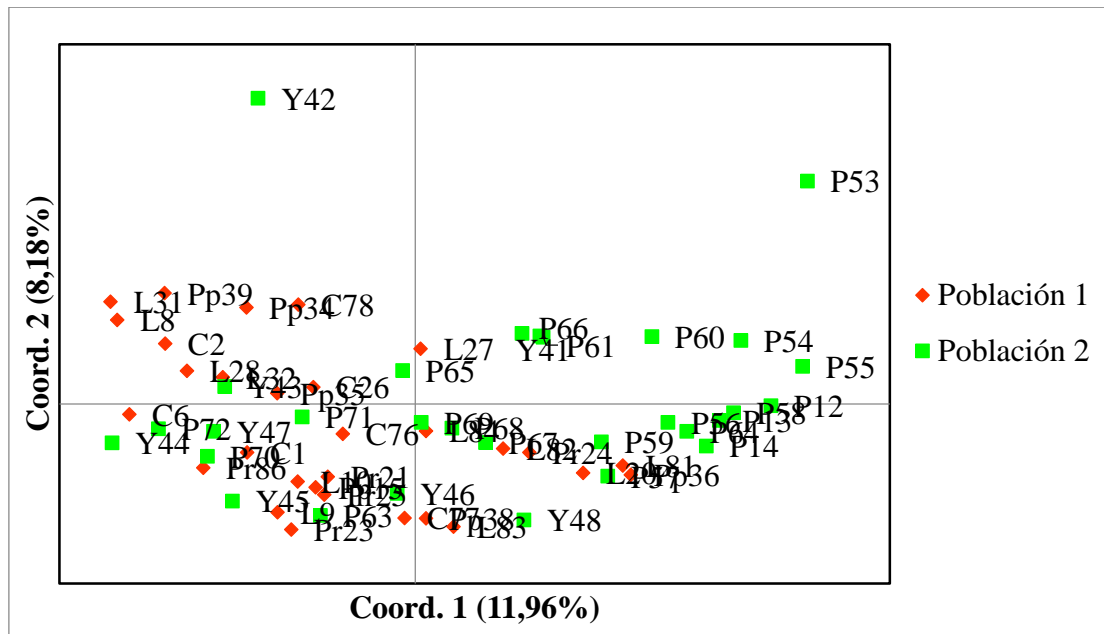
Por otra parte, se diseñó un dendrograma *NJ* (Figura 3), en el cual se puede observar la disposición espacial de los individuos. Se denotan dos subconjuntos o ramas diferenciables principales en los que se entremezclan los individuos de ambas subpoblaciones sin distinción clara entre las subpoblaciones definidas propiamente para el muestreo, ni entre sitios de colecta; lo que concuerda con el grado de similitud presente, debido a la estrecha cercanía genética mostrada entre los individuos de cada conjunto. Asimismo, se puede notar que algunos individuos (Y46, Y42, P53, P55, L9, L27, L31, L32 y C2) destacan del conjunto, al mostrar una mayor distancia genética.



**Figura 3.** Dendrograma *NJ* basado con siete combinaciones de imprimadores selectivos AFLP's, en dos subpoblaciones naturales de *S. holdridgei* en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica, 2019.

Con el mismo objetivo, se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) para mostrar la diferenciación genética espacial existente dentro y entre las subpoblaciones analizadas

(Figura 4). Se puede observar un patrón consistente con los análisis anteriores, ya que en los cuadrantes tres y cuatro se muestra una mezcla de los individuos de ambas subpoblaciones formando un conjunto sin diferencias significativas entre las distancias genéticas y mezclados sin distinción de la subpoblación a la que pertenecen. Mientras que en el cuadrante uno y dos, se denota una clara separación entre algunos de los individuos del bosque nuboso y pluvial premontano, respectivamente.



**Figura 4.** Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) con base en la distancia genética de Nei de 60 individuos de dos subpoblaciones naturales de *S. holdridgei* en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica, 2019.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Diversidad genética

De los 60 individuos analizados, se generaron 122 fragmentos totales a partir del uso de siete combinaciones de imprimadores selectivos; que proporcionaron un promedio de 17,43 bandas por locus. Aunque, según Acuña *et al.* (2005) el método AFLP's permite que por cada combinación de imprimadores probado se amplifique un promedio de entre 40 y 100 fragmentos de ADN aproximadamente. Eso ha sido demostrado, debido a que esta técnica ha sido ampliamente utilizada en especies leñosas del Neotrópico. En Costa Rica, por ejemplo, para la especie *Dalbergia retusa*, se obtuvo un promedio de 44,8 fragmentos mediante el uso de cinco combinaciones de imprimadores (Chavarría-Lines, 2006) y en la especie *Dipteryx panamensis* se obtuvo un promedio de 40 fragmentos por cada combinación de imprimadores selectivos (Meza, 2010). En Nicaragua para *Calycophyllum candidissimum* se reportó un promedio de 75,33 fragmentos (Dávila, Affenzeller, Tribsch, Díaz & Comes, 2017). Asimismo, en *Cedrella odorata* se detectó con tres combinaciones de imprimadores un promedio de 86 bandas (De la Torre, 2013) y en la especie endémica chilena *Gomortega keule* un total de 52 fragmentos por combinación (Delaveau *et al.*, 2013). Basándose en esos resultados se podría suponer que, al aplicar una mayor cantidad de combinación de imprimadores, se aumente el número de bandas por locus; aunque es probable que no todas resulten ser de tipo polimórfico. Se debe tener en cuenta que se fue muy estricto a la hora de descartar los imprimadores que presentaron datos faltantes; por lo cual no se cumplió esa teoría.

Una posible razón para la existencia de estos valores podría relacionarse con las dificultades presentadas durante el proceso de recolecta, almacenamiento y transporte del material vegetal. Ya que un hecho reconocido, es que un manejo inadecuado de las muestras proporciona efectos negativos en la calidad e integridad del ADN; ya que se podrían liberar contaminantes que pueden llegar a intervenir y dificultar la acción de los reactivos utilizados durante las reacciones de PCR (Barra, Salazar, Beltran & Sagredo, 2012). Debido a que el material, estuvo expuesto a periodos irregulares de congelación/descongelación, se pudo fomentar la sintetización de metabolitos secundarios y la aparición de cristales en el interior de la célula, que rompen y

degradan la estructura celular (Velázquez, Martínez & Romero, 2014), fragmentando el ADN y comprometiendo el rendimiento en algunas de las muestras. Esto, se relaciona con la alta sensibilidad que presentan los marcadores moleculares AFLPs con respecto a su requerimiento de ADN de alta calidad y pureza, ya que involucran enzimas de restricción (Serrato-Díaz & Ramos-Ortiz, 2014; Solano-Flórez, Márquez-Cardona & Schuler, 2009). Relacionado a esto, es de considerar la probabilidad de que ocurriera una digestión parcial del ADN en algunas de las muestras, afectando la reproducibilidad de las bandas (Dowling, 1996).

En el caso de las combinaciones E-ATC/M-CAA, E-AGG/M-CTC, E-AGC/M-CTT, E-ACG/M-CGG y E-ATC/M-CAT que no presentaron señales de amplificación para la mayoría de los individuos (datos faltantes), podría ser que posibles mutaciones en esos individuos generan cambios en la región flanqueada del ADN (Callen *et al.*, 1993); lo cual es común también en marcadores microsatélites, aunque se tenía evidencia de que esas combinaciones ya habían resultado funcionales para la especie (Araya-Salas, 2018).

Otra razón, podría deberse a inconvenientes presentados durante la electroforesis; ya que se ha demostrado que en el análisis por electroforesis capilar es común que factores como, fluctuaciones bruscas en el voltaje durante el análisis, las condiciones de corrida e incluso inconsistencias propias del equipo, provoquen que los patrones de los picos resulten poco consistentes (Crespillo *et al.*, 2012); por lo cual se dificulta su evaluación y se condiciona la cantidad de fragmentos definidos reportados en algunas de las muestras.

