

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



DIRECTOR DE TESIS: Dra. BEATRIZ RENDÓN AGUILAR

ASESOR INTERNO: M. en C. DAVID N. ESPINOSA ORGANISTA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Poderosa, con la fuerza de siglos
surge de lo más hondo
la voz vegetal,

Qué altas manos
qué extendidos murmullos verdes
gritos puestos en pie
lanzas en ristre buscando el cielo,
qué arcos iris desgranados en los follajes
qué amorosa madre de tiernos cantos, solitarias lluvias.

Con el agua entre los dedos
con el sol en la cintura,
besando el corazón de la tierra
y los ojos aéreos
guardan los árboles la vida.

Silencio verde alma verde
tersa piel desnuda
de caricias colmada.
Por el talle de las muchachas de sueño
caminan estrellas.

En la jungla
altares vegetales
cuidan el humo del copal
pétreas palabras,
los pasos del jaguar en las vetas del aire,
el instante cuando la sangre del maíz
fecundó la vida,
cuando el sol era un pájaro
y los dioses vivían en las plantas
y los hombres atesoraban las semillas.

Oh joven dios vegetal
oh bondadosa iguana serpiente
oh señores de todos los campos y todos los seres.

La huella de la Tierra.
Indalecio Cardeña Vázquez.

Por que me permitieron
vivir y me dieron la
oportunidad de conocer el
mundo, de estudiar y
siempre querer más, esto
es para ustedes: Delia y
Felipe.

A Humberto por todo el
apoyo y la fuerza que me
ha brindado durante todo
este tiempo.

A ti que siempre tuviste
tiempo para preguntar por
esta locura llamada tesis y
recordarme que ya era
tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis abuelitos Delia y Felipe por su apoyo incondicional, sus enseñanzas y el haber creído en mí para realizar este sueño. A todos y cada uno de mis tíos: Adriana, Jesús, Ricardo, Isaac, Paty y Carlos, unos por ser más allá que solo mis tíos, los otros por ser ellos. A mi papi, Felipe, por que sin él no podría haber llegado hasta donde estoy, por ser quién es e inculcarme todos los valores que me permitieron seguir adelante. A mis carnalitos Sol y Leonel, así como a mis princesas Jimena y Joana por darme ánimos y compartir aventuras y desventuras, siempre juntos.

A la Doctora Beatriz Rendón por ser mi tutora, mi guía y haber despertado mi interés en algo desconocido. A Bety, por brindarme su confianza, apoyo, enseñanzas y su amistad incondicional. Al ramillete: Lulú, Consuelo, Mireya y Gaby por su valiosa ayuda en campo. A Juanita y Yalina, por ser mis amigas, compañeras de parranda, confidentes y carnalas.

Al Dr. Jorge González-Astorga por el apoyo prestado en la parte de laboratorio y en la estancia en Xalapa. A Julia Hernández por enseñarme y apoyarme en las extracciones, corrimientos y lectura de los geles, así como su casa y confianza. A Pablo Octavio Aguilar por brindarme sus conocimientos, ayuda, tiempo y amistad.

Al Dr. Pedro Luis Valverde, Gerardo Zúñiga, Pablo Octavio Aguilar, Armando Cervantes y José Alejandro Zavala Hurtado por ayudarme a desenmarañar los misterios de los programas. A Gilberto Hernández Cárdenas y Miguel Bravo por su valiosa ayuda en la elaboración de los mapitas. Amelia Cornejo Romero por su ayuda prestada y sus valiosos consejos.

Quisiera agradecer de forma especial al prof. Armando Cervantes, porque siempre tuvo un buen consejo matemático para mi y me repitió muchas veces hasta donde puedo llegar. A la Dra. Paty Velasco, Biol. Cristóbal Galindo, M. en IBSH. Angélica Flores, Profa. Magdalena (Biogeografía), Carmen Salgado, así como a todos y cada unos de los profesores que aportaron valiosos conocimientos en mi formación como Bióloga.

No menos importantes, agradezco a los profesores: M. en C. Armando Cervantes Sandoval, Biol. Carlos Martínez Montoya y Dra. Elia Roldan Reyes, por ser sinodales y enriquecer este trabajo.

Al buen Cyborgh por compartir un poco de vino, a veces amargo, otras dulce. A ti José Vite por que me enseñaste un mejor camino a seguir. A la banda: Dianova-gen, Karamy, Di Florín, Ariadna, Martínez, El Chino, Isra, Pepe, Fernando, Ioana, Montero, Alecito, Fausto, Flavio, Paco, Janitzio, Eric, Luis, Vero, Miguel y todos y cada uno de aquellos que de forma directa o indirecta compartieron momentos valiosos a mi lado.

A la comunidad de Buenavista Loxicha, así como a los señores Pablo Reyes, Samuel Santiago y Felipe Reyes por el préstamo de su monte y así poder realizar este estudio.

Este proyecto estuvo parcialmente financiado por CONACYT (R38234-B).

ÍNDICE

Índice general	6
Índice de figuras	8
Índice de cuadros	9
Resumen	10
Abstrac	11
Introducción	12
<i>Ceratozamia</i> en el estado de Oaxaca	15
Genética de Poblaciones	17
Distribución Espacial	21
Estructura Genética Espacial	23
Objetivos	25
Objetivo general	25
Objetivos particulares	25
Hipótesis	25
Material y Método	26
Descripción de <i>Ceratozamia longifolia</i>	26
Sitios de estudio	28
Trabajo de campo	32
Colecta de material	32
Patrones de distribución espacial	32
Trabajo de laboratorio	32
Extracción	32
Análisis de datos	33

Diversidad genética	33
Estructura genética	35
Índices de similitud genética de Nei (I)	38
Distancias genéticas (D)	38
Fenogramas de las relaciones genéticas	39
Flujo génico	40
Patrones de distribución espacial	41
Estructura genética espacial	42
Resultados	45
Diversidad genética	45
Estructura genética	47
Similitudes y Distancias genéticas	50
Relaciones genéticas	51
Flujo génico	52
Patrones de distribución de los individuos	53
Estructura genética espacial	54
Discusión	57
Conclusiones	66
En conclusión	66
Bibliografía	68
ANEXO 1: Índices de diversidad genética para varias especies de cícadas	71
ANEXO 2: Buffer de extracción, sistemas de corrimiento y técnicas de tinción enzimática	72

Índice de Figuras

Figura 1. Distribución del complejo <i>Ceratozamia robusta</i> y sitios considerados refugios florísticos por Toledo (1982) y Wendt (1987)	13
Figura 2. Mapa de distribución del género <i>Ceratozamia</i> para el estado de Oaxaca	16
Figura 3. Diagrama de <i>Ceratozamia longifolia</i>	28
Figura 4. Zona de estudio, localización de las tres poblaciones de <i>Ceratozamia longifolia</i>	29
Figura 5. Fenograma basado en las isoenzimas de <i>Ceratozamia longifolia</i>	51
Figura 6. Distancias genéticas y distancias euclidianas	52
Figura 7. Flujo génico estimado en función de la distancia genética	53
Figura 8. Patrones de distribución de tres poblaciones de <i>Ceratozamia longifolia</i>	54
Figura 9. Correlograma que muestra la correlación espacial r_c a través de cuadrantes como una función de distancia	55

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Insectos polinizadores de varias especies de cícadadas	24
Cuadro 2. Especies que se localizan en el bosque mesófilo de montaña y cohabitan cerca de <i>Ceratozamia longifolia</i>	30
Cuadro 3. Características de las zonas de estudio de <i>Ceratozamia longifolia</i>	31
Cuadro 4. Loci enzimáticos analizados en <i>Ceratozamia longifolia</i>	33
Cuadro 5.- Frecuencias alélicas	46
Cuadro 6. Resumen de los estimadores obtenidos para tres poblaciones de <i>Ceratozamia longifolia</i>	47
Cuadro 7. Índices de fijación por locus en cada población de <i>Ceratozamia longifolia</i>	48
Cuadro 8. Estadísticos F de Wright para tres poblaciones de <i>Ceratozamia longifolia</i>	50
Cuadro 9. Distancia y Similitud genética de tres poblaciones de <i>Ceratozamia longifolia</i> de acuerdo con Nei	51
Cuadro 10. Número de migrantes individuales por generación y distancias geográficas	52
Cuadro 11. Resultados de la autocorrelación espacial de <i>Ceratozamia longifolia</i>	55

RESUMEN

Se realizó el análisis de la diversidad y estructura genética, así como los patrones de distribución de los individuos y la estructura genética espacial de tres poblaciones de *Ceratozamia longifolia* en la Sierra Madre del Sur, Oaxaca, utilizando electroforesis de isoenzimas.

Las medidas de los estimadores de la diversidad genética fueron: número de alelos por locus ($A = 1.94$), porcentaje de loci polimórficos ($P = 79.7362$), heterocigosis promedio observada ($H_O = 0.3331$) y esperada ($H_E = 0.2852$). Los valores de la estructura genética fueron: $F = 0.2376 \pm 0.097$, $\theta = 0.3373 \pm 0.0633$ y $f = -0.1511 \pm 0.0891$, siendo solo θ estadísticamente diferente de cero. Los valores de las distancias genéticas fluctuaron entre $I = 0.8967$ e $I = 0.7484$ y las similitudes genéticas variaron entre $D = 0.2898$ y $D = 0.1090$. El valor de flujo génico fue de $Nm = 0.2948 \pm 0.8$, el más alto fue de $Nm = 0.4871$ para Pablo Reyes-San José y el más bajo de $Nm = 0.1934$ para Juquilita-San José.

En lo que se refiere a los patrones de distribución de los individuos es agregada para las tres poblaciones aunque una de ellas, San José, presenta una distribución fluctuante entre aleatoria y agregada, pero finalmente la distribución es agregada. En lo que respecta a la distribución genética espacial, esta es parcial para las tres poblaciones, esto es que no hay una delimitación bien definida de los vecindarios genéticos.

Ceratozamia longifolia presenta el valor más alto de diversidad genética, en términos de heterocigosis, que hasta ahora se ha reportado, lo que sugiere que las tres poblaciones provienen de una población altamente diversa con una separación reciente.

Las poblaciones están estructuradas, por lo que existe una diferenciación entre ellas, hecho que pudo ser generado por deriva génica. La endogamia no actúa en la estructura genética de estas.

Los patrones de distribución corresponden con la dispersión de las semillas, aunque no se conoce la presencia de posibles dispersores.

En cuanto a la distribución genética espacial, existen factores ambientales tales como la inclinación y orientación de la pendiente que favorecen la dispersión de las semillas e impiden una clara delimitación de los vecindarios.

ABSTRACT

A diversity and genetic structure analysis was performed, as well as the distribution patron of the individuals and space genetic structure of three populations of *Ceratozamia longifolia*. This study was done at the Sierra Madre del Sur, State of Oaxaca using an isoenzymes eletrophoresys technique.

The size of the genetic diversity estimators were: number of alleles per locus ($A=1.94$), percentage of polymorphic loci ($P=79.7362$), observed mean heterozygosity ($H_O=0.3331$) and expected ($H_E=0.2852$). The values of the genetic structure are: $F= 0.2376 \pm 0.097$, $\theta= 0.3373 \pm 0.0633$ y $f= -0.1511 \pm 0.0891$, being only θ statystycaly different from cero. The values of the genetic distances were between $D=0.2898$ and $D=0.1090$. The gene flow value was of $Nm=$, while the highest was of $Nm=$ for Pablo Reyes-San José site, while the lowest of $Nm=0.1934$ for Juquilita-San José.

Concerning to the distribution patrons of the individuals, it is added for the three populations, although one of them (San José) has a fluctuating distribution between aleatory and added, finally it becomes added. Referring to the spatial genetic distribution, the three populations are partial; this means that there is no any well defined delimitation within the genetic neighborhoods.

Ceratozamia longifolia shows the highest value of genetic diversity, in terms of up dated heterozygosity reported, which it suggests that populations come from a highly diverse population with a recent separation.

Populations are structured, so that there is a differentiation between them, fact that could have occurred because of genetic drift. Endogamy does not apply on their genetic structure.

Distribution patrons correspond with the seed dispersion, although it is not known the possible presence of dispersants.

Regarding with the space genetic distribution, there are environmental factors such as slopes inclination and orientation, which favor the seed dispersion and avoid clear neighborhood delimitation.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con Rzedowski (1998), el estado de Oaxaca es el más diverso en lo que se refiere a la riqueza florística conocida o estimada actualmente. Oaxaca presenta una gran variedad de ecosistemas que se ubican dentro de las provincias fisiográficas de la Sierra Madre del Sur (SMS), el Sistema Montañoso del Norte de Oaxaca (SMNO) y la Planicie Costera Sureste (PCS) (Rzedowski 1988). En particular, la SMS, ubicada en la porción sur del estado, junto con la Faja Volcánica Trans-mexicana, se consideran como zonas de endemismos potenciales para varios grupos (Ferrusquía 1998).

Estos endemismos han sido de gran interés para los biólogos, ya que pueden ayudar a descifrar la historia y origen de la flora. Basados en la suposición de que patrones comunes de distribución de la biota son causados por una historia común, mediante la biogeografía vicariante se interpreta históricamente la distribución de la biota y áreas de endemismo (Tribsch 2004). Las fluctuaciones climáticas durante el Pleistoceno fueron el evento histórico natural más reciente que tuvo un tremendo impacto en la distribución de la biota y causó patrones de vicarianza en varias especies (Hewitt 1996). Diversas poblaciones de plantas y animales sobrevivieron en refugios glaciares restringidos, pero no todas pudieron recolonizar grandes áreas en el Holoceno (Tribsch 2004).

Entre los grupos que permanecieron en refugios glaciares y recolonizaron posteriormente áreas de la tierra se encuentra el género *Ceratozamia*, cuyas especies se localizan en un amplio rango de hábitats, que incluyen bosques templados deciduos de hoja ancha, bosques de pino-encino, bosque tropical perennifolio y bosque mesófilo de montaña. Mediante un análisis multivariado de los taxa de este grupo con su tipo de hábitat se encontró que existe un mayor número de ellas dentro de los bosques mesófilos, en donde las poblaciones llegan a ser dominantes del estrato herbáceo (Vovides *et al.* 2004a). Este género, perteneciente a la familia *Zamiaceae*, se encuentra representado por aproximadamente 21 especies distribuidas a lo largo de regiones templadas y tropicales de América, desde la Sierra Madre Oriental de México, en Tamaulipas, hasta las montañas del sur de Tabasco. En la parte occidental se distribuye desde las montañas de la Sierra Madre del Sur de Oaxaca hasta la Sierra de los Cuchumatanes, en Guatemala, con la reciente localización de una población en la zona montañosa al norte de Honduras (Hill *et al.* 2004; Pérez-Farrera 2005).

La distribución del género coincide con los refugios florísticos del Pleistoceno propuestos para varias especies tropicales (Toledo 1982; Wendt 1987; Vovides *et al.* 2004a, 2004b). Adicionalmente, se ha planteado que el sureste de México podría ser el centro de radiación y diversificación del género (Rzedowski y Palacios 1977; Rzedowski 1996; González y Vovides 2002). Vovides (2004a) plantea que el género *Ceratozamia* puede ser considerado un grupo paleoendémico originado al sur-sureste de México, desde donde inicia un proceso de radiación, por lo que las especies de este género divergieron recientemente (10 mil años atrás, González y Vovides 2002). La baja variación detectada mediante *RAPD* (*Randomly Amplified Polymorphic DNAs*) y la alta diferenciación morfológica apoya la radiación adaptativa reciente (Pérez-Farrera 2005) (Figura 1).

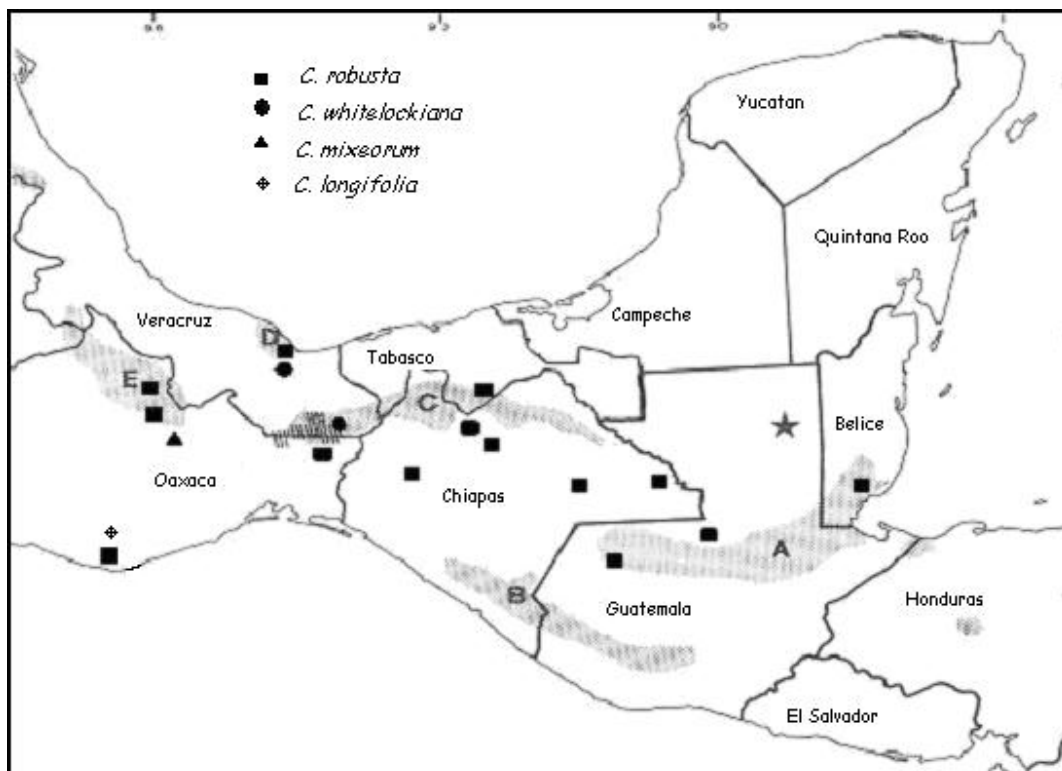


Figura 1.- Distribución del complejo *Ceratozamia robusta* y sitios considerados refugios florísticos por Toledo (1982) y Wendt (1987). A: área de Izabal; B: el Soconusco; C: zona del arco; D: los Tuxtlas; E: norte de Oaxaca. Tomado de Wendt (1987) y modificado con datos de Stevenson *et al.* (1986).

Stevenson *et al.* (1986) consideran la vicarianza como una posible explicación del actual patrón de distribución de *Ceratozamia* y probablemente este género presentó un ancestro común debido a que en el estado de plántulas es muy difícil encontrar diferencias entre las especies, con excepción de *Ceratozamia robusta* que difiere un poco. Este ancestro común (probablemente

muy parecido a *Ceratozamia robusta*) pudo haber evolucionado en el Mesozoico inferior y comienzo del Cenozoico y es muy probable que *Ceratozamia* estuvo ampliamente distribuida en gran parte del norte y sur de México (Rzedowski y Palacios 1977; Palacios y Rzedowski 1993) y quizás en Norte América. No obstante, debido a las fluctuaciones climáticas que prevalecieron en el Pleistoceno (Burnham y Graham 1999), algunos de los miembros del género sobrevivieron en el sur donde actualmente se concentra la mayor diversidad y es muy probable que una forma ancestral permaneció aislada en Honduras, un territorio con una gran historia de aislamiento geográfico (Coney 1982).

Otra hipótesis es que el actual patrón de distribución de este género es una respuesta a la migración y diversificación de mamíferos que sucedió después que se formó el puente de Panamá que unió Sudamérica con Centroamérica hace 16-15 ma. (Burnham y Graham 1999). Dichos mamíferos fungieron como dispersores de muchas especies de plantas, entre ellas las de *Ceratozamia*, el cual posteriormente se diversificó y especió al quedar aisladas sus poblaciones debido a las fluctuaciones climáticas y a la extinción de sus dispersores (Pérez-Farrera 2005).

