



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

TEMA:

**Variabilidad y estructura genética de *Ceratozamia zaragozae* Medellín-Leal
(Cycadales, Zamiaceae) en San Luis Potosí, México**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

PRESENTA:

NAISHLA MIROSLAVA GUTIÉRREZ ARROYO

DIRECTOR: DR. PABLO OCTAVIO AGUILAR

CODIRECTOR: DR. JOSE ARTURO DE NOVA VÁZQUEZ

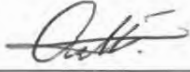
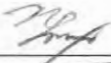



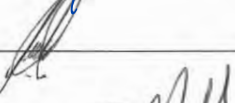
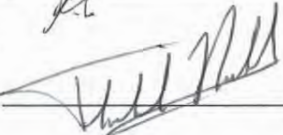
MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO, 2018



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

Por este conducto le comunico que el Jurado asignado a la pasante de Licenciatura en Biología **Nashla Miroslava Gutiérrez Arroyo** quien presenta el trabajo recepcional de tesis intitulado **“Variabilidad y estructura genética de *Ceratozamia zaragozae* Medellín-Leal (Cycadales, Zamiaceae) en San Luis Potosí, México”**, después de revisarlo en reunión de sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

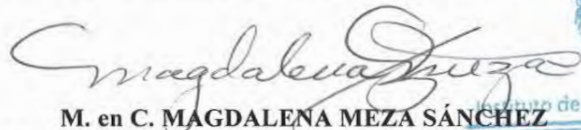
PRESIDENTE:	Dr. Arturo Sánchez González	
SECRETARIO :	Dra. Norma Leticia Manríquez Morán	
PRIMER VOCAL:	Dr. Luis Fernando Rosas Pacheco	
SEGUNDO VOCAL:	Dr. Pablo Octavio Aguilar	
TERCER VOCAL:	Dr. José Arturo de Nova Vázquez	
PRIMER SUPLENTE:	Dra. Dulce María Galván Hernández	
SEGUNDO SUPLENTE:	Dr. Francisco Federico Núñez de Cáceres González	

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi más atenta consideración.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

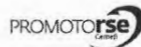
ATENTAMENTE
“AMOR, ORDEN Y PROGRESO”
Mineral de la Reforma, Hidalgo a 10 de enero de 2018





M. en C. MAGDALENA MEZA SÁNCHEZ
COORDINADOR ADJUNTO DE LA LICENCIATURA EN BIOLÓGIA

Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pachuca - Tulancingo km. 4.5
 Colonia Carboneras
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
 Tel. +52 771 7172000 exts. 6640 y 6642, Fax 2112
 aab_icbi@uaeh.edu.mx



www.uaeh.edu.mx



DEDICATORIA

“Learning about evolution can transform us in a deep way. It shows us our place in the whole splendid and extraordinary panoply of life. It unites us with every living thing on the Earth today and with myriads of creatures long dead. Evolution gives us the true account of our origins, replacing the myths that satisfied us for thousands of years. Some find this deeply frightening, others ineffably thrilling”

Jerry A. Coyne.



A mis padres, hermanos y a mi sobrino, que son la fuente de mi motivación.

AGRADECIMIENTOS

-Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por los apoyos CB-2014/243454 otorgado al Dr. José Arturo de Nova; e INFR-252807 otorgado al Cuerpo Académico de Ecología de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, a cargo del Dr. Fernando Rosas Pacheco.

-A la Secretaría de Educación Pública que otorgó los recursos PROMEP/103.5/12/6576 al Dr. José Arturo de Nova y PRODEP/UAEH-PTC-631 al Dr. Pablo Octavio Aguilar.

-Al Herbario Isidro Palacios y a los investigadores del Instituto de Investigación en Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, por el apoyo en el trabajo de campo.

-A los laboratorios de Sistemática Molecular, Conservación Biológica y Genética; del Área Académica de Biología, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; por brindar la infraestructura para la realización de este trabajo.

-A la Dra. Norma L. Manríquez Morán y al Dr. L. Fernando Rosas Pacheco por permitirnos acceder a sus áreas y equipos; necesarios para la realización del trabajo.

-A los sinodales la Dra. Norma L. Manríquez Morán, al Dr. L. Fernando Rosas Pacheco, al Dr. Arturo Sánchez González, a la Dra. Dulce María Galván Hernández, al Dr. Francisco F. Núñez de Cáceres González; y a los directores Dr. Pablo Octavio Aguilar y Dr. José Arturo de Nova.

- Al Dr. Pablo Octavio Aguilar por todo su apoyo y valiosas enseñanzas, por compartir de su tiempo y ayudarme a crecer tanto académica como personalmente, por la motivación, la paciencia al escuchar mis enredadas pláticas, los consejos, por confiar en mí y ayudar a mejorar la confianza en mí misma, y por más, le estoy y estaré muy agradecida.

- A la Dra. Norma L. Manríquez Morán por la disponibilidad y todas las atenciones en el periodo que se hizo uso del equipo del laboratorio de Sistemática Molecular, por compartir de su tiempo, por todas las valiosas enseñanzas, los consejos, la motivación constante, la paciencia y por todas las consideraciones; por todo el apoyo, le estoy y estaré muy agradecida.

- A la M. en C. Josefina Ramos-Frías (Chepis), al Biol. Manuel Macedo, a Jocelyn Briseño, al Biol. Mario García, a la Dra. Dulce Ma. Galván, al Dr. Pablo Octavio Aguilar y al Dr. Francisco F. Núñez de Cáceres, por la amena compañía en el laboratorio y por todo su apoyo.

- Al Biol. Ulises Iturbe Acosta por las valiosas enseñanzas y por la motivación.

- A mis hermanos Vladimir y Vicente y, principalmente; a mis padres Rita y Javier, por las atenciones diarias, por la comprensión, confianza y su apoyo en todo momento, gracias por escuchar con atención y entusiasmo cada novedad del trabajo, por la gran motivación, siempre les estaré muy agradecida.

- A Jocelyn Briseño, Alejandra Márquez y Edith García, quienes escuchaban atentamente mis dramáticas y enredadas pláticas, me aconsejaban, tranquilizaban y motivaban, muchas gracias por su apoyo.

-A mis amigos, amigas y familiares, quienes estuvieron pendientes de este trabajo y que me permitían compartir de él.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE CUADROS	9
ABREVIATURAS.....	10
1. RESUMEN	12
2. INTRODUCCIÓN	13
3. ANTECEDENTES.....	15
3.1 La importancia de la variabilidad genética.....	15
3.2 Las cícadas	17
3.3 Estado actual de las cícadas mexicanas.....	19
3.3.1 <i>Cícadas en San Luis Potosí</i>	23
3.4 Estudios genéticos en cícadas	23
3.5 Especie de estudio: <i>Ceratozamia zaragozae</i>	29
3.5.1 <i>Descripción</i>	30
3.5.2 <i>Estudios previos</i>	31
4. JUSTIFICACIÓN.....	32
5. HIPÓTESIS.....	32
6. OBJETIVO GENERAL	33
7. OBJETIVOS PARTICULARES.....	33
8. MATERIAL Y MÉTODOS	34
8.1 Sitio de estudio	34
8.2 Obtención de material biológico	35
8.3 Extracción de DNA	36
8.4 Amplificación.....	37
8.5 Análisis de datos	38
8.5.1 <i>Diversidad genética</i>	39
8.5.2 <i>Estructura genética</i>	39
8.5.3 <i>Cuellos de botella</i>	40
8.5.4 <i>Selección natural</i>	41
9. RESULTADOS.....	42
9.1 Diversidad genética	42
9.2 Estructura genética.....	44
9.3 Cuellos de Botella	48

9.4 Selección Natural	49
10. DISCUSIÓN	51
10.1 Diversidad de la especie.....	52
10.2 Estructura genética	54
11. CONCLUSIONES	59
12. BIBLIOGRAFÍA	60
13. ANEXOS	72

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribución de las tres familias y 10 géneros de las cícadas (Nagalingum *et al.*, 2011). 17
- Figura 2.** Filogenia de Cycadales calibrada por seis registros fósiles. Inferencia Bayesiana obtenida bajo el modelo “birth-death prior”. Los valores mostrados en los nodos constituyen el promedio de divergencia entre clados estimado en millones de años. C: Carbonífero; P: Pérmico; T: Triásico; J: Jurásico; K: Cretácico, Pg: Paleógeno; N: Neógeno; H_E: Heterocigosis esperada promedio por clado (modificado de Condamine *et al.*, 2015). 27
- Figura 3.** A) Cladograma obtenido por González & Vovides (2002), B) representación de la ubicación geográfica de los principales clados obtenidos por González & Vovides (2002) y C) Cladograma obtenido por González & Vovides (2012). 28
- Figura 4.** A) Individuo adulto de *Ceratozamia zaragozae* (fotografía tomada por: J. A. de Nova-Vázquez, 2014), B) macroestrobilo y C) microestrobilo (Tomado de Castillo-Lara *et al.*, 2017). 31
- Figura 5.** Polígono de muestreo donde se localizan las seis poblaciones de *Ceratozamia zaragozae* en el estado de San Luis Potosí (elaborado por: J. A. de Nova-Vázquez).... 35
- Figura 6.** Árbol de agrupamiento UPGMA, considerando las distancias de Nei. 45
- Figura 7.** a) Gráfica resultante de la evaluación siguiendo método de Evanno *et al.*, (2005), la cual muestra que el límite adecuado de asignación es K= 4; b) estimación de los grupos genéticos (K= 4), obtenidos utilizando el programa STRUCTURE y corregidas por el programa CLUMPP; c) mapa donde se ubican por colores a las localidades, en correspondencia con el análisis de asignación. 46
- Figura 8.** Análisis de Funciones Discriminantes de Componentes Principales para las seis poblaciones *Ceratozamia zaragozae*. 47
- Figura 9.** Prueba de Mantel para las matrices de distancias genéticas y geográficas.... 48

ÍNDICE DE CUADROS

- Cuadro 1.** Lista de especies de la familia Zamiaceae en México, distribución y regiones biogeográficas. P: en peligro de extinción, A: amenazadas, Pr: protección especial; E: endémicas y NE: no endémicas (modificado de SEMARNAT, 2010; Nicolalde-Morejón *et al.*, 2014)..... **20**
- Cuadro 2.** Lista de trabajos realizados sobre la diversidad y estructura genética de cícadas. H_O : heterocigosis observada; H_E : heterocigosis esperada; F_{ST}/G_{ST} : índice de diferenciación genética entre poblaciones. Se integran los indicadores de diversidad promedio \pm DE por taxa. **24**
- Cuadro 3.** Secuencias de los *primers* y características de los 10 microsatélites. T_a = temperatura de alineamiento (adaptado de Meerow & Nakamura, 2007)..... **38**
- Cuadro 4.** N: número de alelos registrados para los 10 loci analizados. bp: pares de bases; N_a : número de alelos promedio por locus; N_e : número efectivo de alelos por locus; I: índice de Shannon; H_O : heterocigosis observada; H_E : heterocigosis esperada; f : coeficiente de fijación. **42**
- Cuadro 5.** Descripción de la variabilidad genética que presentan las poblaciones de *C. zaragozae* en San Luis Potosí. N: número de individuos analizados; N_a : número de alelos por población; N_e : número efectivo de alelos por locus; I: índice de Shannon; H_O : heterocigosis observada; H_E : heterocigosis esperada; f : coeficiente de fijación. **43**
- Cuadro 6.** Comparación pareada entre los coeficientes de diferenciación de las poblaciones de *C. zaragozae*, provenientes de San Luis Potosí. Valores de F_{ST} debajo de la diagonal, p obtenida por el AMOVA sobre la diagonal. En rojo se señalan los valores significativos. **44**
- Cuadro 7.** Frecuencias alélicas para los tres loci bajo selección natural, de acuerdo con el análisis de neutralidad. Con azul se muestran los alelos sobre expresados (selección a favor) y en rojo los exclusivos (selección en contra). **50**
- Cuadro 8.** Promedio de los valores F_{ST} y H_O de los 10 loci analizados en todas las poblaciones, con color azul se señalan los marcadores identificados por el modelo de neutralidad, como sometidos a selección natural. **50**
- Cuadro 9.** Promedio de H_O y H_E por población, considerando solo los loci bajo selección natural. En azul se muestran los valores promedio. **51**

ABREVIATURAS

A	Promedio de alelos por locus/población
ADCP	Análisis de Discriminante de Componentes Principales
AMOVA	Análisis Molecular de la Varianza
°C	Grados Centígrados
μl	Microlitros
μM	Micromolar
Abs	Absorbancia
AFLP	Polimorfismos en Longitud de Fragmentos Amplificados (<i>Amplified Fragments of Longitude Polimorphysims</i>)
ANP	Área Natural Protegida
bp	Pares de Bases (<i>Base Pares</i>)
°C	Grados Centígrados
CITES	Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres
Cm	Centímetros
CTAB	Bromuro de hexadecil-trimetil-amonio (<i>Cetyl-Trimethyl-Ammonium-Bromide</i>)
DNA	Ácido Desoxiribonucleico (<i>Desoxiribonucleic Acid</i>)
dNTP	Deoxinucleósido trifosfato
EDTA	Ácido etil-diamino-tetra-acético (<i>Ethylene-Diamine-Tetra-Acetic-Acid</i>)
F	Coefficiente de fijación
FIT	Coefficiente de Endogamia Dentro de las Poblaciones
FIS	Coefficiente de Endogamia Entre Poblaciones
FST	Coefficiente de Diferenciación Poblacional
g	Gramos
GARP	Algoritmo Genético basado en Grupos de Datos para Predicción (<i>Genetic Algorithm for Rule-set Predictions</i>)
GST	Coefficiente de Diferenciación de Nei
Ha	Hectáreas
HCl	Ácido clorhídrico
H_E	Heterocigosis Esperada
H_O	Heterocigosis Observada
HW	Equilibrio de Hardy-Weimberg
I	Índice informativo para cada iniciador
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
INE-SEMARNAP	Instituto Nacional de Ecología-Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales y Pesca
ITS	Secuencias Intergénicas Simples (<i>Intergenic-Sequences</i>)
IUCN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (<i>International Union of Conservation of Nature</i>)
km²	Kilómetros cuadrados
M	Molar
m	Metros
Ma	Millones de años
MCMC	Cadenas de Markov-Monte Carlo (<i>Markov Chain-Monte Carlo</i>)

ms.n.m.	Metros Sobre el Nivel del Mar
Mg	Miligramos
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
min	Minutos
ml	Mililitros
Mm	Milimolar
mm	Milímetros
N	Norte
Na	Promedio de muestras amplificadas por locus/población
NaCl	Cloruro de sodio
NE	Noreste
Ne	Número efectivo de alelos por locus/población
Ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
NOM	Norma Oficial Mexicana
O	Oeste
P	Porcentaje de Loci Polimórficos
P	Probabilidad
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PNC	Programa Nacional para la Recuperación de la Familia Zamiaeae (Cicadas)
PNP	Parque Nacional el Potosí
rpm	Revoluciones por minuto
SCAR	Secuencias Amplificadas de Regiones Caracterizadas (<i>Sequence Characterized Amplified Region</i>)
s	Segundo
SEMARNAT	Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales
SSR	Secuencias Simples Repetidas (<i>Simple Sequence Repeats</i>)
Taq	Polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TTPGA	Herramientas para análisis genético-poblacionales (<i>Tools for Populations Genetic Analysis</i>)
U	Unidades Enzimáticas
UPGMA	Método de Agrupamiento Pareado No Balanceado con Medias Aritméticas (<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>)
UMAS	Unidades de Manejo de la Vida Silvestre
χ^2	Chi cuadrada
IIM	Modelo de Islas Infinitas (<i>Island Isolation Model</i>)

1. RESUMEN

Ceratozamia zaragozae Medellin-Leal (Zamiaceae), es una cícada considerada en "Peligro Crítico" de extinción dado que solo se contaba con un registro puntual de 50 individuos en la localidad de "Pico del Agujón", en el estado de San Luis Potosí. En los años ochenta se extrajeron miles de plantas de esta localidad sin conocer a la fecha su paradero. El área de distribución limitada, el cambio de uso del suelo y una fertilidad baja son las principales causas de amenaza para la especie. Por lo anterior, en este trabajo se estudiaron nuevas poblaciones encontradas en San Luis Potosí para determinar su diversidad y estructura genética mediante el uso de SSR. Se realizaron análisis de varianza, agrupamiento, asignación, ordenamiento, correlación geográfica-genética, cuellos de botella y neutralidad-selección, además de establecer los niveles de variación para cada locus y población. Las seis poblaciones representan un incremento del 244 % del área de distribución conocida originalmente. Se identificó un elevado número de individuos heterocigos, exogamia y entre tres o cuatro grupos genéticos; con la mayor diversidad en las cuatro poblaciones centrales de la distribución geográfica: Parque Nacional el Potosí (PNP), Ejido Alamitos, Arroyo Moctezuma y Sierra del Camarón; las cuales tienen mayor tamaño poblacional, mayor heterocigosis y menor diferenciación; aunque Sierra del Camarón y el PNP tienen grupos genéticos exclusivos. Tres de estas cuatro poblaciones, presentan cuellos de botella, siendo más severo en la población ubicada en el PNP. Finalmente, Pico del Agujón y Cerro la Calavera, forman un grupo genético con aparente flujo genético, aunque son las más alejadas geográficamente. Ambas tienen tamaños poblacionales reducidos por cuellos de botella identificables, aunque no severos en comparación con el resto. Esto hace pensar en dos posibilidades: i) se encuentran conectadas por flujo ancestral; o ii) el flujo genético aparente es producto de la reubicación en los ochentas de individuos provenientes de Pico del Agujón a Cerro la Calavera. Nos inclinamos a pensar que la segunda opción es la más probable, ya que Cerro la Calavera es la localidad con la menor H_O (0.721 ± 0.060), que no correspondería

con un grupo basal, pero si con un efecto fundador, además de ser una población atípica ambientalmente.

2. INTRODUCCIÓN

La variación genética incluye todas las variantes tanto del genoma nuclear como de los orgánulos citoplasmáticos como la mitocondria y el cloroplasto. Se considera la materia prima de la evolución y es guiada por diferentes fuerzas evolutivas tales como, selección natural, deriva génica, endogamia, flujo génico y mutación (Tomasco & Less, 2015). El efecto de las fuerzas mencionadas tiene correlación con la capacidad de respuesta de las poblaciones y especies ante cambios ambientales, entre mayor variación menor riesgo de pérdida de especies, poblaciones y recursos genéticos. Además, ayuda a entender la forma, distribución, velocidad y causas en los cambios de la variación genética (Piñero *et al.*, 2008), así como a establecer medidas de conservación efectivas (Hamrick & Godt, 1996a).

Las cícadas son plantas dioicas que crecen con relativa lentitud, conforman el grupo más basal de gimnospermas existentes (Whitelock, 2002); sus registros fósiles se remontan al Pérmico temprano hace 280 Ma (Zhifeng & Thomas, 1989) y posiblemente al periodo Carbonífero tardío hace 300 a 325 Ma (Norstog & Nicholls, 1997). Se les ha considerado como "fósiles vivientes" debido a que la morfología de las especies actuales ha permanecido prácticamente inalterada con respecto a la de los registros fósiles (Stevenson, 1990; Chase *et al.*, 1993). Sin embargo, análisis filogenéticos y de datación basados en herramientas moleculares sugieren que las especies actuales provienen de una radiación más reciente (Nagalingum *et al.*, 2011; Condamine *et al.*, 2015).

La lista más reciente de este grupo considera 350 especies a nivel mundial, divididas en tres familias con 10 géneros, las cuales se distribuyen en las zonas tropicales y subtropicales de África, Asia, Australia y América (Osborne *et al.*, 2012; Calonje *et al.*, 2017). En México se han registrado

un total de 61 especies de la familia Zamiaceae (Calonje *et al.*, 2017), lo que coloca al país en segundo lugar a nivel mundial en diversidad de este grupo (Nicolalde-Morejón *et al.*, 2014).

Conforman uno de los grupos de plantas más amenazados del mundo y la mayoría se encuentran catalogadas como "Amenazadas" o "En Peligro" (Donaldson, 2003), esto debido a que presentan un alto valor comercial en mercados internacionales y son objeto de un mercado ilegal por el saqueo de plantas y semillas silvestres; esto y la destrucción del hábitat, representan las dos principales causas de amenaza (INE-SEMARNAP, 2000).

De manera general, las cícadas presentan altos niveles de diferenciación y baja variabilidad genética, lo que se ha asociado principalmente con su dispersión y polinización restringida. Por lo tanto, la estructura y distribución de alelos depende tanto de características microambientales que favorecen el reclutamiento a nivel de paisaje, como de la historia de conectividad entre fragmentos de vegetación a nivel biogeográfico (Octavio-Aguilar *et al.*, 2009).