Debido a que los AFLPs son marcadores dominantes, en donde es imposible diferenciar los genotipos homocigotos de los heterocigotos del fragmento de ADN analizado (Backeljau, 1995), el sistema termina clasificándose por defecto como dominante recesivo (Simpson, 1997). Con relación a ello, el grado de ploidía tiene un efecto directo en la variación genética observada (Valdés-Infante & Rodríguez, 2003); ya que con este tipo de marcadores es probable que se subestimen los valores resultantes en la diversidad genética a la hora de realizar el análisis de “presencia/ausencia”, debido a que se puede llegar a encubrir la presencia de fragmentos en los locus (De Vicente, López & Fulton, 2004); por lo cual es muy importante tener en cuenta que la mayoría de los programas estadísticos utilizados para los análisis genéticos están diseñados especialmente para especies diploides. Por tanto, al desconocer la ploidía de la especie se utilizó

un enfoque conservador al utilizar el índice de diversidad haplotípica ( $h$ ) (Nei, 1987); que es una de las formas existentes de cuantificación de la variabilidad genética, en la cual se considera la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar en una población sean distintos (Peakall & Smouse, 2006). Ese cálculo de diversidad es equivalente al índice de heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) para datos diploides (Rojo Arreola, 2005), aplicado con marcadores codominantes como los microsatélites (Barahona-Padilla, 2014); por lo que, esa probabilidad se define en función de las frecuencias alélicas de la misma forma; pero esta se puede aplicar a cualquier organismo (haploide, diploide o poliploide) (Moreno, 2010).

En este estudio se obtuvo una diversidad genética promedio ( $h$ ) igual a 0,201; destacando que el bosque pluvial premontano fue la subpoblación que presentó mayor diversidad (0,205) (Cuadro 4). Estos valores son considerados como moderados según datos reportados para poblaciones endémicas en ecosistemas insulares oceánicos, que por lo general tienen valores menores en comparación con las poblaciones de continente (Frankham, 1997; Montoya 2007); por causa de las barreras obvias de polinización y dispersión a las que están expuestas.

Estudios realizados con aloenzimas para la heterocigosidad esperada en las Islas Canarias, reportan un promedio de 0,186 (especies reportan valores desde 0,047 hasta 0,456) (Francisco-Ortega, Santos- Guerra, Kim & Crawford, 2000); aunque para especies endémicas en islas oceánicas del Pacífico, DeJode & Wendel (1992) se reportó un valor de 0,064. En contraparte, si se compara con datos reportados para especies del Neotrópico se tiene que los presentes valores se catalogan por debajo de la media de especies continentales; lo cual destaca la fragilidad de los ecosistemas endémicos insulares. En especies tropicales continentales se han reportado valores bajos de heterocigosidad esperada, muy similar a lo obtenido en la especie en estudio; por ejemplo, en la especie *Sideroxylon capiri* se detectó un rango de 0,204 a 0,249 (Villalobos-Barrantes, García, Lowe & Albertazzi, 2015). En las especies continentales *Vochysia ferruginea* y *Lonchocarpus costarrisensis* se reportaron valores de heterocigosidad de 0,30 y 0,24 (rango entre poblaciones de 0,19-0,28), respectivamente (Cavers, Navarro, Hopkins, Ennos & Lowe, 2005; Navarro *et al.*, 2005). Además, en un estudio recopilatorio con marcadores RAPD para especies endémicas de sitios continentales e insulares se reporta un valor igual a 0,20 (Nybom, 2004).

En el caso particular de las islas oceánicas, el grado de variabilidad presente en las poblaciones se ve determinado principalmente por factores como el área total, la edad de la isla, el estado de aislamiento geográfico (Poulin, 2006; Sosa, Batista, González-Pérez & Bouza; 2002) y las condiciones ecológicas y geomorfológicas que la definen (Stuessy, Takayama, López-Sepúlveda & Crawford, 2014). Con base en esos estudios, los valores de diversidad anteriormente mencionados pueden explicarse con varias hipótesis, ya que la Isla del Coco cumple con todos los factores necesarios para la creación de un ecosistema muy restrictivo en términos de intercambio de flujo genético.

De esta manera, se tiene que la Isla se encuentra a más de 500 km de distancia de la masa continental, por lo que el océano es una barrera que imposibilita la dispersión y polinización externa, actuando como un aislante del contacto con otras poblaciones; lo cual se traduce en un flujo genético que se da de forma exclusivamente interna (Maki, 2001). Sumado a ello, el factor de área disponible (23,85 km<sup>2</sup>) provoca una reducida y discontinua distribución espacial de las poblaciones; lo que según Frankham (1997) posibilita futuras extinciones, ya que la probabilidad de autocruzamiento es mayor, provocando que la diversidad genética disminuya.

En relación con estas restricciones y para comprender los valores presentados, debe considerarse como factor clave la colonización de la especie. Puede catalogarse como un evento “raro de dispersión a larga distancia” que tuvo la capacidad de intervenir en el bioma existente, de tal manera que se pudieran crear los patrones biogeográficos y endémicos actuales que identifican a la Isla del Coco (Le Roux *et al.*, 2014). Este evento se considera como “raro”, ya que una característica de las especies insulares es que pueden llegar a perder la capacidad de dispersión que poseían los individuos que actuaron como ancestros colonizadores (Fernández-Palacios *et al.*, 2001). En estos casos si se sigue la “Ley de Baker” (1955) (Stebbins, 1957), que establece que la población cero está por lo general compuesta por unos pocos individuos que contienen un flujo genético restringido y que con el paso del tiempo es común que llegue a borrarse su huella genética original, dando paso a efectos evolutivos de gran impacto, como mutación, recombinación, deriva genética y selección natural (Stuessy *et al.*, 2014). Con base en esta teoría, se debe considerar la posibilidad de que los agentes colonizadores pudieron tratarse de individuos pertenecientes a otras especies del género *Sacoglottis* que pudieron adaptarse y dar

producto a un evento de especiación que resultó en la especie tratada actualmente. Aunque a su vez, según la tasa de crecimiento anual ( $3,1 \pm 1,1$  mm/año) (Bonilla, 2017); los individuos L9 (90 cm) y L31 (75 cm) podrían ser parte de este proceso; destacando que este último es también el individuo que presentó la mayor cantidad de fragmentos polimórficos (41).

Aunque se desconoce en qué año se dio este evento, se han planteado varias teorías que podrían explicar este fenómeno. Montoya (2016) describe que el proceso de dispersión pudo comenzar por causa de la influencia de las corrientes marinas existentes en dirección oeste, antes del cierre del Istmo de Panamá durante la época de finales del Plioceno y el periodo del Pleistoceno. En esas épocas, ríos de gran magnitud como el Magdalena y el Orinoco desembocaban en un sitio común transportando semillas naturalmente hacia la isla. Otra teoría propuesta, es después del cierre del Istmo, donde el evento pudo darse gracias a la presencia de la Contracorriente Ecuatorial Norte (CCEN), ya que la isla es considerada como la primera área poco profunda que toca esta corriente (Córtes, 2016). Además, de otras cuatro corrientes superficiales que pudieron intervenir en el proceso; arrastrando material genético (ACMC, 2007).

Ambas ideas tienen mérito, ya que la flora vascular de la isla presenta muchas similitudes con las especies encontradas en Centroamérica y en el noreste de Sudamérica; en especial las de la provincia fitogeográfica de la Guyana-Amazónica (Montoya, 2016). Esta relación tiene sentido, ya que el género *Sacoglottis* cuenta con 10 especies diferentes, distribuidas en la región Neotropical, desde la selva Atlántica de Río de Janeiro hasta Costa Rica (Cuatrecasas, 1961); a excepción de *S. gabonensis* (endémica) que se desarrolla fuera de América en la costa oeste de África. Se ha reportado la aparición de fósiles del mismo género que datan desde el Mioceno temprano en las regiones neotropicales mencionadas anteriormente (Pérez-Consuegra *et al.*, 2018). De hecho, una característica morfológica común presente en todas las especies del género, es que sus semillas son tipo drupas con un exocarpo carnoso y un endocarpo leñoso que presenta cavidades resiníferas (Antunes-Carvalho & Sousa de Holanda, 2018), que brindan la capacidad de flotar y viajar por años a través de las corrientes (Cuatrecasas, 1961). Por tanto, no es improbable la posibilidad de que *S. holdridgei* sea una especie derivada que se adaptó a las condiciones del ecosistema.

