



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN

**EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA
GENÉTICA DE *Ceratozamia kuesteriana* REGEL.,
(ZAMIACEAE), EN TAMAULIPAS, MÉXICO:
PROPUESTA DE CONSERVACIÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN**

P R E S E N T A:

CUAUHTÉMOC ALAIN RUBIO TOBÓN

DIRECTOR DE TESIS:
DR. PABLO OCTAVIO AGUILAR

MINERAL DE LA REFORMA, HGO., 2019



Mineral de la Reforma, Hgo., a 8 de enero de 2019

Número de control: ICBI-D/014/2019
Asunto: Autorización de impresión de tesis.

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

Por este conducto le comunico que el comité revisor asignado al C. Cuauhtémoc Alain Rubio Tobón, alumno de la Maestría en Ciencias en Biodiversidad y Conservación con número de cuenta 222400, autoriza la impresión del proyecto de tesis titulado **"Evaluación de la diversidad y estructura genética de Ceratozamia kuesteriana Regel., (Zamiaceae), en Tamaulipas, México: Propuesta de conservación"** en virtud de que se han efectuado las revisiones y correcciones pertinentes.

A continuación se registran las firmas de conformidad de los integrantes del comité revisor.

PRESIDENTE Dr. Arturo Sánchez González

SECRETARIO Dr. Andrew Peter Vovides Papalouka

VOCAL Dr. Pablo Octavio Aguilar

SUPLENTE Dr. Aurelio Ramírez Bautista

Sin otro particular reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.



ORSC/IGMG



Ciudad del Conocimiento
Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia
Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo,
México. C.P. 42184
Teléfono: +52 (771) 71 720 00 ext. 2231
Fax 2109
direccion_icbi@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

DEDICATORIA

“No me juzgues por mis éxitos, júzgame por la cantidad de veces que me caí y me levanté de nuevo”
(Nelson Mandela)

A mi familia:

*“...Cada vez que tropecé en la vida, mi madre secó mis lágrimas, mi padre me animó a seguir adelante, mi hermano me ayudó a verlo como una anécdota y mis abuelos me consintieron, por lo que en realidad, nunca caí en la tristeza. Sé que soy dichoso, pues he tenido una familia, que me apoya de manera incondicional... **infinitas gracias**”*

*“Lo llaman suerte, pero es constancia. Lo llaman casualidad, pero es disciplina. Lo llaman genética, pero es sacrificio.
Ellos hablan, tu trabaja duro”*
(J. L. Borges)

AGRADECIMIENTOS



A el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada con número de CVU **822117**.

A la **Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH)** por el espacio brindado durante esta etapa de mi formación.

A el **Instituto Tecnológico de CD. Victoria, Tamaulipas** por el apoyo en la identificación y recolecta del material biológico para la realización de este proyecto.

A el **Proyecto 252807 de CONACYT-INFR-2015-01** por el apoyo en la infraestructura prestada dentro de la UAEH.

A mi **comité tutorial de Maestría** del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) por sus aportaciones para la realización de este proyecto, por lo que externo mis más sinceros agradecimientos a:

- **Dr. Pablo Octavio Aguilar:** Gracias por la oportunidad y confianza nuevamente brinda en mí para llevar a cabo este proyecto. Debo reconocer su gran dedicación, esmero y tiempo que me dedico durante esta etapa de mi formación académica... *“Infinitas gracias”*
- **Dr. Arturo Sánchez Gonzáles:** Por sus observaciones y asesorías que fueron fundamentales en la realización de este proyecto. Gracias por todo.
- **Dr. Aurelio Ramírez Bautista:** Por sus aportaciones y asesorías, además de su imprescindible conocimiento que apporto en la realización de este proyecto. Gracias por todo.
- **Dr. Andrew Peter Vovides Papalouka:** Me permito extenderle un reconocimiento especial por haber aceptado en formar parte de este proyecto y reconocerle la fascinante dedicación que le tiene a las cícadas. Además agradezco sus asesorías, observaciones y aportaciones que fueron imprescindibles en este proyecto. Por ultimo, quiero dar las gracias por la capacitación que me brindo durante el curso de “Microscopia Óptica” realizado en julio 2018 en las instalaciones del INECOL, Xalapa, Veracruz. Gracias por todo.

A la **Dra. Katia Adriana González Rodríguez** perteneciente al Museo de Paleontología: Por su grata amistad y confianza brindada en mí. Gracias por los consejos, las motivaciones y el tiempo brindado... *“Infinitas gracias”*

A la **Dra. Dulce María Galván Hernández y a su familia:** Por la grata hospitalidad brinda durante el “I Congreso Mexicano de Cícadas en Xalapa”, Veracruz, en octubre 2017. Muchas gracias.

Al **Ing. Agrónomo Enrique Favián Vega y a su esposa:** Por su amistad y su grata hospitalidad brinda durante mi estancia el Curso de “Microscopia Óptica” en Xalapa Veracruz en julio 2018. Muchas gracias.

A la **L.T. Guadalupe Elizabeth Chávez Ramírez** perteneciente a la Dirección de Autoaprendizaje de Idiomas de la UAEH: Por su basta paciencia y dedicación en la enseñanza de la Lengua Inglesa, además del tiempo brindado en la preparación del examen TOEFL. Muchas gracias.

A la **M. en C. Griselda Nallely Hernández Rico**: Por todo el apoyo brindado durante esta etapa de vida profesional, además de su grata amistad, comprensión y compañía... *“Infinitas gracias”*

A mis **compañeros de laboratorio de Genética**: Por el apoyo brindado, Muchas gracias por todo.

A **mi familia**: Por todo el apoyo incondicional brindado durante esta importante travesía de mi vida profesional... *“Infinitas gracias”*

ÍNDICE

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
CONTENIDO	6
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
RESUMEN	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. ANTECEDENTES	14
2.1 Las cícadas	14
2.2 Ecología.....	16
2.3 Amenazas a nivel mundial	18
2.4 Las cícadas mexicanas	21
2.4.1 Amenazas en México	23
2.4.2 Conservación en México	25
3. ESTADO DEL ARTE	27
3.1 Genética de poblaciones en cícadas	27
3.2 Efecto de las fuerzas evolutivas sobre la variabilidad genética de las cícadas	29
3.2.1 Selección natural	30
3.2.2 Flujo génico	31
3.2.3 Endogamia.....	32
3.2.4 Deriva génica.....	33
4. ESPECIE DE ESTUDIO	39
4.1 <i>Ceratozamia kuesteriana</i> Regel	39
4.2 Descripción.....	39
4.3 Estudios previos	42
5. HIPÓTESIS	44
6. JUSTIFICACIÓN	45
7. OBJETIVO GENERAL	46
8. OBJETIVOS PARTICULARES	46
9. MATERIALES Y MÉTODOS	47
9.1 Revisión bibliográfica	47
9.2 Sitios de Estudio.....	47
9.3 Colecta de material biológico.....	50
9.4 Extracción de DNA	51
9.5 Amplificación de los SSR	51
9.6 Análisis de datos.....	52
9.6.1 Diversidad genética	52
9.6.2 Estructura genética	53
9.6.3 Cuellos de botella	54

9.6.4 Selección natural	54
10. RESULTADOS.....	56
10.1 Diversidad genética	56
10.2 Estructura genética	56
10.3 Cuellos de botella	60
10.4 Selección Natural	62
11. DISCUSIÓN	63
11.1 Diversidad y estructura genética	64
11.2 Cuellos de botella	67
11.3 Selección natural	69
11.4 Estrategias de Conservación.....	70
11.4.1 Propagación artificial.....	71
11.4.2 Programas de manejo	72
12. CONCLUSIONES.....	74
13. LITERATURA CITADA	75
ANEXOS.....	101
1 Permiso de colecta.....	101
2 Protocolo para extracción de DNA en plantas de Doyle y Doyle (1987)	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Insectos específicos para la polinización de algunas cícadas en el mundo (Modificado de Schneider <i>et al.</i> , 2002).	17
Tabla 2. Estudios genéticos sobre la diversidad, estructura genética y rango geográfico de cícadas. HE: heterocigosis esperada; HO: heterocigosis observada; FST/GST: índice de diferenciación genética entre poblaciones; M: Marcador; N.L: Número de Localidades; N.C.I.M.: Número Calculado de Individuos Maduros; EC: Estatus de Conservación. <2 km ² : Puntual; 2-20km ² : Restringida; >20-200 km ² : Regional; >200 km ² : Amplia. Se integran los indicadores de diversidad Promedio ± DE por taxa.....	34
Tabla 3. Caracterización de las poblaciones de <i>C. kuesteriana</i> muestreadas en la Reserva de la Biosfera “El Cielo” (Tomado de Montelongo-Ruiz, 2016).	50
Tabla 4. Colecta de material biológico de las poblaciones de <i>C. kuesteriana</i> utilizadas en el análisis genético poblacional con marcadores codominantes microsátélites.	50
Tabla 5. Marcadores moleculares utilizados. Nombre del locus, secuencia de los iniciadores, temperatura de alineamiento (Ta), alelos por locus obtenidos en la estandarización (A) y tamaño en pares de bases de los alelos amplificados por marcador (pb); para los diez iniciadores propuestos por Meerow y Nakamura (2007). --- No amplificado para la especie.	52
Tabla 6. Descripción genética de cinco poblaciones de <i>Ceratozamia kuesteriana</i> en la reserva de la biosfera “El Cielo” en Tamaulipas. N: Tamaño de muestra, Na: Promedio de alelos por locus, Ne: Número efectivo de alelos por locus, I: Índice informativo, Ho: Heterocigosis observada, He: Heterocigosis esperada, F: Coeficiente de fijación, AP: Número de alelos privados por población, EHW: Equilibrio de Hardy-Weimberg, ***: p < 0.0001.....	56
Tabla 7. Número de individuos migrantes por generación (diagonal superior) e índices de diferenciación pareados (diagonal inferior) entre las localidades de <i>Ceratozamia kuesteriana</i> analizadas, Fst: Índice de diferenciación pareados, Nm: Migrantes por generación. * Diferencias significativas de acuerdo a la prueba AMOVA.	57
Tabla 8. Frecuencia de heterocigosidad (Heq) por loci determinado por el análisis de cuellos de botella para <i>Ceratozamia kuesteriana</i> . Pob: Población, LD: Loci con deficiencia de heterocigosidad, LE: Loci con exceso de heterocigosidad, H: Prueba de Wilcoxon, p: Probabilidad, CB: Intensidad del Cuello de Botella.....	61
Tabla 9. Frecuencias alélicas para los loci sometidos a presiones de selección natural por el modelo de Dirichlet, en las cinco poblaciones de <i>Ceratozamia kuesteriana</i> . pb: Pares de bases, HE: heterocigosis calculada, POP: población. Rojo alelos con baja frecuencia, potencialmente con selección en contra. Verde alelos con frecuencia alta, potencialmente con selección a favor. Amarillo alelos con baja frecuencia pero no dentro de lo esperado por un modelo de neutralidad.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Filogenia calibrada por registros fósiles de las cícadas actuales, obtenido por el modelo de probabilidad posterior de Yule (a) y de Muertes-Nacimientos (b) (Modificado de Codamine *et al.*, 2015). Los colores señalan la divergencia de los clados: 295.7 a 316.6 Ma del surgimiento del grupo (divergencia con respecto a *Ginkgo*); 140 a 206.4 Ma divergencia entre *Dioon* y *Cycas*, (Zamiaceae vs Cycadaceae); 116.3 a 170.3 Ma primera divergencia dentro de la familia Zamiaceae (*Stangeria* en amarillo con respecto al resto de los géneros de Zamiaceae). 15
- Figura 2.** Distribución mundial de las cícadas de acuerdo a Christenhusz *et al.*, 2011 (Modificado de Donaldson, 2003a). 19
- Figura 3.** Ubicación geográfica de los géneros mexicanos de la familia Zamiaceae. Se muestran las localidades tipo de las especies reportadas por género a la fecha (Modificado de Nicolalde-Morejón *et al.*, 2014). 23
- Figura 4.** Representación de una población pequeña, los fenómenos estocásticos incrementan el efecto de los problemas genéticos, por lo que la población sufre un vórtice de extinción (Tomado de Rocha y Gasca, 2007). 28
- Figura 5.** Características morfológicas de *C. kuesteriana*. a: Estructura, b: Foliolo, c: Microsporofito, d: Microsporangio, e: Megasperofitos con óvulos, f: Posición de los óvulos en la bráctea del megasperofito, g: Semillas maduras (Modificado de Vovides, 1985). 41
- Figura 6.** Comparación morfológica de megatróbilos de *C. kuesteriana* (A) y *C. sabatoi* (B). Fotos Ken Hill (A) y Juan Carlos López Domínguez (B). 42
- Figura 7.** Mapa del estado de Tamaulipas donde se señala la Reserva de la biosfera “El Cielo” y los sitios de colecta (P1 a P5). 49
- Figura 8.** Árbol de agrupamiento UPGMA considerando las distancias de Nei entre las poblaciones de *Ceratozamia kuesteriana*. 57
- Figura 9.** Análisis de asignación para las cinco poblaciones de *Ceratozamia kuesteriana*. A) Número de grupos genéticos de acuerdo a la propuesta de Evanno *et al.*, 2005. B) Análisis de asignación promedio. 58
- Figura 10.** Análisis de Funciones Discriminantes de Componentes Principales para las poblaciones de *Ceratozamia kuesteriana*. 59
- Figura 11.** Prueba de Mantel entre las distancias geográficas en kilómetros (Matriz 1), con respecto a las distancias de Nei (Matriz 2), para las cinco poblaciones de *Ceratozamia kuesteriana*. 60

RESUMEN

Ceratozamia kuesteriana (Regel), amenazada a causa del calentamiento global, con una distribución altitudinal cada vez más angosta y con poblaciones sometidas a condiciones extremas de sequía. El objetivo de este trabajo fue evaluar la diversidad y estructura genética de cinco poblaciones de *C. kuesteriana* en la reserva de la biosfera “El Cielo”, comparando estos datos con la información del resto de grupo para establecer su estado actual y proponer estrategias de manejo y conservación pertinentes. Se utilizaron nueve marcadores SSR; los cuales mostraron una diversidad genética elevada (H_o : 0.53 ± 0.05); las poblaciones están estructuradas (F_{st} (4, 401): 0.151; $p < 0.001$), sin asociación con la distancia geográfica (r : 0.1814, p : 0.648); presentan endogamia (F_{is} (196,401): 0.209; $p < 0.001$), están en desequilibrio Hardy-Weimberg (χ^2 : 61.648 ± 30.79 ; $p < 0.001$) y existen cuellos de botella en todas las poblaciones, algunos más recientes e intensos que otros. Se concluye que la diversidad está altamente fragmentada por lo que prácticamente todas las poblaciones son diferentes en su composición genética, proceso de diferenciación que aparentemente se ha propiciado por la selección natural y se infiere la pérdida de conectividad por ausencia de polinizadores naturales. La población tres mantiene los niveles más altos de diversidad genética con respecto al resto, aunque presenta el cuello de botella más intenso. Por el contrario, la población cinco es la que tiene la menor diversidad genética y se encuentra alejada geográficamente. La mayor contribución de este trabajo radica en el análisis de neutralidad que mostró cuatro loci sometidos a selección; tres bajo selección balanceadora y uno con selección direccional. En conjunto, estos datos indican que la población tres se encuentra en condiciones óptimas mientras que la población cinco apenas subsiste. Finalmente, se han logrado identificar zonas de alta y baja densidad dentro de la reserva, por lo que es factible el uso de propuestas de conservación previamente probadas en otras *Ceratozamias*, sin embargo, la carencia de datos demográficos (fertilidad, viabilidad, supervivencia, mortalidad, etc.) no permite un programa de manejo completo.

Palabras clave: adaptación, cuello de botella, diferenciación, diversidad genética, selección natural.

1. INTRODUCCIÓN

Las cícadas son un grupo de plantas que forma parte importante del patrimonio biológico de México; siendo los trópicos uno de sus refugios naturales más importantes en el mundo (Vovides, 2000; Judd *et al.*, 2007). *Ceratozamia* es el grupo más diverso en nuestro país, con 30 especies, de las cuales 16 se localizan en la Sierra Madre Oriental (SMO); el resto se distribuye en la Planicie Costera del Golfo, el Istmo de Tehuantepec y la Sierra de Juárez (Calonje *et al.*, 2018).

Ceratozamia kuesteriana es una especie de reciente redescubrimiento (Vovides y Nicolalde-Morejon, 2010), está sujeta a protección especial por las leyes mexicanas y catalogada en peligro de extinción (P) por la IUCN. Se desconoce en detalle la historia de las poblaciones y las amenazas puntuales para la especie. Montelongo-Ruíz (2016) y Octavio-Aguilar (Com. Pers.) confirmaron la presencia de la especie en la reserva de la biosfera “El Cielo” y su ausencia en Linares y Aramberri, Nuevo León; Miquihuana y Ciudad Victoria, Tamaulipas; Ciudad Valles y Rio Verde, San Luis Potosí y Rio Escanela, Querétaro; lo que implica una reducción considerablemente en la distribución estimada (Whitelock, 2002). Es importante destacar estas ausencias ya que estimaciones previas del ámbito potencial de distribución de la especie la ubican en prácticamente la totalidad del extremo norte de la Sierra Madre Oriental, incluyendo Nuevo León, San Luis Potosí, Querétaro y Tamaulipas. Además, los primeros reportes de la planta se realizaron en Rio Verde y Ciudad Valles, San Luis Potosí; localidades en las que al día de hoy se ha extinguido.

La información obtenida en los recorridos mencionados fue complementada con registros procedentes del herbario de la Universidad Autónoma de Tamaulipas y varias tesis con listados florísticos de la región. De manera particular, existen reportes en la Sierra de Tamaulipas y en Ciudad Madero, ésta última localidad no corresponde al tipo de vegetación normalmente asociado al género *Ceratozamia*, al corroborar los puntos geográficos, se localizaron poblaciones de *Zamia* spp, por lo que existen errores en la identidad en los registros. En conjunto, la información geográfica y documental es obsoleta, errónea y/o sobreestimada, lo que reduce considerablemente el área geográfica ocupada por la especie, restringiéndola exclusivamente a la Reserva de “El Cielo”, donde

sus poblaciones son aparchonadas, aisladas y en algunas hay poca representatividad de las categorías juveniles.

Las cícadas son amenazadas principalmente por cambios antropogénicos y de uso del suelo. Esto resulta interesante para explicar adaptaciones a hábitats degradados, alteraciones en la distribución espacial, modificaciones en su diversidad genética y variación a corto y mediano plazo en la estructura demográfica, lo cual ha sido reportado para otras cícadas (López-Gallego, 2008; Octavio-Aguilar *et al.*, 2008; Rubio-Tobón, 2015). Al respecto, se debe señalar que esta especie de cícada no forma parches densos en áreas mayores a 50 m², como se ha reportado para *C. fuscoviridis* (Rubio-Tobón, 2015) o *C. mexicana* (Rivera-Fernández *et al.*, 2012); por el contrario, los individuos se localizan en huecos rocosos, aislados, protegidos y bajo el dosel del bosque; lo que constituye una limitante para la colecta y registro. Esta alteración en la densidad espacial, obedece principalmente al escases de microhábitats idóneos para la germinación y crecimiento de las plántulas, ya que para el género estas son sensibles a la desecación y tienen una alta mortalidad (Sánchez-Tinoco *et al.*, 2000).

De acuerdo con González y Vovides (2002), *C. kuesteriana* forma parte del clado ubicado al norte del Eje Neo-volcánico entre los estados de Tamaulipas, San Luís Potosí, Querétaro e Hidalgo, especies para las cuales se hipotetiza procesos de especiación reciente, además no se descartan asociaciones y variación dadas por arrastre filogenético como la constricción de los foliolos, la disminución en la cantidad de estomas y el engrosamiento de la cutícula (Vovides *et al.*, 2018), lo que podría estar asociado a rasgos morfológicos similares con otras *Ceratozamia*s adaptadas a regiones con baja precipitación, como el caso de *C. zaragozae*. Sin embargo, a diferencia de esta última, que gracias a los trabajos de prospección-exploración se pudo determinar que existen más poblaciones (Castillo-Lara *et al.*, 2017); *C. kuesteriana* no ha podido incrementar su área de distribución, por el contrario los recorridos a lo largo de la SMO mostraron extinciones locales; por lo que las adaptaciones que pudo haber tenido en este proceso reciente de especiación-radiación no han sido suficientes para garantizar su persistencia.

Para poder encaminar los trabajos de conservación, en este documento se incluyeron estrategias de conservación tanto *in situ* como *ex situ* para *C. kuesteriana*, tomado como base algunas ideas ya reportada para otras cícadas, en especial aquellas que se encuentran dentro de una reserva como el caso de *C. norstogii* y *C. mirandae*. La presencia de la especie en la Reserva de la Biosfera “El Cielo” le confiere cierta protección especial contra la deforestación y saqueo de plantas adultas, aunque el desconocimiento sobre el estado demográfico de las poblaciones podría ser un obstáculo para la implementación de estrategias de conservación adecuadas. Por todo lo anterior, sirva la información como un antecedente general de evaluación del estado de conservación de *C. kuesteriana* en su área de distribución conocida (Nicolalde-Morejón y Vovides, 2010).

2. ANTECEDENTES

2.1 Las cícadas

Las cícadas son plantas antiguas de origen monofilético (Stevenson, 1990; Stevenson, 1992; Chase *et al.*, 1993), grupo hermano del resto de las plantas con semilla actuales (Nixon *et al.*, 1994). Surgen en el Carbonífero, hace 325 a 280 millones de años (Ma) (Norstog y Fawcett, 1989; Zhifeng y Thomas, 1989; Norstog y Nicholls, 1997) con máxima radiación en el Jurásico y Cretácico (Mc Elwain *et al.*, 2005). La mayoría radiaron hace menos de 10 millones de años, en el Mioceno tardío, aunque conservan caracteres primitivos como células espermáticas móviles (Norstog y Nicholls, 1997; Nagalingum *et al.*, 2011). Los géneros *Cycas* y *Dioon*, en el viejo y nuevo mundo, respectivamente; conforman clados ancestrales con una divergencia entre 250 y 270 Ma (Figura 1) (Codamine *et al.*, 2015).

Las cícadas constituyen el segundo mayor grupo de gimnospermas (Judd *et al.*, 2007), son dioicas con conos masculinos (microstróbilos) y femeninos (megastróbilos), pero no determinado en todos los casos por heterocromía (cromosomas sexuales diferenciados) (Harvey *et al.*, 1997; Ainsworth, 2000; Kanchanaketu *et al.*, 2007). Esto se debe a eventos filogenéticamente independientes lo que ubica a los cicadales como modelo de estudio óptimo para entender la evolución de la sexualidad en plantas (Sangueden *et al.*, 2009; Iglesias-Andreu *et al.*, 2010; Iglesias-Andreu *et al.*, 2012).

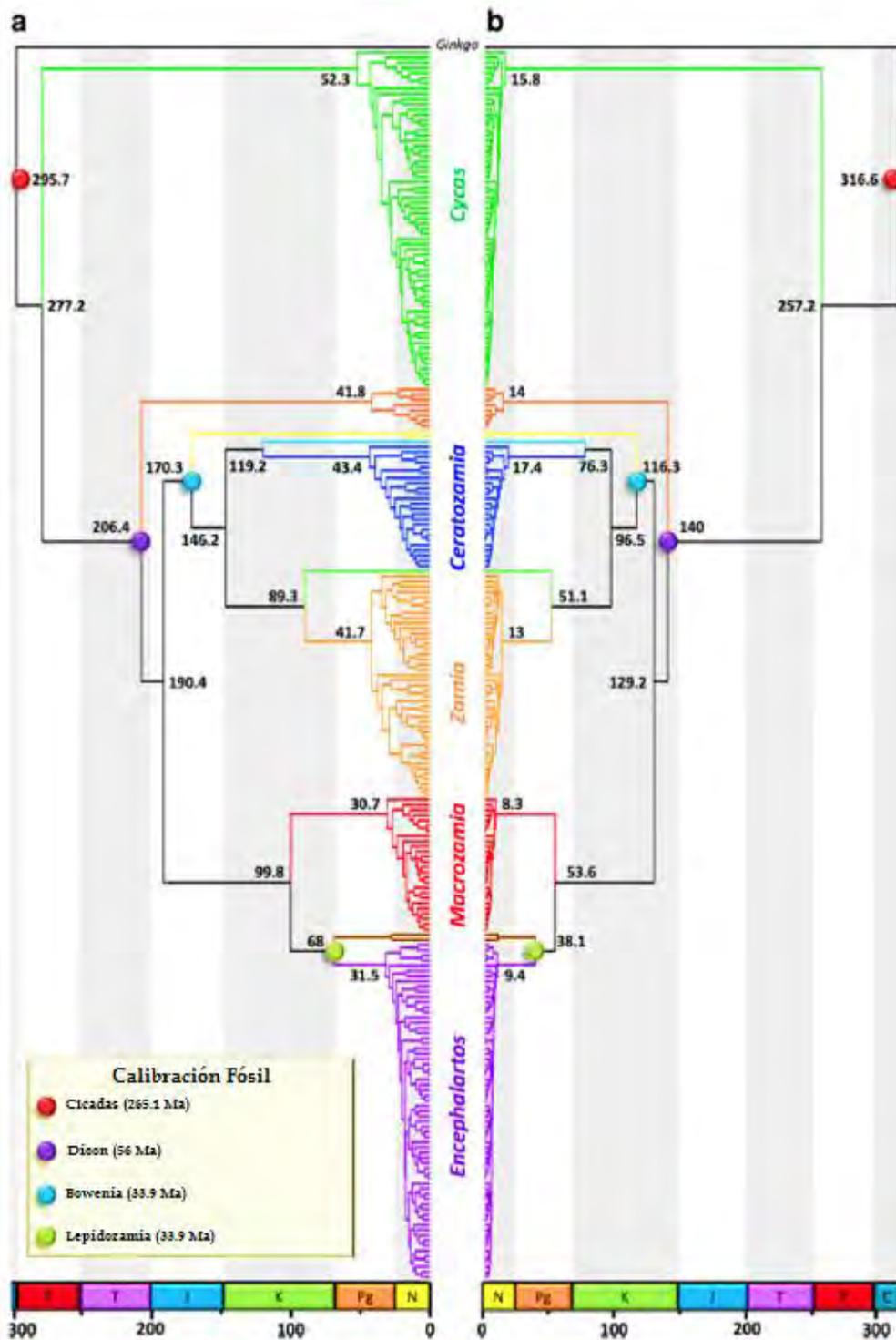


Figura 1. Filogenia calibrada por registros fósiles de las cícadas actuales, obtenido por el modelo de probabilidad posterior de Yule (a) y de Muertes-Nacimientos (b) (Modificado de Codamine *et al.*, 2015). Los colores señalan la divergencia de los clados: 295.7 a 316.6 Ma del surgimiento del grupo (divergencia con respecto a *Ginkgo*); 140 a 206.4 Ma divergencia entre *Dioon* y *Cycas*, (Zamiaceae vs Cycadaceae); 116.3 a 170.3 Ma primera divergencia dentro de la familia Zamiaceae (*Stangeria* en amarillo con respecto al resto de los géneros de Zamiaceae).

Estas plantas producen una corona de hojas con foliolos dispuestos en un eje principal, los troncos son paquicaules con poco xilema denominado manoxilemático, algunas especies exhiben ramas bifurcadas dicotómicamente. Sus raíces presentan simbiosis con cianobacterias en raíces coraloides, que fijan nitrógeno atmosférico. Son plantas de lento crecimiento que pueden llegar a vivir más de 2000 años (Vovides, 1990; Gifford y Foster, 1996; Vovides *et al.*, 2010a).

2.2 Ecología

Las plantas dioicas por lo general son polinizadas por diferentes organismos, lo que las hace dependientes de este tipo de interacción para llevar la reproducción, tal es el caso de las cícadas. Son polinizadas por escarabajos (entomófilas) de las familias Curculionidae y Languridae, con la excepción de *Cycadothrips chadwicki* (Insecta, Thysanoptera), que poliniza a *Macrozamia communis* y *C. albrechti* que poliniza a *M. macdowelli* (Tabla 1). Dichos escarabajos parecen ser atraídos por el calor producido por los conos masculinos de las cícadas cuando maduran, eventualmente entran también a los conos femeninos, donde ocurre la polinización (Tang *et al.*, 1987; Tang *et al.*, 1999; Terry, 2001; Yáñez, 2006). La restricción sexual por la dependencia de poblaciones sanas de polinizadores, trae como consecuencia una alta diferenciación y elevación en los niveles de endemismo (Hamrick y Godt, 1996).

Las cícadas producen una variedad de sustancias secundarias con función protectora contra los herbívoros (Norstog y Fawcett, 1989; Vovides *et al.*, 1993; Norstog y Nicholls, 1997; Gómez-Pompa *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 2002). Por un lado, algunas sustancias tóxicas contienen dos grupos de azúcares nitrogenados (cicacina y macrozamina) que representan los compuestos naturales carcinogénicos más potentes que se conocen (Bell *et al.*, 1967; Bell y Nunn, 1988; Nash *et al.*, 1992; Yáñez, 2006). Por otro lado, la toxina que se encuentra en menor concentración en los tejidos de las cícadas es el aminoácido no proteico derivado de alanina, β -N-metilamino-L-alanina (β -BMAA), que en concentraciones elevadas es neurotóxico para mamíferos y aves (Schneider *et al.*, 2002; Brener *et al.*, 2003a, b). La toxicidad mencionada contribuye a una deficiencia en la dispersión ocasionando que la diferenciación se incremente aún más (Avisé, 2004).

Tabla 1. Insectos específicos para la polinización de algunas cícadas en el mundo (Modificado de Schneider *et al.*, 2002).

Cícadas	Polinizadores	Fuente
1. <i>Zamia furfurácea</i> (México)	a) <i>Rhopalotri amollis</i>	Norstog <i>et al.</i> , 1986.
2. <i>Zamia integrifolia</i> (Estados Unidos, Bahamas, Cuba y Gran Caimán)	a) <i>Rhopalotriss lossoni</i> b) <i>Paraxonotha zamiae</i>	Tang <i>et al.</i> , 1987.
3. <i>Encephalartos cycadifolius</i> (Sudáfrica)	a) <i>Metacucujus encephalarli</i> b) <i>Xenoscelini</i> spp.	Donaldson <i>et al.</i> , 1995.
4. <i>Encephalartos villosus</i> (Sudafrica)	a) <i>Porthetes</i> spp. b) <i>Xenoscelini</i> spp. c) <i>Antliarhinus zamiae</i>	Donaldson, 1997.
5. <i>Encephalartos</i> spp (África)	a) <i>Apinotropis</i> spp.	Oberprieler, 1995.
6. <i>Macrozamia communis</i> (Australia)	a) <i>Traneslyt erioides</i> y <i>T. sparsus</i> b) <i>Cycacodothrips chadwicki</i>	Chadwick, 1993. Terry, 2001.
7. <i>Macrozamia macdowellii</i> (Australia)	a) <i>Cycadodthrips albrechti</i>	Mound y Terry, 2001.
8. <i>Cycas</i> spp (Asia)	a) <i>Tychiodes</i> spp. b) <i>Xenocryptus</i> spp.	Tang <i>et al.</i> , 1999.

