



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ASPECTOS DEMOGRÁFICOS Y VARIABILIDAD GENÉTICA EN
Zamia katzeriana (Regel) Retting, EN LA SIERRA DE TABASCO,
MÉXICO

TESIS:

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
AMBIENTALES

PRESENTA:

CELENIA ZAPATA HERNÁNDEZ

ASESORES:

DRA. NELLY DEL CARMEN JIMÉNEZ PÉREZ

DRA. JULIA MARÍA LESHER GORDILLO

VILLAHERMOSA TABASCO, AGOSTO DE 2016



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

“ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE”

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN



AGOSTO 03 DE 2016

**C. CELENIA ZAPATA HERNÁNDEZ
PAS. DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES
P R E S E N T E**

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales titulado: **“ASPECTOS DEMOGRÁFICOS Y VARIABILIDAD GENÉTICA EN *Zamia katzeriana* (Regel) Retting. EN LA SIERRA DE TABASCO, MÉXICO”**, asesorado por la Dra. Nelly del Carmen Jiménez Pérez y Dra. Julia María Leshner Gordillo sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado está integrado por el Dr. Raymundo Hernández Martínez, Dr. Stefan Louis Arriaga Weiss, Dra. Nelly del Carmen Jiménez Pérez, Dra. Danaé Cabrera Toledo y Dr. Carlos Manuel Burelos Ramos.

Por lo cual puede proceder a concluir con los trámites finales para fijar la fecha de examen.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE

M. EN C. ROSA MARTHA PADRON LOPEZ
DIRECTORA

C.c.p.- Expediente del Alumno.
C.c.p.- Archivo

UJAT
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN
Tabasco

CARTA AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis de Maestría denominado: **“ASPECTOS DEMOGRÁFICOS Y VARIABILIDAD GENÉTICA EN *Zamia katzeriana* (Regel) Retting. EN LA SIERRA DE TABASCO, MÉXICO”**, de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco el Trabajo Recepcional antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en éste documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco el Día 03 de Agosto de 2016.

AUTORIZO



CELENIA ZAPATA HERNÁNDEZ

Dedicatoria

A dios: Por a verme dado fortaleza, salud y la perseverancia para culminar mis estudios de maestría.

A mis padres: Quienes me han apoyado siempre en todos mis proyectos, por su amor y cariño. Este logro igual es de ustedes.

A mi esposo: Por estar a mi lado y apoyarme incondicionalmente, por sus consejos, palabras de aliento, por motivarme a seguir a delante y sobre todo por su amor. Te amo

A mis hermanos: Por estar al pendiente de mí, por su cariño y apoyo. Los quiero mucho

Agradecimientos

Agradezco a mi directora de tesis la doctora Nelly del Carmen Jiménez Pérez, por apoyarme en los años de la maestría de forma académica y económica cuando no tenía beca. Por su tiempo, paciencia y dedicación al apoyarme en la escritura de esta tesis y en el artículo. Muchas Gracias

Gracias a la doctora Julia María Leshner Gordillo, también directora de esta tesis, por su apoyo personal, académico y económico durante el posgrado, por darme la oportunidad de trabajar nuevamente en el laboratorio de genómica y enseñarme sobre genética de poblaciones, por su tiempo y dedicación. Gracias

Gracias a los integrantes de mi comité tutorial y sinodal. Al Dr. Raymundo Hernández Martínez, al Dr. Stefan Louis Arriaga Weiss y al Dr. Carlos Manuel Burelos Ramos, por sus aportaciones durante realización de esta tesis. Así mismo agradezco a la Dra. Dánae Cabrera Toledo por darme la oportunidad de realizar mi estancia en el laboratorio de Sistemática Molecular Vegetal, en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, de la Universidad de Guadalajara, y por ayudarme en los análisis estadísticos de estructura poblacional.

Por ultimo agradezco a mis compañeros de laboratorio Lupita, Sandra, Alex, Alejandra, Félix, Oscar, Onésimo, Eder, Yazmin, por su apoyo incondicional en los monitores y mis análisis de laboratorio y sobre todo por su amistad.

| | Índice | Página |
|------------------|---|---------------|
| Lista de cuadros | | VIII |
| Lista de figuras | | XIX |
| Abreviaturas | | X |
| Resumen | | 12 |
| I | Introducción | 14 |
| II | Antecedentes | 16 |
| 2.1. | Relación de los estudios demográficos y genéticos, su importancia en el estudio de las poblaciones | 16 |
| 2.2 | Estudios demográficos en cícadras | 17 |
| 2.3 | Estudios genéticos en cícadras | 19 |
| 2.4 | Estudios que integran genética y demografía de poblaciones | 22 |
| III. | Justificación | 22 |
| IV. | Hipótesis | 24 |
| V | Objetivos | 24 |
| VI. | Materiales y métodos | 24 |
| 6.1 | Especie de estudio | 24 |
| 6.2. | Descripción del área de estudio | 26 |
| 6.3. | Estudio de aspectos demográficos de las poblaciones | 28 |
| 6.3.1. | Monitoreos para el estudio de estructura poblacional | 28 |
| 6.3.2 | Análisis de datos para estructura poblacional, patrones de crecimiento y aproximaciones de la edad. | 28 |
| 6.4. | Estudios de variabilidad genética. | 29 |
| 6.4.1. | Colecta de material biológico y extracción de ADN | 29 |
| 6.4.2. | Amplificación de ADN por medio de Microsatélites | 29 |
| 6.4.3. | Análisis estadístico para el estudio de diversidad genética | 31 |
| 6.4.4. | Estructura Genética | 32 |
| 6.4.5. | Distribución de la variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones | 33 |
| 6.4.6. | Distancia genética | 33 |
| 6.4.7. | Análisis de distribución espacial | 34 |

| | | |
|--------|--|----|
| VII. | Resultados | 35 |
| 7.1. | Estructura poblacional con base en categorías del tamaño de la hoja. | 35 |
| 7.1.1. | Tasas de crecimiento | 36 |
| 7.2. | Determinación de la diversidad y estructura genética de las poblaciones de <i>Zamia katzeriana</i> | 39 |
| 7.2.1. | Diversidad genética | 39 |
| 7.2.2. | Estructura genética | 41 |
| 7.2.3. | Distribución de la variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones | 43 |
| 7.2.4. | Distancias genéticas | 43 |
| 7.2.5. | Distribución espacial de las poblaciones de <i>Zamia katzeriana</i> | 44 |
| VIII. | Discusión | 46 |
| 8.1. | Estructura poblacional con base en categorías de tamaño de la hoja | 46 |
| 8.2. | Determinación de la diversidad y estructura genética de las poblaciones de <i>Zamia katzeriana</i> | 48 |
| 8.2.1. | Diversidad genética | 48 |
| 8.2.2. | Estructura genética | 50 |
| 8.2.3. | Distribución de la variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones | 52 |
| 8.2.4. | Distancias genéticas | 52 |
| 8.2.5. | Distribución espacial de las poblaciones de <i>Zamia katzeriana</i> | 53 |
| IX. | Conclusión | 54 |
| X. | Recursos | 54 |
| XI. | Bibliografía | 55 |
| | Anexo | 62 |

Índice de cuadros

| | | |
|------------------|--|-----------|
| Cuadro 1. | 10 Iniciadores microsatélites de <i>Zamia integrifolia</i> aislados por Meerow y Nakamura en el 2007 | 30 |
| Cuadro 2. | Cuatro Iniciadores microsatélites de <i>Zamia Katzeriana</i> diseñados a partir de secuencias de cloroplastos obtenidas de GenBank | 30 |
| Cuadro 3. | Categorías de estadios de vida de <i>Zamia katzeriana</i> según el tamaño de la hoja | 36 |
| Cuadro 4 | Análisis de varianza (ANOVA) para tasa de crecimiento, utilizando una variable dependiente y dos factores categóricos A: población y B: Categoría de tamaño. | 39 |
| Cuadro 5. | Análisis de varianza, utilizando como variable dependiente la tasa de crecimiento | 39 |
| Cuadro 6 | Estimadores de diversidad genética en tres poblaciones de <i>Zamia katzeriana</i> | 41 |
| Cuadro 7. | Resultados de la prueba de Wilcoxon para detectar eventos de cuello de botella | 41 |
| Cuadro 8 | Promedios de Estadísticos de <i>F</i> de Wright (1951) para 6 loci microsatélites de <i>Zamia katzeriana</i> | 42 |
| Cuadro 9. | AMOVA en base a 6 loci polimórficos analizados en tres poblaciones de <i>Zamia katzeriana</i> , Tabasco, México. | 43 |

Índice de figuras

| | | |
|------------------|---|-----------|
| Figura 1. | Planta adulta de <i>Zamia katzeriana</i> , B) Hoja nueva de <i>Zamia katzeriana</i> . Población de Villa Guadalupe, Huimanguillo, Tabasco. | 25 |
| Figura 2. | Poblaciones estudiadas de <i>Zamia katzeriana</i> en Tabasco, México | 27 |
| Figura 3. | Tasas de crecimiento por categoría de tamaño de <i>Zamia katzeriana</i> | 37 |
| Figura 4. | Tasa de crecimiento por población de <i>Zamia katzeriana</i> | 38 |
| Figura 5. | Amplificaciones de los 6 iniciadores utilizados, en geles de agarosa al 2%. | 40 |
| Figura 6. | Representación gráfica de la estructura genética real de las poblaciones estudiadas de <i>Zamia katzeriana</i> , obtenida mediante el programa STRUCTURE v 2.3.3. | 42 |
| Figura 7. | Dendograma de las tres poblaciones estudiadas usando la distancia genética de Nei 1972 | 44 |
| Figura 8. | Distribución espacial de las poblaciones de <i>Zamia katzeriana</i> , utilizando el programa Primer 6.1.6 versión 2006 (PRIMER-E Ltd) | 45 |

Abreviaturas

| | |
|----------------------------|---|
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico |
| AB | Agua Blanca |
| PCR | Polymerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| MI | Milimolar |
| Pb | Pares de bases |
| N_e | Tamaño efectivos de la población |
| Nm | Flujo génico |
| M | Molar |
| H_e | Heterocigosidad esperada |
| H_o | Heterocigosidad observada |
| cm² | Centímetro cuadrado |
| mL | Mililitro |
| g | Gramo |
| mg | Miligramo |
| ng | Nanogramo |
| µL | Microlitro |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| Tris HCL | Tris (hidroximetil) aminometano ácido clorhídrico |
| RNAse | Ribonucleasa |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| TAE | Tris-Ácido Acético-EDTA |
| UPGMA | Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean o Método de pares de grupos no ponderados con la media aritmética |
| AMOVA | Análisis molecular de varianza |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| IAM | Modelo de alelos infinitos |
| SMM | Modelo gradual de mutación estricta |
| F_{ST} | Coefficiente de diferenciación genética entre poblaciones |

| | |
|-----------------------|---|
| F_{IS} | Coeficiente de endogamia entre poblaciones |
| F_{IT} | Coeficiente de endogamia total |
| T.C | Tasa de crecimiento |
| λ | Tasa finita de crecimiento |
| VG | Villa de Guadalupe |
| NCBI | Centro Nacional de Información Biotecnológica |

Anexo

Cuadros

Cuadro 1 Tabla de toma de datos en los monitoreos de *Zamia katzeriana*, población de Agua blanca **62**

Cuadro 2 Frecuencia alélica por locus de *Zamia katzeriana* **63**

Figuras

Figura 1 Dendograma general de Similitud de las tres poblaciones estudiadas de *Zamia katzeriana* según el coeficiente de Dice, 1: P1 Villa Guadalupe, 2: P2 Villa Guadalupe, 3: Agua Blanca. **64**

Resumen

Los estudios demográficos y genéticos han generado durante años por si solos, una vasta información acerca del estado de conservación de diferentes poblaciones de plantas. Actualmente la complementación de estos dos tipos de estudio ha ayudado a la implementación de mejores estrategias de conservación para especies endémicas, en riesgo o en peligro de extinción, ya que la información obtenida es más robusta y consistente. *Zamia katzeriana* es una especie endémica de México, con distribución restringida a los estados de Tabasco, Veracruz y Chiapas. A la fecha no hay ningún estudio sobre su diversidad genética, ni tampoco sobre el estado de sus poblaciones y debido a que es una especie que está en la NOM-059-SEMARNAT-2010 en categoría de peligro de extinción, es necesario el desarrollo de estudios que ayuden a su conservación. Por lo anterior, se planteó evaluar la diversidad genética y aspectos demográficos de tres poblaciones de *Zamia katzeriana* distribuidas en la sierra de Tabasco, dos localizadas en Villa Guadalupe, Huimanguillo y una en Agua Blanca, Macuspana. Para esto, se realizaron cuatro monitoreos, durante un año. La extracción del ADN para los estudios genéticos, se realizó utilizando muestras de material vegetal de 72 individuos. La estimación de los datos demográficos para establecer los estadios de edades, dio como resultados cinco niveles (plántula, juvenil 1 y 2, adulto1 y 2). No hubo crecimiento estadísticamente significativo para ninguno de los estadios de vida. Los estudios de diversidad genética empleando seis marcadores microsátélites muestran una alta similitud entre las poblaciones, la H_e (heterocigosidad esperada) y H_o (Heterocigosidad observada) estuvieron entre 0.265-0.349 y 0.220-0.252 respectivamente, el índice de fijación fue positivo para todas las poblaciones a nivel poblacional, sin embargo los resultados obtenidos no muestran un cuello de botella evidente. Según los datos obtenidos en el AMOVA la diversidad genética de las poblaciones estudiadas se encuentra, intrapoblacionalmente con un 93% y el índice de diferenciación que hay entre las poblaciones (F_{st}) es de 0.146. Los estadísticos de F (F_{is} y F_{it}) son positivos (0.303 y 0.325 respectivamente), reflejando un déficit de heterocigotos y la presencia de endogamia en las poblaciones. El índice de migración muestra que hay un alto

flujo genético entre las poblaciones ($Nm= 6.968$). Los datos sugieren que solo hay dos poblaciones genéticamente diferenciadas. Con base en los resultados obtenidos las poblaciones más estables tanto genética como demográficamente son las de Villa de Guadalupe, esto debido a que el sitio donde se encuentran es más conservado, lo que favorece a que el número de individuos sea mayor. Se recomiendan la implementación de estrategias de conservación para las poblaciones, especialmente para las poblaciones de Agua Blanca.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

I. Introducción

Las cícadas forman un grupo de gimnospermas dioicas tropicales y subtropicales, junto con *Ginkgo*, son consideradas como las plantas con semilla más antiguas que aún existen (Arnold, 1953). El registro fósil indica que han existido desde el periodo pérmico hace unos 280 millones de años (Zhifeng-Gao y Thomas, 1989) y posiblemente desde el carbonífero hace 345 millones de años (Mamay, 1976).