Otra característica presente en el género son las flores hermafroditas completas (Giordano, 2009); aunque en *S. holdridgei* se desconoce su estado de compatibilidad. Según Ward, Dick, Grivel & Lowe (2005), las especies del Neotrópico son normalmente autoincompatibles; en el caso de ecosistemas insulares se ha reportado que un rasgo distintivo de sus especies es la capacidad de ser autocompatibles en comparación con las especies de continente; ya que pasan por filtros de colonización (Grossenbacher *et al.*, 2017); que son básicamente las características ecológicas y ambientales propias del hábitat que funcionan como factores selectivos a los que los individuos colonizadores tienen que superar y adaptarse (Longo-Sánchez & Blanco, 2009). En este sentido, si se sigue la teoría de autocompatibilidad y se liga con la pequeña cantidad de individuos que funcionaron como los ancestros de las subpoblaciones, existe una gran probabilidad de que los individuos posean un alto grado de parentesco; lo cual puede influir en la disminución de la base genética de la especie; condicionando su existencia a largo plazo (Kress & Beach, 1994), y llegar hasta posibles casos de autogamia (Bawa, 1974). Ello se explica con el patrón continuo de floración que se da durante la mayor parte del año (Acosta-Vargas, 2016), debido a que los polinizadores tienen mayor probabilidad de visitar un mismo árbol una y otra vez por la alta abundancia de flores. Como se puede observar en la Figura 3, los individuos de ambas subpoblaciones se encuentran agrupados en un solo grupo, lo cual indica una distancia genética reducida; a excepción de unos pocos individuos de la Subpoblación 2; indicativo claro de la baja diversidad encontrada.

Otros factores que podrían contribuir a la pérdida del “*pool*” genético, podrían ser la presencia de especies invasoras introducidas en el ecosistema y la influencia del cambio climático. En cuanto al primer punto, diversos estudios (ACMIC, 2007; Acosta-Vargas, 2016; Sierra, 2001) han reportado la amenaza presentada por la fauna introducida en específico para esta especie; por acciones como, la agresiva depredación de semillas a causa de las ratas, la eliminación de la regeneración por parte de herbívoros como los venados y la modificación del sotobosque debido a la erosión ocasionada por los cerdos. En el caso de la flora introducida Acosta-Vargas (2016) & Bonilla (2017), destacan la presión que imponen las especies de la familia Melastomataceae sobre la especie; ya que crean un estado de competencia persistente que podría llegar a escalar a un futuro cambio en la estructura y composición florística del Parque. A su



vez, el cambio climático podría afectar de forma más agresiva evolutivamente (extinción), ya que las especies continentales se mueven hacia arriba o hacia latitudes más bajas con el aumento de temperatura; en cambio, en especies insulares el aislamiento impide la adaptabilidad a estas condiciones (Fernández-Palacios *et al.*, 2001), dificultando el proceso de adaptación. De hecho, se ha reportado que la corriente del niño transporta aguas más cálidas de lo normal, lo que podría crear modificaciones en el ecosistema del bosque nuboso (ACMC, 2007); lo cual pondría en peligro no solo a *S. holdridgei*, sino a las demás especies mencionadas anteriormente que dependen de su estabilidad en el ecosistema. Finalmente, es de considerar que aunque la isla es relativamente joven (2,2 a 1,5 millones de años) (Rojas & Alvarado, 2012); con el aumento de su edad la estructura geológica puede verse afectada a causa del cambio de su entorno físico a consecuencia de eventos como, hundimientos, erosión continua y vulcanismos; lo cual, genera presión sobre el estado de la diversidad genética de las especies (Stuessy, 2007).

#### **4.2 Estructura y diferenciación genética**

El análisis AMOVA mostró que la especie presenta un comportamiento muy particular en cuanto a la variación interpoblacional; ya que según Hamrick, Godt & Sherman (1992) el parámetro medio de variación interpoblacional para especies leñosas se da en un rango de entre 10 y 15%; y la diferenciación genética entre estas subpoblaciones fue de tan solo 3% (Cuadro 5). Algunos casos con resultados dentro de ese rango se dieron en especies como, *Dalbergia retusa* con un 8% de variación interpoblacional (Chavarria-Lines, 2006), *Cedrela liolloi* con un 15% y *Cedrela Balansae* con un 5% (Zelener *et al.*, 2012). Asimismo, en *Terminalia amazonia* se detectó un 5,6% utilizando marcadores moleculares RAPD (Pitcher, Shore & Kellman, 2003).

El valor del coeficiente de diferenciación genética interpoblacional ( $F_{ST}$ ) fue de 0,076; mientras su análogo ( $\Phi_{PT}$ ) fue de 0,029. Se tiene que el primer valor, es el más confiable debido a que Lynch & Milligan (1994) lo desarrollaron para el programa AFLPsurv, para calcular un coeficiente  $F_{ST}$  adaptado para datos binarios, dado que el coeficiente  $F_{ST}$  se calcula generalmente para datos codominantes. Ambos valores son similares y se consideraron bajos, ya que un valor menor a 0,15 indica que el grado de diferenciación genética es significativamente escaso (Sosa *et al.*, 2002). Lo cual, indica que el flujo genético entre subpoblaciones es de moderado a alto.

Algunos casos comparables, son los reportes en *Swietenia macrophylla* con un  $F_{ST}$  de 0,095 (Trujillo-Sierra, Delgado-Valerio, Ramírez-Morillo, Rebolledo-Camacho & Pérez-Nasser, 2013), *Dalbergia retusa* con un valor de  $F_{ST}$  de 0,076 (Chavarria-Lines, 2006) y en *Terminalia amazonia* un 0,038 (Pitcher *et al.*, 2003).

Se ha reportado que las especies endémicas con reproducción exógama normalmente cumplen un patrón en el que la mayor variación genética se da dentro de poblaciones (Esparza-Olguín, 2004). En este caso, los valores  $F_{ST}$  junto con los resultados en el Apéndice 1, demuestran que lo más probable es que la especie este definida como una sola población (metapoblación) con poca estructura, compuesta por dos subpoblaciones o “demes” que evolutivamente comparten información genotípica significativa y que apenas comienzan a mostrar signos de divergencia que podría tener relación con su ubicación geográfica, y que todavía conservan altas tasas de flujo génico entre ellas. Esto concuerda con la hipótesis inicial planteada, en la que se esperaba que hubiera algún tipo de diferenciación entre subpoblaciones debido a las diferencias fenotípicas presentadas por las subpoblaciones según el rango altitudinal; ya que, por ejemplo, en el bosque nuboso los árboles presentan menor altura, hojas más gruesas y pequeñas y menor dominancia apical que en el bosque pluvial premontano. Esas características morfológicas pueden deberse meramente a factores ambientales y no genéticos.

Según Frankham (1997) la estructura genética interpoblacional es el resultado de la distribución geográfica y el espacio de subpoblaciones entre las cuales existen diferencias genéticas. A su vez, Sosa *et al.* (2002) apoya que esta diferenciación se debe también a aspectos como la capacidad de migración o la existencia de barreras geográficas y ecológicas. Por lo que, el flujo genético tiende a darse de forma más fluida dentro de las islas, en comparación con el flujo genético entre islas (Maki, 2001). Con relación a lo descrito anteriormente, se debe tener en cuenta que las subpoblaciones muestreadas están distribuidas geográficamente de forma continua, y que su definición se dio por el hecho particular de la diferencia presentada por tipo de bosque al que pertenecen los individuos (fenotipo) que están descritos por su rango altitudinal.

### 4.3 Análisis de agrupamiento

El dendrograma realizado (Figura 3), muestra que las subpoblaciones muestreadas tienden a separarse en dos subgrupos, cuyos individuos se entremezclan sin una definición clara en la distribución espacial por subpoblación, ni por sitios de colecta. Al no haber diferencias significativas entre subpoblaciones, se podría decir que el *pool* genético de la especie se debe a unos pocos ancestros comunes que se destacan en la zona de Llanos de Palo de Hierro en el bosque pluvial premontano, esto dada la relación presentada entre la distancia genética y la distribución espacial de las subpoblaciones. Lo cual, apoya la hipótesis del alto grado de emparentamiento discutido anteriormente, a partir del índice de similitud.

En el análisis preliminar de Coordenadas Principales (PCoA) aplicado, se observan resultados similares y se tiene que los primeros componentes corresponden a 11,96 % y 8,18% de la variación genética total. En la Figura 4, se observa de forma similar al dendrograma una concentración de los individuos de ambas subpoblaciones; notando en particular la separación de una fracción de los individuos en los cuadrantes uno y dos, que corresponden con individuos de la Subpoblación 2 (bosque nuboso) y de la Subpoblación 1 (pluvial premontano).