Ceratozamia zaragozae es una especie endémica de México, específicamente del estado de San Luis Potosí (Whitelock, 2002), se encuentra catalogada en "Peligro Crítico" de acuerdo con la lista roja de la IUCN, en el Apéndice I del CITES (Chemnick & Gregory, 2010; CITES, 2003) y dentro de la NOM-059-2010, considerada como en peligro de extinción (P) (SEMARNAT, 2010), esto debido a que su área de distribución ha sido modificada principalmente por el cambio de uso de suelo, extracción ilegal desde hace más de treinta años, aislamiento de la zona, etc. Además, esta es una de las cícadas del género que crece en las zonas más secas, incluso semidesérticas (Whitelock, 2002). Hasta la fecha *C. zaragozae* era considerada la cícada más amenazada del género ya que solo se habían registrado 50 individuos ubicados en una localidad de San Luis Potosí, México. Sin embargo, en un trabajo previo se localizaron más poblaciones, aumentando el área de distribución total a 113.8 km² (Castillo-Lara *et al.*, 2017). Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la diversidad y estructura genética de *C. zaragozae*, en el estado de San Luis Potosí, para determinar el estado de conservación de sus poblaciones.

3. ANTECEDENTES

3.1 La importancia de la variabilidad genética

La diversidad genética es el componente básico de la biodiversidad y se refiere a todas las formas posibles que se encuentran en el material genético de una especie. El resto de la biodiversidad se deriva de los procesos evolutivos que operan sobre esas variaciones. Su conocimiento y comprensión es de vital importancia para la conservación y el avance de la genética evolutiva, para la salud pública, la sustentabilidad y la productividad agrícola, pesquera y forestal; la domesticación y la biomedicina. Este conocimiento puede ser utilizado en varias vertientes, tales como: a) evaluar la capacidad de respuesta de las poblaciones y especies ante los cambios ambientales naturales o provocados por las actividades humanas; b) evaluar los riesgos de la pérdida de especies, poblaciones y recursos genéticos; c) planear estrategias de aprovechamiento y conservación de poblaciones, especies y recursos genéticos; d) entender la forma, la velocidad y las causas de la pérdida de la diversidad genética; e) evaluar los riesgos de introducción de enfermedades, plagas, especies invasoras, variedades mejoradas y modificadas genéticamente sobre las poblaciones, especies nativas y recursos genéticos de plantas animales y humanos (Piñero *et al.*, 2008).

Parte de la variación fenotípica y todos los cambios evolutivos que ocurren en las poblaciones se pueden atribuir a cambios en las secuencias de DNA que codifican o están relacionados con los atributos físicos. La variación fenotípica que presentan las poblaciones naturales es limitada si la comparamos con la variación genética, que incluye variantes silenciosas que no tienen un correlato fenotípico. Además de que la variación de formas puede ser influenciada por el ambiente, dependiendo de la plasticidad que un rasgo tenga (plasticidad fenotípica) (Tomasco & Less, 2015).

La variación genética incluye todas las variantes de los genomas nuclear y de los orgánulos citoplasmáticos como la mitocondria y el cloroplasto. Esta es la materia prima de la evolución y es

guiada por diferentes fuerzas evolutivas como selección natural, deriva génica, flujo génico, endogamia y mutación. El estudio de la variación genética resulta una herramienta poderosa que permite abordar temas como las relaciones filogenéticas entre especies, la historia de las poblaciones y el peso relativo de las fuerzas evolutivas, con mayor claridad y precisión. A nivel poblacional, la variación genética depende de cambios históricos en la conectividad y tamaño de las poblaciones, aspectos ecológicos intrínsecos a las especies, procesos adaptativos específicos a limitantes evolutivas, entre otros (Tomasco & Less, 2015).

En las poblaciones pequeñas, o aquellas sometidas a endogamia se puede favorecer el aumento en la frecuencia de mutaciones deletéreas recesivas, incrementando la mortalidad de los portadores (Tomasco & Less, 2015).

De manera general, la variabilidad genética de una población se incrementa por aparición de nuevos alelos debido a mutaciones o por ingreso de alelos externos a través del flujo génico. Por otro lado, la variabilidad es "filtrada" por selección natural, lo que elimina alelos poco adaptativos para las poblaciones; de igual forma la variación se pierde aleatoriamente al disminuir el tamaño poblacional o puede verse mermada por emparejamientos consanguíneos (Frankham *et al.*, 2004).

A nivel de especie la variación se produce por cambios en el material genético, por lo tanto; la mutación es la fuente última de variación genética y, por consiguiente, de la evolución biológica. El término mutación es usado en sentido más amplio para referirse a todos los cambios genéticos, incluyendo sustitución de nucleótidos, inserción y deleción, cambios en la localización genómica de elementos genéticos transponibles y reordenamientos cromosómicos (Hartl, 2000); es un proceso natural y espontáneo que ocurre con cierta frecuencia, en términos probabilísticos en todas las células. Sin embargo, son las mutaciones que ocurren en las células gaméticas las que tienen posibilidades de pasar a la siguiente generación y entrar en el juego de la evolución, este tipo de mutaciones ocurren esporádicamente, se calcula que la tasa promedio de mutaciones gaméticas sucede con una frecuencia de 1×10^{-6} . También la recombinación y el flujo génico entre poblaciones pueden aumentar la variación encontrada en las poblaciones naturales. La primera

produce distintas combinaciones de las variantes generadas por mutación y la segunda dispersa variantes que surgen en una población hacia el resto (Tomasco & Less, 2015).

3.2 Las cícadas

Las cícadas comprenden un grupo basal de gimnospermas (Whitelock, 2002), el cual ha mostrado tener un origen evolutivo único, tanto en estudios morfológicos como moleculares (Stevenson, 1990; Chase *et al.*, 1993). Sus registros fósiles se remontan posiblemente al periodo Carbonífero tardío hace 300 a 325 Ma (Norstog & Nicholls, 1997) y, la diversidad de este grupo probablemente alcanzó su máximo auge durante el periodo Jurásico hace 150 a 200 Ma (Anderson *et al.*, 2007; Pant, 2002; Whitelock, 2002). Han sobrevivido extinciones masivas, aunque las especies actuales provienen de una radiación reciente (Nagalingum *et al.*, 2011, Condamine *et al.*, 2015), calculada hace aproximadamente 19 Ma, a partir de un número pequeño de especies que subsistieron durante el Mioceno tardío (Condamine *et al.*, 2015).

El orden Cycadales se dividen en tres familias, con 10 géneros, Cycadaceae con un género, Stangeriace con dos y Zamiaceae con siete, distribuidos en las zonas tropicales y subtropicales de África, Asia, Australia y América (figura 1). Actualmente, existen 350 especies de cícadas a nivel mundial, aunque la lista sigue en aumento gracias a descripciones de taxones nuevos (Calonje *et al.*, 2017).

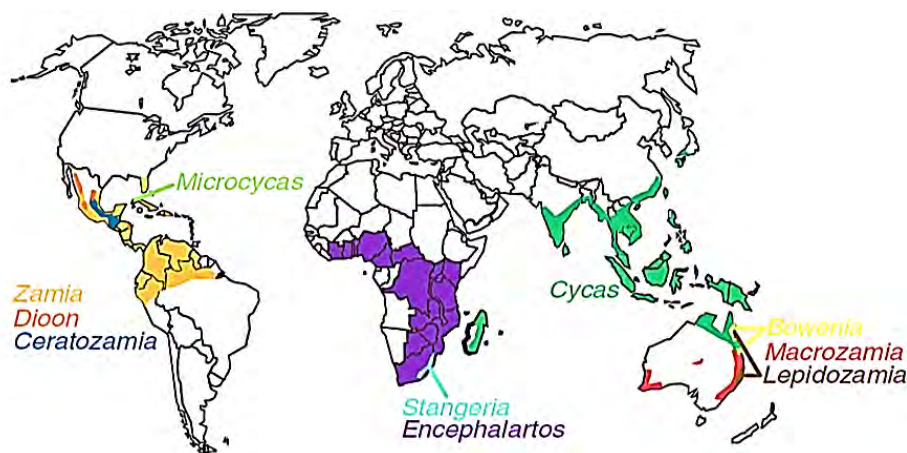


Figura 1. Distribución de las tres familias y 10 géneros de las cícadas (Nagalingum *et al.*, 2011).

El hábitat de las cícadas se caracteriza por exhibir precipitaciones en verano e invierno secos, con precipitación de al menos 350 mm anuales. Hay excepciones en algunos hábitats tropicales que quizá tengan precipitaciones excesivas con más de 5,500 mm anuales (Whitelock, 2002). Además, algunos taxones pueden prosperar en condiciones xerófilas con precipitaciones extremadamente bajas y veranos largos y calurosos (Donaldson, 1995).

Los suelos donde se establecen están generalmente compuestos por arena o grava con cantidades más pequeñas de arcilla y humus. El requisito más importante que debe tener el suelo es que drene rápidamente el agua (Whitelock, 2002).

Aunque es un grupo que se enfrenta a una serie de factores que limitan su distribución y crecimiento, se ha adaptado a las condiciones adversas del medio, sobreviviendo a distintas elevaciones que van desde el nivel del mar hasta más de 2,500 ms.n.m.; con sus consecuentes cambios de temperatura y precipitación (Whitelock, 2002).

Las especies de cícadas difieren entre sí en crecimiento, producción, tamaño y número de conos, tamaño de semilla, longevidad, polinización, agentes de dispersión, tolerancia a temperaturas, etc. A pesar de las numerosas diferencias entre especies, las cícadas comparten algunas características generales: a) presencia de cicasinas; b) crecen con relativa lentitud en comparación con otras plantas de vida larga; d) tienen una corteza primaria medulosa, rica en fécula que las hace vulnerables al moho, lo que explica que la mayoría de las especies viven en suelos bien drenados. Esto significa también que los tallos se pueden dañar fácilmente cuando se extraen o trasplantan y que en las plantas que no se tratan con cuidado la mortalidad es alta; e) son dioicas; f) las semillas no tienen periodo inactivo, el embrión se desarrolla lenta pero continuamente hasta la germinación, lo cual sucede normalmente pocos meses después de la dispersión. Por esto, la vida de las semillas es relativamente corta y está sometida a daños por desecación (Nicolalde-Morejón *et al.*, 2014). Sin embargo, como excepción; el género *Ceratozamia* tiene resiliencia en las semillas por lo que pueden tardar hasta dos años en germinar, esperando condiciones adecuadas de humedad haciendo que las plantas de este género tengan las tasas de reclutamiento más bajas entre las cícadas

(Sánchez-Tinoco & Engleman, 2004); g) las raíces son usualmente suculentas y tuberosas, pueden formar sistemas secundarios que además de captar agua y nutrientes, anclan y dan soporte al tronco. Un tipo especial de raíz en ciertas cícadas es la coraloide, que contiene bacterias simbióticas del género *Nostoc*, las cuales pueden fijar el nitrógeno atmosférico lo que les permite sobrevivir en suelos carentes de nutrientes (Nicolalde-Morejón *et al.*, 2014; Goel & Khuraijam, 2015); también tienen raíces contráctiles, que llevan el ápice bajo la superficie del suelo, donde queda protegido contra las consecuencias de la sequía y de incendios (CITES, 2003).

Es difícil calcular la esperanza de vida global de las cícadas. Sin embargo, las estimaciones sobre la longevidad de estas plantas en la naturaleza varían desde 125 años como en *Encephalartos villosus* (Donaldson, 1995), a 2,000 años en algunos individuos (>3 m de alto) de *Dioon edule* (Vovides, 1990).

Las cícadas conforman uno de los grupos de plantas más amenazados del mundo, la mayoría se encuentran catalogadas como "Amenazadas" o en "Peligro de Extinción" (Donaldson, 2003). Por ello, muchas de estas especies están incluidas en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2012) y en la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES, 2003) (Mayett, *et al.*, 2014). Estas plantas generan gran interés científico y comercial, este último debido a sus características ornamentales. Presentan alto valor comercial en mercados internacionales y son objeto de un mercado ilegal basado en el saqueo de plantas y semillas silvestres (INE-SEMARNAP, 2000). Un gran número de especies (52%) están en amenaza de extinción en la naturaleza y las dos principales causas son la destrucción del hábitat y el ya mencionado, comercio ilegal (CITES, 2003).

3.3 Estado actual de las cícadas mexicanas

En México se distribuye un total de 61 especies de la familia Zamiaceae, lo cual representa el 17% de la diversidad del orden Cycadales, colocando a México en el segundo lugar a nivel mundial en

diversidad de este grupo, solo después de Australia. De este total, 30 especies corresponden al género *Ceratozamia*, 14 a *Dioon* y 17 a *Zamia* (Calonje *et al.*, 2017). El porcentaje de endemismo en México es de 88.9%; de 61 especies que habitan en el territorio mexicano, 48 son endémicas distribuidas principalmente en el sureste mexicano, con una riqueza mayor en los estados de Veracruz, Chiapas y Oaxaca (cuadro 1) (Nicolalde-Morejón *et al.*, 2014).

Cuadro 1. Lista de especies de la familia Zamiaceae en México, distribución y regiones biogeográficas. P: en peligro de extinción, A: amenazadas, Pr: protección especial; E: endémicas y NE: no endémicas (modificado de SEMARNAT, 2010; Nicolalde-Morejón *et al.*, 2014).

No	Especie	Distribución	Estado	Nom-059-
1	<i>Ceratozamia alvarezii</i> Pérez-Farr. Vovides <i>et</i> Iglesias	E	Chiapas	P
2	<i>C. becerrae</i> Pérez-Farr., Vovides <i>et</i> Schutzman	E	Chiapas, Tabasco	A
3	<i>C. brevifrons</i> Miq.	E	Veracruz	--
4	<i>C. chimalapensis</i> Pérez-Farr. <i>et</i> Vovides	E	Oaxaca	P
5	<i>C. decumbens</i> Vovides, Avendaño, Pérez-Farr. <i>et</i> Gonz.-Astorga	E	Veracruz	P
6	<i>C. euryphyllidia</i> Vázq.Torres, Sabato <i>et</i> D.W. Stev.	E	Oaxaca, Veracruz	P
7	<i>C. fuscoviridis</i> Moore	E	Hidalgo	--
8	<i>C. hildae</i> G.P. Landry <i>et</i> M.C.Wilson	E	Querétaro, San Luis Potosí	A
9	<i>C. huastecorum</i> Avendaño, Vovides <i>et</i> Cast.-Campos	E	San Luis Potosí, Veracruz	A
10	<i>C. kuesteriana</i> Regel	E	Tamaulipas	P
11	<i>C. latifolia</i> Miq.	E	Hidalgo, Querétaro, San Luis Potosí	P
12	<i>C. matudae</i> Lundell	NE	México (Chiapas) y Guatemala	P
13	<i>C. mexicana</i> Brongn.	E	Puebla, Veracruz	A
14	<i>C. miqueliana</i> H. Wendl.	E	Chiapas, Tabasco, Veracruz	P
15	<i>C. mirandae</i> Vovides, Pérez-Farr. <i>et</i> Iglesias	E	Chiapas	P
16	<i>C. mixeorum</i> Chemnick, T.J. Greg. <i>et</i> Salas-Mor.	E	Oaxaca	P
17	<i>C. morettii</i> Vázq.Torres <i>et</i> Vovides	E	Veracruz	P
18	<i>C. norstogii</i> D.W. Stev.	E	Chiapas, Oaxaca	P
19	<i>C. robusta</i> Miq.	NE	México (Chiapas) y Guatemala	A

20	<i>C. sabatoi</i> Vovides, Vázquez-Torres, Schutzman et Iglesias	E	Hidalgo, Querétaro	A
21	<i>C. santillanii</i> Pérez-Farr. et Vovides	E	Chiapas	--
22	<i>C. vovidesii</i> Pérez-Farr. et Iglesias	E	Chiapas	P
23	<i>C. whitelockiana</i> Chemnick et T.J. Greg.	E	Oaxaca	P
24	<i>C. zaragozae</i> Medellín-Leal	E	San Luis Potosí	P
25	<i>C. zoquorum</i> Pérez-Farr., Vovides et Iglesias	E	Chiapas	P
26	<i>Dioon angustifolium</i> Miq.	E	Nuevo León, Tamaulipas	P
27	<i>D. argenteum</i> T.J. Greg., Chemnick, Salas-Mor. et Vovides	E	Oaxaca	P
28	<i>D. califanoi</i> De Luca et Sabato	E	Oaxaca, Puebla	P
29	<i>D. caputoi</i> De Luca, Sabato et Vázquez-Torres	E	Puebla	P
30	<i>D. edule</i> Lindl.	E	Hidalgo, Querétaro, San Luis Potosí, Veracruz	P
31	<i>D. holmgrenii</i> De Luca, Sabato et Vázquez-Torres	E	Oaxaca	P
32	<i>D. merolae</i> De Luca, Sabato et Vázquez-Torres	E	Chiapas, Oaxaca	P
33	<i>D. purpusii</i> Rose	E	Oaxaca	P
34	<i>D. rzedowskii</i> De Luca, A. Moretti, Sabato et Vázquez-Torres	E	Oaxaca	P
35	<i>D. sonorensis</i> (De Luca, Sabato et Vázquez-Torres) Chemnick, T.J. Greg. et Salas-Mor.	E	Sinaloa, Sonora	P
36	<i>D. spinulosum</i> Dyer ex Eichler	E	Oaxaca	P
37	<i>D. stevensonii</i> Nic.-Mor. et Vovides	E	Guerrero, Michoacán	--
38	<i>D. tomasellii</i> De Luca, Sabato et Vázquez-Torres	E	Durango, Jalisco, Nayarit	P
39	<i>Zamia cremnophila</i> Vovides, Schutzman et Dehgan	E	Tabasco	P
40	<i>Z. fischeri</i> Miq.	E	Hidalgo, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas	P
41	<i>Z. furfuracea</i> L.f.	E	Veracruz	Pr
42	<i>Z. grijalvensis</i> Pérez-Farr. Vovides et Martínez-Camilo	E	Chiapas	--
43	<i>Z. herrerae</i> S. Calderón et Standl.	NE	México (Chiapas), Guatemala y El Salvador	P
44	<i>Z. inermis</i> Vovides, J.D. Rees et Vázquez-Torres	E	Veracruz	P
45	<i>Z. katzeriana</i> (Regel) E. Rettig	E	Chiapas, Tabasco, Veracruz	P

46	<i>Z. lacandona</i>	Schutzman <i>et</i> Vovides	E	Chiapas	P
47	<i>Z. loddigesii</i>	Miq.	E	Chiapas, Hidalgo, Oaxaca, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz	A
48	<i>Z. paucijuga</i>	Wieland	E	Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca	Pr
49	<i>Z. prasina</i>	W. Bull	NE	México (Chiapas, Quintana Roo, Tabasco, Yucatán) y Guatemala	Pr
50	<i>Z. purpurea</i>	Vovides, J.D. Rees <i>et</i> Vázq. Torres	E	Oaxaca, Veracruz	P
51	<i>Z. soconuscensis</i>	Schutzman, Vovides <i>et</i> Dehgan	E	Chiapas	P
52	<i>Z. spartea</i>	A. DC.	E	Oaxaca	P
53	<i>Z. variegata</i>	Warsz.	NE	México (Chiapas) y Guatemala	Pr
54	<i>Z. vazquezii</i>	D.W. Stev., Sabato <i>et</i> De Luca	E	Veracruz	P

En México 50 de las 61 especies registradas, se encuentran incluidas en la NOM- 059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010). Se ha formulado el Programa Nacional de Cícadas (PNC), cuyo objetivo principal es la conservación, recuperación, manejo y aprovechamiento sustentable de estas plantas. El PNC presenta cinco acciones generales: 1) plantear medidas de protección por especie; 2) fomentar las UMAS, que son instrumentos para la conservación y el aprovechamiento de la vida silvestre, incorporando el trabajo de las comunidades; 3) capacitar a las autoridades encargadas de la vigilancia y la protección de la vida silvestre; 4) difundir la importancia de las cícadas entre el público en general; 5) incrementar el conocimiento científico de estas plantas. Este programa reconoce que es importante establecer estrategias estatales de conservación (INE-SEMARNAP, 2000).

El primer vivero para la gestión sostenible de cícadas se puso en marcha en 1990, destinado a una población de *Dioon edule* en Monte Oscuro, distrito de Chavarillo, Veracruz. La comunidad acordó establecer en Monte Oscuro un vivero utilizando semillas recolectadas en la naturaleza, en el entendimiento de que se utilizaría para a) conservar el hábitat natural como fuente de semillas, y b)

reintroducir las plantas producidas en el vivero para compensar la retirada de semillas. Como resultado, se han conservado unas 80 hectáreas de hábitat de selva baja caducifolia (CITES, 2003).