Se clasifican en tres familias *Cycadaceae*, *Stangeriaceae* y *Zamiaceae* (Whitelock, 2002). La familia *Zamiaceae* (Johnson, 1959), está compuesta por ocho géneros, cinco de ellos están en el Neotrópico: *Chigua* D.W. Stev., endémico de Colombia; *Dioon* Lindl y *Ceratozamia* Brong., endémico de México; *Microcycas* (Miq.) A. DC., endémico de Cuba, y *Zamia* L. que incluye 61 especies (Hill *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2009), con una distribución desde la costa sureste de Estados Unidos, hasta Bolivia y el suroeste de Brasil (Balduzzi *et al.*, 1982; Sabato, 1990; Norstog y Nicholls, 1997).

En México la familia *Zamiaceae* esta compuestas por 42 especies de tres géneros: *Ceratozamia*, *Dioon* y *Zamia*. Este hecho coloca a México en segundo lugar mundial después de Australia en diversidad de cícadas (Hill *et al.*, 2007). En nuestro país habitan aproximadamente 20% de las especies del mundo, de este porcentaje más del 80% (cerca de 34) de las especies son endémicas del país. El género *Zamia* ocupa una diversidad de hábitats mayor que los otros géneros mexicanos, por lo que es más diverso y más difícil de caracterizar (Norstog y Nicholls, 1997) debido a que sus patrones de variación morfológica, ecológica, citológica y genética (Limón, 2012) son muy complejos.

Actualmente, el género *Zamia* al igual que todas las cícadas, es un grupo vegetal fuertemente amenazado y la mayoría se encuentra en peligro de extinción en condiciones silvestres, debido principalmente a la pérdida de hábitat, por el constante cambio de uso de suelo en las zonas tropicales, al saqueo y tráfico ilegal por su belleza ornamental (Osborne, 1995; IUCN, 1997).

En Tabasco se encuentran tres especies de *Zamia* (Nicolalde–Morejón *et al.*, 2009) todas enlistadas en la NOM-059-SEMARNAT- 2010, entre ellas esta *Zamia katzeriana* con estatus “en peligro de extinción” (Nicolalde–Morejón *et al.*, 2014) por lo que es protegida legalmente a nivel nacional e internacional (IUCN 2012).

Zamia katzeriana se distribuye en los estados de Veracruz, Tabasco y Chiapas entre 200-700 m.s.n.m. Es una especie de sotobosque, asociado a vegetación en buen estado de conservación, principalmente bosque tropical perennifolio (Rzedowski, 1978).

A pesar de ser *Zamia katzeriana* una especie protegida, el tamaño de sus poblaciones ha disminuido en los últimos 50 años en un 75% (Vovides *et al.*, 2010), este hecho se atribuye principalmente a la pérdida de hábitat. Debido a que los factores de riesgo que enfrenta son extremos, es importante el desarrollo de estudios que permitan obtener información valiosa, para proponer programas de conservación y manejo sustentable para la especie.

La demografía es un área que ha generado información sobre la dinámica de las poblaciones, actualmente asociada a la genética de poblaciones, hacen de la información originada una herramienta clave y esencial para las investigaciones en biología de la conservación (Lande, 1988; Yu *et al.*, 2011), ya que ofrecen nuevas perspectivas sobre la aptitud, la propagación de mutaciones dentro de las poblaciones y el establecimiento de las historias de vida en un contexto filogenético (Metcalf y Pavard, 2006), lo cual permite conocer los patrones de diversidad y estructura genética de las especies; así como inferir la influencia de los procesos microevolutivos, como la endogamia, el flujo génico, la selección natural y la deriva génica (Lewontin, 1974).

El propósito de esta investigación es realizar un análisis de diversidad genética y estructura poblacional de *Z. katzeriana* en la sierra de Tabasco, con la finalidad de determinar el estado de conservación en el que se encuentran las poblaciones y generar conocimiento científico útil para planear un manejo sustentable.

II. Antecedentes

2.1. La relación de los estudios demográficos y genéticos, su importancia en el estudio de las poblaciones

Los estudios demográficos permiten determinar la estabilidad de las poblaciones, mediante la observación de eventos que éstas presentan a lo largo del tiempo, como la natalidad, mortalidad, fertilidad y la dispersión de individuos de cada edad durante su historia de vida (Metcalf y Pavard, 2006). El balance entre dichos parámetros define en última instancia la adecuación de las poblaciones y su persistencia en el tiempo (Cabrera-Toledo, 2009), a través del valor Lambda (λ), que es la tasa finita de crecimiento (Salomé-Castañeda, 2009). Al analizar los resultados de los parámetros demográficos obtenidos, es posible detectar los componentes críticos que deben ser considerados en el establecimiento de procedimientos de extracción y manejo de recursos, para no poner en riesgo la persistencia de las poblaciones (Salomé-Castañeda, 2009).

La ecología molecular, mediante la genética de poblaciones, estudia los parámetros genéticos, que describen la forma en que la variación genética se distribuye dentro y entre poblaciones (Limón, 2009; Cabrera-Toledo, 2009), determinando así su estructura genética. A partir de la información obtenida se puede inferir como los procesos microevolutivos como la selección natural, el flujo genético, la endogamia, deriva génica y las mutaciones, modulan la dinámica de los genes en las poblaciones (Limón, 2009). Es por ello que el estudio de la genética de poblaciones es indispensable, para evaluar el potencial evolutivo de

las poblaciones, el cual repercute en la capacidad de estas, para adaptarse a los cambios del ambiente (Cabrera-Toledo, 2009).

Existe una estrecha relación entre los procesos demográficos y genéticos de las poblaciones, la cual radica en la influencia que tienen los procesos genéticos en las tasas vitales y viceversa (Schemske *et al.*, 1994). Ya que tanto, la genética de una población como la demografía, son producto de procesos biológicos y ecológicos, generados a lo largo de la historia de vida de la especie. Por ejemplo: en una población drásticamente reducida al mínimo, comienza una cruce entre individuos emparentados, causando altos índices de endogamia e influyendo posiblemente, a su vez negativamente en la fertilidad de la descendencia y por ende en la tasa de crecimiento (Schemske *et al.*, 1994).

2.2. Estudios demográficos en cícadas

Negrón-Ortiz y Breckon (1989), estudiaron la estructura poblacional, la fenología foliar y la rotación de la hoja, de *Zamia debilis* L.f.ex Aiton (*Zamiaceae*), durante 29 meses en Cambalache en el norte de Puerto Rico. Utilizando el número de hojas y un índice de hojas por número de folíolos, para determinar la estructura de la población. Encontraron que más del 50% de la población se compone de individuos no ramificados. La estructura poblacional que se originó, mediante las 7 clases de tamaño, fue una J invertida, típico de árboles con semillas y plantas tolerantes a la sombra. Señalan que la producción de conos no afecta la producción de hojas, pero si la escasez de agua.

Vovides (1990), estudio la distribución espacial, la supervivencia y la fecundidad de *Dioon edule*, durante cuatro años, en un bosque tropical, localizado en el centro de Veracruz. Los datos mostraron, que la población tenía una estructura poblacional de tipo "J" invertida o Deevey tipo III, esto debido a la muerte de plántulas ocasionadas por las sequias e incendios. Las plantas presentaron una distribución agregada, localizadas en zonas poco profundas y con

aflorescencias rocosas, a causa de la competencia con otras plantas. La frecuencia estimada de conificación para machos fue de 2.8 a 8.8 años y de 10 a 52 años para hembras, siendo los intervalos más cortos, los que se producen después de un año con abundante lluvia.

Negrón-Ortiz *et al.*, (1996) estudiaron la morfología reproductiva de la población de *Zamia erosa*, en Cambalache en Puerto Rico, durante 3 años y encontraron que muy pocas plantas hembras adultas producen conos en un año determinado. Llegaron a la conclusión de que la supervivencia de adultos es crucial para la persistencia de las poblaciones *Zamia* que el reclutamiento de nuevos individuos.

López (2002), realizó estudios en las poblaciones del chamal (*Dioon edule* var. *angustifolium*) en la sierra de San Carlos, Tamaulipas. Encontró, que las poblaciones se distribuyen principalmente en los bosques ralos de encinos en desarrollo avanzado, al margen de los escurrideros y arroyos. Se presentaron valores significativos en los coeficientes de correlación entre diferentes variables como: cobertura y diversidad del estrato arbustivo superior con la cobertura y densidad, cobertura de las especies arbóreas y porcentaje de conos masculinos y femeninos, cobertura y sanidad del *Dioon edule* var. *angustifolium*.

Octavio-Aguilar *et al.*, (2008) realizaron estudios sobre la dinámica poblacional de *Dioon edule* Lindl. En tres poblaciones de Veracruz: Monte Oscuro, el Farallón y el rancho del Niño. Los resultados mostraron que las poblaciones presentan una distribución espacial agregada, exceptuando las plántulas y plantas jóvenes del Farallón. Lo anterior lo atribuyen a la ausencia o falta de dispersores. Se presentó una alta mortalidad de semillas y plantas en las primeras etapas del ciclo de vida. La tasa finita de crecimiento, estuvo en función a la presencia de plantas adultas.

Salomé-Castañeda (2009), realizó estudios en dos poblaciones de *Dioon spinulosum* Dyer & Eichler (*Zamiaceae*), en San Miguel Soyaltepec, Oaxaca,

usando matrices de transición. Los resultados indicaron que las poblaciones presentaron un patrón de distribución agregado, atribuido al gran número de plántulas; la estructura poblacional tipo J invertida indicó gran mortalidad de plántulas y elevadas tasas de supervivencia de individuos juveniles y adultos. Se encontró relaciones positivas entre el tallo, altura y número de hojas. Los valores de la tasa finita de crecimiento poblacional (λ) indicaron estabilidad para ambas poblaciones e incluso un ligero crecimiento, la supervivencia de individuos reproductivos es clave para la permanencia de las poblaciones.

Rivera-Fernández *et al.* (2012) realizaron estudios sobre la estructura poblacional de *Ceratozamia mexicana* en dos poblaciones con diferente estatus de conservación (conservado y perturbado), al compararlos encontraron que el sitio conservado mostró una estructura demográfica de "J" invertida, mientras que el perturbado presentó una distribución más discontinua. La densidad poblacional fue de 0.78 individuos/m² en el sitio conservado y de 0.26 individuos/m² en el perturbado. La distribución espacial para todas las fases de desarrollo de la planta fue aleatoria, con excepción de la etapa de plántula, que fue agregada. Los resultados mostraron que la perturbación disminuye la densidad de las plantas además de eliminar individuos reproductivos, lo que pone en riesgo la persistencia de la población.

2.3. Estudios genéticos en cícadadas

González-Astorga *et al.*, (2005) realizaron la determinación de la variación genética dentro y entre poblaciones de *Dioon angustifolium*. Usando 14 marcadores aloenzimáticos. Los resultados muestran un índice de polimorfismo de $52 \pm 46.23\%$. La variación genética esta atribuida a las diferencias entre las poblaciones con 16.7%. El índice de migración fue de 1.55 ± 0.67 , datos similares a lo reportado a otras especies de plantas endémicas y con dificultades en la dispersión de semillas. Se detectó un cuello de botella reciente en las poblaciones, pero este no mostró una reducción evidente en la variación genética de las

poblaciones, ya que en comparación con otras especies de cícadas *D. angustifolium* presenta altos niveles de diversidad genética.

González-Astorga *et al.*, (2006) determinaron la diversidad y estructura genética de cuatro poblaciones de *Zamia loddigesii*, con 15 marcadores enzimáticos. Encontraron un número de alelos por locus de 1.80 ± 0.09 , el porcentaje de loci polimórficos fue de 66.6 ± 5.4 y la *He* de 0.266 ± 0.02 . El porcentaje de diferenciación entre las poblaciones fue de 18%. En cuanto al índice de migración (*Nm*) fue de 1.6. Los resultados indican que el aislamiento geográfico y la fragmentación del hábitat, que presenta *Z. loddigesii*, ha provocado la pérdida de alelos en las poblaciones.

Cabrera-Toledo *et al.*, (2008) estudiaron el exceso de heterocigosidad en cuatro poblaciones de *Dioon caputoi*, utilizando 14 marcadores enzimáticos, obteniendo una *He* mayor que la *Ho* en todas las poblaciones. Los coeficientes de endogamia (F_{is} y F_{it}) dieron valores negativos, confirmando el exceso de heterocigotos que presentaban las poblaciones. Por otro lado la F_{st} fue de 0.099, porcentaje más bajo que lo reportado para otras especies de cícadas (*Cycas seemannii*, $F_{st}= 0.594$, Keppel *et al.*, 2002; *Dioon sonorensis*, $F_{st}= 0.15$, González-Astorga *et al.*, 2009; *Macrozamia communis*, $F_{st}= 0.270$, Ellstrand *et al.*, 1990). Este bajo porcentaje lo atribuyen a la influencia de insectos polinizadores. La mayoría de las estimaciones de variación genética de *D. caputoi* fueron altas, por lo que se podría confirmar que la rareza es compatible con altos niveles de diversidad genética.

Limón (2009), estudió la genética de cinco poblaciones de *Zamia furfuracea* L. f. usando 20 marcadores aloenzimáticos, de los cuales se obtuvieron un total de 40 bandas polimórficas. El número promedio de alelos por locus fue de 1.72 y el índice de polimorfismo promedio fue 97.8%. Se presentó una *He* de 0.3313 y un exceso de homocigotos en todas las poblaciones, lo que indicó la pérdida de variabilidad genética por efecto de la endogamia. La diferenciación genética fue

similar ($F_{st}=16\%$) a la encontrada en otras especies de cícadas (*Z. loddigesii*, $F_{st}=0.179$, Aguirre-Fey, 2004; *D. angustifolium*, $F_{st}=0.167$, González-Astorga *et al.* 2005).

González-Astorga *et al.*, (2009) determinaron la diversidad y la estructura genética de cuatro poblaciones de *Dioon sonorensis*, mediante la utilización de 19 loci aloenzimáticos. Las estimaciones de diversidad genética que encontraron fueron: 2.0 ± 0.04 de alelos por locus, con un porcentaje de polimorfismo de 68.4% a 89.5%, la H_o fue mayor que la H_e (0.330-0.314 respectivamente). Las subpoblaciones estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg, pero se presentó un exceso de homocigotos ($F_{it}=0.314$). La variación genética atribuida a la diferencia entre las poblaciones fue de 15%. Los resultados indican que el aislamiento geográfico, causado por los efectos históricos del pleistoceno, entre las poblaciones, ha causado una variación clinal de las frecuencias alélicas.