El análisis de agrupamiento bayesiano (Apéndice 1), concuerda con los resultados discutidos anteriormente, ya que se determinó que existe una gran probabilidad de que la especie esté representada por dos subpoblaciones en las cuales no hay una total separación genética entre los individuos, ya que existe un amplio intercambio genético entre ambas subpoblaciones. Aunque al tratarse de una especie relativamente joven, es de esperarse que con el tiempo (millones de años) se cumpla una tendencia hacia la separación; como se puede corroborar en la Figura 4. De esta manera, los datos sugieren que los moderados niveles de diversidad presentados pueden explicarse por la alta similitud de los individuos y la forma de agrupación en la que están dispuestos; lo cual implica que exista una alta probabilidad de parentesco.

Los individuos que presentaron mayores distancias genéticas respecto al conjunto principal pudieron proceder de distintos bancos de semillas. Para explicar esta separación genética, se planteó la teoría de que la colonización de la especie pudo deberse a más de un evento migratorio; basándose en la historia geológica reportada por Castillo *et al.* (1988). Se especula

que los primeros ancestros pudieron llegar a la isla en la primera etapa de formación (2.2-1.97 Ma) en donde se integró el escudo volcánico y se edificaron las rocas más antiguas, que en este caso darían forma a lo que hoy se conoce como Cerro Yglesias. Y la siguiente o siguientes dispersiones pudieron darse en etapas posteriores, durante la formación de la caldera (erupciones piroclásticas) (1,96-1,92 Ma) que ahora se considera el noreste de la isla alrededor de la Bahía Wafer o cuando los flujos de lava fisúales se desplazaron hacia el sudoeste (1,91-1,51 Ma).

Se debe comprender que en poblaciones naturales el equilibrio del flujo genético se mantiene por la influencia que ejercen los dispersores de semillas y polen; ya que esa dinámica define la estructura genética de las especies en el ecosistema (Meza, 2010). Esto porque los sistemas de cruzamiento influyen directamente en la proporción de variabilidad genética de las poblaciones (Hamrick & Godt, 1990).

Con relación a esto, se tiene que *S. holdridgei* se caracteriza por tener una alta capacidad de producción de semillas, con un sistema de dispersión interno poco eficiente. Ya que las semillas son de tipo barócoro (Trusty *et al.*, 2006), por lo que los individuos poseen una alta predisposición a establecerse en el sitio de caída y es común encontrarlas bajo el dosel a pocos metros del árbol progenitor; provocando un alto impacto en la estructura genética local de las poblaciones (Willson, 1993). Es muy probable que gran parte de la regeneración esté correlacionada genéticamente (medios hermanos o hermanos completos). Asimismo, el patrón de dispersión también se ve influenciado por la alta tasa de precipitación anual (5000-7000 mm) (Montoya, 2007), ya que permite el transporte lento y discontinuo de las semillas por las laderas y los cauces de las diferentes cuencas, desplazándose hacia zonas planas. Este patrón, explica la baja diversidad presentada para el bosque nuboso; ya que es de esperarse que se generen sectores con individuos ínfimamente relacionados (consanguinidad), por causa de la incapacidad de las semillas de trasladarse a grandes distancias, lo que permite que exista una elevada similitud genética entre los individuos (Nason, 2002) (Figura 4). Además, recientemente también se ha reportado que los cerdos tienen una participación mínima en el proceso, ya que fueron introducidos recientemente en el año 1793 (Sierra, 2001); y generan un patrón de dispersión invariable, centrándose principalmente en las zonas que recubren el bosque pluvial premontano, debido a que estos mamíferos frecuentan poco los sitios de mayor altura (bosque nuboso).

En cuanto al sistema de polinización de la especie, se desconoce si existe más de un protagonista que influya en el proceso. Hasta la fecha, solo se ha reportado al ave endémica conocida comúnmente como “Pinzón de Cocos” (*Pinaroloxias inornata*) (Stiles & Skutch, 2007). Según estudios previos, esa ave es capaz de alimentarse del néctar de al menos 29 especies de flores (Werner & Sherry, 1987) en la Isla del Coco; lo que es congruente con los hábitos alimenticios presentados para varias especies de Pinzones de las Islas Galápagos (Grant & Grant, 2002), que se vieron influenciados por una radiación adaptativa que afinó estas habilidades. De hecho, se ha reportado que por presiones ecológicas como la escasez de alimentos y el alcance de altas densidades poblacionales de esta ave; las especies pueden ampliar su nicho de alimentación, especializándose en la alimentación por néctar (Traveset *et al.*, 2015).

Por tanto, se denota que este sistema se da de forma más fluida, ya que se ha reportado que las especies polinizadas por aves llegan a tener una mayor conectividad funcional entre poblaciones, lo que promueve el flujo de genes y restringe la divergencia adaptativa local (Kramer, Fant & Ashley, 2011). Además, esta ave se encuentra distribuida en todos los pisos altitudinales presentes en la isla (Werner & Sherry, 1987); y se sabe que este tipo de polinizadores son capaces de recorrer distancias relativamente grandes. Esta afirmación, puede justificarse al comprender que el ave tuvo que desplazarse más de 800 km desde las Islas Galápagos en su migración hasta la Isla del Coco en su fase de colonización (Dalrymple & Cox, 1968). Lo cual explicaría, los datos presentados en la Figura 3. No obstante, es de considerar que la densidad poblacional de *S. holdridgei* es alta y que su distribución espacial está restringida al área de la isla. Por lo cual, al haber una floración extensa durante la mayor parte del año, es probable que el mismo polinizador visite más de una vez el mismo individuo; y se presenten autopolinizaciones y por consiguiente autofecundaciones; que podría promover la endogamia (Nason, 2002). También se ha reportado que un factor limitante en el proceso de polinización puede llegar a ser la territorialidad de las aves (Parra, Vargas & Eguiarte, 1993); ya que existen casos en que llegan a visitar las flores con el único objetivo de alimentarse sin llevar a cabo la acción de polinización (Torices, 2014), por lo cual el ciclo de polinización no siempre es exitoso.

#### 4.4 Implicaciones para la conservación

A pesar de que el Parque Nacional Isla del Coco (PNIC) es un ecosistema protegido, considerado Patrimonio de la Humedad desde 1997 (UNESCO) y declarado humedal de importancia internacional para la Convención RAMSAR desde 1998 (Trusty *et al.*, 2006); no ha pasado invicto ante las repercusiones de la intrusión humana. Desde continuas intervenciones por parte de embarcaciones balleneras y piratas en busca de refugio, hasta intentos infructuosos de colonización por búsqueda de tesoros, que dejaron como resultado extensas áreas deforestadas en las bahías (Bolívar, Rivinsky & Wo Ching, 2000; Porrás-Jiménez *et al.*, 2014) e introducciones accidentales y no accidentales de especies invasoras de flora (5 especies) y fauna (6 especies) (UICN, 2017). Hasta la fecha, estas intervenciones continúan acarreamo problemas que implican un alto impacto en el desarrollo de la ecología de los bosques; aunque se desconoce ese nivel de impacto.

Se ha detallado en diversos estudios que el disturbio humano juega un papel fundamental en la pérdida de diversidad, en especial cuando se trata de la introducción de especies exóticas; por su capacidad de desatar cambios radicales en la abundancia e integridad del “*pool*” genético de las especies nativas, logrando crear hasta una extinción local (Sans, Caño & Green, 2008).

En este punto, es indispensable diseñar estrategias de intervención para la conservación de las especies que presentan algún grado de amenaza. Para ello, un aspecto clave es conocer la distribución de la variabilidad genética en las poblaciones (Hamrick, Godt, Murawski & Loveless, 1991); ya que este parámetro se considera el pilar principal que marca el éxito biológico y la capacidad de adaptación de las especies a las condiciones ambientales y evolutivas a las que están expuestas (corto y largo plazo) (Holsinger & Gottlieb, 1991). De esta manera, los datos reportados en este estudio mediante la aplicación de la metodología AFLP’s son de gran importancia para la comprensión del estado actual de la especie respecto a la estructura y diversidad genética conformada por las subpoblaciones analizadas de *S. holdridgei*. Se tiene que la mayor variación genética se da dentro de las subpoblaciones o “*demes*”, difiriendo genéticamente en tan solo un 3%, lo cual indica que la especie presenta poca estructura genética; con una diversidad genética promedio moderada (0,201), considerando que se trata de una especie endémica insular.