Un estudio reciente con regiones espaciadoras transcritas internas (*ITS*) de ADN nuclear y la región *trnL-F* no codificadora de ADN de cloroplastos, revela que el género es monofilético (González y Vovides 2002), lo cual apoya las hipótesis de un proceso de vicarianza o dispersión posteriores (González y Vovides 2002; Vovides *et al.* 2003, 2004a, 2004b).

Ceratozamia se encuentra en poblaciones disyuntas en México (Vovides *et al.* 2003), en franjas relativamente estrechas más o menos paralelas a los diferentes sistemas montañosos (Jones 1993), en zonas inaccesibles con pendientes pronunciadas, en laderas montañosas y lomeríos (Pérez-Farrera *et al.* 2000; Withelock 2004; Pérez-Farrera 2005), aunque pueden encontrarse algunas poblaciones en zonas más o menos planas en suelos arcillosos, arenosos, gravosos o limosos con poca o mucha materia orgánica (Pérez-Farrera 2005) y en suelos someros (Pérez-Farrera *et al.* 2000; Vovides *et al.* 2003, 2004a).

Desde un punto de vista etnobotánico, este género, como el resto de las cícadas, representan un alto valor cultural y económico, debido a los diversos usos que se les dan por sus propiedades alimenticias, medicinales, tóxicas, ceremoniales u ornamentales, entre otras (Vazquez-Torres 1990, Chávez-González *et al.* 2005).

Los estudios en el género *Ceratozamia* son escasos y corresponden a enfoques de sistemática, dinámica poblacional, morfología, distribución, ecología, polinización y dispersión de

semillas (Tang 1988; Vovides 1991, 2003; Clarck *et al.* 1992; Norstog *et al.* 1992; Pérez-Farrera *et al.* 2000), entre otros.

A nivel molecular existen pocos trabajos, entre los que destacan el estudio de sistemática molecular para determinar la monofilia del género *Ceratozamia*, las relaciones filogenéticas con otros géneros de cícadas y la interrelación entre las especies del género mediante el uso de *RAPD* (González y Vovides 2002). En cuanto a la genética de poblaciones, hasta el momento solo existe un trabajo realizado en los complejos *Ceratozamia nostorgii* y *C. niqueliana* utilizando *RAPD* (Pérez-Farrera 2005), a pesar de que estudios realizados con el género *Dioon edule* y *Dioon angustifolium* han reportado una alta variación genética (González-Astorga 2003a, 2005).

Debido a que México es el centro de diversificación del grupo y a que existe la hipótesis de que su distribución corresponde con la existencia de refugios florísticos (González y Vovides 2002), es necesario conocer los procesos microevolutivos involucrados en su proceso de diversificación, por lo que es importante abordar aspectos de genética de poblaciones en estas especies, para determinar los niveles de variación genética y el grado de estructuramiento genético, así como los probables procesos y factores que han producido dichos patrones.

Actualmente, diversos programas de conservación, además de la preservación del hábitat, pretenden mantener existentes los niveles de variación genética en las especies que son raras o en peligro (Frankel y Soulé 1981; Simberloff 1988; INE-SEMARNAP 2000), ya que los niveles de variación genética bajos están relacionados con una disminución en la habilidad de las poblaciones a adaptarse a los cambios medioambientales y un incremento en la susceptibilidad a las plagas y presiones por enfermedades (Barrett y Kohn 1991).

***Ceratozamia* en el estado de Oaxaca**

Rzedowski y Palacios (1977) reportan la existencia de restos fósiles de polen de *Ceratozamia* provenientes del Mioceno (Cenozoico), en Oaxaca y Chiapas; en el caso de Oaxaca, el sitio es un bosque mesófilo de montaña que alberga vegetación relictual (*Engelhardtia mexicana*, *Yushania* sp., *Alsophila satrinii*, *Miconia*, *Chamaedorea*).

Para Oaxaca, mediante una revisión de herbario, se han identificado ocho especies de *Ceratozamia* (Figura 2): *C. euryphyllidia*, *C. norstogii*, *C. robusta*, *C. mexicana*, *C. sp.* (Chimalapensis), *C. mixeorum* *C. whitelockiana*; de las cuales dos son endémicas (*C. mixeorum* y *C. whitelockiana*).

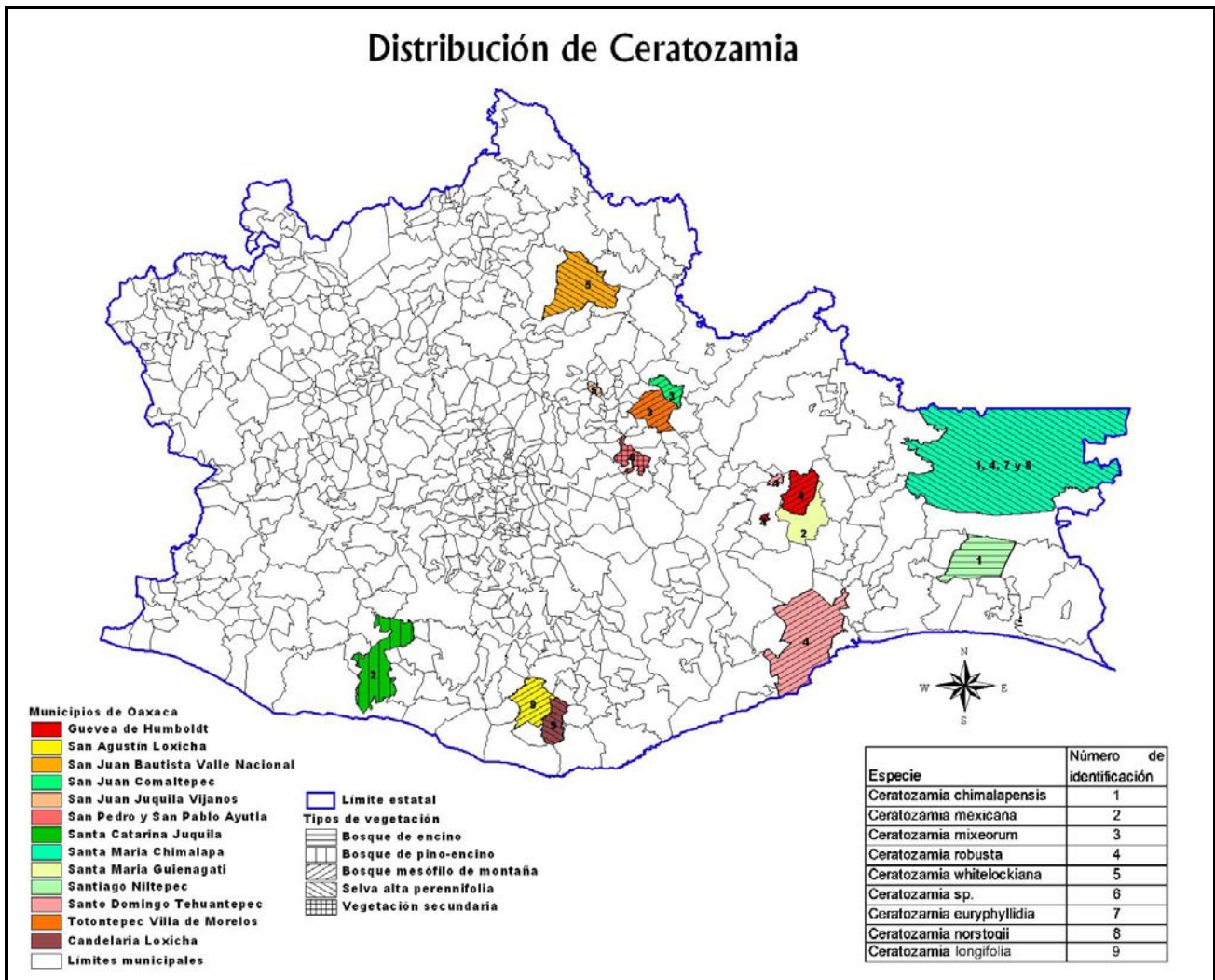


Figura 2.- Mapa de distribución del género *Ceratozamia* para el estado de Oaxaca. Elaborado por Gilberto Hernández Cárdenas (2007).

Recientemente, durante el levantamiento florístico para la caracterización de la vegetación (CONACYT R38234-B), el equipo de la Dra. Rendón Aguilar (2003), localizó poblaciones de una especie que, de acuerdo con Vovides y Nicolalde (com. per.), se trata de una especie que fue descrita en 1848 por Miquel y está en proceso de re-descripción (Chávez-González *et al.* 2005). Esta especie corresponde al objeto del presente estudio.

Mediante una revisión de herbario se encontró que las poblaciones de *Ceratozamia* en el estado de Oaxaca se encuentran principalmente dentro del bosque mesófilo de montaña, aunque también habitan en bosque de encino, bosque de pino-encino, selva alta perennifolia y vegetación secundaria, en un rango altitudinal que va de 630 a los 2000 m (Chávez-González *et al.* 2005). Tres de estas especies (*Ceratozamia mixeorum*, *C. whitelockiana* y *C. robusta*) habitan en un

amplio rango de hábitat, desde bosque mesófilo de montaña hasta el bosque tropical subcaducifolio (Pérez-Farrera 2005).

Genética de Poblaciones

La diversidad genética ha jugado un papel importante en la sobrevivencia de las especies a largo plazo (Frankel 1970), ya que es la base para los cambios evolutivos en poblaciones naturales y contribuye en la adaptabilidad de los individuos (Schaal *et al.* 1991).

El potencial evolutivo de una especie depende en parte de los niveles de variación genética mantenida dentro de ésta, así como en la distribución de la variación genética dentro y entre sus poblaciones (Soltis y Soltis 1990). Esta diversidad en las especies es el resultado de eventos históricos y procesos evolutivos (Wright 1969). En dicho contexto, la estructura genética en poblaciones naturales refleja la interacción de diferentes procesos como la selección natural, deriva génica, endogamia, mutación, migración y flujo génico (Wright 1969; Lewontin 1974; Slatkin 1987; Falk y Holsinger 1991), así como su historia biogeográfica (Max *et al.* 1999) y las características ecológicas de sus hábitats (Xiao *et al.* 2004).

Hamrick (1983) y Loveless y Hamrick (1984) encontraron que la forma de vida, rango geográfico, sistema de apareamiento y estatus taxonómico, tienen efectos significativos en la diferenciación de la diversidad genética entre y dentro de las poblaciones de plantas. De igual forma, la fluctuación en el número y tamaño de la población, los procesos biogeográficos y de especiación, por sí mismos, pueden determinar la composición genética actual de las especies (Hamrick y Godt 1996). La importancia relativa de los factores difiere dentro de las especies y grupos ecológicos. Esta variabilidad es el resultado de complejas interacciones entre características de historia de vida de la especie, condiciones ambientales locales y la historia ecológica de especies (Álvarez-Buylla *et al.* 1996).

En general, las cícadadas presentan valores bajos de heterocigocidad observada ($H_O = 0.014-0.263$) y alta diferenciación genética entre poblaciones ($G_{ST} = 0.03-0.59$) cuando se comparan con lo reportado para gimnospermas ($G_{ST} = 0.07$) (Yang y Merrow 1999), *Polisticum munitum* ($G_{ST} = 0.024$) (Soltis y Soltis 1987), *Pinus virginiana* ($G_{ST} = 0.053$) (Parker *et al.* 1997) (ANEXO 1). Esto puede atribuirse a que las especies presentan rangos geográficos restringidos y tamaños poblacionales relativamente pequeños (Donaldson 2003), así como el hecho de que las poblaciones se encuentran aisladas y con poco flujo génico entre ellas. La excepción a este patrón la marca la especie australiana *Macrozamia riedlei*, ya que se reporta una alta variación

genética (Byrne y James 1991). Algo similar se reporta para las especies endémicas de México *Dioon edule* y *D. angustifolium*, que aunque tienen valores de variación más bajos que la primera, éstos son más altos comparados con lo reportado para otras cícadas, árboles tropicales regionales, coníferas, helechos y plantas endémicas perennes (González-Astorga *et al.* 2003a, 2005).

Las especies del orden *Cycadales* son dioicas, de lento crecimiento, perennes de larga vida (Jones 1993). Basados en estas características biológicas, se espera que tengan altos niveles de variación genética dentro de las poblaciones (Loveless y Hamrick 1984). Los estudios realizados hasta ahora muestran que las cícadas presentan más baja variación genética que la esperada. Esto podría deberse a que la evolución bioquímica dentro de las cícadas es baja comparada con otras plantas con semillas, lo que limita la dispersión de estas, debido a las sustancias neurotóxicas que se encuentran presentes (Walters y Decker-Walters 1991).

El complejo *Macrozamia plurinervia*, comprende siete especies australianas y habitan en bosques de eucalipto y pino. Los valores promedio de variación genética para este complejo son: número de alelos por locus (A) 1.5, el porcentaje de loci polimórficos (PLP ó P) 36.58, el promedio de heterocigosis observada (H_O) 0.08, heterocigosis esperada (H_E) 0.111. Los valores relativamente bajos de diversidad genética que se reportan, probablemente se deben a que las poblaciones se encontraban distantes y en hábitats diferentes (*M. conferta*) y poblaciones de otras especies estaban muy cerca (*M. fearnsidei*). Esta diversidad genética baja puede atribuirse a diversos factores incluyendo el rango geográfico restringido, poblaciones pequeñas aisladas, así como los sistemas de entrecruzamiento (exocruza), la deriva génica, efecto fundador y la historia reciente de la población (Sharma *et al.* 1999, 2004). Hamrick y Godt (1989) reportan que el reducido tamaño poblacional y la extinción local de una población propician la baja diversidad genética.

Se ha reportado baja diversidad genética ($A= 1.3$, $P= 27.43$, $H_O= 0.039$, $H_E= 0.071$) para *Macrozamia parcifolia* ($A= 1.2$, $P= 17.6$, $H_O= 0.02$, $H_E= 0.037$), *M. pauli-guilielmi* ($A= 1.3$, $P= 31.3$, $H_O= 0.043$, $H_E= 0.081$) y *M. crassifolia* ($A= 1.4$, $P= 35.3$, $H_O= 0.067$, $H_E= 0.107$), tres especies endémicas de Australia, siendo la posible razón su rango geográfico restringido y las pequeñas poblaciones aisladas, las cuales raramente exceden los 100 individuos. Tal estructura poblacional puede resultar en una baja diversidad genética debido a la selección direccional dentro de un rango medioambiental estrecho (Jones y Foster 1994) y una deriva génica aleatoria en pequeñas

poblaciones. La baja diferenciación genética puede deberse a que estas especies divergieron recientemente de un ancestro depauperado y su diferenciación aún no se ha llevado a cabo (Sharma *et al.* 1998).

En *Macrozamia riedlei*, endémica de Australia y principal componente de matorrales y bosques, los valores de diversidad genética son relativamente más altos que para el resto de las cícadas ($A= 2.4$, $P= 93$, $H_O= 0.263$, $H_E= 0.274$). Se reportan altos niveles de polimorfismo para esta especie cuando es comparada con un amplio rango de especies de plantas con características similares en la historia de vida (especies de larga vida, exocruza, polinizadas por viento o semillas dispersadas por gravedad, Hamrick y Godt 1990), incluyendo coníferas. Hay más heterocigotos que los esperados que sugiere una ventaja de éstos en la sobrevivencia. Una consecuencia de la limitada dispersión de semillas, es que las plántulas tienden a crecer en agrupaciones en las cuales compiten por los nutrientes y el espacio, incluyendo a la planta madre. Las aloenzimas heterocigotas pueden ser preferencialmente seleccionadas en la competencia de las plántulas. Además, la endogamia no tiene la suficiente intensidad como para tener un efecto en la diferenciación poblacional ($F_{IS}= -0.079$) (Byrne y James 1991).

En el caso de *Cycas seemannii*, localizada en las islas del Pacífico sobre la jurisdicción de Fiji, Nueva Caledonia, Tonga y Vanuatu, la baja variación genética ($A= 1.8$, $P= 50.0$, $H_O= 0.048$, $H_E= 0.138$) puede ser atribuido al hecho de que las poblaciones crecen en una plantación de pino y éstas han sido fragmentadas, además de presentar perturbaciones por actividades humanas. La vulnerabilidad al fuego, baja dispersión y potencial de recolonización, podrían generar un aparente declive en la variación genética dado por la fragmentación de las poblaciones, lo cual indica que esta especie puede ser muy vulnerable ecológica y genéticamente a los impactos humanos (Keppel 2002).

En el sur de África se conocen 13 especies de *Encephalartos*, de las cuales se tomaron 9 especies para hacer secuencias de ADN (ITS y *rbcL*) y el estudio aloenzimático para determinar las relaciones filogenéticas y las relaciones entre las especies. Los valores de diversidad genética reportados son los más bajos al compararlos con otras cícadas, gimnospermas, helechos, pinos y especies endémicas ($A= 1.6$, $P= 35.7$, $H_O= 0.135$). La posible explicación para las pequeñas distancias genéticas (0.005-0.59) entre las especies de *Encephalartos* (Van der Bank *et al.* 2001) son: a) lentitud para alcanzar la edad reproductiva (hasta 50 años), b) los eventos reproductivos

exitosos están probablemente separados por cien años o más, y c) las plantas necesitan un mecanismo de dispersión de semillas a larga distancia (Tang 1990; Norstog y Nicholls 1997).

Así mismo, el alto coeficiente de endogamia (F_{IS}) en *Macrozamia pauli-guilielmi*, *M. parcifolia* y *M. heteromera* (F_{IS} = 0.47, 0.41, 0.37; respectivamente) sugiere apareamiento entre individuos relacionados. Esto puede ser el resultado del proceso de dispersión, el cuál comienza con la desintegración del cono y la caída de las semillas cerca de la planta madre. Las semillas son relativamente grandes y normalmente son dispersadas a distancias cortas por pequeños mamíferos. La dispersión se da dentro de pequeños radios (5 m) a partir de la planta madre lo cual puede derivar en una subestructura espacial dentro de la población y reproducción biparental. Los valores de F_{IS} indican carencia de heterocigotos, así como algún grado de endogamia entre individuos relacionados, esto probablemente al tipo de polinización, que se da por medio de gorgojos y escarabajos, aunado a la presencia de plántulas cerca de la planta madre. La presencia de altos valores de F_{IS} son inusuales en individuos adultos de especies de larga vida debido a que la selección usualmente elimina a los individuos altamente homocigotos (Sharma *et al.* 1998, 1999, 2004).

En el complejo *Macrozamia heteromera*, que comprende cinco especies en Australia, los valores de la diversidad genética total ($H_T = 0.16$) y de diferenciación genética ($G_{ST} = 0.102$) sugieren una divergencia reciente dentro de estas especies (Sharma *et al.* 1998, 1999). La alta diferenciación entre las poblaciones aisladas indica que el flujo génico a larga distancia es restringido. La poca variación dentro de las poblaciones muestra que algunas poblaciones fueron fundadas por uno o algunos dispersores a larga distancia. El resultado de la dispersión puede haber sido históricamente reciente puesto que las identidades genéticas entre algunas poblaciones con grandes distancias geográficas son muy altas. Los patrones de variación aloenzimática demostraron que la evolución del complejo es la consecuencia del aislamiento aunado a la especialización ecológica (Yang y Merrow 1996).

Las poblaciones de *Dioon edule*, cícada endémica de México, se distribuyen a lo largo de la Sierra Madre Oriental, en ecotonos entre el bosque tropical deciduo y bosque de encino. Las poblaciones presentan relativamente altos niveles de diversidad y variación genética ($A = 1.44 \pm 0.19$, $PLP = 54.78 \pm 10.94$, $H_O = 0.273 \pm 0.097$, $H_E = 0.239 \pm 0.039$). En este caso la distribución de la diversidad genética parece estar correlacionada con factores como la historia de vida y la historia biogeográfica (González-Astorga *et al.* 2003b).