El β -BMAA puede estar relacionado con otra función en los megatróbilos, donde se almacena en bajas concentraciones de forma permanente, contrario a los microtróbilos donde esta toxina es liberada antes. Esta actividad histoquímica a través de las toxinas, puede interpretarse como el “síndrome de polinización” para el desarrollo de larvas de escarabajos, donde les brinda protección a través del tejido de los microstrobilos (Vovides, 1991; Vovides *et al.*, 1993). El β -BMAA es producido también por cianobacterias del género *Nostoc* (Míguez-Caramés, 2016) presentes en las raíces de las cícadas, las que bio-acumulan esas toxinas en sus semillas.

A pesar de la alta toxicidad en las cícadas, las hojas son depredadas por herbívoros específicos como son las orugas del género *Eumaeus*, (familia Lycaenidae) y escarabajos de la especie *Aulacoscelis melanocera* (familia Crisomelidae), que tienen una amplia distribución en las zonas tropicales. Este tipo de alimentación parece ser un rasgo evolutivo para *Eumaeus*, puesto que son capaces de metabolizar las toxinas producidas por las cícadas y heredarlas a sus huevos y larvas, concentrando las sustancias en la cubierta de la pupa; tal es el caso de las larvas de *Rhopalotria* (Rothschild *et al.*, 1986; Bowers y Larin, 1989; Bowers y Farley, 1990; Vovides *et al.*, 1993).

Aún con la alta concentración de toxinas en prácticamente todos los tejidos; su dispersión puede estar dada ocasionalmente por animales. Por ejemplo, se ha reportado que las semillas de *Dioon holmgrenii*, son consumidas y dispersadas por ardillas (*Sciurus* spp.) y urracas (*Calocitta formosa*); las semillas de *D. edule* son depredadas y dispersadas ocasionalmente por *Peromyscus mexicanus* (González-Christen, 1990; Vovides, 1990), las de *Ceratozamia matudae* y *C. mirandae* por pecaríes *Pecari tajacu* (Pérez-Farrera *et al.*, 2000; Pérez-Farrera y Vovides, 2004; Pérez-Farrera *et al.*, 2006), las semillas de *Zamia pumila* y *Z. furfuracea* son dispersadas por cenizotes (*Mimus polyglottos*) (Eckenwalder, 1980) y por cangrejos (Chemnick y Vazquez-Torrez, Com. Per.).

2.3 Amenazas a nivel mundial

Las cícadas se distribuyen en regiones tropicales y subtropicales (Figura 2). Algunas zonas tienen géneros específicos lo que constituye una relación entre sus procesos evolutivos (radiación, colonización, dispersión) y su distribución geográfica (Gifford y Foster, 1996; Vovides, 2000; Judd *et al.*, 2007). La lista actual consta de dos familias (Cycadaceae y Zamiaceae; Christenhusz *et al.*, 2011), con un total de 10 géneros y 371 especies: *Bowenia* (2), *Ceratozamia* (31), *Cycas* (125), *Dioon* (15), *Encephalartos* (71), *Lepidozamia* (2), *Macrozamia* (41), *Microcycas* (1), *Stangeria* (1) y *Zamia* (82) (Calonje *et al.*, 2018).

Cycadaceae solo cuenta con el género *Cycas* distribuido en Asia, Australia y Oceanía excepto *Cycas thouarsii* ubicada en las Islas Comoros, Seychelles, Kenya, Madagascar, Mozambique y Tanzania (Osborne *et al.*, 2012). Zamiaceae cuenta con nueve géneros (*Bowenia*, *Ceratozamia*, *Dioon*, *Encephalartos*, *Lepidozamia*, *Macrozamia*, *Microcycas*, *Stangeria*, y *Zamia*) con 246 especies descritas. Los géneros restringidos al continente americano son *Ceratozamia*, *Dioon*, *Microcycas* (con una sola especie *M. calocoma*, endémica de Cuba) y *Zamia* (el género más grande para el grupo con 82 especies). Once listas se han publicado desde 1985 hasta el 2012, duplicando el número de especies descritas; aunque se creen que hay más especies por descubrir (Osborne *et al.*, 2012).

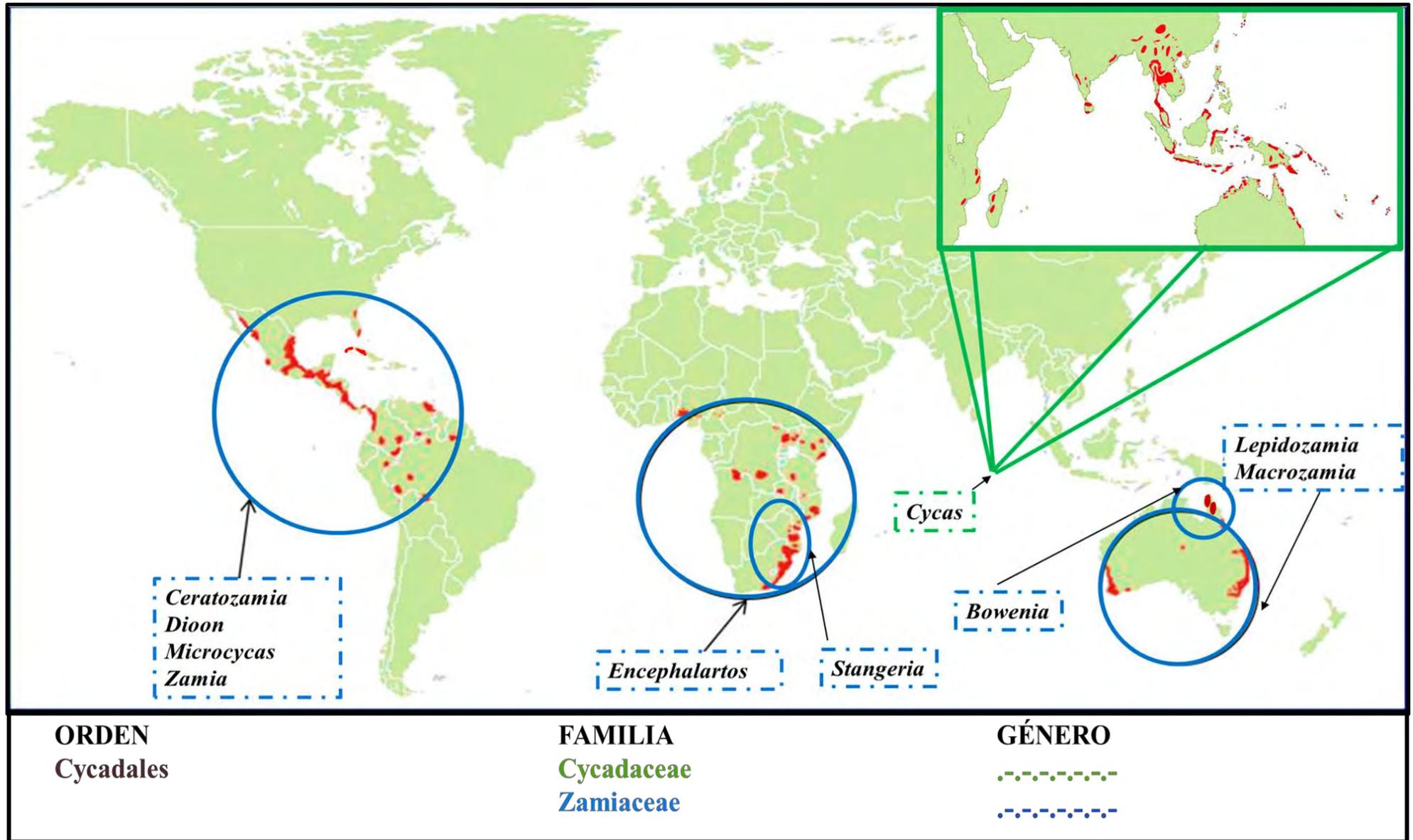


Figura 2. Distribución mundial de las cícadas de acuerdo a Christenhusz *et al.*, 2011 (Modificado de Donaldson, 2003a).

La mayoría de las cícadas tienen poblaciones pequeñas en áreas restringidas con baja dispersión por lo que son susceptibles de extinción (Pérez-Farrera *et al.*, 2004; Yáñez, 2006; Octavio-Aguilar *et al.*, 2008). En 2003, se reportó que un 53% de las especies estaba en peligro (UICN, 2003), para el 2010 el valor se incrementó al 64%. Por esto la situación actual ha ido en declive, principalmente en Asia, Australia, Centroamérica y México (Donaldson, 2003).

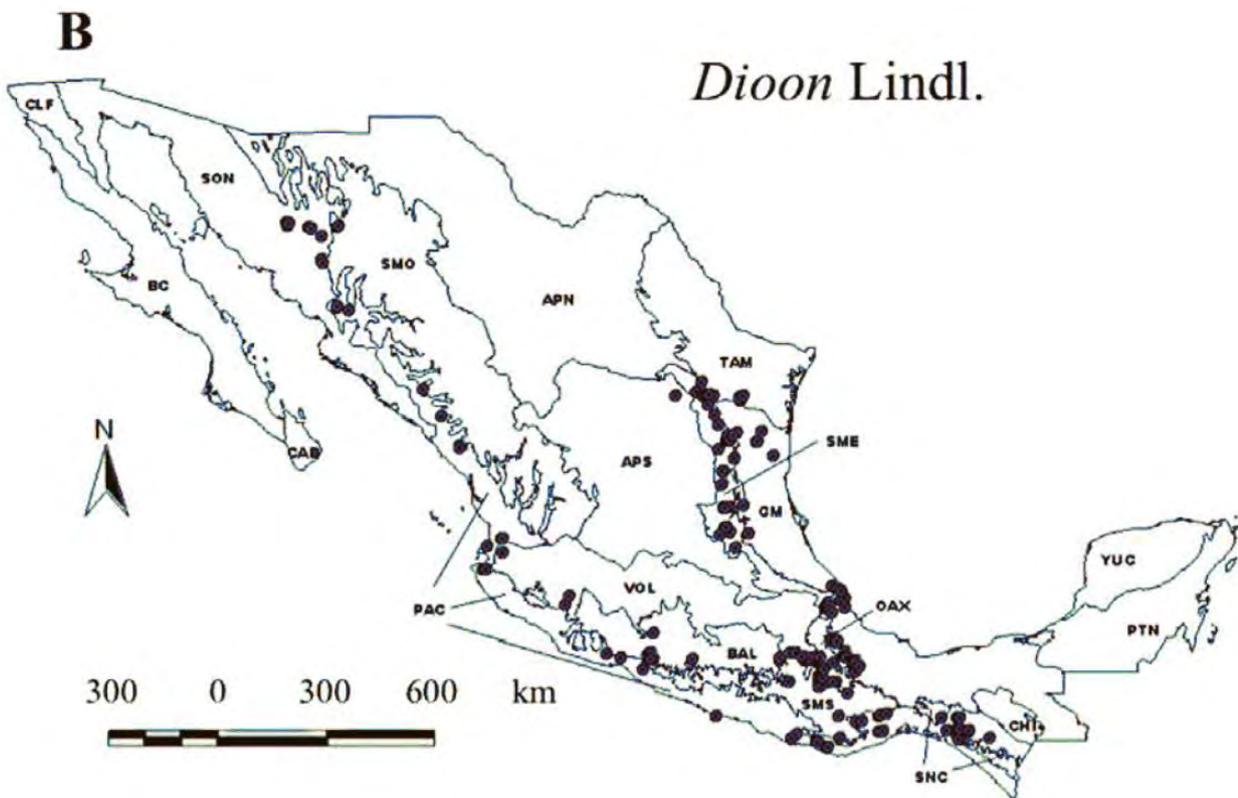
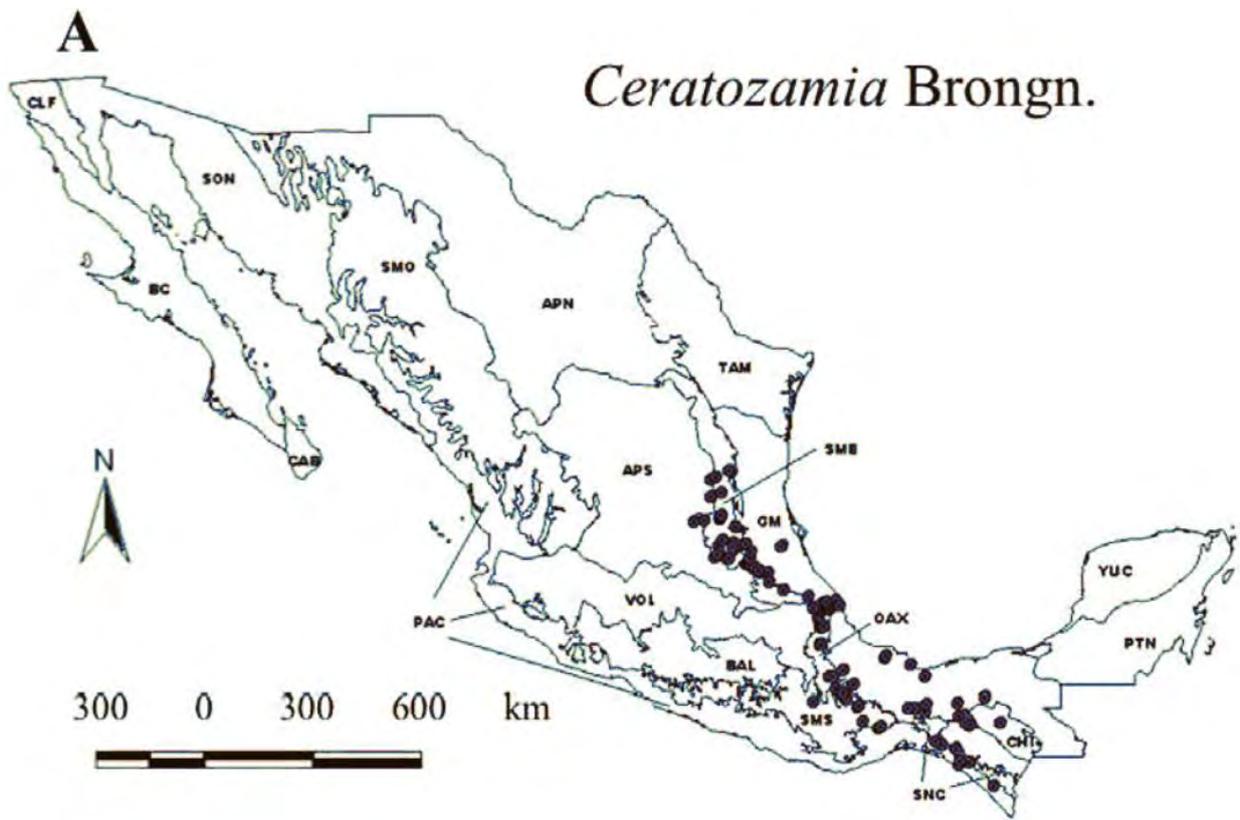
De acuerdo con las categorías de la UICN en América, 24 especies se reportan en Peligro Crítico (CR); en África, 18 especies están clasificadas dentro de esta categoría, lo que significa que una de cada cuatro especies africanas se considera en CR. Dos especies del género africano *Encephalartos* se han extinguido en estado silvestre (EW) en la última década (Donaldson, 2003). Por ejemplo, *Encephalartos woodii* originalmente se describió a partir de una sola planta masculina, no se encontraron nunca otros individuos. Las poblaciones originales de *E. woodii* fueron eliminadas a través de la cosecha y extracción de corteza, las últimas plantas habían sido transferidas a los jardines botánicos en 1916 y en 1964 murió el último ejemplar colectado de forma silvestre. Los ejemplares que actualmente se tienen en algunos jardines botánicos son clones provenientes de esa única planta masculina conocida. De acuerdo a la UICN en 2003 *E. woodii* se declaró oficialmente extinta en la naturaleza (Donaldson, 2010a). Para *Encephalartos brevifoliolatus*, originalmente se conocía una población de cinco a siete plantas masculinas. En 1998, se había catalogado como en Peligro (E) y en el 2003 en Peligro Crítico (CR). Estas últimas plantas fueron removidas por los colectores furtivos, por lo que funcionarios de conservación retiraron los últimos ejemplares a un lugar *ex situ* seguro en 2004. En 2006 se declaró oficialmente Extinta en la Naturaleza (Donaldson, 2010b).

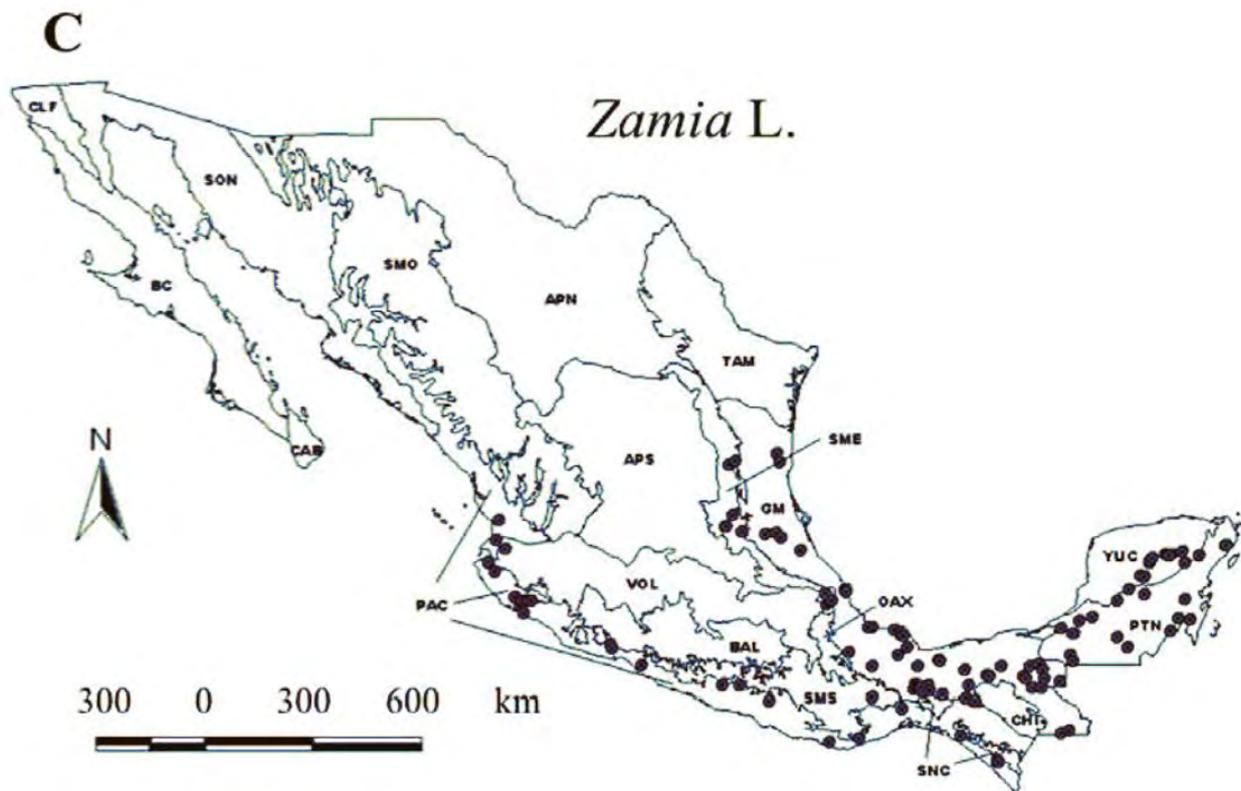
Los ejemplos anteriores ponen de manifiesto que las cícadas a nivel mundial están enfrentando graves problemas de extinción. En 2016, el Informe Anual de la UICN, menciona que las cícadas no están amenazadas gravemente, pero sí se están deslizando hacia la extinción con más rapidez que cualquier otro grupo conocido, a excepción de los corales (UICN, 2016).

Todos los géneros de cícadas están incluidas en los Apéndices de la CITES, por lo tanto; su comercio está regulado (Rutherford *et al.*, 2013; PNUMA-CMCM, 2014). Para el género *Cycas*, todas las especies se incluyen en el Apéndice II, excepto *Cycas beddomei*, nativo de la India; que se encuentra en el Apéndice I. Para los géneros *Bowenia*, *Dioon*, *Lepidozamia*, *Macrozamia*, y *Zamia*; todas las especies se incluyen en el Apéndice II, excepto *Ceratozamia* spp., *Encephalartos* spp., *Microcycas calocoma* y *Stangeria eriopus* que están en el Apéndice I. A nivel de especie, actualmente se incluyen en el Apéndice I un total de 105 mientras que en el Apéndice II hay 266 especies (Calonje *et al.*, 2018).

2.4 Las cícadas mexicanas

En México se encuentran los géneros *Ceratozamia*, *Zamia* y *Dioon*, pertenecientes a la familia Zamiaceae, ocupando el segundo lugar a nivel mundial en diversidad de cícadas, después de Australia (Vovides, 2000; Haynes, 2012; Osborne *et al.*, 2012; Rivera-Fernández *et al.*, 2012); ya que cuenta con 61 de las 371 especies descritas a nivel mundial (Calonje *et al.*, 2018). El género *Ceratozamia* está representada por 30 de las 31 especies reportadas, con excepción de *C. hondurensis* J. L. Haynes, Whitelock, Schutzman y R.S. Adams; *Zamia* con 17 y *Dioon* con 14. En este contexto, los tres géneros se distribuyen en 15 de las 19 regiones biogeográficas de acuerdo a Nicolalde-Morejón *et al.*, (2014), excepto en el Altiplano Norte (Chihuahuense), Baja California, California (franja mexicana) y El Cabo (Figura 3). Por lo tanto, la mayor riqueza de cícadas en el país se encuentra en la provincia biogeográfica SMO y en el sureste mexicano (Oaxaca y Chiapas) (Luna *et al.*, 2000; Vovides *et al.*, 2003; Yáñez, 2006; Juárez *et al.*, 2009). El porcentaje de endemismo en México es de 93.45%; puesto que 60 especies son exclusivas del territorio mexicano. Por estados de la república, el patrón de endemismo se distribuye de la siguiente manera: Veracruz diez especies, Chiapas y Oaxaca nueve especies cada uno, y San Luis Potosí, Tabasco, Hidalgo y Tamaulipas, con una especie cada uno (Nicolalde-Morejón *et al.*, 2014; Calonje *et al.*, 2018).





Leyenda Regiones Biogeográficas

APN, Altiplano Norte	CHI, Los Altos de Chiapas	PTN, El Peten	SON, Sonora
APS, Altiplano Sur	CLF, California	SCN, Soconusco	TAM, Tamaulipeca
BAL, Depresión del Balsas	GM, Golfo de México	SME, Sierra Madre Oriental	VOL, Eje Volcánico
BC, Baja California	OAX, Oaxaca	SMO, Sierra Madre Occidental	YUC, Yucatán
CAB, del Cabo	PAC, Costa del Pacífico	SMS, Sierra Madre del Sur	

Figura 3. Ubicación geográfica de los géneros mexicanos de la familia Zamiaceae. Se muestran las localidades tipo de las especies reportadas por género a la fecha (Modificado de Nicolalde-Morejón *et al.*, 2014).

2.4.1 Amenazas en México

En México las leyes que protegen la flora y fauna silvestre están a cargo de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) y se basan en el Método de Evaluación del Riesgo (MER); que es una herramienta complementaria de la NOM-059 (NOM-059-SEMARNAT-2010); además de implementar programas de recuperación y conservación como el Programa de Conservación de Especies en Riesgo (PROCER) 2007-2012 a cargo de la Comisión Nacional de

Áreas Naturales Protegidas (CONANP) (CONABIO, 2008; Ayala-Orozco *et al.*, 2012). Dentro de estas estrategias y normas, las cícadas se encuentran como especies prioritarias de conservación de acuerdo con la Ley General de Vida Silvestre (LGVS). De acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010); se establece que todas las cícadas mexicanas se encuentran amenazadas, por lo que son un grupo prioritario para su conservación (INE-SEMARNAT, 2000; UNEP-WCMC, 2013).

La situación actual para México, de acuerdo a la Lista Roja de la UICN es la siguiente; 17 especies caen en la categoría En Peligro Crítico, 24 En Peligro, 12 Vulnerables, cuatro Casi Amenazado y cuatro con Datos Insuficientes (Calonje *et al.*, 2018). Es así que la totalidad de las especies se encuentra bajo algún grado de amenaza o riesgo de extinción (SEMARNAT-2010). Además, establece especificaciones para su protección (INE-SEMARNAT. 2000). La mayoría de las cícadas mexicanas también se encuentran listadas en los Apéndices I y II del CITES.

El mayor riesgo que enfrentan las cícadas es la colecta ilegal de ejemplares (Pérez-Farrera y Vovides, 2006) y la destrucción de su hábitat, colocándolas en riesgo por la disminución de sus poblaciones, la extinción de los polinizadores (Vovides *et al.*, 1997) y una amplia separación espacial entre plantas macho y hembra (Rubio-Tobón, 2015; Octavio-Aguilar *et al.*, 2017a, b y c). Se estima que la distancia geográfica entre sexos no debería ser grande (Clark y Clark, 1987, 1988). Además, el tráfico ilegal de plantas y semillas resulta ser el aspecto de amenaza, ya que tienen un alto valor económico y ornamental por su rareza (Martínez-Meyer *et al.*, 2014; CITES, 2012; UICN, 2017). Otro factor que reduce las poblaciones de cícadas consiste en la transformación de su hábitat por actividades antropogénicas, que impacta directamente sobre la diversidad de las comunidades y la persistencia de las poblaciones, incluidos los aspectos demográficos y genéticos. Esto resulta interesante para explicar adaptaciones locales de las especies a los hábitats degradados, modificaciones en su diversidad genética y variación a corto y mediano plazo en la estructura demográfica, lo cual ya ha sido reportado en cícadas (López-Gallego, 2008; Octavio-Aguilar *et al.*, 2008; Rubio-Tobón, 2015). La perturbación también altera la estructura de los ecosistemas cambiando

la disposición de los recursos y el medio físico (White y Walker, 1997). La fragmentación disminuye el tamaño y la conectividad entre las poblaciones, causando un deterioro general (Andren, 1994; Berglund y Jonsson, 2003; Hobbs y Yates, 2003) y por ende, una presión de selección particular sobre las categorías menos adaptadas dentro de las poblaciones. Esto induce cambios demográficos que incrementan el riesgo de extinción local (Barrett y Kohn, 1991), lo que se ha asociado con la disminución en el tamaño poblacional (Eisto *et al.*, 2000; Vergeer *et al.*, 2003; Kolb y Lindhorst, 2006), reducción de la fecundidad (Oostermeijer *et al.*, 1998), bajo reclutamiento (Kery *et al.*, 2000; Jacquemyn *et al.*, 2003), alteraciones en la estructura y composición demográfica (Jules, 1998; Bruna y Kress, 2002); así como densidad baja y pérdida del potencial evolutivo (Gram y Sork, 1999).

2.4.2 Conservación en México

Toda la información presentada denota la urgencia de iniciar con actividades enfocadas a la conservación y manejo de las cícadas en México. Al respecto, la tendencia actual para la conservación de flora amenazada consiste en la integración de los enfoques *in situ* y *ex situ* de manera complementaria, así como la utilización de técnicas convencionales y modernas disponibles que garanticen la disponibilidad de germoplasma (García *et al.*, 2001). La conservación *in situ* comprende estrategias de manejo para mantener la diversidad de recursos genéticos en los sitios donde ocurren los procesos evolutivos que determinan su diversificación: las áreas naturales en el caso de los recursos forestales maderables, no maderables y la fauna sujeta a cacería o recolección; campos agrícolas y unidades de producción rural que manejan y guían los procesos de manejo y domesticación.

Por el contrario, las estrategias de conservación *ex situ* se llevan a cabo fuera de estos contextos evolutivos e incluyen: bancos de germoplasma usando técnicas de crio-conservación de semillas a bajas temperaturas, colecciones de propágulos vegetativos, cultivo de tejidos *in vitro*, jardines botánicos y colecciones particulares (Ford- Lloyd y Jackson., 1986, Primack., 2000; Casas *et al.*, 2016).

Considerando ambos enfoques y con la finalidad de mitigar la presión sobre las poblaciones en este grupo de plantas, se desarrolló el Proyecto para la Protección, Conservación y Recuperación de la Familia *Zamiaceae* (Cycadales) de México (INE-SEMARNAT, 2000), cuya función es la implementación de Unidades de Manejo Ambiental (UMA) para la conservación de estos recursos. Los mejores ejemplos de conservación *ex situ* e *in situ* se encuentran en el estado de Chiapas, generados por la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH) con ayuda del Instituto de Ecología A.C. En 1996, se iniciaron cultivos en huertos rurales para la propagación de *Ceratozamia matudai*, *C. norstogii*, *Dioon merolae* y *Zamia soconuscensis* en comunidades de la Reserva de la Biósfera “La Sepultura” y “El Triunfo” (Pérez-Farrera y Tejeda-Cruz, 1996; Vovides *et al.*, 2002). Otros ejemplos se encontraron en San Luis Potosí, donde se cultiva *D. edule*; también en Veracruz se tienen cultivos de *D. edule*, *C. mexicana*, *Z. furfuracea* y *Z. loddigesii*. Además, se han iniciado gestiones para la propagación de especies en peligro de extinción como *D. caputoi* en la reserva Tehuacan-Cuicatlan y *Z. inermis* por pobladores de Mozomboa, Veracruz (Vovides *et al.*, 2010a, Octavio-Aguilar *et al.*, 2017b y c). En cuanto a la conservación *ex situ*, se ha evaluado la importancia de la variabilidad genética preservada en colecciones y jardines como una fuente representativa para varias especies, asumiendo un papel importante de este tipo de colecciones en la conservación de la familia *Zamiaceae* (Calonje *et al.*, 2010).