En este sentido, también es prioritario evaluar las relaciones ecológicas presentes entre *S. holdridgei* y el efecto de las especies introducidas sobre ella; con el propósito de fortalecer la base informativa acumulada y crear un perfil sólido para la toma de decisiones respecto a la conservación de las especies. Hasta la fecha en el PNIC los recursos investigativos se concentran principalmente en los campos de biología marina, geología marina, oceanografía (Córtes, 2008), y estudios básicos de estructura y composición florística (Bonilla, 2017; Porras-Jiménez, 2012; Porras-Jiménez *et al.*, 2014; Trysty *et al.*, 2006; entre otros). Por lo tanto, es común y altamente probable que la resolución de los Planes de Manejo propuestos por el SINAC, basen sus estrategias de conservación y manejo, en el aspecto de la dinámica de poblaciones, sin contemplar la importancia del recurso genético en el mantenimiento de las especies a largo plazo. Por lo cual, este estudio es de gran peso en el futuro conservativo de las especies pertenecientes al PNIC.

## 5. CONCLUSIONES

La cantidad de fragmentos totales (122) obtenidos con la aplicación de la técnica AFLP es relativamente baja en comparación con los resultados obtenidos para otras especies forestales; no obstante, brindaron información suficiente para detectar de forma eficiente los niveles de variación genética presentes en la especie.

Al aumentar la cantidad de combinaciones de imprimadores selectivos, se podría reducir el grado de cercanía presentado por los individuos muestreados en el diagrama PCoA, bajo los datos de distancia genética obtenidos.

El índice de diversidad genética determinado para ambas subpoblaciones es bajo ( $h=0,201$ ) en comparación con resultados esperados para especies forestales tropicales con sistemas exogámicos.

La variación genética intrapoblacional mostrada (97%), se encuentra dentro del rango normal para especies endémicas pertenecientes a ecosistemas insulares.

Los sistemas de agrupamiento utilizados, definieron dos subpoblaciones o “demes” relacionadas genéticamente, con tendencia a una potencial separación por acción del tiempo y la evolución.

La presente caracterización genotípica de la especie no es concluyente en cuanto a determinar si las variaciones fenotípicas encontradas en el campo se deban al factor genético o ambiental, y en qué proporción se manifiesta cada uno.

Los protocolos estandarizados para la extracción de ADN y análisis AFLP para la especie *S. holdridgei* pueden emplearse como metodología de apoyo en futuros estudios genéticos y de conservación.



## 6. RECOMENDACIONES

Optimizar las técnicas de colecta, almacenamiento y transporte del material vegetal para obtener ADN de mayor calidad y aumentar el éxito de la amplificación de los fragmentos de ADN.

Para efecto de estudios posteriores, se recomienda probar las combinaciones de imprimadores funcionales faltantes (6) seleccionados en el estudio “Evaluación de marcadores moleculares AFLPs en *Sacoglottis holdridgei* Cuatrec. (Humiriaceae) en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica”, con el fin de obtener mayor cantidad de perfiles de amplificación.

Trabajar en la síntesis de imprimadores para la detección de marcadores moleculares como los microsatélites; para realizar comparaciones respecto a los valores de diversidad genética e indagar a profundidad acerca del comportamiento del flujo genético de la especie.

Realizar estadísticos que correlacionen datos fenotípicos y genéticos, con el fin de obtener resultados más concluyentes acerca del estado de la especie en el tiempo; de manera que se puedan estructurar estrategias de manejo y conservación más competentes.

Realizar estudios de la misma índole, en otras especies del género *Sacoglottis* para poder comparar y establecer el grado de diferenciación y relaciones filogenéticas entre ellas.

## 7. REFERENCIAS

- Acosta-Vargas, L. G. (2016). Population status of the tree *Sacoglottis holdridgei* (Humiriaceae) at Isla del Coco National Park, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 64(a), 263-275. doi: <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v64i1.23455>
- Área de Conservación Marina Isla del Coco (ACMIC), Onca Natural. (2007). Plan de Manejo del Parque Nacional Isla del Coco-MINIAE. Disponible en: [http://www.acmic.sinac.go.cr/doc/plan\\_manejo\\_pnic.pdf](http://www.acmic.sinac.go.cr/doc/plan_manejo_pnic.pdf). Consultado el 17 de diciembre de 2018.
- Acuña, C., López, G., Marcucci, S., Pathauer, P., Torales, S., & Zelener, N. (2005). *Eucalyptus globulus*: Uso de AFLP para determinar los posibles orígenes de razas locales. *Idia XXI. Revista de Información sobre Investigación y Desarrollo Agropecuario*, 5(8), 149-152.
- Antunes Carvalho, F., & Sousa de Holanda, A. S. (2018). Flora de la Serra dos Carajás sarcas, Pará, Brasil: Humiriaceae. *Rodriguesia*, 69(3), 1143-1145.
- Araya-Salas, M. (2018). *Evaluación de marcadores moleculares AFLPs en Sacoglottis holdridgei Cuatrec. (Humiriaceae) en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica* (Informe Técnico). Instituto Tecnológico De Costa Rica (ITCR), Cartago, Costa Rica.
- Araya-Valverde, E., Murillo-Gamboa, O., Aguilar, G., & Rocha, O. (2005). Relaciones genéticas en una colección de clones de *Gmelina arborea* (Roxb) reveladas con marcadores AFLP. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 2(6), ág-1.
- Backeljau, T., De Bruyn, L., De Wolf, H., Jordaens, K., Van Dongen, S., Verhagen, R., & Winnepenninckx, B. (1995). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and parsimony methods. *Cladistics*, 11(2), 119-130.
- Barahona Padilla, S. P. (2014). *Utilización de loci microsatélites y ADN mitocondrial para evaluar la estructuración genético-poblacional de la caballa (Scomber japonicus Houttuyn, 1782) en el Mar Peruano* (Tesis de Bachillerato). Escuela Académico

Profesional de Genética y Biotecnología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

- Barra, M., Salazar, E., Beltrán, B., & Sagredo, B. (2012). Simple and robust DNA extraction method for the large-scale analysis of genotypes containing high polyphenolic content, such as landraces of *Solanum tuberosum* and *Zea mays*. *Revista Ciencia e Investigación Agraria*, 39(3), 593-601.
- Bawa, K. (1974). Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. *Evolution*, 28(1), 85-92.
- Bogarín, D., Warner, J., Gigot, G., & Savolainen, V. (2008). *Epidendrum cocoense* (v. de errata publicada en 2016). La Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN 2008. doi: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T132831A3463741>
- Bolaños, R., & Watson, V. (1993). *Mapa ecológico de Costa Rica, según el sistema de clasificación de zonas de vida del mundo de L. R. Holdridge, Escala 1: 200.000* [Mapa ecológico]. Centro Científico Tropical, San José, Costa Rica.
- Bolívar, A., Rovinski, Y., & E. Wo Ching. (2000). *La pesca en la Isla del Coco. Estudio integral para el mejoramiento del control pesquero en la zona de influencia del Área de Conservación Marina y Terrestre Isla del Coco*. San José, Costa Rica: Fundación de Amigos de la Isla del Coco (FAICO).
- Bonilla, R. (2017). *Evaluación de los bosques del Parque Nacional Isla del Coco-Costa Rica* (Tesis de Licenciatura). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.
- Callen, D., Thompson, A., Shen, Y., Phillips, H., Richards, R., Mulley, J., & Sutherland, G. (1993). Incidence and origin of null alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. *The American Journal of Human Genetics*, 52(5), 922-927.