Limón (2012), realizó estudios de diversidad y distribución de la variación genética de *Zamia loddigesii* Miq en la vertiente del golfo de México, usando marcadores moleculares ISSR, encontrando un nivel de polimorfismo de 97.28%. El número de alelos fue de 1.97 y el índice de Shannon de 0.38. La estructura poblacional según el método bayesiano fue de 40 y 56%, el flujo génico encontrado fue de 0.36, la prueba de Mantel no fue significativa. Estos resultados mostraron un mayor grado de diferenciación genética, a lo reportado en un estudio previo con aloenzimas (González-Astorga *et al.*, 2006).

Nolasco-Soto *et al.*, (2015) investigaron la estructura filogeográfica y la historia demográfica de *Zamia paucijuga*, basándose en 120 secuencias de ITS2 y 117 de PSBK /I, de 13 poblaciones localizadas a lo largo de todo el rango de distribución de la especie. Se detectaron un total de 19 haplotipos, 15 del ITS2 y cuatro de PSBK/I. La diversidad genética estimada para PSBK es relativamente más baja que la de ITS2. Implicando que la diversidad genética de *Z. paucijuga* es relativamente más baja que la presentada en otras cícadas, pero relativamente

más alta que la encontrada en coníferas. Los AMOVAs jerárquicos y no jerárquicos, mostraron tanto niveles bajos como altos de estructura genética, esta discrepancia, probablemente refleja una disminución en el flujo de genes. La prueba de SAMOVI mostró para ambos loci, una alta correspondencia con la estructura geográfica regional, lo que indica el uso de ambas regiones de genes nucleares y de cloroplastos. Mejorando así las inferencias sobre los procesos evolutivos que afectan la dinámica poblacional de *Z. paucijuga*.

2.4. Estudios que integran genética y demografía de poblaciones

A partir de los estudios realizados que integran la relación entre las características de la historia de vida y la estructura genética de las poblaciones en cícadas, la mayoría de los investigadores han llegado a la conclusión que la diversidad genética de cada población está estrechamente relacionada con la historia evolutiva, biogeográfica y ambiental de cada especie y que los individuos con mayor distribución y variación genética en las poblaciones son los organismos adultos, por tanto su permanencia en las poblaciones es de gran importancia (*Zamia loddigesii*, Aguirre, 2004; *Dioon caputoi* y *Dioon merolae*, Cabrera–Toledo, 2009; *Ceratozamia mexicana*, Rivera-Fernández, 2012). Solo en un estudio realizado a *Dioon edule* se encontró que el mayor reservorio de variación genética se encuentra en las plántulas y en las semillas, pero también afirma la importancia de la permanencia de los individuos adultos en las poblaciones naturales, pues son los que aportan la semilla.

III. Justificación

De manera similar a lo que ocurre en los países donde se distribuyen cícadas, casi todas las especies mexicanas enfrentan serios problemas de supervivencia en el medio natural, resultado de la destrucción del hábitat, debido a la ampliación de áreas dedicadas a la agricultura, la ganadería, al saqueo y tráfico ilegal de plantas y semillas del medio natural.

Debido a la restricción de su distribución, al tamaño poblacional y a la especificidad de hábitats *Zamia katzeriana* puede ser catalogada como una especie rara, es por ello que está enlistada en la NOM-059-SEMARNAT- 2010 en la categoría, "peligro de extinción". A pesar de ser una especie prioritaria, sus poblaciones siguen decreciendo de forma constante, como consecuencia principalmente de la pérdida de su hábitat natural, por el cambio de uso de suelo. Por lo que es necesario el desarrollo de estudios que ayuden a orientar estrategias de manejo para atenuar este problema.

La demografía y la genética de poblaciones son disciplinas que a la fecha han generado una vasta información sobre el estado de conservación en el que se encuentran diversas poblaciones de plantas, brindando un panorama más amplio sobre el estado de conservación en el que se encuentran y de igual forma dando pie a la generación de mejores estrategias para la preservación de las especies, principalmente para especies endémicas, raras o que han estado sujetas a fuertes presiones de fragmentación de su hábitat (Alvarez-Buylla *et al.*, 1996; Hamrick y Godt, 1996).

Por lo anterior, en este estudio se plantea la integración de elementos de demografía y genética en tres poblaciones de *Zamia katzeriana* presentes en la sierra de Tabasco. Considerando particularmente la importancia evolutiva, ecológica y ornamental de esta especie que presenta distribución restringida, siendo endémica de México. Se pretende que los resultados aporten conocimientos no conocidos con anterioridad y definan el estado de conservación para las poblaciones, tomando en cuenta que este sería el primer estudio tanto genético como demográfico para la especie.

IV. Hipótesis

Las poblaciones de *Zamia katzeriana*, debido a la pérdida de su hábitat natural y a la fragmentación de las poblaciones, presentarán estructuras poblacionales compuestas en su mayoría por individuos adultos por ser demográficamente menos susceptibles al disturbio y dado a la reducción drástica de sus poblaciones, presentaran bajos niveles de diversidad genética.

V. Objetivos

Objetivo general

- Analizar los procesos demográficos y genético poblacionales de *Zamia katzeriana* distribuidas en la sierra de Tabasco, México.

Objetivos específicos

- Determinar la estructura poblacional de tres poblaciones de *Zamia katzeriana* con base en categorías del tamaño de la hoja.
- Determinar la diversidad y estructura genética de las poblaciones
- Evaluar la distribución de la variación genética entre y dentro de las poblaciones.
- Calcular la distancia genética entre las poblaciones
- Determinar la distribución espacial de las plantas de cada población estudiada de *Zamia katzeriana*.

VI. Materiales y métodos

6.1. Especie de estudio

Zamia katzeriana es una planta de lento crecimiento, dioica de hasta 1.6 m de alto (Figura 1), su tronco es subterráneo y puede llegar a medir 25 cm de largo y 7 cm de diámetro. Presenta catáfilas cartáceas, semi-decíduas, base triangular y

ápice aristada de 1.4 cm de ancho en la base y 5.3 cm de largo, con indumento amarillento (Nicolalde-Morejón *et al.*, 2008).

Las hojas (de 1 a 3) son adpresas de 180 cm de largo por 36 o 70 cm de ancho, cuando las hojas son nuevas presentan un color rosado intenso (Figura 1), pecíolo terete con agujones simples; raquis de 35 a 75 cm de largo, inermis, con 3 o 7 pares de folíolos, estos son coriáceos, oblongo-lanceolados, opuestos a subopuestos de 18 a 35 cm de largo por 4.5 o 12 cm de ancho; venación inconspicua, superficie adaxial con cutícula brillante, sésil, base cuneada, ápice acuminado, asimétrico, margen denticulado sobre la mitad distal, subrevoluto; articulación de 0.6 a 1.6 cm de ancho (Nicolalde-Morejón *et al.*, 2008).



Figura 1. A) Planta adulta de *Zamia katzeriana*, B) Hoja nueva de *Zamia katzeriana*. Población de Villa Guadalupe, Huimanguillo, Tabasco.

Una planta puede presentar de 1 a 5 microstróbilos, cónicos, de 3.9 cm de largo por 1.1 cm de diámetro, de color café tomentoso con ápice agudo; la microsporofila es cuneiforme, con el extremo distal hexagonal truncado; el pedúnculo mide 3.8 cm de largo, descendente y de color amarillento (Nicolalde-Morejón *et al.*, 2008).

El megastróbilo usualmente solitario de 8 a 12 cm de largo, con 4.5 o 6 cm de diámetro, elípticos, marrón tomentulosos, ápice aristado de hasta 0.8 cm. Las megasporófilas miden cerca de 2.6 cm de largo por 1.5 cm de diámetro, cuneado-peltado, extremo distal hexagonal-truncado; pedúnculo de 11 a 14 cm de largo, descendente, tomentoso. Las semillas son ovoides de 1.2 cm de largo por 1.8 cm de diámetro, la sarcotesta es rosa cuando inmaduras, y rojas cuando maduras (Nicolalde-Morejón *et al.*, 2008). Su número cromosómico es de $2n= 16$ (Schutzman, 1984). El ciclo de maduración de los conos femeninos es de aproximadamente un año (Vovides, A. P. y Nicolalde-Morejón, 2010). Es polinizada por insectos (Norstog y Fawcett, 1989).

Sus poblaciones están generalmente localizadas en suelos profundos con gran cantidad de materia orgánica y afloramientos rocosos; sin embargo, dado el índice de deforestación que experimenta el sureste de México, también es reportada en relictos de vegetación alterada (Vovides, A. P. y Nicolalde-Morejón, 2010).

Zamia katzeriana está incluida dentro de un complejo que lleva su nombre (Complejo *Z. katzeriana*) junto con las especies: *Z. cremnophila* Vovides, Schutzman y Dehgan, *Z. lacandona* Schutzman y Vovides y *Z. purpurea* Vovides, J. D. Rees y Vázq. Torres, las cuales se caracterizan por sus folíolos anchos (3-11 cm) y coriáceos, y tallos subterráneos (Nicolalde-Morejón *et al.*, 2008 y 2011).

6.2. Descripción del área de estudio

Los muestreos de material vegetal y los monitoreos de las poblaciones se llevaron a cabo a partir del 14 de diciembre del 2013 al 14 de noviembre del 2014 en dos de los municipios de la región Sierra de Tabasco, en Huimanguillo en la comunidad de Villa Guadalupe y en el parque estatal de Agua Blanca, Macuspana (Figura 2).

La localidad de Villa de Guadalupe está situada en el municipio de Huimanguillo a 400 metros de altitud. El clima predominante es cálido húmedo con abundantes lluvias en verano: Presenta una temperatura media anual de 26.2°C, con máximas en mayo de 30.6°C. Su vegetación pertenece a la de bosque tropical perennifolio.

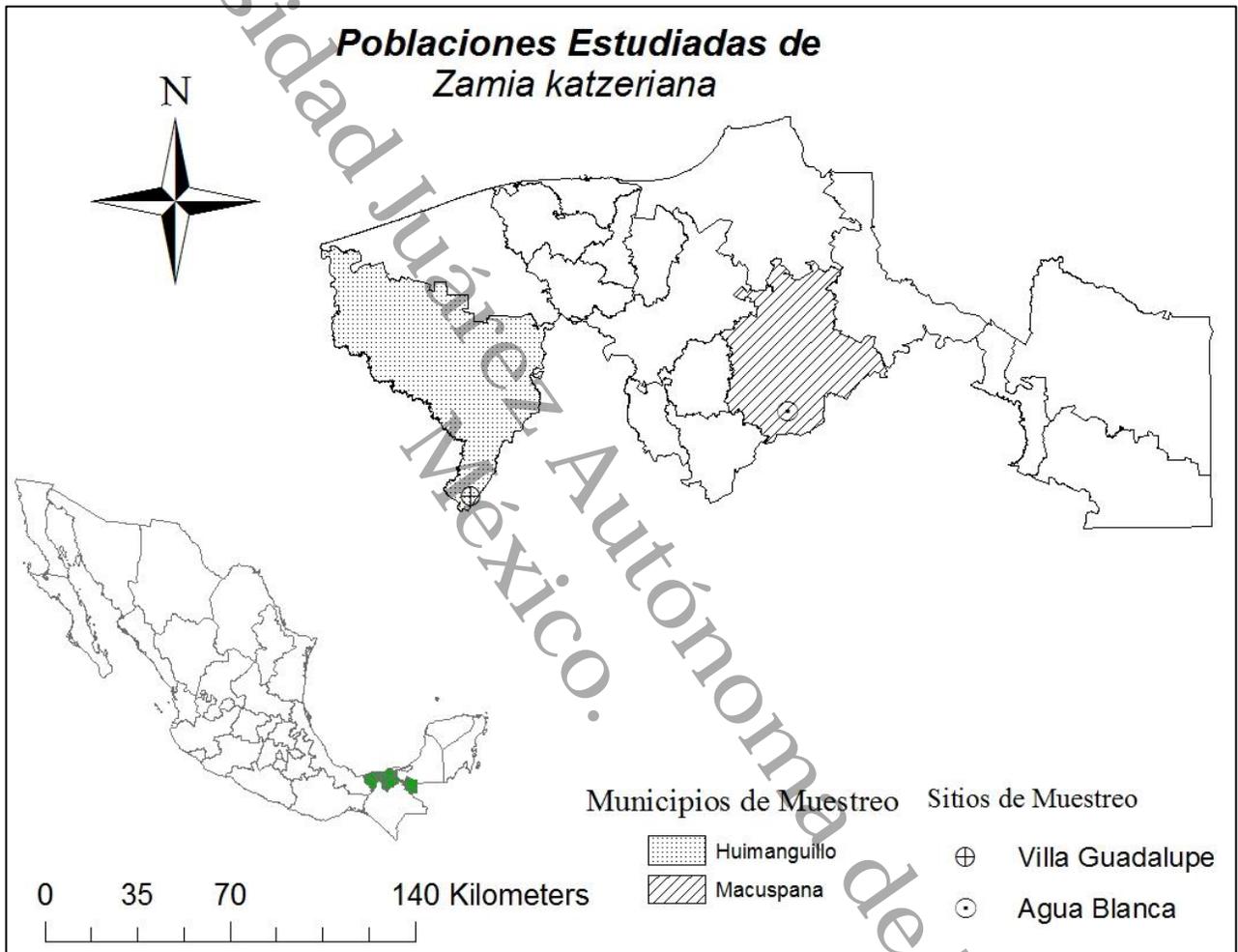


Figura 2. Poblaciones estudiadas de *Zamia katzeriana* en Tabasco, México

El Parque Estatal “Agua Blanca”, se localiza en el ejido Las Palomas, del municipio de Macuspana, entre el Oeste y Noroeste de la región sierra de Tabasco (17°37' N; 92°29' O). Este abarca una superficie de 2,025 hectáreas, con una altitud de 100 a 200 m. La vegetación dominante es selva mediana perennifolia.

6.3. Estudio de aspectos demográficos de las poblaciones

6.3.1. Monitoreos para el estudio de estructura poblacional

En cada uno de los sitios de estudio se trazó una parcela permanente de 30 m x 15 m (450 m²), enseguida se realizó el marcaje de los individuos que estaban dentro del cuadrante. De cada individuo de la parcela se registró el número de hojas, tamaño de la hoja, número de folíolos y condición reproductiva (Tabla 1, anexo). El sexo de las plantas se determinó por la presencia de conos o sus remanentes dentro de la corona de hojas, entre las catáfilas o en el suelo. Se visitó cada parcela cuatro veces durante un año, aproximadamente cada dos meses, esto para registrar producción y apertura de conos, la producción de hojas y la muerte de plantas.