En el caso de *Dioon angustifolium*, endémico de México, se encuentra a lo largo de la Sierra Madre Oriental. Los niveles de diversidad y variación genética son relativamente más bajos que los reportados para *D. edule* ($A = 1.67 \pm 0.23$, $PLP = 52.4$, $H_O = 0.215 \pm 0.132$, $H_E = 0.218 \pm 0.093$), esto puede ser atribuido a que la distribución geográfica es más amplia en *D. edule*, tamaños poblacionales más grandes y altas densidades poblacionales que en *D. angustifolium*. Esto es consistente con Gitzendanner y Soltis (2000) y Cole (2003) quienes describen estos patrones de variación genética entre especies de plantas congeneres raros y de distribución amplia. Además la deriva génica, asociada con cuellos de botella (bottlenecks) generados por vicarianza o efectos fundadores, puede haber impulsado o acompañado de una rápida especiación (González-Astorga *et al.* 2005).

D. angustifolium muestra un exceso de heterocigotos, lo cual indica que el efecto fundador puede haber jugado un papel importante en la historia de la especie (González-Astorga y Núñez-Farfán 2001; González-Astorga y Castillo-Campos 2004; González-Astorga *et al.* 2004, 2005).

En el caso de *Ceratozamia*, debido a que prácticamente no existen trabajos en genética de poblaciones, no se puede realizar alguna comparación, por lo que es necesario ampliar los estudios a otras especies

Distribución espacial

En los paisajes naturales y modificados, la dispersión es un proceso fundamental que afectan su regulación y estabilidad, influyen la dinámica de extinción y recolonización en las poblaciones irregulares y metapoblaciones, y controlan los patrones de flujo génico. No obstante, la importancia de la dispersión en plantas y su efecto sobre los patrones genéticos actuales, el conocimiento particularmente en el caso de las cícadas es muy escaso (Pérez-Farrera *et al.* 2000; Vovides 2003).

Para poder entender la dinámica poblacional y de comunidad, así como el funcionamiento de los ecosistemas, es fundamental conocer la distribución espacial de los organismos (Crist y Wiens 1996). Las plantas están expuestas a múltiples factores que afectan su distribución. Estos factores pueden ser intrínsecos, como la distancia de dispersión de semillas, depredación y sus relaciones con otros organismos, así como factores ambientales como la temperatura y precipitación (Greig-Smith 1983). De acuerdo con Epperson y Álvarez-Buylla (1997), la dispersión de semillas y la disponibilidad de un hábitat adecuado para las plántulas, puede producir una distribución agregada, pero la densidad va a depender de la mortalidad, la cual puede modificar

este patrón, dando un giro hacia una distribución aleatoria de organismos de tamaño intermedio. Finalmente, en la etapa de madurez, el resultado puede ser de un patrón de distribución normal. Esta tendencia hacia un patrón de distribución normal es explicada usualmente por la importancia del desarrollo de la competencia por los recursos conforme la planta incrementa su tamaño (Phillips y MacMahon 1981).

En *Ceratozamia* la dispersión de semillas es muy pobre, al ser primordialmente por gravedad, y puede ser un factor que influye significativamente en la distribución de los individuos. La baja o nula dispersión de semillas a grandes distancias por animales puede estar influenciada por el hecho de que las semillas contienen neurotoxinas como cycasinas, macrozaminas, neocycasinas 3-metilamino-L-alanina (BMAA), metilazoxymetanol (MAM) y ácido 2,4-diaminobutírico (DABA) (Norstog y Nicholls 1997; Schneider *et al.* 2002; Castillo-Guevara y Rico-Garay 2003). Estas características químicas pueden haber jugado un importante rol ecológico como defensa anti-herbivoría durante la larga historia evolutiva de las cícadas (Moretti *et al.* 1983), aunque también puede influir el gran tamaño de las semillas como en el caso de *Cycas*, *Dioon* y *Macrozamia*.

Se han reportado para algunas cícadas las especies que funcionan como dispersores de las semillas, en *Encephalartos*, son dispersadas principalmente por monos (*Cercopithecus*), en *Cycas* este proceso es llevado a cabo por zorros voladores (*Pteropus*), en *Zamia integrifolia* la dispersión es por aves (*Mimus polyglottos*); se ha registrado a ratones del género *Peromyscus* como dispersores de *Dioon edule* (*Peromyscus mexicanus*; Vovides *et al.* 2003, 2004b), en *Ceratozamia matudae* y *C. mirandae* se han registrado a pecaríes, jabalíes y coatís (*Tayassu pecari*, *T. tajacu* y *Nasua narica*) como sus dispersores (Pérez-Farrera 1999; Pérez-Farrera *et al.* 2000), en el caso de *Ceratozamia longifolia* aún no se han observado dispersores.

Además de los dispersores, otras formas de dispersión de semillas pueden determinar el patrón de distribución espacial dentro de las poblaciones. Algunos trabajos que se han realizado con *Ceratozamia mirandae* y *C. matudae* han reportado que el patrón de distribución es agregado (Vovides *et al.* 2003, 2004b), lo que se atribuye principalmente a la forma de dispersión de la semilla, que ocurre primordialmente por gravedad, debido a que la mayoría de las plántulas y juveniles se localizan cerca de la planta madre, bajo la sombra de los árboles o en el fondo de las barrancas, e indica una dispersión de semillas pobre por animales (Pérez-Farrera *et al.* 2000; Keppel 2001; Vovides *et al.* 2003, 2004b; Pérez-Farrera y Vovides 2004).

Para *Ceratozamia longifolia* solo tenemos registro de visitantes pero no hay certeza de su papel como polinizadores.

Estructura genética espacial

Debido a la limitada movilidad de las plantas, su estructura genética envuelve una estructura espacial, o su actual distribución física de los individuos. Por lo tanto, los patrones espaciales a menudo tienen implicaciones genéticas. Los patrones espaciales y genéticos ocasionalmente pueden reflejar la heterogeneidad ambiental y presiones de selección diferencial (Loveless y Hamrick 1984).

Al conocer los patrones de la estructura genética espacial y cómo varían entre sexos, clases de edades y en el tiempo, se pueden obtener evidencias importantes acerca de la dispersión (Peakall *et al.* 2003). El flujo génico a través de la dispersión de polen y semillas es una clave determinante en el establecimiento de la estructura genética: cuando el flujo génico total es restringido, se espera un decremento en las relaciones genéticas entre pares de individuos conforme incrementa la distancia entre ellos, de acuerdo con los modelos de aislamiento por distancia (Wright 1943; Schnabel *et al.* 1991; Chung y Epperson 2000).

Las cícadas dependen en gran medida de sus polinizadores y la polinización se da primordialmente por insectos del grupo de los Cucurliónidos y Langúridos (Norstog *et al.* 1986; Tang 1987; Norstog y Fawcett 1989) (Cuadro 1).

Cuadro 1.- Insectos polinizadores de varias especies de cícadas (tomado de Schneider *et al.* 2002).

cícadas	Insectos	Autor
<i>Zamia furfuracea</i>	<i>Rhopalotria mollis</i> (Coleopt. Curcul. Belidae)	Norstog <i>et al.</i> 1986
<i>Zamia integrifolia</i>	<i>Rhopalotria slossoni</i> <i>Paraxonota zamiae</i> (Coleopt. Languriidae)	Tang <i>et al.</i> 1987
<i>Encephalartos cycadifolium</i>	<i>Metacucujus encephalarii</i> (Coleopt. Boganiidae)	Donaldson <i>et al.</i>
<i>Encephalartos villosus</i>	Nueva especie de Xenoscelini. Coleopt. Languriidae <i>Porthetes</i> sp. (Coleopt. Cucul. Amphocerini)	Donaldson 1997
<i>Encephalartos</i> sp.	Nueva especie y género (Coleopt. Xenoscelini. Languriidae)	
<i>Macrozamia comunis</i>	<i>Antliarhinus zamiae</i> (Coleopt. Brentibidae) <i>Apinotropis</i> sp. (Coleopt. Curcul. Anthribidae)	Oberprieler 1999
<i>Macrozamia macdonellii</i>	<i>Tranes luteriodes</i> y <i>T. sparsus</i> (Coleopt. Curculionidae)	Chadwick 1993
<i>Cycas</i> sp.	<i>Cycadothrips chadwicki</i> (Thysanopt. Aelothripidae)	Terry 2001
	<i>Cycadothrips albrechti</i> (Thysanopt. Aelothripidae)	Mound y Terry 2001
	<i>Trychiodes</i> sp. (Coleopt. Curcul. Curculionidae)	Tang <i>et al.</i> 1999
	<i>Xenocryptus</i> sp. (Coleopt. Languriidae)	
<i>Dioon y Zamia</i>	<i>Rhopalotria mollis</i> Sharp (Coleopt. Curcul. Belidae)	Pérez-Farrera 2005
	<i>R. slossoni</i> Schaeffer	Vovides 1991
	<i>Pharaxonotha zamiae</i> Blake	

Al menos en el género *Dioon* y *Zamia* existen polinizadores específicos, como *Pharaxonotha* sp. y *Rhopalotria* sp. (*Rhopalotria mollis* Sharp, *R. slosoni* Schaeffer, *Pharaxonotha zamiae* Blake), el mismo fenómeno podría esperarse en la mayoría de los géneros neotropicales, incluyendo *Ceratozamia* (Vovides 1991; Pérez Farrera 2005), además de que los polinizadores son específicos por región y la distribución de los mismos está íntimamente ligada a las cícadas.

En *Ceratozamia mexicana* se ha reportado *Pharaxonotha* sp. (Vovides 1991) y se ha encontrado especificidad al nivel de género (Vovides *et al.* 1997), pero no se sabe si esta existe a nivel de especie (Pérez-Farrera 2005) (Cuadro 1).

Debido a la importancia que tiene el conocer tanto la diversidad como la estructura genética en las poblaciones, es preciso realizar más estudios para poder determinar el estado de las poblaciones de diversas especies, el estatus de riesgo en el que se encuentra y estos resultados podrían servir como base para futuras investigaciones. De igual forma, mediante este tipo de estudios se pueden crear medidas de protección para poder conservar la riqueza alélica que proporcionan las especies, sobre todo las de distribución restringida.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar los niveles de variación aloenzimática y estructura genética en poblaciones de *Ceratozamia longifolia*, en la Sierra Madre del Sur, Oaxaca.

Objetivos particulares

- ∞ Determinar los niveles de variación aloenzimática en tres poblaciones de *Ceratozamia longifolia* localizadas en la Sierra Madre del Sur.
- ∞ Determinar la estructura genética entre poblaciones.
- ∞ Determinar los patrones de distribución espacial de los individuos dentro de las poblaciones.
- ∞ Determinar la estructura genética espacial de cada una de las poblaciones.

HIPÓTESIS

Hipótesis 1

Dado que las poblaciones de *Ceratozamia longifolia* en la Sierra Madre del Sur tienen una densidad poblacional baja y se encuentran aisladas geográficamente unas de otras, es probable que la diversidad genética de la especie sea baja y la diferenciación entre poblaciones alta.

Hipótesis 2

Dado que *Ceratozamia longifolia* es una especie perenne de larga vida, que las semillas se dispersan por gravedad y que son polinizadas por insectos, se espera que los individuos se encuentren distribuidos de forma agregada, así como la presencia de pequeños vecindarios genéticos bien delimitados.

MATERIAL Y MÉTODO

Ceratozamia longifolia

La especie de estudio se encuentra en proceso de reidentificación y redescipción (CONACYT, R38234-B). Un análisis preliminar indica que podría tratarse de una especie colectada en 1848, por Miquel, perteneciente al complejo de *Ceratozamia robusta* (Vovides y Nicolalde, com. pers.). Por lo que se dará la descripción general de dicho complejo.

El complejo *Ceratozamia robusta* es el único complejo de especies que presenta un rango amplio de distribución (Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Veracruz, Belice y Guatemala) (Vovides *et al.* 2004a, Whitelock 2004).

Son plantas vasculares semileñosas a leñosas, perennes, de crecimiento extremadamente lento y muy longevas. Es un género dioico, que se caracteriza por presentar tronco globoso, subgloboso, cilíndrico con la edad, ramificado o no ramificado y a veces parcialmente subterráneo, protegido por bases persistentes o cicatrices foliares, hipógeo o epígeo.

Su sistema radical consta de una raíz principal profunda con función de penetración y anclaje, un sistema de raíces fibrosas de alimentación y otras con crecimiento hacia arriba. Estas raíces que crecen hacia arriba forman masas coraloides en la superficie del suelo, donde entran en simbiosis con cianobacterias (algas azul-verdes). Las raíces profundas presentan micorrizas vesículo-arbusculares que facilitan la absorción de nutrimentos y agua (Yáñez Espinosa 2006).

Los foliolos son linear-lanceolados, subfalcados a falcados, simétricos a ligeramente asimétricos; el ápice de los foliolos puede ser largamente atenuado a agudo, cuando son adultos. Los troncos son cilíndricos y pueden ser parcialmente acaulescentes o pueden ser caulescentes. La mayoría de las especies presentan troncos que no ramifican, no obstante algunas especies pueden presentar ramificación cuando son viejas (*Ceratozamia mirandae*, *C. alvarezii* y *C. zoquorum*). Estos troncos están protegidos por las bases persistentes o cicatrices foliares regularmente rómbicas. En la parte central del tronco emergen generalmente las catáfilas que son triangulares y tomentosas.

El crecimiento de las hojas en la mayoría de las especies son erectas, pero algunas especies pueden presentar hojas arqueadas, colgantes, largas hasta tres metros (*Ceratozamia robusta*) o cortas hasta 50 cm. (*Ceratozamia alvarezii*). La vernación de las hojas es erecta en

la mayoría de las especies, sin embargo, existen especies que presentan vernación circinada (*Ceratozamia moretti*, *C. zoquorum*). Las hojas son pinnadas, ovales u oblongas, los folíolos de la parte media generalmente son más largos y más anchos que las de la parte apical y basal de la hoja.

El pecíolo y el raquis son cilíndricos en todas las especies de *Ceratozamia*. Éstas poseen aguijones que disminuyen hacia el raquis en intensidad y en longitud. Sin embargo, algunas especies pueden ser inermes (*Ceratozamia kuesteriana*, *C. becerrae* y *C. zoquorum*). La base del pecíolo generalmente es tomentosa de color café. El raquis y el pecíolo en la mayoría de las especies son rectos. Sin embargo, en *Ceratozamia norstogii* y *C. zaragozae* son espiralados y cuando emergen pueden presentar tomentos, pelos largos o cortos generalmente de color beige.

Los folíolos son lineares lanceolados, cuya textura puede ser coriácea, subcoriácea o papirácea. En sección transversal pueden ser planos o acanalados. Generalmente, los folíolos se insertan al raquis en un solo plano. Las articulaciones de los folíolos en la mayoría de las especies son verdes (*Ceratozamia norstogii*, *C. alvarezii*, *C. mirandae*), amarillas (*C. matudae*) o anaranjadas (*C. becerrae*, *C. zoquorum*). Los folíolos pueden ser lineares, falcados o subfalcados.

Los estróbilos masculinos o microstróbilos son erectos, cilíndricos o cónicos, con pedúnculos alargados o cortos, tomentosos, mientras que los estróbilos femeninos o megastróbilos son erectos en la mayoría de las especies, o descendentes; cilíndricos en forma de barril, con pedúnculos largos o cortos, tomentosos o inermes (Pérez-Farrera 2005).

La planta masculina produce un cono polínico efímero, cuyo polen es acarreado por pequeños escarabajos (curculiónidos y langúridos), que polinizan la planta femenina cuando su cono está receptivo. El cono femenino es más grande y pesado que el masculino. La permanencia del cono femenino es de poco más de un año en *Ceratozamia*; durante ese tiempo ocurre la fertilización y maduración de la semilla (Yáñez Espinosa 2006). Las semillas en *Ceratozamia* presentan un letargo fisiológico debido a los embriones inmaduros, porque las semillas no germinan inmediatamente después de la dehiscencia del cono. Los embriones requieren de seis a ocho meses o más para madurar antes de la germinación (Vovides *et al.* 2004a).

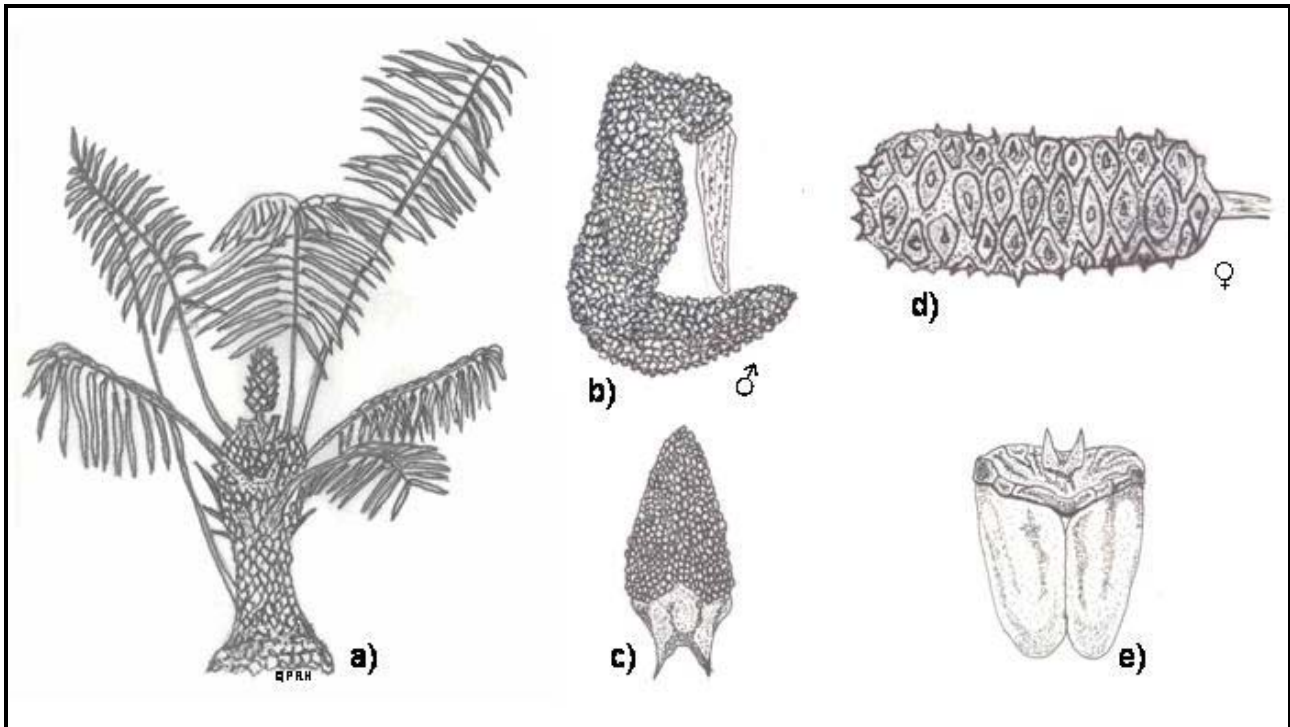


Figura 3.- Diagrama esquemático de *Ceratozamia longifolia*. a) Ejemplar masculino adulto con cono, b) estróbilo masculino con pedúnculo, c) microstróbilo, d) estróbilo femenino con pedúnculo y e) megastrobilo. Elaborado por Quijano Pérez (2007).

Al igual que el resto de las especies de *Ceratozamia*, las poblaciones pertenecientes a este complejo también se encuentran dentro del bosque mesófilo de montaña, aunque también habitan en bosque de encino, bosque de pino-encino, selva alta perennifolia y vegetación secundaria, en un rango altitudinal que va de 630 a los 2000 m (Chávez-González *et al.* 2005; Pérez-Farrera 2005). Tres de estas especies (*Ceratozamia mixeorum*, *C. whitelockiana* y *C. robusta*) habitan en un rango amplio de ambientes, desde bosque mesófilo de montaña hasta el bosque tropical subcaducifolio.