- Carrillo, A. M., & Granadilla, O. A. (2010). Principales problemas que afectan específicamente a la biodiversidad en islas. *Ambienta: La revista del Ministerio de Medio Ambiente*, (91), 127-136.
- Castillo, P., Batiza, R., Vanko, D., Malavassi, E., Barquero, J., & Fernandez, E. (1988). Anomalously young volcanoes on old hot-spot traces: I. Geology and petrology of Cocos Island. *Geological Society of America Bulletin*, 100(9), 1400-1414.
- Cavers, S., Navarro, C., Hopkins, P., Ennos, R. A., & Lowe, A. (2005). Regional and population-scale influences on genetic diversity partitioning within Costa Rican populations of the pioneer tree *Vochysia ferruginea*. *Silvae Genetica*, 54(1-6), 258-264.
- Chavarría-Lines, A. (2006). *Variación genética del árbol tropical en peligro de extinción Dalbergia retusa Hemsl. (Papilionaceae) en Costa Rica, utilizando el análisis de AFLP* (Tesis de Maestría). Universidad de Costa Rica (UCR), San José, Costa Rica.
- Cortés, J. (2008). Historia de la investigación marina de la Isla del Coco, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 56(2), 1-18.
- Cortés, J. (2016). Isla del Coco: coastal and marine ecosystems. Costa Rican Ecosystems. In M. Kapelle (Ed.), *Costa Rican Ecosystems* (pp: 162-191). Chicago, USA: University of Chicago Press.
- Crespillo, M., Luque, J. A., Paredes, M. R., & Barrio, P. A. (2012). *Criterios mínimos recomendados para la Aceptación y Evaluación de Perfiles Mezclas*. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Departamento de Barcelona, (1), 25.
- Cuatrecasas, J. (1961). A taxonomic revision of the Humiriaceae. *Contributions from the U.S. National Herbarium*, 35(2), 25-214.
- Cuatrecasas, J. (1964). Miscelánea sobre Flora Neotrópica, I. *Ciencia*, 23(4), 137-151.
- Dalrymple, G., & Cox, A. (1968). Paleomagnetism, Potassium- Argon ages and petrology of some volcanic rocks. *Nature*, 217(5126), 323-326.

- Dávila, A., Affenzeller, M., Tribsch, A., Díaz, V., & Comes, H. P. (2017). AFLP diversity and spatial structure of *Calycophyllum candidissimum* (Rubiaceae), a dominant tree species of Nicaragua's critically endangered seasonally dry forest. *Heredity*, *119*(4), 275-286.
- De La Torre, A. (2013). Estructura poblacional, diversidad y flujo genético en poblaciones ribereñas de cedro (*Cedrela odorata* L.). *REPORTEMANU*, *80*.
- DeJode, D. R., & Wendel, J. F. (1992). Genetic diversity and origin of the Hawaiian Islands cotton, *Gossypium tomentosum*. *American Journal of Botany*, *79*(11), 1311-1319.
- Delaveau, C., Fuentes-Arce, G., Ruiz, E., Hasbún, R., Uribe, M., & Valenzuela, S. (2013). Variabilidad genética mediante AFLP en tres relictos de *Gomortega keule* Baillon: especie endémica chilena en peligro de extinción. *Gayana. Botánica*, *70*(2), 188-194.
- De Vicente, M. C., López, C., & Fulton, T. (2004). *Genetic diversity analysis with molecular marker data: learning module*. Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI).
- Dowling, T. E. (1996). Nucleic acids, III: analysis of fragments and restriction sites- Molecular Techniques. En D. M. Hillis, C. Moritz & B. K. Mable (Ed.), *Molecular Systematics*, (pp. 249-320). Sunderland, USA: Sinauer Associates, Inc.
- Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, *4*(2), 359-361.
- Eguiarte, L., Aguirre, E., Scheinva, E., González, A., & Souza V. (2010). Diferenciación, flujo génico y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. En A. Becerra, A. Castañeda, & D. Piñero (Eds.), *Evolución orgánica* (pp. 10-13). D.F., México: Universidad Nacional Autónoma de México. ISBN: 978-607-02-6738-3

- Esparza-Olguín, L. G. (2004). ¿Qué sabemos de la rareza en especies vegetales? Un enfoque genético-demográfico. *Boletín de la sociedad Botánica de México*, (75).
- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*, 131(2): 479-491.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8), 2611-2620.
- Hamrick, J. L., Godt, M. J. W., Murawski, D. A., & Loveless, M. D. (1991). Correlation between species traits and allozyme diversity: Implications for Conservation Biology. In: D.A. Falk & K.E. Holsinger. (Ed.), *Genetics and Conservation of Rare Plants* (pp. 75-86). Nueva York, USA: Oxford University Press.
- FAO. (2001). Forest Genomics for conserving adaptive Genetic Diversity. En K. V. Krutovskii, & D. B. Neale, *Forest Genetic Resources Working Papers*. Rome, Italy: Forest Genetic Resources (FAO).
- Fernández-Palacios, J. M., & Martín-Esquivel, J. L. (2001). Las islas como experimento de laboratorio. En J. M. Fernández-Palacios & J.L. Martín-Esquivel (Ed.), *Naturaleza de las Islas Canarias. Ecología y Conservación* (pp. 39-44). Santa Cruz de Tenerife, España: Publicaciones Turquesa.
- Francisco- Ortega, J., Santos- Guerra, A., Kim, S. C., & Crawford, D. J. (2000). Plant genetic diversity in the Canary Islands: a conservation perspective. *American Journal of Botany*, 87(7), 909-919.
- Frankham, R. (1997). Do island populations have less genetic variation than mainland populations?. *Heredity*, 78(3), 311.

- Giordano, L. C. S. (2009). Humiriaceae Neotropical. En: W. Milliken, B. Klitgrd, & A. Baracat (2009 en adelante), Neotropikey - Clave interactiva y recursos de información para plantas con flores del Neotrópico. Recuperado de <http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Humiriaceae.htm>.
- Grant, P. R., & Grant, B. R. (2002). Darwin's finches. *Current Biology*, 15(16), 614-615.
- Grossenbacher, D. L., Brandvain, Y., Auld, J. R., Burd, M., Cheptou, P. O., Conner, J. K., ... & Petanidou, T. (2017). Self- compatibility is over- represented on islands. *New Phytologist*, 215(1), 469-478.
- Hamrick, J., & M. Godt. (1990). Allozyme diversity in plant species. In: A.H.D. Brown, M.T. Cregg, A.L. Kahler, & B.S. Weir (Ed.), *Plant population genetics, breeding and genetic resources* (pp. 43-63). Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc.
- Hamrick, J., Godt, M., & Sherman, S. (1992). Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest*, 6(42), 95- 124.
- Holsinger K.E., & Gottlieb L.D. (1991). Conservation of rare and endangered plants: principles and prospects. In: D.A. Falk & K.E. Holsinger. (Ed.), *Genetics and Conservation of Rare Plants* (pp. 195-208). Nueva York, USA: Oxford University Press.
- IMN (Instituto Meteorológico Nacional). (2018). Condiciones actuales del tiempo: Estación Automática de base Wafer, Isla del Coco, Puntarenas, Costa Rica.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., & Spencer, C. A. (2006). Genética de la Conservación. En W. S. Klug, M. R. Cummings, & C. A. Spencer (Ed.), *Conceptos de genética: Octava edición* (pp. 785-786). Madrid, España: Pearson Educación.
- Kramer, A. T., Fant, J. B., & Ashley, M. V. (2011). Influences of landscape and pollinators on population genetic structure: examples from three *Penstemon* (Plantaginaceae) species in the Great Basin. *American journal of botany*, 98(1), 109-121.

- Kress, W., & Beach, J. (1994). Flowering plant reproductive systems. *La Selva: ecology and natural history of a Neotropical rain forest*, 19, 33.
- Lammi, A., Siikamäki, P., & Mustajärvi, K. (1999). Diversidad genética, tamaño de la población y estado físico en poblaciones centrales y periféricas de una planta rara *Lychnis viscaria*. *Conservation Biology*, 13(5), 1069-1078. Recuperado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1523-1739.1999.98278.x>
- Le Roux, J. J., Strasberg, D., Rouget, M., Morden, C. W., Koordom, M., & Richardson, D. M. (2014). Relatedness defies biogeography: the tale of two island endemics (*Acacia heterophylla* and *A. koa*). *New Phytologist*, 204(1), 230-242.
- Lodhi, M., Ye, G., Weeden, N., & Reisch, B. (1994). A simple and efficient method for DNA lysis from grapevine cultivars and *Vitis species*. *Plant Molecular Biological Report*, 12, 6-13.
- Longo-Sánchez, M. C., & Blanco, J. F. (2009). Sobre los filtros que determinan la distribución y la abundancia de los macroinvertebrados diádromos y no-díadromos en cada nivel jerárquico del paisaje fluvial en islas/On the filters determining the distribution and abundance of diadromous and non-diadromous macroinvertebrates in each hierarchical level of the fluvial landscape of islands. *Actualidades Biológicas*, 31(91), 179-195.
- Lynch, M., & Milligan, B. G. (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular ecology*, 3(2), 91-99.
- Malavassi, E. (1983). Visita al Parque Nacional Isla del Coco. *Revista Geográfica de América Central*, (15-16), 211-216.
- Maki, M. (2001). Genetic differentiation within and among island populations of the endangered plant *Aster miyagii* (Asteraceae), an endemic to the Ryukyu Islands. *American Journal of Botany*, 88(12), 2189-2194.