3. ESTADO DEL ARTE

3.1 Genética de poblaciones en cícadas

Las poblaciones han sido las unidades naturales de estudio tanto para la ecología como para la genética (Hartl y Clark, 1997, Barbadilla, 2012). Una población se puede definir como un grupo de individuos que pertenecen a la misma especie, que viven en un área geográfica definida y que se aparean o pueden potencialmente llegar a hacerlo (Frankel y Soulé, 1981). Las poblaciones genéticamente pueden continuar existiendo, extinguirse, volver a unirse unas con otras o continuar divergiendo hasta que se vuelvan reproductivamente aisladas. Las poblaciones reproductivamente aisladas pueden dar lugar a nuevas especies (Klug *et al.*, 2013).

La genética de poblaciones es parte central de la teoría evolutiva moderna, sus aportaciones a la biología de la conservación han ido creciendo conforme la teoría y práctica han ido integrándose a la disciplina que ahora se conoce como genética de la conservación (Eguiarte y Piñero, 1990), que se basa en el estudio de la diversidad y estructura genética en las poblaciones tanto a nivel intra como interespecífica (Rocha y Gasca, 2007; Klug *et al.*, 2013). Uno de los objetivos fundamentales de esta disciplina es ayudar a minimizar los efectos de las extinciones, la fragmentación y reducción de flujo génico principalmente en poblaciones pequeñas (Frankham, 1995; Amos y Balmford, 2001; Frankham *et al.*, 2002), dado que son más propensas a la extinción, ya que los factores estocásticos (tanto genéticos como demográficos y eventos catastróficos) aceleran su decline (Primack *et al.*, 2001) y las llevan a los llamados vórtices de extinción (Primack *et al.*, 2001; Frankham *et al.*, 2002). Los vórtices se inician cuando las poblaciones son pequeñas, demográficamente inestables y tienen niveles altos de endogamia; la disminución poblacional reduce la adecuación y se produce una retroalimentación negativa, lo que refuerza el decline, aumenta la depresión por endogamia y la susceptibilidad a eventos aleatorios ambientales, reduciendo aún más el tamaño poblacional y así sucesivamente hasta llegar a la extinción (Figura 4).

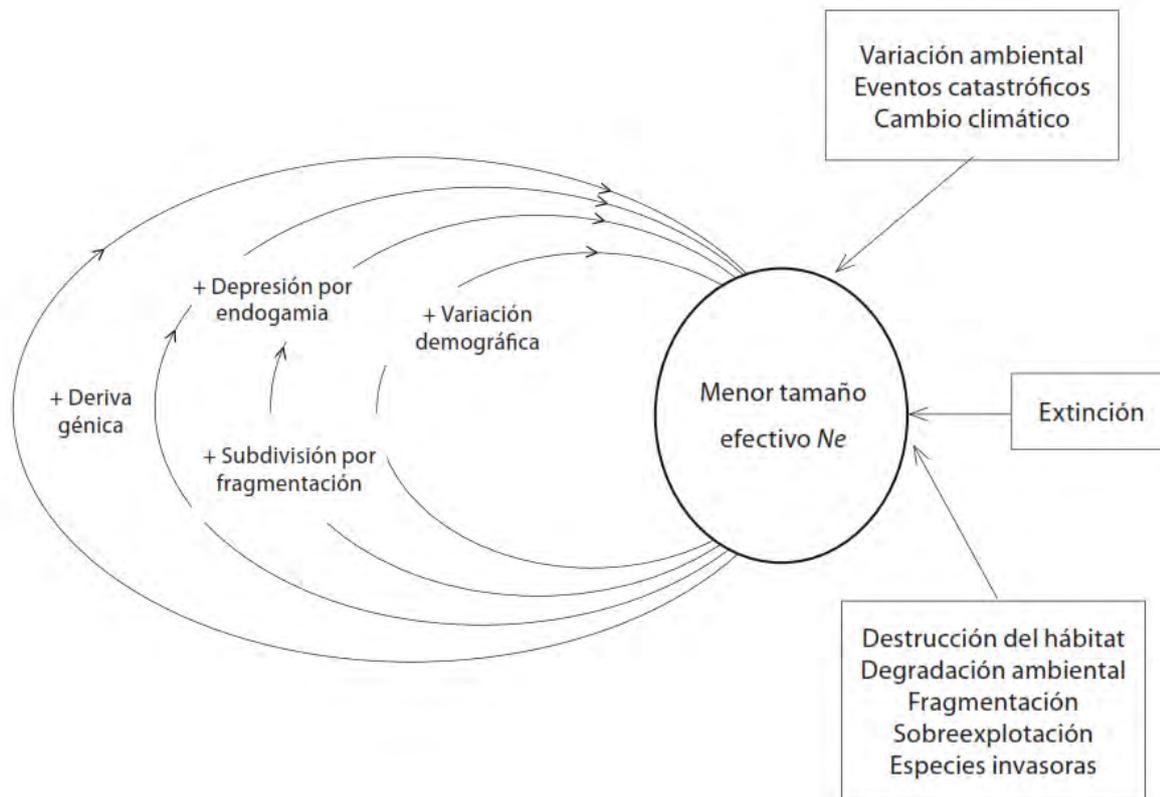


Figura 4. Representación de una población pequeña, los fenómenos estocásticos incrementan el efecto de los problemas genéticos, por lo que la población sufre un vórtice de extinción (Tomado de Rocha y Gasca, 2007).

Los estudios de diversidad genética en cícadas han sido de gran relevancia en términos de conservación, ecología y evolución debido a que se encuentran en un estatus de amenazas y en peligro de extinción (Bachmann, 1994; Donaldson, 2003). La información generada han permitido desarrollar teorías acerca de la distribución geográfica del grupo, aporta bases fundamentales para el entendimiento de las presiones de selección así como el establecimiento de relaciones filogenéticas entre clados (Rivera-Fernández, 2012).

Actualmente, se cuenta con varios estudios sobre genética poblacional destacando los realizados en los géneros *Dioon* (González-Astorga *et al.*, 2003, 2005, 2008, 2009; Cabrera-Toledo *et al.*, 2008; Octavio-Aguilar *et al.*, 2009), *Zamia* (González-Astorga *et al.*, 2006; Meerow y Nakamura, 2007), *Ceratozamia* (Montelongo-Ruíz, 2016; García-Montes, 2017), *Microcycas* (Pinares *et al.*, 2009), *Cycas* (Yang y Meerow, 1996; Chao-Luan *et al.*, 1999; Keppel *et al.*, 2002) y *Macrozamia* (Sharma *et al.*, 2004), por mencionar algunos ejemplos.

Además de los estudios de genética poblacional, los marcadores moleculares que se han utilizado para la inferencia filogenética entre especies estrechamente relacionadas han sido los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP por sus siglas en inglés), las repeticiones de secuencias intergénicas simples (ISSR) y la amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD, Simmons *et al.*, 2007). Recientemente, también se han utilizado Regiones de Secuencias Amplificadas Conocidas (SCAR; Paran y Michelmore, 1993) como un método o técnica para identificar secuencias de DNA con loci específicos para la reconstrucción filogenética a nivel de especies (Bailey *et al.*, 2004; Gonzales y Vovides, 2012).

Para el caso del género *Zamia*, en 2008 se inició el Proyecto GE004 Códigos de barras moleculares (DNA barcoding) en especies mexicanas del género *Zamia* (Vovides *et al.*, 2010b). Ese proyecto fue el primer esfuerzo sistemático por construir una biblioteca de referencia de códigos de barras moleculares para las cícadas mexicanas (Zamiaceae, Cycadales).

3.2 Efecto de las fuerzas evolutivas sobre la variabilidad genética de las cícadas

La genética de poblaciones es el estudio de los cambios en las frecuencias génicas entre generaciones y entre poblaciones, como tal; se relaciona estrechamente con la genética evolutiva porque la evolución depende, en gran medida; de dichos cambios (De Vicente *et al.*, 2004; Rivera-Fernández, 2012). Desde un punto de vista genético, la evolución impulsada por el cambio mencionado, puede ser originada por la variación en las condiciones ambientales o en el tamaño de las poblaciones (Hartl y Clark, 1997; Molina-Freaner y Clark-Tapia, 2005; Hedrick, 2011). Sin embargo, las cícadas como especies de larga vida; son recilentes a los cambios al conservar mayor variabilidad genética, puesto que los individuos adultos llegan a vivir más de 4000 años y tienden a reproducirse con su progenie (Vovides, 1990).

En todo caso, la pérdida de variabilidad obedece a las mismas fuerzas que en el resto de los organismos, pero condicionadas por sus características intrínsecas (larga vida, dispersión limitada,

restricción en las áreas de distribución, etc.). Por todo lo anterior, es necesario clarificar la manera en que las fuerzas evolutivas actúan sobre este grupo particular.

3.2.1 Selección natural

La selección natural se define como la reproducción y/o supervivencia diferencial de los genotipos. Aquellos con mayor adecuación son los que producen más progenie, pasando más copias de sus genes a las generaciones posteriores. Así las frecuencias de sus alelos aumentan en la población y las de otros con menor adecuación disminuyen. La selección natural puede diferenciar u homogeneizar poblaciones, dependiendo de la naturaleza del ambiente. Si las poblaciones se encuentran en ambientes contrastantes, van a diferenciarse y si están en ambientes muy parecidos, la selección puede actuar para homogeneizarlas (Futuyma y Moreno, 1988; Hartl y Clark, 1997; Li y Ge, 2001). En las cícadras, los ambientes contrastantes están determinados en principio por la distribución tropical, cualquier zona de distribución fuera de los trópicos es rara, por lo que se esperaría homogeneidad para todos los miembros del grupo.

Durante mucho tiempo se creyó que la selección era la principal fuerza que mantenía la variación fenotípica y genotípica. Sin embargo, a partir del desarrollo de nuevas técnicas para el estudio de la variación a nivel DNA y proteínas se inició de manera formal el estudio de la evolución a nivel molecular, mostrando que existe una gran cantidad de variación neutral que no responde a la selección (Zuckerlandl y Pauling, 1965; Ford *et al.*, 1999). En las cícadras, esta variación ha sido identificada en asociación a regiones repetidas (Meerow y Nakamura, 2007), regiones que permiten identificar procesos no asociados a la selección.

De acuerdo con la teoría neutra de la evolución molecular, la mayor parte de la variación a nivel molecular no es mantenida por la selección tipo darwiniana (selección adaptativa o positiva), sino que es resultado de un balance entre la deriva génica y las mutaciones neutras (Kimura, 1983; Ohta, 1992). Es decir, la mayor parte de la variación a nivel molecular ocurre de manera aleatoria y no tiene importancia adaptativa. En su conjunto, los postulados de la teoría neutra parecían regir en buena medida a la evolución molecular (Castillo-Cobián, 2007).

En particular, los estudios moleculares han mostrado que existen procesos de adaptación a zonas con presiones ambientales específicas aún dentro del rango tropical, donde encontramos a las cícadas. Por ejemplo, en *Cycas micronesica* la estructura genética está determinada por la continuidad del bosque, el tamaño de las semillas, las diferencias edáficas y por actividades antropogénicas, factores que constituyen presiones de selección particulares a cada región. Utilizando EST-microsatélites, se detectó selección natural balanceadora en un locus y positiva en dos loci. Cabe aclarar que los EST se encuentran en regiones codificantes, por ejemplo la producción de ciertas proteínas y al transporte de azúcares respectivamente. Esto indica que la selección natural es un evento propio de las cícadas, aún con su larga vida. Considerando la vulnerabilidad de esta especie fue posible establecer e identificar poblaciones prioritarias para la conservación *ex situ*, lo que ha dado pauta para trabajos de conservación en cícadas (Cibrián-Jaramillo *et al.*, 2010).

3.2.2 Flujo génico

El flujo génico es el movimiento de alelos de una población a otra. En plantas, éste ocurre por medio del movimiento de polen y semillas. El flujo génico hace a las poblaciones más parecidas genéticamente (Crow y Kimura, 1970; Hedrick, 2011). Esta fuerza evolutiva, han sido un tema vital en biología evolutiva, ya que es un componente importante en la estructura de las poblaciones.

Anteriormente se pensaba que el flujo génico en general era muy restringido y de poca importancia evolutiva (Levin, 1981). Sin embargo, se ha observado en distintas especies que los niveles estimados de flujo génico generalmente son altos (Riesberg y Burke, 2001) y que pueden actuar como una fuerza que mantiene integrada a la especie, además de influir en procesos ecológicos (Slatkin, 1994; Whitlock y McCauley, 1999; Aguirre-Planter, 2007).

Sin embargo, la dispersión limitada de polen y semillas en las cícadas, genera que todas ellas tengan divergencias poblacionales aún a escalas finas (Octavio-Aguilar *et al.*, 2017a), encontrando que las diferencias pueden identificarse desde los diez metros de radio, con dependencia de la existencia de hembras y machos en esa área (Octavio-Aguilar *et al.*, 2017b). Cualquier cambio en la continuidad del ambiente tendrá consecuencias genéticas en estas plantas por incremento en la

diferenciación, eliminación de adultos que representan reservorios de variación o por la pérdida de polinizadores (Iglesias-Andreu *et al.*, 2017).

Un fenómeno interesante relacionado con el flujo génico es la depresión por exogamia, proceso dado por el flujo entre poblaciones adaptadas a condiciones locales distintas, por lo que los alelos migrantes en realidad no contribuyen a incrementar la adecuación de la población receptora sino a incrementar la mortalidad de cualquier individuo portador de esos alelos exógenos poco adecuados a las condiciones locales (Aguirre-Planter, 2007; Hedrick, 2011). En el caso de las cícadas, normalmente se esperan niveles elevados de endogamia por sus limitaciones; sin embargo, la acción de translocación humana ha sido documentada en *Ceratozamia zaragozae* (Gutiérrez-Arroyo, 2018), lo que genera patrones de exogamia inesperados que influyen en la adecuación local.

3.2.3 Endogamia

La endogamia se refiere al apareamiento no aleatorio, en donde la probabilidad de que un individuo sea autóctigo (con alelos idénticos por descendencia) es mayor que para una población panmíctica (con reproducción aleatoria). Por lo tanto, representa una violación al supuesto de la panmixia y reduce el número real de individuos reproductivos (Hartl y Clark, 1997; Hedrick, 2011; Abarca-García y López-Villalobos, 2007). En cícadas, debido a su baja dispersión de polen y semillas, ciclos de vida muy largo y generaciones que se traslapan; son susceptibles en presentar altos niveles de endogamia intergeneracional (Feng *et al.*, 2014).

La mayoría de los individuos normalmente tienen algunos alelos recesivos deletéreos, pero estos alelos no tienen ningún efecto porque los individuos son heterocigóticos a estos genes. Sin embargo, la endogamia aumenta la frecuencia de homócigos y así produce más individuos con dos copias de un alelo recesivo deletéreo (Lynch, 1993; Lande, 1995; Lynch *et al.*, 1995). Esto puede ser un problema, particularmente en poblaciones pequeñas donde es menos probable encontrar una pareja no relacionada (Watterson, 1975; Tajima, 1983, 1989; Amos y Harwood, 1998; Thévenon y Couvet, 2002). Tal es el caso de *Zamia inermis* (Iglesias-Andreu *et al.*, 2017), representada por una sola

población, con ausencia de polinizadores y bajo reclutamiento. Esta planta presenta el mayor nivel de endogamia respecto al resto del género (Tabla 2).

3.2.4 Deriva génica

En las poblaciones pequeñas pueden producirse fluctuaciones aleatorias de las frecuencias alélicas. El grado de fluctuación aumenta cuando el tamaño de la población disminuye. El decremento en el tamaño poblacional puede darse por el llamado "efecto fundador" (Lloyd y Webb, 1992), que se produce cuando una población se origina a partir de un número pequeño de individuos, cuyo acervo genético puede no reflejar el de la población original. En el caso de las cícadas, al presentar baja dispersión de semillas y ser susceptibles a la fragmentación; sus subpoblaciones suelen diferenciarse genéticamente en condiciones relativamente similares, compartiendo solo algunos alelos, lo que indica reducciones poblacionales fuertes. En la mayoría de los casos aquellas subpoblaciones que se encuentran en los extremos de la distribución presentan una alta diferenciación alélica y la presencia de alelos raros (González-Astorga *et al.*, 2005). Esto se ha reportado en *Ceratozamia fuscoviridis* donde las poblaciones más perturbadas presentan mayor diferencia en comparación de las menos perturbadas, esto está relacionado con la pérdida de individuos y el limitado flujo genético (García-Montes, 2017). Aunque las poblaciones puedan luego incrementarse hasta alcanzar un gran tamaño, los genes propios por todos los miembros se derivan exclusivamente de los fundadores, en dado caso que no haya mutación, migración o selección y suponiendo también que los emparejamientos sean aleatorios (Klug *et al.*, 2013). Otra causa de la disminución en el tamaño poblacional es el fenómeno conocido como "cuello de botella genético" (Hoelzel *et al.*, 1993). Los cuellos de botella aparecen cuando una población de gran tamaño sufre una reducción drástica, pero temporal, en el número de individuos. Aun cuando la población se recupere, su diversidad genética se habrá reducido (Klug *et al.*, 2013).

Tabla 2. Estudios genéticos sobre la diversidad, estructura genética y rango geográfico de cícadas. HE: heterocigosis esperada; HO: heterocigosis observada; FST/GST: índice de diferenciación genética entre poblaciones; M: Marcador; N.L: Número de Localidades; N.C.I.M.: Número Calculado de Individuos Maduros; EC: Estatus de Conservación. <2 km²: Puntual; 2-20km²: Restringida; >20-200 km²: Regional; >200 km²: Amplia. Se integran los indicadores de diversidad Promedio ± DE por taxa.

Cícadas del viejo mundo										
Orden: Cycadales										
Familia: Cycadaceae										
Género: <i>Cycas</i>										
Espece	He	Ho	FST/GST	M	País	Distribución	N.L	N.C.I.M.	EC	Referencia
<i>C. bífida</i>	0.543	*	0.116	SSR	China	Amplia	*	10000-12000	VU	Nguyen, 2010a; Gong, 2015.
<i>C. debaoensis</i>	0.484	0.389	0.114	SSR	China	Restringida	2	1125	CR	Tang, 2010; Gong, 2015.
<i>C. dolichophylla</i>	0.466	*	0.260	SSR	China	Amplia	10-12	10000	NT	Nguyen, 2010b; Zheng <i>et al.</i> , 2016.
<i>C. guizhouensis</i>	0.419	*	0.139	SSR	China	Regional	*	10000-12000	VU	Hill, 2010a; Feng <i>et al.</i> , 2016b.
<i>C. hongheensis</i>	0.435	*	*	SSR	China	Puntual	*	100	CR	Bösenberg, 2010a.
<i>C. multipinnata</i>	0.497	0.387	0.295	SSR	China	Amplia	3	1000-2500	EN	Nguyen, 2010c; Gong <i>et al.</i> , 2015.
<i>C. segmentifida</i>	0.436	*	0.229	SSR	China	Limitada	*	10000	VU	Nguyen, 2010d; Feng <i>et al.</i> , 2016a.
<i>C. simplicipinna</i>	0.447	0.394	0.261	SSR	China	Regional	*	10000-12000	NT	Nguyen, 2010e; Feng <i>et al.</i> , 2014.
<i>C. szechuanensis</i>	0.247	*		SSR	China	Restringida	*	300	CR	Hill, 2010b; Gong, 2012.
<i>C. panzhihuensis</i>	0.061	*	0.139	A/I	China	Restringida	6	250000	VU	Chao-Luan <i>et al.</i> , 1999; Hill, 2010c.
<i>C. taitungensis</i>	0.039	0.021	0.051	A/I	China	Regional	2	10000	EN	Huang <i>et al.</i> , 2004; Haynes, 2010.
<i>C. seemannii</i>	0.057	0.047	0.594	A/I	Fiyi	Restringida	*	10000-12000	VU	Keppel, 2002; Hill, 2010d.
<i>C. pectinata</i>	0.076	0.066	0.387	A/I	Bangladesh	Amplia	10-20	200000-250000	VU	Yang y Meerow, 1996; Nguyen, 2010f.
<i>C. diannanensis</i>	0.053	*	0.097	ISSR	China	Regional	*	5000	VU	Xiao <i>et al.</i> , 2005; Hill, 2010e.
<i>C. siamensis</i>	0.134	0.114	0.291	A/I	Cambodia	Amplia	*	10000-12000	VU	Yang y Meerow, 1996; Nguyen, 2010g.
<i>C. balansae</i>	0.130	*	0.400	ISSR	China	Amplia	*	10000	NT	Xiao <i>et al.</i> , 2005; Nguyen, 2010h.
<i>C. micronesica</i>	0.545	0.349	0.323	SSR	Guam	Regional	*	*	EN	Cibrián-Jaramillo <i>et al.</i> , 2010; Marler <i>et al.</i> , 2010.
Prom. ± D. E.	0.30±0.20	0.23±0.17	0.28±0.18							
Género: <i>Encephalartos</i>										

<i>E. latifrons</i>	0.168	*	0.0637	AFLP	Sudáfrica	Restringida	2	60-100	CR	Donaldson, 2010c; Da Silva <i>et al.</i> , 2012
<i>E. barteri</i>	0.228	*	*	RAPD	Benin; Ghana, Nigeria	Amplia	10	10000-15000	VU	Ekue <i>et al.</i> , 2008; Hurter, 2010.
Prom. ± D. E.	0.20±0.04	*	*							
Género: Macrozamia										
<i>M. parcifolia</i>	0.037	0.020	0.090	A/I	Australia	Restringida	2	1000-2500	VU	Sharma <i>et al.</i> , 1998; Forster, 2010a.
<i>M. communis</i>	0.045	*	0.270	A/I	Australia	Regional	*	100000	LC	Ellstrand <i>et al.</i> , 1990; Hill, 2010f.
<i>M. heteromera</i>	0.061	0.049	0.100	A/I	Australia	Amplia	*	10000-20000	LC	Sharma <i>et al.</i> , 1999; Forster, 2010b.
<i>M. pauli-guilielmi</i>	0.081	0.043	0.030	A/I	Australia	Regional	*	2500	EN	Sharma <i>et al.</i> , 1998; Bösenberg, 2010b.
<i>M. plurinervia</i>	0.111	0.080	0.350	A/I	Australia	Amplia	5	1000-2500	EN	Sharma <i>et al.</i> , 2004; Forster, 2010c.
<i>M. riedlei</i>	0.263	*	0.274	A/I	Australia	Amplia	10-20	100000-120000	LC	Byrne y James, 1991; Bösenberg, 2010c.
Prom. ± D. E.	0.10±0.08	0.03±0.03	0.19±0.13							
Cicadas del nuevo mundo										
Familia: Zamiaceae										
Género: Dioon										
Especie	He	Ho	FST/GST	M	País	Distribución	N.L	N.C.I.M.	EC	Referencia
<i>D. holmgrenii</i>	0.170	0.204	0.069	A/I	México	Restringida	2	10500	EN	González-Astorga <i>et al.</i> , 2008; Chemnick <i>et al.</i> , 2010.
<i>D. angustifolium</i>	0.218	0.215	0.167	A/I	México	Amplia	2	20000	VU	González-Astorga <i>et al.</i> , 2005; Chemnick y Gregory, 2010b.
<i>D. tomasellii</i>	0.295	0.309	0.145	A/I	México	Amplia	6	6000	VU	González-Astorga <i>et al.</i> , 2008; Vovides y Chemnick, 2010a.
<i>D. edule</i>	0.386	0.323	0.148	A/I	México	Amplia	15-20	141500	NT	Octavio-Aguilar <i>et al.</i> , 2009; Chemnick y Gregory, 2010c.
<i>D. sonorensis</i>	0.314	0.330	0.151	A/I	México	Regional	5	2400	EN	González-Astorga <i>et al.</i> , 2008; Chemnick y Gregory, 2010d.
<i>D. caputoi</i>	0.350	0.490	0.096	A/I	México	Restringida	5	300-500	EN	Cabrera-Toledo <i>et al.</i> , 2008; Chemnick y Gregory, 2010e.
<i>D. merolae</i>	0.446	0.713	0.070	A/I	México	Restringida	6	3500	VU	Cabrera-Toledo <i>et al.</i> , 2010; Chemnick y Gregory, 2010f.
Prom. ± D. E.	0.31±0.09	0.37±0.18	0.12±0.04							
Género: Ceratozamia										

<i>C. mexicana</i>	0.235	*	0.185	ISSR	México	Amplia	*	500000-750000	VU	Rivera-Fernández, 2012; Vázquez <i>et al.</i> , 2010.
<i>C. kuesteriana</i>	0.403	*	0.157	ISSR	México	Puntual	1	250-500	CR	Montelongo-Ruiz, 2016; Chemnick y Gregory, 2010a.
<i>C. kuesteriana</i>	0.53	0.66	0.250	SSR	México	Puntual	1	250-500	CR	En este trabajo
<i>C. fuscoviridis</i>	0.740	0.770	0.127	SSR	México	Regional	7	20000	CR	Donaldson, 2003b. Vite <i>et al.</i> , 2013; García-Montes, 2017.
<i>C. zaragozae</i>	0.600	0.800	0.102	SSR	México	Restringida	1	100	CR	Chemnick y Gregory 2010g; Gutiérrez-Arroyo, 2018.
Prom. ± D. E.	0.49±0.22	0.78±0.02	0.14±0.04							
Género: <i>Microcycas</i>										
<i>M. calocoma</i>	0.170	0.200	0.337	A/I	Cuba	Restringida	5	1540-4000	CR	Pinares <i>et al.</i> , 2009; Bösenberg, 2010d.
Prom. ± D. E.	---	---	---							
Género: <i>Zamia</i>										
<i>Z. lacandona</i>	0.216	*	0.108	A/I	México	Regional	2	500	EN	González-Astorga <i>et al.</i> , 2008; Pinares <i>et al.</i> , 2009; Stevenson, 2010a.
<i>Z. loddigesii</i>	0.226	0.263	0.179	A/I	México	Amplia	10-20	100000	NT	González-Astorga <i>et al.</i> , 2006; Chemnick y Gregory, 2010h.
<i>Z. katzeriana</i>	0.298	*	0.191	A/I	México	Restringida	5	50-1000	CR	González-Astorga <i>et al.</i> , 2008; Pinares <i>et al.</i> , 2009; Vovides <i>et al.</i> , 2010a.
<i>Z. variegata</i>	0.355	*	0.085	A/I	Belice; Guatemala, Honduras, Mexico	Amplia	30	5000-10000	EN	González-Astorga <i>et al.</i> , 2008; Pinares <i>et al.</i> , 2009; Stevenson, 2010b.
<i>Z. cremnophila</i>	0.429	*	0.174	A/I	México	Regional	5	1000	EN	González-Astorga <i>et al.</i> , 2008; Pinares <i>et al.</i> , 2009; Stevenson, 2010c.
<i>Z. purpurea</i>	0.485	*	0.025	A/I	México	Regional	*	2000	CR	González-Astorga <i>et al.</i> , 2008; Pinares <i>et al.</i> , 2009; Vovides <i>et al.</i> , 2010b.
<i>Z. lucayana</i>	0.490	0.483	0.067	SSR	Bahamas	Regional	3	1000-1500	EN	Stevenson, 2010d; Calonje <i>et al.</i> , 2013.
<i>Z. pumila</i>	0.041	*	*	A/I	Republica Dominicana	Amplia	*	5000-10000	NT	Walters y Decker-Walters 1991; Stevenson, 2010e.

<i>Z. furfuracea</i>	0.540	0.57	0.087	SSR	México	Regional	4	10000	EN	Favian-Vega, Datos no Publicados; Chemnick y Gregory 2010i.
<i>Z. inermis</i>	0.348	0.151	0.734	SSR	México	Puntual	1	300-500	CR	Iglesias-Andreu <i>et al.</i> , 2017; Vovides <i>et al.</i> , 2010c.
<i>Z. prasina</i>	0.434	0.282	0.246	SSR	México y Belice	Regional	10-15	10000	NT	Velasco-Martínez, 2015; Vovides y Chemnick, 2010b.
Prom. ± D. E.	0.35±0.15	0.35±0.17	0.19±0.20							
	He	Ho	FST/GST							
Cycadaceae	0.30±0.20	0.23±0.17	0.28±0.18	*: No reportado; A/I : Aloenzimas/Isoenzimas; ISSR : Repeticiones de Secuencias Intergénicas Simples; SSR : Secuencias de Repeticiones Simples; AFLP : Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados; RAPD : Amplificación Aleatoria de DNA Polimórfico; CR : En peligro crítico; EN : En peligro; VU : Vulnerable; NT : Casi amenazada; LC : Preocupación menor						
Zamiaceae	0.30±0.18	0.35±0.25	0.17±0.14							
Cycadales	0.30±0.18	0.31±0.23	0.19±0.14							
Cicadas del viejo mundo	0.24±0.19	0.16±0.16	0.22±0.14							
Marcador (SSR, ISSR, AFLP y RAPD)	0.36±0.16	0.38±0.02	0.21±0.10							
Marcador (A/I)	0.09±0.07	0.06±0.03	0.23±0.17							
Cicadas del nuevo mundo	0.36±0.16	0.42±0.22	0.17±0.14							
Marcador (SSR y ISSR)	0.48±0.15	0.53±0.24	0.22±0.20							
Marcador (A/I)	0.29±0.12	0.34±0.17	0.14±0.08							
Marcador (SSR, ISSR, AFLP y RAPD: TOTAL)	0.41±0.16	0.48±0.20	0.21±0.15							
Marcador (A/I: TOTAL)	0.21±0.14	0.21±0.19	0.18±0.13							

De todos los trabajos poblacionales realizados en cícadras se deduce que:

- Las especies del nuevo mundo tienen mayor diversidad genética que las especies del viejo mundo (González-Astorga *et al.*, 2009).
- Las especies de cícadras con mayor distribución, en general; presentan mayor nivel de variación que las de distribución restringida; asociado principalmente a endogamia (Griffith *et al.*, 2015).
- Comparado con otros grupos de plantas, las cícadras son más diversas de lo esperado, esto se ha relacionado con su ciclo de vida largo (González-Astorga *et al.*, 2008).
- Todas las cícadras presentan alta diferenciación genética entre poblaciones, debido a su dispersión limitada; ocasionando una estrecha estructura genética espacial y mayor diversidad al interior de las mismas (Octavio-Aguilar *et al.*, 2017b).
- Existen indicios de que la perturbación afecta negativamente la diversidad de las cícadras (Octavio-Aguilar *et al.*, 2017a)

4. ESPECIE DE ESTUDIO

4.1 *Ceratozamia kuesteriana* Regel

Ceratozamia kuesteriana Regel., es endémica de Tamaulipas; está catalogada en extremo peligro de extinción (CR) por la lista roja de la UICN y sólo existen 35 reportes, todos procedentes de los municipios Gómez Farías (Reserva de la Biosfera “El Cielo”) y Rio Verde en San Luis Potosí, actualmente extinta (Moretti *et al.*, 1982; Vovides, 1985; Brito-Aguilar, 2000; Chemnick y Gregory, 2010a). Algunos autores sugieren que podría encontrarse desde la región sur de Nuevo León hasta la zona norte de San Luis Potosí (Vovides y Nicolalde-Morejon, 2010). Sin embargo, recorridos exhaustivos recientes en las áreas mencionadas han mostrado que su ámbito de distribución se ha reducido únicamente a la Reserva de la Biosfera “El Cielo” (Montelongo-Ruiz, 2016).