6.3.2. Análisis de datos para estructura poblacional, con base en categorías del tamaño de hoja.

Para obtener la estructura de la población, el total de individuos se dividió en categorías de largo de hoja, con base al tamaño de las plantas con presencia de estructuras reproductivas masculinas encontradas (No se encontraron conos femeninos). Se analizaron algunas relaciones alométricas que definen patrones de crecimiento en esta especie, por medio de regresiones simples, con el objetivo de probar algún tipo de dependencia entre variables. De este modo se determinó cual era la variable de tamaño, que mejor define el estadio del ciclo de vida de la planta (plántula, juvenil, adulto). Se formaron un total de tres categorías según Salomé-Castañeda 2009 (con modificaciones en el número de clasificación): Plántulas (P) 0-0.15 cm; Juvenil1 (J1) 0.151-0.20 m; Juvenil 2 (J2) 0.21-0.30 m; Adulto 1 (A1) 0.31-0.8; Adulto 2 (A2) >0.8m. A partir de esta categorización se estableció la estructura de la población mediante un gráfico de frecuencias. Se determinaron las tasas de crecimiento individuales sacando los promedios del tamaño de las hojas del primer y último monitoreo y utilizando la siguiente fórmula $T.C = \frac{TF - TI}{TI}$ (Tasa de crecimiento es igual al tamaño final menos el tamaño inicial entre el tamaño inicial). Posteriormente se realizó un análisis de varianza de una sola vía de las

tasas de crecimiento, para determinar si se presentaban diferencias significativas entre categorías, entre poblaciones y en la interacción categoría-población. Para esto se utilizó los programas estadísticos STATGRAPHICS y SigmaPlot 11.

6.4. Estudios de diversidad genética

6.4.1. Colecta de material biológico y extracción de ADN

Se colectó un foliolo de cada individuo, haciendo un total de 72 muestras para la extracción de ADN genómico (30 de la población 1 VG (Villa de Guadalupe); 30 para la población 2 de VG y 12 para la población de AB (Agua Blanca)). La colecta de hojas se efectuó usando guantes para evitar contaminar las muestras y una tijera que se desinfectó con etanol al 70% después de cada colecta. Las hojas colectadas se protegieron con papel estraza, se introdujeron posteriormente en una bolsa de plástico y se colocaron en una hielera, para transportarlas al laboratorio, en el que se guardaron en un ultracongelador a -80°C hasta su tratamiento.

El ADN de *Zamia katzeriana*, fue extraído a partir de 0.2 gr del material vegetal colectado, empleando el método descrito por Bekesiova *et al.*, (1999). La cuantificación y calidad de las muestras de ADN se realizó midiendo la relación de absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro SmartSpec™ Plus (Bio-Rad). Se consideró que 1U A260 equivale a 50 µg/ml de ADN de doble cadena (Sambrook *et al.*, 1989).

6.4.2. Amplificación de ADN por medio de microsatélites

La amplificaciones se realizaron utilizando los 10 iniciadores microsatélites de *Zamia integrifolia* aislados por Meerow y Nakamura (2007) (Cuadro 1) y cuatro iniciadores (Cuadro 2) diseñados a partir de secuencias de ADN de cloroplastos de la especie que se encuentran en la base de datos del GenBank, disponible

dentro de la página del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por su siglas en ingles). Estos se realizaron mediante el programa Primer 3 (v. 0.4.0).

Cuadro 1. Lista de los 10 iniciadores microsatélites de *Zamia integrifolia* aislados por Meerow y Nakamura (2007).

| Iniciadores | F | R | Gen Bank |
|----------------|---------------------------|---------------------------|----------|
| Zam28 F | CAGGACAAAAGCATATAGGC | TTGGTTTGGTAGGTGATAGG | EF108366 |
| Zam29 F | GACTTCCTACCTAAAGATGCTA | TCCTGCTTACTTTAGATGCT | EF108367 |
| Zam32 F | CCAACAAGATAGCAAGGGA | AGCATGTGTAAACCTATAAAGGA | EF108368 |
| Zam33 F | CATGCTTGTTTGACTTGAACATA | TCCTTTCACACGTAATTATAAATCT | EF108369 |
| Zam34 F | AGCATCAAGGGACTATCAAC | TCAATGCCTCTAATACAAAAAAC | EF108370 |
| Zam35 F | TGCATATACATATATACTCATGCAC | TCACTATGCACTCACATACATAA | EF108371 |
| Zam39 F | TCACAAAATCTCAGCACCCC | TGAGTTAAACATGCGCCTCC | EF108372 |
| Zam40 F | CTTGGCTACCTTCTCTCCTATC | TGTTTGGCTTCACCCTGTTC | EF108373 |
| Zam41 F | GTAACAATCCCATTCCCCAAG | AGTGCCAAACCTCCAAGAAG | EF108374 |
| Zam45 F | CCTTAAAGAAGCTCGTAACTCC | TTCCCGAGATTATCCCTAGC | EF108375 |

Cuadro 2. Cuatro iniciadores microsatélites de *Zamia Katzeriana* diseñados a partir de secuencias de cloroplastos obtenidas de GenBank.

| Iniciadores | F | R | No. Acesión GenBank de la secuencia de ADN utilizada |
|------------------|----------------------|----------------------|--|
| Zamkatz1 | ACCTAAGGGCTGCTAAAAGT | AAGGTACATGAACAGCCATC | GU807304 |
| Zamkatz2 | TTCATATGCTCTCCCCTTA | TGATCAGCTCTCCTCTCCTA | GU807165 |
| Zamkatz3F | GGGATTCAAATTCTCATTCA | TGTGGAGCAGAGGTTCTATT | GU807222 |
| Zamkatz4F | GGTTTGGTACTCTTCCTTCC | GAGTTTCTAAGTTCCGACGA | GU807420 |

La reacción de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) se llevó a cabo en un termociclador MyCycler (Bio-Rad) utilizando la siguiente mezcla de reacción: 2 µL de agua inyectable, 15 µL de iQSM (iQSupermix, Bio-Rad laboratories), 1 µL de iniciador Forward, 1 µL de iniciador Reverse y 1 µL de ADN, siendo el volumen final de 20 µL. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización a 94°C por 7 minutos durante un ciclo, alineación a 92°C por un minuto, hibridación a 55°C-65°C por un minuto, extensión a 72°C por un minuto durante 45 ciclos y una extensión final de 72°C. La separación de los fragmentos

obtenidos en PCR se realizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, (3.4 g de agarosa, 3.4 ml de TAE 50X, 3 μ L de bromuro de etidio y 166.6 mL de agua desionizada estéril) usando Buffer TAE 1X, a 90 V por dos horas, fueron teñidas con bromuro de etidio en una concentración de 10 μ g/mL y se visualizaron en un transluminador (Uvitec) de luz ultravioleta.

6.4.3. Análisis estadístico para el estudio de diversidad genética

A partir de las imágenes digitalizadas de los geles obtenidos por electroforesis, en las que se visualizó el número de fragmentos amplificados en la PCR, se calculó el tamaño molecular de cada banda comparando los fragmentos contra el marcador de peso HyperLadder de 100 pb de invitrogen™. Una vez calculados, se construyó una base de datos de los genotipos de cada individuo, por población y por locus de la siguiente manera: si el locus estaba determinado por dos alelos, se tendría los genotipos: 1,1 (homocigoto), 1,2 (heterocigoto) y 2,2 (homocigoto). Ahora si el locus estaba determinado por tres alelos, el número de genotipos posibles se incrementa a seis: tres homocigotos (1,1., 2,2 y 3,3) y tres heterocigotos (1,2., 2,3 y 1,3). En la base de datos la primera columna corresponde a la población, la segunda a los individuos y a partir de la tercera a los genotipos de cada individuo.

La base de datos se analizó en el programa GeneAEx 6.41 (Peakall and Smouse, 2006) y en el programa Genepop v 4.0.10. Con estos análisis se calcularon los estimadores de diversidad genética, como el porcentaje de loci polimórficos (P), en el que un locus se consideró polimórfico si la frecuencia del alelo más común no excedía 0.99. P toma valores de 0 y 100%; si es cero no existe variación genética y cuando el valor es 100%, todos los loci analizados son polimórficos. El valor P se obtiene de la siguiente manera: $P = (x/m) \cdot 100$, donde x es el número de loci polimórficos en una muestra de m loci (Hedrick, 2000). De igual forma se calculó el número de alelos diferentes (N_a) y el número efectivo de alelos (N_e), donde este último se refiere a los alelos con capacidad de pasar a la siguiente generación (Kimura y Crow, 1964). El índice de diversidad de Shannon

(*I*), no asume que haya equilibrio en Hardy-Weinberg (Lewontin, 1972). La heterocigosidad observada (*H_o*) se calcula como el promedio de los genotipos heterocigotos y la heterocigosidad esperada (*H_e*), en el equilibrio de Hardy-Weinberg, se calcula a partir de las frecuencias alélicas, esto es: $H_e = 1 - \sum p_i^2$, donde p_i es la frecuencia alélica del alelo *i*-ésimo en el *m*-ésimo locus (Hartl y Clark, 1997). El índice de fijación (*F*) se calculó con la finalidad de conocer el exceso o deceso de heterocigotos en las poblaciones, ya que también es un estimador estadístico de la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg, se estima como $F = 1 - (H_o - H_e)$. Este índice toma valores de -1 a +1, para ello si $F = 0$ la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, esto ocurre cuando $H_o = H_e$. Si $F > 0$ (positivo) habrá una deficiencia de heterocigotos, mientras que si $F < 0$ (negativo) esto indica exceso de heterocigotos (Hedrick, 2000).

Para probar la posibilidad de un cuello de botella dentro de las poblaciones, se realizó una estimación mediante el programa Bottleneck versión 1.2.0.2 (Cornuet y Lukart, 1996) usando la prueba Wilcoxon, donde se muestran dos modelos: el modelo de alelos infinitos **IAM** y el modelo gradual de mutación estricta **SMM**.

6.4.4. Estructura genética

El perfil genético de las poblaciones lo podemos ver reflejado en el grado de diferenciación de la variabilidad genética dentro y entre las poblaciones, el cual puede ser calculado siguiendo uno o varios estadísticos, entre los más utilizados están los estadísticos de *F* de Wright (1951) F_{it} , F_{is} , F_{st} . Donde F_{it} estima la endogamia total para todas las poblaciones y se calcula como: $F_{it} = (HT - HI) / HT$, donde HT es el promedio de la heterocigosis esperada en la población total, para todos los loci; HI es el promedio de la heterocigosis individual observada. $F_{is} = (HS - HI) / HS$, donde HS es el promedio de la heterocigosis esperada dentro de subpoblaciones para todos los loci. Ambos estimadores toman valores entre -1 y +1, entre más cercano a uno este el índice mayor es la endogamia que presenta la

población. Por último F_{st} , estima la variación de las frecuencias alélicas entre poblaciones, y por tanto la diferenciación genética entre ellas y se calcula como: $F_{st} = (HT-HS)/HT$ (Eguiarte, *et al.* 2007). El índice F_{st} es siempre positivo, tiene valor cercano a 0 cuando no hay subdivisión (apareamiento al azar) por lo que no existen divergencias genéticas entre las poblaciones; y tiene un valor cercano a 1 cuando existe subdivisión extrema (aislamiento completo), de manera que valores de F_{st} menores a 0.05 indica una diferenciación genética insignificante, mientras que valores mayores a 0.25 muestran una diferenciación genética significativa entre las poblaciones (Limón, 2012). Para cada estadístico se utilizó un intervalo de confianza del 95% utilizando el programa GeneAEx 6.41 (Peakall and Smouse, 2006).

Para determinar si las tres poblaciones de *Zamia katzeriana* podrían ser subdivididas en grupos k genéticamente distintos o conglomerados, se empleó el programa STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000) que, mediante un método de agrupación bayesiano con base en el modelo de no mezcla y frecuencia de alelos independientes. Se ejecutó el análisis asumiendo que $k= 1$ a 5 poblaciones con 30,000 repeticiones.

6.4.5. Distribución de la variación genética entre y dentro de las poblaciones

El grado de diferenciación genética dentro y entre poblaciones se estimó mediante el análisis molecular de varianza (AMOVA), en el programa GeneAEx 6.41 (peakall and Smouse, 2006) usando 99 permutaciones, con intervalos de confianza del 95%. Este estadístico se realizó para determinar la varianza total existente entre individuos dentro de poblaciones y entre las poblaciones.

6.4.6. Distancia genética

El cálculo de distancias o identidades genéticas es muy útil para tener una idea general de que tan similares o diferentes son las poblaciones, por lo que se construyeron dos matrices de distancia genética entre poblaciones. La primera fue

construida mediante el índice de Nei (1972), para medidas de distancia e identidades que considera a los cambios en las frecuencias alélicas derivados tanto de mutaciones como efectos de deriva genética, utilizando programa GeneAEx 6.41 (Peakall and Smouse, 2006).

La segunda matriz se estimó calculando el coeficiente de similaridad de Nei-Li (1979), también conocido como similaridad de Dice (1945), utilizando una base de datos binaria de presencia (1) - ausencia (0) de banda por muestra, en el programa NtSys-PC versión 2.1.

Los coeficientes de similaridad fueron, a su vez introducidos en el subprograma SAHN para construir dendogramas con el objetivo de generar representaciones visuales de las relaciones genéticas existentes entre las poblaciones (Manly, 1997) y entre los diferentes individuos, para ello se usó el método de agrupamiento de medias aritméticas no ponderadas (UPGMA), que agrupa a los individuos en forma jerárquica con base a los promedios de similitud,. La significancia de los nodos del dendograma se calculó empleando el procedimiento de Bootstrap del programa.

6.4.7. Análisis de distribución espacial

Para visualizar la relación espacial entre las poblaciones, se utilizó el programa Primer 6. 1. 6 (Clarke y Gorley 2001), mediante el índice de similaridad de Bray Curtis, ya que este no es afectado por las diferencias en el número de muestras. Se mostró una distribución espacial de los datos de cada población con una similaridad del 50%.

VII. Resultados

7.1. Estructura poblacional con base en categorías del tamaño de la hoja

Se obtuvieron 5 categorías basadas en el tamaño promedio de las hojas de cada individuo y la talla mínima de los organismos que presentaron conos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Categorías de estadios de vida de *Zamia katzeriana* según el tamaño de hoja

| Categoría de Tamaño | Tamaño de la planta (según el promedio del tamaño de sus hojas en m) | Estadio del individuo |
|---------------------|--|---|
| Plántula |  <0.15 | De una a tres hojas menores a 16 centímetros, con dos o cuatro folíolos pequeños |
| Juvenil 1 |  0.151-0.20 | De una a tres hojas de 16.1 hasta 28 centímetros, con cuatro o seis folíolos, No reproductivo |
| Juvenil 2 |  0.21-0.30 | De una a tres hojas de 18 a 34 centímetros, con cuatro u ocho folíolos, Potencialmente reproductivo |

| | | |
|----------|--|--|
| Adulto 1 |  <p style="text-align: center;">0.31-0.8</p> | De una a cuatro hojas de 30 hasta 110 cm, con 6 o 14 foliolos, Reproductivo. |
| Adulto 2 |  <p style="text-align: center;">>0.80</p> | De una a dos hojas de 78 a 160 cm, con 10 o 14 foliolos, Reproductivo. |

7.1.1. Tasas de crecimiento

Las tasas de crecimiento obtenidas durante los cuatro monitoreos (Figura 3) estuvieron entre 0 y 0.8 cm, siendo las plantas juveniles y las adultas las que presentan un crecimiento más visible.