La mayoría de las especies crecen sobre suelos arcillosos con poca materia orgánica o semi-limosos con abundante materia orgánica. Sin embargo, algunas especies pueden crecer sobre rocas (*Ceratozamia kuesteriana*, *C. becerrae*, *C. zoquorum*) (Figura 3).

Sitios de estudio

Dentro de la SMS, en los municipios de San Agustín Loxicha y Candelaria Loxicha, se albergan ocho ecosistemas diferentes ubicados en un gradiente altitudinal que va de los 0 a 2000 m.s.n.m. (Aragón 2004; Luna-José 2001; INEGI 1986; CONACYT R38234-B) y comprende desde bosques de pino hasta selva baja caducifolia. Las poblaciones de

Ceratozamia se localizan en la vertiente del Pacífico, dentro de los municipios de San Agustín Loxicha y Candelaria Loxicha, que forman parte de la provincia Costa Pacífica, correspondiente a la región caribea del reino Neotropical (Rzedowski 1988). El área de estudio se localiza dentro de la Región Prioritaria Terrestre No. 129 (Arriaga *et al.* 2000) (Figura 4).

Para el presente estudio se trabajaron tres poblaciones: Juquilita, Pablo Reyes y San José (Cuadro 3). El área donde se localizan corresponde al Mesozoico, con rocas volcánico sedimentarias (Velasco de León, com. per.). El área presenta gran heterogeneidad debido, por un lado, a que el suelo que prevalece en los sitios es inestable, además de ser poco profundo, con acumulación variable de materia orgánica y rocas expuestas. Por otro lado, a que el relieve es accidentado con laderas de pendientes pronunciadas (de 30 a 90% de inclinación) y cañadas, así como diferentes grados de exposición a los vientos del Pacífico (160°S, 90°SO, 70°SE).

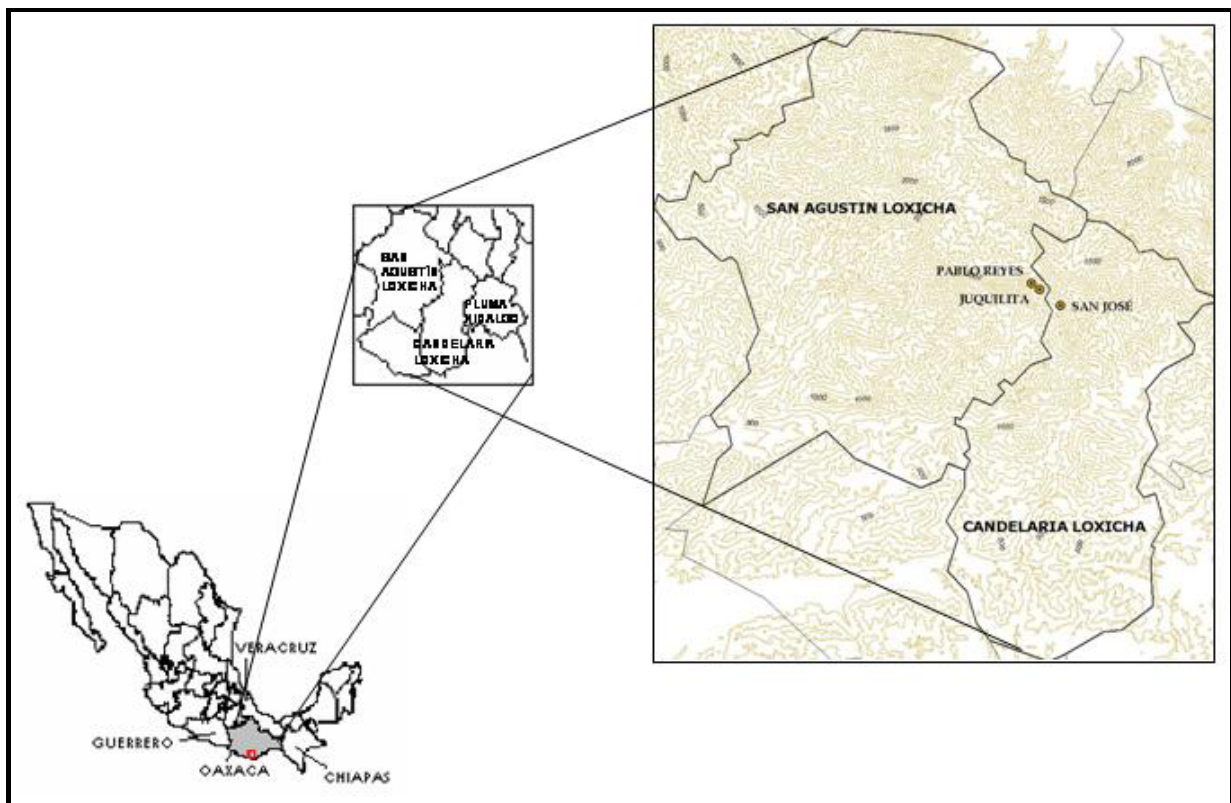


Figura 4.- Mapa de localización de las tres poblaciones de *Ceratozamia longifolia*. Elaborado por Miguel Bravo (2006).

El clima de la región se clasifica como Aw2(w) y es un grupo de climas cálidos, subgrupo de climas cálidos con temperatura media anual superior a 22°C, temperatura del mes más frío superior a 18°C, tipo cálido subhúmedo con lluvias en verano, subtipo más húmedo de los cálidos subhúmedos, precipitación del mes más seco inferior a 60 mm.

En la región se puede encontrar toda una diversidad edafológica, pero en los sitios de estudios el tipo de suelo que podemos encontrar principalmente son: a) Cambisol húmico, que es suelo profundo de textura franco arenosa, de plasticidad y adhesividad ligera y buen drenaje; es rico en materia orgánica y su pH es ácido. b) Luvisol crómico, que es profundo, con un buen desarrollo, textura migajón arcillosa en el horizonte superficial y arcillosa en el subyacente; su adhesividad y plasticidad es fuerte y su drenaje interno es moderado; el pH es ácido y es pobre en materia orgánica y c) Litosol, suelo delgado que descansa directamente sobre roca sedimentaria de tipo caliza o metamórfica; su textura es fina, el color es café oscuro; es de plasticidad ligera y drenaje interno bueno; su pH es ligeramente ácido y su contenido de materia orgánica es bajo (Luna-José 2006).

Las poblaciones de Juquilita y Pablo Reyes se localizan dentro de una asociación vegetal que, de acuerdo con la composición florística, altitud y distribución fragmentaria, corresponde a un bosque mesófilo de montaña (Hernández 2004), el cual forma parte de una franja discontinua que se extiende a lo largo de varias laderas (Rendón com. pers.). Estos sitios representan la distribución más costeña reportada hasta ahora para este tipo de vegetación en la vertiente del Pacífico de la Sierra Madre del Sur de Oaxaca.

Cuadro 2.- Especies que se localizan en el bosque mesófilo de montaña de la población Juquilita y cohabitan con *Ceratozamia longifolia*.

Familia	Nombre Científico	Nombre Común
Celastraceae***	<i>Perrottetia longistylis</i> *	Palo de leche
Fagaceae**	<i>Quercus aff. insignis</i> *	Encino
Fagaceae**	<i>Quercus partelensis</i> *	Encino blanco
Fagaceae**	<i>Quercus aff. paxtalensis</i>	Encino delgado
Fagaceae**	<i>Quercus aff. sartorii</i>	Encino delgado
Rubiaceae***	<i>Rogiera</i> sp.	Hoja rosada
Thymelaeaceae	<i>Daphnopsis</i> sp.*	Hoja de siete
Actinidiaceae	<i>Saurauia konzattii</i>	Colorado
Meliaceae	<i>Trichilia</i> sp.	Yegalache
Lauraceae	<i>Mocinnodaphne cinnamomoidea</i>	Pementillo
Theaceae	<i>Ternstroemia</i> sp.	Hoja lisa
Onagraceae	<i>Fuchsia arborescens</i>	Rosado

*Géneros de plantas vasculares que tienen al menos una especie que habita exclusiva o preferentemente en el bosque mesófilo de montaña (Rzedowski 1996). **Elementos Holárticos ***Elementos Tropicales y Neotropicales (Rzedowski 1996; Mayorga *et al.* 1998).

El sitio donde se ubica la población Juquilita es de difícil acceso y, por lo tanto, se trata de un bosque mesófilo de montaña con un alto grado de conservación, lo cual se verifica con la presencia de familias y géneros exclusivos de este tipo de vegetación (Hernández 2004). La lista florística está compuesta de 79 especies, distribuidas en 15 familias, de las cuales 11 crecen cerca de *Ceratozamia longifolia* (*Perrottetia longistylis*, *Quercus* aff. *Insignis*, *Q. partelensis*, *Q. aff. Paxtalensis*, *Q. aff. sartorii*, *Rogiera* sp., *Daphnopsis* sp., *Saurauia conzattii*, *Trichilia* sp., *Mocinnodaphne cinnamomoidea*, *Ternstroemia* sp., *Fuchsia arborescens*, Cuadro 2).

La población Pablo Reyes, se localiza en un sitio más expuesto, a un costado de la carretera y del manto de un río. También se pudo apreciar que la cobertura vegetal es más escasa probablemente debido a una mayor inestabilidad del suelo, ya que la pendiente es aún más pronunciada, por lo que la pérdida de material edáfico es mayor. Esto se asentó debido al impacto del huracán Paulina, que afectó más esta zona, y a la construcción de la terracería.

Cuadro 3.- Características de las poblaciones de *Ceratozamia longifolia* muestreadas en la Sierra Madre del Sur.

Población	Tamaño poblacional	Municipio	Tipo de vegetación	Altitud	Orientación de la pendiente	Inclinación de la pendiente
Juquilita	46	San Agustín Loxicha	Bosque mesófilo de montaña	1760	160° S	85%
Pablo Reyes	~100	San Agustín Loxicha	Bosque mesófilo de montaña	1520	90° SO	98%
San José	~200	Candelaria Loxicha	Selva alta	1380	70° SE	30%

La población San José, de acceso difícil, se localiza en una selva alta perennifolia y, aunque no se han realizado estudios florísticos, se puede apreciar un alto grado de conservación y sin perturbación aparente. Las pendientes para esta zona son menos pronunciadas, en comparación con las otras poblaciones y se observa mayor acumulación de materia orgánica. Las características particulares de las tres poblaciones se resumen en el Cuadro 3.

Trabajo de campo

Colecta de material

Se colectó un foliolo joven por individuo en cada población. El número de foliolos colectados varió dependiendo del tamaño de la población. El material vegetal se colocó en papel aluminio, se transportó en nitrógeno líquido (para detener la desnaturalización de las proteínas), finalmente se almacenó en un ultracongelador (REVCO) a -70°C hasta el momento de extracción.

Patrones de distribución espacial

Para determinar los patrones de distribución, en Juquilita, se delimitó un cuadrante de 65 x 50 m con una cuerda marcada cada metro, en él se registraron los individuos en sus coordenadas x y y. Para las otras dos poblaciones, se tomó a un individuo como punto central y se determinaron las coordenadas radiales, con respecto al norte, así como la distancia entre individuos (punto fijo). En San José, el cuadrante se dividió en dos debido a la la distribución de los individuos.

Trabajo de laboratorio

Extracción

Se maceró 0.1 g de tejido por individuo con nitrógeno líquido y se agregaron 250 μL de solución amortiguadora de extracción (0.1 M Tris-HCL pH 7.5, 0.001 M EDTA, 0.01M CaCl_2 , 0.01 M MgCl_2 , 4% PVP-40 y 0.1% β -2-mercaptoetanol; Chao-Luan *et al*, 1999). El extracto fue absorbido en trozos de papel filtro de 2 x 15 mm ("wicks") y estos se almacenaron en un ultracongelador a -70°C hasta que fueron sometidos a electroforesis.

Se utilizaron geles horizontales de almidón de papa al 10 y 12% con los sistemas R propuestos por Chao-Luan *et al.* (1999) y PK de Yang y Merrow (1996). Los geles se corrierón a 4°C por un tiempo de 6.5 hrs. a 50 mA de corriente y 200 a 50 voltios constantes. Se ensayaron 16 sistemas enzimáticos (Cuadro 4) la mayoría de las cuales se han sido estandarizados en *Dioon edule* y *D. angustifolium* (González-Astorga 2003a, 2005).

Cuadro 4.- Loci enzimáticos analizados en *Ceratozamia longifolia*.

Aloenzima	Abreviación del Locus	E.C. No.	Buffer*
Fosfatasa ácida	Acph	3.1.3.2	R
Alcohol deshidrogenasa	Adh	1.1.1.1	R, PK
Peroxidasa anódica	Apx1, Apx2 and Apx3	1.11.1.7	R
Diaforasa	Dia1 and Dia2	1.6.99	R
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	G3pdh	1.2.1.12	R
Isocitrato deshidrogenada	Idh	1.1.1.41	R
Malato deshidrogenasa	Mdh1, Mdh2 and Mdh3	1.1.1.37	R
Menadione reductasa	Mnr1, Mnr2 and Mnr3	1.6.99	R
Fosfoglucoisomerasa	Pgil and Pgi2	5.3.1.9	R
6-Fosfogluconato deshidrogenasa	6Pgd	1.1.1.44	R
Aconitato hidratasa	Aco	4.2.1.3	PK
Aspartato amino transferasa (Glutamato oxalacetato transaminasa)	Aat (Got)	2.6.1.1	PK
Enzima málica	Me	1.1.1.40	PK
Esterasa	Est1 and Est2	3.1.1	R
Fosfoglucomutasa	Pgm	5.4.2.2	R
Shikimato deshidrogenasa	Sdh	1.1.1.25	R
Aldolasa	Ald	4.1.2.13	R

ANÁLISIS DE DATOS

Se obtuvieron los genotipos multilocus para cada individuo de *Ceratozamia longifolia* y se elaboraron bases de datos para ser usadas en los programas BIOSYS-2 (Swofford y Selander 1997) y TFGA 1.3 (Tools for Population Genetics Analysis) (Miller 1997). Se obtuvieron las frecuencias alélicas para cada locus por población y a partir de esta información, se calcularon los estimadores que permiten evaluar la variación genética dentro y entre poblaciones.

Diversidad genética

La diversidad genética se estimó mediante la proporción de loci polimórficos (P), el número de alelos por locus (A), la heterocigosis observada (H_O) y la esperada (H_E) las cuales se obtuvieron a partir de las frecuencias genotípicas y alélicas (Hedrick 2000). Se determinó la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg para cada loci con una prueba de Chi-cuadrada (χ^2) (Weir 1990).

La proporción de loci polimórficos (P) se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$P = \frac{x}{m}$$

donde x es el número de loci con más de un alelo y m es el número total de loci analizados. Puesto que la probabilidad de encontrar más de un alelo (con bajas frecuencias) en un locus se incrementa con el tamaño de muestra, se debe determinar un criterio para decidir si

un locus es polimórfico o no. De acuerdo con Hedrick (2000) para que un locus sea considerado polimórfico, el alelo más frecuente no debe exceder el 95%. También se considera que una enzima es polimórfica si el alelo más común no excede el 99% de la población o si simplemente se encuentra más de un alelo (Hedrick 2000). Un valor de cero indica que los loci muestreados son monomórficos y por lo tanto, no existe diversidad genética, mientras que un valor de uno indica que todos los genes muestreados son polimórficos.

El número promedio de alelos por locus se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$A = \sum_{i=1}^n \frac{n_i}{m}$$

donde n_i es el número de alelos observados por el locus i , y m es el número de loci bajo análisis. Es la medida básica de la variación genética y presenta la desventaja de ser muy sensible al tamaño de la muestra (Eguiarte 1990).

La heterocigosis promedio esperada por población (H_E) se obtuvo mediante la fórmula:

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

donde p_i es la frecuencia de los alelos del locus i . H_E toma valores que van de cero, cuando no hay variación genética, a uno, cuando todos los individuos son heterocigotos. La proporción de loci heterocigotos por individuo. H_E es una medida compuesta por la sumatoria de la variación genética a nivel de los alelos. La magnitud de H_E , así como el promedio de alelos por locus, está en función de la proporción de loci polimórficos, el número de alelos por locus polimórficos y las frecuencias alélicas entre poblaciones o especies.

La heterocigosis observada (H_O) es calculada directamente a partir de las frecuencias genotípicas observadas y es considerada una medida comparativa de diversidad de menos peso, ya que se ve afectada por la endogamia y otros procesos evolutivos que violan los supuestos de Hardy-Weinberg (La ley del equilibrio de Hardy-Weinberg establece que en ausencia de cualquier fuerza evolutiva (deriva génica, selección natural endogamia, mutación, flujo génico) las frecuencias genotípicas y alélicas permanecen constantes a través del tiempo. En cualquier generación, las frecuencias genotípicas esperadas serán: p^2 , $2pq$ y q^2 para AA, Aa y aa, respectivamente, para el caso de un locus con dos alelos) (Berg y Hamrick 1997).

Estructura genética

La estructura genética explica el modo en que se distribuye la variación genética dentro y entre poblaciones, e involucra el estudio de la variación espacial y temporal, la dispersión y movimiento de genes.

La endogamia desvía a las poblaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg hacia un exceso de homocigotos. Por consiguiente, este índice cuantifica la reducción en la heterocigosis observada (H_O) de una población dada con respecto a una población con apareamientos al azar, es decir, la heterocigosis esperada (H_E) en el equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) con las mismas frecuencias alélicas (Hartl y Clark 1989).

El coeficiente de endogamia (F) mide la reducción de la heterocigosidad dentro de una población, respecto a la heterocigosis esperada en equilibrio H-W. Se define como:

$$F = 1 - \frac{H_O}{H_E} = \frac{1 - H_O}{2pq}$$

donde H_O es la heterocigosis promedio observada a nivel de subpoblación y H_E la esperada para todos los loci. H_O es la heterocigosis observada en la población y $2pq$ es la proporción de heterocigosis esperada para cualquier par de alelos en el locus. F toma valores de -1 a +1, los valores de F igual a cero indican que la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W). Valores de F mayores que cero muestran un exceso de homocigos y valores menores que cero revelan un exceso de heterocigos, ambos con respecto a una población con apareamientos al azar (Álvarez-Buylla y Garay 1994; Hedrick 2000).

Una población está en equilibrio cuando no se presenta ninguna fuerza evolutiva y las frecuencias genotípicas observadas en un locus dado tiene relación directa con las frecuencias genotípicas esperadas bajo una asociación aleatoria de los alelos de dicho locus. El equilibrio de H-W indica panmixia (apareamiento aleatorio entre los individuos de una población) al nivel de análisis genéticos y se espera que las frecuencias alélicas y genotípicas permanezcan estables y no cambien de generación en generación. En poblaciones donde los apareamientos entre parientes son comunes, las frecuencias genotípicas no se encuentran en las proporciones esperadas, sino que existen menos heterocigos de los esperados. En este contexto la endogamia se define como la probabilidad de que un individuo en una población posea genes idénticos por descendencia, lo cual significa que sus progenitores sean consanguíneos (Wright 1978).

Para describir la estructura genética dentro y entre poblaciones se estimaron los estadísticos F de Wright (F_{IT} , F_{IS} y F_{ST}) (Hedrick 2000). Estos estadísticos son medidas de la fijación de alelos a diferentes niveles de organización: dentro de cada subpoblación (individual) (F_{IS}), entre subpoblaciones (subpoblación) (F_{ST}) y en la población completa (población) (F_{IT}). Estas medidas estadísticas de la estructura genética por variación en la distribución direccional es un análisis regular de varianza (χ^2) (Wright 1951). La medición de los estadísticos de F_{ST} es una divergencia en las frecuencias alélicas dentro de las poblaciones, considerando que F_{IS} y F_{IT} son la medida de exceso de heterocigosis (<0) y déficit (>0) relativo a lo esperado por H-W en poblaciones locales y en los grupos de poblaciones totales, respectivamente (Berg y Hamrick 1997).