La distribución de *C. kuesteriana* se restringe al bosque de pino-encino y al bosque mesófilo de montaña en el extremo norte de la SMO. El tipo de suelo en donde crece esta cícada es sobre afloramientos cársticos y en suelos café oscuros a negros ricos en materia orgánica. Aunque con humedad menor que el resto de las especies del género (Vovides, 1985; Whitelock, 2002, 2004; Vovides y Nicolalde-Morejon, 2010).

4.2 Descripción

Tallos solitarios, raramente ramificados, subterráneos, 15-20 cm de largo, 10-12.5 cm de diámetro, cubierto por bases de hojas y catafilos viejas, pero con la superficie relativamente lisa. Hojas en plantas adultas usualmente 3-5, hojas emergentes café-amarillentas y ligeramente tomentosas, hojas maduras verde oscuro brillante, glabras, 11.8 m de largo, 47.5-62.5 cm de ancho, planas a moderadamente quilladas, no torcido; pecíolo 17.5-30 cm de largo, 6-8 mm de diámetro, generalmente inerme, pero ocasionalmente con pocos agujijones pequeños; raquis subterete. Folíolos 35-45 pares por hoja, linear-lanceolados, 10-22 cm de largo, 0.6-1.5 cm de ancho, 7-9 venas, márgenes enteros y ligeramente revolutos. Microstróbilo solitario, erecto, cónico, 22.5-30 cm de largo, 2.8-3.5 cm de diámetro, ligeramente tomentoso (tomentulo), pero aparentemente glabras, ápice

mucronado; pedúnculo 5-15 cm de largo, 1-1.3 cm de diámetro, densamente tomentoso. Megastróbilo solitario, globoso a cortamente cilíndrico, 11.3-17.5 cm de largo, 5-7 cm de diámetro, verde oliva, ligeramente tomentoso, ápice mucronado; pedúnculo densamente tomentoso, 5-7.5 cm de largo, 1.3-2 cm de diámetro, esporófilas 2-2.3 cm de largo. Semillas sub ovoideas a globosas, 1.7-2.2 cm de largo, 1.7-1.7 cm de diámetro, sarcotesta crema cuando madura, tornándose rápidamente café cuando las semillas son liberados del cono, lisas (Regel, 1857; Moretti *et al.*, 1982; Whitelock, 2002). El desarrollo de la semilla, para el género *Ceratozamia* en general; se completa entre 18 a 24 meses desde la polinización hasta el desarrollo completo del embrión. La megasporogénesis y la megagametofitogénesis ocurren durante los tres meses. La germinación tarda aproximadamente 12 meses, por lo tanto, a esta fase se la llama "latencia" pregerminativa (Pérez-Farrera y Vovides, 1997; Sánchez-Tinoco *et al.*, 2000). El número cromosómico para la especie es $2n = 16$ (Figura 5, Vovides, 1985).



Figura 5. Características morfológicas de *C. kuesteriana*. a: Estructura, b: Foliolo, c: Microsporofito, d: Microsporangio, e: Megasporofitos con óvulos, f: Posición de los óvulos en la bráctea del megasporofito, g: Semillas maduras (Modificado de Vovides, 1985).

Ceratozamia kuesteriana está estrechamente relacionada con *C. sabatoi*, las diferencias resaltables es el color de los megatróbilos; en *C. kuesteriana* son café-rojizo y en *C. sabatoi* de verde-azulado a café-azulado. El color del pecíolo y raquis es cobrizo en hojas adultas de *C. kuesteriana* y verde claro a oscuro en *C. sabatoi* (Figura 6).



Figura 6. Comparación morfológica de megatróbilos de *C. kuesteriana* (A) y *C. sabatoi* (B). Fotos Ken Hill (A) y Juan Carlos López Domínguez (B).

4.3 Estudios previos

De acuerdo a Vovides y Nicolalde-Morejón, (2010) *Ceratozamia kuesteriana* fue descrita por Eduard Augusto von Regel en 1857, quien la describió a partir de plantas cultivadas en el jardín Botánico de Leningrado, y fue introducida desde México por Karwinski (Stevenson y Sábato, 1986). Sin embargo, esta especie fue redescubierta en estado silvestre en 1965 por un colector comercial de plantas de nombre Luciano E. Guerra, quien la denominó *Ceratozamia* “Rancho del Cielo” ubicado en Tamaulipas. Posteriormente, en 1981; Aldo Moretti y Sergio Sábato, investigadores italianos junto con Mario Vázquez-Torres investigador mexicano; estudiando la taxonomía del género; notaron la

similitud entre las colecciones de herbario de Karwinski de *C. kuesteriana* y dos colecciones más provenientes desde Tamaulipas (Moretti *et al.*, 1982). Esta información sirvió para asociarle una localidad específica (Whitelock, 2002). Sin embargo, los ejemplares de Karwinski nunca fueron revisados por Regel, dado que no están señalados en el protocolo correspondiente de la especie, por lo que Stevenson y Sábato (1986); procedieron a tipificar las colecciones de Regel (LE) como el Holotipo. Según González y Vovides (2002), *C. kuesteriana* forma parte del clado ubicado al norte de la Faja Volcánica Transmexicana entre los estados de Tamaulipas, San Luís Potosí, Querétaro e Hidalgo; taxones para los cuales se hipotetizan procesos de especiación reciente. Finalmente, con respecto a la latitud, *C. kuesteriana* es la especie más norteña del género y su importancia en el estudio de la evolución de las ceratozámias aún no ha sido evaluada a profundidad.

5. HIPÓTESIS

De acuerdo a los registros históricos, *Ceratozamia kuesteriana* Regel., se encuentra confinada a una estrecha región en el extremo norte de la SMO, con poblaciones ubicadas únicamente en la Reserva de la Biósfera “El Cielo”.

No obstante su rareza, estudios previos han mostrado que varias cícadas del nuevo mundo tienen una elevada diversidad genética, altamente estructurada tanto al interior como entre poblaciones; por lo que la condición de una distribución estrecha parece no ser una causa suficiente para condicionar los niveles de diversidad genética para el grupo. Por lo anterior, se espera que *C. kuesteriana*, al encontrarse distribuida en una Reserva, relativamente poco perturbada, presente altos niveles de diversidad genética con una estructura bien definida.

6. JUSTIFICACIÓN

Ceratozamia kuesteriana fue descrita originalmente por Regel en 1876, asumiéndose como sinonimia de *C. mexicana* hasta 1982 cuando Moretti la redescubre (Regel 1876; Moretti *et al.*, 1982). A partir de su descripción no se han realizado estudios puntuales sobre su hábitat, distribución, demografía y genética; sin embargo, se desconoce el estado actual de sus poblaciones y el potencial de riesgo que la especie enfrenta, en particular en su zona de distribución nativa. Actualmente las localidades donde se establece *C. kuesteriana* están limitadas al estado de Tamaulipas, siendo particularmente abundante en la Reserva de la Biosfera “El Cielo” en donde sólo se han realizado algunos listados florísticos y un análisis genético preliminar exploratorio (Montelongo-Ruíz, 2016).

Por otro lado, la especie representa el extremo norte de la distribución para el género, por lo que cuenta con adaptaciones asociadas con ambientes más secos y cálidos que el resto de las ceratozamias, tales como foliolos más angostos y más cerosos (Whitelock, 2002). Por estas características, la especie puede constituir un modelo biológico para el estudio de los procesos de aislamiento, adaptación y diferenciación en especies de vida larga.

Por lo anterior, es necesario dirigir esfuerzos para delimitar el potencial evolutivo de la especie y establecer los procesos implicados en la dinámica genética-poblacional para esta cícada. La información permitirá evaluar el grado de amenaza de la especie en su área y establecer estrategias de manejo y conservación adecuadas.

7. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la diversidad y estructura genética de *Ceratozamia kuesteriana* Regel., (Zamiaceae), mediante el uso de SSR; para determinar el estado de conservación de la especie y sugerir estrategias para su conservación a futuro.

8. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer el estado del arte en el grupo, mediante una revisión detallada de trabajos previos en el ámbito de la conservación y la variación genética; para establecer las amenazas puntuales y la relevancia del grupo así como de la especie.
2. Establecer los niveles de heterocigosis, polimorfismo, promedio de alelos por locus y otros indicadores en las cinco poblaciones identificadas para *C. kuesteriana* en su rango de distribución, mediante el uso de marcadores SSR; para determinar la diversidad genética de la especie.
3. Determinar los niveles de diferenciación, número de individuos migrantes por generación y otros indicadores de la estructura genética, mediante modelos de asignación bayesianos y análisis moleculares de varianza; para evaluar la distribución de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones a lo largo del rango de distribución de la especie, que comprende solo el estado de Tamaulipas.
4. Identificar alelos exclusivos dentro de las poblaciones, mediante modelos no paramétricos basados en el equilibrio deriva-mutación; para determinar cuellos de botella y otras reducciones poblacionales aleatorias.
5. Establecer la neutralidad de los marcadores, mediante el modelo de Poisson para las frecuencias alélicas; a fin de identificar posibles eventos de selección y definir las poblaciones con mayor riesgo en la reserva.
6. Proponer estrategias de conservación, considerando los resultados obtenidos del análisis genético, para establecer la primera aproximación de manejo para la especie.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Revisión bibliográfica

Se realizó una búsqueda exhaustiva del estado de conservación y todos los estudios publicados a la fecha sobre la variación genética de las cícadas, a nivel mundial. La información colectada fue sistematizada en tablas y se redactó un informe general, con énfasis particular a las cícadas mexicanas, destacando su grado de amenaza, distribución y acciones concretas aplicables a la especie de estudio.

9.2 Sitios de Estudio

El estado de Tamaulipas cuenta con una de las áreas naturales protegidas más importantes del país, la reserva de la biosfera de “El Cielo”, dentro de la Sierra Madre Oriental. Comprende 144,530 ha, que forman parte de los municipios de Gómez Farías, Llera, Jaumave y Ocampo. Está limitada por los paralelos 22°-55'-30'' y 23°-25'-50'' N y 99°-95'-50'' y 99°-26'-30'' W. Su abrupta topografía y situación geográfica permiten no sólo una sucesión de pisos altitudinales de vegetación, sino también dos vertientes muy distintas. Una expuesta a los vientos alisios húmedos que concentran neblina y lluvia en la vertiente Este, la otra queda al interior; claramente sérica. Gracias a estas condiciones en la reserva se suman dos elementos de diversidad, forma parte de la Zona de Transición Mexicana y de la Zona de Transición Altitudinal, con elementos de afinidad neártica en sus partes más altas y elementos neotropicales en las bajas. De estos elementos neotropicales, el género *Ceratozamia* es un ejemplo; muchos tienen su límite más septentrional en la reserva y otras sierras del sur de Tamaulipas. Se encuentran además muchos elementos evolucionados *in situ* dentro de las cordilleras mexicanas, especialmente en el bosque de neblina que también presenta la mezcla más notable de elementos neárticos y neotropicales (Morrone, 1999; Morrone, 2002; Morrone *et al.*, 2002; Mora-Olivo *et al.*, 2008). Su orografía y situación geográfica le confirieron el papel de «refugio» de los distintos tipos de vegetación dominantes en el norte de México durante los últimos periodos del Cenozoico reciente. Comprende por lo menos ocho tipos de vegetación muy distintos. En 144,530 ha., que se distribuyen desde los 200 hasta los 2,200 msnm, la reserva incluye 743 especies de plantas vasculares, 430

especies de aves (255 residentes y 175 migratorias), 99 especies de mamíferos, 60 de reptiles y 21 de anfibios, entre otros (Vargas-Contreras y Hernández-Huerta, 2001; Sánchez-Ramos *et al.*, 2005).

Los sitios de colecta se basaron en el trabajo previo de Montelongo-Ruíz (2016), el cual consideró cinco poblaciones dentro de la reserva de la biosfera “El Cielo” con base en el modelo de distribución potencial de la especie bajo el algoritmo de Máxima Entropía (MaxEnt ver 3.3.3e; Phillips *et al.*, 2004). Dentro de este trabajo sólo se pudo confirmar la presencia de la especie en la reserva de la biosfera “El Cielo” y se confirmó su ausencia en Linares y Aramberri, Nuevo León; Miquihuana, Ciudad Victoria y Ciudad Madero en Tamaulipas, en Ciudad Valles, San Luis Potosí y en Río la Escalena, Querétaro; estas poblaciones habían sido propuestas por el modelo de distribución potencial o reportadas en estudios anteriores sin una corroboración adecuada (Figura 7).

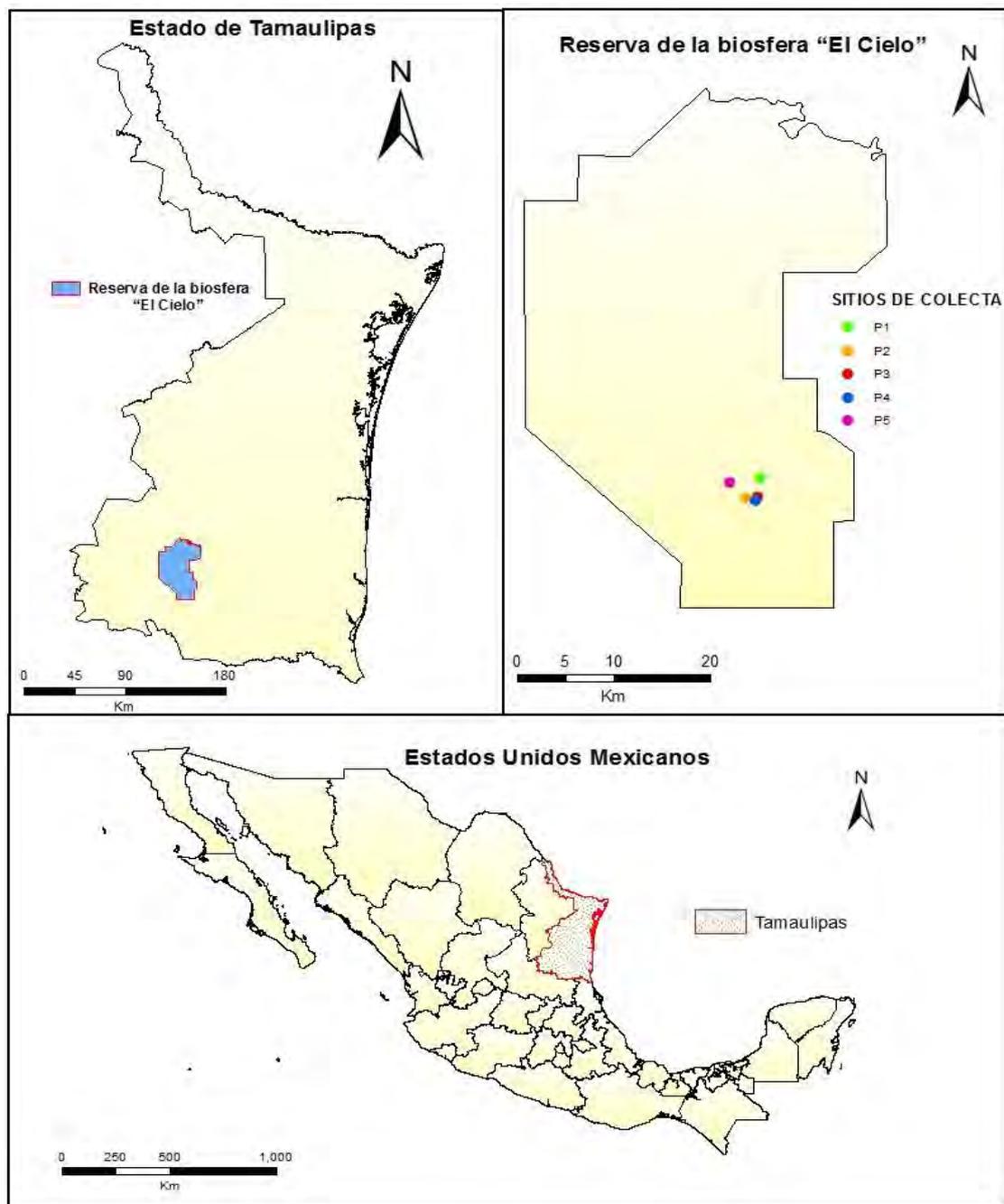


Figura 7. Mapa del estado de Tamaulipas donde se señala la Reserva de la biosfera “El Cielo” y los sitios de colecta (P1 a P5).

De acuerdo con Montelongo-Ruíz, el número total de individuos colectados en las cinco poblaciones fue de 229, siendo más abundantes los juveniles (79 adultos, 94 juveniles y 56 plántulas). Las plantas se distribuyen de manera heterogénea, siendo más abundantes en las poblaciones colectadas en el orden tres y cuatro, mientras que las poblaciones colectadas en el orden uno y dos tienen menor densidad de individuos, además de estar alejadas del resto de las poblaciones (Tabla 3).

Tabla 3. Caracterización de las poblaciones de *C. kuesteriana* muestreadas en la Reserva de la Biosfera “El Cielo” (Tomado de Montelongo-Ruiz, 2016).

Población	Latitud	Longitud	msnm	Adultos	Juveniles	Plántulas	Total
P1	23°3'20.50"N	99° 12' 58.20" O	1263	10	13	8	31
P2	23°2' 8.50"N	99° 13' 42.40" O	1340	17	16	4	37
P3	23° 2' 11.60"N	99° 13' 4.40" O	1196	31	14	12	57
P4	23° 1' 59.40"N	99° 13' 14.50" O	1201	14	25	18	57
P5	23°3'2.90"N	99° 14' 38.90" O	1624	7	26	14	47
Total							229

9.3 Colecta de material biológico

La colecta de materia biológico se llevó a cabo con base en protocolos ya establecidos (Montelongo-Ruiz, 2016; García-Montes, 2017). Los foliolos (considerando como mínimo tres) de cada individuo se retiraron de las frondas y fueron limpiados con alcohol al 70% con ayuda de un atomizador y toallas de papel absorbente para evitar que se contaminaran con DNA extraño. Las muestras fueron transportadas en bolsas plásticas herméticas que contenían 1gr de sílica gel para reducir la humedad; posteriormente las muestras se depositaron en refrigeración a -20°C, hasta la extracción.

En este trabajo se consideran 201 muestras provenientes de las cinco poblaciones (Tabla 4), colectadas por Montelongo-Ruiz (2016). Para el análisis se utilizaron un total de diez microsatélites propuestos por Meerow y Nakamura (2007). El material biológico (foliolos) colectado previamente se encuentra a resguardo en el laboratorio de Genética del Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEH. La obtención del material biológico se realizó con el permiso de colecta con número de folio SGPA/DGVS/06725/16 (Anexo 1).

Tabla 4. Colecta de material biológico de las poblaciones de *C. kuesteriana* utilizadas en el análisis genético poblacional con marcadores codominantes microsatélites.

Población	Adultos	Juveniles	Plántulas	Total
P1	10	13	8	31
P2	18	18	4	40
P3	31	13	12	56
P4	0	26	2	28
P5	7	27	12	46
Total				201

9.4 Extracción de DNA

Para la extracción de DNA de las muestras obtenidas en campo se utilizó un protocolo modificado de Doyle y Doyle (1987). Para asegurar la calidad del DNA extraído, se recurrió al proceso de purificación, el que consiste en centrifugar y lavar el DNA con etanol y acetato de sodio 3M con un pH de 5.2 además de un lavado previo con cloroformo-octanol 24:1 que permite la separación de dos fases; el DNA queda en la fase acuosa y en la fase orgánica quedan las proteínas y otros contaminantes tal como lo mencionan Sánchez-Hernández y Gaytán-Oyarzún (2006). Para la cuantificación y evaluación de la pureza del DNA, se utilizó un espectrofotómetro para nano-muestras. Cada muestra ya purificada y cuantificada se almacenó en un congelador a -20°C para evitar la posible degradación del material genético y hasta su uso posterior (Anexo 2).

9.5 Amplificación de los SSR

Se evaluaron diez marcadores SSR propuestos por Meerow y Nakamura (2007), cada uno fue preparado a una concentración 25 µM. La mezcla de reacción para la PCR fue de 10-50 ng/µl de DNA genómico de las muestras extraídas (2 µl de una dilución previamente calculada); adicionando 11 µl de dH₂O y 5.1 µl de mezcla madre (3 µl de solución amortiguadora para PCR, 2.1 µl de MgCl₂ al 2 mM, 2 µl de dNTP's al 200 µM) 2 µl de cada iniciador 25 µM, además de 0.22 µl (1U) de Taq DNA polimerasa para un total de 25 µl por tubo de reacción. Se utilizó el programa de PCR, ajustando la temperatura de alineamiento y el número de ciclos como se indica: 2 minutos a 94°C, 30 a 35 ciclos de (30s a 94°C, 1 min a 58-60°C, 1 min a 72°C), 7 min a 72°C y 4°C para almacenar (Tabla 5). Los productos de PCR se visualizaron en geles de acrilamida al 15% haciendo una electroforesis a 100 Amp-500 mV por espacio de 1 hora siendo teñidos con bromuro de etidio.

Tabla 5. Marcadores moleculares utilizados. Nombre del locus, secuencia de los iniciadores, temperatura de alineamiento (Ta), alelos por locus obtenidos en la estandarización (A) y tamaño en pares de bases de los alelos amplificados por marcador (pb); para los diez iniciadores propuestos por Meerow y Nakamura (2007). --- No amplificado para la especie.

Locus	Secuencia del iniciador 5'-3'	Ta°C	A	Pb
Zam-28	F-CAGGACAAAAGCATATAGGC R-TTGGTTTGGTAGGTGATAGG	58	11	127-67
Zam-29	F-GACTTCCTACCTAAAGATGCTA R-TCCTGCTTACTTTAGATGCT	61	12	114-79
Zam-32	F-CCAACAAGATAGCAAGGGA R-AGCATGTGTAAACCTATAAAGGA	59	6	111-90
Zam-33	F-CATGCTTGTTTGACTIONTGACTIONT R-TCCTTTCACACGTAATTATAAATCT	---	---	---
Zam-34	F-AGCATCAAGGGACTATCAAC R-TCAATGCCTCTAATACAAAAAAC	59	5	111-97
Zam-35	F-TGCATATACATATATACTCATGCAC R-TCACTATGCACTCACATACATAA	58	5	111-98
Zam-39	F-TCACAAAATCTCAGCACCCC R-TGAGTTAAACATGCGCCTCC	63	6	126-97
Zam-40	F-CTTGGCTACCTTCTCCTATC R-TGTTTGGCTTCACCCTGTTC	58	7	126-59
Zam-41	F-GTAACAATCCATTCCCAAG R-AGTGCCAAACCTCCAAGAAG	51	7	257-175
Zam-45	F-CCTTAAAGAAGCTCGTAACTCC R-TTCCCGAGATTATCCCTAGC	55	6	132-76

9.6 Análisis de datos

Los geles obtenidos para la visualización de los amplificados fueron analizados utilizando el programa Gel Analyzer (Lazar y Lazar, 2010), capturando en una hoja de cálculo la longitud e intensidad de la o las bandas de cada individuo para crear una base de datos para los análisis estadísticos.

9.6.1 Diversidad genética

Se calcularon las frecuencias génicas (alélicas y genotípicas) para los individuos de las cinco poblaciones, con el fin de determinar el promedio de muestras amplificadas por locus/localidad (N), el promedio de alelos por locus/localidad (A), el número efectivo de alelos por locus/localidad (Ne), el porcentaje de loci polimórficos (P), el índice informativo de Shannon para cada iniciador/localidad (I), las heterocigosis observadas y esperadas (Ho y He respectivamente) y el coeficiente de fijación ($f = 1 - H_o/H_e$). Con estos datos se determinó si las localidades se encuentran en equilibrio de Hardy-

Weimberg (HW), de acuerdo con las diferencias significativas entre las frecuencias observadas y esperadas, utilizando el programa GenAlEx v.6.5 (Pekall y Smouse, 2012), el cual considera una prueba de χ^2 modificada para estas comparaciones. Finalmente, se estableció la cantidad de alelos exclusivos por localidad, medida indirecta de la fijación por deriva génica.

9.6.2 Estructura genética

De igual manera, se evaluó la distribución de la variabilidad genética dentro y entre las poblaciones analizadas calculando los índices de diferenciación/endogamia (F_{IT} , F_{IS} , F_{ST}) para determinar el número de individuos migrantes por generación (N_m) de forma pareada. También se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) considerando la naturaleza hipervariable del marcador; utilizando el programa GenAlEx v.6.5. Además, se establecieron las distancias de Nei para marcadores hipervariables con lo que se construyó un árbol de divergencia genética mediante el algoritmo UPGMA (Hammer *et al.*, 2001).

Para establecer la cohesión genética entre los individuos dentro de las localidades y visualizar la estructura de alelos compartidos, se realizó un análisis de asignación basado en el modelo de Monte Carlo, considerando 50,000 permutaciones y 50,000 pasos de asignación por Bootstrap, con 10 iteraciones; bajo un modelo aditivo que considera *a priori* la identidad de procedencia de los individuos y los asigna a grupos hipotéticos. Se usaron de 2 a 12 grupos (k) (Falush *et al.*, 2007), para este análisis se utilizó el programa STRUCTURE v.5.4 (Pritchard *et al.*, 2000). El límite adecuado de asignación a la cantidad de grupos con la menor varianza acumulada fue calculado de acuerdo con el método gráfico propuesto por Evanno *et al.*, (2005) generado a partir del programa STRUCTURE HARDVESTER (Earl y Von-Holdt, 2012), el promedio de las iteraciones fue modelado con el programa CLUMPP v1.1.2 (Jakobsoon y Rosenberg, 2007) y visualizado mediante el programa Distruct v1.1 (Rosenberg, 2004).

Este modelo fue contrastado con los grupos obtenidos por un Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC), que muestra asociaciones entre individuos considerando las correlaciones y/o covarianzas de las frecuencias alélicas corregidas, independientemente de la

procedencia; por lo que se acerca más a un modelo nulo sin flujo génico, contrario al obtenido por STRUCTURE (Jombart *et al.*, 2010). Este análisis se realizó con el programa STATISTICA v10 (StatSoft, 2011).

Para determinar si existe aislamiento por distancia, condición que limita o fomenta el flujo génico; se realizó una prueba de Mantel considerando una matriz de distancias geográficas y una de distancias genéticas obtenidas por el modelo de Nei para marcadores hipervariables utilizando el programa TFPGA v.1.3 (Miller, 1997).

9.6.3 Cuellos de botella

Para estimar si han existido reducciones recientes en el tamaño efectivo poblacional, se realizó un análisis de cuello de botella, el cual considera la desviación del equilibrio deriva-mutación, que se observa en un incremento sustancial en la cantidad de genotipos heterocigotos para cada loci; generados por iteraciones bayesianas hasta por 10,000 pasos. Las frecuencias obtenidas se ajustan al modelo de Islas Infinitas (I. I. M.). El resultado final de la iteración fue comparado con lo esperado en el modelo de equilibrio mediante una prueba de Wilcoxon. El programa que se utilizó para este análisis fue Bottleneck v.1.2.02 (Cornuet y Luikart, 1996). Este análisis también detecta la falta de genotipos heterocigotos, disminución atribuible a un incremento poblacional basado en cruces endogámicas, lo que se considera un cuello de botella ancestral; además de poder analizar por separado cada locus. La comparación en cada locus depende de las diferencias entre la heterocigosis calculada y la heterocigosis esperada en el modelo de islas infinitas bajo el supuesto de equilibrio deriva-mutación ($H_E - H_{EQ} = D_H$), dividido entre la desviación estándar (DE) de la heterocigosis calculada por la iteración a 10,000 pasos.

9.6.4 Selección natural

Para determinar si algún loci se encuentra bajo el efecto de la selección natural se realizó un análisis de neutralidad. Para ello, se utilizó el programa BayeScan ver. 2.01 (Foll y Gaggiotti, 2008). El objetivo de este programa es identificar alelos con frecuencias alejadas de lo esperado por un modelo

aleatorio de Poisson, para ello se utilizó un modelo Markoviano Multinomial desarrollado por Dirichlet (Huelsenberck y Andolfato, 2007). Uno de los posibles escenarios consiste en un modelo de islas en el que las frecuencias de los alelos de las subpoblaciones se correlacionen a través de un grupo de genes migrantes en común de los que difieren en diversos grados no aleatorios, ya sea por flujo o por selección natural. Por lo tanto, esta formulación puede considerar escenarios ecológicos realistas en donde el tamaño efectivo, la tasa de inmigración y el coeficiente de adecuación pueden diferir entre poblaciones. En el modelo se utilizó un total de iteraciones de 150,000 con un tamaño de muestra de 5,000 considerando un intervalo de confianza mínimo de 20 iteraciones. El programa genera 10 análisis simultáneos para probar la neutralidad, cada uno con 5,000 pasos. El modelo final calibrado se genera a partir de 50,000 pasos.

10. RESULTADOS

10.1 Diversidad genética

Los resultados mostraron que la población con mayor diversidad genética fue la población tres, seguida de la población uno. Sin embargo, en todos los casos, incluyendo estas dos poblaciones; se manifestó endogamia y ninguna población se encontró en equilibrio de Hardy-Weimberg (χ^2 : 61.648 ± 30.79 , $p < 0.0001$), la más afectada por esta situación fue la población dos. Por otro lado, la población uno y dos, mostraron una mayor cantidad de alelos exclusivos, lo que se asocia a deriva genética por fijación y pérdida aleatoria de alelos (Tabla 6). En todos los casos el polimorfismo fue del 100%.

Tabla 6. Descripción genética de cinco poblaciones de *Ceratozamia kuesteriana* en la reserva de la biosfera “El Cielo” en Tamaulipas. **N:** Tamaño de muestra, **Na:** Promedio de alelos por locus, **Ne:** Número efectivo de alelos por locus, **I:** Índice informativo, **Ho:** Heterocigosis observada, **He:** Heterocigosis esperada, **F:** Coeficiente de fijación, **AP:** Número de alelos privados por población, **EHW:** Equilibrio de Hardy-Weimberg, ***: $p < 0.0001$.