3.3.1 Cícadras en San Luis Potosí

Los climas predominantes en San Luis Potosí son el seco y semiseco ya que representan el 71% de la superficie del estado. La temperatura media anual es de 21°C (INEGI, 2002). La riqueza de cícadras en el estado; incluye un total de seis especies: *Ceratozamia hildae* G. P. Landry et M.C. Wilson, *C. huastecorum* Avendaño, Vovides et Cast.-Campos, *C. latifolia* Miq., *C. zaragozae* Medellín-Leal, *Dioon edule* Lindl. y *Zamia fischeri* Miq., siendo *C. zaragozae* y *C. huastecorum* endémicas del estado (Nicolalde-Morejón et al., 2014).

3.4 Estudios genéticos en cícadras

Entender la variación genética dentro y entre poblaciones es esencial para establecer medidas de conservación efectivas. Muchos aspectos de la biología de la conservación, tales como la pérdida de diversidad genética en programas de conservación y la restauración de poblaciones en peligro, pueden ser abordados con ayuda de estudios detallados de la genética de poblaciones (Hamrick & Godt, 1996a). De manera general, las cícadras presentan niveles altos de diferenciación genética (F_{ST}), lo que se ha asociado a lo restringido de su dispersión y polinización. De esta forma, la estructura y distribución de alelos depende tanto de características microambientales que favorecen el reclutamiento a nivel de paisaje, como la historia de conectividad entre fragmentos de vegetación a nivel biogeográfico (Octavio-Aguilar et al., 2009). Esto también se traduce en niveles altos de endogamia, con pérdida de heterocigosis observada (H_O) respecto a heterocigosis esperada (H_E). Sin embargo, esto no es una constante para las cícadras a nivel mundial (cuadro 2).

Se han realizado numerosos estudios para evaluar la diversidad y estructura genética de las cícadras mexicanas, encontrando que la familia Zamiaceae en el nuevo mundo (*Zamia*, *Ceratozamia* y *Dioon*), en general, tiene mayor diversidad genética que las cícadras del resto del mundo. Además,

existe una mayor conectividad entre las zonas de distribución (corredores, reservas, etc.), lo que se traduce en una menor diferenciación (cuadro 2). Aunque para el género *Ceratozamia* existen pocos estudios genético-poblacionales. Para las especies del género *Dioon* la diversificación de las especies actuales se estima hace 15.4 Ma (Condamine *et al.*, 2015), aunque se sugiere que algunas especies surgieron hace 10,000 años (González-Astorga *et al.*, 2003, 2005), lo que explicaría en gran medida los niveles de variabilidad altos y diferenciación genética baja de este grupo (figura 2), aún cuando el género se considere basal para el clado americano, con una divergencia estimada en más de 90 Ma.

Cuadro 2. Lista de trabajos realizados sobre la diversidad y estructura genética de cícadas. H_O : heterocigosis observada; H_E : heterocigosis esperada; F_{ST}/G_{ST} : índice de diferenciación genética entre poblaciones. Se integran los indicadores de diversidad promedio \pm DE por taxa.

No	Especie	H_E	H_O	F_{ST}/G_{ST}	M	Referencia
1	<i>Cycas panzhihuensis</i>	0.061	--	0.139	A/I	(Chao-Luan <i>et al.</i> , 1999)
2	<i>C. taitungensis</i>	0.039	0.021	0.051	A/I	(Huang <i>et al.</i> , 2004)
3	<i>C. seemanii</i>	0.057	0.047	0.594	A/I	(Keppel, 2002)
4	<i>C. pectinata</i>	0.076	0.066	0.387	A/I	(Yang & Meerow, 1996)
5	<i>C. parvula</i>	0.053	--	0.097	ISSR	(Xiao <i>et al.</i> , 2005)
6	<i>C. guizhouensis</i>	0.059		0.139	ISSR	(Xiao <i>et al.</i> , 2004)
7	<i>C. siamensis</i>	0.134	0.114	0.291	A/I	(Yang & Meerow, 1996)
8	<i>C. balansae</i>	0.130	--	0.4	ISSR	(Xiao <i>et al.</i> , 2005)
9	<i>C. micronesica</i>	0.545	0.349	0.323	SSR	(Cibrián-Jaramillo <i>et al.</i> , 2010)
10	<i>C. multipinnata</i>	0.497	0.387	0.295	SSR	(Gong <i>et al.</i> , 2015)
11	<i>C. debaoensis</i>	0.484	0.389	0.114	SSR	(Gong & Gong, 2016)
12	<i>C. simplicipinna</i>	0.447	0.394	0.261	SSR	(Feng <i>et al.</i> , 2014)
	Prom. \pm D. E.	0.22\pm0.2	0.21\pm0.17	0.26\pm0.16		
13	<i>Dioon holmgrenii</i>	0.17	0.204	0.069	A/I	(González-Astorga <i>et al.</i> , 2008)
14	<i>D. angustifolium</i>	0.218	0.215	0.167	A/I	(González-Astorga <i>et al.</i> , 2005)

15	<i>D. tomasellii</i>	0.295	0.309	0.145	A/I	(González-Astorga <i>et al.</i> , 2008)
16	<i>D. edule</i>	0.386	0.323	0.148	A/I	(Octavio-Aguilar <i>et al.</i> , 2009)
17	<i>D. sonorensis</i>	0.314	0.33	0.151	A/I	(González-Astorga <i>et al.</i> , 2008)
18	<i>D. caputoi</i>	0.35	0.49	0.096	A/I	(Cabrera-Toledo <i>et al.</i> , 2008)
19	<i>D. merolae</i>	0.446	0.713	0.07	A/I	(Cabrera-Toledo <i>et al.</i> , 2010)
	Prom. ± D. E.	0.31±0.09	0.37±0.18	0.12±0.04		
20	<i>Ceratozamia mexicana</i>	0.235	--	0.185	ISSR	(Rivera-Fernández, 2012)
21	<i>C. kuesteriana</i>	0.403	--	0.157	ISSR	(Montelongo-Ruiz, 2016)
22	<i>C. fuscoviridis</i>	0.74	0.77	0.127	SSR	(García-Montes, 2017)
	Prom. ± D. E.	0.34±0.39	0.55±0.28	0.14±0.04		
23	<i>Microcycas calocoma</i>	0.17	0.2	0.337	A/I	(Pinares <i>et al.</i> , 2009)
	Prom. ± D. E.	--	--	--		
24	<i>Zamia lacandona</i>	0.216	--	0.108	A/I	(González-Astorga <i>et al.</i> , 2008; Pinares <i>et al.</i> , 2009)
25	<i>Z. loddigesii</i>	0.266	0.263	0.179	A/I	(González-Astorga <i>et al.</i> , 2006)
26	<i>Z. katzeriana</i>	0.298	--	0.191	A/I	(González-Astorga <i>et al.</i> , 2008; Pinares <i>et al.</i> , 2009)
27	<i>Z. variegata</i>	0.355	--	0.085	A/I	(González-Astorga <i>et al.</i> , 2008; Pinares <i>et al.</i> , 2009)
28	<i>Z. cremnophila</i>	0.429	--	0.174	A/I	(González-Astorga <i>et al.</i> , 2008; Pinares <i>et al.</i> , 2009)
29	<i>Z. purpurea</i>	0.485	--	0.025	A/I	(González-Astorga <i>et al.</i> , 2008; Pinares <i>et al.</i> , 2009)
30	<i>Z. lucayana</i>	0.49	0.483	0.067	SSR	(Calonje <i>et al.</i> , 2013)
	Prom. ± D. E.	0.36±0.11	0.37±0.19	0.12±0.06		
31	<i>Macrozamia parcifolia</i>	0.037	0.02	0.09	A/I	(Sharma <i>et al.</i> , 1998)
32	<i>M. communis</i>	0.045	--	0.27	A/I	(Ellstrand <i>et al.</i> , 1990)
33	<i>M. heteromera</i>	0.061	0.049	0.1	A/I	(Sharma <i>et al.</i> , 1999)
34	<i>M. pauli-guilielmi</i>	0.081	0.043	0.03	A/I	(Sharma <i>et al.</i> , 1998)
35	<i>M. plurinervia</i>	0.111	0.08	0.35	A/I	(Sharma <i>et al.</i> , 2004)

36	<i>M. riedlei</i>	0.263	--	0.274	A/I	(Byrne & James, 1991)
	Prom. ± D. E.	0.10±0.08	0.03±0.03	0.19±0.13		
<hr/>						
	Cycadaceae	0.22±0.21	0.21±0.17	0.26±0.16		
	Zamiaceae	0.30±0.18	0.33±0.26	0.15±0.09		
	Cycadales	0.27±0.19	0.29±0.23	0.18±0.12		
<hr/>						

M: Marcador; A/I: aloenzimas/isoenzimas.

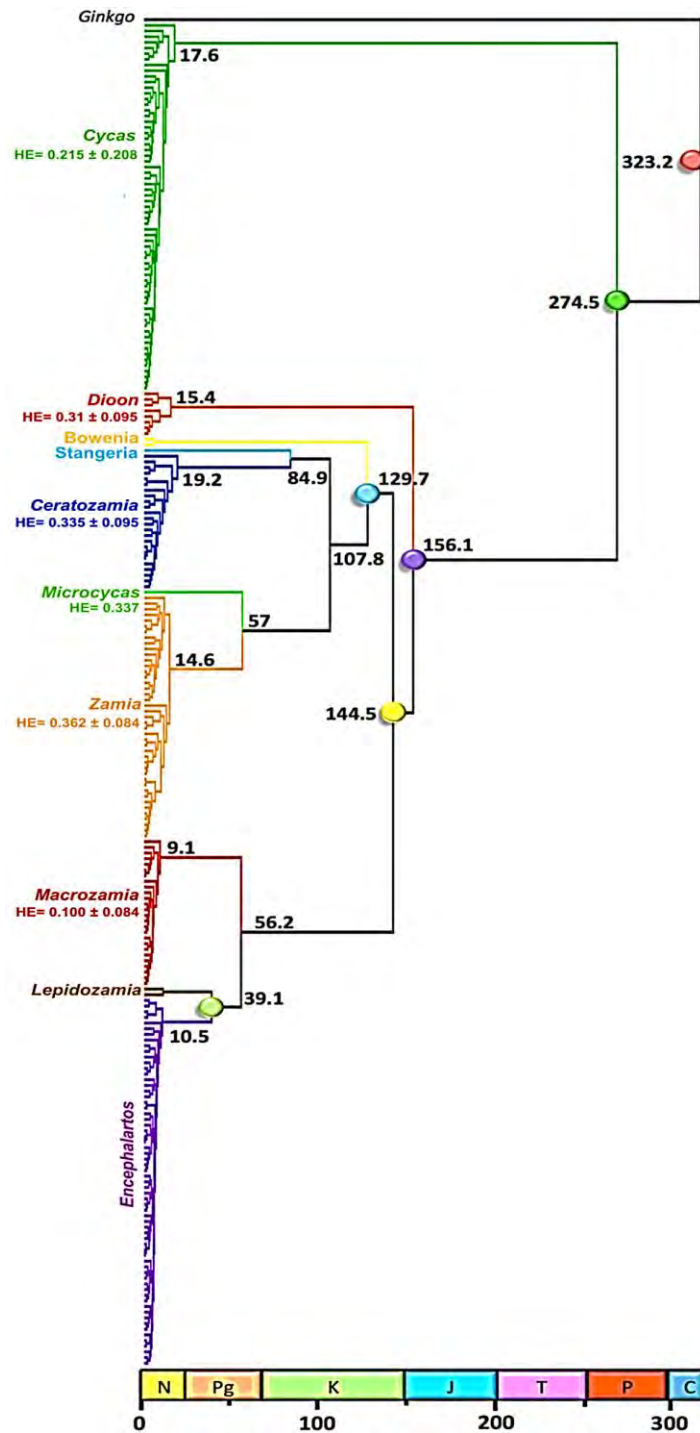


Figura 2. Filogenia de Cycadales calibrada por seis registros fósiles. Inferencia Bayesiana obtenida bajo el modelo “birth-death prior”. Los valores mostrados en los nodos constituyen el promedio de divergencia entre clados estimado en millones de años. C: Carbonífero; P: Pérmico; T: Triásico; J: Jurásico; K: Cretácico, Pg: Paleógeno; N: Neógeno; H_E : Heterocigosis esperada promedio por clado (modificado de Condamine *et al.*, 2015).

Por otra parte, se estima que el género *Ceratozamia* surgió hace 84.9 Ma, mientras que la divergencia de las especies actuales comenzó hace aproximadamente 19.2 Ma (figura2) (Condamine *et al.*, 2015), lo anterior tiene una asociación directa con la variación genética dentro del género y responde en gran medida a la variación ambiental-geográfica. Estudios filogenéticos para *Ceratozamia* han mostrado divergencias asociadas con procesos de aislamiento biogeográfico. Por ejemplo, en los clados basales de la filogenia (figura 3, A y B, [1b y 2b]), se encuentran especies distribuidas al sur y sureste la Faja Volcánica Transmexicana, zona considerada como un refugio del Pleistoceno; mientras que en el clado más derivado (figura 3, A y B, [1a y 2a]), donde se ubica *C. zaragozae*, se encuentran especies con distribución al norte y noreste de la faja (González & Vovides, 2002; 2012), la cual se originó en el Plioceno-Cuaternario (Marshall & Liebherr, 2000).

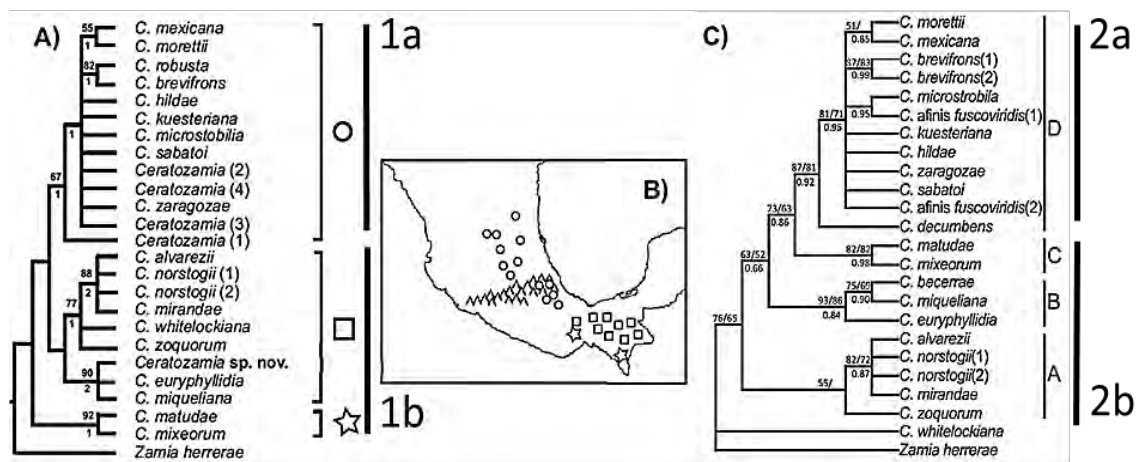


Figura 3. A) Cladograma obtenido por González & Vovides (2002), B) representación de la ubicación geográfica de los principales clados obtenidos por González & Vovides (2002) y C) Cladograma obtenido por González & Vovides (2012).

Para entender el proceso de especiación que ha sucedido en el género *Ceratozamia*, es necesario combinar el conocimiento de la genética de poblaciones con los estudios sobre la distribución de las especies y la historia del paisaje, pues conduce a una mejor comprensión de cómo los procesos históricos han moldeado la diversidad y estructura genética de las especies (Cordellier & Pfenninger, 2009; McKay *et al.*, 2010; Rebernig *et al.*, 2010). De igual forma, determinar cuanta diversidad genética hay en una especie y explicar esto en términos de su origen,

organización y mantenimiento es fundamental para la conservación (Yeh, 2000). En este sentido, se sabe que los ciclos climáticos en el pasado, particularmente en último máximo glacial (LGM), hace 23,000 a 18,000 años, tuvieron un gran impacto en la estructura y los niveles de diversidad genética de muchas especies actuales (Hewitt, 2004). La hipótesis de los refugios del Pleistoceno en regiones tropicales implica que, en un ambiente globalmente más seco y frío, pequeñas áreas se beneficiaron de condiciones locales con mayor humedad debido a la heterogeneidad topográfica, lo cual protegió a los relictos de selvas tropicales (Haffer & Prance, 2001) donde muchas especies sobrevivieron (Toledo, 1982; Taberlet *et al.*, 1998; Provan & Bennett, 2008). Se llevó a cabo un consenso sobre la existencia de refugios florísticos y faunísticos de gran edad al sur de México (Brown, 1976; Toledo, 1982; 1988). Al respecto, el género *Ceratozamia* parece haber estado presente en la flora del Mioceno en la región meridional de Pichucalco, Chiapas (Palacios & Rzedowski, 1993). Se ha propuesto que, debido a los cambios climáticos durante el Pleistoceno, algunos miembros de *Ceratozamia* sobrevivieron al sur de la Faja Volcánica Transmexicana, donde están concentrados los clados basales y la mayor diversidad del género. Sin embargo, estos refugios estuvieron aparentemente ausentes en las zonas al norte de este, concluyendo entonces que el género *Ceratozamia* probablemente se originó al sur/sureste de México y las especies al norte/noreste son resultado de especiaciones recientes posteriores, hace menos de 10,000 años (González & Vovides, 2002).

3.5 Especie de estudio: Ceratozamia zaragozae

Ceratozamia zaragozae Medellín-Leal (Zamiaceae), es una cícada endémica de San Luis Potosí nombrada en honor del General Ignacio Zaragoza. Fue descrita por Fernando Medellín-Leal en 1963 a partir de varios individuos recolectados en la Sierra de la Equilateria (Pico del Agujón), a unos 30 kilómetros al sureste de Rio Verde, San Luis Potosí, México. Esta era la única localidad donde se había ubicado a la especie, estimando una distribución limitada a 45 km² con una ocupación menor de 10 km². En toda esa superficie se contabilizaron tan solo 50 individuos, ya que

una gran cantidad de plantas fueron extraídas de su hábitat natural durante la década de los ochentas del siglo pasado, erradicando poblaciones enteras. Se desconoce la ubicación actual de los individuos comercializados por los pobladores, por lo que su estatus de conservación corresponde a “Peligro Crítico” de acuerdo con la lista de la IUCN (Medellín-Leal, 1963; Chemnick & Gregory, 2010).

3.5.1 Descripción

Se trata de una planta con un tronco hipogeo ocasionalmente ramificado, ovoide a sub-cilíndrico de 9 a 20 cm de alto y 9 a 11 cm de diámetro. Sus hojas tienen 20 a 95 cm de largo y 16 a 43 cm de ancho, sus peciolo son inermes y lisos. Sus foliolos son linear lanceolados, ligeramente falcados de 5 a 20 cm de largo y de 3 a 10 mm de ancho ubicados en verticilos. Tienen un microstróbilo solitario de 10 a 20 cm de largo y 2 a 3 cm de ancho. El megastróbilo tiene 8 a 12 cm de ancho y 6 a 7 cm de diámetro (Medellín-Leal, 1963, Whitelock, 2002). La especie con mayor similitud morfológica es *Ceratozamia norstogii* distribuida al noreste de Chiapas (Pérez-Farrera *et al.*, 2001) (figura 5).



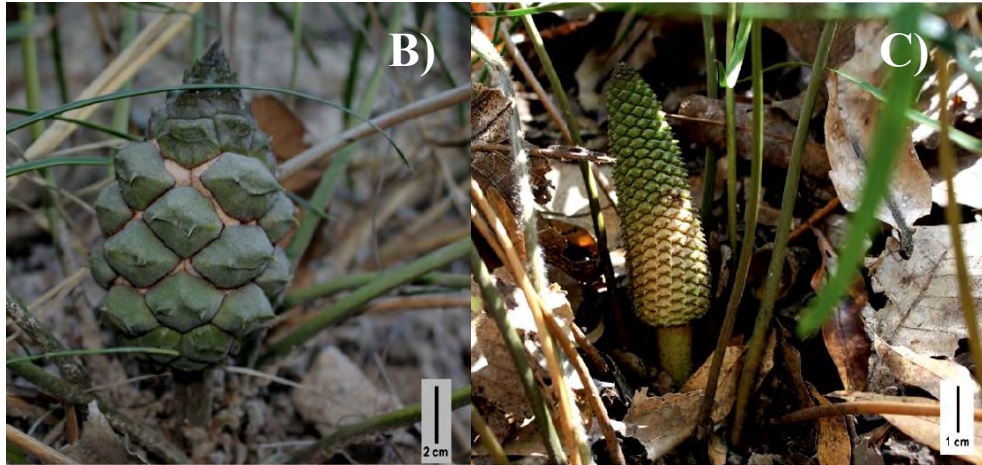


Figura 4. A) Individuo adulto de *Ceratozamia zaragozae* (fotografía tomada por: J. A. de Nova-Vázquez, 2014), B) macroestrobilo y C) microestrobilo (Tomado de Castillo-Lara *et al.*, 2017).