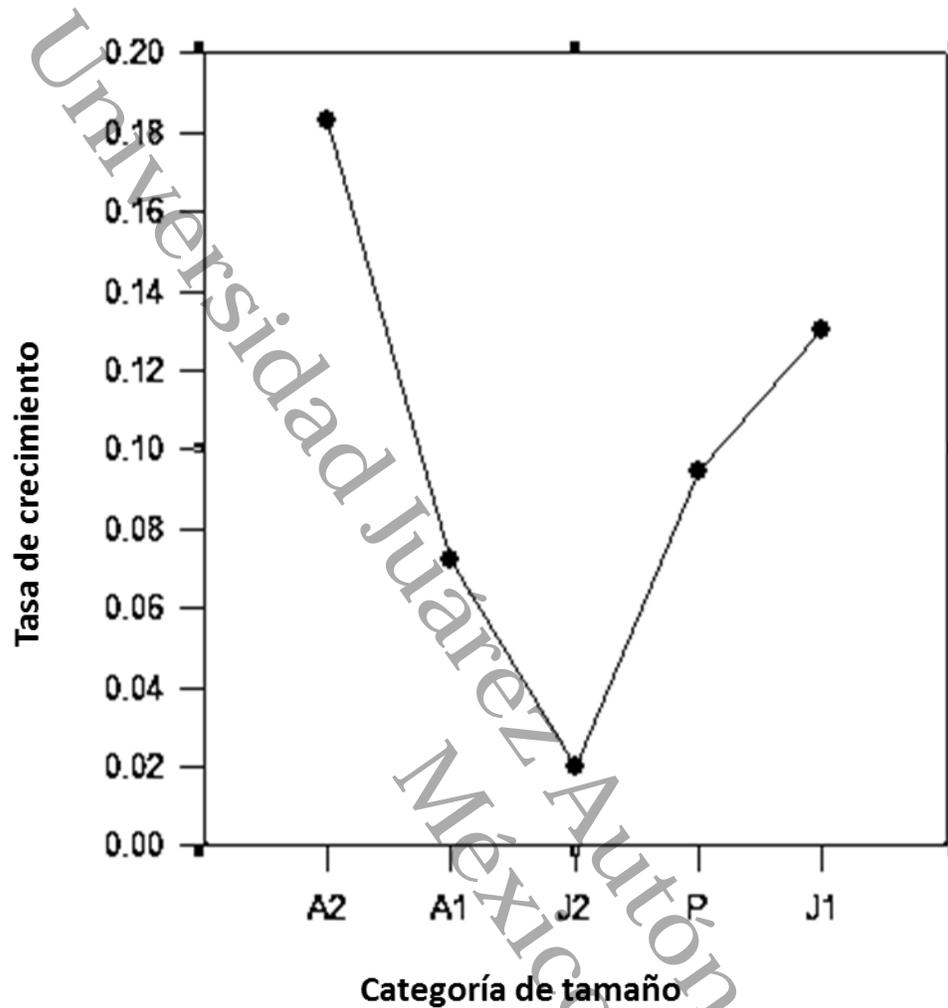


Figura 3. Tasas de crecimiento por categoría de tamaño de *Zamia katzeriana*

De las tres poblaciones estudiadas, la que obtuvo una tasa de crecimiento mayor fue la población 1 de VG (Figura 4). Siendo de igual forma esta, la población con una frecuencia de individuos mayor, al de las otras dos poblaciones.

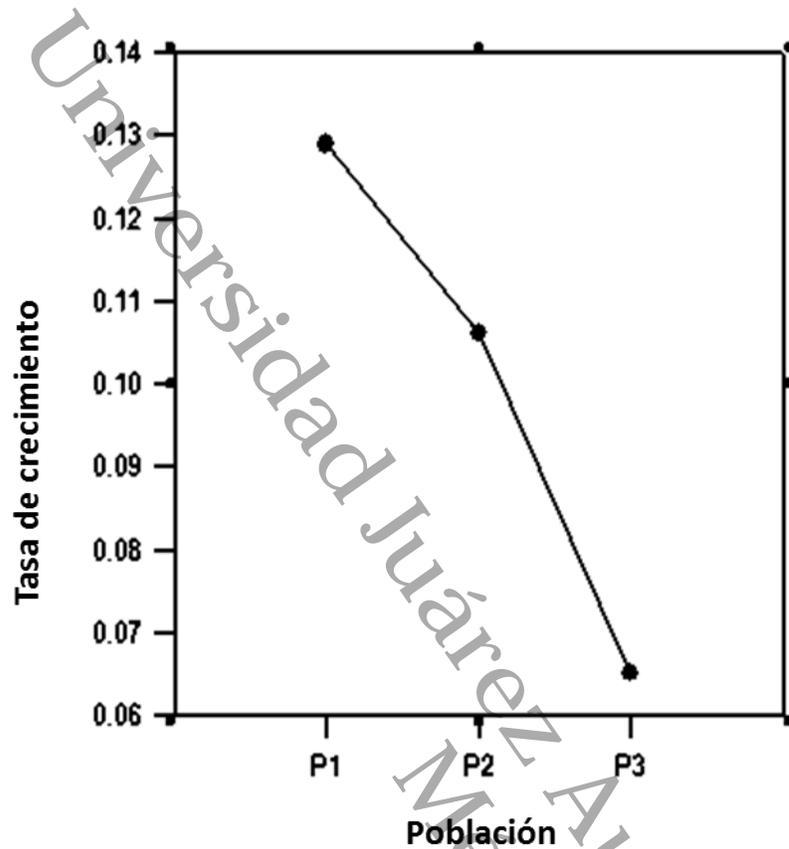


Figura 4. Tasa de crecimiento por población de *Zamia katzeriana*

Los resultados obtenidos en el programa STATGRAPHICS (Cuadro 4) muestran que no hay una relación significativa entre las tasas de crecimiento con las variables A: Población y B: Categorías de tamaño, en un nivel de confianza del 95%.

Cuadro 4. Análisis de varianza (ANOVA) para tasa de crecimiento, utilizando una variable dependiente y dos factores categóricos A: población y B: Categoría de tamaño.

| Fuente | Suma de Cuadrados | GL | C.M | Razón-F | Valor -P |
|---------------|-------------------|----|-----------|---------|----------|
| Modelo | 0.117622 | 8 | 0.0147027 | 1.00 | 0.4479 |
| Residuo | 0.899905 | 61 | 0.0147525 | | |
| Total (Corr.) | 1.011753 | 69 | | | |

Variable A: Población y B: Categorías de tamaño. ≥ 0.05 no significativo

No se encontraron diferencias significativas en las tasas de crecimiento entre las poblaciones ni entre las categorías en un nivel de confianza de un 95% (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza, utilizando como variable dependiente la tasa de crecimiento

| Fuente de variación | DF | SS | MS | F | P |
|---------------------|----|--------|--------|-------|-------|
| Población | 2 | 0.0319 | 0.0159 | 1.173 | 0.316 |
| Categoría de tamaño | 4 | 0.124 | 0.0310 | 2.285 | 0.070 |
| Residual | 63 | 0.856 | 0.0136 | | |
| Total | 69 | 1.018 | 0.0147 | | |

≥ 0.05 no significativo

7.2. Determinación de la diversidad y estructura genética de las poblaciones de *Zamia katzeriana*.

7.2.1. Diversidad genética

De los 14 iniciadores utilizados en el presente estudio (Cuadros 1 y 2) solo seis amplificaron efectivamente para *Zamia katzeriana*. Se obtuvo un total de 16 alelos, de los cuales el 12.5 % de las amplificaciones fueron para los iniciadores

Zam 4 y Zam 3 respectivamente y un 18.75% para los iniciadores Zam 1, Zam 2, Zam 40 y Zam 39 respectivamente (Figura 5). El tamaño de los fragmentos amplificados estuvo entre 150-400 pb.

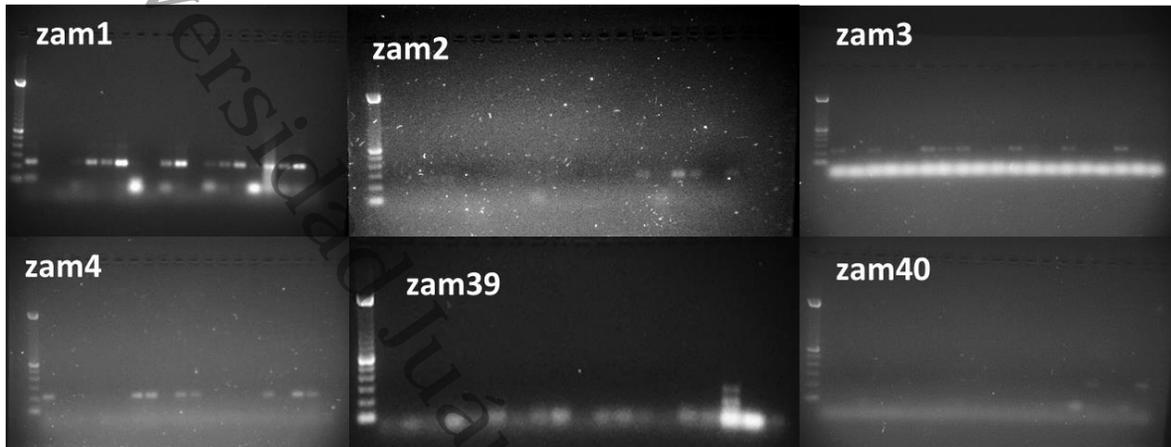


Figura 5. Amplificaciones de los 6 iniciadores utilizados, en geles de agarosa al 2%.

Los estimadores de diversidad genética (Cuadro 6) muestran que el porcentaje de loci polimórficos promedio fue de $P= 77.78 \% \pm 5.56\%$. La población 1 y 2 de VG presentaron dos alelos diferentes (N_a) y la población de AB solo uno, el número promedio de alelos efectivos (N_e) fue de uno para todas las poblaciones y el índice de diversidad de Shannon (I) estuvo entre 0.420 y 0.571, la heterocigosidad esperada (H_e) fue mayor que la observada (H_o) en todas las poblaciones, en cuanto al índice de fijación (F) estuvo entre 0.118 y 0.208, al ser este índice positivo refleja un exceso de homocigotos.

Cuadro 6. Estimadores de diversidad genética en tres poblaciones de *Zamia katzeriana*.

| Pob | N | P | N _a | N _e | I | H _o | H _e | F |
|------|--------------|--------------|----------------|----------------|-------------|----------------|----------------|-------------|
| Pob1 | 15.167 | 83.33 | 2.333 | 1.798 | 0.571 | 0.252 | 0.349 | 0.189 |
| Pob2 | 20.333 | 83.33 | 2.167 | 1.521 | 0.464 | 0.232 | 0.275 | 0.208 |
| AB | 7.167 | 66.67 | 1.833 | 1.586 | 0.420 | 0.220 | 0.265 | 0.118 |
| Med | 14.22 | 77.78 | 2.11 | 1.63 | 0.48 | 0.23 | 0.29 | 0.17 |
| DE | 2.04 | 5.56 | 0.18 | 0.16 | 0.09 | 0.07 | 0.05 | 0.12 |

N_a= número promedio de alelos diferentes, N_e=número promedio de alelos efectivos, I= índice de diversidad de Shannon, H_o= heterocigosidad observada H_e= heterocigosidad esperada, F= índice de fijación

Según los resultados obtenidos mediante la prueba de Wilcoxon, en las poblaciones estudiadas no se presenta un cuello de botella evidente (Cuadro 7).

Cuadro 7. Resultados de la prueba de Wilcoxon para detectar eventos de cuello de botella.

| Población | P1 VG | | P2VG | | AB | |
|--|-------|-------|-------|-----|--------|--------|
| | IAM | SMM | IAM | SMM | IAM | SMM |
| Probabilidad de 2 colas para exceso o deficiencia de heterocigotos | 0.625 | 0.625 | 0.625 | 1 | 0.3125 | 0.3125 |

IAM= Modelo de Alelos Infinitos, SMM= Modelo Gradual de Mutación Estricta

7.2.2. Estructura genética

Con base en el método utilizado para evaluar la estructura poblacional, se encontró que el coeficiente de endogamia local fue positivo $F_{is} = 0.303$. Un patrón similar presentó el coeficiente de endogamia total para el conjunto de las tres poblaciones F_{it} con 0.325. La diferenciación genética entre poblaciones fue de $F_{st} = 0.146$, lo cual indica que el 14.6% de la diversidad genética de la especie, está

distribuida entre las poblaciones. Finalmente el índice de migración (Nm) presentó 6.968, reflejando la presencia de flujo genético entre las poblaciones (Cuadro 8).

Cuadro 8. Promedios de estadísticos de F de Wright (1951) para 6 loci microsatélites de *Zamia katzeriana*.

| F-estadísticas | Valor |
|----------------------------|-------|
| F_{is} | 0.303 |
| F_{it} | 0.325 |
| F_{st} | 0.146 |
| Nm | 6.968 |

F_{is} = Coeficiente de endogamia entre poblaciones; F_{it} = Coeficiente de endogamia total; F_{st} = Coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones.

El análisis de estructura genética dio como resultado $K=2$ (Figura 6), siendo K el número real de poblaciones genéticamente diferenciadas, se asume que de las tres poblaciones, a nivel genético se reducen a solo 2, representándolas con los colores rojo y verde.