Población	N	Na	Ne	I	Ho	He	F	AP	EHW
Población 1	31	5.33±0.50	3.62±0.30	1.39±0.09	0.57±0.10	0.70±0.03	0.21±0.13	2	***
Población 2	40	5.44±0.63	3.30±0.43	1.28±0.15	0.42±0.08	0.64±0.06	0.39±0.12	2	***
Población 3	56	5.89±0.66	3.85±0.47	1.43±0.11	0.58±0.10	0.71±0.03	0.19±0.13	1	***
Población 4	28	5.44±0.67	3.39±0.56	1.29±0.16	0.56±0.11	0.64±0.06	0.22±0.13	1	***
Población 5	46	5.00±0.55	3.43±0.49	1.25±0.17	0.56±0.12	0.63±0.08	0.24±0.16	1	***
TOTAL	40.20±1.53	5.42±0.26	3.52±0.2	1.33±0.06	0.53±0.05	0.66±0.03	0.25±0.06	5	***

10.2 Estructura genética

El análisis de varianza molecular (AMOVA) mostró que existen diferencias significativas a todos los niveles (F_{st} (4, 401): 0.151, F_{it} (201, 401): 0.329, F_{is} (196, 401): 0.209; en todos los casos $p < 0.001$), (Tabla 7) aunque la mayor diferenciación se da al interior de los individuos (67%), seguida de la diferencia intrapoblacional (18%) con la mejor diferenciación entre poblaciones (15%). Las distancias de Nei mostraron que la mayor similitud se encuentra entre las poblaciones uno y cinco seguidas de las poblaciones dos y tres, siendo la población cuatro la más diferenciada (Figura 8), no obstante en el agrupamiento, todas fueron significativamente distintas.

Tabla 7. Número de individuos migrantes por generación (diagonal superior) e índices de diferenciación pareados (diagonal inferior) entre las localidades de *Ceratozamia kuesteriana* analizadas, **Fst**: Índice de diferenciación pareados, **Nm**: Migrantes por generación. * Diferencias significativas de acuerdo a la prueba AMOVA.

Fst/Nm	Población 1	Población 2	Población 3	Población 4	Población 5
Población 1		1.853*	1.879*	1.186*	2.838*
Población 2	0.119		1.556*	1.086*	1.037*
Población 3	0.117	0.138		1.459*	1.177*
Población 4	0.174	0.187	0.146		1.228*
Población 5	0.081	0.194	0.175	0.169	

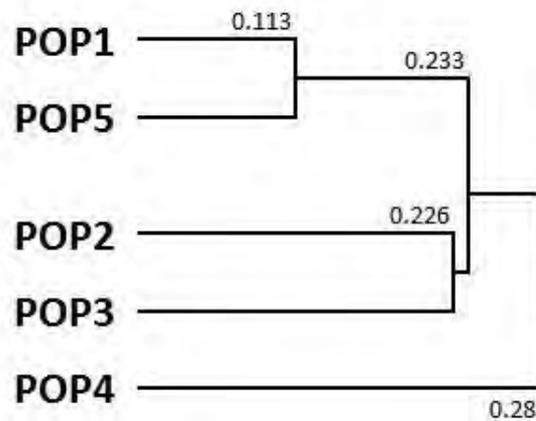


Figura 8. Árbol de agrupamiento UPGMA considerando las distancias de Nei entre las poblaciones de *Ceratozamia kuesteriana*.

El análisis de asignación bayesiana mostró que en las cinco poblaciones de *C. kuesteriana* analizadas, se encuentran nueve grupos genéticos (Figura 9).

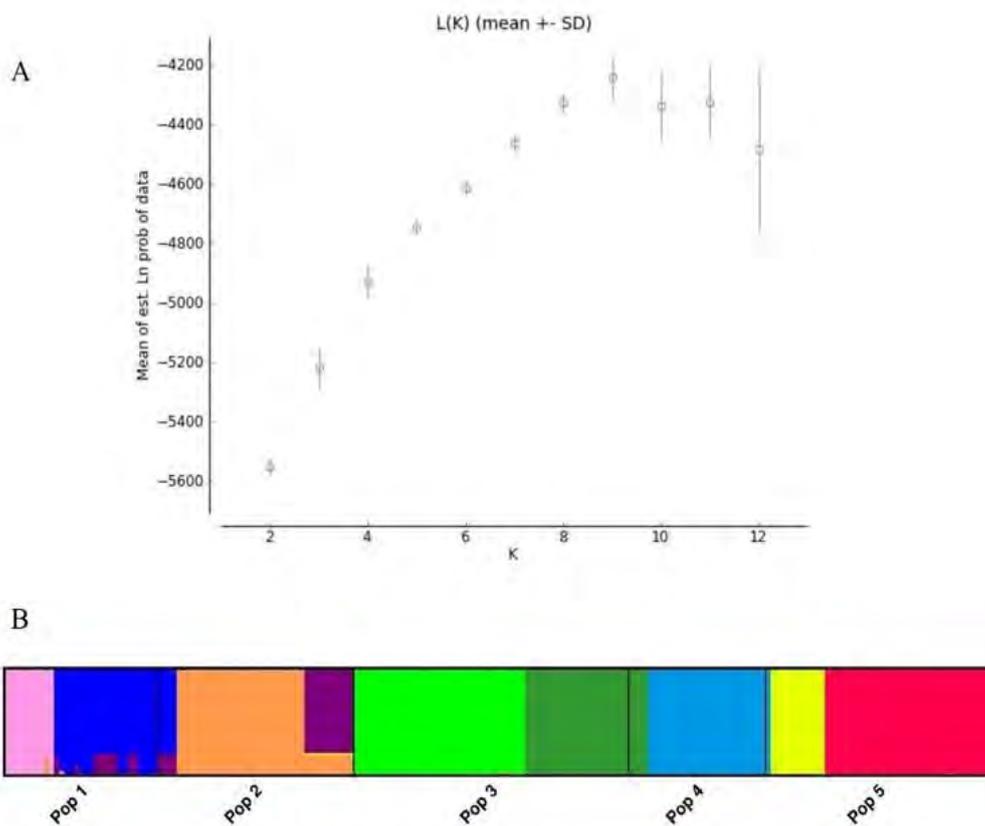


Figura 9. Análisis de asignación para las cinco poblaciones de *Ceratozamia kuesteriana*. A) Número de grupos genéticos de acuerdo a la propuesta de Evanno *et al.*, 2005. B) Análisis de asignación promedio.

El Análisis de Funciones Discriminantes de Componentes Principales (DAPC), coincide con el resultado del AMOVA al mostrar que la mayoría de las poblaciones difieren significativamente ($F_{(18,179)}: 72.5 \pm 65.49, p < 0.0001$), con excepción de las poblaciones uno y dos. La variación entre las frecuencias alélicas de las poblaciones analizadas se explica por dos funciones discriminantes (F1 eigenvalue: 28.24, Var. Exp: 89.78; F2 eigenvalue 1.72, Var. Exp: 5.49%, Var. Exp. 95.27%). El primer factor se encuentra correlacionado con las frecuencias alélicas de los loci: Zam29 ($r: -2.67$), Zam34 ($r: -1.36$), Zam39 ($r: 1.37$), Zam40 ($r: -2.34$) y Zam45 ($r: -1.36$); el segundo factor se relaciona únicamente con Zam39 ($r: 0.83$). Con estos atributos es posible asignar a los individuos a sus respectivas poblaciones de origen con porcentajes de entre 82.5% y 100%, siendo la población tres la más diferenciada (Figura 10).

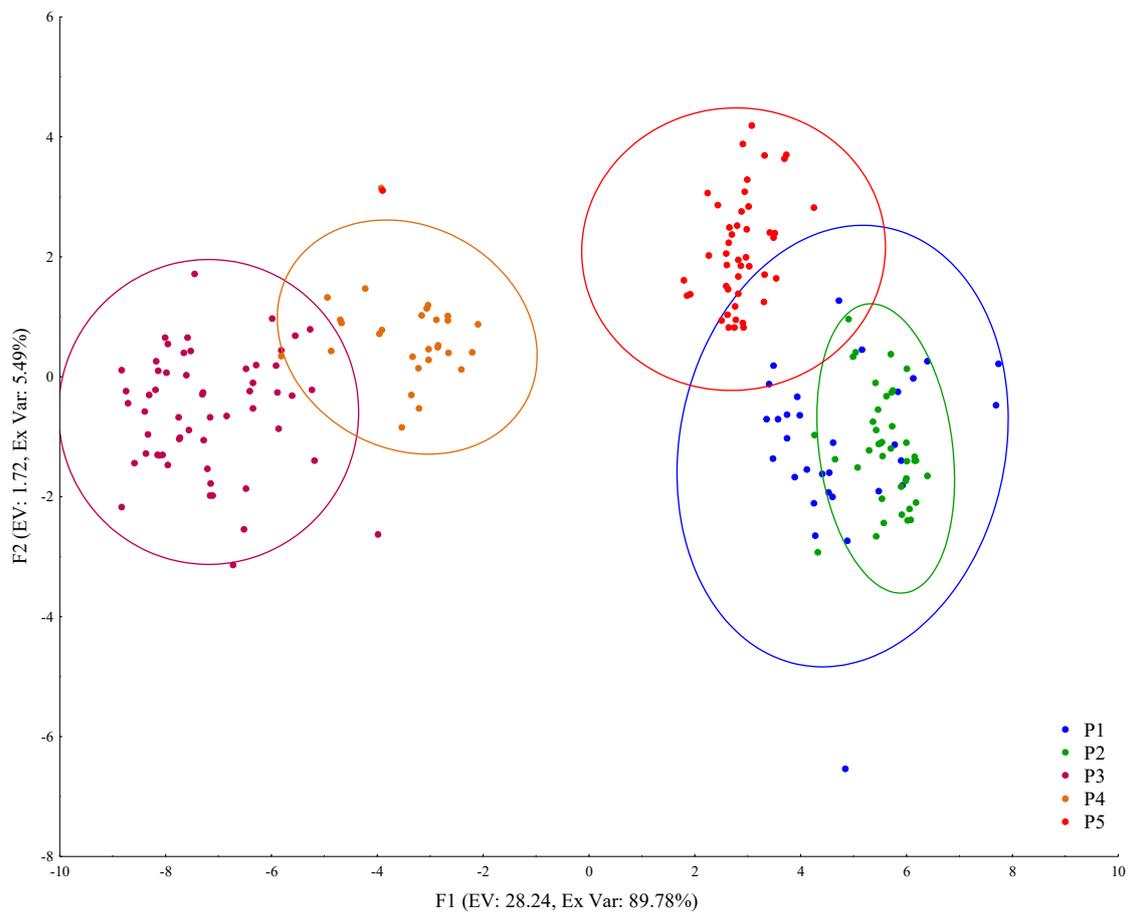


Figura 10. Análisis de Funciones Discriminantes de Componentes Principales para las poblaciones de *Ceratozamia kuesteriana*.

Finalmente, en cuanto a la estructura genética; el modelo de aislamiento por distancia (Stepping Stone) no es adecuado para explicar la distribución de la variación genética entre las poblaciones de *Ceratozamia kuesteriana*, ya que de acuerdo con la prueba de Mantel (Figura 11); no existe una correlación significativa entre las distancias genéticas de Nei con respecto a las distancias geográficas ($r = 0.1814$, $p = 0.648$).

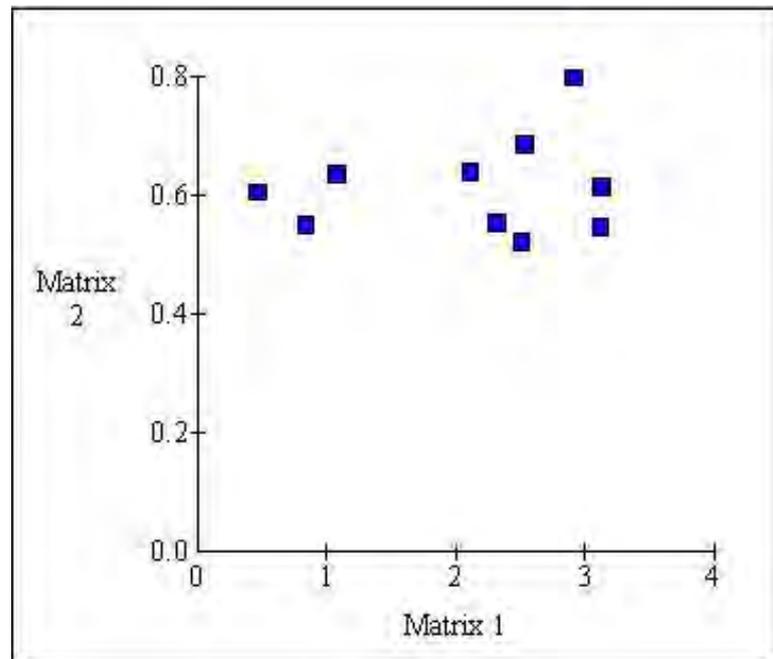


Figura 11. Prueba de Mantel entre las distancias geográficas en kilómetros (Matriz 1), con respecto a las distancias de Nei (Matriz 2), para las cinco poblaciones de *Ceratozamia kuesteriana*.

10.3 Cuellos de botella

Todas las poblaciones presentan cuellos de botella de magnitudes variables, siendo la población cuatro la que presenta la menor magnitud de la reducción poblacional y las poblaciones uno y tres las más afectadas. La mayoría de los loci analizados se alejan del equilibrio deriva-mutación al presentar exceso de heterocigosidad, por lo que se infiere que los cuellos de botella detectados son recientes (Tabla 8). El locus Zam40 y Zam45, tienen deficiencia de heterocigosidad en las poblaciones dos y cinco, por lo que los eventos de reducción podrían ser más antiguos que en el resto de las poblaciones.

Tabla 8. Frecuencia de heterocigosidad (Heq) por loci determinado por el análisis de cuellos de botella para *Ceratozamia kuesteriana*. Pob: Población, LD: Loci con deficiencia de heterocigosidad, LE: Loci con exceso de heterocigosidad, H: Prueba de Wilcoxon, p: Probabilidad, CB: Intensidad del Cuello de Botella.

Pob	Locus	Heq	LD	LE	H	p	CB
1	Zam 28	0.710	0	9	3.342	0.00195	***
	Zam 29	0.665					
	Zam 32	0.549					
	Zam 34	0.544					
	Zam 35	0.554					
	Zam 39	0.462					
	Zam 40	0.353					
	Zam 41	0.618					
	Zam 45	0.550					
2	Zam 28	0.647	1	8	2.373	0.00882	**
	Zam 29	0.721					
	Zam 32	0.529					
	Zam 34	0.534					
	Zam 35	0.533					
	Zam 39	0.535					
	Zam 41	0.599					
	Zam 45	0.522					
3	Zam 28	0.620	0	9	3.496	0.00024	***
	Zam 29	0.725					
	Zam 32	0.500					
	Zam 34	0.502					
	Zam 35	0.499					
	Zam 39	0.505					
	Zam 40	0.324					
	Zam 41	0.612					
	Zam 45	0.564					
4	Zam 28	0.715	0	9	2.211	0.01351	*
	Zam 29	0.714					
	Zam 32	0.545					
	Zam 34	0.554					
	Zam 35	0.473					
	Zam 39	0.472					
	Zam 40	0.206					
	Zam 41	0.675					
	Zam 45	0.620					
5	Zam 28	0.504	2	7	2.746	0.00301	**
	Zam 29	0.680					
	Zam 32	0.525					
	Zam 34	0.526					
	Zam 35	0.421					
	Zam 39	0.437					
	Zam 41	0.579					

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: 0.001

10.4 Selección Natural

Se identificaron cuatro loci alejados de la neutralidad. Para corroborar el tipo de selección que actúa sobre estos marcadores se realizó una tabla con las frecuencias alélicas por población (Tabla 9), en donde se observa que los loci Zam34, Zam39 y Zam41, presentan exceso de heterocigotos para dos o tres alelos específicos (selección balanceadora); mientras que el locus Zam40 presenta deficiencia de heterocigotos (selección direccional), con particular intensidad en la población cinco.

Tabla 9. Frecuencias alélicas para los loci sometidos a presiones de selección natural por el modelo de Dirichlet, en las cinco poblaciones de *Ceratozamia kuesteriana*. pb: Pares de bases, HE: heterocigosis calculada, POP: población. Rojo alelos con baja frecuencia, potencialmente con selección en contra. Verde alelos con frecuencia alta, potencialmente con selección a favor. Amarillo alelos con baja frecuencia pero no dentro de lo esperado por un modelo de neutralidad.

	pb	POP1	POP2	POP3	POP4	POP5
Zam34	97	0.016	0.088	0.089	0.071	0.087
	100	0.290	0.350	0.250	0.375	0.293
	103	0.371	0.388	0.295	0.429	0.261
	106	0.242	0.075	0.205	0.107	0.250
	111	0.081	0.100	0.161	0.018	0.109
	HE	0.71279599	0.7040625	0.77471413	0.65880255	0.7639386
Zam39	97	0.000	0.000	0.000	0.036	0.272
	105	0.000	0.025	0.384	0.375	0.304
	110	0.065	0.325	0.080	0.464	0.326
	114	0.435	0.488	0.107	0.125	0.098
	120	0.339	0.088	0.339	0.000	0.000
	126	0.161	0.075	0.089	0.000	0.000
	HE	0.66545541	0.6428125	0.71157064	0.62690959	0.71762305
Zam40	59	0.194	0.000	0.000	0.000	0.000
	67	0.129	0.900	0.000	0.000	0.000
	77	0.677	0.100	0.000	0.000	0.978
	98	0.000	0.000	0.000	0.839	0.022
	109	0.000	0.000	0.473	0.161	0.000
	119	0.000	0.000	0.357	0.000	0.000
	126	0.000	0.000	0.170	0.000	0.000
	HE	0.4869918	0.18	0.61974559	0.26976459	0.04253474
Zam41	175	0.258	0.300	0.214	0.071	0.087
	196	0.097	0.175	0.027	0.054	0.217
	208	0.274	0.313	0.357	0.125	0.174
	217	0.242	0.138	0.152	0.446	0.304
	225	0.048	0.050	0.107	0.161	0.163
	238	0.081	0.025	0.080	0.125	0.054
	257	0.000	0.000	0.063	0.018	0.000
	HE	0.78147947	0.7596875	0.78092995	0.73533158	0.79276997

11. DISCUSIÓN

De acuerdo a los objetivos planteados, este trabajo se enmarca en dos dimensiones de acuerdo a la propuesta de Baker (1938): una dimensión próxima o ecológica y una dimensión última o evolutiva. Respecto a la primera dimensión, las especies no se distribuyen al azar, sino que la densidad de individuos en un área responde a la disponibilidad de recursos y a la tasa de crecimiento específica de la población (Rubio-Tobón, 2015). Bajo esas dos limitantes, la estrategia de subsistencia que la especie adopta como respuesta a sus necesidades es garantizar los eventos reproductivos (Begon, 2009), que pueden ser limitados ante factores abióticos (latitud, altitud y longitud) o bióticos (polinizadores, dispersores, depredadores; Scheiner, 1993). Las cícadas son plantas de crecimiento lento, limitadas por sus asociaciones bióticas, con dependencias espaciales específicas y una alta mortalidad en etapas tempranas. Todos estos elementos modifican las frecuencias alélicas de una población de manera repentina y muchas veces aleatoria (Octavio-Aguilar, 2009). Por lo que nuestros resultados pueden ser un reflejo del estado actual y ecológico de las poblaciones en la reserva de la biosfera “El Cielo”.

En cuanto al segundo nivel o dimensión se podría centrar en las ideas principales derivadas de la teoría Darwin-Wallace sobre la evolución de las especies. En principio los organismos son el resultado de su historia evolutiva, es decir; de ancestría-descendencia a partir de modificaciones graduales y muchas veces permanentes que pueden ser una respuesta a cambios ambientales (selección natural), procesos aleatorios (deriva, mutación), frecuentistas (endogamia) o meramente geográficos (flujo génico) (Futuyma, 1986; Li, 1997; Schaal *et al.*, 2003; Aguirre-Planter, 2007; Castillo-Cobián, 2007). Además, existe cierta resistencia al cambio ambiental por modificaciones en la expresión de los genes (mayor cantidad de mensajeros, limitación de la generación de proteínas, modificaciones postranscripcionales y postraduccionales, etc.), lo que se conoce como "plasticidad fenotípica", lo que incrementa la respuesta de los organismos sin realizar cambios basales en la información genética, aquellos genes capaces de modificar su expresión estarían relacionados con procesos de arrastre filogenético al no cambiar entre especies y poblaciones sino simplemente mostrar

diferentes patrones de expresión sin dejar huellas en el genoma. Esto permite conservar o ampliar el nicho ecológico de las especies (Stearns, 1992; Peterson *et al.*, 1999; Wiens y Graham 2005). Al respecto, las cícadas son organismos que conservan atributos morfológicos ancestrales, al grado de considerarse fósiles vivientes, por lo que resultan ser organismos plásticos y adaptables, con alta variabilidad morfológica asociada a los ambientes donde se desarrolla (Vovides *et al.*, 2018). Por ejemplo, se ha logrado establecer una relación entre el grosor de la cutícula adaxial de los folíolos y la profundidad de los huecos estomatales como una respuesta ante ambientes secos, al menos en el género *Dioon* (Vovides *et al.*, 2018). Sin embargo, estas adaptaciones parecen ser filogenéticamente independientes, limitando el proceso de arrastre y conservadurismo. Esta variación no se ha asociado con la presencia de alelos mutables, cambios en secuencias o modificaciones sustanciales al genoma, sino con la propia adaptabilidad de la planta al ambiente.

Por lo tanto, para entender los resultados, hay que recordar que las cícadas son un grupo de especies con historias evolutivas amplias y bien documentadas, donde procesos tanto ambientales como genéticos; han generado cambios en su diversidad. Por ejemplo, las especies del nuevo mundo tienen mayor diversidad genética que las del viejo mundo (González-Astorga *et al.*, 2009). Además, las cícadas con mayor distribución geográfica presentan en general mayor nivel de variación que las de distribución restringida; fenómeno asociado a la fragmentación (próximo) y a la endogamia (último) (Griffith *et al.*, 2015). En esencia, las cícadas son diversas genéticamente pero sus poblaciones se diferencian en la mayoría de los casos, por lo que la variación no se encuentra distribuida de manera homogénea, poniendo en riesgo a las poblaciones en los extremos de la distribución o sometidas a condiciones diferentes (Tabla 2).

11.1 Diversidad y estructura genética

Uno de los principales objetivos de la biología evolutiva es estimar la estructura genética y la dinámica de la diversidad en las poblaciones (Wright, 1978; Octavio-Aguilar *et al.*, 2009). Algunos de los principales rasgos de la historia de vida que modifican la estructura genética de una población son: forma de vida, área de distribución geográfica, sistemas de reproducción y dispersión de semillas

y polen (Hamrick y Godt, 1989; Epperson y Tian-Quan, 1997). Estos atributos son limitados en las cícadas, incluyendo a *C. kuesteriana*, especie restringida al límite de la distribución del género, con dispersión de polen y semillas limitada a unos cuantos metros, asociada con la presencia de polinizadores específicos, con distribución puntual en la reserva de la biósfera “El Cielo”, sensible a la fragmentación, aunque de larga vida; sumado a las presiones climáticas que el calentamiento global representa para una especie con estas limitaciones (López-Gallego, 2008; Octavio-Aguilar *et al.*, 2008; Vovides y Nicolalde-Morejon, 2010; Rubio-Tobón, 2015).

No obstante, *C. kuesteriana* presentó alta diversidad genética global, pero al interior; cada población mantiene una base genética divergente, limitada, alejada del equilibrio de Hardy-Weimberg, con cuellos de botella de diferentes magnitudes y variación producto de la endogamia (Tabla 3). Esto, se hace evidente en el trabajo previo realizado por Montelongo-Ruíz (2016), donde se establece que las poblaciones de *C. kuesteriana* tienen alta diversidad genética con 76 loci obtenidos por ISSR y con la mayor diferenciación dentro de las poblaciones. Algunos estudios sobre especies de larga vida han propuesto que los procesos que afectan la estructura y diversidad genética están relacionados con la supervivencia de las semillas, el patrón de distribución espacial, el rango de dispersión de sus propágulos (éxito reproductivo), la fecundidad durante la fase adulta y los procesos de fragmentación del hábitat (Hamrick y Godt, 1989; Kaufman, 1998; Austerlitz *et al.*, 2007, Octavio-Aguilar *et al.*, 2009). Por ejemplo, en poblaciones del árbol longevo *Antirhea aromatica*, las plántulas mantienen un porcentaje mayor de loci polimórficos y heterocigosidad que los adultos (González-Astorga y Castillo-Campos, 2004), al igual que en las palmas *Astrocaryum mexicanum* (Eguiarte *et al.*, 1992) y *Euterpe edulis* (Conte *et al.*, 2003) y *Cecropia obtusifolia* (Alvarez-Buylla y Garay, 1994). En *Dioon edule* las semillas representan un importante reservorio de diversidad genética que se pierde o se reduce significativamente en los adultos, por la alta mortalidad de semillas (Octavio-Aguilar, 2009). Contrariamente, en *Ilex guayusa* la mayor heterocigosis se presenta en adultos, fenómeno dado por la baja producción de semillas (Mosquera-Bolaños, 2015). De igual manera, un estudio con *Vaccinium corymbosum* (Ericaceae) encontró que la heterocigosidad de los adultos

aumenta debido al aborto de la mayoría de las semillas auto-fertilizadas (Krebs y Hancock, 1990). Esto indica procesos de supervivencia diferenciales que favorecen a los homócigos (selección direccional) en la mayoría de los casos, y un cambio en las frecuencias genóticas entre categorías. Estos resultados sugieren que las semillas y las plántulas representan un reservorio de variabilidad genética en poblaciones naturales de *C. kuesteriana* lo que tiene importantes repercusiones ecológicas y evolutivas (Alvarez-Buylla *et al.*, 1996).

En las poblaciones de *C. kuesteriana* existe una estructura demográfica dominada por las categorías tempranas (plántulas y juveniles), mientras que los adultos son menos abundantes, con excepción de la población tres (Tabla 3), esto sugiere una baja supervivencia y transición entre categorías, tal como se ha reportado en otras cícadas (Pérez-Farrera *et al.*, 2006; Octavio-Aguilar *et al.*, 2008; Rubio-Tobón, 2015); por lo que la pérdida de variabilidad asociada a la mortalidad de plántulas sería más severa en poblaciones pequeñas dominadas por adultos y juveniles (poblaciones dos y tres de este estudio), las cuales ya habrían sido depuradas por la mortalidad diferencial entre categorías mencionadas en párrafos anteriores, llevando a una homogeneidad genética estable y con mejores perspectivas ante las presiones de selección, afirmación sostenida por los resultados del análisis de neutralidad. Solo en la población dos, la cuál fue la menos diversa genéticamente (Tabla 6), la pérdida de variabilidad no necesariamente está asociada a procesos dirigidos de selección.

Otra causa de pérdida de diversidad es la ausencia de flujo génico, que además incrementa la estructura, aún a corta distancia geográfica; por lo que se infiere la pérdida de conectividad por ausencia de polinizadores naturales (Iglesias-Andreu *et al.*, 2017; Octavio-Aguilar *et al.*, 2017a). Esto tiende a generar huecos generacionales, manteniendo a las poblaciones estáticas, tal es el caso de la cícada en cuestión, donde la ausencia de adultos en las poblaciones cuatro y cinco sugieren una disminución de la tasa de crecimiento y la persistencia de las poblaciones por estasis no reproductiva de juveniles (Rubio-Tobón, 2015). En las poblaciones uno y dos, la ausencia de plántulas sugiere estasis poblacional por incremento de adultos infértiles o sin éxito reproductivo (Castillo-Lara *et al.*, 2017), lo que sugiere riesgo de endogamia, pérdida de reclutamiento y/o ausencia de polinizadores.

Solo en la población tres se encuentran individuos equitativamente repartidos en todas las categorías, siendo esta la localidad con mejor potencial de aprovechamiento, además de mantener la mayor diversidad genética asociada. Para inferir que estamos ante la presencia de poblaciones estáticas (uno y dos), en declive (cuatro y cinco) y resilientes (tres); se sugiere realizar trabajos a futuro sobre demografía, interacciones biológicas para detectar la presencia o ausencia de polinizadores y dispersores además de un análisis de perturbación sobre las poblaciones, para saber si existe alguna relación con la diferenciación y pérdida de diversidad; tal como se han reportado en *Dioon edule* (Octavio-Aguilar, 2009), *Ceratozamia mexicana* (Rivera-Fernández, 2012), *Ceratozamia fuscoviridis* (García-Montes, 2017), *Zamia furfuracea* (Octavio-Aguilar *et al.*, 2017a) y *Zamia inermis* (Iglesias-Andreu *et al.*, 2017).

Adicionalmente, considerando su estatus de conservación en Peligro Crítico (CR), y con base en los resultados se puede inferir que las poblaciones de *C. kuesteriana* están próximas a desaparecer, particularmente las ubicadas en las localidades cuatro y cinco; presentado escenarios parecidos a *Zamia inermis*, que sólo se conoce una población compuesta de tres subpoblaciones distribuidas en tan sólo 2.5 km² de pastizales y bosques estacionalmente secos y fragmentados y con un reclutamiento extremadamente bajo y su diversidad genética está insuficientemente representada en los cultivos (Octavio-Aguilar *et al.*, 2017b, c; Iglesias-Andreu *et al.*, 2017).

11.2 Cuellos de botella

Un cuello de botella es una drástica reducción temporal en el tamaño poblacional por deforestación, fragmentación, incendios, etc. (Arenas *et al.*, 2012; Jian, *et al.*, 2015). El efecto genético ocurre cuando una población o especie se reduce a uno pocos individuos reproductivos, cuyos descendientes se incrementaran en número luego de relativamente pocas generaciones, logrando restablecer la población (Klug *et al.*, 2013). En las cícadas, se ha reportado que la mayoría de sus poblaciones presentan cuellos de botella recientes, que promueve el efecto fundador en especial en el género *Zamia*, debido a que sus ciclos de vida son relativamente cortos en comparación del resto del grupo (González-Astorga *et al.*, 2005). Con respecto a nuestro estudio, las poblaciones de *C. kuesteriana*

son pequeñas y aisladas dentro de la Reserva, ya sea por la llegada fortuita de unas pocas semillas con poca representatividad de la variación genética de su población fuente o por la reducción del tamaño poblacional en eventos recientes de fragmentación (Keppel *et al.*, 2002). Se ha sugerido que en pequeñas poblaciones, como la de algunos fundadores; la deriva genética resulta en una reducción en la variación genética (Neigel, 1996) incrementada por eventos posteriores de reproducción endogámica. Considerando que todas las poblaciones estudiadas aquí están distribuidas en condiciones climáticas similares dentro de un área que se supone ha sido bien conservada al formar parte de un Área Natural Protegida (Morrone *et al.*, 2002; Mora-Olivo *et al.*, 2008), la causa más probable de aislamiento es la deriva génica, observación que se sustenta en los coeficientes de endogamia positivos y significativos (Tabla 6). Además de la presencia de varios alelos exclusivos en las cinco poblaciones analizadas (Tabla 7); aunque aún no se observa una reducción en la diversidad genética de la especie. Esto puede ser resultado del tiempo de vida largo propuesto para *Ceratozamia*, que ronda alrededor de 250 años o más (Sánchez-Tinoco *et al.*, 2000), lo que mantendría la variabilidad acumulada de varias generaciones dentro de las poblaciones, tal como lo muestra el AMOVA.