F_{IS} : variación dentro de subpoblaciones. Es un estimador de la reducción o incremento en la proporción de individuos heterocígos dentro de una subpoblación, y se calculó mediante la fórmula:

$$F_{IS} = 1 - \frac{H_o}{H_s}$$

donde H_s es la heterocigosis promedio esperada para todos los loci y H_o la observada a nivel de subpoblación (Hedrick 2000). Si toma valores positivos señala que existe un exceso de individuos homocígos con respecto a los esperados si se cumplieran los supuestos de Hardy-Weinberg y que posiblemente la endogamia es la fuerza evolutiva que ha ejercido un papel importante sobre la estructura genética en esta subpoblación. Si toma valores negativos indica que existen menos homocígos de los esperados e indica que posiblemente la selección favorece a los heterocígos (Hartl y Clark 1989).

F_{ST} : variación entre poblaciones. Es una medida de diferenciación genética entre subpoblaciones, donde la reducción de la heterocigosis en una subpoblación es debida a deriva génica (Hartl y Clarck 1989) y se calcula como:

$$F_{ST} = 1 - \frac{H_s}{H_t}$$

donde H_s es la heterocigosis promedio esperada entre subpoblaciones y H_t es la diversidad genética total para un locus (Hedrick 2000; Berg y Hamrick 1997). Si F_{ST} es igual a cero indica que todas las poblaciones son iguales y si vale uno quiere decir que todas las poblaciones son distintas. F_{ST} refleja también cómo se reparte la variación genética en la especie, es decir, qué proporción de la diversidad genética está contenida dentro y entre las

poblaciones. Mientras más cerca de uno estén los valores de F_{ST} se requerirá un mayor número de poblaciones para tener toda la variación genética de la especie. Si F_{ST} es grande para todos los loci indica que existe mucha diferenciación genética entre subpoblaciones, que la mayor parte de la variación genética se encuentra entre subpoblaciones y que posiblemente esto haya sido generado por deriva génica. Si la F_{ST} es elevada sólo para algunos loci, entonces la diferenciación genética posiblemente fue generada por adaptación a condiciones locales por selección natural. Por otro lado, la F_{ST} refleja qué tanto flujo génico existe entre las poblaciones (Slatkin y Barton 1989).

F_{IT} : variación total. Estima la reducción en la heterocigosis de un individuo con respecto a la población total, ya sea por endogamia o deriva génica, este índice toma valores entre -1 y +1, y está relacionado con F_{IS} y F_{ST} :

$$F_{IT} = 1 - \frac{H_o}{H_t}$$

donde H_o es la heterocigosis promedio individual observada por subpoblación y H_t es la heterocigosis promedio esperada en la población total (Hedrick 2000). Este estadístico mide el grado de endogamia total en las poblaciones, estimando la reducción en la heterocigosis individual promedio al nivel de toda la población (el conjunto de todas las subpoblaciones).

Estos estadísticos se obtuvieron mediante el programa TFPGA 1.3 (Miller 1997), que los calcula como: f , F y θ usando el procedimiento de Weir y Cockerham (1984) y que equivalen a F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} , respectivamente. Éstos consideran el número de individuos y de localidades en la estimación de parámetros, reduciendo el sesgo en los estadísticos obtenidos con tamaños de muestra pequeños. Este método parte del supuesto de que un número r de poblaciones de igual tamaño ha descendido en forma independiente de una sola población ancestral que estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg y de ligamiento. Por esto las poblaciones se mantienen bajo las mismas condiciones y las diferencias observadas tienen que ver con el muestreo genético entre generaciones (Weir y Cockerham 1984).

La significancia se obtuvo mediante el programa TFPGA 1.3 (Miller 1997), que calcula la desviación estándar de los estimados mediante un método de remuestreo (jackknife, dada una población de valores obtenidos de los datos observados, se muestra aleatoriamente de dicha población, sin reasignar, hasta llenar los diferentes grupos con un número menor de valores que el grupo original) sobre todos los loci, y calculando los intervalos de confianza de los estimados

(al 95%) mediante la técnica de remuestreo denominada "Bootstrap" (los datos muestrales son tratados como si constituyesen los datos de toda la población, es decir se utilizan como el universo del que se extraerán muestras con reemplazamiento. Esto es que se toma un dato al azar y se hace el análisis, después se vuelve a tomar otro dato y se realiza nuevamente el análisis, y así sucesivamente. Los valores son reasignados). Adicionalmente, se calculó la significancia de los estadísticos f (F_{is}), F (F_{it}) por locus y el índice de fijación (F) aproximándolos al estimador $F^2 N (K-1)$, distribuido como χ^2 con $K (K-1)/2$ grados de libertad, donde N es el tamaño de muestra y K el número de alelos (Li y Horvitz 1953); para F_{ST} se usó una prueba de χ^2 , como $\chi^2 = (2N) F_{ST} (k-1)$, con $(k-1) (s-1)$ grados de libertad, donde s es el número de subpoblaciones (Workman y Niswander 1970).

Índice de similitud genética de Nei (I)

Propone que la probabilidad de elegir al azar un alelo en dos poblaciones diferentes es idéntica a la probabilidad de escoger al azar dos alelos distintos dentro de la misma población (Hartl y Clarck 1989) y se define como:

$$I = J_{XY} / (J_{XX} J_{YY})^{1/2}$$

donde J_{XY} es la probabilidad de escoger el mismo alelo en dos poblaciones distintas; J_{XX} probabilidad de elegir al azar dos alelos distintos de la población X y J_{YY} probabilidad de elegir al azar dos alelos distintos de la población Y (Hartl y Clarck 1989).

Si las dos poblaciones son idénticas, entonces $J_{XY} = J_{XX} = J_{YY}$ y la identidad tiene un valor de uno, mientras que vale cero cuando dos poblaciones no comparten alelos (Hartl y Clarck 1989).

Distancias genéticas (D)

Para obtener las distancias e similitudes genéticas se utilizaron los estimadores de Nei (1972), que permiten cuantificar las diferencias e similitudes genéticas entre poblaciones y se definen como:

$$I = -\ln [G_{xy} / (G_x G_y)^{1/2}];$$

donde I es la identidad y G_x , G_y y G_{xy} son las medidas de $\sum p_i^2$, $\sum q_i^2$ y $\sum p_i q_i$ respectivamente sobre todos los loci. $\sum p_i^2$ y $\sum q_i^2$ son iguales a la probabilidad de que dos alelos tomados de manera aleatoria en una misma población sean idénticos por descendencia y $\sum p_i q_i$

es igual a la probabilidad de que dos alelos, uno de cada población, sean también idénticos por descendencia. Los valores de D van de cero a ∞ (Pasteur 1988; Hedrick 2000).

A partir de la similitud se puede obtener la distancia genética entre dos poblaciones como:

$$D = -\ln I$$

D toma valores de cero si las poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas entre sí y de ∞ si no comparten ningún alelo (Hedrick 2000)

Fenogramas de las relaciones genéticas

Con base en las frecuencias alélicas se obtienen matrices de distancias genéticas a partir de las cuales pueden construirse fenogramas. La distancia genética más utilizada es la de Nei (1972), la cual mide el número de sustituciones de codones por locus que han ocurrido después de la divergencia entre un par de poblaciones. Esta interpretación es válida sólo si la tasa de sustitución génica por locus es uniforme a través de los loci y de los linajes (Hillis 1984; Swofford y Olsen 1990; en Cornejo 1998). Las matrices son agrupadas para construir los fenogramas de las relaciones genéticas. En este trabajo se utilizaron dos métodos de agrupamiento: UPGMA y Neighbor-joining.

El método UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic average) busca en la matriz los elementos que presenten la menor distancia y las poblaciones involucradas se unen en un nodo interno que se dibuja en una posición adecuada a lo largo del eje de distancias. Cada vez que se selecciona un elemento de la matriz se construye una nueva con un número de poblaciones igual al anterior menos uno (puesto que se toman en conjunto las poblaciones que se han unido en el agrupamiento). Se revisa la matriz nuevamente y se busca el siguiente elemento más pequeño. En cada ciclo del proceso de agrupamiento, las poblaciones son agrupadas de acuerdo a la distancia promedio más pequeña (Avice 1994). El supuesto principal de este método es que la tasa de sustitución de genes es constante a lo largo de todas las ramas del fenograma (Nei 1978).

En Neighbor-joining se considera que las tasas de cambio molecular entre las ramas son desiguales y que no todos los linajes han divergido en cantidades iguales. El fenograma construye en cada paso una matriz de distancias transformadas que ajusta la longitud de las

ramas entre cada par de nodos, finalmente une los pares de nodos menos distantes en la matriz de distancias transformadas (Swofford y Olsen 1990; en Cornejo 1998).

Se obtuvieron las identidades genéticas de Nei (I) y las distancias genéticas (D) para todos los pares de poblaciones y se construyó el fenograma de las relaciones genéticas entre las poblaciones (método UPGMA), con el programa TFGA 1.3 (Miller 1997). El método Neiborg-joining fue calculado con el mismo software. Para estimar la confianza estadística del fenograma se utilizó el método de remuestreo bootstrap con 100 réplicas, a partir de las cuales se obtuvo un árbol concenso.

Flujo génico

El flujo génico representa el movimiento de genes desde una parte del área de distribución de la especie hacia otra y determina si las subpoblaciones de una especie evolucionarán como una sola unidad o no, debido a que tiende a reducir las diferencias genéticas entre poblaciones locales. Si hay una gran cantidad de flujo génico entre las subpoblaciones, éstas evolucionarán juntas, pero si hay poco flujo génico, cada población evolucionará casi de manera independiente (Slatkin 1994).

Existen métodos directos e indirectos para medir el flujo génico (Nm). Los métodos directos son aquellos que dependen de observaciones o experimentos que miden la extensión de la dispersión de las especies. Los métodos indirectos están basados en modelos matemáticos y emplean las frecuencias alélicas u otras características medibles de las especies para deducir qué cantidad de flujo génico debe haber ocurrido para producir los patrones espaciales observados. Los métodos indirectos tienen la ventaja de que en ellos las estimaciones del flujo génico son para muchos años, no solamente para una o dos generaciones, por lo tanto, estiman la tasa promedio de dispersión y no la tasa durante un periodo particular (Slatkin 1990; Hamrick *et al.* 1995).

Wright (1951) introdujo uno de los métodos basándose en su modelo de islas y definió F_{ST} como la cantidad de consanguinidad causada por las diferencias en las frecuencias génicas entre las poblaciones y encontró que en un solo locus:

$$F_{ST} = \frac{\sigma_p^2}{\bar{p}(1-\bar{p})}$$

donde p y σ_p^2 son la media y la varianza de las frecuencias alélicas entre poblaciones. Para estimar indirectamente el valor promedio de flujo génico (Nm) se utiliza el estadístico F_{ST} mediante la expresión derivada por Wright:

$$F_{ST} = \frac{1}{(4Nm\alpha + 1)}$$

Lo que nos conduce a la fórmula:

$$Nm = \frac{1}{4} \left(\frac{1}{F_{ST}} - 1 \right)$$

donde $\alpha = [s/(s-1)]^2$ y s es el número de poblaciones analizadas. Nm se interpreta como el número de migrantes por generación entre dos poblaciones dadas.

Los valores de Nm menores que 1 indican que pocos individuos migran entre poblaciones, lo que se ha relacionado con una mayor diferenciación genética, por deriva génica (Slatkin 1994), mientras que los valores de Nm mayores que 1 sugieren una superpoblación cercana a la panmixia, donde el flujo génico restringe a la deriva (Slatkin 1994; Hartl y Clark 1989). Se considera que el flujo génico en plantas es adecuado cuando excede los cuatro individuos por generación (Slatkin 1993, 1994), aunque cuando las poblaciones se encuentran cercanas se tiende a sobreestimar a Nm .

Para obtener información sobre el aislamiento por distancia (*sensu* Wright 1946) se realizó un análisis de regresión simple del valor de F_{ST} entre pares de poblaciones y la distancia geográfica entre ellas, denominada d . Esto mediante una prueba de Mantel, ya que no es posible aplicar un método estadístico típico porque los valores de Nm para diferentes pares de poblaciones no son independientes (Sokal y Rohlf 1995). El principio del modelo permite observar si a mayor distancia geográfica hay menor flujo génico (aislamiento por distancia).

Patrones de distribución espacial

En las poblaciones Pablo Reyes y San José se ubicaron los individuos dentro de un plano con coordenadas x e y . Los patrones de distribución de cada organismo se analizaron usando la función K de Ripley (Ripley 1977; Diggle 1983) la cual considera las distancias entre individuos ubicados bajo un esquema Cartesiano en un cuadrante. La función $K(t)$ estima el número esperado de otros individuos dentro de una distancia t con respecto a un determinado individuo.

Bajo la hipótesis nula de una distribución aleatoria, el valor de $K(t)$ es igual a πt^2 (Skarpe 1991). A fin de evaluar la significancia estadística de $K(t)$ se estimaron los intervalos de confianza al 95% usando el procedimiento de Monte Carlo (se usa para aproximar expresiones matemáticas complejas y costosas de evaluar con exactitud. Para comprender un sistema aleatorio se realizan repeticiones para intentar reconocer el comportamiento del sistema, las simulaciones siempre se hacen mediante un generador de números aleatorios, en general una función que produce números independientes distribuidos uniformemente entre 0 y 1) basado en 99 permutaciones de cada individuo en el cuadrante (Duncan 1995). Cuando $K(t)$ es positivo y toma valores por arriba del límite superior de la región de confianza, la inferencia es que los individuos tienen una distribución agregada a la correspondiente escala (t), mientras que una desviación negativa indica un patrón de distribución normal (Diggle 1983). Si $K(t)$ permanece entre los límites de los intervalos de confianza para un determinado valor de t , la hipótesis nula de una dispersión aleatoria no es rechazada (Haase *et al.* 1997). En la representación gráfica del análisis fue usada la variable derivada:

$$\sqrt{K(t)/(\pi - t)} \quad (DV)$$

donde $K(t)$ es la función $K(t)$ calculada para el conjunto de datos, para cualquier valor de t ; t es la distancia a la cual $K(t)$ fue calculada. Esta variable derivada (DV) tiene un valor esperado de cero para cualquier valor de t cuando el patrón es aleatorio (Skarpe 1991).

Los análisis de la distribución espacial fueron realizados usando el programa elaborado por Duncan (1995). Para fines prácticos, se denominó a la variable derivada DV. Los datos obtenidos fueron graficados, en el eje x , los valores corresponden a la variable t , y la distancia fue de 0.5 m. En el eje y el valor corresponde a DV.

Estructura genética espacial

La evaluación de la estructura genética en la variación isoenzimática detectada en el espacio poblacional y la estimación del tamaño de las áreas donde es más probable encontrar individuos emparentados genéticamente se realiza a través de la técnica estadística de la autocorrelación espacial, que puede definirse como la relación entre los valores de una variable en función de la distribución de los puntos del espacio donde esa variable adquiere un valor determinado (Griffiths 1987). En este caso, las variables son cada uno de los alelos detectados

en los individuos analizados, y las unidades espaciales son las coordenadas que definen la posición relativa de esos individuos en las poblaciones donde fueron muestreados.

Para conocer la relación genética entre los individuos en un marco microgeográfico, se realizó un análisis de autocorrelación espacial entre la distancia genética y la distancia euclidiana entre pares de individuos dentro de la población. El método a utilizar es un análisis matricial de acuerdo con el método propuesto por Smouse y Peakall (1999) para loci codominantes multialélicos.

Los análisis de estructura genética a escala fina, se basan en el modelo de aislamiento por distancia. A escala local, las diferencias genéticas entre individuos aumentan conforme se incrementa la distancia entre ellos (Wright 1943, Epperson 1989).

A diferencia del análisis de autocorrelación espacial clásico en el cual se ejecuta el análisis alelo por alelo y locus por locus, el procedimiento de Smouse y Peakall (1999) es intrínsecamente multivariado, lo cual reduce el efecto de la estocasticidad.

Las matrices generadas entre las distancias geográficas y las distancias genéticas al cuadrado entre individuos son requeridas como punto de entrada para el análisis. La distancia genética es calculada mediante la fórmula:

$$d_{ij}^2 = \frac{1}{2} \sum_{k=1}^K (y_{ik} - y_{jk})^2$$

donde $k = 1, \dots, K$ índices del carácter genético (Smouse y Peakall 1999). La matriz líneal de las distancias geográficas al cuadrado fue calculada como distancias Euclidianas entre las coordenadas x - y y - del sitio (Peakall et al. 2003) por lo que al referirnos a distancias geográfica es igual a distancia euclidiana.

El resultado es un coeficiente de autocorrelación denominado r , cuyo valor fluctúa entre -1 y 1 y es similar al índice de Moran (Peakall et al. 2003).

El análisis de la significancia estadística se analizó mediante un "bootstrap" de 1000 pasos, con remuestreo de los valores de r . La hipótesis nula ($r = 0$) del análisis asume que no existe una relación entre la distancia genética y geográfica, por lo que se genera un estimado denominado rp . Para que $r = 0$, la curva de los valores de r debe interceptarse en el eje de x . Después de 1000 pasos, los valores de rp se re-clasifican definiendo el límite superior ($rp = 975$, Ur) e inferior ($rp = 25$, Lr) del intervalo de confianza al 95%. Este análisis permite un error tipo 2 en la hipótesis nula (inclusión de relaciones no significativas dentro del intervalo de confianza).

Para evitar este tipo error, los autores proponen una segunda restricción mediante una permutación de los valores de la matriz por intervalo de distancia geográfica (5, 10, 15 ó 20 metros dependiendo del patrón de agregación espacial de la población). Este nuevo análisis permite determinar un intervalo de error con sus respectivos límites superior (U error) e inferior (L error) por rango de distancia geográfica. De este modo, para que los valores de r sean significativos deben ser mayores a Ur y el límite inferior de la permutación también debe ser mayor que los límites superiores de rp (975, Ur).

En este sentido, los valores de r significativos, indican que existe una autocorrelación espacial y genética, denominada vecindario genético, familia genética o “Neighborhood” (Peakall *et al.* 2003). Estos análisis se realizaron con el software llamado GenAIEx para Excel (Peakall y Smouse 2005).