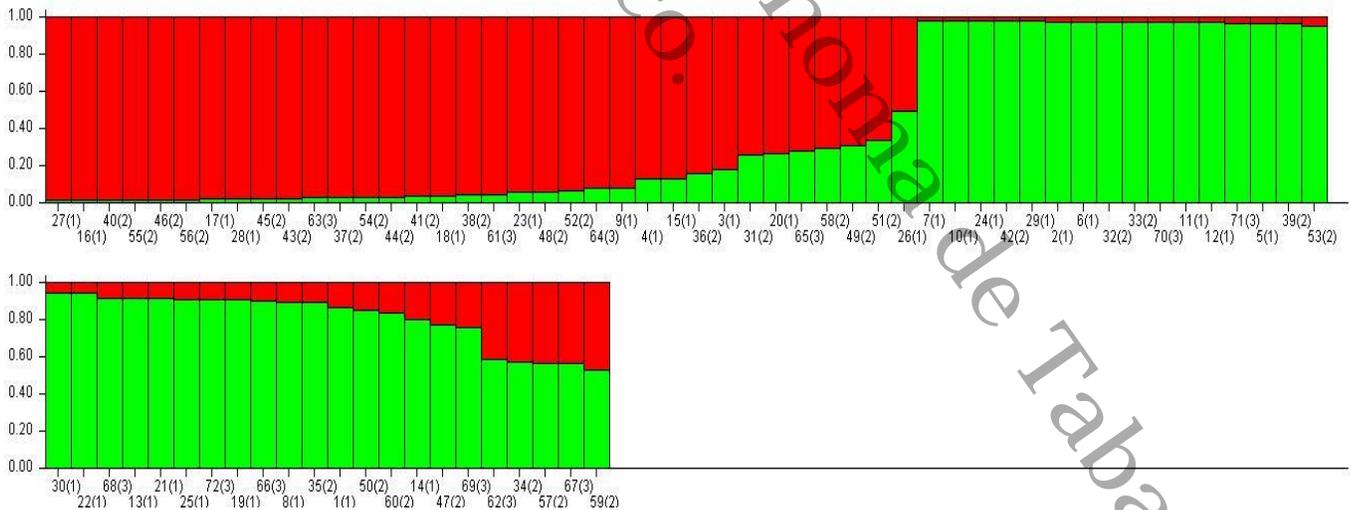


Figura 6. Representación gráfica de la estructura genética de las poblaciones estudiadas de *Zamia katzeriana*, obtenida mediante el programa STRUCTURE v 2.3.3. Los números que están dentro de los paréntesis en la parte inferior de la

imagen, representan las poblaciones estudiadas: 1:P1 de Villa Guadalupe; 2: P2 de Villa Guadalupe; 3: Agua Blanca.

7.2.3. Distribución de la variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones

Los resultados del AMOVA se resumen en el cuadro 9, donde se indica que el mayor porcentaje de variación genética (93%) es debido a las diferencias dentro de las poblaciones entre individuos, en tanto que el 7% de varianza genética total restante se debe a la variación promedio entre las poblaciones (Cuadro 9).

Cuadro 9. AMOVA en base a 6 loci polimórficos analizados en tres poblaciones de *Zamia katzeriana*, Tabasco, México.

| Fuente de Variación | GL | SC | CM | Est. Var. | Varianza% |
|---------------------|----|--------|-------|-----------|-----------|
| Entre poblaciones | 2 | 3.467 | 1.734 | 0.048 | 7% |
| Intra poblacional | 69 | 44.867 | 0.650 | 0.650 | 93% |
| Total | 71 | 48.334 | | 0.698 | 100% |

GL= Grados de libertad; SC=Suma de cuadrados; CM= Cuadrados medios

7.2.4. Distancias genéticas

Las distancias genéticas entre las poblaciones utilizando el índice de Nei (1972) (figura 7). Las poblaciones que resultaron más distantes fueron la población 1 de VG contra la población de AB con 0.203 de distancia genética. Mientras que las más cercanas fueron la población 2 de VG y la población de AB con solo 0.079 de distancia genética.

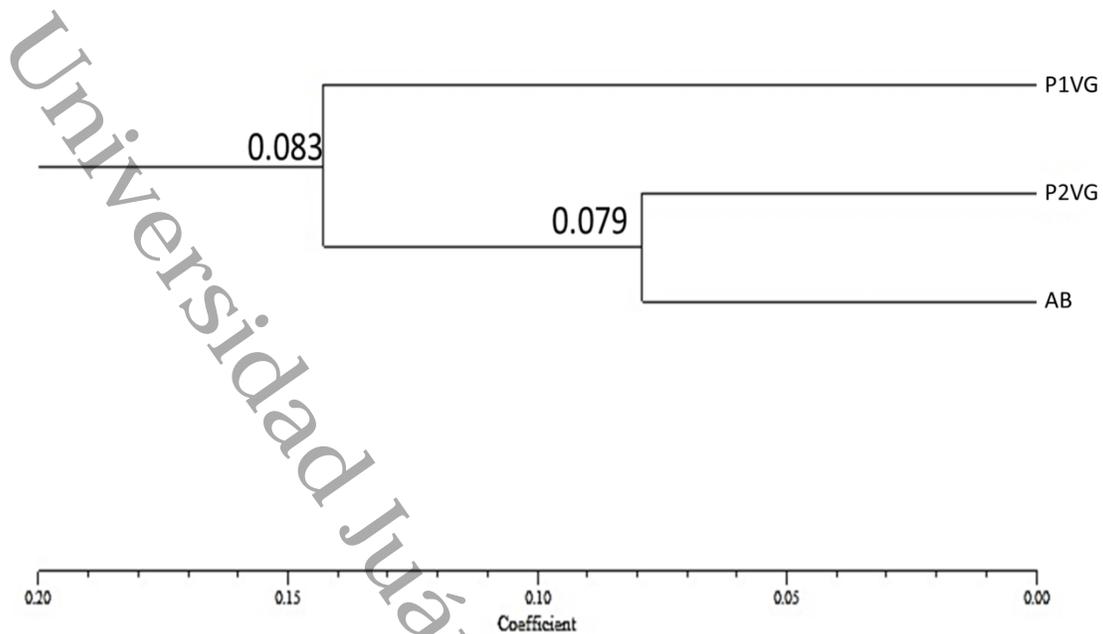


Figura 7. Dendrograma de las tres poblaciones estudiadas usando la distancia genética de Nei (1972).

En dendrograma general de similitud de Dice (Figura 1 anexo), se observan tres grupos principales el grupo **A**, **B** y **C**. el primero está conformado principalmente de individuos de las poblaciones de VG y solo un individuo de la población de AB. El segundo grupo está conformado por individuos de las tres poblaciones y el último solo y exclusivamente por dos individuos de la población 1 de VG.

7.2.5. Distribución espacial de las poblaciones de *Zamia katzeriana*

La distribución espacial de las poblaciones obtenida mediante el programa Primer 6. 1.6 (Figura 8) con una similitud del 50%, muestra que a este nivel de similitud se forman dos grupos principales en los cuales hay individuos de las tres poblaciones.

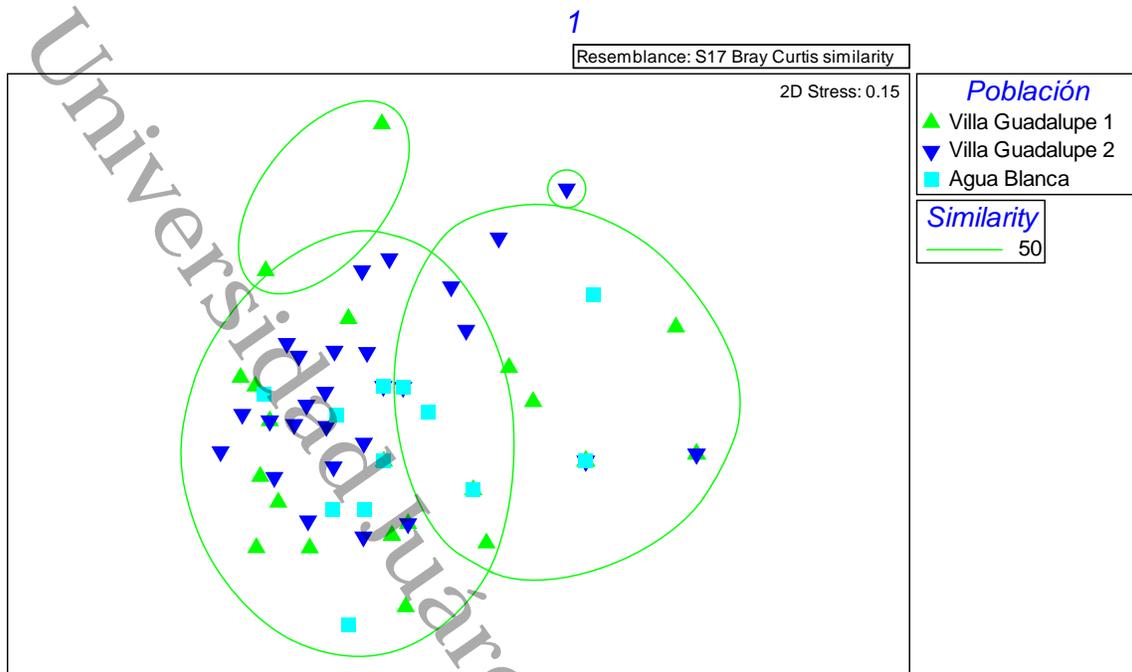


Figura 8. Distribución espacial de las poblaciones de *Zamia katzeriana*, utilizando el programa Primer 6.1.6 (PRIMER-E Ltd) versión 2006.

VIII. Discusión

8.1. Estructura poblacional en base a categorías del tamaño de la hoja.

Con base en los cinco estadios de vida determinados a partir del tamaño de las hojas se encontró que en todas las poblaciones el mayor número de individuos son adultos (P1 VG= 20, P2 VG= 17; AB= 5), estos resultados concuerdan con lo encontrado por Cabrera-Toledo (2009) en el estudio realizado a *Dioon caputoi*, donde el número de adultos fue mayor al de reclutas, difiriendo de los resultados obtenidos en otros estudios realizados para especies de la familia *Zamiaceae* distribuidos en zonas tropicales (Rivera-Fernández *et al.*, 2012; Salomé-Castañeda, 2009; Vovides, 1990; Negrón-Ortiz y Breckon, 1989). Estos resultados son justificados debido a que las condiciones ambientales que presentaban las poblaciones, no son las óptimas para que las semillas germinen, añadiendo el saqueo de plantas juveniles y semillas. En nuestro estudio, se esperaba un número mayor de plántulas ya que las poblaciones se encuentran en zonas con alta precipitación anual y sustrato abundante, que hace un sitio idóneo para la germinación de semillas.

Según Salomé-Castañeda (2009) la fragmentación del hábitat puede afectar el reclutamiento en las poblaciones, el patrón de mortalidad de plántulas y la supervivencia de adultos se repite en la mayoría de las especies de cícadas. Quizá este evento este afectando a las poblaciones estudiadas, principalmente a la población de Agua Blanca donde se encontró solo tres plántulas de un total de 12 individuos.

Se esperaba que debido a la presencia de un número alto de individuos adultos en las poblaciones hubiese eventos significativos de conificación, sin embargo solo tres individuos masculinos conificaron durante el tiempo de estudio. Esta condición de poca o nula producción de conos femeninos se ha observado en otras especies de cícadas del género *Dioon*, donde se han encontrado frecuencias

bajas de hasta dos pares de plantas conificando a lo largo de dos a cuatro años, siendo las plantas femeninas las que tardan un mayor tiempo en producir conos (Cabrera-Toledo, 2009; Vovides, 1990). El hecho de haber encontrado solo conos masculinos abre la posibilidad de que, la proporción sexual esté sesgada a machos, ya que al ser más constantes brindarían una mayor disponibilidad de polen, cuando surjan los conos femeninos (Cabrera-Toledo, 2009).

La tasa de crecimiento promedio de los individuos no fue significativa para ninguna de las poblaciones (Cuadro 4 y 5) esto debido principalmente a la duración del estudio, ya que al ser una especie de larga vida, no es posible visualizar un cambio significativo en el crecimiento en corto tiempo. Estudios realizados en otras cícadas con un tiempo mayor a 2 años han encontrado un crecimiento significativo en las poblaciones estudiadas de *Ceratozamia mexicana* (Rivera-Fernández, 2012), *Dioon spinulosum* (Salomé-Castañeda, 2009), *Dioon caputoi* (Cabrera-Toledo, 2009), *Dioon edule* Lindl. (Octavio-Aguilar *et al.*, 2008) y *Zamia loddigesii* (Aguirre-Fey, 2004).

Aunque la tasa de crecimiento no fue significativa, la gráfica de correlación entre la tasa de crecimiento y la categoría de tamaño (Figura 3), refleja que los individuos adultos tuvieron una mayor tasa de crecimiento, seguida de los juveniles y quedando al final las plántulas que se encuentran en la parte media de la gráfica. Por lo general, los juveniles y las plántulas tienden a tener un crecimiento más constante pues están en la etapa de desarrollo, nuestros resultados pueden estar sesgados como se mencionó anteriormente por el tiempo de estudio, pero en el cuadro 5 donde la variable dependiente es la tasa de crecimiento con respecto a la categoría de tamaño, el resultado es 0.07, siendo este muy cercano al valor de significancia que es <0.05 , abre la posibilidad de que se encuentre un valor significativo si se aumenta el tiempo de estudio.

Por otro lado, el análisis de correlación entre la tasa de crecimiento y las poblaciones (Figura 4) reflejan que la población 1 es la que presenta mayor

crecimiento y la población de AB la que presenta menor tasa de crecimiento. Este resultado puede deberse a que las poblaciones 1 y 2 se encuentran en una zona conservada, a diferencia de la población de AB que está en una zona turística. La cercanía del punto central de la zona turística donde se encuentra la población estudiada, puede estar afectando la estabilidad de la población y arriesgando su persistencia, ya que la densidad poblacional comparada con las otras dos poblaciones, es relativamente baja, resultados similares encontró Rivera-Fernández (2012) en un estudio realizado en dos poblaciones de *Ceratozamia mexicana* con diferente estatus de conservación (conservado y perturbado) encontrando que la perturbación disminuye la densidad de las plantas.

8.2. Determinación de la diversidad y estructura genética de las poblaciones de *Zamia katzeriana*.

8.2.1. Diversidad genética

La distribución de las frecuencias alélicas de *Zamia katzeriana*, reflejan que de los 16 alelos presentes en las poblaciones, aproximadamente 2 son alelos exclusivos para cada población. La presencia de estos dos alelos exclusivos en las poblaciones, pueden indicar, que estos tal vez surgieron por acción de la mutación, son variantes que se fijaron rápidamente en las poblaciones, y que posiblemente no se hayan difundido a las otras poblaciones debido al aislamiento por distancia (Limón, 2009), para el caso de la población 1 y 2 de VG, que se encuentran en la misma localidad, por falta de organismos polinizadores o dispersores. Estos resultados son menores a los obtenidos por Limón (2012), quien encontró en promedio 6.3 para *Zamia loddigesii*, asegurando que este resultado es debido a que probablemente las poblaciones tengan limitaciones en el flujo genético, ya que cuanto menor sea el flujo genético, mayor número de bandas de este tipo tendrá la población.

El número promedio de N_e (Cuadro 6) está dado por 1.798 y 1.521 para las poblaciones 1 y 2 de VG respectivamente y 1.586 para Agua Blanca. Esto representa aproximadamente el 30.66% de los alelos participando en el aporte al pool genético de las poblaciones de *Zamia katzeriana*.