3.5.2 Estudios previos

González & Vovides (2002), realizaron un análisis filogenético del grupo monofilético *Ceratozamia* mediante secuencias de la región ITS y el gen de cloroplasto *trnL-F*, mostrando un complejo conformado por *Ceratozamia kuesteriana*, *C. microstrobila*, *C. sabatoi*, *C. hildae* y *C. zaragozae*, dichas especies se distribuyen al norte de la Faja Volcánica Transmexicana (figura 8 A y B). Posteriormente, se analizó citogenéticamente a las especies del complejo mostrando que comparten un mismo número cromosómico (16 n) y que la morfología foliar responde a adaptaciones a medios secos y subhúmedos en bosques de pino y pino-encino, con un incremento en la cutícula cerosa de los foliolos; por lo que el grupo comparte cierta afinidad en cuanto a su hábitat y adaptaciones, con foliolos más estrechos que el resto de las ceratozamias (Vovides *et al.*, 2004 a, b). Tratando de establecer el estatus taxonómico de las especies del complejo, se realizó una ampliación del estudio filogenético ingresando un nuevo marcador SCAR, sin embargo, el complejo se mantiene, separando únicamente a *C. microstrobila* como un clado independiente, ingresando al complejo a la especie descrita recientemente *C. fuscoviridis* (figura 3; González & Vovides, 2012).

Al usar un marcador hipervariable (AFLP) se separan dos complejos con afinidades ambientales, por un lado, se tiene el grupo *Ceratozamia alvarezii*, *C. sabatoi*, *C. zaragozae*, *C. kuesteriana*, *C. mexicana* y *C. robusta*, de las cuales, las cuatro primeras tienen foliolos angostos y

las dos últimas tiene foliolos significativamente más anchos. El segundo grupo formado con este tipo de marcadores corresponde a *C. zoquorum*, *C. miqueliana*, *C. latifolia*, *C. microstrobila*, *C. hildae* y *C. morettii*, ubicadas más al sur de la distribución del género, con excepción de *C. hildae*; todas con afinidades tropicales. Toda esta información nos muestra que las especies del género se segregan biogeográficamente, con adaptaciones foliares para sitios secos al norte y para sitios húmedos al sur (De Castro *et al.*, 2006). En particular para *C. zaragozae*, los estudios se limitan a la caracterización estructural de las poblaciones mostrando bajo reclutamiento y dispersión limitada (Castillo-Lara *et al.*, 2017).

4. JUSTIFICACIÓN

Ceratozamia zaragozae es una cícada que se encuentra en "Peligro Crítico" de acuerdo con la IUCN, ya que solo se tenía conocimiento de una población, ubicada en un área de distribución limitada a 45 km² y una ocupación menor de 10 km². Sin embargo, en un trabajo previo se localizaron además de la población tipo, otras cinco poblaciones, aumentando el área de distribución total a 113.8 km². A pesar de estos nuevos registros, se desconocen los niveles de variación y estructura genética de la especie, así como las fuerzas evolutivas involucradas en la distribución y mantenimiento de la variación genética. Dentro de sus amenazas principales en el medio silvestre están, la recolección excesiva de plantas, siendo esta la causa de erradicación de la especie en ciertas áreas; así como la disminución de su hábitat natural por cambio en el uso del suelo, cambio climático y restricción del hábitat.

5. HIPÓTESIS

Las cícadas son plantas longevas, dioicas y con dispersión limitada. La mayoría de especies presentan diferenciación alta y variabilidad genética baja. Sin embargo, en algunas especies se han

encontrado niveles de variabilidad altos y diferenciación genética baja. Siendo entonces los niveles de variación y estructura genética determinados por características intrínsecas a las especies. En *Ceratozamia zaragozae*, a pesar de que se localizaron más poblaciones, dos de ellas (Cerro la Calavera y Arroyo Moctezuma) tienen un tamaño poblacional pequeño y en la población tipo (Pico del Agujón), se reportaron saqueos hace 30 años.

Considerando lo anterior, es probable que en estas poblaciones exista una pérdida significativa de variabilidad genética por efecto de un cuello de botella y endogamia posterior, siendo las poblaciones restantes las que presentarían mayor variación genética. Además, se espera un patrón de aislamiento por distancia debido a la dispersión restringida y las distancias geográficas entre cada población.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los niveles de variabilidad y la estructura genética de *Ceratozamia zaragozae*, mediante el uso de marcadores moleculares SSR; con el fin de establecer el estado de conservación de las poblaciones en el estado de San Luis Potosí, México.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

- Calcular las frecuencias alélicas, el promedio de alelos por locus/población, el número efectivo de alelos por locus/población, el índice informativo por locus/población, las heterocigosis observadas y esperadas, así como el coeficiente de fijación; con el fin de establecer los niveles de variabilidad genética de *Ceratozamia zaragozae*.
- Evaluar la distribución de la variabilidad genética dentro y entre las poblaciones, calculando los índices de diferenciación/endogamia, las distancias de Nei, así como con análisis de varianza molecular, agrupamiento, asignación bayesiana, ordenamiento y regresión

geográfica-genética; para determinar cómo está dada la estructura genética y el posible flujo genético entre poblaciones.

- Evaluar el efecto de la reducción poblacional mediante un análisis de cuellos de botella y compararlo con la variación encontrada.
- Determinar si algún locus se encuentra bajo selección natural con una prueba de neutralidad; de ser el caso, determinar los alelos con mayor y menor frecuencia de cada locus bajo selección, el posible tipo de selección y que poblaciones presentan una presión selectiva mayor.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Sitio de estudio

El trabajo se llevó a cabo en la sierra de la Equilateria en donde se realizaron recorridos considerando los tipos de vegetación asociados con la presencia de la especie y reportes previos de los pobladores que realizaron recolección y ventas masivas de individuos durante la década de los ochentas del siglo pasado. En las zonas donde se detectó la presencia de la especie se realizaron cuadrantes de 200 m² donde se ubicó espacialmente, mediante coordenadas XY a todos los individuos.

Además de la localidad tipo ubicada en el Pico del Agujón, se ubicaron otras cinco poblaciones en un área de distribución que abarca un total de 113.8 km², incluyendo los 45 km² reportados por Chemnick & Gregory (2010). El polígono de distribución se ubica entre los 11 y 60 km al oeste de Rio Verde y de los 36 a los 108 km al sureste de San Luis Potosí (figura 6), con una altitud entre 1,600 a 2,350 ms.n.m. Las poblaciones se ubican en las localidades de: Área Natural Protegida (ANP) Parque Nacional el Potosí (PNP), Arroyo Moctezuma, Ejido Alamitos, Sierra del Camarón, Pico del Agujón (localidad tipo) y Cerro la Calavera (Rancho San Rafael). La pendiente

promedio de las localidades donde se encuentra la planta es de $52.5 \pm 24.1^\circ$, la cobertura vegetal promedio de los sitios es de $74.165 \pm 14.14\%$. Dada su condición y por consiguiente su alta susceptibilidad a la recolección inmoderada, se omite la ubicación geográfica exacta de los sitios de estudio.

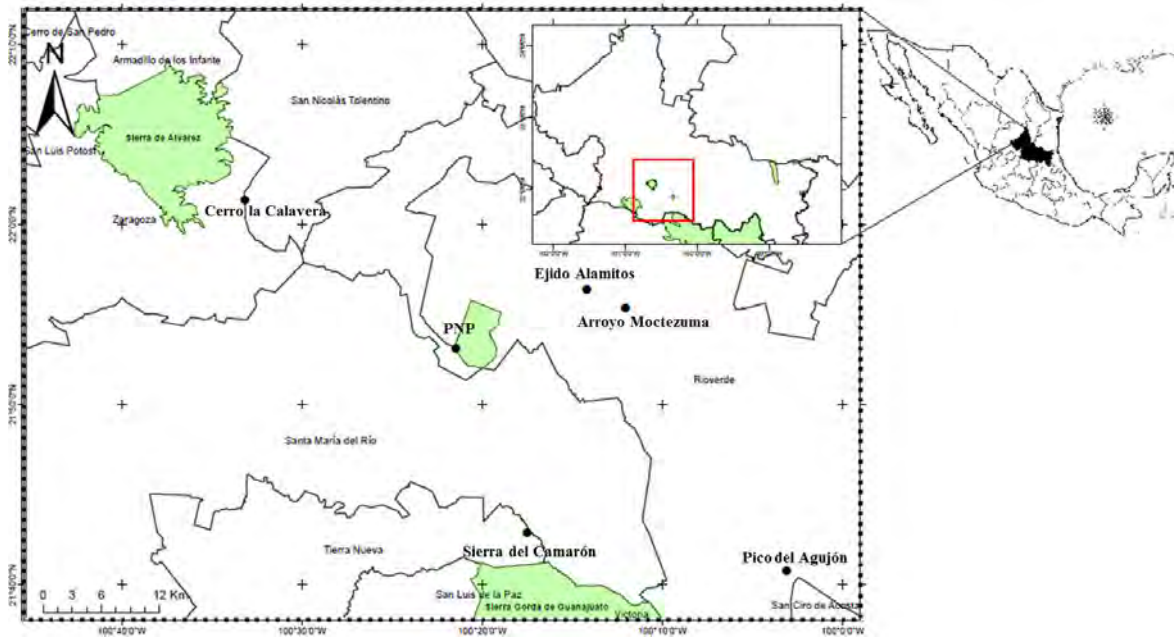


Figura 5. Polígono de muestreo donde se localizan las seis poblaciones de *Ceratozamia zaragozae* en el estado de San Luis Potosí (elaborado por: J. A. de Nova-Vázquez).

8.2 Obtención de material biológico

Se tomaron muestras de tejido foliar fresco en bolsas plásticas herméticas conteniendo 1 g de sílica gel, para evitar la proliferación de hongos. Este material se transportó en hieleras hasta el Herbario Isidro Palacios del Instituto de Investigación en Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí; donde se resguardaron a -20°C . El material fue transportado posteriormente al Laboratorio de Genética del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, donde se realizó la extracción.

8.3 Extracción de DNA

Para la extracción del DNA se utilizó el protocolo modificado de Doyle & Doyle (1987). Este método combina procesos químicos, físicos y mecánicos e incluye básicamente tres pasos: a) lisis celular; b) eliminación de proteínas y c) precipitación y limpieza del DNA (Falcón & Valera, 2007).

El método consiste en la maceración con nitrógeno líquido de tejido foliar, el cual fue previamente desinfectado con etanol al 70%, posteriormente se agregó 1 ml de buffer CTAB 2X (2% de CTAB, 1.4 M de NaCl, 20 mM de EDTA, y 100 mM de tris-HCL), además de 0.8 µl de 2-β-mercaptoetanol, se homogeneizó y se recuperó en un microtubo de 2 ml, incubándose a 60°C durante 20 min. Se centrifugó durante 8 min a 8,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió con 1 ml del buffer CTAB 2X sin 2-β-mercaptoetanol, se agitó con vortex, posteriormente se centrifugó durante 8 min a 9,000 rpm y se repitió el paso. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió con 600 µl de CTAB 2x y 20 µl RNAsa (1 mg/ml) dejando en incubación a 37°C durante 1 hr 30 min, posteriormente se agregaron 20 µl proteinasa k (1 mg/ml) incubándose a 60 °C durante 1 hr 30 min. Se agregaron 600 µl de cloroformo:octanol (24:1) esto se homogenizó perfectamente y se centrifugó durante 10 min a 10,000 rpm, en esta ocasión se tomó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo al cual se le agregaron 2/3 del volumen final de isopropanol frío para precipitar el DNA y se dejó reposar aproximadamente 12 horas a -20°C. Se centrifugó durante 10 min a 12,000 rpm, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante para evitar perder la pastilla de DNA, la cual fue lavada con 1 ml de etanol al 100 % y centrifugada durante 10 min a 15,000 rpm, eliminando el etanol cuidadosamente sin perder la pastilla, se repitió el paso ahora con etanol al 70%. Una vez que el DNA estuvo completamente seco se agregaron 100 µl de agua ultra pura estéril. Las muestras se congelaron a -20°C.

Se realizó un tratamiento posterior con el fin de garantizar la pureza del DNA, este consistió en agregar 300 µl de agua destilada ultra pura estéril, más 400 µl de una solución de cloroformo:isoamílico (24:1), se homogenizó y se centrifugó durante 10 min a 10,000 rpm, el

sobrenadante se trasladó a un tubo nuevo, se agregaron 400 μ l de cloroformo:octanol se homogenizó y se centrifugó durante 10 min a 10,000 rpm, el sobrenadante se trasladó a un nuevo tubo. Se agregaron 65 μ l de acetato de sodio y posteriormente 2/3 del volumen final de isopropanol frío para precipitar el DNA, se dejó reposar aproximadamente 12 horas a -20°C . Se centrifugó durante 10 min a 12,000 rpm, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante para evitar perder la pastilla de DNA, la cual fue lavada con 1 ml etanol al 100% y centrifugada durante 10 min a 15,000 rpm, eliminando el etanol cuidadosamente sin perder la pastilla y se repitió el paso ahora con etanol al 70%. Una vez que el DNA estuvo completamente seco se resuspendió en 100 μ l de agua ultra pura estéril. Las muestras se congelaron a -20°C .

Para determinar la pureza y calidad de las extracciones se realizó una cuantificación mediante un nano espectrofotómetro (Eppendorf) considerando la relación de Abs a 260 nm (correspondiente con la longitud de onda refractante para la molécula de DNA) dividida entre la Abs a 280 nm (longitud de onda refractante para las proteínas). Se considera aceptable un coeficiente entre 1.7 y 2. Además, se realizó una división entre la Abs a 260 nm sobre la Abs a 230 nm (longitud refractante para sales fenólicas) para determinar la pureza del DNA, el cociente debe ser mayor a 1.5 para considerarse aceptable (Bravo de la Garza *et al.*, 2012; Anexo 1). Finalmente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% a 90 V por dos horas para ver la integridad del DNA obtenido.

8.4 Amplificación

Se evaluaron 10 marcadores SSR (cuadro 3) propuestos por Meerow & Nakamura (2007). La mezcla de reacción para PCR fue de 1 μ l de MgCl_2 (C. I 25 mM, C. F 3 mM); 0.6 μ l del primer forward, 0.6 μ l del reverse (C. I 25 μ M, C. F 2 μ M); 0.16 μ l de dNTP's (C. I 10 mM, C. F 0.2 mM); 2.4 μ l de buffer (C. I 5 x, C. F 1.5 x); 0.1 μ l de Taq DNA polimerasa (C. I 5 U, C. F 0.5 U); 1.1 μ l de agua ultra pura estéril y finalmente se agregaron 2 μ l del DNA extraído (10-50 ng/ μ l) para un total de 8 μ l por tubo de reacción. Los tubos se colocaron en un termociclador de gradientes Arktik

de Thermo Scientific y se utilizaron los siguientes parámetros: desnaturalización inicial a 94°C por 2 min. Se consideraron 35 ciclos, cada uno con desnaturalización a 94°C por 30s, alineamiento a 55-67°C (optimizado acorde al iniciador, obtenido por gradiente) por 1 min y extensión a 72°C por 1 min. Extensión final a 72°C por 7 min. Se almacenaron a 4°C.

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de acrilamida 15% teñido con bromuro de etidio, revelado en un transiluminador UV con registro fotográfico para análisis posterior Anexo 2.

Cuadro 3. Secuencias de los *primers* y características de los 10 microsátélites. T_a= temperatura de alineamiento (adaptado de Meerow & Nakamura, 2007).

Locus	Primer Forward 5'-3'	Primer Reverse 5'-3'	Ta(°C)	Tipo de repetición	No. de alelos	Intervalo del tamaño de los alelos (bp).
Zam28	CAGGACAAAAGCATATAGGC	TTGGTTTGGTAGGTGATAGG	61	(GT) ₁₂	3	197-205
Zam29	GACTTCCTACCTAAAGATGCTA	TCCTGCTTACTTTAGATGCT	65	(AGT) ₁₅	5	188-245
Zam32	CCAACAAGATAGCAAGGGA	AGCATGTGTAACCTATAAAGGA	60	(GT) ₆ (GA) ₁₄	4	145-151
Zam33	CATGCTTGTTGACTTGAACCTA	TCCTTTCACACGTAATTATAAATCT	58	(CA) ₁₃	6	187-203
Zam34	AGCATCAAGGGACTATCAAC	TCAATGCCTCTAATACAAAAAAC	58	(CTT) ₉	4	198-219
Zam35	TGCATATACATATATACTCATGCAC	TCACTATGCACCTCACATACATAA	58	(TG) ₁₄ (TA)(TG) ₁₀	7	89-105
Zam39	TCACAAAATCTCAGCACCCC	TGAGTTAAACATGCGCCTCC	60	(GA) ₁₄	5	166-184
Zam40	CTTGGTACCTTCTCTCTATC	TGTTTGGCTTACCCCTGTTC	60	(AG) ₁₉	10	214-238
Zam41	GTAACAATCCCATTCCCAAG	AGTGCCAAACCTCCAAGAAG	67	(TG) ₇ G(GA) ₁₄	5	225-235
Zam45	CCTTAAAGAAGCTCGTAACTCC	TTCCCGAGATTATCCCTAGC	55	(GA) ₉	3	141-145

8.5 Análisis de datos

Los geles obtenidos para la visualización de los amplificadores se analizaron utilizando el programa Gel Analyzer (Lazar & Lazar, 2010), se capturó en una hoja de cálculo el tamaño en pares de bases (bp) de las bandas de cada individuo por cada marcador y de esta forma se creó una base de datos para los análisis estadísticos. El tamaño de los amplificadores, así como la presencia de alelos nulos, fue estandarizado de acuerdo con el método de Chybicki & Burezyk (2009), considerado un modelo de endogamia por individuo y un análisis de asignación del tamaño por agrupamiento.

8.5.1 Diversidad genética

Con el programa GenAlEx v.6.5 (Pekall & Smouse, 2012), se calcularon las frecuencias génicas (alélicas y genotípicas) de las poblaciones en cuestión con el fin de determinar el promedio de muestras amplificadas por locus/población (N), el promedio de alelos por locus/población (N_a), el número efectivo de alelos por locus/población (N_e), el índice informativo por locus/población (I), las heterocigosis observadas y esperadas (H_O y H_E respectivamente) y el coeficiente de fijación ($f = 1 - \frac{H_O}{H_E}$). Con base en estos datos se determinó si las poblaciones se encontraban en el equilibrio de Hardy-Weimberg (HW), de acuerdo con las diferencias significativas entre las frecuencias observadas y esperadas, se consideró una prueba de χ^2 modificada para esta comparación (Octavio-Aguilar *et al.*, 2009). Posteriormente, se estableció la cantidad de alelos exclusivos por población, medida indirecta de la fijación por deriva génica.

8.5.2 Estructura genética

La distribución de la variabilidad genética dentro y entre las poblaciones analizadas se evaluó, 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. Posteriormente se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA). Se establecieron las distancias de Nei para marcadores hipervariables con lo que se construyó un árbol de agrupamiento mediante el algoritmo UPGMA. En todos los casos se utilizó el mismo programa.

Se realizó un análisis de asignación con ayuda del programa STRUCTURE v. 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000), basado en 50,000 remuestreos realizados con 50,000 cadenas de Markov-Monte Carlo (MCMC), considerando $K = 2$ hasta $K = 12$ (Falush *et al.*, 2007). El modelo realizó 10 repeticiones por cada K para determinar la desviación estándar. Los grupos formados fueron evaluados de acuerdo con el método de Evanno *et al.* (2005) para determinar el límite adecuado de asignación, con ayuda del programa en línea, STRUCTURE HARVESTER (Earl & vonHoldt, 2012). Se corrigió la iteración por promedios usando el programa CLUMPP v 1.1.2 (Jakobsoon &

Rosenberg, 2007). Finalmente, los grupos genéticos obtenidos de la corrección se visualizaron con el programa Distruct v1.1 (Rosenberg, 2004).

Para comparar los grupos genéticos inferidos a partir del modelo bayesiano, que considera *a priori* el origen de los individuos bajo modelos regidos por el flujo génico, se generaron nuevos grupos mediante un Análisis Discriminante de Componentes Principales (ADCP). Este procedimiento considera una matriz de covarianza para establecer grupos independientes del origen (Jombart *et al.*, 2010), más afines a la similitud en las frecuencias alélicas. El procedimiento se realizó con el programa STATISTICA v.10 (StatSoft, 2011).

Finalmente, para determinar si había aislamiento por distancia, se realizó una prueba de Mantel considerando la matriz de distancias genéticas de Nei con respecto a una matriz de distancia geográficas, corregida por Jackknife, eliminando el extremo superior. Este análisis se realizó con el programa TFPGA v.1.3 (Miller, 1997).