- Meza, N. (2010). *Validación del protocolo AFLP para Caracterización Molecular y Análisis de Diversidad Genética en Dipteryx panamensis (Pitt.) (Fabaceae)* (Informe de trabajo Final de Graduación). Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.
- Montoya, M. (2007). Conozca la Isla del Coco. Una guía para su visitación. En Organización para los Estudios Tropicales (OET) (Ed.), *BioCurso Isla del Coco: la isla del tesoro* (pp: 35-90). San Pedro, Costa Rica: OET.
- Montoya, M. (2016). Isla del Coco: Terrestrial Ecosystems. Costa Rican Ecosystems. In M. Kapelle (Ed.), *Costa Rican Ecosystems* (pp: 192-244). Chicago, USA: University of Chicago Press.
- Moreno, M. V. (2010). *Diversidad genética en girasol cultivado: análisis de una colección de germoplasma local para su aplicación en programas de mejoramiento* (Tesis Doctoral). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Nason, J. (2002). La estructura genética de las poblaciones de árboles. En M. Guariguata, & G. Kattán (Ed.), *Ecología y conservación de bosques neotropicales* (pp. 299-328). Cartago, Costa Rica: Libro Universitario Regional.
- Navarro, C., Cavers, S., Colpaert, N., Hernández, G., Breyne, P., & Lowe, A. J. (2005). Chloroplast and total genomic diversity in the endemic Costa Rican tree *Lonchocarpus costaricensis* (JD Smith) Pittier (Papilionaceae). *Silvae Genetica*, 54(1-6), 293-300.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3), 583-590.
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. New York, USA: Columbia university press.
- Nybom, H. (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular ecology*, 13(5), 1143-1155.

- Ortiz, E., & Soto, C. (2014). Atlas Digital de Costa Rica 2014. [CD- Rom]. Cartago, Costa Rica: Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Parra, V., Vargas, C. F., & Eguiarte, L. E. (1993). Reproductive- biology, pollen and seed dispersal, and neighborhood size in the hummingbird- pollinated *Echeveria gibbiflora* (Crassulaceae). *American Journal of Botany*, 80, 153-159.
- Peakall, R., & Smouse, P. (2006). GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1), 288-295.
- Peakall, R., & Smouse, P. (2006). Appendix 1-Methods and Statistics in GenAlEx 6. *Australian National University, Canberra*.
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28, 2537-2539.
- Pérez-Consuegra, N., Góngora, D. E., Herrera, F., Jaramillo, C., Montes, C., Cuervo-Gómez, A. M., ... & Bayona, G. (2018). New records of Humiriaceae fossil fruits from the Oligocene and Early Miocene of the western Azuero Peninsula, Panamá. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 70(1).
- Pitcher, R., Shore, J. S., & Kellman, M. (2003). Genetic diversity of the tropical tree *Terminalia amazonia* (Combretaceae) in naturally fragmented populations. *Heredity*, 91(3), 307.
- Porras-Jiménez, M. A. (2012). *Dinámica de los bosques del Parque Nacional Isla del Coco, Área de Conservación Marina Isla del Coco* (Tesis de Licenciatura). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.
- Porras-Jiménez, M. A., Acosta-Vargas, L. G., Castillo-Ugalde, M., & Quesada-Monge, R. (2014). Estructura y composición florística del bosque nuboso de la Isla del Coco. *Revista Tecnología en Marcha*, 27, 22-36.
- Poulin, E. (2006). *Biodiversidad en Juan Fernández* (Informe N°21). Santiago, Chile: Universidad de Chile, Fundación Oceana.

- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, *155*(2), 945-959.
- QIAGEN. (2016). DNeasy Plant Mini Kit. QIAGEN Quick-Start Protocol. Cat#69104 and 69109. Recuperado de <https://www.qiagen.com/nl/>
- QIAGEN. (2016). QIAxcel Advanced User Manual, v. 6. Cat# HB-0804-009. Recuperado de <https://www.qiagen.com/nl/>
- Rojas, W., & Alvarado, G.E. (2012). Marco geológico y tectónico de la Isla del Coco y la región marítima circunvecina, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, *60*(3), 15-33.
- Rojo Arreola, L. C. (2005). *Estructura genética y poblacional de Tursiops truncatus (Cetacea: delphinidae) en el Golfo de California: ¿Son las formas costera y oceánica genéticamente divergentes?* (Tesis de grado). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, USA
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, *4*, 406-425.
- Santamarta-Cerezal, J.C. (2017). *Tratado de Minería de Recursos Hídricos en Islas Volcánicas Oceánicas*. Sevilla, España: Colegio Oficial de Ingenieros de Minas del Sur de España. ISBN 9788460876212.
- Sans, X., Caño, L., & Green, A. (2008). Las especies invasoras reducen la diversidad de especies nativas y su integridad genética. En M. Vilà, F. Valladares, A. Traveset, L. Santamaría, & P. Castro (Ed.), *Invasiones biológicas* (pp. 103-116). Madrid, España: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Serrato-Díaz, A., & Ramos-Ortiz, O. (2014). AFLP: Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados. En A. R. Cornejo, A. S. Díaz, B. Rendón, & M. G. Rocha (Ed.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (pp. 127-147). Tlalpan, México: SEMARNAT, INECC, UAM-I.

- Sierra, C. (2001). The feral pig (*Sus scrofa*, Suidae) in Cocos Island, Costa Rica: rootings, soil alterations and erosion. *Revista de Biología Tropical*, 49(3-4), 1159-1170.
- Sistema Nacional de Áreas de Conservación, CR. (SINAC). (2016). *Propuesta de actualización del Plan General de Manejo del Parque Nacional Isla del Coco 2017-2026* (Ed.), H. Acevedo V. Obando & Y. Villalobos. San José, Costa Rica. 143 p.
- Simpson, J. (1997). Amplified fragment length polymorphisms (AFLP). *Botanical Sciences*, (60), 119-122.
- Solano-Flórez, G., del Pilar Márquez-Cardona, M., & Schuler, I. (2009). Optimización de la extracción de ADN de *Passiflora ligularis* para el análisis por medio de marcadores moleculares. *Universitas Scientiarum*, 14(1), 16-22.
- Sosa, A. P., Batista, F. J., González-Pérez, M. A., & Bouza, N. (2002). Conservación genética de las especies vegetales amenazadas. En A. Bañares (Ed.), *Técnicas de diagnóstico del estado de conservación. Biología de la Conservación de Especies Amenazadas* (pp. 2-27). Madrid, España: Organismo Autónomo de Parques Nacionales. Ministerio de Medio Ambiente.
- Stebbins, GL. (1957). Self fertilization and population variability in the higher plants. *American Naturalist*, 91, 337-354.
- Stiles, F. G., & Skutch, A. F. (2007). *Guía de aves de Costa Rica*. Cartago, Costa Rica: Editorial INBio. 216 p.
- Stuessy, T. F. (2007). Evolution of specific and genetic diversity during ontogeny of island floras: the importance of understanding process for interpreting island biogeographic patterns. In M.C. Ebach, & R.S. Tangney (Ed.), *Biogeography in a changing world* (pp. 117-133). Boca Raton, FL: CRC Press.