Los valores obtenidos de H_e a nivel poblacional, fueron mayores a los de la H_o para todas las poblaciones ($P1= H_e: 0.349; H_o: 0.252, P2=H_e: 0.275; H_o=0.232, AB= H_e: 0.265; H_o=0.220$) reflejando la pérdida de heterocigotos y un exceso de homocigotos para las tres poblaciones. Estos resultados fueron semejantes a los encontrados por Limón (2009), para *Zamia furfuracea* donde encontró una H_e de 0.3313 promedio, mencionando que este porcentaje de H_e puede ser debido al exceso de homocigotos en todas las poblaciones, indicando pérdida de variabilidad genética por efecto de la endogamia. De forma contraria, Cabrera-Toledo *et al.* (2008) encontraron en *Dioon caputoi* valores de H_o (0.49 ± 0.04) más altos que los de H_e (0.35 ± 0.01), indicando un exceso de heterocigosidad en las poblaciones. Resultados similares fueron los obtenidos a nivel de locus (Cuadro. 2 anexos) en el presente trabajo donde hay valores de H_o que son mayores a los de H_e , reflejando que a nivel de locus hay alelos que son altamente heterocigotos

El índice de fijación es positivo para todas las poblaciones, esto representa la presencia de individuos homocigotos y la posible fijación de estos, ya que cuando $H_o < H_e$ se asume que en esa población se produjeron más apareamientos endogámicos de lo que se espera al azar (Eguiarte y Aguirre, 2007).

Los resultados obtenidos para la presencia de cuellos de botella usando la prueba Wilcoxon, dieron como resultado que las poblaciones de *Zamia katzeriana* estudiadas no presentan un cuello de botella evidente. De forma contraria, Rivera-Fernández y colaboradores (2012), encontraron la presencia de un cuello de botella reciente en las poblaciones de un sitio perturbado de *Ceratozamia mexicana*, mediante el método de SMM con 21.44 de loci con exceso de heterocigosidad. El cuello de botella se presenta en una población, cuando está

sufre una reducción drástica del tamaño poblacional (N_e), disminuyendo la variación genética. Esto puede traer serias consecuencias como: cambios en la selección natural, expresión de alelos deletéreos, fijación de alelos por endogamia, etc. (Beebee y Rowe, 2004). Aunque nuestros resultados no fueron significativos, el exceso de heterocigotos a nivel de alelos y el no equilibrio de Hardy Weinberg debido a los índices de F negativos (Cuadro 2, anexo), está la posibilidad de que las poblaciones estén saliendo de un cuello de botella producido por la reducción drástica de sus poblaciones debido principalmente, a la deforestación en décadas pasadas o podría ser de forma inversa, que aún el cuello de botella no sea visible, por lo que el programa no lo pudo detectar. Esto podría ser posible, debido a que como es una especie muy longeva los tiempos generacionales son muy largos, y quizá el cuello de botella aún no se expresa en las generaciones actuales y por tanto no afecta a la variación genética de las poblaciones (González-Astorga *et al.*, 2005).

8.2.2. Estructura genética

La estructura genética de las poblaciones, puede estar influenciada por muchos factores, incluyendo el efecto de la deriva génica, el sistema de entrecruzamiento, el flujo génico, lo que implica cambios en la distribución de las poblaciones y de los individuos al seno de la misma, por efecto de la fragmentación del hábitat, dando como resultado el aislamiento geográfico entre poblaciones (Ellstrand y Ellam, 1993). De acuerdo con nuestros análisis, los estadísticos de F (Cuadro 8), muestra valores positivos para F_{is} de 0.303, lo cual representa el déficit de heterocigotos. Un patrón similar presentó F_{it} con 0.325, lo que refleja que a nivel global hay pérdida de alelos heterocigotos. Del mismo modo, Limón (2012) encontró datos positivos para F_{is} con un valor de 0.778 en poblaciones de *Zamia loddigesii*, atribuyendo este resultado a un alto valor de endogamia local en las poblaciones, de forma contraria Cabrera-Toledo y colaboradores (2008) encontraron índices de F_{is} y F_{it} negativos (-0.379 y -0.242

respectivamente), indicando que existe un exceso de heterocigotos en las poblaciones de *Dioon caputoi*.

El índice de diferenciación genética F_{st} presentó un valor de 0.146, lo que indica que hay un 14.6% de diferenciación genética entre las poblaciones. Estos resultados son semejantes a los encontrados en *Zamia furfuracea* por Limón (2009) con 16% de diferenciación que resulta relativamente alta al compararla con otras especies de cícadas; pero menores a los obtenidos por Limón (2012) donde $F_{st} = 44.4\%$ (theta) para *Zamia loddigesii*, este porcentaje es mayor (usando ISSR), al encontrado en un estudio previo a las mismas poblaciones usando aloenzimas (González-Astorga *et al.*, 2009). Por otro lado, Cabrera-Toledo (2008) encontró valores más bajos de F_{st} en poblaciones de *Dioon caputoi* ($F_{st} = 0.099$), atribuyendo este resultado a la influencia de insectos polinizadores, ya que al comparar su resultado con otras investigaciones encontró que entre mayor es el número de polinizadores, mayor es la F_{st} . Hasta el momento para *Zamia katzeriana* se conoce que es polinizada por un artrópodo (escarabajo), quizá al igual que *Dioon* esta tenga relación con el índice de F_{st} encontrado.

El índice de migración (Nm) presentó 6.968, reflejando un alto porcentaje de flujo genético entre las poblaciones y señalando la existencia de seis migrantes por generación entre las poblaciones, estos resultados son mayores a los encontrados en otros estudios realizados en poblaciones de *Zamia loddigesii* como los de González-Astorga *et al.*, (2006) donde $Nm = 1.6$ y Limón (2012) que obtuvo un índice de $Nm = 0.361$, indicando que menos de un individuo está migrando por generación y lo atribuye a la deriva génica.

La prueba de estructura genética poblacional (Figura 6) resultó en $k=2$, asumiendo que de las tres poblaciones estudiadas, genéticamente solo existen dos; aunque al principio las poblaciones 1 y 2 de Villa Guadalupe se presentan para la población 1k y la población de AB para la 2k, al final, individuos de las tres

poblaciones se encuentran tanto en la población 1k y 2k, por lo que se asume la gran relación genética que existe entre poblaciones

8.2.3. Distribución de la variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones

El índice de varianza molecular AMOVA (Cuadro 9) determinó que el principal componente de diversidad genética de las poblaciones estudiadas de *Zamia katzeriana* corresponde a la variación intra poblacional con el 93%, seguida de la variación entre poblaciones con un 7%, este resultado concuerda a los obtenidos por Cabrera-Toledo *et al.* (2010) en poblaciones de *Dioon* spp. Donde la variación intra poblacional fue mayor a la variación entre poblaciones (*D. caputoi* =83% y *D. merolae* =80%). De forma contraria, Limón (2012) en poblaciones de *Zamia loddigesii* encontró que la mayor riqueza genética de esta especie se encuentra entre las poblaciones con un 52.2%, este resultado lo atribuye a que por lo general, las especies con poblaciones separadas, tienden a tener mayor diferenciación genética entre poblaciones, que las especies con distribución continua. Dos de las poblaciones estudiadas de *Zamia katzeriana* tienen una distribución continua, pues se encuentran en la misma localidad, la última está separada geográficamente, pero posiblemente, estas pudieron haber tenido flujo genético, cuando Tabasco tenía extensiones de selva conservada, haciendo sitios idóneos para la propagación de esta planta y por tanto facilitando el flujo génico entre ellas.

8.2.4. Distancias genéticas

La distancia genética entre las poblaciones fueron muy similares, no mayores a 0.1 (Figura 7), las poblaciones más cercanas fueron AB y la población 2 de VG con 0.079. Se esperaría que hubiese menor distancia entre las poblaciones 1 y 2 de VG ya que estas se encuentran más cercanas. Las poblaciones más distanciadas genéticamente fueron la población 1 de VG con la

población de AB (0.203). Esto era de esperar pues la población de AB esta distanciada geográficamente de las otras dos poblaciones.

En el análisis de similitud entre las poblaciones estudiadas por individuos (Figura 1, anexo) se observa que hay una baja segregación de alelos en las tres poblaciones estudiadas, ya que de los tres grupos principales el **A** y **B**, están conformados por individuos de las tres poblaciones, mostrando una alta relación entre las mismas. Siendo solo el grupo **C** el que está conformado única y exclusivamente por dos individuos de la población 1 VG, lo que hace a esta población, la más diversa de todas, pues se presenta en los tres grupos, compartiendo un número significativo de alelos con las dos poblaciones restantes. Esto hace a las poblaciones muy similares a nivel global, pero diferenciadas a nivel intra poblacional.

8.2.5. Distribución espacial de las poblaciones de *Zamia katzeriana*

La distribución espacial de las poblaciones (Figura 8) corrobora la relación presentada en el dendograma de similitud (Figura 1, anexo), ya que se presentan, tres grupos principales, el primero representa al grupo **A** con un individuo de la población dos en el borde, que sería el que se separa cuando la similitud es de 53.5%. El segundo grupo sería el **B** que alberga a la mayoría de los individuos estudiados, y el último sería de **C** con solo dos individuos de la población 2 que son separados del resto de la población. La relación existente entre la población 1 y 2 es evidente, ya que estas se encuentran en la misma población. Pero la relación con la población tres, que es una población geográficamente alejada de estas, solo podría ser explicada con las migraciones o flujos genéticos que pudieron haber tenido en el pasado.

IX. Conclusión

Los resultados de los estudios genéticos y demográficos realizados indican que, de las tres poblaciones estudiadas, la más vulnerable es Agua Blanca ya que su densidad poblacional fue proporcionalmente inferior a las dos poblaciones de Villa de Guadalupe y por el contrario, su nivel de endogamia fue mayor. La exposición a la que está sujeta esta población debido a los visitantes del sitio turístico pueden influenciar estos parámetros poblacionales, de manera que la fragmentación y la perturbación del hábitat están afectando significativamente la estabilidad de las poblaciones de *Zamia katzeriana*, disminuyendo el tamaño poblacional y su variabilidad genética.

Considerando estos resultados, es posible formular estrategias que contribuyan a la conservación de esta especie, o implementar aquellas que han sido utilizadas con éxito en otras especies en peligro. Tomando en cuenta que las poblaciones de *Zamia katzeriana* se desarrollan preferentemente en sitios conservados; se recomienda en lo posible, se evite visitas en el sitio donde se encuentran las poblaciones dentro del parque estatal, practicar la fecundación dirigida en las tres poblaciones para aumentar la variabilidad genética e introducir individuos a las poblaciones para el aporte de nuevos alelos.

X. Recursos

Este estudio fue realizado gracias a los recursos económicos otorgados por el fondo PFI con el proyecto “Estructura poblacional y diversidad genética de dos especies de *Zamia* (Zamiaceae; Cycadales) amenazadas y en peligro de extinción, en la sierra de Tabasco, México”. A la beca otorgada por el Conacyt con número de CVU 557179 y al apoyo brindado para investigadores del CCYTET, en la convocatoria 2015.

XI. Bibliografía

- Aguirre D. F. 2004. Demografía y genética de poblaciones de *Zamia loddigesii* Miq. (Zamiaceae) en el centro de Veracruz, México. Universidad Veracruzana, facultad de biología, Xalapa, Veracruz, México. 69p.
- Arnold, C.A. 1953. Origin and relationships of the cycads. *Phytomorphology* **3**: 51-65.
- Alvarez-Buylla, E. R., Chaos, A., Piñero, D. y Garay, A. A. 1996. Demographic genetics of a pioneer tropical tree species: patch dynamics, seed dispersal, and seed banks. *Evolution* **50**: 1155-1166.
- Balduzzi, A. P., De Luca P. & Sabato S. 1982. A phytogeographical approach to the New World Cycads. *Delpinoa*, n.s. 23–24.
- Bekesiova I, Nap J.P, Mlynarova L. 1999. Isolation of High Quality DNA and RNA from Leaves of the Carnivorous Plant *Drosera rotundifolia*. *Plant Molecular Biology Reporter* **17**: 296-277.
- Beebee T. J. C. y Rowe G. 2004. An introduction to Molecular Ecology. Oxford University Press. New York.
- Cabrera – Toledo, D., González-Astorga J., Nicolalde-Morejón F. 2010. Allozyme diversity levels in two congeneric *Dioon spp.* (Zamiaceae, Cycadales) with contrasting rarities. Springer. Michoacán, Mexico.
- Cabrera – Toledo, D. 2009. Biología poblacional de dos cícadas mexicanas con distintos niveles de rareza. Tesis Doctorado en Ciencias. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Veracruz.
- Cabrera-Toledo D., Gonzalez-Astorga J., Vovides A. P. 2008. Heterozygote excess in ancient populations of the critically endangered *Dioon caputoi* (Zamiaceae, Cycadales) from central Mexico. *Botanical Journal of the Linnean Society*. Vol. **158**: 436-447p.
- Cornuet J., Luikart, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*: 2001-2014.
- Clarke K, Gorley R 2001 Primer-e ver.6: user manual/tutorial–primer-e

- Dice L. R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*. 26: 297-302.
- Eguiarte L., Souza V. y Aguirre X. 2007. *Ecología molecular* Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. México.608: 170-179.
- Ellstrand N.C. y Ellam, D. R. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24:217-242.
- Ellstrand NC, Ornduff R y Clegg J M. 1990. Genetic structure of the Australian cycad, *Macrozamia communis* (Zamiaceae). *American Journal of Botany* 77: 677-681.
- González-Astorga J., Vovides A. P., Cabrera-Toledo D., Nicolalde-Morejon F. 2009. Diversity and genetic structure of the endangered cycad *Dioon sonorensis* (Zamiaceae) from Sonora, Mexico: Evolutionary and conservation implications. *Biochemical Systematic and Ecology*. Vol. 36: 891-899p.
- González-Astorga, J., Vovides, A. P., Octavio-Aguilar, P., Aguirre-Fey, D., Nicolalde-Morejón, F. & Iglesias, C. 2006. Genetic diversity and structure of the cycad *Zamia loddigesii* Miq. (Zamiaceae): implications for evolution and conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152: 533-544.
- González-Astorga J., Vovides A. P., Cruz-Angon A., Octavio-Aguilar P., y Iglecias C. (2005) Allozyme Variation in the Three Extant Populations of the Narrowly Endemic Cycad *Dioon angustifolium* Miq. (Zamiaceae) from North-eastern Mexico. *Annals of Botany* vol.95 999-1007 pp.
- Guillies A., Cornelius J., Newton A., Navarro C., Hernández M., Wilson J. 1997. Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species *Cedrella odorata* C. assessed using RAPD. *Mol. Ecol.* 6:1133-1145.
- Hartl DL. Y Clark AG. 1997. *Principles of Population Genetics*. 3ra. Ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

- Hamrick, J.L. & Godt, M.J.W. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences*, 351: 1291-1298.
- Hedrick PW. 2000. Genetics of populations. 2ª ed. Jones y Bartlett Publishers. Boston, USA.
- Hill K. D., Stevenson D. W. y Osborne R. 2007. The Word List of Cycads. Proceedings of the 7th. International Conference on Cycad Biology (CYCAD 2005), Xalapa, México. January, 2005. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 97: 454 – 483.
- IUCN 1998. *1997 IUCN Red List of Threatened Plants*. Gland: IUCN.
- Johnson L. A. S. 1959. The families of Cycads and the Zamiaceae of Australia. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*. 81: 64-117 p.
- Keppel G, Lee SW, y Hodgskiss PD. 2002. Evidence for long isolation among populations of a pacific cycad: Genetic Diversity and Differentiation in *Cycas seemannii* A.Br. (Cycadaceae). *Journal of Heredity* 93: 133-139.
- Kimura, M., & Crow, J.F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738.
- Lande, R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science* 241: 1455-1460.
- Lewontin, R.C. 1974. *The Genetic Basis of Evolutionary Change*. New York: Columbia University Press.
- Lewontin, R.C. 1972. The Apportionment of Human Diversity *Evolutionary Biology* 6: 391–398.
- Limón S. F. 2012. Diversidad y distribución de la variación genética dentro y entre las poblaciones de *Zamia loddigesii* Miq. en la vertiente del golfo de México. Tesis de Maestría. Instituto de ecología A. C. Xalapa, Veracruz, México. 87p.