Las poblaciones de *C. kuesteriana* analizadas presentaron cuellos de botellas en diferentes tiempos y de diferente magnitud. La mayoría de los loci se alejan del equilibrio deriva-mutación al presentar exceso de heterocigosidad, esto se traduce como cuellos de botella recientes en las poblaciones uno (estática), tres (resilente) y cuatro (en declive). Las poblaciones con deficiencia de heterocigosidad son la dos (estática) y la cinco (en declive) por lo que los eventos de reducción podrían ser más antiguos. En cuanto a la magnitud, los resultados sugieren que en la población tres la reducción poblacional no ha sido sostenida, que en las poblaciones uno y dos fueron repetitivos y que en las poblaciones cuatro y cinco fueron de gran magnitud; por lo que en estos lugares el efecto coincide con la cantidad de alelos exclusivos encontrados. Estos resultados corroboran lo que observó Montelongo-Ruíz (2016), quien reporta que la población tres tiene la mayor heterocigosis, siendo la más conservada, con mayor representatividad alélica y con una reducción moderada en tiempo y

espacio; amenazada únicamente por la reducción ya mencionada aunque se puede considerar ancestral. Por el contrario, las poblaciones dos y cinco, tienen menos diversidad, tanto en los resultados de Montelongo-Ruiz (2016) como en los del presente estudio; por lo que han sufrido la mayor pérdida de individuos, durante más tiempo aunque con una recuperación diferente (Tabla 7). Ambos estudios, resaltan la importancia de conservar a las poblaciones en peligro (P4 y P5) así como a la más representativa para la especie (P3).

11.3 Selección natural

En las pruebas de neutralidad se observó que las poblaciones se encuentran bajo selección, siendo esta la mayor contribución del trabajo; aunque solo cuatro loci se alejan de la neutralidad; tres con exceso de heterocigotos (selección balanceadora) y uno monomórfico para la población cinco debido a selección direccional (Tabla 9). Los marcadores SSR utilizados en este trabajo, representan la variación en el número de copias de un arreglo del DNA no codificante; de ahí su alta variabilidad y eficacia para detectar cuellos de botella y otras fuerzas evolutivas neutrales. Sin embargo, el que los loci Zam34, Zam39, Zam40 y Zam41, se alejen de lo esperado bajo una distribución de probabilidad Poisson, es decir; aleatoria propia de los SSR (Huelsenberck y Andolfato, 2007); implica una direccionalidad en las frecuencias de ciertos alelos. En otras palabras, la presencia de algunos alelos específicos podría incrementar la probabilidad de supervivencia y por ende; la adecuación del portador (Futuyma y Moreno, 1988; Hartl y Clark, 1997; Li y Ge, 2001). La única manera en que estos marcadores neutrales puedan fluctuar sus frecuencias de esta manera es que se encuentren ligados cromosómicamente a genes codificantes, por lo que se requieren análisis posteriores de aislamiento y secuenciación, a fin de identificar qué genes les confieren ventajas en este ambiente particular a las plantas por procesos de evolución secundaria inducidos por la adaptación ecológica. Otra manera de buscar de manera indirecta, una medida de selección, es la comparación de las frecuencias genotípicas entre generaciones a fin de cuantificar la pérdida o ganancia de genotipos dentro de la misma población (Hartl y Clark, 1997). En ambos casos, esta evaluación trascienden los objetivos del trabajo, por lo que se propone para futuras investigaciones.

Llama la atención la baja heterocigosis para el locus Zam40 en la población cinco, siendo este el principal marcador que se aleja de la neutralidad (Tabla 9). Dicho marcador es el primer blanco a secuenciar en estudios posteriores, puesto que se manifiesta selección direccional en una localidad que ya de por sí ha sido identificada como prioritaria por el descenso en su variabilidad, la intensidad del cuello de botella y la pérdida de organismos adultos; lo que sugiere una diferenciación selectiva para las nuevas generaciones. Si otros loci tuviesen el mismo comportamiento, se trataría de un proceso inicial de especiación en este extremo de la distribución para el género asociado a una zona de alta divergencia tal como lo sugiere Wright (1968). Por ello, vale la pena estudiar el genoma y transcriptoma de esta especie, específicamente en esta región, para detectar genes y variación adaptativa que permita un manejo dirigido a la conservación en zonas con condiciones ambientales extremas. Aunque por los tiempos generacionales de *C. kuesteriana*, hay que tomar esta afirmación con cuidado antes de hablar de nuevas especies, asumiendo que se requieren estudios taxonómicos y sistemáticos para sostener la identidad generada *de novo* para el taxón sugerido.

11.4 Estrategias de Conservación

El 34 % de la riqueza de cícadas en México, incluyendo *C. kuesteriana*; se encuentra en la provincia biogeográfica de la SMO (Yáñez, 2006), que también sobresale por riqueza y endemismos de otros organismos (Luna *et al.*, 2004). Sin embargo, las estrategias de conservación biológica en la SMO son urgentes, debido a que no se conoce de manera suficiente la composición de especies ni su distribución a escala geográfica local. Además, no se han establecido estrategias que garanticen la protección de la biodiversidad, no se tiene registro sobre programas de propagación tanto *in situ* como *ex situ* de especies vegetales, no hay programas de regeneración que contemplen a las cícadas para reforestar o estudios ecológicos detallados sobre la viabilidad de estas plantas en peligro (Vite *et al.*, 2013). Sin embargo, el Jardín Botánico Francisco Javier Clavijero, del Instituto de Ecología A. C. en Xalapa, Veracruz; dispone de ejemplares vivos para fines de investigación y conservación, aunque no en número suficiente para constituir un banco de germoplasma adecuado (Litz *et al.*, 2004). En cuanto a la conservación *ex situ*, las únicas poblaciones en estado natural para esta cícada están

restringidas a las partes altas de la Reserva de la Biosfera “El Cielo”, por lo que se esperaría que la continuidad de las poblaciones estuviese garantizada por la protección de estas plantas (Vovides y Nicolalde-Morejón, 2010).

Nuestros resultados demuestran que, aun cuando las poblaciones se encuentran en una zona protegida; existen procesos de degradación genética que constituyen una amenaza puntual y persistente, por lo que no basta únicamente con mantener a las plantas en la reserva. Los resultados también muestran que la regeneración natural está limitada, por lo que la propagación asistida puede ser una opción viable para la obtención de germoplasma representativo de la región y de la especie. Al respecto, los resultados del presente estudio indican que esta representatividad se obtiene de las poblaciones tres, al ser la más diversa y cinco al tener alelos exclusivos asociados a un proceso de selección direccional.

De acuerdo con Pérez-Farrera y Vovides (1997) en su manual para el cultivo y propagación de cícadras, las estrategias de conservación pueden ocurrir en dos niveles:

11.4.1 Propagación artificial

Se basa en la implementación de alta tecnología donde se hace investigación a fondo en colaboración con los jardines botánicos y los viveros comerciales para incrementar el crecimiento y germinación de las plantas, como por ejemplo, los trabajos realizados por Dehgan (1983); Dehgan y Johnson (1983); Dehgan y Schutzman (1983); Dehgan y Schutzman (1989); Dehgan y Almira (1993) y Pérez Farrera (1994), usando reguladores de crecimiento y fertilizantes de acción lenta. Sin embargo, la conservación de cícadras podría ser más efectiva si se mejoran los métodos de propagación, ya que presentan una lenta tasa de crecimiento, baja viabilidad de sus semillas y un limitado potencial para la propagación vegetativa, lo que disminuye severamente la regeneración natural y la propagación controlada (Dehgan, 1997, Dominic y Joseph, 2007). Por otro lado, Chávez y Litz (1999), sugieren que los protocolos de micropropagación deberían ser parte de las alternativas de conservación de las especies de cícadras amenazadas a través del mantenimiento *in vitro* de bancos de germoplasma (Urrea *et al.*, 2012).

La micropropagación en *Zamiaceae*, ha sido evaluada vía organogénesis y embriogénesis somática (Rinaldi, 1999). Se han logrado cultivos embriogénicos tanto a partir de hojas (Chávez *et al.*, 1998 y Dhiman *et al.*, 1998) como de megagametofito (Chávez *et al.*, 1992a, b; Jäger y Van Staden, 1996), aunque la organogénesis solo ha sido reportada para *Cycas circinalis* (Dominic y Joseph, 2007). Sin embargo, la regeneración de las plantas solo se ha logrado en *Zamia pumila*, (Chávez, 1992a) y *Dioon edule* (Chávez y Litz, 1999). No hay casos reportados para ninguna *Ceratozamia*, lo que genera incertidumbre sobre el éxito de esta estrategia para *C. kuesteriana*.

11.4.2 Programas de manejo

Comprende programas de conservación apoyados en tecnologías (viveros, técnicas de extracción y mantenimiento, crioprocésamiento, entre otros.) desarrolladas para campesinos directamente en el hábitat donde persisten las poblaciones, los cuales pueden manejar y propagar a las cicadáceas *in situ* como una pequeña industria. Esto puede realizarse a partir de la colecta de semillas maduras de plantas madres adultas de las poblaciones naturales (Pérez-Farrera y Vovides, 1997). Sin embargo, para ello es necesario contar con datos demográficos de viabilidad de las semillas, producción promedio de conos y mortalidad en campo; datos importantes para no afectar a las poblaciones naturales. Específicamente, nuestros resultados solo muestran la región donde se podrían implementar los cultivos *in situ* o huertos rurales, pero no disponemos de datos demográficos concretos, lo que hace urgente este tipo de estudios.

Una parte de lo que ellos cultivan podría comercializarse, bajo la figura de UMA, comprometiendo otra parte a la reintroducción. La proporción destinada a la regeneración deberá ser establecida con base en los datos de supervivencia de las plántulas en su transición al estado juvenil, lo que podría tomar más de 16 años de acuerdo a lo reportado en otras cícadas (Vovides *et al.*, 2010a). Esto, reduciría la presión ejercida por la colecta y saqueo ilegal, de las poblaciones naturales. Los campesinos actuarían como guardias de su propio recurso y ellos tendrían incentivos para conservar un hábitat productivo (Vovides e Iglesias, 1994).

Estas estrategias han logrado éxitos parciales para la conservación de otras cícadas mexicanas. En Chiapas, campesinos de los ejidos La Sombra De La Selva, Tres Picos y Nueva Independencia, municipio de Villaflores; han establecido viveros *in situ* de *Ceratozamia norstogii*, y *Dioon merolae* en los ejidos de Andrés Quintana Roo, municipio de Jiquipilas y La Sombra De La Selva. Otros viveros similares se han establecido en Veracruz con la propagación de *D. edule* en el ejido el Palmar y en Alvarado, Veracruz con la propagación de *Zamia furfurácea* (Vovides e Iglesias, 1994). Actualmente, se han iniciado cultivos en huertos rurales con algunas cícadas (*C. norstogii*, *D. merolae*, *D. edule* y *Z. furfurácea*) en comunidades de la Reserva de la Biósfera “La Sepultura” y “El Triunfo” (Pérez-Farrera y Tejeda-Cruz, 1996; Vovides *et al.*, 2002). Estos ejemplos sugieren que la propagación rural es una alternativa viable para *C. kuesteriana*, ya que comparte algunos atributos poblacionales con *Zamia inermis* en Veracruz, (distribución geográfica restringida, sistemas específicos de reproducción, ausencia de polinizadores naturales, baja dispersión de semillas, reclutamiento extremadamente bajo, mayor persistencia en la categoría de adultos, altos niveles de endogamia y estructura genética altamente diferenciada entre poblaciones, por mencionar algunas características) esta última especie se ha propagado con éxito en el jardín botánico Clavijero, se ha logrado su polinización asistida y la obtención de un huerto en las inmediaciones de Mozombo, aunque dicho huerto no es genéticamente representativo (Octavio-Aguilar *et al.*, 2017a, b, c). En el caso de *C. kuesteriana*, el problema de la poca representatividad en los huertos podría ser prevenido puesto que ya contamos con la información sobre la variabilidad genética de las poblaciones.

Finalmente, además de las estrategias de conservación mencionadas, es necesario la evaluación de las poblaciones, en particular realizar la caracterización demográfica y poblacional en cada localidad, para conocer las características del hábitat, el área de ocupación, el número de especímenes maduros y no maduros, los factores de riesgo y el estado de conservación-perturbación actual a que han estado sometidas, entre otros (García *et al.*, 2001). Todas estas herramientas son un campo abierto a la investigación y contribución para la protección de cícadas en México, en especial aquellas que están bajo una categoría de protección, para favorecer su subsistencia en la naturaleza.

12. CONCLUSIONES

1. La especie *Ceratozamia kuesteriana*, mostró valores altos de diversidad con respecto a otras especies de cícadas, considerando la revisión bibliográfica previa.
2. Existe una elevada divergencia entre los individuos y entre las poblaciones, siendo similares genéticamente solo las poblaciones uno y cinco de acuerdo con los árboles de agrupamiento y el modelo de asignación y el análisis de funciones discriminantes de componentes principales.
3. El AMOVA indica que todas las poblaciones son diferentes, lo cual podría ser resultado de otras fuerzas evolutivas que actúan particularmente en declive sobre la población cinco.
4. Aunque todas las poblaciones presentaron cuellos de botella, las poblaciones dos y cinco poseen loci con deficiencia en heterócigos, lo que sugiere un mayor tiempo o intensidad de la reducción poblacional. Por el contrario, la población tres (resiliente) tiene la mayor diversidad, representatividad alélica y un exceso de loci heterócigos, por lo que el cuello de botella es más reciente y de menor magnitud, aún sin un efecto negativo sobre la población.
5. Existen indicios de selección natural para cuatro loci, por lo que estos no responden al supuesto de neutralidad; tres de ellos tienen exceso de heterócigos, por lo que se infiere selección balanceadora, pero Zam40 tiene una deficiencia significativa de heterocigotos en la población cinco, lo que sugiere una selección direccional. Sumando todos los resultados, la población cinco es la más amenazada en la región.
6. La identificación de poblaciones con diversidad genética representativa (población tres) y única probablemente asociada con procesos de adaptación local (población cinco), muestra las fuentes potenciales para la extracción de semillas necesarias para un plan de manejo *in situ*, siendo esta la propuesta de manejo y conservación con mayor viabilidad, considerando los antecedentes en otras especies de cícadas.

13. LITERATURA CITADA

- Abarca-García, A. y López-Villalobos, A. 2007. La estimación de la endogamia y la relación entre la tasa de fecundación cruzada y los sistemas reproductivos en plantas con flores: una interpretación de su significado evolutivo. Págs. 183-214. *En*: Eguiarte, L.E., Souza, V. y X. Aguirre (eds.). *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología. México.
- Aguirre-Planter, E. 2007. Flujo génico: métodos para estimarlo y marcadores Moleculares. Págs. 49-62. *En*: Eguiarte, L.E., Souza, V. y Aguirre X. (eds.). *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología. México.
- Ainsworth, C. 2000. Boys and girls come out to play: the molecular biology of dioecious plants. *Annals of Botany*, 86:211-221.
- Álvarez-Buylla, E. R., García-Barrios., R., Lara-Moreno, C. y Martínez-Ramos, M. 1996. Demographic and genetic models in conservation biology: applications and perspectives for Tropical Rain Forest tree species. *Annual Review in Ecology and Systematics*, 27: 387-421.
- Álvarez-Buylla, E.R., y Garay, A. 1994. Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pioneer tree species. *Evolution*, 48: 437-453.
- Amos, W. y Balmford, A. 2001. When does conservation genetics matter? *Heredity*, 87:257-265.
- Amos, W. y Harwood, J. 1998. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 353:177-186.
- Andren, H. 1994. Effects of habitat fragmentation on birds and mammals in landscapes with different proportion of suitable habitat: A review. *Oikos*, 71(3): 355-366.
- Arenas, M., Ray, N., Currat, M. y Excoffier, L. 2012. Consequences of range contractions and range shifts on molecular diversity. *Molecular Biology and Evolution*, 29: 207-218.
- Austerlitz, F., Dutech, C., Smouse, P. E., Davis, F. y Sork, V. L. 2007. Estimating anisotropic pollen dispersal: a case study in *Quercus lobata*. *Heredity*, 99: 2, 193.
- Avise, J. C. 2004. *Molecular markers, natural history, and evolution*, 2nd ed. Sunderland (Massachusetts): Sinauer Associates. 684 p.
- Ayala-Orozco, B., Valera-Bermejo, A., Koleff-Osorio, P., Cruz-Romo, L., Cruz-Robles, E., Caso-Chávez, M. y Prado-Gasca, K. S. 2012. Propuesta de lista de especies prioritarias para la conservación en México. Coordinación General (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP), Instituto Nacional de Ecología (INE), Dirección General de Vida Silvestre (DGVS-SEMARNAT) y Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA)). http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/pdf/EspeciesPrioritarias/PropuestaaEspPrioritarias_ago2012_VerAct_Sept2013.pdf. 22p.

- Bachmann, K. 1994. Molecular markers in plant ecology. *The New Phytologist*, 126: 403-418.
- Bailey, C. D., Hughes, C. E. y Harris, S. A. 2004. Using RAPDs to identify DNA sequence loci for species level phylogeny reconstruction: an example from *Leucaena* (Fabaceae). *Systematic Botany*, 29:4-14.
- Baker, J. R. 1938. The evolution of breeding seasons. *Evolution*, 161-177 pp.
- Barbadilla, A. 2012. *Genética de Poblaciones*. Universidad Autónoma de Barcelona. En: <http://biologia.uab.es/divulgacio/genpob.html#factores>, consultado, 08 de mayo de 2017.
- Barrett, S. C. H. y Kohn, J. R. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. Págs. 3-30. *En*: Falk, D. A. y Holsinger, K. E. (eds.). *Genetic and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press. New York, New York. USA.
- Begon, M., Mortimer, M. y Thompson, D. J. 2009. *Population ecology: a unified study of animals and plants*. John Wiley & Sons. 256.
- Bell, E. A. y Nunn, P. B. 1988. Neural diseases in man are plants to blame? *Biologist*, 35: 39-43.
- Bell, E. A., Vega, A. y Nunn, P. B. 1967. Neurotoxic Effects of α -Amino- β -methylaminopropionic Acid. *Proceedings of the Fifth Conference on Cycad Toxicity*, Miami, FL, USA. 24-25.
- Berglund, H. y Jonsson, B. G. 2003. Nested plant and fungal communities; the importance of area and habitat quality in maximising species capture in boreal old-growth forests. *Biological Conservation*, 112: 319-328.
- Bösenberg, J. D. 2010a. *Cycas hongheensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42040A10635591. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42040A10635591.en>. Downloaded on 28 February 2018.
- Bösenberg, J. D. 2010b. *Macrozamia pauli-guilielmi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T41956A10611259. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T41956A10611259.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Bösenberg, J. D. 2010c. *Macrozamia riedlei*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42019A10626648. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42019A10626648.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Bösenberg, J. D. 2010d. *Microcycas calocoma*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42107A10647674. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42107A10647674.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Bowers, M. D. y Farley, S. 1990. The behavior of grey jays, *Perisoreus canadensis*, towards palatable and unpalatable Lepi-doptera. *Animal Behaviour*, 39: 699-705.

- Bowers, M. D. y Larin, Z. 1989. Acquired chemical defense in the Lycaenid butterfly, *Eumaeus atala*. *Journal of Chemistry Ecology*, 15: 1133-1146.
- Brener, E. D., Stevenson, D. W. y Twigg, R. W. 2003a. Cycads: evolutionary innovations and the role of plant-derived neurotoxins. *Trends in Plant Science*, 8(9): 446-452.
- Brener, E. D., Stevenson, D. W., McCombie, R. W., Katari, M. S., Rudd, S. A., Mayer, K. F. X., Palenchar, P. M., Runko, S. J., Twigg, R. W., Dai, G., Martienssen, R. A., Benfey, P. N. y Coruzzi, G. M. 2003b. Expressed sequence tag analysis in *Cycas*, the most primitive living seed plant. *Genome Biology*, 4(12): R78.1-R78.11.
- Brito-Aguilar, R. 2000. Avifauna de la reserva de la biosfera "El Cielo", Tamaulipas, México. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. L022. México, D.F.
- Bruna, E. M. y Kress, W. J. 2002. Habitat fragmentation and the demographic structure of Amazonian understory herb (*Heliconia acuminata*). *Conservation Biology*, 16(5): 1256-1266.
- Byrne, M. y James, S. H. 1991. Genetic diversity in the cycad *Macrozamia riedlei*. *Heredity*, 67:35-39.
- Cabrera-Toledo, D., González-Astorga, J. y Vovides, A. P. 2008. Heterozygote excess in ancient populations of the critically endangered *Dioon caputoi* (Zamiaceae, Cycadales) from central Mexico. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 158: 436-447.
- Cabrera-Toledo, D., González-Astorga, J., Nicolalde-Morejón, F., Vergara-Silva, F. y Vovides, A. P. 2010. Allozyme diversity levels in two congeneric *Dioon* spp. (Zamiaceae, Cycadales) with contrasting rarities. *Plant Systematics and Evolution*, 290: 115-125.
- Calonje, C., Husby, C. y Calonje, M. 2010. Germination and early seedling growth of rare *Zamia* spp. in organic and inorganic substrates: advancing *ex situ* conservation horticulture. *HortScience*, 45(4): 679-683.
- Calonje, M., Meerow, A. W., Knowles, L., Knowles, D., Griffith, P., Nakamura, K. y Francisco-Ortega, J. 2013. Cycad biodiversity in the Bahamas Archipelago and conservation genetics of the threatened *Zamia lucayana* (Zamiaceae). *Fauna y Flora International*, 47: 190-198.
- Calonje, M., Stevenson D. W. y Stanberg, L. 2018. The World List of Cycads, online edition [Internet]. 2013-2018. [cited 2018 Sep 01]. Available from: <http://www.cycadlist.org>.
- Casas, A., Torres-Guevara, J. y Parra, F. 2016. Domesticación en el continente americano. Manejo de Biodiversidad y Evolución Dirigida por las Culturas del Nuevo Mundo. 504 p.
- Castillo-Cobián, A. 2007. La selección natural a nivel molecular. Págs. 11-48. *En*: Eguiarte, L.E., Souza, V. y X. Aguirre (eds.). *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología. México.

- Castillo-Lara, P., Octavio-Aguilar, P., y De-Nova, J. A. 2017. *Ceratozamia zaragozae* Medellín-Leal (Zamiaceae), an endangered Mexican cycad: New information on population structure and spatial distribution. *Brittonia* 65(4): 1-11.
- Chadwick, C. E. 1993. The role of *Tranesiyt eroides* and *T. sparsus* Boh (col. Curculionidae) in the pollination of *Macrozamia communis* (Zamiaceae). Págs. 77-88. *En*: Stevenson, D. W. y Norstog, K. J. (eds). Proceedings of the second international conference on cycad biology. Palm and Cycad Societies of Australia, Milton, Queensland.
- Chao-Luan, L., Wang, Q., Jiang, S. Y., Ge, S. y Wang, K. E. 1999. Genetic diversity of allozymes in populations of *Cycas panzhihuaensis*. Págs. 323-327. *En*: Chen, C. J. (ed.). Biology and Conservation of Cycads Proceedings of the Fourth International Conference on Cycad Biology. Beijing: International Academic Publishers.
- Chao-Luan, L., Wang, Q., Jiang, S. Y., Ge, S. y Wang, K. E. 1999. Genetic diversity of allozymes in populations of *Cycas panzhihuensis* L. Zhou y S. Y. Yang. Págs. 323-327. *En*: Chen, C. J. (ed.). Biology and Conservation of Cycads-Proceedings of the Fourth International Conference on Cycad Biology. Beijing: International Academic Publishers.
- Chase, M. W., Soltis, D. E., Olmstead, R. G., Morgan, D., Les, D. H., Mishler, B. D., Duvall, M. R., Price, R. A., Hills, H. G., Qiu, Y-L., Kron, K. A., Rettig, J. H., Conti, E., Palmer, J. D., Manhart, J. R., Sytsma, K. J., Michaels, H. J., Kress, W. J., Karol, K. G., Clark, W. D., Hedrén, M., Gaut, B. S., Jansen, R. K., Kim, K-L., Wimpee, C. F., Smith, J. F., Furnier, G. R., Strauss, S. H., Xiang, Q-Y., Plunkett, G. M., Soltis, P. S., Swensen, S. M. Williams, S. E., Gadek, P. A., Quinn, C. J., Eguiarte, L. E., Golenberg, E., Learn, G. H., Graham, S. W., Barrett, S. C. H., Dayanyan, S. y Albert, V. A. 1993. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 80: 528-580.
- Chávez, V. M., Litz, R. E. y Norstog, K. 1992a. Somatic embryogenesis and organogenesis in *Zamia fischeri*, *Z. furfuraceae* and *Z. pumila*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 30: 99-105.
- Chávez, V. M., Litz, R. E., y Norstog, K. 1992b. In vitro morphogenesis of *Ceratozamia hildae* and *C. mexicana* from megagametophytes and zygotic embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 30: 93-98.
- Chávez, V. M., Litz, R. E., Monroy, M., Moon, P. y Vovides, A. 1998. Regeneration of *Ceratozamia euryphyllidia* (Cycadales, Gymnospermae) plants from embryogenic leaf cultures derived from mature phase trees. *Plant Cell Report*. 17: 612-616.

- Chávez, V. M. y Litz, R. E. 1999. Organogenesis from megagametophyte and zygotic embryo explants of the gymnosperm *Dioon edule* Lindley (Zamiaceae, Cycadales). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 58: 219-222.
- Chemnick, J. y Gregory, T. 2010a. *Ceratozamia kuesteriana*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42101A10644486. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42101A10644486.en>. Downloaded on 10 May 2017.
- Chemnick, J. y Gregory, T. 2010b. *Dioon angustifolium*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T178868A7631473. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T178868A7631473.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Chemnick, J. y Gregory, T. 2010c. *Dioon edule*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42158A10643785. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42158A10643785.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Chemnick, J. y Gregory, T. 2010d. *Dioon sonorensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42130A10661262. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42130A10661262.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Chemnick, J. y Gregory, T. 2010e. *Dioon caputoi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42106A10647070. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42106A10647070.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Chemnick, J. y Gregory, T. 2010f. *Dioon merolae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42146A10666824. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42146A10666824.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Chemnick, J. y Gregory, T. 2010g. *Ceratozamia zaragozae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42103A10645793. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42103A10645793.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Chemnick, J. y Gregory, T. 2010h. *Zamia loddigesii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42166A10671439. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42166A10671439.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Chemnick, J. y Gregory, T. 2010i. *Zamia furfuracea*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42152A10668734. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42152A10668734.en>. Downloaded on 22 March 2018.
- Chemnick, J., Gregory, T. y Morales S. 2010. *Dioon holmgrenii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42129A10660365. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42129A10660365.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Christenhusz, M. J. M., Reveal, J. L., Farjon, A., Gardner, M. F., Mill, R. R., y Chase, M. W. 2011. A new classification and linear sequence of extant gymnosperms. *Phytotaxa*, 1919: 55-70.

- Cibrián-Jaramillo, A., Daly, A. C., Brenner, E., Desalle, R. y Marler, T. E. 2010. When North and South don't mix: genetic connectivity of a recently endangered oceanic cycad, *Cycas micronesica*, in Guam using EST-microsatellites. *Molecular Ecology*, 19: 2364-2379.
- CITES. 2012. Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. Appendices I, II and III, of Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. www.cites.org/eng/app/appendices.shtml. (Consultado febrero, 2017).
- Clark, D. A. y Clark, D. B. 1987. Temporal and environmental patterns of reproduction in *Zamia skinneri*, a tropical rain forest cycad. *The Journal of Ecology*, 75: 135-149.
- Clark, D. B., y Clark, D. A. 1988. Leaf production and the cost of reproduction in the Neotropical rain forest cycad, *Zamia skinneri*. *The Journal of Ecology*, 76: 1153-1163.
- Codamine, F. L., Nagalingum, N. S., Marshall, C. R. y Morlon, H. 2015. Origin and diversification of living cycads: a cautionary tale on the impact of the branching process prior in Bayesian molecular dating. *BMC Evolutionary Biology*, 15(65): 1-18.
- CONABIO. 2008. Capital Natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. 621 p.
- Conte, R., Nodrai, R. O., Vencovsky, R. y dos Reis, M. S. 2003. Genetic diversity and recruitment of tropical palm, *Euterpe edulis* Mart., in a natural population from the Brazilian Atlantic Forbes. *Heredity*, 91: 401-406.
- Cornuet, J. M. y Luikart, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144: 2001-2014.
- Crochet, P. A. 2000. Genetic structure of avian populations-allozymes revisited. *Molecular Ecology*, 9: 1463-1469.
- Crow, J. F. y Kimura, M. 1970. An introduction to population genetic theory. Harper y Row. Nueva York. 575 p.
- Da Silva, J. M., Donaldson, J. S., Reeves, G. y Hedderson, T. A. 2012. Population genetics and conservation of critically small cycad populations: a case study of the Albany Cycad, *Encephalartos latifrons* (Lehmann). *Biological journal of the Linnean Society*, 105(2): 293-308.
- Dehgan, B. 1997. Propagation and culture of cycads: A practical approach. *En: II International Symposium on Ornamental Palms and other Monocots from the Tropics* 486: 123-132.
- Dehgan, B. 1983. Propagation and growth of cycads. A conservation strategy. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 96: 137-139.
- Dehgan, B. y Johnson, C. R. 1983. Improved seed germination of *Zamia floridana* (sensu lato) with H₂SO₄ and GA₃. *Scientia Horticulturae*. 19: 357-361.