RESULTADOS

Diversidad genética

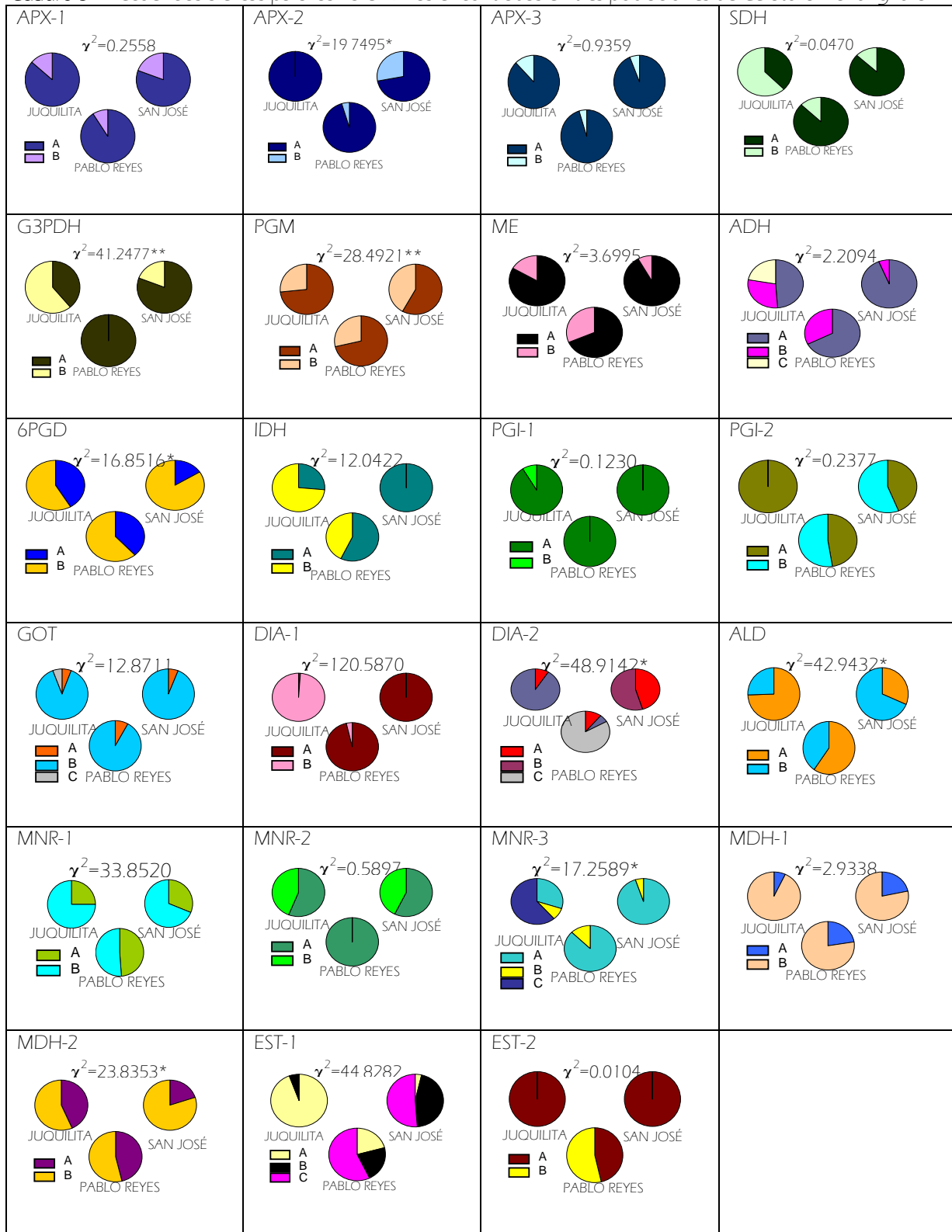
Se ensayaron 17 sistemas enzimáticos, de los cuales solo 15 mostraron buena definición para su interpretación: Peroxidasa anódica (Apx-1, Apx-2, Apx-3), Shikimato deshidrogenada (Sdh), Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3pdh), Fosfoglucomutasa (Pgm), Enzima málica (Me), Alcohol deshidrogenasa (Adh), 6-Fosfogluconato deshidrogenasa (6Pgd), Isocitrato deshidrogenasa (Idh), Fosfoglucoisomerasa (Pgi-1, Pgi-2), Glutamato oxalacetato transaminasa (Got), Diaforasa (Dia-1, Dia-2), Aldolasa (Ald), Menadion reductasa (Mnr-1, Mnr-2, Mnr-3), Malato deshidrogenasa (Mdh-1, Mdh-2), Esterasa (Est-1 y Est-2).

Los loci monomórficos se encontraron en diferentes poblaciones y fueron: Apx-2, Pgi-2 y Est-2 para Juquilita; G3pdh, Pgi-1 y Mnr-2 para Pablo Reyes y Idh, Pgi-1, Dia-1 y Est-2 en San José. En total, fueron codificadas 23 isoenzimas que están representadas en el Cuadro 5.

El análisis de χ^2 para la heterogeneidad de las frecuencias alélicas de locus polimórficos indicó que éstas varían significativamente entre las poblaciones. La mayoría de las enzimas mostraron valores altos de heterogeneidad ($\chi^2 = 48.4192$) y solo algunas tienen valores bajos ($\chi^2 = 0.0470$). La enzima DIA-1 mostró la heterogeneidad más grande ($\chi^2 = 120.5870$, $P < 0.0001$) y la frecuencia del alelo más común varió desde 1.000 en San José hasta 0.0111 en Juquilita. En EST-2 se observó la menor heterogeneidad ($\chi^2 = 0.0104$, $P < 0.01$), el alelo más común mostró valores de 1.0000 en Juquilita y San José hasta 0.4651 en Pablo Reyes (Cuadro 5).

Mediante gráficas de pastel se muestra la proporción de las frecuencias alélicas (Cuadro 5). La mayoría de las enzimas exhibió dos bandas (alelos), a excepción de las que presentaron un locus único con un alelo fijo y solo algunas presentaron tres bandas. Algunas enzimas tienen un alelo fijo para una determinada población, como APX-2 en Juquilita. En el caso de PGI-1, este alelo está fijo en Pablo Reyes y San José, al igual que en Juquilita y San José tienen fijo el alelo EST-2. Fueron muy pocas las poblaciones que presentaron tres bandas, en general solo se presentaba en una población, a excepción de EST-1, que presentó tres bandas en Pablo Reyes y San José (Cuadro 5).

Cuadro 5.- Frecuencias alélicas para las 23 enzimas encontradas en tres poblaciones de *Ceratozamia longifolia*.



Valores estadísticamente diferentes de cero * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$

La hipótesis sobre una baja diversidad genética no se cumple. La estimación de la variabilidad genética de las tres poblaciones de *Ceratozamia longifolia* se presenta en el Cuadro 6. El número promedio de alelos por locus (A) para las tres poblaciones es de 1.943, con un rango de 1.87-2.00. El porcentaje de loci polimórficos (P) tiene una media de 79.73 y varió de 73.91 (Pablo Reyes) a 82.6 (Juquilita y San José). La heterocigosis observada (H_O) presenta un valor medio de 0.3331, el rango fue de 0.2762-0.3872, la heterocigosis esperada (H_E) presenta un valor de 0.2852, los valores fluctuaron entre 0.266-0.3017 (San José y Pablo Reyes, respectivamente) (Cuadro 6). El valor de la heterocigosis observada es mayor que el de la heterocigosis esperada (Cuadro 6).

La población con mayor diversidad genética es Pablo Reyes, además de que mostró las diferencias más grandes entre las heterocigosis promedio esperada y observada. La población de menor diversidad genética es San José y mostró diferencias menores entre las heterocigosis esperada y observada. Juquilita es la que presentó valores intermedios en la diversidad genética y las diferencias entre sus heterocigosis.

Cuadro 6.- Resumen de los estimadores de diversidad genética obtenidos para tres poblaciones de *C. longifolia*.

Población	Ni	A	P	H_O	H_E
Juquilita	41.6087 (1.0)	2.00 (0.11)	82.6087	0.3361 (0.054)	0.2879 (0.040)
Pablo Reyes	41.3478 (0.6)	1.96 (0.10)	73.9130	0.3872 (0.069)	0.3017 (0.041)
San José	46.6522 (1.1)	1.87 (0.10)	82.6087	0.2762 (0.056)	0.2660 (0.039)
Media Total			79.7362	0.3331	0.2852

Ni: media del tamaño de muestra; A: número de alelos por locus P: porcentaje de loci polimórficos; H_O y H_E heterocigosis observada y esperada, respectivamente. Errores estándar en paréntesis.

Estructura genética

Los índices de fijación mostraron valores negativos y no significativos en su mayoría, lo que indica que solo algunos loci (0.073- -0.652, 0.533- -0.955, 1.000- -0.105, Juquilita, Pablo Reyes y San José, respectivamente) no están en equilibrio de H-W (Cuadro 7).

Únicamente ALD presentó valores positivos y significativamente diferentes de cero para las tres poblaciones, por lo que para este locus las poblaciones no están en equilibrio de H-W, indicando un exceso de homocigotos.

Cuadro 7.- Índices de fijación por locus en cada población de *Ceratozamia longifolia*.

Locus	Juquilita	Pablo Reyes	San José
APX 1	-0.158 (0.94)	0.173 (1.47)	-0.105 (0.41)
APX 2			0.330 (5.57)
APX 3	-0.139 (0.74)	-0.049 (0.06)	-0.064 (0.14)
SDH	-0.504 (9.92*)	-0.049 (0.06)	-0.149 (0.97)
G3PDH	-0.169 (0.86)	-0.147 (0.78)	1.000 (48.02*)
PGM	-0.364 (5.59)	-0.400 (6.32)	-0.642 (19.97*)
ME	-0.029 (0.01)	-0.458 (8.55*)	-0.087 (0.30)
ADH	-0.097 (0.63)	-0.486 (9.54*)	-0.064 (0.14)
6PGD	0.226 (2.28)	0.133 (0.83)	0.702 (25.38*)
IDH	-0.227 (1.83)	-0.147 (0.74)	
PGI-1	-0.098 (0.34)	-0.814 (26.99*)	
PGI-2			-0.067 (0.12)
GOT	0.073 (0.53)	0.533 (12.78*)	0.291 (4.53)
DIA-1	-0.011 (0.00)	-0.036 (0.03)	
DIA-2	0.177 (1.59)	0.426 (12.97*)	0.218 (1.71)
ALD	0.424 (7.80*)	0.665 (14.39*)	0.515 (13.26*)
MNR-1	-0.200 (1.40)	-0.955 (38.22*)	-0.449 (9.64*)
MNR-2	-0.623 (9.09*)		0.053 (0.17)
MNR-3	-0.033 (0.02)	-0.143 (0.60)	-0.053 (0.09)
MDH-1	-0.075 (0.17)	-0.147 (0.72)	-0.278 (3.27)
MDH-2	-0.652 (15.06*)	-0.642 (15.01*)	-0.250 (1.94)
EST-1	-0.059 (0.10)	-0.387 (10.75*)	-0.831 (33.49*)
EST-2		-0.776 (25.12*)	

* Valores estadísticamente distintos de cero, $P < 0.001$. Entre paréntesis se muestran los valores de χ^2 .

En las tres poblaciones se observa que existe un ligero exceso de heterocigotos para algunos loci (Cuadro 7). En el caso de Juquilita, solo cuatro de los loci no están en equilibrio H-W

(SDH, ALD, MNR-2, MDH-2). El resto de los loci indican un equilibrio en esta población. De estos cuatro loci, tres son negativos, lo que indica que hay un exceso de heterocigotos. El valor positivo muestra un exceso de homocigotos.

En Pablo Reyes 10 isoenzimas muestran que la población no está en equilibrio de H-W (ME, ADH, PGI-1, GOT, DIA-2, ALD, MNR-1, MDH-2, EST-1, EST-2) y el resto muestra equilibrio en la población. De estos 10 loci, siete son negativos, lo que indica un exceso de heterocigotos y solo tres positivos, con un exceso de homocigotos.

Para San José, seis loci son estadísticamente diferentes de cero, indicando que la población no está en equilibrio; para los loci restantes, esta sí está en equilibrio H-W. De estos, la mitad son positivos y la otra mitad son negativos, por lo que tanto hay un exceso de heterocigotos como de homocigotos.

La hipótesis de una alta diferenciación genética si se cumple. Para el caso de los valores promedio estimados de los estadísticos F , θ y f de Wright (1978), los datos fueron analizados por el método de Weir y Cockerham (1984), ya que este método es más robusto pues se emplean análisis de remuestreo bootstrap y jackknife.

Los valores promedio de los estadísticos F y f indican que las poblaciones se encuentran en equilibrio de H-W y que en la estructura genética de *Ceratozamia longifolia* la endogamia no está presente.

En cuanto al estadístico f , el valor promedio fue de -0.1511, con un rango de -0.1997 a -0.1198. Todos los valores son negativos y no son significativos, por lo que la endogamia no está presente y, por lo tanto, las poblaciones se encuentran en equilibrio de H-W, a pesar de que hay pocos individuos en estas (Cuadro 8).

En el caso de θ , el valor promedio es positivo y significativamente diferente de cero (0.3373), con un rango de 0.3490-0.2892, y todos los valores son significativos (de acuerdo a la prueba de χ^2 con la corrección de Yates para la heterogeneidad de las frecuencias alélicas). Este índice sugiere que el 33% de la variación se encuentra repartida entre las poblaciones y el 67% se encuentra dentro de las poblaciones. Del mismo modo, refleja que las poblaciones están estructuradas, por lo que existe una diferenciación entre poblaciones. La fuerza evolutiva que está determinando la estructura genética en las tres poblaciones de *Ceratozamia longifolia* es la deriva génica (Cuadro 8).

En el caso del estadístico F, el valor promedio es de 0.2376, con un rango de 0.2699-0.1822, lo que indica que a pesar de registrarse ciertos niveles de endogamia dentro de cada población, no ha tenido un efecto significativo (Cuadro 8).

Cuadro 8.- Estadísticos F de Wright para tres poblaciones de *Ceratozamia longifolia* en la Sierra Madre del Sur, Oaxaca.

Loci	F	θ	f
Apx 1	0.2414	0.3426**	-0.1539
Apx 2	0.2300	0.3372**	-0.1617
Apx 3	0.2390	0.3390**	-0.1513
Sdh	0.2395	0.3341**	-0.1421
G3pdh	0.2158	0.3307**	-0.1717
Pgm	0.2669	0.3490**	-0.1261
Me	0.2464	0.3423**	-0.1458
Adh	0.2461	0.3418**	-0.1454
6Pgd	0.2274	0.3463**	-0.1818
Idh	0.2229	0.3237**	-0.1490
Pgi 1	0.2358	0.3357**	-0.1505
Pgi 2	0.2414	0.3314**	-0.1346
Got	0.2333	0.3398**	-0.1613
Dia 1	0.1822	0.2892**	-0.1505
Dia 2	0.1914	0.3099**	-0.1716
Ald	0.2115	0.3428**	-0.1997
Mnr 1	0.2699	0.3481**	-0.1198
Mnr 2	0.2371	0.3354**	-0.1479
Mnr 3	0.2227	0.3264**	-0.1541
Mdh 1	0.2455	0.3431**	-0.1485
Mdh 2	0.2686	0.3475**	-0.1210
Est 1	0.2365	0.3208**	-0.1242
Est 2	0.2360	0.3267**	-0.1346
Media \pm DS	0.2376 \pm 0.0970	0.3373** \pm 0.0633	-0.1511 \pm 0.0891
95% IC	0.4073 – 0.0380	0.4499 – 0.2114	0.0173 – 0.3000

**P<0.05

Similitud y Distancia Genética

Las similitudes genéticas para pares de poblaciones se muestran en el Cuadro 9. Los valores obtenidos variaron entre $I=0.8967$ y $I=0.7484$. El más alto se observó entre Pablo Reyes-San José y el más bajo en Juquilita-Pablo Reyes. Esto quiere decir que Pablo Reyes-San José son las poblaciones que comparten mayor número de alelos entre sí. Por otro lado, Juquilita-Pablo Reyes, son las poblaciones que menos alelos comparten.

Las distancias genéticas (Nei 1972) entre pares de poblaciones de *Ceratozamia longifolia* variaron entre $D=0.2898$ y $D=0.1090$. Las poblaciones que tienen frecuencias alélicas menos distantes, por lo que comparten mayor número de frecuencias alélicas, son Pablo Reyes-San José y las que tienen una mayor distancia genética son Juquilita-Pablo Reyes (Cuadro 9).

Cuadro 9.- Distancia genética (sobre la diagonal) y Similitud genética (debajo de la diagonal) de tres poblaciones de *Ceratozamia longifolia* de acuerdo con Nei (1972/1978).

Population	Juquilita	Pablo Reyes	San José
Juquilita	*****	0.2898	0.2767
Pablo Reyes	0.7484	*****	0.1090
San Jose	0.7583	0.8967	*****

Relaciones genéticas

El análisis de agrupamiento UPGMA basado en las distancias genéticas muestra la agrupación de las poblaciones y las similitudes genéticas de éstas. Ambos índices no muestran relación con la distribución de las poblaciones, ya que las poblaciones más cercanas geográficamente están separadas genéticamente (Figura 5).

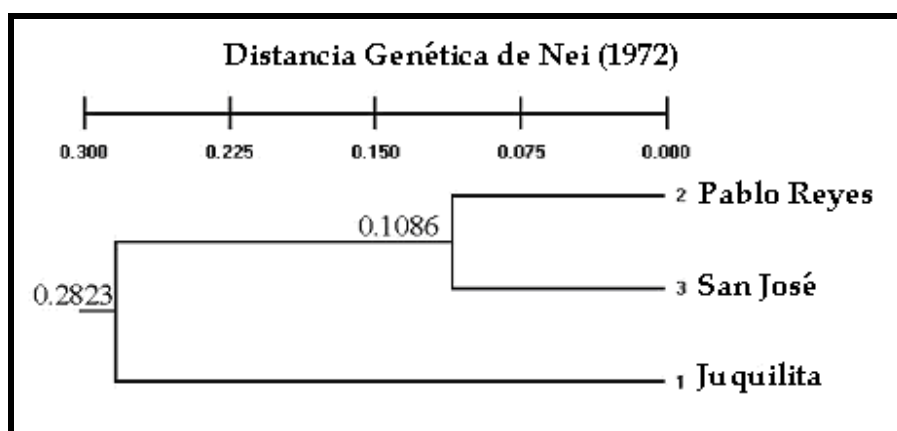


Figura 5.- Fenograma basado en las isoenzimas de tres poblaciones de *Ceratozamia longifolia* basados en un análisis de agrupamiento de los valores de las distancias genéticas de Nei (1972).

En el método Neighbor-joining se obtuvieron los mismos resultados (Figura 5).

Al relacionar las distancias geográficas con las distancias genéticas, tenemos que las poblaciones de Pablo Reyes y San José están separadas por 1.33 Km, y aunque no son el par de poblaciones que se encuentra más cercano, son las que comparten un mayor número de alelos entre sí. El análisis de las distancias genéticas y las distancias geográficas demostró que no hay relación entre ellas, por lo que el modelo de aislamiento por distancia no se cumple, es decir que

a mayor distancia no hay una disminución del número de alelos que comparten entre sí ($P=0.8984$, $\beta=-0.9495$, $R^2=0.02525$) (Figura 6).

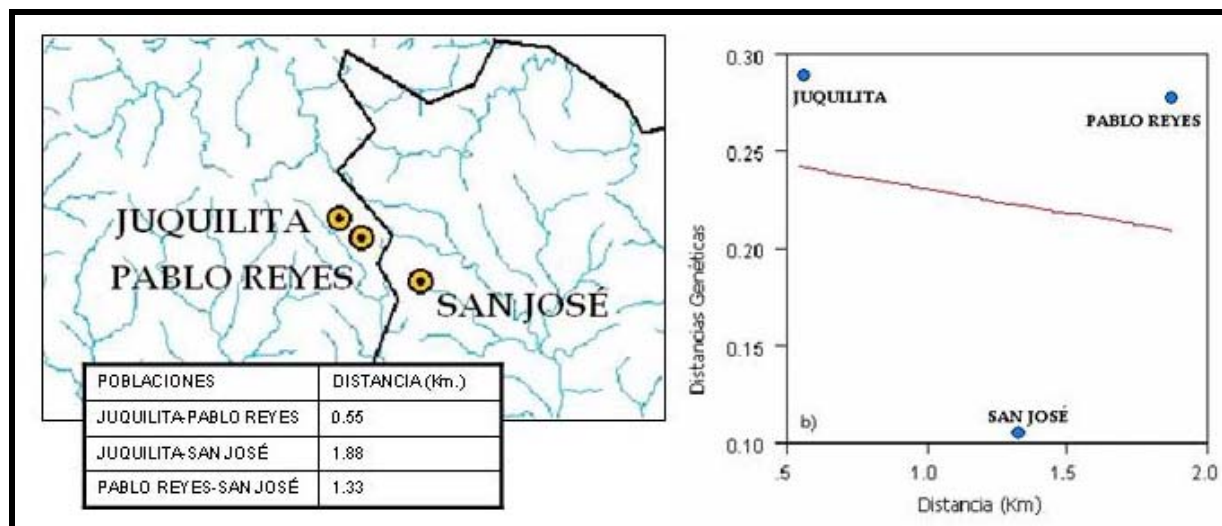


Figura 6.- a) Mapa de distribución de las tres poblaciones de *Ceratozamia longifolia* y cuadro con las distancias entre poblaciones pareadas. b) Distancias genéticas de Nei y distancias geográficas entre poblaciones pareadas, 1) Juquilita-Pablo Reyes, 2) Juquilita-San José y 3) Pablo Reyes-San José (dist. Gen. = $0.2561 - 0.02471 * \text{distancia}$).