- Limón S. F., 2009. Genética de Poblaciones de *Zamia furfuracea* L. f. (Zamiaceae); una cícada endémica al estado de Veracruz, México. Tesis de licenciatura, Universidad Veracruzana, México.
- López O. A. 2002. Distribución y relaciones ecológicas del chamal (*Dioon edule* var. *angustifolium*) en la sierra de San Carlos, Tamaulipas, Méx. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de ciencias forestales. Linares, Nuevo León. 114p.
- Mamay S. H. 1976. Paleozoi origin of the Cycads. Professional Paper 934, U. S. Geological Suvey, Washington, D. C.
- Manly L. F. 1997. Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology 2nd edition. Chapman and Hall. London. 424p.
- Meerow A. W. Nakamura K. 2007. Ten microsatellite loci from *Zamia integrifolia* (Zamiaceae). Molecular Ecology Notes. Vol. 7. 824-826p.
- Metcalf C. J. E., Pavard S. 2006. Why evolutionary biologists should be demographers. TRENDS in Ecology and Evolution Vol. 22 No. 4. 8pp
- Nei, M, and Li W. 1979. Mathematical model for studing genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceeding of National Acadimic of Sciences of United States of America. Vol. 76:5269-5273
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Center for Demographic and Population Genetics, University of Texas at Houston. Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America. Vol. 70: 3321-3323.
- Nei M. 1972. Genetic distances between populations. American Naturalist 106: 283-292.
- Negrón-Ortiz V., D. L. Gorchov , y G. J. Breckon . 1996 . Population structure in *Zamia* (Zamiaceae) in northern Puerto Rico. II. Seed germination and stage-structured population projection. *International Journal of Plant Sciences* 157: 605 – 614.
- Negrón-Ortiz V. y Breckon G. J. 1989. Population structure in *Zamia debilis* (Zamiaceae) I. Size clases, leaf phenology, and leaf turnover. American Journal of botany. Vol. 76. 891-900 p.

- Nicolalde-Morejón F., González-Astorga J., Vergara-Silva F., Stevenson D., Rojas-Soto O., Medina-Villarreal A. 2014. Biodiversidad de Zamiaceae en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. Vol.85: S114-S125
- Nicolalde-Morejón F, Vergara-Silva F, González-Astorga J, & Vovides AP. 2011. Perspectivas Sistemáticas de *Zamia* (Zamiaceae) en Megaméxico: de la taxonomía alfa a los códigos de barras genéticos. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 82: 341-355.
- Nicolalde-Morejón, F. A.P. Vovides & D.W. Stevenson. 2009. Taxonomic revision of *Zamia* in Mega-Mexico. *Brittonia* 61: 301–335.
- Nicolalde-Morejón, F., Vovides, A.P., Stevenson, D.W. & Sosa, V. 2008. Identity of *Zamia katzeriana* and *Z. verschaffeltii* (Zamiaceae). *Brittonia*. 60: 38-48.
- Nicolalde-Morejón E. F. 2005. Circunscripción de las especies del complejo *Zamia katzeriana* (Zamiaceae-Cycadales). Tesis de Maestría. Instituto de Ecología, A. C. Xalapa, Veracruz, México. 48pp.
- Nolasco-Soto, J., González-Astorga, J., Nicolalde-Morejón, F., Vergara-Silva, F., Monterosa, A., y Medina-Villarreal, A. (2015). Filogeografía y la historia demográfica de *Zamia paucijug* Wieland (Zamiaceae) es una especie de cícadas de la vertiente del Pacífico mexicano. *Planta Sistemática y Evolución*, 301 (2), 623-637p.
- Norstog, K.J. & Nicholls T. J. 1997. *The Biology of the Cycads*. Cornell University Press, Ithaca.
- Norstog, K. & Fawcett, P. 1989. Insect-Cycad Symbiosis and its relation to the pollination of *Zamia furfuracea* (Zamiaceae) by *Rhopalotria mollis* (Curculionidae). *American Journal of Botany*. 76(9): 1380-1394
- Octavio-Aguilar P., González-Astorga J., Vovides A. 2008. Population dynamics of the Mexican cycad *Dioon edule* Lindl. (Zamiaceae): life history stages and management impact. *Botanical journal of the Linnean Society*. Vol. 157. 381-391 pp.
- Osborne R. 1995. The world cycad census and a proposed revision of the threatened species status for cycad taxa. *Biological Conservation* 71: 1–12.

- Parraguirre C., Vargas J., Ramírez P., Azpiros H., Jasso J. 2002. Estructura de la diversidad Genética en poblaciones naturales de *Pinus greggii* Engelm. Instituto de recursos naturales, colegio de postgraduados. Estado de México. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 25 (3): 279-287
- Peakall, R. and Smouse P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6, 288-295.
- Pritchard, J.; Stephens, M.; Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.
- Rivera-Fernández A., Octavio-Aguilar P., Sánchez-Coello N. Sánchez-Velásquez L., Vázquez-Torres S., Iglesias-Andreu L. 2012. Estructura poblacional y distribución espacial de *Ceratozamia mexicana* Brongn. (Zamiaceae) en un ambiente conservado y en uno perturbado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, Vol.15, núm.2. 2012. 9pp.
- Reynolds, C.E. & Houle, G. 2002. Mantel and partial Mantel tests suggest some factors that may control the local distribution of *Aster laurentianus* at Îles de la Madeleine, Québec. *Plant Ecology*, 164: 19-27.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Limusa. México.
- Sabato, S. 1990. West Indian and South American cycads. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 57: 173–185
- Salomé-Castañeda E. 2009. Parámetros demográficos de *Dioon spinulosum* Dyer & Eichler (Zamiaceae), en San Miguel Soyaltepec, Oaxaca. Tesis de Maestría. Instituto de ecología. Xalapa, Veracruz, México. 129p.
- Sambrook, J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory press. 2a Ed. New York.
- Schemske D. W., Husband B. C., Ruckelshaus M. H., Goodwillie C., Parker I. M., Bishop J. G. 1994. *Ecology*. Vol. 75. 584-606p.
- Schutzman, B. 1984. A new species of *Zamia* L. (Zamiaceae, Cycadales) from Chiapas, Mexico. *Phytologia*. 55(5): 299-304.
- Taylor, A.S., J.L. Haynes & G. Holzman. 2009. Taxonomical, nomenclatural and biogeographical relevations in the *Zamia skinneri* complex of Central

- America (Cycadales: Zamiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 158:399-429.
- Vovides, A. P. y F. Nicolalde-Morejón. 2010. Ficha técnica de *Zamia katzeriana*. En: Vovides, A. P. (compilador). Base de datos de la cícadas mexicanas. Instituto de Ecología A.C., INECOL. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. DK008. México, D.F.
- Vovides, A. Chemnick, J. & Gregory, T. 2010. *Zamia katzeriana*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 19 April 2013.
- Vovides, A. 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.
- Whitelock L. M. 2002. The Cycads. Timber Press, Portland, Oregon U. S. A. 375 p.
- Yu, H.H., Yang, Z.L., Sun, B. & Liu, R.N. 2011. Genetic diversity and relationship of endangered plant magnolia officials assessed with ISSR polymorphisms. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(2): 71-78.
- Zhifeng, G. y Thomas B. A. 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 Palaeobotany and Palynology* 60: 205-223.

Cuadro 2. Frecuencia alélica por locus de *Zamia katzeriana*

| Pop | Locus | N | Na | Ne | I | Ho | He | F |
|-------------|---------|----|-------|-------|-------|--------------|--------------|---------------|
| Pob1 | Locus 1 | 7 | 1.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | #N/A |
| | Locus 2 | 30 | 2.000 | 1.342 | 0.423 | 0.300 | 0.255 | -0.176 |
| | Locus 3 | 7 | 2.000 | 1.960 | 0.683 | 0.286 | 0.490 | 0.417 |
| | Locus 4 | 11 | 3.000 | 2.469 | 0.995 | 0.000 | 0.595 | 1.000 |
| | Locus 5 | 17 | 3.000 | 2.905 | 1.082 | 0.824 | 0.656 | -0.256 |
| | Locus 6 | 19 | 3.000 | 1.112 | 0.243 | 0.105 | 0.101 | -0.041 |
| Pob2 | Locus 1 | 11 | 1.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | #N/A |
| | Locus 2 | 30 | 2.000 | 1.471 | 0.500 | 0.400 | 0.320 | -0.250 |
| | Locus 3 | 18 | 3.000 | 1.409 | 0.557 | 0.111 | 0.290 | 0.617 |
| | Locus 4 | 14 | 2.000 | 1.508 | 0.520 | 0.000 | 0.337 | 1.000 |
| | Locus 5 | 25 | 3.000 | 2.654 | 1.036 | 0.800 | 0.623 | -0.284 |
| | Locus 6 | 24 | 2.000 | 1.087 | 0.173 | 0.083 | 0.080 | -0.043 |
| AB | Locus 1 | 2 | 2.000 | 2.000 | 0.693 | 0.000 | 0.500 | 1.000 |
| | Locus 2 | 12 | 2.000 | 1.180 | 0.287 | 0.167 | 0.153 | -0.091 |
| | Locus 3 | 6 | 2.000 | 1.385 | 0.451 | 0.333 | 0.278 | -0.200 |
| | Locus 4 | 2 | 1.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | #N/A |
| | Locus 5 | 11 | 3.000 | 2.951 | 1.090 | 0.818 | 0.661 | -0.238 |
| | Locus 6 | 10 | 1.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | #N/A |

N_a = número promedio de alelos diferentes, N_e =número promedio de alelos efectivos, I = índice de diversidad de Shannon, H_o = heterocigosidad observada H_e = heterocigosidad esperada, F = índice de fijación

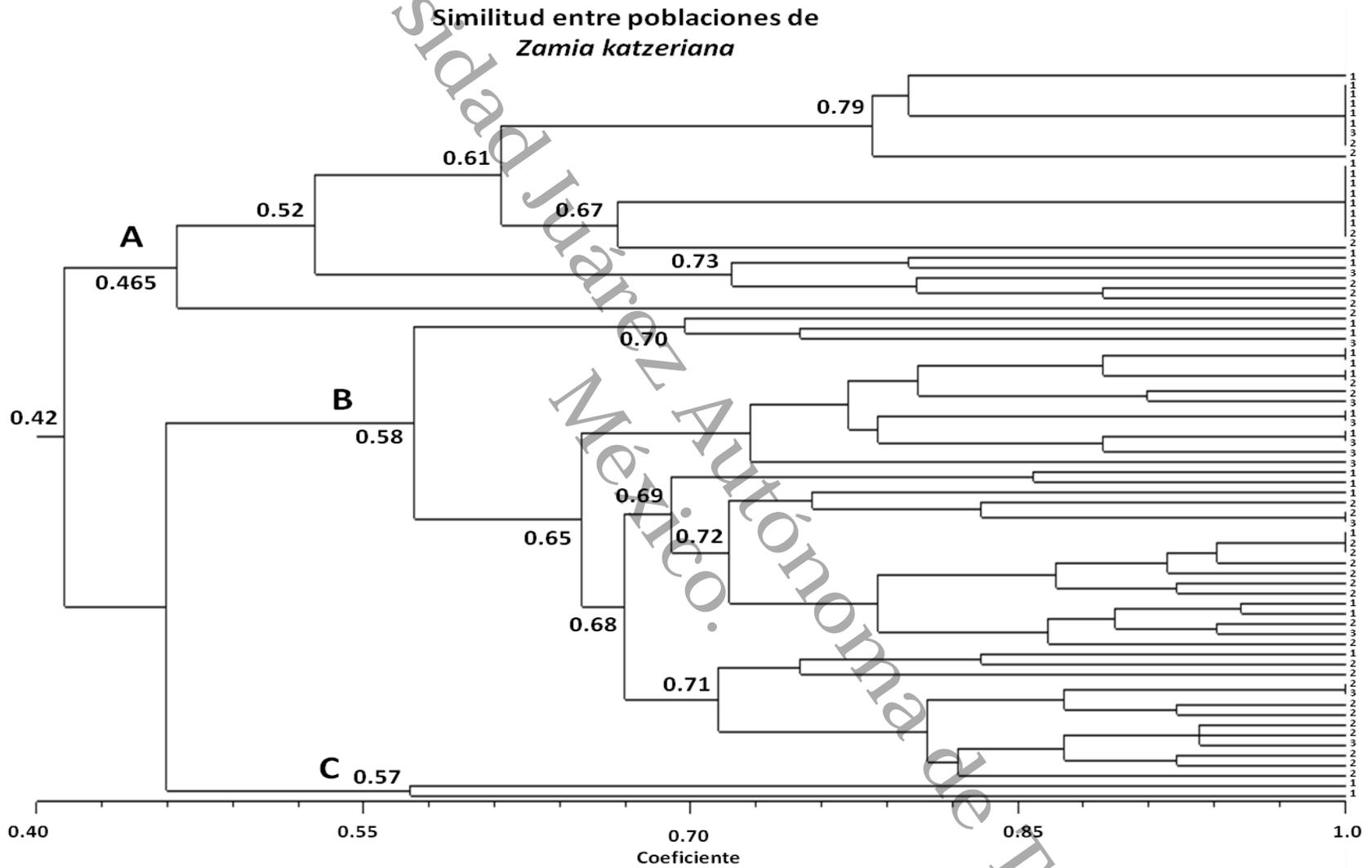


Figura 1. Dendrograma general de Similitud las tres poblaciones estudiadas de *Zamia katzeriana* según el coeficiente de Dice, 1: P1 Villa Guadalupe, 2: P2 Villa Guadalupe, 3: Agua Blanca.