8.5.3 Cuellos de botella

Se realizó el análisis considerando un modelo de islas infinitas (IIM) utilizando el programa Bottleneck v. 1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996). Este modelo asume un remuestreo de 1,000 permutaciones bajo el supuesto de equilibrio entre deriva y mutación, cuya consecuencia es una pérdida y/o ganancia aleatoria de alelos, independientemente del locus al que pertenecen y que en su conjunto se distribuyen bajo el modelo de Poisson. Una reducción reciente en el tamaño poblacional genera un incremento significativo, pero momentáneo; en la cantidad de loci con exceso de heterocigos. Contrario a esto, una reducción ancestral en el tamaño poblacional genera una pérdida significativa en la cantidad de genotipos heterocigos por la fijación aleatoria de alelos. En ambos casos, es posible identificar diferencias significativas en la distribución Poisson esperada mediante una prueba no paramétrica de Wilcoxon.

8.5.4 Selección natural

Se sabe que los SSR son secuencias de DNA constituidas por repeticiones en tándem, se caracterizan por ser altamente polimórficas, codominantes, homólogas para diferentes especies, géneros e incluso familias. Sin embargo, la característica más importante es que los microsatélites se distribuyen en regiones no codificantes (Golstein *et al.*, 1996). Históricamente, estas repeticiones en tándem han sido designadas como DNA no funcional, principalmente porque son altamente inestables (Gemayel *et al.*, 2012). Sin embargo, diversas publicaciones han presentado evidencia de que los microsatélites juegan un papel importante en procesos como, la regulación de la transcripción y traducción, la organización de la cromatina, el tamaño del genoma y el ciclo celular (Nevo, 2001; Li *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2013). Carneiro-Vieira *et al.* (2016) sugieren que la función biológica de un microsatélite está relacionada con su posición en el genoma.

Debido a que los microsatélites utilizados fueron diseñados para una especie de otro género (*Zamia*), aunque de la misma familia; no se tiene conocimiento de la ubicación exacta de los microsatélites en el genoma de *Ceratozamia zaragozae* y, por lo tanto, se desconoce si están ligados a regiones codificantes del genoma por proximidad. Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó una prueba de neutralidad de los marcadores mediante un análisis Markoviano considerando el modelo multinomial de Dirichlet (Bernard, 2005) utilizando el programa BayeScan v 2.1 (Foll & Gaggiotti, 2008). Este análisis permite identificar alelos con frecuencias alejadas a lo esperado por un modelo aleatorio de Poisson, lo anterior con el fin de determinar si algún marcador se encuentra bajo selección natural. A diferencia del análisis de cuellos de botella, las diferencias se encontrarían únicamente en un locus y no en la totalidad de los marcadores, dando lugar a una direccionalidad; por lo que este procedimiento se realiza locus por locus. El modelo fue realizado utilizando un número 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.

9. RESULTADOS

9.1 Diversidad genética

Los marcadores moleculares SSR mostraron un total de 62 alelos, en 10 loci, con longitudes entre 70 y 280 pares de bases (cuadro 4). Todos los loci presentan exogamia ($f = -0.375 \pm 0.036$), con alrededor de 2.797 ± 0.13 alelos efectivos, siendo los más informativos Zam28, Zam34, Zam39, Zam40, Zam41 y Zam45. Los loci con mayor heterocigosis, tanto observada como esperada fueron Zam40 y Zam41. Se presentó el 100% de polimorfismo para todos los loci (cuadro 4).

A nivel poblacional, Sierra del Camarón presentó mayor H_O seguido de Pico del Agujón. La población con menor H_O fue Cerro la Calavera. El Ejido Alamitos presentó el menor índice informativo ($I = 0.98 \pm 0.106$), pero el mayor nivel de exogamia ($f = -0.474 \pm 0.05$) (cuadro 5).

Cuadro 4. N: número de alelos registrados para los 10 loci analizados. bp: pares de bases; Na: número de alelos promedio por locus; Ne: número efectivo de alelos por locus; I: índice de Shannon; H_O : heterocigosis observada; H_E : heterocigosis esperada; f : coeficiente de fijación.

Locus	N	bp	Na	Ne	I	H_O	H_E	f
Zam28	5	80-90	4±0.45	3±0.38	1.15±0.14	0.72±0.09	0.63±0.06	-0.17±0.13
Zam29	2	70-80	2	1.96±0.03	0.68±0.01	0.82±0.03	0.49±0.01	-0.68±0.05
Zam32	2	75-80	2	1.80±0.05	0.63±0.02	0.66±0.04	0.44±0.02	-0.50±0.05
Zam33	5	70-80	8.8±0.95	2.33±0.16	0.93±0.07	0.87±0.04	0.56±0.03	-0.56±0.05
Zam34	10	100-170	3.17±0.4	2.70±0.18	1.10±0.08	0.84±0.06	0.62±0.03	-0.34±0.08
Zam35	4	70-80	3.80±0.4	2.18±0.08	0.83±0.50	0.92±0.02	0.54±0.02	-0.73±0.06
Zam39	5	120-140	2.8±0.31	2.66±0.38	1.11±0.11	0.64±0.09	0.59±0.05	-0.11±0.14
Zam40	15	220-280	4.3±0.21	4.75±0.43	1.80±0.10	0.80±0.05	0.78±0.02	-0.02±0.06
Zam41	10	190-230	5.7±0.56	4.09±0.40	1.50±0.10	0.95±0.03	0.74±0.03	-0.29±0.08
Zam45	5	90-100	4±0.26	3.02±0.26	1.18±0.06	0.89±0.04	0.66±0.03	-0.37±0.09

Cuadro 5. Descripción de la variabilidad genética que presentan las poblaciones de *C. zaragozae* en San Luis Potosí. N: número de individuos analizados; Na: número de alelos por población; Ne: número efectivo de alelos por locus; I: índice de Shannon; H_O: heterocigosis observada; H_E: heterocigosis esperada; *f*: coeficiente de fijación.

Población	N	Na	Ne	I	H _O	H _E	<i>f</i>
PNP	20	3.91±0.72	2.68±0.33	1.03±0.13	0.81±0.05	0.58±0.04	-0.43±0.09
Arroyo Moctezuma	10.91±0.91	3.78±0.47	2.73±0.26	1.07±0.10	0.82±0.05	0.61±0.03	-0.38±0.09
Ejido Alamitos	20	4.09±0.74	2.41±0.21	0.98±0.11	0.82±0.05	0.56±0.03	-0.47±0.05
Sierra del Camarón	20	4.27±0.66	3.04±0.41	1.14±0.13	0.83±0.05	0.62±0.04	-0.36±0.07
Pico del Agujón	20	4.27±0.76	2.91±0.33	1.13±0.13	0.83±0.03	0.62±0.04	-0.38±0.07
Cerro la Calavera	11.36±0.64	3.64±0.41	3.01±0.36	1.12±0.12	0.72±0.06	0.62±0.04	-0.22±0.13
Total	17.045±0.529	3.98±0.25	2.80±0.13	1.08±0.50	0.80±0.02	0.60±0.01	-0.37±0.04

Las poblaciones de Arroyo Moctezuma ($\chi^2 = 115.83$, $gl = 97$, $p = 0.093$) y Cerro la Calavera ($\chi^2 = 98.111$, $gl = 97$, $p = 0.449$) mostraron estar bajo equilibrio de Hardy-Weinberg, sin embargo, los loci Zam41, Zam35, Zam32 y Zam29 para Arroyo Moctezuma y Zam45, Zam41, Zam35, Zam34, Zam33, Zam29 y Zam28 para Cerro la Calavera; se encuentran en desequilibrio. El resto de las poblaciones no están bajo equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 194.326 \pm 90.847$, $gl = 97$, $p < 0.001$).

En el PNP, los alelos 98 de Zam45 (frecuencia alélica de 0.025), 234 de Zam40 (0.150) y 282 del mismo locus (0.075), son exclusivos y no se encuentran en ninguna otra población. De igual manera en el Ejido Alamitos los alelos 276 de Zam40 y 162 de Zam34 (ambos con 0.05); en el Sierra del Camarón el alelo 192 de Zam41 (0.075) y el alelo 234 del mismo locus para Cerro la Calavera (0.125), son exclusivos.

9.2 Estructura genética

Existen diferencias significativas entre la variabilidad genética de las poblaciones analizadas ($F_{ST} = 0.102$, $p < 0.001$). Sin embargo, de acuerdo con el análisis pareado; no todas las poblaciones difieren entre sí, por lo que las poblaciones de Pico del Agujón, el PNP y Cerro la Calavera son las más distantes (cuadro 6). Esto explica que no existan diferencias significativas entre individuos ($F_{IT} = 0.188$, $p > 0.05$), por lo que se manifiesta una alta exogamia ($F_{IS} = -0.324$, $p > 0.05$), con variación mayor entre individuos al interior de las poblaciones.

Cuadro 6. Comparación pareada entre los coeficientes de diferenciación de las poblaciones de *C. zaragozae*, provenientes de San Luis Potosí. Valores de F_{ST} debajo de la diagonal, p obtenida por el AMOVA sobre la diagonal. En negritas se señalan los valores significativos.

F_{ST}/P	PNP	Arroyo Moctezuma	Ejido Alamitos	Sierra del Camarón	Pico del Agujón	Cerro la Calavera
PNP	---	0.210	0.015	0.03	0.015	0.015
Arroyo Moctezuma	0.081	---	0.245	0.135	0.015	0.03
Ejido Alamitos	0.129	0.034	---	0.06	0.015	0.015
Sierra del Camarón	0.084	0.062	0.075	---	0.015	0.075
Pico del Agujón	0.111	0.109	0.147	0.067	---	0.255
Cerro la Calavera	0.146	0.120	0.195	0.97	0.055	---

De acuerdo con los análisis pareados, además de considerar las distancias de Nei, se generó un árbol de agrupamiento que muestra tres subpoblaciones (establecidas por el análisis de varianza previo): subpoblación 1 = Ejido Alamitos, Arroyo Moctezuma y Sierra del Camarón; subpoblación 2 = PNP; subpoblación 3 = Pico del Agujón y Cerro la Calavera (figura 7).

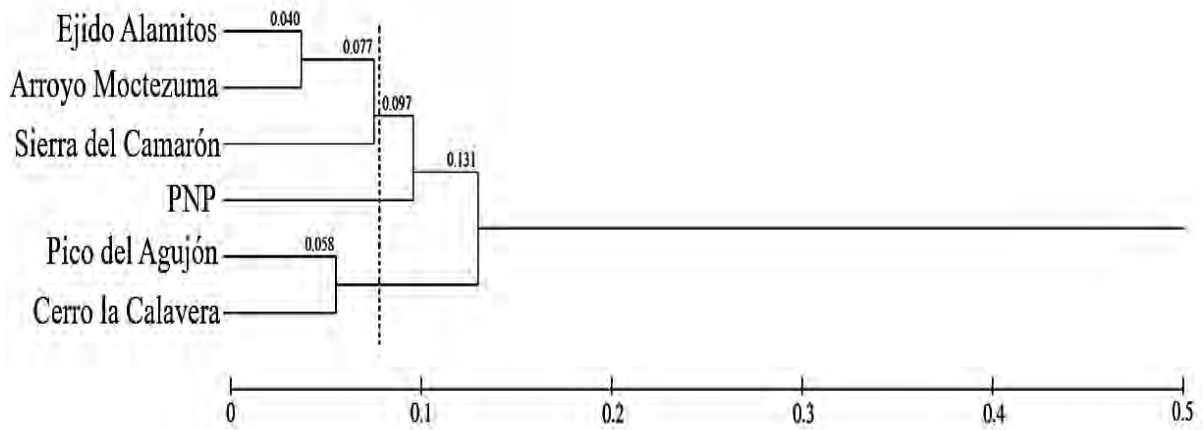
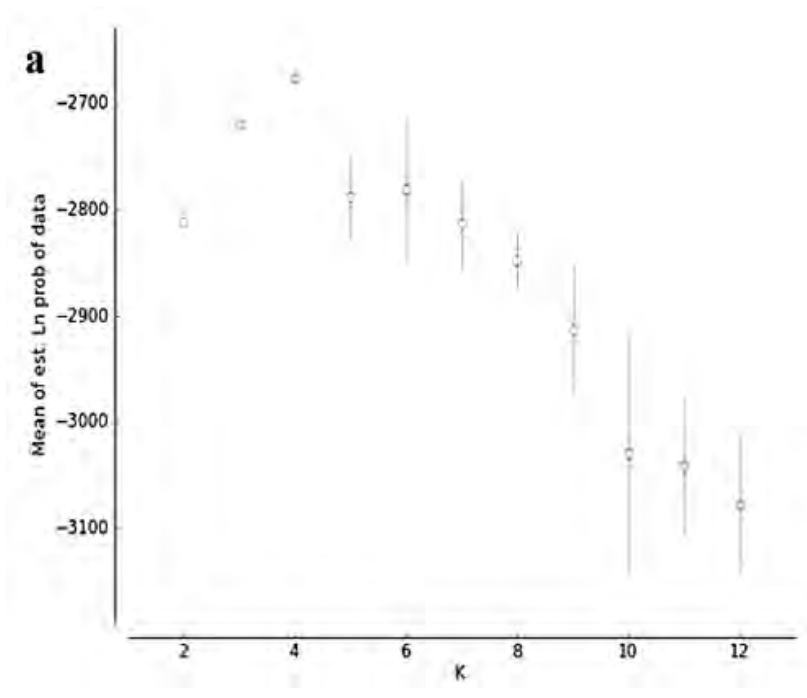


Figura 6. Árbol de agrupamiento UPGMA, considerando las distancias de Nei.

El análisis de asignación mostró cuatro grupos genéticos (figura 8a), distribuidos de manera independiente entre poblaciones. El grupo 1 se encuentra preferentemente en el PNP, el grupo 2 se distribuye tanto en Arroyo Moctezuma y Ejido Alamitos, el grupo 3 es dominante en Sierra del Camarón y el grupo 4 se distribuye en Agujón y Cerro la Calavera (figura 8b).



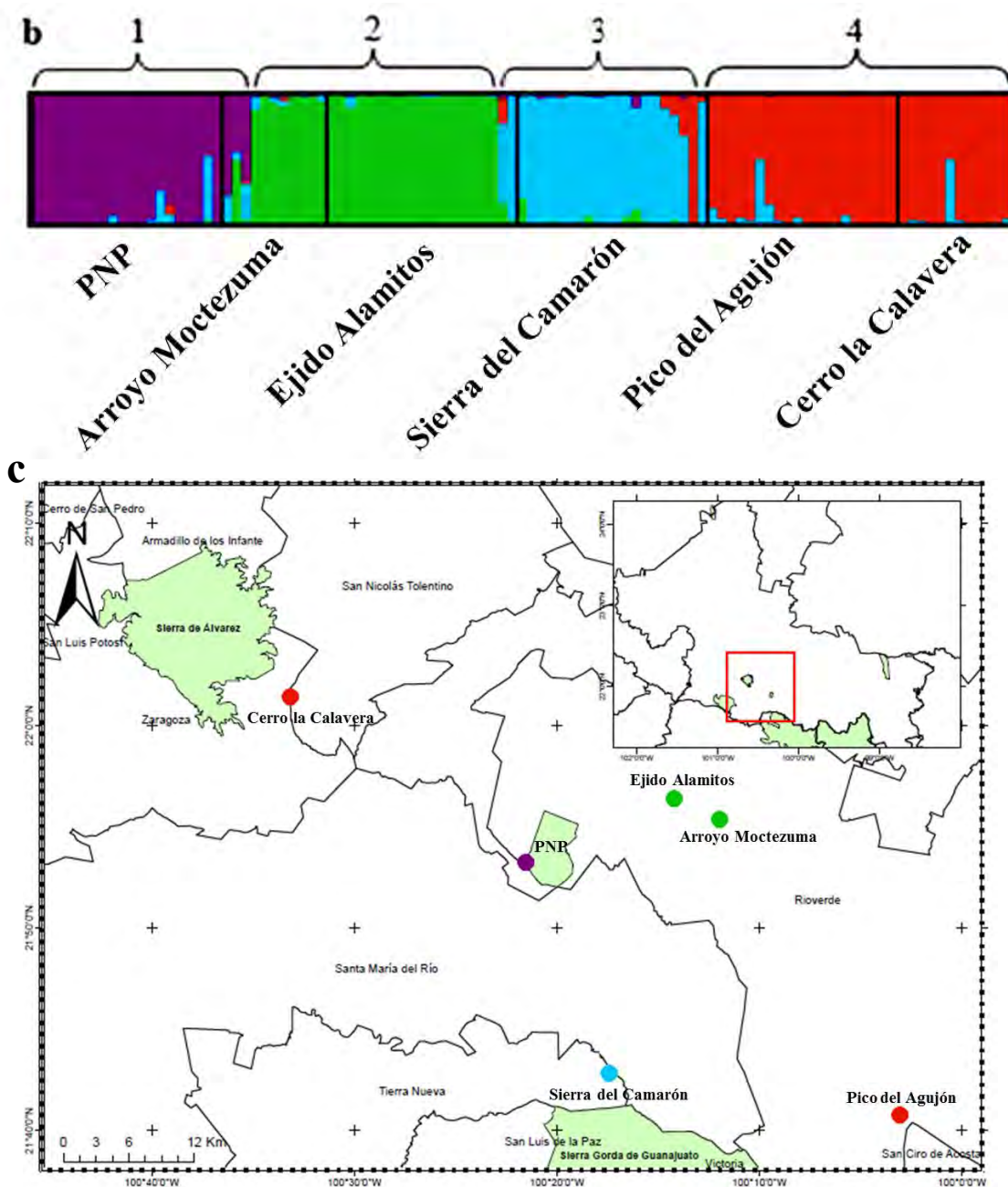


Figura 7. a) Gráfica resultante de la evaluación siguiendo método de Evanno *et al.*, (2005), la cual muestra que el límite adecuado de asignación es $K=4$; b) estimación de los grupos genéticos ($K=4$), obtenidos utilizando el programa STRUCTURE y corregidas por el programa CLUMPP; c) mapa donde se ubican por colores a las localidades, en correspondencia con el análisis de asignación.

El ADCP mostró cuatro grupos diferentes ($F = 9.1079$, $p < 0.0001$); definidos principalmente por Zam32 (f de Wilks = 3.4541, $p = 0.007$), Zam34 (f de Wilks = 3.5957, $p = 0.005$), Zam35 (f de Wilks = 13.3144, $p = 0.000$), Zam39 (f de Wilks = 11.20, $p = 0.000$), Zam40 (f

de Wilks = 35.8025, $p = 0.000$), Zam41 (f de Wilks = 13.6519, $p = 0.000$) y Zam45 (f de Wilks = 37.0549, $p = 0.000$). Las primeras dos funciones resultantes presentan eigenvalores superiores a la unidad ($F1 = 7.3965$, Varianza explicada. 67.03%; $F2 = 1.5797$, Var. Exp. 14.31%) estos grupos no corresponden con los grupos obtenidos mediante asignación bayesiana, el grupo 1 engloba a los individuos de las poblaciones de PNP y Arroyo Moctezuma, el grupo 2 incluye a los individuos de Ejido Alamitos, el grupo 3 se conforma por los individuos de Sierra del Camarón y el grupo 4 contiene a los individuos de Pico del Agujón y Cerro la Calavera (figura 9). Por lo que la diferenciación entre Sierra del Camarón y Ejido Alamitos sería independiente de la distancia entre procedencias.