Flujo génico

El flujo génico (Nm) obtenido para *Ceratozamia longifolia* mediante el modelo de islas (Wright 1931) fue menor que uno (0.2948 ± 0.8) es decir que el movimiento de genes en el pasado fue bajo. Las poblaciones Pablo Reyes y San José fueron las que presentaron el valor más alto ($Nm=0.4871$) separadas por 1.33 Km y el valor más bajo fue entre Juquilita y San José ($Nm=0.1934$) separadas por 1.88 km (Cuadro 10, Figura 6a).

Por consiguiente, puede considerarse que la alta diferenciación genética está dada por el escaso flujo génico que se llevó cabo en el pasado entre las poblaciones.

Cuadro 10.- Número de migrantes por generación (Nm) (sobre la diagonal) y distancias geográficas (bajo la diagonal) entre pares de poblaciones de *Ceratozamia longifolia*.

	Juquilita	Pablo Reyes	San José
Juquilita		0.20403396	0.19347134
Pablo Reyes	0.55		0.48714496
San José	1.88	1.33	

La correlación entre las matrices de Nm y la distancia geográfica entre pares de poblaciones indican que no hay un modelo de aislamiento por distancia, es decir, que el flujo

génico entre poblaciones no disminuye conforme aumenta la distancia geográfica ($\text{Log Nm} = 0.1591(\text{Log } d) - 0.5793$, $R^2 = 0.01771$, $P = 0.8669$, $\beta = 0.1942$) (Figura 7, Figura 6a).

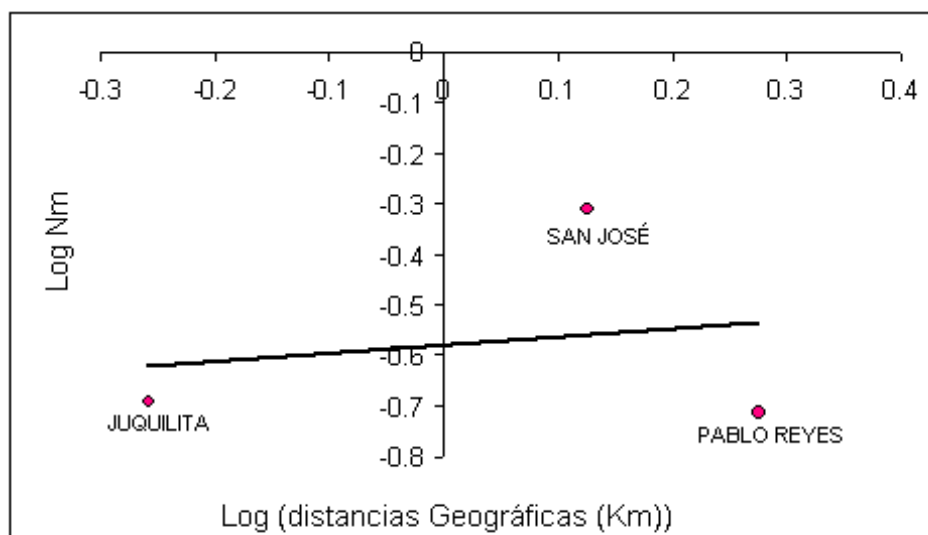


Figura 7.- Flujo génico estimado entre pares de poblaciones en función de la distancia geográfica. $\text{Log}_{10} \text{Nm}$ [$\text{Nm} = (1/8)(F_{ST})^{-1/8}$] graficada contra Log_{10} distancias geográficas (d) entre pares de poblaciones (en Km) para *Ceratozamia longifolia* colectada en tres sitios ($\text{Log Nm} = 0.1591(\text{Log } d) - 0.5793$, $R^2 = 0.01771$, $P = 0.8669$, $\beta = 0.1942$).

Patrones de distribución de los individuos

La hipótesis de distribución agregada de los individuos de *Ceratozamia longifolia* se cumple en las tres poblaciones, aunque los patrones varían dentro de cada población. En el caso de Juquilita, el análisis muestra que a 21.5 m la distribución es agregada, dentro del rango de 21.5 a 25 m el patrón cambia y los individuos se distribuyen de forma aleatoria. En Pablo Reyes el patrón de distribución es agregado, aunque la curva se localiza muy cerca de los límites de confianza. En San José, en el primer sub-cuadrante, la distribución es aleatoria hasta los 22 m y a mayor distancia, los individuos se distribuyen de forma agregada. En el segundo sub-cuadrante, el patrón no está muy definido ya que dentro de los primeros 21 m la distribución fluctúa entre aleatoria y agregada, pero después de estos la distribución es completamente agregada (Figura 8).

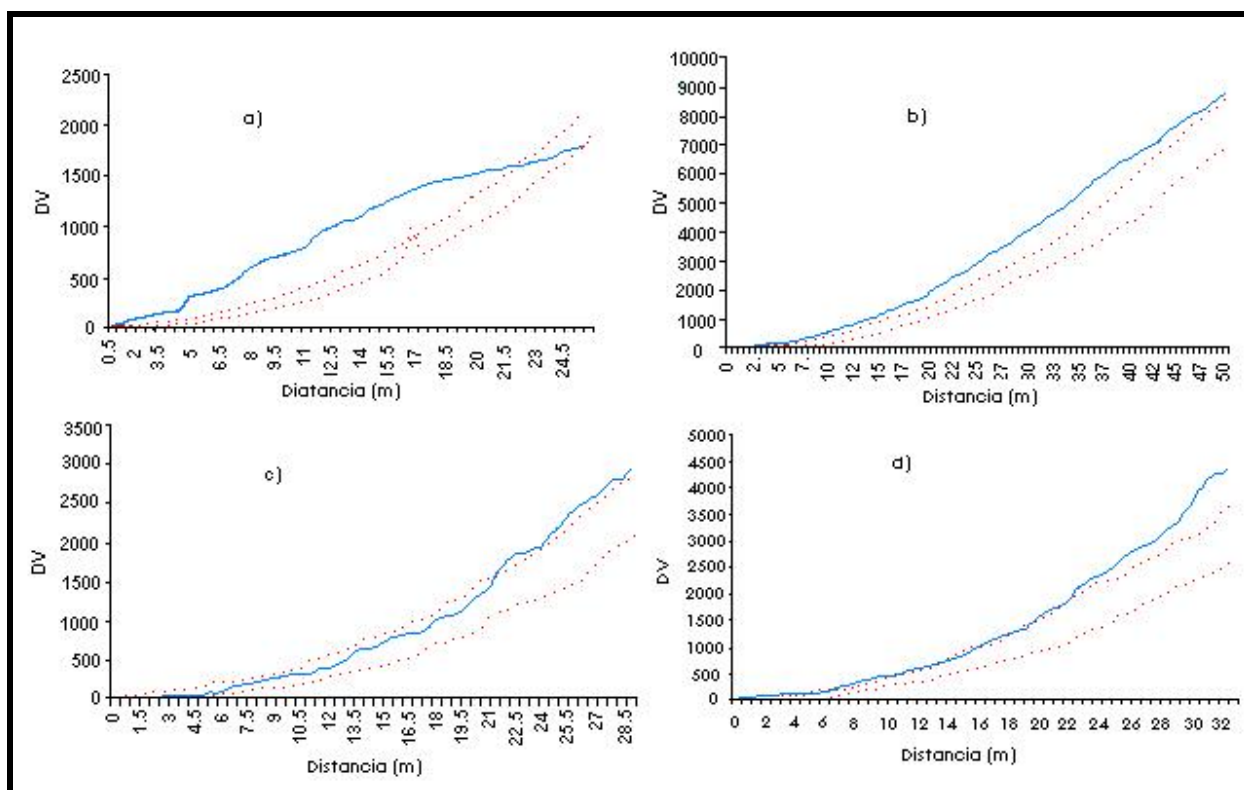


Figura 8.- Patrones de distribución de tres poblaciones de *Ceratozamia longifolia* el tamaño del cuadrante varió de una población a otra: a) Juquilita: 65 x 50 m, b) Pablo Reyes: 100 x 100 m, c y d) San José: 70 x 70 m. las líneas punteadas representan los límites del intervalo de confianza al 95%.

Estructura genética espacial

El resultado del análisis de autocorrelación espacial para las poblaciones de *Ceratozamia longifolia* para diferentes tamaños de clases de distancias es explicado en la Figura 9. El correlograma muestra la correlación r_c para las enzimas en función de la distancia entre los individuos. En el inciso (a) se muestran los resultados para la población Juquilita. Los valores de correlación son positivos y significativos a menos de 6 m, con una intercepción en X a 5.785 m, lo que indica que en ese punto $r=0$, por lo que la hipótesis nula se acepta y no hay una estructura definida en la población. La estructura genética espacial es parcial a 3 m, es decir que a 3 m se forman vecindarios genéticos parciales lo que indica que los individuos que se localizan dentro de esta distancia son los que tienen mayor similitud genética. Para la población Pablo Reyes, los valores son significativos a menos de 35 m, con una intercepción en X a 35.833. De igual manera, la estructura es parcial a 6 m. En este caso no se delimitan bien agrupaciones de individuos (Figura 9b y 9c). La población de San José presentó valores positivos y significativos a menos de 18 m, con una intercepción en X a 17.87. La estructura parcial esta dada a 15 m y se

observa que los individuos se agrupan aproximadamente cada 9 m (Figura 9d). En la Figura 9e, los valores son positivos y significativos en todos los casos, la intercepción en $X=0$, ya que los valores de r son significativamente diferentes de cero. La estructura está a 4 m y se observa el agrupamiento de especies cada 4 m (Cuadro 11).

Cuadro 11.- Resultados de la autocorrelación espacial de *Ceratozamia longifolia*.

Transecto	Juquilita	Pablo Reyes	San José (d)	San José (e)
Clases de distancia				
Tamaño	3 m	6 m	15 m	4 m
n	42	25	11	9
r	0.080	0.214	0.123	0.107
U	0.065	0.098	0.107	0.078
L	-0.055	-0.085	-0.075	-0.070
P	0.010	0.010	0.010	0.006
Ur	0.151	0.288	0.264	0.139
Lr	-0.002	0.145	-0.031	0.073
Intercepción	5.785	35.833	17.807	0.000

Análisis con distancia de clases de 3, 6, 15 y 4. La correlación r es mostrada con el número de comparaciones pareadas n , las bandas superior (U) e inferior (L) del intervalo de confianza al 95% con respecto a la hipótesis nula ($r = 0$). Las bandas superior (Ur) e inferior (Lr) con respecto a r fueron determinadas por bootstrap; la probabilidad P y el estimado de la intercepción x , la cual fue igual a cero cuando r no fue significativamente diferente de cero.

Figura 9.- Correlograma que muestra la correlación espacial r_c a través de cuadrantes como una función de distancia.

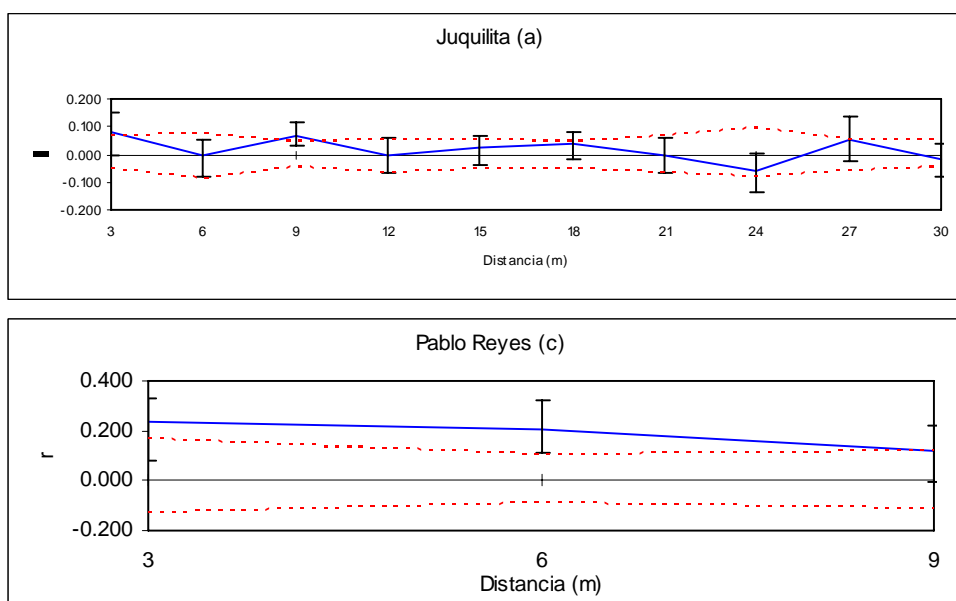
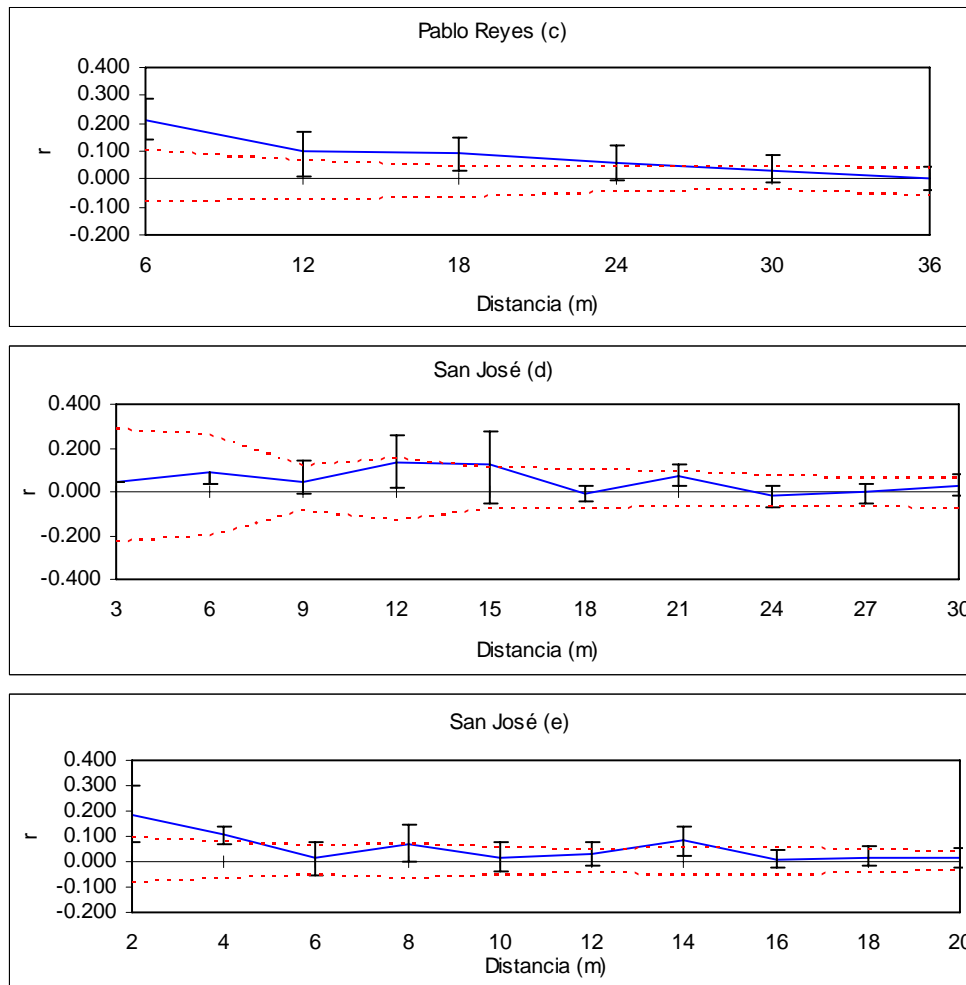


Figura 9.- Continuación...



Intervalos de confianza al 95% con respecto a la hipótesis nula de una distribución aleatoria de los individuos, y las barras de error al 95% de confianza con respecto a los valores de r_c determinados mediante bootstrapping.

DISCUSIÓN

Ceratozamia longifolia presenta el valor más alto de diversidad genética que hasta ahora se ha reportado, al compararla con otras especies de cícadras (ANEXO 1). De las tres poblaciones estudiadas, Pablo Reyes es la que presenta mayor diversidad genética y la de menor diversidad es San José. Estas poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg en lo que respecta a los estadísticos F y f y solo algunos loci muestran un exceso de heterocigotos, los cuales podrían ser favorecidos por la selección. Así también, se encontró que las poblaciones están estructuradas, por lo que existe una diferenciación entre ellas, hecho que pudo ser generado por deriva génica. A pesar de que las poblaciones son pequeñas, los valores de f indican que hay entrecruzamiento, por lo que la endogamia no actúa en la estructura genética. Los patrones de distribución para Juquilita y Pablo Reyes son agregados y para San José es aleatorio a pesar de esto la estructura genética espacial poblacional es parcial, es decir que no hay una delimitación de vecindarios genéticos.

Existen diversos factores que pueden intervenir en la estructura y distribución genética de las especies tales como: el rango geográfico, es decir si tienen una distribución muy restringida; la historia de vida, sobre todo si se trata de plantas de lento crecimiento, longevas, con madurez sexual tardía; el hecho de que la variabilidad no se haya acumulado o fijado completamente en el acervo genético de las especies; finalmente, que las poblaciones se hayan originado de un ancestro genéticamente erosionado (con poca diversidad genética). También debe tomarse en cuenta si las especies son:

- × Lentas para alcanzar la edad reproductiva. En *Ceratozamia* se ha registrado alrededor de 30 años (González y Vovides 2002).
- × Que el éxito de los eventos reproductivos están separados probablemente cientos de años o más (González y Vovides 2002; González-Astorga 2005).
- × La escasez de un mecanismo de dispersión de semillas y polen (Norstog y Nicholls 1997). En *Ceratozamia*, probablemente está relacionado con el hecho de que las semillas no son dispersadas a grandes distancias, sino por gravedad (Pérez-Farrera *et al.* 2000; Pérez-Farrera y Vovides 2004a, 2004b).

Esto explica los valores bajos en la diversidad genética de ciertas especies.

Sin embargo, algunas plantas raras o en peligro, endémicas, que presentan tamaños poblacionales pequeños, con diversos mecanismos de dispersión y condiciones ambientales

limitadas y donde se esperarían valores bajos de variación genética, pueden presentar alta diversidad genética (Byrne y James 1991; Ranker 1994; Cardoso *et al.* 1998; Maki y Asada 1998; Delgado *et al.* 1999; Dolan *et al.* 1999; Ledig *et al.* 1999; Martínez-Palacios *et al.* 1999; Evans *et al.* 2000; Hannan y Orick 2000; González-Astorga y Núñez-Farfán 2001; González-Astorga *et al.* 2003a), ya que la selección natural opera a través de un gradiente ecológico que puede ser más importante que el aislamiento geográfico (Schneider *et al.* 1999). Este puede ser el caso de *Ceratozamia longifolia*.

Cuando existen diferencias en la morfología e historia de vida en las especies y es comparada entre hábitats, se sugiere que la selección es más importante que el aislamiento geográfico al promover las diferencias fenotípicas. Aunque las diferencias morfológicas y de la historia de vida entre los hábitats puede reflejar una plasticidad genotípica en respuesta a diferencias ambientales, se ha sugerido que la plasticidad genotípica no explica toda la variación observada. En hábitats con diferentes características micro-ambientales sugieren que la selección natural actúa en caracteres morfológicos particulares.

Las diferencias fenotípicas dentro de un estrecho gradiente en el hábitat son mucho mayores que en las poblaciones aisladas históricamente en hábitats similares. El aislamiento geográfico puede promover la divergencia genética y/o reproductiva, pero diversificar la selección a través de un gradiente ambiental o entre historias aisladas con un régimen selectivo diferente, pareciendo ser un factor clave en la diversificación fenotípica y especiación.