- Dehgan, B. y Schutzman, B. 1983. Effect of H₂SO₄ and GA₃ on seed germination of *Zamia furfuracea*. *Scientia Horticulturae* 18(3): 371-372.
- Dehgan, B. y Schutzman, B. 1989. Embryo development and germination of *Cyca* seeds. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 114(1): 125-129.
- Dehgan, B. y Almira, F. 1993. Horticultural practices and conservation of cycads. *En: Stevenson, D.W. y Norstog K. (eds.) Proceedings of Cycad '90. Second International Conference on Cycad Biology, Milton, Queensland, Australia.* 322-328.
- De Vicente, M. C., López, C. y Fulton, T. 2004. Análisis de la diversidad genética utilizando datos de marcadores moleculares: Módulo de aprendizaje. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia. 87 p.
- Dhiman, M., Moitra, S., Singh, M.H. y Bhatnagar, S. P. 1998. Formation of somatic embryos from leaf callus of *Zamia furfuracea*: a preliminary report. *Phytomorphology*. 48(3): 317-322.
- Dominic, V. J. y Joseph, J. P. 2007. Shoot bud differentiation from megagametophyte cultures of *Cycas circinalis* L. an endangered ornamental plants. *Recent Trends En: Horticultural Biotechnology*. 130(1): 124-130.
- Donaldson, J. S. 1997. Is there a floral parasite mutualism in cycad pollination? The pollination biology of *Encephalartos villosus* (Zamiaceae) *Annals of the Missouri Journal Botanical*, 84: 1398-1406.
- Donaldson, J. S. 2003a. Cycads. Status Survey and Conservation Action Plan. UICN/SSC Cycad Specialist Group. UICN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 86 p.
- Donaldson, J. S. 2003b. *Ceratozamia fuscoviridis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2003: e.T42100A10644118. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2003.RLTS.T42100A10644118.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Donaldson, J. S. 2010a. *Encephalartos woodii*. (Errata version published in 2016) The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T41881A92750886. Downloaded on 17 February 2017.
- Donaldson, J. S. 2010b. *Encephalartos brevifoliolatus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T41882A10566751. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20103.RLTS.T41882A10566751.en>. Downloaded on 16 February 2017.
- Donaldson, J. S. 2010c. *Encephalartos latifrons*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T41892A10571584. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20103.RLTS.T41892A10571584.en>. Downloaded on 22 March 2018.
- Donaldson, J. S., Nánni, I. y Bósenberg, J. de W. 1995. The role of insects in the pollination of *Encephalartos cycadifolius*. Págs. 423-434. *En: Vorster, P. (ed.) Proceedings of the third international conference on cycad biology. Cycad Society of South Africa, Stellenbosch.*

- Doyle, J. J. y Doyle, J. L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Earl, D. A. y Von-Holdt, B. M. 2012. Structure Harvester: website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4: 359-361.
- Eckenwalder, J. E. 1980. Dispersal of the West Indian cycad, *Zamia pumila* L. *Biotropica*, 12: 79-80.
- Eguiarte, L. E., Perez-Nasser, N. y Piñero, D. 1992. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. *Heredity*, 69(3): 217.
- Eguiarte, L. E. y Piñero, D. 1990. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. *Ciencias*. Número especial 4. Ecología y conservación en México. Págs. 34-47. *En*: Nuñez-Farfán, J. y Eguiarte, L. E. (editores). *La evolución biológica*. Facultad de Ciencias, Instituto de Ecología, UNAM, Conabio. 398 p.
- Eisto, A. K., Kuitunen, M., Lammi, A., Saari, V., Suhonen, J., Syjasuo, S. y Tikka, P. M. 2000. Population persistence and offspring fitness in the rare bellflower *Campanula cervicaria* in relation to population size and habitat quality. *Conservation Biology*, 14: 1413-1421.
- Ekué, M. R., Gailing, O., Hölscher, D., Sinsin, B. y Finkeldey, R. 2008. Population genetics of the cycad *Encephalartos barteri* ssp. *barteri* (Zamiaceae) in Benin with notes on leaflet morphology and implications for conservation. *Belgian Journal of Botany*, 141(1): 78-94.
- Ellstrand, N. C., Ornduff, R. y Clegg, J. M. 1990. Genetic structure of the Australian cycad, *Macrozamia communis* (Zamiaceae). *American Journal of Botany*, 77: 677-681.
- Epperson, B. K. y Tian-Quan, L. 1997. Gene dispersal and spatial genetic structure. *Evolution*, 51(3): 672-681.
- Evanno, G., Regnaut, S. y Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulatory study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.
- Falush, D., Stephens, M. y Pritchard, J. K. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7: 574-578.
- Feng, X. Y., Wang, Y. H., y Gong, X. 2014. Genetic diversity, genetic structure and demographic history of *Cycas simplicipinna* (Cycadaceae) assessed by DNA sequences and SSR markers. *BMC Plant Biology*, 14: 187-202.
- Feng, X.Y., Liu, J., y Gong, X. 2016a. Species delimitation of the *Cycas segmentifida* complex (Cycadaceae) resolved by phylogenetic and distance analyses of molecular data. *Frontiers in Plant Science*, 7: 134-145.

- Feng, X. Y., Zheng, Y., y Gong, X. 2016b. Middle-Upper Pleistocene climate changes shaped the divergence and demography of *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae): Evidence from DNA sequences and microsatellite markers. *Scientific Reports*, 6: 27368-27379.
- Foll, M. y Gaggiotti, O. 2008. A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: a Bayesian perspective. *Genetics*, 180: 977-993.
- Ford-Lloyd, B. y Jackson, M. 1986. *Plant genetic resources: an introduction to their conservation and use*. Edward Arnold. 152p.
- Ford, M. J., Thornton, P.J. y Park, L. K. 1999. Natural selection promotes divergence of transferrin among salmonid species. *Molecular Ecology*, 8: 1055-1061.
- Forster, P. 2010a. *Macrozamia parcifolia*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T41966A10612374. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T41966A10612374.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Forster, P. 2010b. *Macrozamia heteromera*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42007A10619620. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42007A10619620.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Forster, P. 2010c. *Macrozamia plurinervia*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T41978A10590161. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T41978A10590161.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Frankel, O. y Soulé, M. E. 1981. *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, England. 317 p.
- Frankham, R. 1995. Conservation genetics. *Annual Review of Genetics*, 29: 305-327.
- Frankham, R., Ballou, J. D. y Briscoe, D. A. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge, Reino Unido. 607 p.
- Futuyma, D. J. 1986. Reflection on reflections: ecology and evolutionary biology. *Journal of the History of Biology*, 19: 303–12.
- Futuyma, D. J. y Moreno, G. 1988. The evolution of ecological specialization. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 19(1): 207-233.
- García, E. P., Lara, J. C. L., García, P. I. L. y Montesinos, D. P. 2001. Estudios para la conservación de las *Zamias* cubanas: 1. Caracterización de localidades en Cuba occidental. *Revista del Jardín Botánico Nacional*, 22(2): 195-200.
- García-Montes, M. A. 2017. Variabilidad genética de *Ceratozamia fuscoviridis* Moore (Cycadales, Zamiaceae) en Tlahuiltepa, Hidalgo, México. (Tesis de licenciatura) Facultad de Biología, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 63 p.
- Gifford, E. M. y Foster, A. S. 1996. *Morphology y evolution of vascular plants*. 3rd Edition. W. H. Freeman y Company, New York, USA. 626 p.

- Gómez-Pompa, A., Vovides, A. P., Ogata, N., González-García, J., Castro-Cortés, R. y Corona-López, A. 2000. Cycads: The endangered living fossils CD-ROM interactivo. Q, Taxa, Dept. Botany y Plant Sciences, Univ. de California, Riverside.
- Gong, Y. Q. 2012. The resource survey, genetic diversity and the conservation strategies of *Cycas szechuanensis*. Guangdong: Sun Yat Sen University, 14: 56-68.
- Gong, Y. Q. 2015. Genetic differentiation and Phylogeographic study of four bipinnata *Cycas* species. Kunming: Kunming Institute of Botany, Chinese Academic of Sciences, 48: 1094-1105.
- Gong, Y. Q., Zhan, Q. Q., Nguyen, K. S., Nguyen, H. T., Wang, Y. H., y Gong, X. 2015. The historical demography and genetic variation of the endangered *Cycas multipinnata* (Cycadaceae) in the red river region, examined by chloroplast DNA sequences and microsatellite markers. PLOS ONE, 10: e0117719.
- González, D. y Vovides, A. P. 2002. Low intralinage divergence in *Ceratozamia* (Zamiaceae) detected with nuclear ribosomal DNA ITS and Chloroplasts DNA trnL-F noncoding region. Systematic Botany, 27(4): 654-661.
- González, D. y Vovides, A. P. 2012. A modification to the SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) method provides phylogenetic insights within *Ceratozamia* (Zamiaceae). Revista Mexicana de Biodiversidad, 83: 929-938.
- González-Astorga, J., Vovides, A. P., Ferrer, M. M. e Iglesias, C. 2003. Population genetics of *Dioon edule* Lindl. (Zamiaceae, Cycadales): biogeographical and evolutionary implications. Biological Journal of the Linnean Society, 80: 457-467.
- González-Astorga, J., Vovides, A. P., Cruz-Angon, A., Octavio-Aguilar, P. e Iglesias, C. 2005. Allozyme variation in the three extant populations of the narrowly endemic cycad *Dioon angustifolium* Miq. (Zamiaceae) from north-eastern México. Annals of Botany, 95: 999-1007.
- González-Astorga, J., Vergara-Silva, F., Vovides, A. P., Nicolalde-Morejón, F., Cabrera-Toledo, D. y Pérez-Farrera, M. A. 2008. Diversity and genetic structure of three species of *Dioon* Lindl. (Zamiaceae, Cycadales) from the Pacific seaboard of Mexico. Biological Journal of the Linnean Society, 94: 765-776.
- González-Astorga, J., Vovides, A. P., Cabrera-Toledo, D. y Nicolalde-Morejón, F. 2009. Diversity and Genetic Structure of the Endangered Cycad *Dioon sonorensis* (Zamiaceae) from Sonora, Mexico: Evolutionary and Conservation Implications. Biological Journal of the Linnean Society, 36: 891-899.
- González-Astorga, J., Vovides, A. P., Octavio-Aguilar, P., Aguirre-Fey, D., Nicolalde-Morejón, F. e Iglesias, C. 2006. Genetic diversity and structure of the Cycad *Zamia loddigesii* Miq.

- (Zamiaceae): implications for evolution and conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152: 533-544.
- González-Astorga, J., y Castillo-Campos, G. 2004. Genetic variability of the narrow endemic tree *Antirhea aromatica* Castillo-Campos y Lorence, (Rubiaceae, Guettardeae) in a tropical forest of Mexico. *Annals of Botany*, 93(5): 521-528.
- González-Christen, A. 1990. Algunas interacciones entre *Dioon edule* (Zamiaceae) y *Peromyscus mexicanus* (Rodentia: Cricetidae). *La Ciencia y el Hombre, Universidad Veracruzana*, 5: 77-92.
- Gram, W. K. y Sork, V. L. 1999. Population density as a predictor of genetic variation for woody plant species. *Conservation Biology*, 13: 1079-1087.
- Griffith, P., Calonje, M., Meerow, A. W., Tut, F., Kramer, A. T., Hird, A., Magellan, T. M. y Husby, C. E. 2015. Can a botanic garden cycad collection capture the genetic diversity in a wild population? *International Journal of Plant Sciences*, 176(1): 1-10.
- Gutiérrez-Arroyo, N. M. 2018. Variabilidad y estructura genética de *Ceratozamia zaragozae* Medellín-Leal (Cycadales, Zamiaceae) en San Luis Potosí, México, (Tesis de licenciatura) Facultad de Biología, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo México. 75 p.
- Hammer, O., Harper, D. A. T. y Ryan, P. D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*, 41(1): 9-99.
- Hamrick, J. L., y Godt, M. W. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 351 (1345): 1291-1298.
- Hamrick, J. L. y Godt, M. J. 1989. Allozyme diversity in plant species. Págs 253-321. *En*: A. H. D. Brown, M. T. Clegg, A. L. Kahler y B.S. Weir (eds.) *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Hartl, D. L. y Clark, A. G. 1997. *Principles of population genetics* 3^{ra}. Sunderland: Sinauer Associates. 635 p.
- Harvey, C. F., Gill, G.P., Fraser, L. G. y Mcneilage. M. A. 1997. Sex-linked markers and progeny sex ratio in diploid *A. chinensis*. *Sex. Plant Reproduction*, 10: 149-154.
- Haynes, J. L. 2010. *Cycas taitungensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42067A10642224. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42067A10642224.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Haynes, J. L. 2012. World list of cycads: a historical review. UICN/SSC Cycad specialist group. Cycads.org/publications/Haynes-Historical-Review-of-World-List-of-Cycads-2011.pdf. 37 p.
- Hedrick, P. W. 2011. *Genetics of Populations*. Jones and Bartlett, Boston, Massachusetts, Arizona State University. 675 p.

- Hill, K. D. 2010a. *Cycas guizhouensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42076A10620376. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42076A10620376.en>. Downloaded on 28 February 2018.
- Hill, K. D. 2010b. *Cycas szechuanensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42041A10635911. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42041A10635911.en>. Downloaded on 28 February 2018.
- Hill, K. D. 2010c. *Cycas panzhihuaensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42078A10621423. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42078A10621423.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Hill, K. D. 2010d. *Cycas seemannii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42064A10641249. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42064A10641249.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Hill, K. D. 2010e. *Cycas diannanensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42052A10639287. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42052A10639287.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Hill, K. D. 2010f. *Macrozamia communis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42000A10615939. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42000A10615939.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Hobbs, R. J. y Yates, C. J. 2003. Turner review No. 7: Impacts of ecosystem fragmentation on plant populations: generalising the idiosyncratic. *Australian Journal of Botany*, 51: 471-488.
- Hoelzel, A. R., Halley, J., O'Brien, S. J., Campagna, C., Arnborn, T., Le Boeuf, B., Ralls, K. y Dover, G. A. 1993. Elephant seal genetic variation and the use of simulation models to investigate historical population bottlenecks. *Journal Heredity*, 84: 443.
- Huang, S., Hsieh, H.T., Fang, K. y Chiang, Y. C. 2004. Patterns of Genetic Variation and Demography of *Cycas taitungensis* in Taiwan. *The Botanical Review*, 70: 86-99.
- Huelsenberck, J. P. y Andolfato, P. 2007. Inference of population structure under Dirichlet process model. *Genetic Society of America*, 175: 1787-1802.
- Hurter, J. 2010. *Encephalartos barteri* ssp. *barteri*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T41910A10591402. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T41910A10591402.en>. Downloaded on 22 March 2018.
- Iglesias-Andreu, L. G., Luna-Rodríguez, M., Durán-Vázquez, M., Rivera-Fernández, A. y Sánchez-Coello, N. G. 2010. RAPD markers associated with sex expression in *Ceratozamia mexicana* Brongniart (Zamiaceae). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 16 (2): 139-145.

- Iglesias-Andreu, L. G., Octavio-Aguilar, P., Sánchez-Coello, N. G., Baldo-Romero, M. A. y Casas, J.L. 2012. La determinación del sexo en cícadas (Cycadales). Cuadernos de Biodiversidad, 39: 7-10.
- Iglesias-Andreu, L. G., Octavio-Aguilar, P., Vovides, A. P., Meerow, A. W., de Cáceres-González, F. N., y Galván-Hernández, D. M. 2017. Extinction risk of *Zamia inermis* (Zamiaceae): a genetic approach for the conservation of its single natural population. International Journal of Plant Sciences, 178(9): 715-723.
- INE-SEMARNAT. 2000. Proyecto para la protección, conservación y recuperación de la familia Zamiaceae (Cycadales) de México. Instituto Nacional de Ecología y Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México D.F. Consultado: 29 de marzo de 2017, http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/consultaPublicacion.html?id_pub=183.
- Jäger, A. K. y Van Staden, J. 1996. Somatic embryogenesis and organogenesis in *Encephalartos dyerianus* and *Encephalartos natalensis*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 45: 99-102.
- Jacquemyn, H., Butaye, J. y Hermy, M. 2003. Influence of environmental and spatial variables on regional distribution of forest plant species in a fragmented and changing landscape. Ecography, 26: 768-776.
- Jakobsson, M. y Rosenberg, N. A. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. Bioinformatics, 23(14): 1801-1806.
- Jian, L., Wei, Z. y Xun, G. 2015. Species delimitation, genetic diversity and population historical dynamics of *Cycas diannanensis* (Cycadaceae) occurring sympatrically in the Red River region of China. Frontiers in Plant Science, 6: 696.
- Jombart, T., Devillard, S. y Balloux, F. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. BMC Genetics, 11: 94.
- Juárez, H. S. A. C., Contreras, R. y Luna, I. 2009. Biogeographic analysis of endemic cacti of the Sierra Madre Oriental, Mexico. Biological Journal of the Linnean Society, 97: 373-389.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F. y Donoghue, M. J. 2007. Plant Systematics: A phylogenetic approach. 3rd Edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA. 620 p.
- Jules, E. S. 1998. Habitat fragmentation and demographic change for a common plant: *Trillium* in old growth forest. Ecology, 79: 1645-1656.
- Kanchanaketu, K., Sangdue, N., Toahsakul, M. y Hongtrakul, V. 2009. Comparative Karyomorphological Study between Male and Female Plants of Some *Cycas* and *Zamia* Species. Natural Science, 43: 476-485.

- Kaufman, S. R., Smouse, P. E. y Alvarez-Buylla, E. 1998. Pollen mediated gene flow and differential male reproductive success in a tropical pioneer tree *Cecropia obtusifolia* Bertol. (Moraceae): a paternity analysis. *Heredity* 81: 164-173.
- Keppel, G. 2002. Low genetic variation in a pacific cycad: conservation concerns for *Cycas seemannii* (Cycadaceae). *Oryx*, 36: 41-49.
- Keppel, G., Lee, S. W. y Hodgskiss, P. D. 2002. Evidence for long isolation among populations of a pacific cycad: Genetic diversity and differentiation in *Cycas seemannii* A. Br. (Cycadaceae). *Journal of Heredity*, 93: 133-139.
- Kery, M., Matthies, D. y Spillmann, H. H. 2000. Reduced fecundity and offspring performance in small populations of the declining grassland plants *Primulaveris* and *Gentianalutea*. *Journal of Ecology*, 88: 17-30.
- Kimura, M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press. Cambridge. 332 p.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., y Palladino, M. A. 2013. Genética de poblaciones y genética evolutiva. Págs. 776-807. *En: Conceptos de genética*. 10.^a Pearson. Madrid.
- Kolb, A. y Lindhorst, S. 2006. Forest fragmentation and plant reproductive success: a case study in four perennial herbs. *Plant Ecology*, 185: 209-220.
- Krebs, S. L. y Hancock, J. F. 1990. Early-acting inbreeding depression and reproductive success in the highbush blueberry, *Vaccinium corymbosum* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 79: 825-832.
- Lande, R. 1995. Mutation and conservation. *Conservation Biology*, 9: 82-791.
- Lazar, I. y Lazar, I. 2010. Gel Analyzer 2010: Freeware 1D gel electrophoresis image analysis software 2010.
- Levin, D. A. 1981. Dispersal versus gene flow in plants. *Annals of Missouri Botanical Garden*, 68: 233-253.
- Li, A. y Ge, S. 2001. Genetic variation and clonal diversity of *Psammochloa villosa* (Poaceae) detected by ISSR markers. *Annals of Botany*, 87: 585-590.
- Li, W. H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Publishers, Massachusetts, 487 p.
- Litz, R. E., Moon, P. A., Benson, E.M., Stewart, J. y Chávez, V. M. 2004. A biotechnology strategy for medium and long term conservation of cycads. *The Botanical Review*. 70: 39-46.
- López-Gallego, C. 2008. Demographic variation in cycad populations inhabiting contrasting forest fragments. *Biodiversity and Conservation*, 17: 1213-1225.
- Lloyd, D. G., y Webb, C. J. 1992. The evolution of heterostyly. Págs. 163-178. *En: Barrett, S. C. H. (ed.) Evolution and function of heterostyly*, Springer-Verlag, Germany.

- Luna, I., Alcántara, O., Morrone, J. J. y Espinosa, D. 2000. Track analysis y conservation priorities in the cloud forests of Hidalgo, Mexico. *Diversity and Distribution*, 6: 137-143.
- Luna, I., Morrone J. J. y Espinosa D. 2004. Biodiversidad de la Sierra Madre Oriental. Ciudad de México, México. Las Prensas de Ciencias, UNAM-CONABIO. No. Sirsi: i9789703215263.
- Lynch, M. 1993. The mutational meltdown in asexual populations. *Journal Heredity*, 84:339-344.
- Lynch, M., Conery, J. y Bürger, R. 1995. Mutational meltdowns in sexual populations. *Evolution*, 49: 1067-1080.
- Marler, T., Haynes, J. y Lindstrom, A. 2010. *Cycas micronesica*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T61316A12462113. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T61316A12462113.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Marshall, D. R. y Jain, S. K. 1969. Genetic polymorphism in natural populations of *Avena fatua* and *A. barbata*. *Nature*, 221: 276-278.
- Marshall, D. R. y Allard, R. W. 1970a. Isozyme polymorphisms in natural populations of *Avena fatua* and *Avena barbata*. *Heredity*, 25: 373-382.
- Marshall, D. R. y Allard, R. W. 1970b. Maintenance of Isozyme polymorphism in natural populations of *Avena barbata*. *Genetics*, 66: 393-399.
- Martínez-Meyer, E., Sosa-Escalante, J. E. y Álvarez, F. 2014. El estudio de la biodiversidad en México: ¿una ruta con dirección? *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: 1-9.
- McElwain, J. C., Willis, K. J. y Lupia, R. 2005. Cretaceous CO₂ decline and the radiation and diversification of angiosperms. Págs. 133-165. *En*: Ehleringer, J. R., Cerling, T., Dearing, M. D. A history of atmospheric CO₂ and its effects on plants, animals, and ecosystems. Springer New York.
- Meerow, A. W. y Nakamura, K. 2007. Ten microsatellite loci from *Zamia integrifolia* (Zamiaceae). *Molecular Ecology Notes*, 7: 824-826.
- Míguez-Caramés, D. M. 2016. Tecnologías de control de floraciones de cianobacterias y algas nocivas en cuerpos de agua, con énfasis en el uso de irradiación por ultrasonido. *INNOTEC*, 12: 54-61.
- Miller, M. 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.
- Molina-Freaner, F. y Clark-Tapia, R. 2005. Clonal diversity and allelic relationships between two closely related species of columnar cacti from the Sonoran Desert: *Stenocereus eruca* and *Stenocereus gummosus*. *International Journal of Plant Science*, 166(2): 505-511.

- Montelongo-Ruiz, G. 2016. Análisis genético poblacional de *Ceratozamia kuesteriana* Regel., en el noreste de México. Tesis de Maestría en Ciencias en Manejo y Conservación de Recursos Naturales. Instituto Tecnológico de Cd. Victoria, Tamaulipas, México. 54 p.
- Mora-Olivo, A., Villaseñor, J. L., Luna-Vega, I., y Morrone, J. J. 2008. Patrones de distribución de la flora vascular acuática estricta en el estado de Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 79 (2): 435-448.
- Moretti, A., Sabato, S. y Vázquez-Torres, M. 1982. The rediscovery of *Ceratozamia kuesteriana* (Zamiaceae) in Mexico. *Brittonia*, 34(2): 185-188.
- Morrone, J. J. 2002. Presentación sintética de un nuevo esquema biogeográfico de América Latina y el Caribe. Proyecto de Red Iberoamérica de Biogeografía y Entomología Sistemática PrIBES. 267-275.
- Morrone, J. J., Organista, D. E., Zúñiga, C. A. y Bousquets, J. L. 1999. Preliminary classification of the Mexican biogeographic provinces: a parsimony analysis of endemism based on plant, insect, and bird taxa. *The Southwestern Naturalist*, 44(4): 507-514.
- Morrone, J. J., Espinosa-Organista, D. y Llorente-Bousquets, J. 2002. Mexican biogeographic provinces: preliminary scheme, general characterizations, and synonymy. *Acta Zoológica Mexicana*, (85): 83-108.
- Mosquera-Bolaños, J. D. 2015. Estudio preliminar de diversidad genética de *Ilex guayusa* en la amazonía ecuatoriana mediante marcadores moleculares ISSR. Tesis de licenciatura. Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, 59 p.
- Mound L. A. y Terry, L. 2001. Thrips pollination of the Central Australian cycad, *Macrozamia macdonellii* (Cycadales). *International Journal Plant Society*, 162: 147-155.
- Nagalingum, N. S., Marshall, C. R., Quental, T. B., Rai, H. S., Little, D. P. y Mathews, S. 2011. Recent synchronous radiation of a living fossil. *Science*, 334(6057): 796-799.
- Nash, R. J., Bell, E. A y Ackery, P. R. 1992. The protective role of cycasin in cycad-feeding Lepidoptera. *Phytochemistry*, 31: 1955-1957.
- Neigel, J. E. 1996. Estimation of effective population size and migration parameters from genetic data. Págs 329-346. En Smith, T. B. y Wayne, R. K. (eds). *Molecular genetic approaches in conservation*. Oxford University Press.
- Nguyen, H. T. 2010a. *Cycas bifida*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42059A10615518. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42059A10615518.en>. Downloaded on 28 February 2018.
- Nguyen, H. T. 2010b. *Cycas dolichophylla*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42053A10639591. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42053A10639591.en>. Downloaded on 28 February 2018.

- Nguyen, H. T. 2010c. *Cycas multipinnata*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42048A10637701. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42048A10637701.en>. Downloaded on 28 February 2018.
- Nguyen, H. T. 2010d. *Cycas segmentifida*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42065A10641637. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42065A10641637.en>. Downloaded on 28 February 2018.
- Nguyen, H. T. 2010e. *Cycas simplicipinna*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42085A10625321. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42085A10625321.en>. Downloaded on 28 February 2018.
- Nguyen, H. T. 2010f. *Cycas pectinata*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42062A10617695. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42062A10617695.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Nguyen, H. T. 2010g. *Cycas siamensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42066A10641954. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42066A10641954.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Nguyen, H. T. 2010h. *Cycas balansae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42069A10642849. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42069A10642849.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Nicolalde-Morejón, F., González-Astorga, J., Vergara-Silva, F., Stevenson, D. W., Rojas-Soto, O. y Medina-Villarreal, A. 2014. Biodiversidad de Zamiaceae en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: 114-125.
- Nixon, K. C., Crepet, W. L., Stevenson, D. W. y Friis, E. M. 1994. A Reevaluation of seed plant phylogeny. *Annals of the Missouri Botanic Garden*, 81: 484-533.
- Norstog, K. y Nicholls, T. 1997. *The Biology of the Living Cycads*. Cornell University Press, Ithaca. 86 p.
- Norstog, K., Stevenson, D. W. y Niklas, K. 1986. The role of weevils in the pollination of *Zamia furfuracea* L. f. (Zamiaceae). *Biotropica*, 18: 300-306.
- Norstog, K. J. y Fawcett, P. K. S. 1989. Insect cycad symbiosis y its relation to the pollination of *Zamia furfuracea* (Zamiaceae) by *Rhopalotria mollis* (Curculionidae). *American Journal of Botany*, 76: 1380-1394.
- Oberprieler, R. G, 1995. The weevils (Coleoptera: Curculionidae) associated with cycads. 1 & 2. Págs. 295-378. *En*: Vorster, P. (ed.) *Proceedings of the third international conference on cycad biology*. Cycad Society of South Africa, Stellenbosch.

- Octavio-Aguilar, P. 2009. Demografía y genética de poblaciones para tres localidades de *Dioon edule* Lindl. (Zamiaceae) en el estado de Veracruz. Tesis de doctorado, Instituto de Ecología, A. C., Xalapa Veracruz, México. 105 p.
- Octavio-Aguilar, P., González-Astorga, J. y Vovides, A. P. 2008. Population dynamics of the Mexican cycad *Dioon edule* Lindl. (Zamiaceae): life history stages and management impact. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 157: 381-391.
- Octavio-Aguilar, P., González-Astorga, J. y Vovides, A. P. 2009. Genetic diversity through life history of *Dioon edule* Lindley (Zamiaceae, Cycadales). *Plant Biology*, 11: 525-536.
- Octavio-Aguilar, P., Iglesias-Andreu, L. G., Núñez de Cáceres-González, F. F. N. y Galván-Hernández, D. M. 2017a. Fine-Scale Genetic Structure of *Zamia furfuracea*: Variation with Life-Cycle Stages. *International Journal of Plant Sciences*, 178 (1): 57-66.
- Octavio-Aguilar, P., Rivera-Fernández, A., Iglesias-Andreu, L. G., Vovides, P. A. y de Cáceres-González, F. F. N. 2017b. Extinction risk of *Zamia inermis*: a demographic study in its single natural population. *Biodiversity and Conservation*, 26 (4): 787-800.
- Octavio-Aguilar, P., Iglesias-Andreu, L. G., Vovides, A. P. y Rivera-Fernández, A. 2017c. *Zamia inermis*, la cícada más amenazada de México. *Cuadernos de Biodiversidad*, 52: 1-5.
- Ohta, T. 1992. The nearly neutral theory of molecular evolution. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 23: 263-286.
- Oostermeijer, J. G. B., Luisjten, S. H., Krenová, Z. V. y Den Nijs, H. C. M. 1998. Relationships between population and hábitat characteristics and reproduction of the rare *Gentiana pneumonanthe* L. *Conservation Biology*, 12(5): 1042-1053.
- Osborne, R., Calonje, M. A., Hill, K. D., Stanberg, L. y Stevenson, D. W. 2012. The world list of cycads. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 106: 480-508.
- Paran, I. y Michelmore, R. W. 1993. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 85: 985-993.
- Pekall, R. y Smouse, P. E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in excel. *Population Genetics Software for teaching and research. Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Pérez-Farrera, M. A. 1994. Estudio sobre germinación en semillas de espadaña *Dioon merolae* De Luca, P.S. Sabato y Vázquez Torres (Zamiaceae). Tesis de Licenciatura. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 98 p.
- Pérez-Farrera, M. A. y Tejeda-Cruz, C. 1996. Proyecto piloto para el establecimiento de viveros *in-situ* para la propagación, conservación y comercialización de las cícadas *Dioon merolae* y *Ceratozamia norstogii* en la Reserva de la Biósfera La Sepultura, Chiapas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Escuela de Biología. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. C120. México D. F.