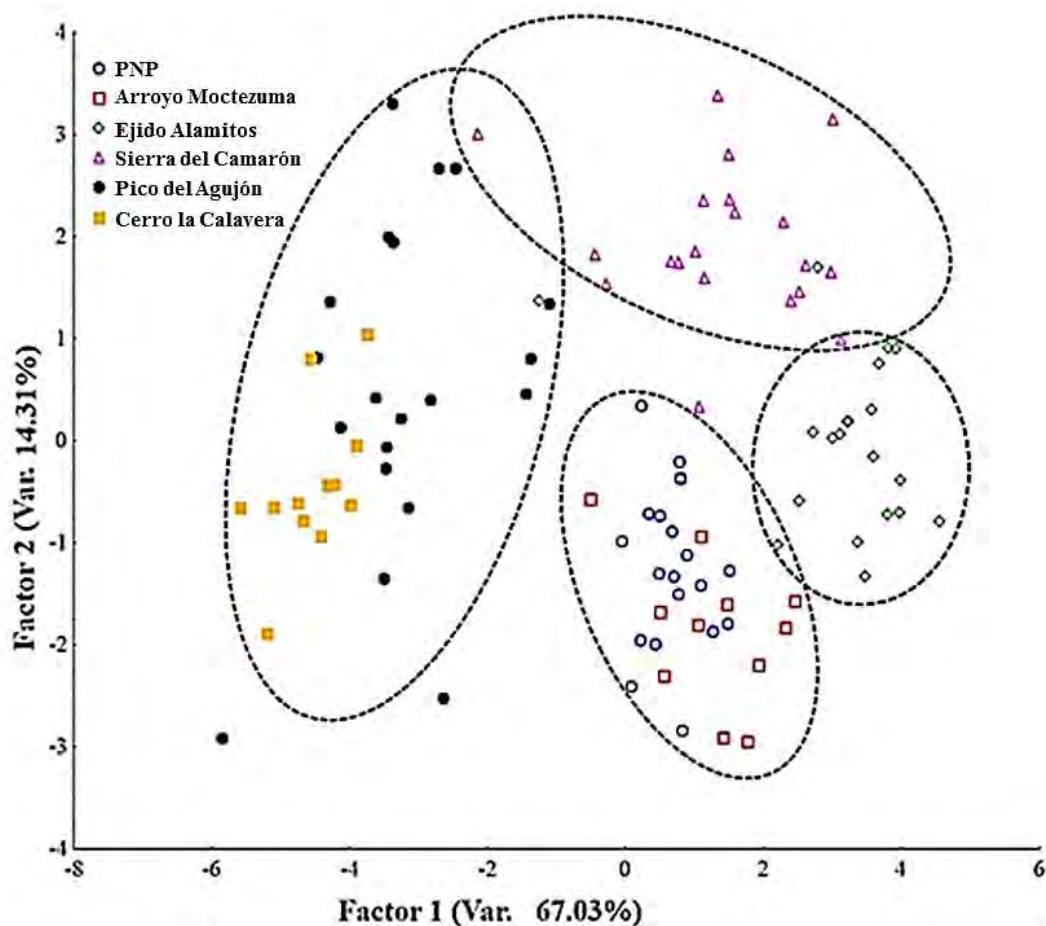


Figura 8. Análisis de Funciones Discriminantes de Componentes Principales para las seis poblaciones *Ceratozamia zaragozae*.

Finalmente, la correlación entre las matrices de distancias genéticas vs geográficas fue positiva y significativa ($r = 0.551$, $p = 0.021$; figura 10), por lo que se asume un modelo de flujo genético de aislamiento por distancia, aunque no aplica para las poblaciones Cerro la Calavera y Pico del Agujón, relación geográfica depurada por el procedimiento de Jackknife.

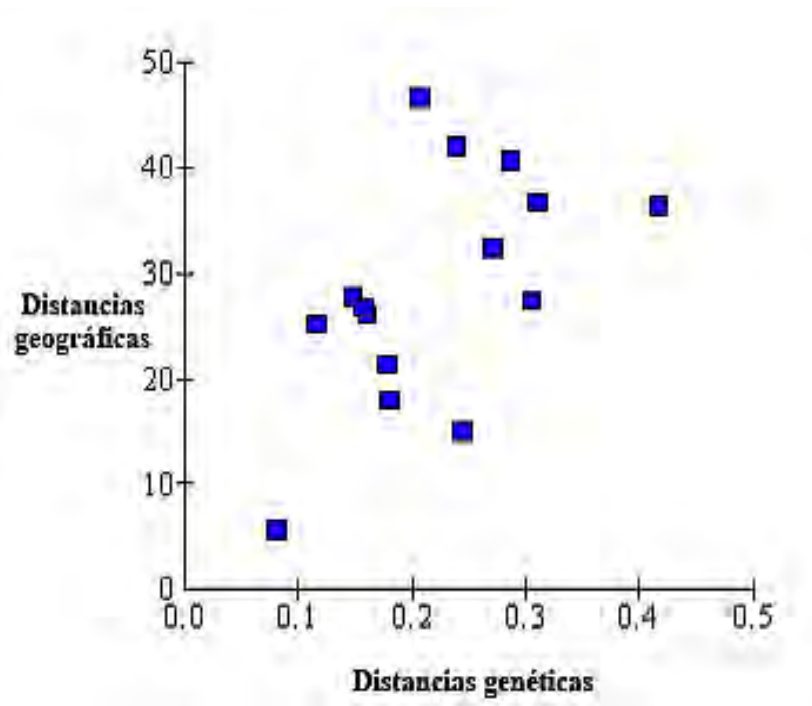


Figura 9. Prueba de Mantel para las matrices de distancias genéticas y geográficas.

9.3 Cuellos de Botella

La prueba de Wilcoxon mostró cuellos de botella recientes en las poblaciones del PNP (Zam41, Zam35, Zam34 y Zam29; $p = 0.00049$), Arroyo Moctezuma (Zam41 y Zam34; $p = 0.00073$), Sierra del Camarón (Zam45, Zam29 y Zam28; $p = 0.00098$), Pico del Agujón (Zam45 y Zam28; $p = 0.00049$) y Cerro la Calavera (Zam41 y Zam39; $p = 0.00049$). Considerando la cantidad de loci en desequilibrio deriva-mutación, la población más afectada es PNP, mientras que la población de Ejido Alamitos no presentó ningún cuello de botella.

9.4 Selección Natural

El análisis de neutralidad mostro que tres (Zam33, Zam35 y Zam41) de los 10 loci analizados se encuentran bajo el efecto de selección natural (figura 11). El alelo 76 de Zam33 se encuentra sobre expresado en todas las poblaciones, mientras que los alelos 70 y 78 son exclusivos de los grupos Alamito-Camarón y Agujón-Calavera, respectivamente. Para Zam35 el alelo 74 está sobre expresado mientras que el alelo 70 es exclusivo del grupo Alamito-Moctezuma. Para Zam41 no hay alelos sobre expresados pero los alelos 192 y 234 son exclusivos de Camarón y Cerro la Calavera, respectivamente (cuadro 7). Además, estos loci presentan los niveles más altos tanto de H_O como de F_{ST} (cuadro 8). Por otra parte, tomando en cuenta los valores de H_O y H_E solo de los loci bajo selección natural, las poblaciones con mayor H_O son Arroyo Moctezuma y Sierra del Camarón (cuadro 9).

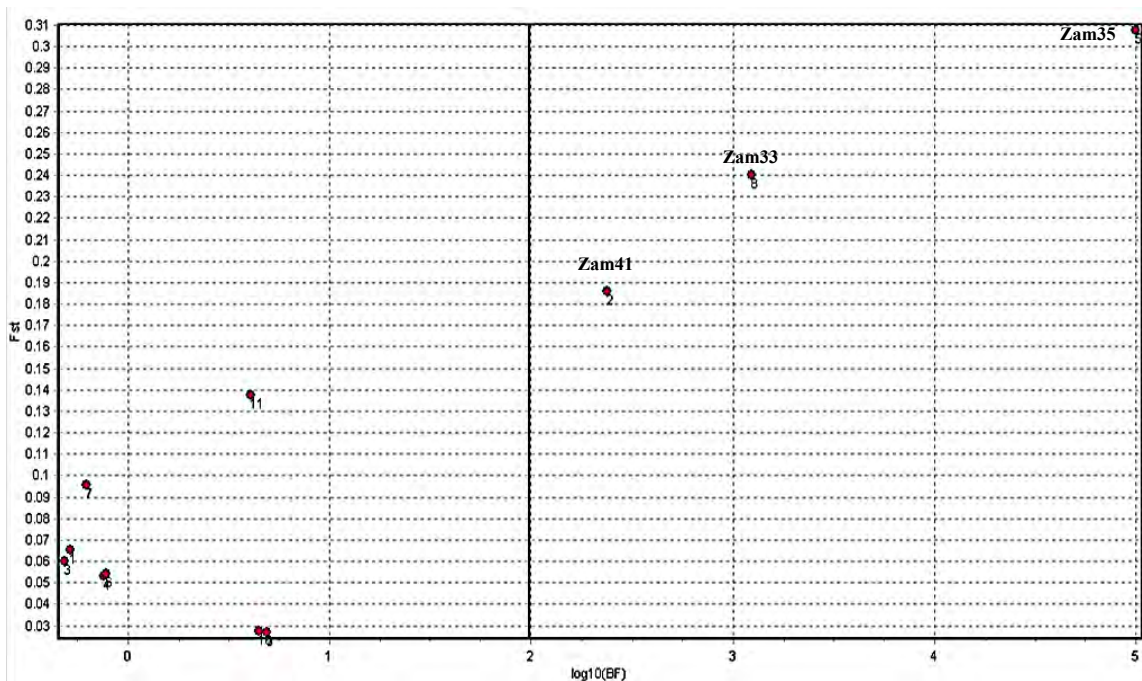


Figura 10. Prueba de neutralidad de los marcadores, obtenida con el programa BayeScan.

Cuadro 7. Frecuencias alélicas para los tres loci bajo selección natural, de acuerdo con el análisis de neutralidad. Con azul se muestran los alelos sobre expresados (selección a favor) y en rojo los exclusivos (selección en contra).

Locus	Alelo	PNP	Arroyo Moctezuma	Ejido Alamitos	Sierra del Camarón	Pico del Agujón	Cerro la Calavera
Zam33	70	*	*	0.025	0.175	*	*
	72	0.625	0.545	0.600	0.225	*	*
	74	0.075	0.091	*	0.125	0.525	0.458
	76	0.300	0.364	0.375	0.475	0.425	0.458
	78	*	*	*	*	0.050	0.083
Zam35	70	*	0.318	0.450	*	*	*
	72	0.500	0.545	0.500	0.525	0.125	*
	74	0.500	0.136	0.025	0.450	0.525	0.583
	76	*	*	0.025	0.025	0.350	0.417
Zam41	192	*	*	*	0.075	*	*
	194	*	*	0.325	0.350	0.025	*
	196	0.175	0.091	0.150	0.075	0.050	*
	198	0.325	*	*	*	0.275	0.125
	200	*	0.318	0.025	*	0.100	0.208
	202	*	0.091	*	*	0.050	0.167
	206	0.025	0.091	*	0.275	0.025	0.125
	208	0.300	0.182	0.500	0.225	0.400	*
	210	0.175	0.227	*	*	0.075	0.250
234	*	*	*	*	*	0.125	

Cuadro 8. Promedio de los valores F_{ST} y H_O de los 10 loci analizados en todas las poblaciones, con color azul se señalan los marcadores identificados por el modelo de neutralidad, como sometidos a selección natural.

Locus	Zam45	Zam41	Zam40	Zam39	Zam35	Zam34	Zam33	Zam32	Zam29	Zam28
F_{ST}	0.059	0.131	0.084	0.072	0.226	0.047	0.179	0.010	0.011	0.139
H_O	0.893	0.947	0.800	0.637	0.924	0.789	0.871	0.663	0.824	0.721

Cuadro 9. Promedio de H_O y H_E por población, considerando solo los loci bajo selección natural. En azul se muestran los valores promedio.

	Zam41		Zam35		Zam33		Total	
	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E
PNP	1.000	0.743	1.000	0.500	0.750	0.514	0.688	0.439
Arroyo Moctezuma	1.000	0.789	0.909	0.583	0.909	0.562	0.705	0.483
Ejido Alamitos	1.000	0.621	0.950	0.546	0.750	0.499	0.675	0.417
Sierra del Camarón	1.000	0.740	0.900	0.521	0.950	0.678	0.713	0.485
Pico del Agujón	0.850	0.743	0.950	0.586	0.950	0.541	0.688	0.468
Cerro la Calavera	0.833	0.819	0.833	0.486	0.917	0.573	0.646	0.470
Total	0.947	0.742	0.924	0.537	0.871	0.561		

10. DISCUSIÓN

Durante el presente estudio, se evaluaron los niveles de variabilidad y la estructura genética en seis poblaciones de *Ceratozamia zaragozae* del estado de San Luis Potosí, México.

En primer lugar, existe un elevado número de individuos heterocigos y entre tres (de acuerdo con el árbol de agrupamiento y al análisis de varianza) o cuatro (de acuerdo con el análisis de asignación y el análisis de ordenamiento) grupos genéticos bien definidos en estas seis poblaciones, explicados principalmente por exogamia. Esto lleva a pensar en un intenso intercambio de genes dependiente de la distancia, aunque no necesariamente reciente y restringido a distancias cortas.

En segundo lugar, el grado de diferenciación entre poblaciones geográficamente cercanas es bajo, lo que nos permite formar grupos identificables con un centro de variabilidad correspondiente a las cuatro poblaciones centrales de la distribución: PNP, Ejido Alamitos, Arroyo Moctezuma y El Camarón. No obstante, la variación al interior de estas localidades está definida por: i) cuellos de botella y alelos exclusivos generados por una disminución del tamaño poblacional en cinco de las seis poblaciones analizadas, ii) Selección balanceadora en El Camarón y Arroyo Moctezuma. Ambas fuerzas evolutivas generan que la estructura genética mostrada por el árbol de agrupamiento,

el análisis de varianza, el análisis de asignación y el ADCP sea diferente para estas cuatro localidades.

Finalmente, la población tipo Pico del Agujón y la población más lejana geográficamente, Cerro la Calavera forman un grupo genético con flujo genético intenso. Ambas poblaciones tienen tamaños poblacionales reducidos por cuellos de botella identificables, aunque no severos en comparación con el resto. Esto hace pensar en dos posibilidades: i) representan a la población original con grupos genéticos antiguos, lo que constituye un flujo ancestral; o ii) el flujo genético intenso es producto de la extracción por parte de los pobladores con la reubicación de los individuos extraídos en los ochentas de Pico del Agujón para conformar un "cultivo" en Cerro la Calavera. Nos inclinamos a pensar que la segunda opción es la correcta dado que Cerro la Calavera es la localidad con la menor H_0 (0.721 ± 0.060), lo cual no correspondería con una población ancestral, pero sí con un efecto fundador; lo que apoyaría la segunda afirmación.

10.1 Diversidad de la especie

Ceratozamia zaragozae presentó mayor heterocigosis observada respecto a la esperada ($H_0 = 0.805$, $H_E = 0.600$), lo cual ha sido reportado para otras especies de cícadas. La variación y estructura genética encontrada en diversos grupos de plantas puede ser determinada por características intrínsecas a las especies (Hamrick & Godt, 1996b; Duminil *et al.*, 2007). En particular, para las plantas de vida larga; se ha propuesto que la diversidad y estructura genética están relacionadas con la sobrevivencia de las semillas, los patrones de distribución espacial, áreas de dispersión tanto de semillas y polen, la fecundidad en la fase adulta; así como de los procesos de fragmentación del hábitat (Hamrick & Godt, 1989; Álvarez-Buylla *et al.*, 1996b; Fernández & Sork, 2007). En este contexto, se ha visto que las plantas longevas generalmente presentan niveles altos de diversidad genética (Hamrick *et al.*, 1992) aun en ambientes fragmentados (González-Astorga & Castillo-Campos, 2004; Lowe *et al.*, 2005; Feyissa *et al.*, 2007). En plantas de vida larga, la persistencia de

las poblaciones depende principalmente de la supervivencia de los adultos (Pinard, 1993; Silvertown *et al.*, 1993, 1996; Olmsted & Álvarez-Buylla, 1995; Hoffmann, 1999).

En cícadas, diversos trabajos señalan una mortalidad de semillas y plántulas alta, asociada a la desecación, con una persistencia alta de adultos (Vovides, 1990; Raimondo & Donaldson, 2003; Pérez-Farrera & Vovides, 2004; Pérez-Farrera *et al.*, 2006; Octavio-Aguilar *et al.*, 2008; Rivera-Fernández *et al.*, 2012). En particular, para las poblaciones de *Ceratozamia zaragozae* un trabajo previo reportó la mayor supervivencia en adultos, mientras que la menor correspondía a las categorías tempranas (Castillo-Lara *et al.*, 2017), congruente con la información ya mencionada.

Otra característica que juega un papel importante son los ciclos de vida particulares de cada grupo. El ciclo de vida en el género *Ceratozamia* (desde la germinación de las semillas hasta las etapas reproductivas) bajo condiciones óptimas de cultivo se extiende por lo menos a quince años y este período se puede duplicar en la naturaleza (González & Vovides, 2002). Por lo tanto, solo una generación habría pasado si consideramos los informes de saqueos, principalmente de adultos, de *C. zaragozae* hace aproximadamente 30 años (Chemnick & Gregory, 2010). Es posible que los efectos por reducción poblacional a causa de actividades antropogénicas que conducirían a una pérdida de variación genética (Frankham *et al.* 2002; Frankham *et al.*, 2004), aún no se ven reflejados en las poblaciones, particularmente en Pico del Agujón donde se dataron las mayores extracciones; ya que los resultados no mostraron endogamia aparente. En otros términos, el lapso temporal entre la perturbación inicial y la actualidad es corto si lo comparamos con la longevidad y el tiempo generacional calculado para la especie (Feyissa *et al.*, 2007). En este sentido, la alta diversidad encontrada podría explicarse por la reproducción de adultos de generaciones antiguas, los cuales mantienen la variación genética, con adultos jóvenes. Este sistema de reproducción podría estar reincorporando y recombinando los alelos dando lugar a la variación elevada.

Al respecto, Cabrera-Toledo *et al.* (2008), sugieren que los ciclos de vida largos, junto con el sistema de apareamiento por cruza obligadas (dioico) pueden contribuir a explicar los niveles altos de variación. Se ha encontrado que en sistemas donde la autofecundación se evita

completamente a través del dioicismo (Costich & Meagher, 1992; Oostermeijer & De Knecht, 2004) o autoincompatibilidad (Segarra-Moragues & Mateu-Andrés, 2007), la variación es mayor dentro que entre las poblaciones, tal como se encontró en *C. zaragozae* ($F_{IS} = -0.324$, $p > 0.05$).

No obstante, debido a que los individuos analizados corresponden en su mayoría a la categoría de adultos, la variación y estructura encontrada sería una representación solo de dicha categoría y los posibles efectos que se verían manifiestos en las categorías tempranas no están representados. Existen algunos estudios que demuestran que la diversidad genética se distribuye diferencialmente entre los distintos estadios (Tonsor *et al.*, 1993; Álvarez-Buylla *et al.*, 1996a, González-Astorga & Núñez-Farfarán, 2001; Kalisz *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2003; González-Astorga & Castillo-Campos, 2004; Fernández & Sork, 2007; Octavio-Aguilar *et al.*, 2009). Entonces, la variación encontrada en las categorías tempranas podría dar una visión de la tendencia a pérdida, ganancia o estabilidad de la variación en las generaciones futuras. Sin embargo, la dificultad de encontrar semillas fecundadas representa una problemática para llevar a cabo estudios donde se consideren todas las categorías. En este caso, durante el periodo de colecta de *C. zaragozae* solo se encontraron dos macroestróbilos maduros en las seis poblaciones. Entonces, a nivel genético la longevidad parece ser una característica que permite que la pérdida de variación sea relativamente lenta, sin embargo, la recuperación de esta también podría ser un proceso tardado dada la baja fecundidad. Asimismo, si el tamaño poblacional se reduce debido a catástrofes naturales o actividades antropogénicas la recuperación en especies de vida larga se ve comprometida (Drechsler *et al.*, 1999), resultando en un riesgo de extinción mayor (Walter & Gillet, 1998).

10.2 Estructura genética

La mayoría de las cícadas tienen una distribución poblacional altamente estructurada, con bajos niveles de flujo genético y siguen un patrón de aislamiento por distancia incluso en espacios geográficos reducidos (Ellstrand *et al.*, 1990; Walters & Decker-Walters, 1991; Yang & Meerow,

1996; Sharma *et al.*, 1999, 2004; Lin *et al.*, 2000; Keppel, 2002; Huang *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2004; Jianguang *et al.*, 2005). Sin embargo, a nivel taxonómico, la diferencia entre especies dentro de los géneros es baja (Condomine *et al.*, 2015; Nagalingum *et al.*, 2011).

En particular para *Ceratozamia*, secuencias nucleares y de cloroplasto revelan niveles bajos de diferenciación (González & Vovides, 2002; 2012), esto podría deberse a los tiempos generacionales largos y al origen relativamente reciente de muchas especies (González & Vovides, 2002). Por ejemplo, un trabajo con el complejo *Ceratozamia norstogii* encontró niveles bajos de diferenciación, sugiriendo que las especies dentro del complejo aún están en proceso de separación (Pérez-Farrera, 2017). Sin embargo, las secuencias tienden a ser estables a lo largo del tiempo, por lo que la baja diferenciación podría ser un efecto del tipo de marcador utilizado en estos estudios. De allí la importancia de contrastar con trabajos basados en marcadores hipervariables, como los que se utilizaron en este estudio.

En particular, la diferenciación poblacional de *Ceratozamia zaragozae* ($F_{ST} = 0.102$) es menor al promedio de las especies de la familia Zamiaceae y Cycadaceae, incluso menor al promedio de *Ceratozamia* y el de otros géneros como *Cycas*, *Dioon*, *Zamia* y *Macrozamia* (ver cuadro 2). En general, los niveles de diferenciación altos en las cícadas se explican por un flujo genético restringido, correspondiente a una dispersión gamética por insectos y dispersión de semillas por gravedad (Loveless & Hamrick, 1984), característica distintiva de este grupo. En contraste algunas especies, incluida la especie de estudio; presentan niveles de diferenciación bajos (cuadro 2). Esto podría deberse al origen reciente del complejo en donde se ubica la especie (González & Vovides, 2002; 2012) y a las relativamente pocas generaciones transcurridas desde los eventos de divergencia. Otra posible explicación es que al igual que la variación, la estructura genética se distribuya diferencialmente entre los distintos estadios, por lo tanto, las nuevas generaciones podrían presentar mayor diferenciación.