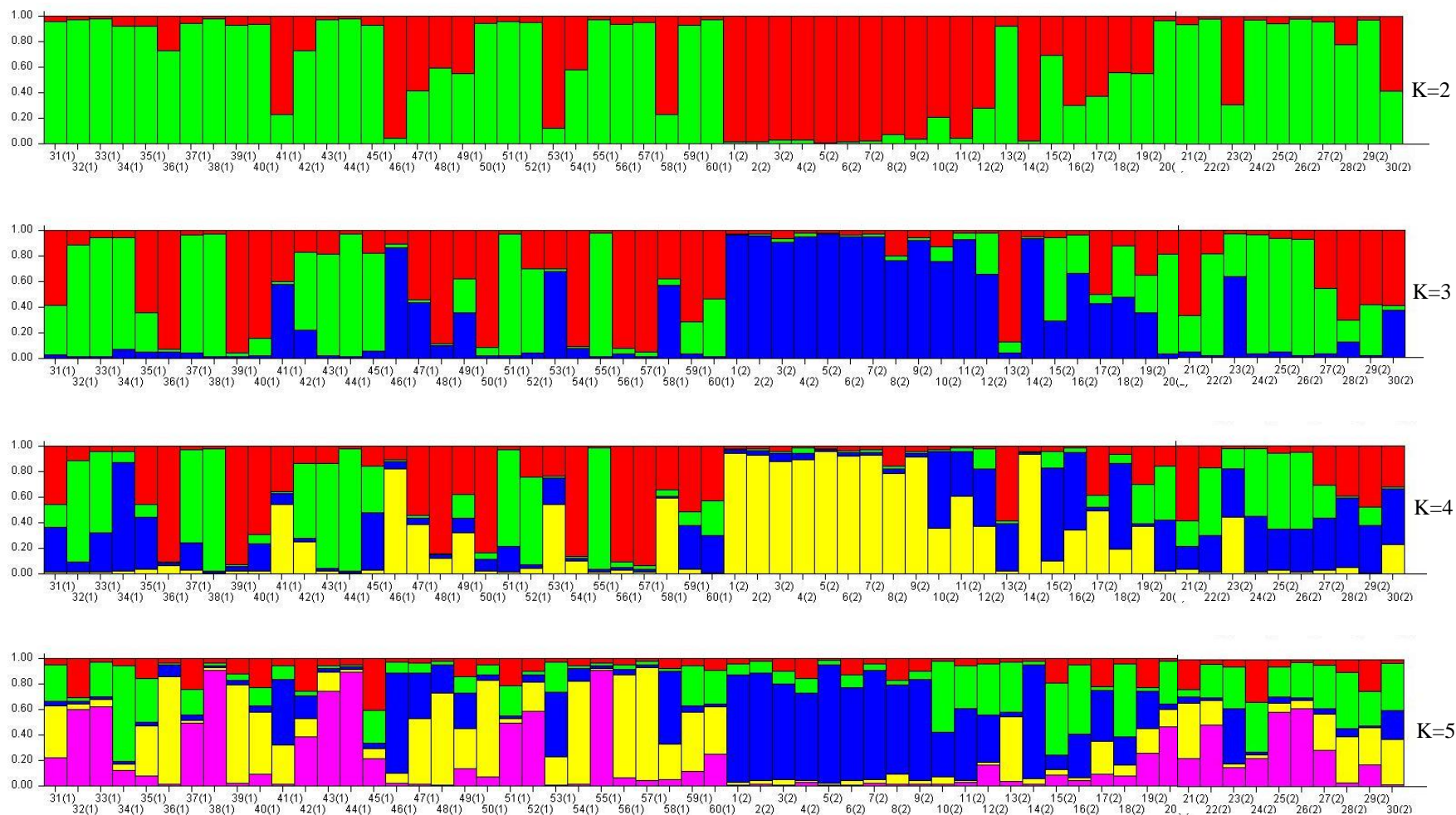
- Stuessy, T. F., Takayama, K., López-Sepúlveda, P., & Crawford, D. J. (2014). Interpretation of patterns of genetic variation in endemic plant species of oceanic islands. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 174(3), 276-288.
- Traveset, A. (1999). Importancia de los mutualismos para la conservación de biodiversidad en ecosistemas insulares. *Revista Chilena de Historia Natural*, 72, 527-538.
- Traveset, A., Olesen, J. M., Nogales, M., Vargas, P., Jaramillo, P., Antolín, E., ... & Heleno, R. (2015). Bird-flower visitation networks in the Galápagos unveil a widespread interaction release. *Nature communications*, 6, 6376.
- Torices, R. (2014). La ecología reproductiva de las plantas: estrategias reproductivas, fuerzas ecológicas y evolutivas. *Revista Ecosistemas*, 23(3), 1-5.
- Trujillo-Sierra, J. E., Delgado-Valerio, P., Ramírez-Morillo, I., Rebolledo-Camacho, V., & Pérez-Nasser, N. (2013). Variación genética en poblaciones mexicanas de *Swietenia macrophylla* King, una especie tropical en expansión geográfica reciente. *Botanical Sciences*, 91(3), 307-317.
- Trusty, J. L., Kesler, H. C., & Delgado, G. H. (2006). Vascular flora of Isla del Coco, Costa Rica. *Proceedings of the California Academy of Sciences, Fourth Series*, 57(7), 247-355.
- Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). (2017). Cocos Island National Park - 2017 Conservation Outlook Assessment. Recuperado de <https://www.worldheritageoutlook.iucn.org/node/1080/pdf>
- Valadez, M.E., & Kahl, G. (2000). *Huellas de ADN en genomas de plantas: teorías y protocolos de laboratorio*. D.F., México: Editorial Mundi-Prensa, S.A. 147 p.
- Valdés-Infante, J., & Rodríguez, N.N. (2003). Marcadores moleculares de ADN y su aplicación en frutales tropicales. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Recuperado de <http://fao.cubasi.cu> (Sitio virtual de la FAO). 25 p.

- Vekemans, X. (2001). AFLPsurv V. 1.0 a software for genetic diversity analysis with AFLP population data. Université Libre de Bruxelles.
- Velázquez, L. P. A., Martínez, M. D. C. A., & Romero, A. C. (2014). Extracción y purificación de ADN. En A. R. Cornejo, A. S. Díaz, B. Rendón, & M. G. Rocha. (Ed.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (pp. 1-26). Tlalpan, México: SEMARNAT, INECC, UAM-I.
- Villalobos-Barrantes, H. M., García, E. G., Lowe, A. J., & Albertazzi, F. J. (2015). Genetic analysis of the dry forest timber tree *Sideroxylon capiri* in Costa Rica using AFLP. *Plant systematics and evolution*, 301(1), 15-23.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., ... Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407- 4417.
- Ward, M., Dick, C. W., Gribel, R., & Lowe, A. J. (2005). To selfe, or not to self... A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees. *Heredity*, 95, 246-254.
- Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K., & Kahl, G. (2005). Detecting DNA Variation by Molecular Markers. In K. Weising, H. Nybom, M. Pfenninger, K. Wolff, & G. Kahl (Eds.), *DNA fingerprinting in plants: Principles, Methods, and Applications* (pp. 58-69). 2 ed. Boca Raton, USA: CRC press.
- Werner, T. K., & Sherry, T. W. (1987). Behavioral feeding specialization in *Pinaroloxias inornata*, the “Darwin's finch” of Cocos Island, Costa Rica. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(15), 5506-5510.
- Willson, M. (1993). Dispersal mode, seed shadows, and colonization patterns. En *Frugivory and seed dispersal: ecological and evolutionary aspects* (pp. 261-280). Springer, Dordrecht.

Zamora, A. (2008). *Estructura y composición florística de los bosques de bahía en el Parque Nacional Isla del Coco, Área de Conservación Marina Isla del Coco* (Práctica de especialidad). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.

Zelener, N., Soldati, M. C., Inza, M. V., Aguirre, R. R., Salek, D., Araujo, A., ... & Fornes, L. (2012). Distribución geográfica de la diversidad genética molecular de dos especies de *Cedrela* (*C. lilloi* y *C. balansae*) sujetas a severos procesos de degradación en la Selva Tucumano-boliviana. En *VIII Ciclo de Conferencia RRNN: Acuerdo Bioersity International-INTA*, Buenos Aires, Argentina. Recuperado de <http://www.mapforgen.org/proyectos.php#Cedrelalilloi>

## 8. APÉNDICES



**Apéndice 1.** Diagrama de barras realizado para la probabilidad de agrupamiento poblacional ( $K$ ) calculada con el programa *STRUCTURE* en la especie *S. holdridgei* en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica, 2019.