- Pérez-Farrera, M. A., y Vovides, A. P. 1997. Manual para el cultivo y propagación de cícadas. INE-SEMARNAP, Mexico City, Mexico. 37 p.
- Pérez-Farrera, M. A. y Vovides A. P. 2004. Spatial distribution, population structure, and fecundity of *Ceratozamia mirandae* Lundell (Zamiaceae) in El Triunfo Biosfere Reserve, Chiapas, Mexico. *The Botanical Review*, 70: 299-311.
- Pérez-Farrera, M. A. y Vovides, A. P. 2006. The ceremonial use of the threatened “Espadaña” cycad (*Dioon merolae*, Zamaiceae) by a community of the Central Depression of Chiapas, Mexico. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 78: 107-113.
- Pérez-Farrera, M. A., Quintana-Ascencio P. F. y Salvatierra-Izaba, B. 2000. Population dynamics of *Ceratozamia matudai* (Zamiaceae) in El Triunfo Biosfere Reserve, Chiapas, México. *Journal of the Torrey Botanical Society*, 127: 291-299.
- Pérez-Farrera, M. A., Vovides, A. P., Octavio-Aguilar, P., González-Astorga, J., Cruz-Rodríguez, J. D. L., Hernández-Jonapá, R. y Villalobos-Méndez, S. M. 2006. Demography of the cycad *Ceratozamia mirandae* (Zamiaceae) under disturbed and undisturbed conditions in a biosphere reserve of Mexico. *Plant Ecology*, 187(1): 97-108.
- Peterson, A. T., Soberón, J. y Sánchez-Cordero, V. 1999. Conservatism of ecological niches in evolutionary time. *Science*, 285(5431): 1265-1267.
- Phillips, S. J., Anderson, R. P. y Schapire, R. E. 2004. A Maximum Entropy approach to species distribution modeling. Appearing in proceedings of de 21st International Conference on Machine Learning, Banff, Canada, Copyright 2004 by the authors.
- Pinares, A., Gonzalez-Astorga, J., Vovides, A. P., Lazcano, J. y Vendrame, W. A. 2009. Genetic diversity of the endangered endemic *Microcycas calocoma* Miq. A. DC (Zamiaceae, Cycadales): Implications for conservation. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37: 385-394.
- PNUMA-CMCM (Comps.) 2014. Lista de especies CITES. Secretaría CITES, Ginebra, Suiza, y PNUMA-CMCM, Cambridge, Reino Unido. 1268 p. Consultado el 29 de marzo de 2017. <http://checklist.cites.org>.
- Primack, R. 2000. Conservation at the population and species levels. *In*: Primack, R. (Ed.). *A primer of conservation biology*. Sinauer Associates Inc. Publishers. U.S.A. 121-182.
- Primack, R., Rozzi, R., Feisinger, P., Dirzo, R. y Masardo, F. 2001. *Fundamentos de conservación biológica*. Fondo de cultura económica, México. 797 p.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. y Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- Regel, E. 1857. Zweineue Cycadeen (*Ceratozamia kuesteriana* y *Lepidozamia peroffkyana*). *Bulletin de la Société Impériale des Naturalistes de Moscou*. Moscú. 30: 1.

- Riesberg, L. H. y Burke, J. M. 2001. The biological reality of species: gene flow, selection and collective evolution. *Taxon*, 50: 235-255.
- Rinaldi, L. M. 1999. Factors affecting shoot regeneration from zygotic embryo and seedling explants of *Cycas revoluta* thumb. *In Vitro Cell and Developmental Biology Plant*. 35: 25-28.
- Rivera-Fernández, A. 2012. Diversidad genética y estructura poblacional de *Ceratozamia mexicana* Brongn. Tesis de Doctorado en ciencias en ecología y biotecnología. Universidad de Veracruz, México.133.
- Rivera-Fernández, A., Octavio-Aguilar, P., Sánchez-Coello, N. G., Sánchez-Velásquez, L. R., Vázquez-Torres, S. M. e Iglesias-Andreu, L. G. 2012. Population structure y spatial distribution of *Ceratozamia mexicana* Brongn. (Zamiaceae) in preserved y disturbed environments. *Tropical y Subtropical Agroecosystems*, 15(SUP2): 110-117.
- Rocha, M., y Gasca, J. 2007. Ecología molecular de la conservación. Págs. 251-272. *En*: Eguiarte, L. E., Souza, V. y Aguirre, X. (comps.). *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología. México.
- Rosenberg, N. A. 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4: 137-138.
- Rothschild, M., Nash, R. J. y Bell, E. A. 1986. Cycasin in the endangered butterfly *Eumaeus atala* Florida. *Phytochemistry*, 25: 1853-1854.
- Rubio-Tobón, C. A. 2015. Influencia de la perturbación en la estructura y dinámica poblacional de *Ceratozamia fuscoviridis* Moore (Cycadales, Zamiaceae) en Tlahuiltepa, Hidalgo, México. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.63 p.
- Rutherford, C., Donaldson, J., Hudson, A., McGough, H. N., Sajeve, M., Schippmann, U. y Tse-Laurence, M. 2013. *CITES and Cycads: A User's Guide*. Kew Publishing. Royal Botanic Gardens, Kew. 114 p.
- Sánchez-Hernández, C. y Gaytán-Oyarzún, J. C. 2006. Two mini-preparation protocols to DNA extraction from plants with high polysaccharide and secondary metabolites. *African Journal of Biotechnology*, 5: 1864-1867.
- Sánchez-Ramos, G., Reyes-Castillo, P. y Dirzo, P. 2005. Historia natural de la reserva de la biosfera “El Cielo”, Tamaulipas, México. Universidad Autónoma de Tamaulipas. ToppanPrinting Inc. Impreso en Hong Kong. 732 p.
- Sánchez-Tinoco, M. Y., Engleman, E. M. y Vovides, A. P. 2000. Cronología reproductiva de *Ceratozamia mexicana* (Cycadales). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 36: 93-123.

- Sanguden, N., Toahsakuly, M. y Hongtrakul, V. 2009. Comparative karyomorphological study between male y female plants of some *Cycas* y *Zamia* Species. *Natural Science*, 43: 476-485.
- Schaal, B. A., Gaskin, J. F. y Caicedo, A. L. 2003. The Wilhelmine E. Key 2002 Invitational Lecture. Phylogeography, haplotype trees and invasive plant species. *Journal of Heredity*, 94: 197-204.
- Scheiner, S. R. 1993. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annual Review of Ecology and Systematic*, 24: 35-68.
- Schneider, D., Wink, M., Sporer, F. y Lounibos, P. 2002. Cycads: their evolution, toxins, herbivores and insect pollinators. *Naturwissenschaften*, 89(7): 281-294.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM- 059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*, 30 de diciembre. (Segunda Sección):1-19 + Anexo normativo III.
- Sharma, I. K., Jones, D. L., Foster, P. I. y Young, A. G. 1998. The extent and structure of variation in the *Macrozamia pauli-guilielmi* complex (Zamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 26: 45-54.
- Sharma, I. K., Jones, D. L., Foster, P. I. y Young, A. G. 1999. Low isozymic differentiation among five species of the *Macrozamia heteromera* group (Zamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 27: 67-77.
- Sharma, I. K., Jones, D. L. y Foster, P. I. 2004. Genetic differentiation and phonetic relatedness among seven species of the *Macrozamia plurinervia* complex (Zamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 32: 313-327.
- Simmons, M. P., Zhang, L. B., Webb, C. T. y Müller, K. 2007. A penalty of using anonymous dominant markers (AFLPs, ISSRs and RAPDs) for phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42: 528-542.
- Slatkin, M. 1994. Gene flow and population structure. Págs. 3-18. *En: Ecological Genetics* (ed Real LA). Princeton University Press.
- StatSoft. 2011. STATISTICA (data analysis software system). Version 10. www.statsoft.com.
- Stearns, S. C. 1992. *The evolution of life histories*. Oxford. Oxford University. No. 575-S81. 249 p.
- Stevenson, D. W. 1990. Morphology y systematics of the Cycadales. *Memoirs of the New York Botanic Garden*, 57: 8-55.
- Stevenson, D. W. 1992. A formal classification of the extant cycads. *Brittonia*, 44(2): 220-223.

- Stevenson, D. W. 2010a. *Zamia lacandona*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42135A10663213. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42135A10663213.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Stevenson, D. W. 2010b. *Zamia variegata*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42139A10664393. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42139A10664393.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Stevenson, D. W. 2010c. *Zamia cremnophila*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42132A10662204. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42132A10662204.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Stevenson, D. W. 2010d. *Zamia lucayana*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42167A10671737. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42167A10671737.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Stevenson, D. W. 2010e. *Zamia pumila*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42177A10649746. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42177A10649746.en>. Downloaded on 22 March 2018.
- Stevenson, D. W. y Sabato, S. 1986. Typification of Names in *Ceratozamia* Brongn., *Dion* Lindl., and *Microcycas* A. DC. (Zamiaceae). *Taxon*, 35: 578-584.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of ADN sequences in finite populations. *Genetics*, 105: 437-460.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by AND polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.
- Tang, W. 2010. *Cycas debaoensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42038A10635002. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42038A10635002.en>. Downloaded on 28 February 2018.
- Tang, W., Oberprieler, R. G. y Yang, S. L. 1999. Beetles (Coleoptera) in cones of Asian Cycas: diversity, evolutionary patterns, and implications for Cycas taxonomy. Págs 280-297. *En: Chen, C. J. (eds.) Biology and conservation of cycads: proceedings of the fourth international conference on cycad biology*. International Academic Publishers, Beijing, China.
- Tang, W., Stenberg, L. y Price, D. 1987. Metabolic aspects of thermogenesis in male cones of five cycad species. *Annals of the Missouri Journal Botanical*, 74: 1555-1559.
- Terry, I. 2001. Thrips and weevils as dual, specialist pollinators of the Australian cycad *Macrozamia communis* (Zamiaceae). *International Journal Plant Society*, 162: 1293-1305.
- Thévenon, S. y Couvet, D. 2002. The impact of inbreeding depression on population survival depending on demographic parameters. *Animal Conservation*, 5: 53-60.

- UICN. 2001. Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, de los Recursos Naturales, y Comisión de Supervivencia de Especies de la UICN. Categorías y criterios de la Lista Roja de la UICN, versión 3.1. UICN. 42 p.
- UICN. 2016. UICN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales, Informe anual 2015, Gland, Suiza. Recuperado de <https://portals.UICN.org/library/sites/library/files/documents/2016-020-Es.pdf>. 36 p.
- UICN. 2017. Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. The UICN Red List of Threatened Species. Version 2016-3. <http://www.UICNredlist.org>. (Consultado 26 marzo 2017).
- UNEP-WCMC. 2013. UNEP-WCMC Species Database: CITES-Listed Species On the World Wide Web: [http://www.unep-wcmc-apps.org/isdb/CITES/Taxonomy/tax-familyresult.cfm?source=plants&displaylanguage=%23displaylanguage%23&Family=195&Country=](http://www.unep-wcmc-apps.org/isdb/CITES/Taxonomy/tax-familyresult.cfm/isdb/CITES/Taxonomy/tax-familyresult.cfm?source=plants&displaylanguage=%23displaylanguage%23&Family=195&Country=). (Consultado 25 de septiembre de 2013).
- Urrea, A. I., Gómez, S. y Naranjo, E. J. 2012. Respuesta de *Zamia incognita* L. al cultivo *in vitro*, una alternativa para su conservación. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 14 (2): 121-133.
- Vargas-Contreras, J. A. y Hernández-Huerta, A. 2001. Distribución altitudinal de la mastofauna en la Reserva de la Biosfera “El Cielo”, Tamaulipas, México. *Acta Zoológica Mexicana*, 82: 83-109.
- Vazquez, M., Bojorquez, H., Torres, L., Sanchez-Moreno, S., Sanchez-Morales, L. y Torres-Hernandez, L. 2010. *Ceratozamia mexicana*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42141A10665184. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42141A10665184.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Velasco Martínez, B. Y. 2015. Variación genética de *Zamia prasina* W. Bull 1881 (Zamiaceae). Tesis de licenciatura. Doctoral dissertation, Instituto en Ciencias Biológicas-Licenciatura en Biología-UNICACH. 57 p.
- Vergeer, P., Renglin, R., Copal, A. y Ouborg, N. 2003. The interacting effects of genetic variation, habitat quality and population size on performance of *Succisa pratensis*. *Journal of Ecology*, 91: 18-26.
- Vite, A., Pulido, M. T. y Flores-Vázquez, J. C. 2013. Estrategia estatal de conservación de las cícadas (Zamiaceae): una propuesta para el estado de Hidalgo, México. *International Journal of Tropical Biology* 61 (3): 1119-1131.
- Vovides, A. P. 1985. Systematic studies on Mexican Zamiaceae II. Additional notes on *Ceratozamia kuesteriana* from Tamaulipas, Mexico. *Brittonia*, 37(2): 226-231.

- Vovides, A. P. 1990. Spatial distribution, survival, and fecundity of *Dioon edule* (Zamiaceae) in tropical deciduous forest in Veracruz, México, with notes on its habitat. *American Journal of Botany*, 77: 1532-1543.
- Vovides, A. P. 1991. Insect symbionts of some Mexican cycads in their natural habitat. *Biotropica*, 23: 102-104.
- Vovides, A. P. 2000. México: Segundo lugar mundial en diversidad de cícadas. *CONABIO. Biodiversitas*, 31: 6-10.
- Vovides, A. P. y Chemnick, J. 2010a. *Dioon tomasellii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42131A10661837. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42131A10661837.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Vovides, A. P. y Chemnick, J. 2010b. *Zamia polymorpha*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42174A10648056. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42174A10648056.en>. Downloaded on 13 April 2018.
- Vovides, A. P. y Nicolalde-Morejón, F. 2010. Ficha técnica de *Ceratozamia kuesteriana*. En: Vovides, A. P. (compilador). Base de datos de las cícadas mexicanas. Instituto de Ecología A.C., INECOL. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. DK008. México, D.F.
- Vovides, A. P., Norstog, K. J., Fawcett, P. K., Duncan, M. W., Nash, R. J. y Molsen, D. V. 1993. Histological changes during maturation in male and female cones of the cycad *Zamia furfuracea* and their significance in relation to pollination biology. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 111 (2): 241-252.
- Vovides, A. P., Ogata, N., Sosa, V. y Peña-García, E. 1997. Pollination of endangered Cuban cycad *Microcycas calocoma* (Miq.) A. DC. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 125 (3): 201-210.
- Vovides, A. P., Iglesias, C., Pérez-Farrera, M. A., Vázquez-Torres, M. y Schippmann, U. 2002. Peasant nurseries: a concept for an integrated conservation strategy for cycads in Mexico. Págs. 421-444. En: Maunder, M., Clubbe, C., Hankamer, C. y Groves, M. (eds.), *Plant Conservation in the Tropics: perspectives and practice*. Richmond, Royal Botanic Gardens, Kew.
- Vovides, A. P., Pérez-Farrera, M. A., González-Astorga, J., González, D., Gregory, T., Chemnick, J., Iglesias, C., Octavio-Aguilar, P., Avendaño, S., Bárcenas, C. y Salas-Morales, S. 2003. An outline of our current knowledge on Mexican cycads (Zamiaceae, Cycadales). *Current Topic in Plant Biology*, 4: 159-174.
- Vovides, A. P., Pérez-Farrera, M. A. e Iglesias, C. 2010a. Cycad propagation by rural nurseries in Mexico as an alternative conservation strategy: 20 years on. *The Board Trustees of the Royal Botanic Gardens. Kew Bulletin*, 65: 603-611.

- Vovides, A. P., González-Astorga, J., Vergara-Silva, F., Sosa Ortega, V., Stevenson, D., Pérez-Farrera, M. A., Nicolalde-Morejón, F. e Iglesias-Delfin, C. 2010b. Códigos de barras moleculares (DNA barcoding) en especies mexicanas del género *Zamia*. Instituto de Ecología, A.C. Informe final SNIB-CONABIO, GE004, México D. F.
- Vovides, A. P., Chemnick, J. y Gregory, T. 2010a. *Zamia katzeriana*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T178866A7631023. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T178866A7631023.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Vovides, A., Chemnick, J. y Gregory, T. 2010b. *Zamia purpurea*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42137A10663702. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42137A10663702.en>. Downloaded on 01 March 2018.
- Vovides, A. P., Chemnick, J. y Gregory, T. 2010c. *Zamia inermis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T42111A10649971. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T42111A10649971.en>. Downloaded on 22 March 2018
- Vovides, A. P., Clugston, J. A. R., Gutiérrez-Ortega, J. S., Pérez-Farrera, M. A., Sánchez-Tinoco, M. Y. y Galicia, S. 2018. Epidermal morphology and leaflet anatomy of *Dioon* (Zamiaceae) with comments on climate and environment. *Flora*, 239: 20-44.
- Walters, T. W. y Decker-Walters D. S. 1991. Patterns of allozyme diversity in the West Indies cycad *Zamia pumila* (Zamiaceae). *American Journal of Botany*, 78: 436-445.
- Watterson, G. A. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology*, 7: 256-276.
- White, P. S. y Walker, J. L. 1997. Approximating nature's variation: selecting and using reference information in restoration ecology. *Restoration Ecology*, 5: 338-349.
- Whitelock, L. M. 2002. *The Cycads*. Timber Press. 1ª ed. Portly Oregon. 532 p.
- Whitelock, L. M. 2004. Range y variation in the genus *Ceratozamia* (Zamiaceae). *The Botanical Review*, 70(2): 235-239.
- Whitlock, M. C. y McCauley, D. E. 1999. Indirect measures of gene flow and migration: F_{ST} not equal to $1/(4Nm + 1)$. *Heredity*, 82: 117-25.
- Wiens, J. J. y Graham, C. H. 2005. Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 36 (1): 519-539.
- Wright, S. 1969. *Evolution and the genetics of populations*. Vol. 2: The theory of gene frequencies. University of Chicago Press. Chicago, 23(1): 72-84.
- Wright, S. 1978. *Evolution and the genetics of populations: a treatise in four volumes*: Vol. 4: variability within and among natural populations. University of Chicago Press, 19: 395-420.

- Xiao, L., Gong, X., Hao, G., Ge, X., Tian, B. y Zheng, S. 2005. Comparison of the genetic diversity in two species of cycads. *Australian Journal of Botany*, 53: 219-223.
- Yang, S. L. y Meerow, A. W. 1996. The *Cycas pectinata* (Cycadaceae) complex: genetic structure and gene flow. *International Journal of Plant Science*, 157: 468-483.
- Yáñez, L. 2006. Las cícadas, biología y conservación en México. Universidad Autónoma de Chapingo, Estado de México, México. 208 p.
- Zane, L., Bargelloni, L. y Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1-16.
- Zheng, Y., Liu, J. y Gong, X. 2016. Tectonic and climatic impacts on the biota within the Red River Fault, evidence from phylogeography of *Cycas dolichophylla* (Cycadaceae). *Scientific Reports*, 6: 33540-33549.
- Zhifeng, G. y Thomas, B. A. 1989. A review of fossil *Cycad megasporophylls* with new evidence of *Crossozamia Pomely* its associated leaves from the lower Permian of Taiyuan, China. *Review of Paleobotany and Palynology*, 60: 205-223.
- Zuckerlandl, E. y Pauling, L. 1965. Molecules as documents of evolutionary biology. *Journal of Theoretical Biology*, 8(2): 357-366.

1 Permiso de colecta



SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES

SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN
PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/ 06725 /16

CIUDAD DE MÉXICO 08 DE JULIO DE 2016

DR. ARTURO SANCHEZ GONZALEZ
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERIA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
CALLE REINA DE LOS BONDADOSOS No. 1556
COLONIA PASEO DE LAS REINAS 5ª SECCIÓN
MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO
C.P. 42184 - MÉXICO
TEL: 01 (771) 710 6708, E-MAIL: artsag@hotmail.com

Considerando que ha dado cumplimiento a los requisitos establecidos para efectuar investigación y colecta científica de flora y fauna silvestres en territorio mexicano y con fundamento en el Artículo 32 Bis fracciones I, III, XXII, XXXIX de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; Artículo 19 fracción XXV y 32 fracción VI, XVIII, XXI, XXIV del Reglamento Interior de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 26 de noviembre de 2012; 79, 80 fracción I, 82, 83 y 87 párrafo cuarto de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente; Artículos 9º. Fracción XII, 97 y 98 de la Ley General de Vida Silvestre; 12, 123 Fracción IV y 126 del Reglamento de la Ley General de Vida Silvestre; Artículo 85, Artículo 88, fracciones I y II, Artículo 105, fracciones II y III del Reglamento de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente en Materia de Áreas Naturales Protegidas (ANP's); las disposiciones relativas de la Norma Oficial Mexicana NOM-126-SEMARNAT-2000, por la que se establecen las especificaciones para la realización de actividades de colecta científica de material biológico de especies de flora y fauna silvestres y otros recursos biológicos en el territorio nacional; la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo, la Dirección General de Vida Silvestre **autoriza** la licencia de colecta científica por proyecto sobre especies o poblaciones en riesgo o sobre hábitat crítico, para desarrollar las siguientes actividades inherentes al proyecto de investigación sobre plantas:

- Colecta de hasta diez (10) hojas y cinco (05) flores de hasta diez individuos de la especie "magnolia" *Magnolia rzedowskiana* por localidad de colecta.
- Colecta de hasta dos (02) hojas por ejemplar de hasta dos (02) individuos de la especie "helecho" *Marattia spp.* Por localidad de colecta.
- Colecta de hojas de la especie "helecho" *Dicksonia sellowiana*.
- Colecta de hasta (10) hojas por individuo, de hasta diez individuos por población de la especie "cedro rojo" *Cedrela odorata*
- Colecta de hasta quince (15) folíolos por individuo de hasta quince (15) individuos por población y hasta tres (03) estróbilos por población de cicadas del género *Ceratozamia*.
- Colecta de diez (10) hojas por individuo de diez individuos por población de la especie "haya" *fagus grandifolia*
- Colecta de hasta dos (02) muestras para herborizar por especie y por localidad de colecta de ejemplares que se encuentren en riesgo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010.

Las actividades se llevarán a cabo en los estados de Guerrero, Hidalgo, San Luis Potosí, Querétaro, Veracruz, Puebla, Nuevo León y Tamaulipas. La presente autorización tendrá duración de un (01) año a partir de la emisión de la misma.

Continúa al reverso.../
Hoja 1 de 2

La presente se expide con el aval de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, con la colaboración de la Biol. Marisol Gutiérrez Lozano, Dr. Pablo Octavio Aguilar, Biol. Manuel Alejandro Macedo Villareal, Estu. De Biol. Yesica Vera Barrios, debiendo sujetarse obligatoriamente el titular y los colaboradores a las siguientes condiciones

1.- Cumplir con las disposiciones Administrativas, Fiscales y de Sanidad exigibles por las autoridades competentes en la materia, sean Federales, Estatales o Municipales, así como con las disposiciones establecidas en la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y su Reglamento en Materia de Áreas Naturales Protegidas y demás disposiciones legales aplicables.

2.- En todo momento el investigador será responsable de los impactos significativos que haya sobre las poblaciones de la flora o fauna silvestres y sus hábitats, por lo que deberá considerar el riesgo de perturbación del ecosistema, antes de su ejecución y no llevarlo a cabo si el riesgo es alto.

3.- Previo al inicio de las actividades de campo, deberá enviar obligatoriamente por escrito y utilizando cualquier medio su programa de trabajo a las Delegación Federal de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales en los Estados de Guerrero 01 (744) 434 1000, Hidalgo 01 (771) 717 9416, Nuevo León 01 (81) 8369 8913, Puebla 01 (222) 229 9506, Querétaro 01 (442) 238 3410, San Luis Potosí 01 (444) 834 0635, Tamaulipas 01 (834) 318 5254, Veracruz 01 (228) 841 6521, enviando copia del mismo a la Dirección General de Vida Silvestre. De igual manera, al término de dichas actividades lo notificará a esa Delegación Federal, enviando un reporte detallado por escrito.

4.- La totalidad del material colectado deberá destinarse exclusivamente a los fines específicos del proyecto, objeto de la presente autorización. Con base al Capítulo IV, Artículo 98 de la Ley General de Vida Silvestre, las muestras botánicas obtenidas serán llevadas y analizadas en el Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, y el titular de la autorización asume la responsabilidad de remitir a esta Dirección General, copia de la(s) constancia(s) del(los) depósitos(s) debidamente firmado(s), especificando la cantidad del material depositado.

5.- Con base al Capítulo IV, Artículo 98 de la Ley General de Vida Silvestre y 126 del Reglamento de la Ley General de Vida Silvestre, el responsable del proyecto deberá someter a la consideración de la Dirección General de Vida Silvestre, en un plazo no mayor de 30 (TREINTA) días de concluida la vigencia de la presente, un informe que describa detalladamente las actividades realizadas, los resultados obtenidos, la problemática del área trabajada, las potenciales alternativas de solución y -en su oportunidad-, la(s) publicación(es) y sobre tiros producto de la investigación.

6.- De acuerdo a que la Dirección General de Vida Silvestre es la autoridad competente para evaluar y dictaminar solicitudes de colecta de fauna y flora en riesgo y de acuerdo con el Artículo 1º de la Ley General de Vida Silvestre y 123 Fracción IV del Reglamento de la Ley federal de Vida Silvestre, su solicitud prestada, se evaluó y dictaminó a lo establecido en la modalidad B: Por proyecto sobre especies o poblaciones en riesgo.

7.- Queda estrictamente prohibido efectuar cualquier aprovechamiento de las especies de flora y fauna silvestres, cualesquiera que sea su estatus, excepto lo aquí autorizado, así como realizar actividades en áreas naturales protegidas de México, sean Estatales o Federales, sin previa autorización.

8.- De acuerdo al Artículo 87 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y al Capítulo IV, Artículo 97 de la Ley General de Vida Silvestre, esta autorización no ampara el aprovechamiento del material biológico colectado para fines comerciales, ni de utilización en biotecnología.



SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES

SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN
PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/ 06725 /16

CIUDAD DE MÉXICO 08 DE JULIO DE 2016

Se recomienda que durante sus actividades de campo, en el caso de observar ejemplares de especies listadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, se notifique de ello (la especie, ubicación geográfica y la fecha) a esta Dirección General, en el informe de actividades antes mencionado.

La presente autorización es personal e intransferible y habrá de mostrarse a las Autoridades Federales, Estatales y Municipales cuantas veces lo soliciten. Así mismo y tomando en consideración lo establecido en el Artículo 87 de la Ley General de Vida Silvestre el titular de la presente deberá contar con el consentimiento previo, expreso e informado de los legítimos propietarios de la(s) tierra(s) donde pretende desarrollar el proyecto.

El incumplimiento de las condiciones aquí establecidas, dará origen a la instauración de un procedimiento administrativo ante la autoridad competente, para proceder a la cancelación de la autorización y a la aplicación de la legislación correspondiente, según sea el caso.

ATENTAMENTE
LA DIRECTORA GENERAL DE VIDA SILVESTRE



SEMARNAT

YOLANDA AURORA ALANIZ PASINI.

- C.c.p- C. Joel González Moreno.- Director General de Inspección de Vida Silvestre, Recursos Marinos y Ecosistemas Costeros, PROFEPA, e-mail: vida_silvestre@profepa.gob.mx, jmejia@profepa.gob.mx
 C. Martín Vargas Prieto.- Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado de Guerrero.- e-mail: delegado@guerrero.semarnat.gob.mx
 C. Guillermo Cueva Sada.- Delegada Federal de la SEMARNAT en el Estado de Nuevo León.- e-mail: delegado@nl.semarnat.gob.mx
 C. Federico Vera Copca.- Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado de Hidalgo.- e-mail: delegado@hidalgo.semarnat.gob.mx
 C. Daniela Migoya Mastretta.- Delegada Federal de la SEMARNAT en el Estado de Puebla.- e-mail: delegado@puebla.semarnat.gob.mx
 C. Oscar Moreno Alanis.- Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado Querétaro.- e-mail: delegado@queretaro.semarnat.gob.mx
 C. José Antonio Undiano Errejón.- Encargado del Despacho de la SEMARNAT en el Estado de San Luis Potosí.- delegado@slp.semarnat.gob.mx
 C. Jesús González Macías.- Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado de Tamaulipas.- e-mail: delegado@tamaulipas.semarnat.gob.mx
 C. José Antonio González Azuara.- Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado de Veracruz.- e-mail: delegado@veracruz.semarnat.gob.mx
 Biol. Bernito Bermudez Almada.- Dirección Regional Península de Baja California y Pacífico Norte.- e-mail: bermudez@conanp.gob.mx
 C. Miguel Ángel Espinosa Luna.- Coordinador de Asesores de la Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental.- e-mail: coordinacion.sgpa@semarnat.gob.mx
 C. Fernando Sánchez Camacho.- Departamento de Análisis para el Aprovechamiento de Otras Especies. e-mail: fsanchez@semarnat.gob.mx

Archivo General: 09/K4-0033/07/16, 09/O1-0037/07/16
LESEMINTAC/ES/C

c:oscar/colecta.cientifica/ArturoSanchezGonzalez(Plantas) SUNIVS (07-07-16)
Hoja 2 de 2

"Por una cultura ecológica y el uso eficiente del papel, las copias de conocimiento de este asunto son remitidas vía electrónica".

Edificio Nacional número 223,
Colonia Anáhuac, Delegación Miguel Hidalgo
Código Postal 11320, Distrito Federal

2 Protocolo para extracción de DNA en plantas de Doyle y Doyle (1987)

1. En un mortero moler alrededor de .5 g de tejido con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino.
2. Agregar 1 ml de buffer **CTAB 2X** y seguir moliendo. Recuperar en un microtubo de 1.5 **ml**. En una campana de extracción agregar 0.8 μ l de B- mercaptoetanol.
3. Centrifugar a 8 000 rpm durante 8 **min**.
4. Eliminar el sobrenadante y suspender con 1 **ml** de **CTAB 2X**, mezclar en vortex.
5. Centrifugar a 9,000 **rpm** durante 8 minutos.
6. Eliminar el sobrenadante y suspender en 600 μ l de **CTAB 2X**, agregar 10 μ l de **RNA'sa** (1 **mg/ml**), incubar a 60°C durante 25 minutos.
7. Agregar 10 μ l de *Proteinasa k* (1 **mg/ml**), incubar a 37 °C durante 25 minutos.
8. Agregar 600 μ l de cloroformo: octanol 24:1, agitar hasta homogeneizar.
9. Centrifugar a 10,000 **rpm** durante 10 **min**, el sobrenadante tiene que quedar transparente.
10. Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo, cuidando de no tomar la interfase.
11. Agregar 2/3 del volumen final de isopropanol helado para precipitar el **DNA**.
12. Las muestras se dejan reposar durante la noche a -20°C.
13. Centrifugar a 12,000 **rpm** durante 10 **min**. Decantar el sobrenadante sin perder la pastilla.
14. Limpiar el **DNA** agregando 1 **ml** de etanol 70% frío y centrifugar a 14,000 **rpm** durante 5 **min**.
15. Eliminar el sobrenadante (secar totalmente) y resuspender con 100 μ l de agua ultra pura.