Por otra parte, el valor más bajo en las comparaciones pareadas de F_{ST} resultó entre las dos poblaciones geográficamente más distantes, Cerro la Calavera y Pico del Agujón (cuadro 6). De

igual forma, de acuerdo con el árbol de agrupamiento (figura 7), el análisis de asignación (figura 8b) así como en el ADCP estas poblaciones conforman un grupo genético bien definido (figura 9). Sin embargo, las estimaciones de la extensión del flujo genético en cícadras son de 2 a 7 km² (Ellstrand *et al.*, 1990; Walters & Decker-Walters, 1991; Yang & Meerow, 1996; Lin *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2004). Por lo tanto, la posibilidad de que exista flujo genético entre estas poblaciones cuya distancia geográfica es de aproximadamente 50 km² es prácticamente nula. Octavio-Aguilar *et al.* (2009), quienes encontraron similitud genética entre poblaciones geográficamente distantes, sugieren que la semejanza puede explicarse por la longevidad de las plantas debido a que los individuos más antiguos mantienen la estructura genética de la población original a lo largo de varias generaciones, que puede llegar a miles de años. Asimismo, Cabrera-Toledo *et al.* (2008), encontraron la menor diferenciación genética entre las poblaciones más grandes y geográficamente más distantes, sugiriendo que la diferenciación genética en las otras poblaciones más pequeñas se vio influenciada principalmente por la deriva génica, la cual incrementa la diferenciación entre las poblaciones (Hedrick, 2000).

En la prueba de Mantel todas las poblaciones excepto Cerro la Calavera y Pico del Agujón mostraron que la correlación entre las distancias genéticas vs geográficas fue positiva y significativa ($r = 0.551$, $p = 0.021$) (figura 10), resultando en un patrón de aislamiento por distancia donde los individuos cercanos tendrán mayor probabilidad de ser iguales por descendencia (Slatkin, 1993; Hedrick, 2005; Rousset, 2000; Chiang *et al.*, 2009). Según esta hipótesis, las poblaciones dentro de un taxón con un patrón de distribución continua pueden experimentar una diferenciación genética proporcional a las distancias geográficas entre sus poblaciones (Wright, 1943). Esta hipótesis no se aplica a Cerro la Calavera y Pico del Agujón, por lo que su conectividad es más probable que esté influenciada por actividades humanas de translocación de plantas y no por la conexión ancestral mencionada, pues entonces el resto de las poblaciones también tendrían una mayor similitud al estar en la zona intermedia de la distribución. Además, Cerro la Calavera y Pico del Agujón, son las poblaciones más pequeñas en cuanto a la cantidad de individuos y Cerro la Calavera tiene la menor

heterocigosis, lo que no concuerda con los niveles de variabilidad asociados a una población ancestral.

Al respecto, los resultados obtenidos mostraron cuellos de botella recientes en cinco de las seis poblaciones estudiadas, incluidas Cerro la Calavera y Pico del Agujón. Sin embargo, los altos niveles de variación genética para la especie sugieren que los cuellos de botella no fueron temporalmente sostenidos, no tuvieron mucha intensidad o son tan recientes que todavía no han tenido un efecto importante sobre la mayoría de los loci (Martínez-Palacios *et al.*, 1999). Esto también sugiere que las poblaciones actuales son relictas de una distribución continua establecida cuando las condiciones ambientales eran distintas de las del presente (Cabrera-Toledo *et al.* 2008). No obstante, la severidad de la reducción poblacional se verá reflejada en un futuro quizá no tan lejano.

En cuanto a la selección natural, sabemos que los SSR son secuencias de DNA constituidas por repeticiones en tándem, altamente polimórficas, codominantes, no codificantes, homólogas para diferentes especies, géneros e incluso familias; altamente inestables, pero en algunos casos son regiones reguladoras dependiendo de su posición en el genoma (Golstein *et al.*, 1996; Nevo, 2001; Li *et al.*, 2004; Gemayel *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2013; Carneiro-Vieira *et al.* 2016). Debido a que los microsatélites utilizados fueron diseñados para otra especie de otro género (*Zamia*), aunque de la misma familia; no se tiene conocimiento de la ubicación exacta de los microsatélites en el genoma de *Ceratozamia zaragozae* y, por lo tanto, se desconoce si están ligados, por proximidad, regulación o epistasis, a regiones codificantes del genoma. Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó una prueba de neutralidad encontrando que tres (Zam41, Zam35 y Zam33), de los 10 loci analizados, se encuentran bajo selección natural.

Cibrián-Jaramillo *et al.* (2010), en un estudio con *Cycas micronesica*, desarrollaron microsatélites a partir de marcadores de secuencias expresadas, realizando de igual forma una prueba de neutralidad, encontrando un locus bajo selección balanceadora. En este caso, y considerando que los loci identificados presentan los niveles más altos de H_0 es posible que

también se trate de selección balanceadora, la cual favorece a los heterocigos (Eguiarte, *et al.*, 1992; Hansson & Westerberg, 2002; González-Astorga *et al.*, 2003). Los alelos exclusivos, a nivel poblacional podrían estar bajo selección en contra o se perdieron por deriva, considerando que su frecuencia en su mayoría es baja. En particular, la población con los niveles más altos de H_O tomando en cuenta solo los marcadores bajo selección (cuadro 9) es Sierra del Camarón; la cual, en el análisis de asignación, así como en el ADCP conforma un grupo independiente. Es posible que la diferenciación genética causada por el aislamiento geográfico y por selección natural, se mantenga y/o aumente, contrario a la segunda población con los niveles más altos de H_O , Arroyo Moctezuma, la cual tanto en el árbol de agrupamiento, así como en el análisis de asignación conforma un grupo con el Ejido Alamitos, portador también de dos alelos exclusivos para los loci sometidos a selección natural, uno compartido con Arroyo Moctezuma. Estas poblaciones son las más cercanas geográficamente (aproximadamente 6 km²) por lo que el flujo génico podría estar homogeneizando y disminuyendo la diferenciación genética causada por selección natural entre estas dos poblaciones.

11. CONCLUSIONES

- *Ceratozamia zaragozae* presenta los niveles más altos de variabilidad genética para el género, asociada a procesos de exogamia. Sin embargo, este nivel de variación podría ser un efecto del tiempo generacional largo y/o de una divergencia reciente de la especie. En particular las poblaciones de Sierra del Camarón, Pico del Agujón y Arroyo Moctezuma constituyen los tres núcleos de mayor diversidad genética estimada a partir de la H_O .
- Existen tres grupos genéticos bien definidos: i) Sierra del Camarón, ii) Pico del Agujón-Cerro la Calavera y iii) PNP-Arroyo Moctezuma-Ejido Alamitos. Al interior del grupo iii puede haber un subgrupo asociado a la menor distancia geográfica (Arroyo Moctezuma-Ejido Alamitos). El grupo ii no corresponde con un modelo de aislamiento por distancia sino con el historial de extracción, por lo que esta asociación estaría dada por actividades antropogénicas.
- La población del Ejido Alamitos no presentó reducción poblacional, mientras que la población del PNP, a pesar de estar ubicada en una reserva natural, es la que presentó una reducción poblacional más severa.
- Se identificaron tres loci que no responden al modelo de neutralidad (Zam33, Zam35, Zam41), cuyas frecuencias genotípicas indican un proceso de selección balanceadora, siendo más intensa en Sierra del Camarón; lo que podría explicar porqué tiene una mayor diferenciación del resto.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez-Buylla, E., García-Barrios, R., Lara-Morena, C. & M. Martínez-Ramos. 1996a. 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., Chaos, A., Piñero D. & A. Garay. 1996b. Demographic genetics of a pioneer tropical tree species: patch dynamics, seed dispersal, and seed banks. *Evolution* 50:1155-1166.
- Anderson, J. M., Anderson, H. M. & C. J. Cleal. 2007. Brief history of the gymnosperms: classification, biodiversity, phytogeography and ecology, Strelitzia. South African National Biodiversity Institute, Pretoria. 280 p.
- Bernard, J. M. 2005. An introduction to the imprecise Dirichlet model for multinomial data. *International Journal of Approximate Reasoning* 39:123-150.
- Bravo de la Garza, A. L., González de la Rosa, C. H. & S. Le Borgne. 2012. Manual de prácticas de laboratorio de Biología Molecular. S. I: Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana ISBN: 978-607-477-728-4.
- Brown, K. S. 1976. Centros de evolución, refugios cuaternarios, y conservación de patrimonios genéticos en la región neotropical: Patrones de diferenciación en Ithomiinae (*Lepidoptera: Nymphalidae*). *Acta Amazónica* 7:75-137.
- Byrne, M. & S. H. James. 1991. Genetic diversity in the cycad *Macrozamia riedlei*. *Heredity* 67:35-39.
- Cabrera-Toledo, D., González-Astorga, J., Nicolalde-Morejón, F., Vergara-Silva, F. & A. P. Vovides. 2010. Allozyme diversity levels in two congeneric *Dioon* spp. (*Zamiaceae*, *Cycadales*) with contrasting rarities. *Plant Systematics and Evolution* 290:115-125.
- Cabrera-Toledo, D., González-Astorga, J. & A. P. Vovides. 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.
- Calonje, M., Meerow, A. W., Knowles, L., Knowles, D., Griffith, P., Nakamura, K. & J. Fransisco-Ortega. 2013. Cycad biodiversity in the Bahamas Archipelago and conservation genetics of the threatened *Zamia lucayana* (*Zamiaceae*). *Fauna & Flora International* 47:190-198.
- Calonje, M., Stevenson, D. W. & L. Stanberg. 2017. The World List of Cycads, online edition. 2013-2017. <http://www.cycadlist.org>. (Consultado el 4 de marzo, 2017).

- Carneiro-Vieira, M. L., Santini, L., Lima, A. D. & M. de Freitas. 2016. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology* 39:312-328.
- Castillo-Lara, P., Octavio-Aguilar, P. & J. A. De-Nova. 2017. *Ceratozamia zaragozae* Medellín-Leal (Zamiaceae), an endangered Mexican cycad: New information on population structure and spatial distribution. *Brittonia*.
- Chao-Luan, L., Wang, Q., Jiang, S. Y., Ge, S. & K. E. Wang. 1999. Genetic diversity of allozymes in populations of *Cycas panzhihuaensis*. Pp. 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., Dayanandan, S. & V. A. Albert. 1993. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Annals of Molecular Botany Garden* 80:528-580.
- Chemnick, J. & T. Gregory. 2010. *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> (Consultado el 4 de marzo, 2016).
- Chiang. 2009. Paraphyly of organelle DNAs in *Cycas* Sect. *Asiorientales* due to ancient ancestral polymorphisms. *BMC Evolutionary Biology* 9:161-10.
- Chung, M. Y., Epperson, B. K. & M. G. Chung. 2003. Genetic structure of age classes in *Camellia japonica* (Theaceae). *Evolution* 57:62-73.
- Chybicki, I. J. & J. Burczyk. 2009. Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. *Journal of Heredity* 100:106-130.
- Cibrián-Jaramillo, A., Daly, A. C., Brenner, E., Desalle, R. & T. E. Marler. 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. 2003. Examen del comercio significativo de la CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres). Cícad. PC14 Doc. 9.2.2. Anexo 1.

- Condamine, F. L., Nagalingum, N. S., Marshall, C. R. & H. Morlon. 2015. Origin and diversification of living cycads: a cautionary tale on the impact of the branching process in Bayesian molecular dating. *BMC Evolutionary Biology* 15:2-18.
- Cordellier, M. & M. Pfenninger. 2009. Inferring the past to predict the future: climate modelling predictions and phylogeography for the freshwater gastropod *Radix balthica* (Pulmonata, Basommatophora). *Molecular Ecology* 18:534-544.
- Cornuet, J. M. & G. Luikart. 1996. Description and power analysis of two test for detecting recent populations bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001-2014.
- Costich, D. E. & T. R. Meagher. 1992. Genetic variation in *Echallium elaterium* (Cucurbitaceae): breeding system and geographic distribution. *Journal of Evolutionary Biology* 5:589-601.
- De Castro, O., Vázquez-Torres, M. S. & P. De Luca. 2006. Utility of AFLP markers for the assessment of molecular relationships in *Ceratozamia* Brongn. (Zamiaceae). *Plant Biosystems* 140:221-228.
- Doyle, J. J. & J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15.
- Donaldson, J. S. 1995. Understanding cycad life histories: an essential basis for successful conservation. Pp. 8-13. *En: Donaldson, J.S. (ed.). Cycad Conservation in South Africa: Issues, priorities and Actions.* Cycad Society of South Africa, Stellenbosch, South Africa.
- Donaldson, J. S. 2003. Cycads. Status, survey and conservation action plan, IUCN/SSC Cycad Specialist Group. IUCN, Gland.
- Drechsler, M., Lamont, B. B., Burgman, M. A., Akcakaya, H. R., Witkowski, E. T. & F. Supriyadi. 1999. Modelling the persistence of an apparently immortal *Banksia* species after fire and land clearing. *Biological Conservation* 88:249-259.
- Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Jordano, P., Salvini, D., Vendramin, G. & R. J. Petit. 2007. Can population genetic structure be predicted from life-history traits? *The American Naturalist* 169:662-672.
- Earl, D. A. & B. M. von Holdt. 2012. Structure Harvester: website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4:359-361.
- Eguiarte, L. E., Pérez-Nasser, N. & D. Piñero. 1992. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. *Heredity* 69:217-228.
- Ellstrand, N. C., Ornduff, R. & J. M. Clegg. 1990. Genetic structure of the Australian cycad, *Macrozamia communis* (Zamiaceae). *American Journal of Botany* 77:677-681.

- Evanno, G., Regnaut, S. & J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulatory study. *Molecular Ecology* 14:2611-2620.
- Falcón, I. L. & A. Valera. 2007. Extracción de ácidos nucleicos. Pp. 499-516. *En: Eguiarte, E. L. Souza, V. & X. Aguirre (Compiladores). Ecología molecular.*
- Falush, D., Stephens, M. & J. K. Pritchard. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7:576-578.
- Feng, X., Wang, Y. & X. Gong. 2014. Genetic diversity, genetic structure and demographic history of *Cycas simplicipinna* (Cycadaceae) assessed by DNA sequences and SSR markers. *BMC Plant Biology* 14:187.
- Frankham, R., Ballou, J. D. & D. A. Briscoe. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge. 617 p.
- Frankham, R., Ballou, J. & D. Briscoe. 2004. A Primer of Conservation Genetics. Cambridge University Press. 220 p.
- Fernández, J. F & V. L. Sork. 2007. Genetic variation in fragmented forest stands of the Andean oak *Quercus humboldtii* Bonpl. (Fagaceae). *Biotropica* 39:72-78.
- Feyissa, T., Nybom, H., Bartish, I. V. & M. Welander. 2007. Analysis of genetic diversity in the endangered tropical tree species *Hagenia abyssinica* using ISSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54:947-958.
- Foll, M. & O. Gaggiotti. 2008. A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: a Bayesian perspective. *Genetics* 180:977-993.
- Gao, C., Ren, X., Mason, A. S., Li, J., Wang, W., Xiao, M. & D. Fu. 2013. Revisiting an important component of plant genomes: microsatellites. *Functional Plant Biology* 40:645.
- García-Montes, M. A. 2017. Variabilidad genética de *Ceratozamia fuscoviridis* Moore (Cycadales, Zamiaceae) en Tlahuiltepa Hidalgo México. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México. 63 p.
- Gemayel, R., Cho, J., Boeynaems, S. & K. J. Verstrepen. 2012. Beyond junk-variable tandem repeats as facilitators of rapid evolution of regulatory and coding sequences. *Genes* 3:461-480.
- Goel, A. K. & J. Khuraijam. 2015. Cycads: An Overview. Pp. 349-360. *En: Bahadur, B., Rajam, M. V., Sahijram, L. & K. V. Krishnamurthy (eds.). Plant Biology and Biotechnology. Springer.*
- Golstein, D. B., Zhivotovsky, L. A., Nayar, K., Ruíz, L. A., Cavalli-Sforza, L. & M. W. Feltman. 1996. Statistical properties of the variation at linked microsatellite loci: implications for the history of human Y-chromosome. *Molecular Biology and Evolution* 13:1213-1218.

- Gong, Y. Q., Zhan, Q. Q., Nguyen, K. S., Nguyen, H. T., Wang, Y. H. & X. Gong. 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*. 10:2: e0117719. doi: 10.1371/journal.pone.0117719.
- Gong, Y. Q. & X. Gong. 2016. Pollen-mediated gene flow promotes low nuclear genetic differentiation among populations of *Cycas debaoensis* (Cycadaceae). *Tree Genetics & Genomes* 12:93 DOI 10.1007/s11295-016-1051-6.
- González-Astorga, J. & J. Núñez-Farfán. 2001. Effect of habitat fragmentation on the genetic structure of the narrow endemic *Brongniartia vazquezii*. *Evolutionary Ecology Research* 3:861-872.
- González-Astorga, J. & G. Castillo-Campos. 2004. Genetic variability of the narrow endemic tree *Antirhea aromatica* Castillo-Campos & Lorente (Rubiaceae, Guettardeae) in a tropical forest of Mexico. *Annals of Botany* 93:521-528.
- González-Astorga, J., Vovides, A. P., Ferrer, M. & C. Iglesias. 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-Angón, A., Octavio-Aguilar, P. & C. Iglesias. 2005. Allozyme variation in 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., Vovides, A. P., Octavio-Aguilar, P., Aguirre-Fey, D., Nicolalde-Morejón, F. & C. Iglesias. 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., Vergara-Silva, F., Vovides, A. P., Nicolalde-Morejón, F., Cabrera-Toledo, D. & M. A. Pérez-Farrera. 2008. Diversity and genetic structure of three species of *Dioon* Lindl. (Zamiaceae, Cycadales) from the Pacific seaboard of México. *Biological Journal of the Linnean Society* 94:765-77.
- González, D. & A. P. Vovides. 2002. Low intralinear divergence in *Ceratozamia* (Zamiaceae) detected with nuclear ribosomal DNA ITS and chloroplast DNA trnL-F non-coding region. *Systematic Botany* 27:654-661.
- González, D. & A. P. Vovides. 2012. A modification to the SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) method provides phylogenetic insights within *Ceratozamia* (Zamiaceae). *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83:929-938.

- Haffer, J. & G. T. Prance. 2001. Climatic forcing of evolution in Amazonia during the Cenozoic: on the refuge theory of biotic differentiation. *Amazoniana-Limnologia Et Oecologia Regionalis Systemae Fluminis Amazonas* 16:579-605.
- Hamrick, J. L., Godt, M. J. & S. L. Sherman-Broyles. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* 6:95-124.
- Hamrick, J. L. & M. J. Godt. 1996a. Conservation genetics of endemic plant species. Pp. 281-304. *En: Avise, J. S. & J. L. Hamrick (eds.). Conservation genetics: case histories from nature.* New York: Chapman and Hall.
- Hamrick, J. L. & M. J. Godt. 1996b. Effects of the history traits on genetic diversity in plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 351:1291-1298.
- Hamrick, J. L. & M. J. Godt. 1989. Alloenzyme diversity in plant species. Pp. 281-304. *En: Brown, A. D., Clegg, M. T., Kahler, A. L. & B. S. Weir (eds.). Plant population genetics, breeding and genetic resources,* Sinauer, Sunderland.
- Hansson, B. & L. Westerberg. 2002. On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Molecular Ecology* 11:2467-2474.
- Hartl, D. L. 2000. *A Primer of population genetics.* Sinauer, Sunderland, MA. 221 p.
- Hedrick, P. W. 2000. *Genetics of populations, Second Edition.* Jones and Bartlett Publishers. Sudbury, MA, USA. 553 p.
- Hedrick, P. W. 2005. *Genetic of populations. Third Edition.* Jones and Bartlett Publishers. Arizona State University. 737 p.
- Hewitt, G. M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 359:183-195
- Hoffmann, W. A. 1999. Fire and population dynamics of woody plants in a neotropical savanna: matrix model projections. *Ecology* 80:1354-1369.
- Huang, S., Hsieh, H. T., Fang, K. & Y. C. Chiang. 2004. Patterns of Genetic Variation and Demography of *Cycas taitungensis* in Taiwan. *The Botanical Review* 70:86-9.
- INE-SEMARNAP (Instituto Nacional de Ecología-Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca). 2000. Prep 6: protección, conservación y recuperación de la familia Zamiaceae (Cycadales) de México. México, D.F. 63 p. <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/download/183.pdf>. (Consultado el 24 febrero, 2016).
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2002. *Síntesis de Información Geográfica del Estado de San Luis Potosí.* 124 p.

- IUCN (International Union for Conservation of Nature). 2012. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <http://www.iucnredlist.org>. (Consultado el 24 febrero, 2016).
- Jakobsoon, M. & N. A. Rosenberg. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure *Bioinformatics* 23:1801-1806.
- Jianguang, X., Jian, S. & L. Nian. 2005. Genetic variation in the endemic plant *Cycas debaoensis* on the basis of ISSR analysis. *Australian Journal of Botany* 53:141-145.
- Jombart, T., Devillard, S. & F. Balloux. 2010. Discriminant analysis of principal component: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics* 11:94.
- Kalisz, S., Nason, J. D., Hanzawa, F. M. & S. J. Tonsor. 2001. Spatial population genetic structure in *Trillium grandiflorum*: the roles of dispersal, mating, history and selection. *Evolution* 55:1560-1568.
- Keppel, G. 2002. Low genetic variation in a pacific cycad: conservation concerns for *Cycas seemannii* (Cycadaceae). *Oryx* 36:41-49.
- Lazar, I. & I. Lazar. 2010. Gel Analyzer freeware developed by the author. GelAnalyzer.com.
- Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T. & E. Nevo. 2004. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 21:991-1007.
- Lin, T. P., Sun, Y. C. & Y. P Cheng. 2000. Low genetic diversity *Cycas taitungensis* (Cycadaceae), and endemic species in Taiwan, revealed by allozyme analysis. *Taiwan Journal of Forest Science* 15:13-19.
- Loveless, M. D. & J. L. Hamrick. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15:65-95.
- Lowe, A. J., Boshier, D., Ward, M., Bacles, C. F. & C. Navarro. 2005. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity* 95:255-273.
- Marshall, C. J. & J. K. Liebherr. 2000. Cladistic biogeography of the Mexican transition zone. *Journal Biogeography*. 27:203-216.
- Martínez-Palacios, A., Eguiarte, L. & G. Furnier. 1999. Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert. *American Journal of Botany* 86:1093-1098.
- Mayett, M. Y., Salomé, C. E. & M. I. Barajas-Domínguez. 2014. Comercialización de cícadas mexicanas (Zamiaceae) en Atlixco, Puebla. Un estudio exploratorio. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5:633-644.

- McKay, B. D., Mays, H. L., Peng, Y. W., Kozak, K. H., Yao, C. T., Yuan, H. W., Lee, P. F. & F. H. Hsu. 2010. Recent range-wide demographic expansion in a Taiwan endemic montane bird, Steere's *Liocichla* (*Liocichla steerii*). *BMC Evolutionary Biology* 10:71.
- Medellín-Leal, F. 1963. A new species of *Ceratozamia* from San Luis Potosi. *Brittonia* 15:175-176.
- Meerow, W. & K. Nakamura. 2007. Ten microsatellite loci from *Zamia integrifolia* (Zamiaceae). *Molecular Ecology Notes* 7:824-826.
- Miller, M. 1997. Tools for populations genetic analysis v.1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.
- Montelongo-Ruiz, G. 2016. Análisis genético poblacional de *Ceratozamia kuesteriana* REGEL, en el noreste de México. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria, Tamaulipas, México. 75 p.
- Nagalingum, N. S., Marshall, C. R., Quental, T. B., Rai, H. S., Little, D. P. & S. Mathews. 2011. Recent synchronous radiation of a living fossil. *Science* 334:796-799.
- Nevo, E. 2001. Evolution of genome-phenome diversity under environmental stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98:6233-6240.
- Nicolalde-Morejón, F., González-Astorga, J., Vergara-Silva, F., Stevenson, D. W., Rojas-Soto, O. & A. Medina-Villarreal. 2014. Biodiversidad de Zamiaceae en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85:114-125.
- Norstog, K. & T. Nicholls. 1997. *The Biology of the Living Cycads*. Cornell University Press, Ithaca. 363 p.
- Octavio-Aguilar, P., González-Astorga, J. & A. P. Vovides. 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. & A. P. Vovides. 2009. Genetic diversity by life-history of *Dioon edule* Lindley (Zamiaceae, Cycadales). *Plant Biology* 11:525-535.
- Olmsted, I. & E. R. Álvarez-Buylla. 1995. Sustainable harvesting of tropical trees, demography and matrix models of two palm species in Mexico. *Ecological Applications* 5:484-500.
- Oostermeijer, J. G. & B. De Knecht. 2004. Genetic population structure of the wind-pollinated, dioecious shrub *Juniperus communis* in fragmented Dutch heartlands. *Plant Species Biology* 19:175-184.
- Osborne, R., Calonje, M.A., Hill, K., Stanberg, L. & D. W. Stevenson. 2012. The world list of cycads. *Memoirs of the New York Botanical Gardens* 106:480-510.

- Pant, D. D. 2002. An introduction to gymnosperms, cycads and cycadales, vol 4, BSIP Monograph. Birbal Sahini Institute of Palaeobotany, Lucknow. 380 p.
- Palacios, C. R. & J. Rzedowski. 1993. Estudio palinológico de las floras fósiles del Mioceno inferior y principios del Mioceno Medio de la región de Pichucalco, Chiapas, México. *Acta Botánica Mexicana* 24:1-96.
- Pekall, R. & P. E. Smouse. 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., Vovides, A. P. & C. Iglesias. 2001. The cycad *Ceratozamia norstogii* D. W. Stev. (Zamiaceae) from southern Mexico: new information on distribution, habitat and vegetative morphology. *Botanical Journal of the Linnean Society* 137:71-76.
- Pérez-Farrera, M. A. & A. P. Vovides. 2004. Spatial distribution, population structure, and fecundity of *Ceratozamia matudai* Lundell (Zamiaceae) in El Triunfo biosphere reserve, Chiapas, México. *The Botanical Review* 70:299-311.
- Pérez-Farrera, M. A., Vovides, A. P., Octavio-Aguilar, P., González-Astorga, J., Cruz-Rodríguez, J., Hernández-Jonapá, R. & S. M. Villalobos-Méndez. 2006. Demography of the cycad *Ceratozamia mirandae* (Zamiaceae) under disturbed and undisturbed conditions in a biosphere reserve of Mexico. *Plant Ecology* 187:97-108.
- Pérez-Farrera, M. A., Vovides, A. P., González, D., López, L., Hernández-Sandoval, L. & M. Martínez. 2017. Estimation of genetic variation in closely related cycad species in *Ceratozamia* (Zamiaceae: Cycadales) using RAPDs markers. *Revista de Biología Tropical* 65:305-319.
- Pinard, M. 1993. Impacts of stem harvesting on populations of *Iriateia deltoidea* (Palmae) in an extractive reserve in Acre, Brazil. *Biotropica* 25:2-14.
- Pinares, A., González-Astorga, J., Vovides, A. P., Lazcano, J. & A. W. Vendrame. 2009. Genetic diversity of the endangered endemic *Microcycas calocoma* (Miq.) A. DC (Zamiaceae, Cycadales): Implications for conservation. *Biochemical Systematics and Ecology* 37:385-394.
- Piñero, D., Caballero-Mellado, J., Cabrera-Toledo, D., Canteros, C. E., Casas, A., Castañeda, A. S., Castillo, A., Cerritos, R., Chassin-Noria, O., Colunga-García, P., Delgado, P., Díaz-Jaimes, P., Eguiarte, L. E., Escalante, A. E., Espinoza, B., Fleury, A., Flores, S. R., Fragoso, G., González-Astorga, J., Islas, V. V., Martínez, E., Martínez, F., Martínez-Castillo, J., Mastretta, A. Y., Medellín, R., Medrano-González, L., Molina-Freaner, F., Morales, B. V., Murguía, A. V., Payró de la Cruz, E., Reyes-Montes, M. R., Robles, S. M., Rodríguez-Arellanes, G., Rojas, L. B., Romero-Martínez, R., Sahaza-Cardona, J., Salas, R. L., Sciutto,

- E., Scott, C. B., Schramm, Y. U., Silva, C., Souza, V., Taylor, M. T., Urbán, J. R., Uribe-Alcocer, M., Vázquez, M. C., Vázquez-Domínguez, E., Vovides, A. P., Wegier, A., Zaldívar, A. R. & G. Zúñiga. REVISORES Brush, S. B. & D. Zizumbo-Villarreal. 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. Pp. 437-494. *En*: Capital natural de México, vol I. Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. & P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Provan, J. & K. D. Bennett. 2008. Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *Trends in Ecology & Evolution*, 23:564-571.
- Raimondo, D. C. & J. S. Donaldson. 2003. Responses of cycads with different life histories to the impact of plant collecting: simulation models to determine important life history stages and population recovery times. *Biological Conservation* 111:345-358.
- Rebernik, C. A., Schneeweiss, G. M., Bardy, K. E., Schonswetter, P., Villaseñor, J. L., Obermayer, R., Stuessy, T. F. & H. Weiss-Schneeweiss. 2010. Multiple Pleistocene refugia and Holocene range expansion of an abundant southwestern American desert plant species (*Melampodium leucanthum*, Asteraceae). *Molecular Ecology* 19:3421-3443.
- Rivera-Fernández, A. 2012. Diversidad y estructura genética poblacional de *Ceratozamia mexicana* Brong. Tesis de Doctorado, Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada, Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz, México. 133 p.
- Rivera-Fernández, A., Octavio-Aguilar, P., Sánchez-Coello, N. G., Sánchez-Velásquez, L. R., Vázquez-Torres, S. M. & L. G. Iglesias-Andreu. 2012. Population structure and spatial distribution of *Ceratozamia mexicana* Brongn. (Zamiaceae) in preserved and disturbed environments. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 15:110-117.
- Rousset, F. 2000. Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology* 13:58-62.
- Rosenberg, N. A. 2004. Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4:137-138.
- Sánchez-Tinoco, M. Y. & E. M. Engleman. 2004. Seed anatomy of *Ceratozamia mexicana* (Cycadales). *The Botanical Review* 70:24-28.
- Segarra-Moragues, J. G. & I. Mateu-Andrés. 2007. Levels of allozyme diversity in closely related toadflaxes (*Linaria*, Plantaginaceae) and their correspondence with the breeding systems of the species. *Conservation Genetics* 8:373-383.

- SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales). 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. 78 p.
- Sharma, I. K., Jones, D. L., Foster, P. I. & A. G. Young. 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. & A. G. Young. 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. & P. I. Foster. 2004. Genetic differentiation and phonetic relatedness among seven species of the *Macrozamia plurinervia* complex (Zamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 32:313-327.
- Silvertown, J., Franco, M. & E. Menges. 1996. Interpretation of elasticity matrices as an aid to the management of plant populations for conservation. *Conservation Biology* 10:591-597.
- Silvertown, J., Franco, M., Pisanty, I. & A. Mendoza. 1993. Comparative plant demography relative importance of life-cycle components to the finite rate of increase in woody, herbaceous perennials. *Journal of Ecology* 81:465-476.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution* 47:264-279.
- StatSoft. 2011. STATISTICA (Data Analysis Software System) v.10. www.statsoft.com.
- Stevenson, D. W. 1990. Morphology and systematics of the Cycadales. *Memoirs of the New York Botanic Garden* 57:8-5.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A. G. & J. F. Cosson. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7:453-464.
- Tonsor, S. J., Kalisz, S., Fisher, J. & T. P. Holtsford. 1993. A life history based study of population genetic structure: seed bank to adults in *Plantago lanceolata*. *Evolution* 47:833-843.
- Tomasco, I. & E. Less. 2015. Variación genética. Equilibrio Hardy-Weinberg y mutación. Pp. 5-45. *En: Bracho, A., Sortibrán, A. & D. Piñero (eds.). EVOLUCIÓN ORGÁNICA. Universidad Nacional Autónoma de México.*
- Toledo, V. M. 1982. Pleistocene changes of vegetation in tropical Mexico. Pp. 93-111. *En: Prance, G. T. (ed.). Biological Diversification in the Tropics. Columbia Univ. Press, New York.*
- Toledo, V. M. 1988. La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo* 14:17-30.

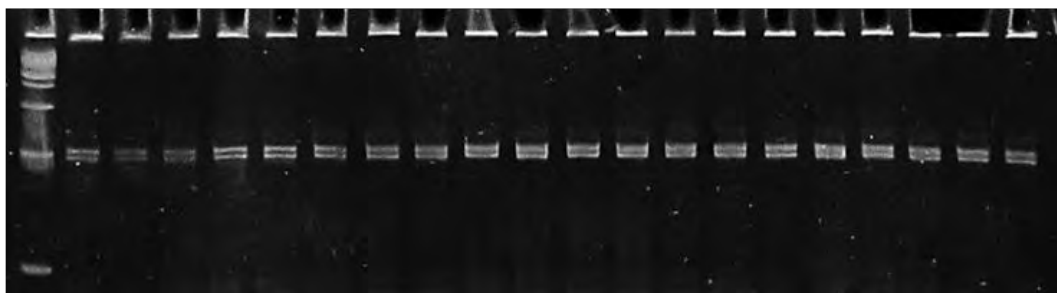
- Vovides, A. P. 1990. Spatial distribution, survival and fecundity of *Dioon edule* (Zamiaceae) in a tropical deciduous forest in Veracruz, Mexico, with notes on its habitat. *American Journal of Botany* 77:1532-1543.
- Vovides, A. P., González-Hernández, M. D., Pérez-Farrera, M. A., Avendaño, S. & C. Barcenas. 2004a. A review of research on the cycad genus *Ceratozamia* Brongn (Zamiaceae) in Mexico. *Taxon* 53:291-297.
- Vovides, A. P., Pérez-Farrera, M. A., González, D. & S. Avendaño. 2004b. Relationships and phytogeography in *Ceratozamia* (Zamiaceae). Pp. 109-125. *En*: Walters, T. & R. Osborne (eds.). *Cycad Classification: Concepts and Recommendations*. CABI Publishing, Wallingford.
- Vovides, A. P. & F. Nicolalde-Morejón. 2010. Ficha técnica de *Ceratozamia zaragozae*. Pp. 1-7. *En*: Vovides, A. P. (Compilador). *Base de datos de las cícadas mexicanas*. Instituto de Ecología A. C., INECOL. Bases de datos SNIB-CONAIO. Proyecto No. DK008. México, D. F.
- Walter, K. S. & H. J. Gillet. 1997 *IUCN Red List of Threatened Plants*. Compiled by the World Conservation Monitoring Centre. IUCN-The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Walters, T. & D. S. Decker-Walters. 1991. Patterns of allozyme diversity in the west Indies cycad *Zamia pumila* (Zamiaceae). *American Journal of Botany* 78:436-445.
- Whitelock, L. 2002. *The Cycads*. Portland: Timber Press. 374 p.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*. 28:114-138.
- Xiao, L., Ge, X. J., Gong, X., W. & G. Hao. 2004. ISSR Variation in the Endemic and Endangered Plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae). *Annals of Botany* 94:133-138.
- Xiao, L., Gong, X., Hao, G., Ge, X., Tian, B. & S. Zheng. 2005. Comparison of the genetic diversity in two species of cycads. *Australian Journal of Botany* 53:219-223.
- Yang, S. L. & A. W. Meerow. 1996. The *Cycas pectinata* (Cycadaceae) complex: genetic structure and gene flow. *International Journal of Plant Science* 157:468-483.
- Yeh, F. C. 2000. Populations genetics. Pp. 21-37. *En*: Walters, T. & R. Osborne (eds.). *Forest conservation genetics. Principles and practice*. CSIRO Publishing, Collingwood.
- Zhifeng, G. & B. A. Thomas. 1989. A review of fossil cycad megasporophylls with new evidence of *Crossozamia* Pomel and its associated leaves from the lower Permian of Taiyuan, China. *Review of Paleobotany and Palynology* 60:205-223.

13. ANEXOS

Anexo 1. Tabla de resultados de cuantificación de DNA, proteínas y sales.

	DNA Abs 280	Proteínas Abs 260/280	Sales Abs 260/230
Promedio	432.32 ng/μl	1.94	1.85

Anexo 2. Ejemplo de productos de PCR; amplificación del microsatélite Zam41, a partir de DNA de individuos de la población Sierra del Camarón.



Anexo 3. Frecuencias alélicas de los 10 microsatelites evaluados.

Locus	Alelos	El Potosino	Arroyo Moctezuma	Ejido Alamitos	Sierra del Camarón	Pico del Agujón	Cerro la Calavera
zam45	N	20	11	20	20	20	12
	92	0.025	0.045	0.000	0.100	0.275	0.333
	94	0.575	0.409	0.500	0.400	0.175	0.292
	98	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	100	0.325	0.455	0.325	0.350	0.350	0.208
	102	0.050	0.091	0.175	0.150	0.200	0.167
zam41	N	20	11	20	20	20	12
	192	0.000	0.000	0.000	0.075	0.000	0.000
	194	0.000	0.000	0.325	0.350	0.025	0.000
	196	0.175	0.091	0.150	0.075	0.050	0.000
	198	0.325	0.000	0.000	0.000	0.275	0.125
	200	0.000	0.318	0.025	0.000	0.100	0.208
	202	0.000	0.091	0.000	0.000	0.050	0.167
	206	0.025	0.091	0.000	0.275	0.025	0.125
	208	0.300	0.182	0.500	0.225	0.400	0.000

		210	0.175	0.227	0.000	0.000	0.075	0.250
		234	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.125
zam40	N		20	10	20	20	20	5
		228	0.000	0.000	0.000	0.200	0.350	0.000
		230	0.025	0.250	0.450	0.275	0.050	0.300
		232	0.350	0.400	0.100	0.100	0.200	0.400
		234	0.150	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		258	0.000	0.000	0.000	0.025	0.025	0.000
		259	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000
		262	0.000	0.000	0.025	0.025	0.075	0.000
		264	0.000	0.000	0.000	0.050	0.075	0.000
		266	0.025	0.050	0.025	0.075	0.050	0.100
		268	0.050	0.100	0.050	0.100	0.075	0.100
		270	0.050	0.050	0.150	0.100	0.000	0.100
		272	0.075	0.100	0.025	0.050	0.075	0.000
		274	0.150	0.000	0.075	0.000	0.025	0.000
		276	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000
		278	0.050	0.050	0.025	0.000	0.000	0.000
		282	0.075	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
zam39	N		20	11	20	20	20	12
		126	0.600	0.636	0.750	0.450	0.600	0.208
		134	0.050	0.000	0.025	0.025	0.000	0.083
		136	0.200	0.136	0.025	0.200	0.150	0.333
		138	0.150	0.182	0.200	0.275	0.200	0.167
		140	0.000	0.045	0.000	0.050	0.050	0.208
zam35	N		20	11	20	20	20	12
		70	0.000	0.318	0.450	0.000	0.000	0.000
		72	0.500	0.545	0.500	0.525	0.125	0.000
		74	0.500	0.136	0.025	0.450	0.525	0.583
		76	0.000	0.000	0.025	0.025	0.350	0.417
zam34	N		20	11	20	20	20	12
		154	0.100	0.182	0.100	0.000	0.000	0.000
		156	0.450	0.409	0.425	0.650	0.525	0.542
		162	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000
		164	0.100	0.000	0.075	0.075	0.000	0.042
		166	0.300	0.409	0.350	0.275	0.350	0.250
		168	0.050	0.000	0.000	0.000	0.125	0.167
		100	0.000	0.000	0.000	0.025	0.225	0.125
		102	0.350	0.273	0.250	0.150	0.200	0.333
		104	0.275	0.227	0.050	0.125	0.000	0.000
		106	0.375	0.500	0.700	0.700	0.575	0.542
zam33	N		20	11	20	20	20	12

		70	0.000	0.000	0.025	0.175	0.000	0.000
		72	0.625	0.545	0.600	0.225	0.000	0.000
		74	0.075	0.091	0.000	0.125	0.525	0.458
		76	0.300	0.364	0.375	0.475	0.425	0.458
		78	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.083
zam32	N		20	11	20	20	20	12
		76	0.600	0.636	0.675	0.650	0.700	0.750
		78	0.400	0.364	0.325	0.350	0.300	0.250
zam29	N		20	11	20	20	20	12
		76	0.500	0.455	0.450	0.500	0.350	0.417
		78	0.500	0.545	0.550	0.500	0.650	0.583
zam28	N		20	11	20	20	20	12
		84	0.775	0.045	0.025	0.325	0.375	0.375
		86	0.000	0.409	0.350	0.275	0.150	0.333
		88	0.225	0.455	0.475	0.150	0.250	0.250
		90	0.000	0.091	0.150	0.200	0.150	0.042
		92	0.000	0.000	0.000	0.050	0.075	0.000

Anexo 4. Permiso de colecta de material biológico.



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 INGENIERÍA
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: artsaq@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, jmeija@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 Alanís.- 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

LESEM/ACO/FSC

c:oscar/colecta cientifica/AnuroSanchezGonzalez(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".

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