En el caso de las cícadas, se ha reportado una baja variación genética dentro de las poblaciones y una alta diferenciación entre ellas (ANEXO 1), excepto para *Macrozamia riedlei* (Byrne y James 1991), *Dioon edule*, *D. angustifolium* (González-Astorga 2003a, 2005), *Cycas balansae* (Xiao y Gong 2006) y *Ceratozamia longifolia*. Aunque estas especies tienen diferencias muy marcadas en los tamaños poblacionales, así como en el número de poblaciones estudiadas, por lo que esto podría estar influyendo en los valores de diversidad genética reportados.

De igual manera, González y Vovides (2002) encontraron una homogeneidad de caracteres morfológicos y por lo tanto una menor variación genética entre las especies de *Ceratozamia*. Esto puede deberse a que el género es de reciente especiación y sus especies tuvieron un flujo génico ancestral por polen o semillas. Givnish y Sytsma (1997) (en Sanderson 1998) proponen que la radiación adaptativa de un taxón presenta alta diferenciación

morfológica y ecológica pero baja diferenciación molecular. Lo mismo puede ocurrir por un efecto fundador después de una fragmentación, ya que las especies están bajo un proceso de reciente especiación (González y Vovides 2002). Recientemente se ha sugerido que las especies que se localizan en los refugios glaciares conservan mayores niveles de variación genética que en las áreas de colonización más reciente, después del retroceso de los glaciares (Widmer y Lexer 2001). Esta reducida diversidad genética tienen el supuesto de haber sufrido un cuello de botella poblacional durante toda la colonización post-glaciar (Premoli *et al.* 2002). La restringida producción y dispersión de semillas, aunado al hecho de ser de lento crecimiento, hace que la especie sea vulnerable a la deriva génica en áreas que fueron colonizadas después del retroceso glaciar (Premoli *et al.* 2002).

En el caso de *Ceratozamia longifolia* se puede proponer que las poblaciones se encuentran en un refugio glacial, ya que sus tamaños poblacionales son pequeños pero su diversidad genética es alta. Además, podría tratarse de una metapoblación (grupo de poblaciones locales que están conectadas entre sí por procesos de emigración e inmigración), que fue fragmentada en tiempos recientes (la carretera, que divide a las poblaciones de Pablo Reyes y San José, tiene poco menos de 30 años, Luna-José com. pers.). Se puede proponer la presencia de una población original altamente diversa genéticamente sujeta a eventos recientes de deriva génica. La heterocigosis esperada y los índices de fijación refuerzan esta hipótesis.

La glaciación del Pleistoceno ha tenido un efecto en la formación de especies, tal como la radiación adaptativa en refugios del Pleistoceno durante el retroceso glaciar, lo cual parece ser el caso del género *Ceratozamia* (González y Vovides 2002). Algo similar ocurrió con *Dioon angustifolium*, la cual probablemente fue derivada, como producto de la fragmentación y subsecuente radiación adaptativa, de una o más poblaciones de *Dioon edule* (González-Astorga *et al.* 2003a, 2005).

Al comparar a *Ceratozamia longifolia* con otras especies, como helechos, algunos pinos y plantas leñosas, tenemos que, a pesar de que comparten características como tipo de reproducción, tamaños poblacionales, rango geográfico, u otros, esta especie presenta el valor más alto de diversidad genética que hasta ahora se ha reportado, excepto en *Ginkgo biloba* (Fan *et al.* 2001, ANEXO 1). Esto se observa en diversos trabajos que se han realizado comparando especies endémicas y de distribución restringida o estrecha con sus congéneres más ampliamente distribuidos, encontrando así una mayor diversidad genética en los primeros

(Soltis y Soltis 1991; Lewis y Crawford 1995; Maki y Asada 1998; Chung y Epperson 1999; 2000, Fan *et al.* 2004; González-Astorga *et al.* 2005).

En el número promedio de alelos por locus y el porcentaje de loci polimórficos los valores más altos se reportan para *Macrozamia riedlei*, algunas gimnospermas y helechos (ANEXO 1). En el caso de *Ceratozamia longifolia* los valores son un poco más bajos que los reportados para estas especies, pero relativamente más altos para sus demás congéneres.

El porcentaje de loci polimórficos para *Ceratozamia longifolia* es el más alto reportado hasta el momento ($P=79.73$), solo a excepción de *Macrozamia riedlei* ($P=93$). El porcentaje que se ha reportado para algunas especies de cícadas no es mayor de 60%, lo que coincide con lo reportado por Hamrick y Godt (1996) para especies endémicas o estrechamente distribuidas, las cuales tienden a tener valores más bajos de loci polimórficos que las especies con rangos geográficos más extensos, independientemente de los sistemas de cruce.

Las condiciones ambientales de las tres poblaciones estudiadas son muy diferentes. San José es la que tiene una mayor densidad poblacional, individuos más grandes y avistamiento de plántulas. Pablo Reyes es la que de alguna manera está más expuesta, ya que la cobertura vegetal es menor, la densidad poblacional es poca, las pendientes son más pronunciadas, por lo que hay mayor arrastre, y por lo tanto, de pérdida de material edáfico, los individuos son de menor tamaño y no se observaron plántulas. Por último, Juquilita se encuentra más aislada, con mucha menor densidad poblacional, solo se observaron dos individuos reproductivos masculinos y no se observaron plántulas. Debido a todas estas características se esperaba que San José fuera la de mayor diversidad genética, pero los datos obtenidos en este estudio muestran que Pablo Reyes es la más diversa genéticamente.

En lo que se refiere a los índices de fijación, solo 20 loci, en las tres poblaciones fueron significativos y muestran que existe un ligero exceso de heterocigosis, lo que sugiere una ventaja de los heterocigotos en la sobrevivencia. Esto puede estar dado por la limitada dispersión de semillas, ya que las plántulas crecen en agrupaciones en las cuales la competencia por los nutrientes y el espacio, no solo entre una y otra sino incluso con la planta madre, puede ser pronunciada. Las enzimas en heterocigosis pueden ser preferentemente seleccionadas en una competencia de las plántulas (Byrne y James 1991). Los valores de los índices de fijación muestran esta tendencia, ya que, si bien no todos son significativos, algunos muestran un exceso de heterocigotos.

Debido a que los estadísticos F y f no fueron significativamente diferentes de cero las poblaciones se encuentran en equilibrio de H-W, esto es que aunque las poblaciones son pequeñas, no hay endogamia, pero si hay deriva génica y entrecruzamiento. En lo que se refiere al valor promedio de θ este fue positivo y significativo estadísticamente, lo que indica que las poblaciones están diferenciadas entre si, con el 30% de la variación genética distribuida entre las poblaciones. En este caso, el valor más bajo se reporta para *Cycas taitungensis*, con un valor de 3% de variación entre poblaciones. Y para *Cycas semmannii* se reporta el valor más alto, con cerca de 60% de variación.

Hamrick y Godt (1990) mencionan que las tendencias a la endogamia resultan en altos niveles de diferenciación poblacional, aunque al parecer hay entrecruzamiento, por lo que esto no se aplica a *Ceratozamia longifolia*. Además, el aislamiento puede incrementar las distancias geográficas, como resultado de la fragmentación del hábitat, probablemente causando una alta diferenciación genética entre las poblaciones (Ellstrand *et al.* 1990; Walters y Decker-Walters 1991; Yang y Merrow 1996; Keppel *et al.* 2002). De igual manera, las barreras para el flujo génico causadas por aislamiento geográfico o reproductivo, facilitan la diferenciación genética de poblaciones por deriva génica y selección natural. La deriva génica ha sido implicada en numerosos estudios aloenzimáticos como causa de diferenciación dentro de las poblaciones de plantas. Aunque la selección natural puede, incluso, iniciar una diferenciación aloenzimática de la población, está más ampliamente implicada en la divergencia de características morfológicas durante la evolución adaptativa. Finalmente, la diferenciación de poblaciones es, con frecuencia, dependiente de la historia biogeográfica. Las diferencias genéticas pueden a menudo reflejar los eventos históricos y relaciones filogenéticas dentro de las poblaciones más allá de un equilibrio entre el flujo génico, deriva y selección (Hamrick y Godt 1996; Max *et al.* 1999).

Cuando las poblaciones son pequeñas y se encuentran aisladas, la deriva génica y la endogamia pueden tener una influencia dominante en la estructura genética poblacional al provocar una pérdida de variación, mientras que en las poblaciones grandes se puede mantener altos niveles de variabilidad genética (Wright 1931; Kimura y Crow 1964; Hamrick y Godt 1989; Barrett y Kohn 1991). Esta teoría es limitada, aunque los datos disponibles están de acuerdo con la predicción de que las poblaciones pequeñas son más propensas a perder polimorfismo en un loci neutral inclusive por fuerzas estocásticas (Barrett y Kohn 1991).

Además, el tener tamaños poblacionales pequeños puede provocar la ocurrencia de endogamia o cruce entre individuos relativamente cercanos (Barrett y Kohn 1991). Los efectos de la endogamia en la compatibilidad en plantas parecen ser más diversos que en los animales por que las plantas tienen diversos sistemas reproductivos, así como estructuras poblacionales (Charlesworth y Charlesworth 1987), por lo que la depresión endogámica no es tan importante en plantas, sino la depresión exogámica, debido a que muchas plantas son endogamas (Templeton 1986).

En el trabajo realizado en *Brongniartia vazquezii* (González-Astorga y Núñez-Farfán 2001) se reporta que la fragmentación del hábitat no ha reducido el flujo génico, aunque éste puede ser alto si las poblaciones de plantas son dispersadas por el viento o polinizadas por animales, como en el caso de esta especie. Para *Macrozamia riedlei* (Byrne y James 1991) se reporta un alto valor de Nm , que combinado con la baja diferenciación poblacional y bajas distancias genéticas entre las poblaciones, sugieren que al combinar efectos de dispersión limitada de semillas, dispersión de polen por escarabajos, exocruza a través del dioecismo y la selección post-cigótica, comparado con la homocigosis, ha mantenido un robusto acervo génico con poca diferenciación intrapoblacional.

En el caso de *Dioon edule* y *D. angustifolium*, el valor de Nm reportado es relativamente alto (2.98 y 1.55, respectivamente), lo cual sugiere que un extenso número de alelos históricos fueron compartidos y el actual flujo génico ocurre entre poblaciones cercanas genéticamente (González-Astorga *et al.* 2003a).

En el caso de *Ceratozamia longifolia*, el valor de Nm es muy bajo (0.3), y podría ser el responsable de la alta diferenciación genética entre las poblaciones. De igual manera no existe un modelo de aislamiento por distancia y esto podría deberse a que la fragmentación de estas poblaciones es reciente. Al comparar los valores de Nm con otros congéneres, el valor más alto reportado hasta ahora corresponde a *Macrozamia plurinervia* ($Nm= 8.24$) y el más bajo es para *Cycas seemannii* (0.11) (ANEXO 1).

Las condiciones geográficas de cada una de las poblaciones ayudan a explicar los valores de las distancias genéticas, así como de flujo génico. Debido a que Juquilita se encuentra más aislada, los valores de las distancias genéticas con respecto a las otras poblaciones son muy bajos. Por otro lado, Pablo Reyes y San José, no tienen barreras geográficas importantes, por lo que tienen mejores condiciones para un intercambio genético y

esto hace que compartan mayores similitudes genéticas. Estos valores permiten inferir que las dos poblaciones estaban unidas en un tiempo cercano y ha transcurrido poco tiempo de haberse fragmentado y aunado a las características de vida de la especie, éste no ha sido suficiente para que se cumpla el modelo de “aislamiento por distancia”.

La distribución, así como la estructura genética espacial entre individuos que se reproducen sexualmente dentro de las poblaciones de plantas está determinada primordialmente por los efectos de factores tales como la limitada dispersión de semillas y polen, el aislamiento en pequeños parches, la mortalidad diferencial y la selección microambiental (Epperson 1993).

La dispersión de genes no aleatorios es el factor clave en el establecimiento de una estructura genética espacial interna de las poblaciones de plantas. Aunque el movimiento genético en las plantas con semillas comprende al polen y semillas, una variedad de argumentos y datos empíricos indican que el desarrollo de la estructura genética espacial dentro de las poblaciones está más fuertemente influenciado por la dispersión de semillas, más que por el polen (Hamrick y Nason 1996). Los valores positivos del linaje a cortas distancias entre las plantas probablemente reflejan estructuras familiares localizadas espacialmente, generadas por la limitada dispersión de semillas.

En el caso de *Ceratozamia*, no se han reportado trabajos a nivel de estructura genética espacial, pero se ha documentado los métodos de polinización y dispersión de varias especies del orden Cycadales y concuerda con lo reportado por Schnabel y Hamrick (1995) y Chung y Epperson (2000), aunque en este caso no se observó una estructura poblacional definida, a pesar de las características de vida de la especie.

En algunas especies la distribución espacial de sus genotipos es cercana a la aleatoriedad (Epperson y Allard 1989). Estas especies son semejantes, en cuanto a dispersión muy amplia de polen y semillas, como el caso de algunas coníferas que son polinizadas y dispersadas por viento (*Pinus contorta* ssp. *latifolia*, Epperson y Allard 1989) o alternativamente son polinizadas por insectos, pero tienen una dispersión muy eficiente de semillas con aves frugívoras (*Neolitsea sericea*, Chung *et al.* 2000). En otras especies de árboles se detectó una estructura genética espacial significativa y la dispersión de semillas o de polen, o ambos son restringidos espacialmente. Por ejemplo, diferentes especies de encinos (*Quercus rubra*, *Q. laevis*, *Q. robur*, *Q. petraea*, citas en Heuertz *et al.* 2003) exhiben una estructura genética

espacial a una corta escala en espacio, la cual fue atribuida a la localización, la dispersión de semillas mediante gravedad, así como la dispersión de polen por viento, la cual es extensiva en estas especies. Una fuerte estructura genética espacial fue reportada en especies de árboles polinizados por pequeños insectos y semillas dispersadas por gravedad (*Gleditsia triacanthos*, Schnabel y Hamrick 1995; *Eurya emarginata*, Chung y Epperson 2000).

En el caso de las cícadas se han reportado muy pocos trabajos. En *Ceratozamia matudai*, *C. mirandae* y *Zamia soconuscensis*, se ha reportado una distribución agregada, debida a diversos factores bióticos y abióticos que parecen ser los responsables de la distribución y la sobrevivencia de estas especies. La distancia entre la planta madre y las semillas es muy pequeña y esto puede ser el principal factor en la distribución espacial y el establecimiento de plántulas. Estos estudios muestran que la dispersión de semillas es muy pobre y se da primordialmente por gravedad (Pérez-Farrera y Vovides 2004, 2004a, 2004b).

En un estudio realizado en *Dioon edule*, Vovides (1990) reporta una distribución agregada, una posible causa de este patrón es debido a que la mayoría de las plantas se localizan en suelos poco profundos, el 84% de estas se encontraron en suelos con profundidades de 6-20 cm. y con frecuencia en afloramientos rocosos, por lo que la cantidad de material edáfico es una limitante para el establecimiento de las plántulas. En las poblaciones de Juquilita y Pablo Reyes, las plantas crecen en laderas con pendientes más pronunciadas (85 y 98%), los suelos son más someros y hay mayor exposición de rocas y esto explicaría que la distribución sea de forma agregada. Para el caso de la población de San José, las pendientes son menos pronunciadas, el suelo es de mayor profundidad y no hay tanta exposición de rocas, sin embargo las plántulas no se establecen tan fácilmente y pueden quedar formando bancos de semillas por muchos años, hasta que las condiciones sean más favorables. Si se toma en cuenta la competencia por el establecimiento en suelos de mayor profundidad con las especies que cohabitan, la selva tiene un mayor número de especies que el bosque mesófilo, por lo que la competencia es aún mayor.

La distribución espacial de las cícadas en suelos someros es debido probablemente a la competencia con las gimnospermas por los suelos profundos, esto por su rápido crecimiento, así sobran más nichos inhóspitos, como los afloramientos rocosos y suelos someros expuestos para las cícadas y otras especies xéricas que pueden colonizarlos.

Se han detectado micorrizas en las poblaciones de *Dioon edule* (Vovides 1990) y se ha reportado ampliamente que en cierto modo esta asociación de micorrizas en las angiospermas mejora la habilidad de la planta hospedera el absorber nutrientes y agua (Cox *et al.* 1980). Las cícadas tienen una asociación simbiótica con algas verde-azules en las raíces coraloides las cuales fijan el nitrógeno atmosférico (Schneider 1894). Los factores bióticos y abióticos pueden tener pronunciados efectos en el establecimiento de las cícadas. Los suelos someros y los afloramientos rocosos son favorables para el establecimiento de las cícadas por la presencia de grietas donde las raíces principales pueden obtener buen anclaje y humedad (Vovides 1990).

Ahora bien, a pesar de que las tres poblaciones están diferenciadas genéticamente, y que se encuentran distribuidas de forma agregada (Juquilita y Pablo Reyes) y aleatoria (San José), éstas no tienen una estructura poblacional definida, ya que no hay una delimitación exacta de sus vecindarios genéticos. Debido a que los métodos de dispersión de semillas son primordialmente por gravedad y que el flujo génico fue muy bajo en el pasado cabría esperar estructuras poblacionales bien diferenciadas. Esta estructura parcial dentro de las poblaciones puede estar influenciada por los eventos históricos y biogeográficos de la región, como la distribución geográfica de las poblaciones durante el Pleistoceno y post-Pleistoceno, la formación de islas, así como los cambios climáticos durante y después de la última gran glaciación (González-Astorga *et al.* 2003a-b; Keppel *et al.* 2002).

CONCLUSIONES

- ☉ *Ceratozamia longifolia* presenta el valor más alto de diversidad genética que hasta ahora se ha reportado.
- ☉ De las tres poblaciones estudiadas, Pablo Reyes es la que presenta mayor diversidad genética y la de menor diversidad es San José.
- ☉ Estas poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg en lo que respecta a los estadísticos F y f y solo algunos loci muestran un exceso de heterocigotos, los cuales podrían ser favorecidos por la selección.
- ☉ Las poblaciones están estructuradas, por lo que existe una diferenciación entre ellas, hecho que pudo ser generado por deriva génica.
- ☉ A pesar de que las poblaciones son pequeñas, los valores de f indican que hay entrecruzamiento, por lo que la endogamia no actúa en la estructura genética.
- ☉ No se cumple el modelo de aislamiento por distancia en las relaciones genéticas y el flujo génico.
- ☉ La alta diferenciación genética está dada por el escaso flujo génico que se llevó cabo en el pasado entre las poblaciones
- ☉ Los patrones de distribución para Juquilita y Pablo Reyes son agregados y para San José es aleatorio a pesar de esto la estructura genética espacial poblacional es parcial, es decir que no hay una delimitación de vecindarios genéticos.
- ☉ Al tener cada una de estas poblaciones se puede observar y entender algunos aspectos de la evolución de este género y de algunas otras especies, por lo que es importante preservarlas.
- ☉ Debido a los valores de diversidad genética de *Ceratozamia longifolia*, los sitios donde se localizan las poblaciones podrían albergar especies relictuales o incluso ser denominados refugios florísticos.

En Conclusión

Hasta el momento no existen trabajos de genética de poblaciones con electrofóresis de isoenzimas reportados para alguna especie del género *Ceratozamia*, por lo que este trabajo aporta nueva información, que aunada con la ya reportada para *Dioon edule* y *D. angustifolium*, pueden ser implementadas en proyectos de conservación para esta familia, ya que son plantas

muy primitivas, con alrededor de 200-280 millones de años y son probablemente las plantas vivas que produjeron semillas por primera vez, además de que representan el enlace entre los helechos y las plantas con semilla (Chamberlain 1935). A pesar de que todas las especies de la familia Zamiaceae, y del Orden Cycadales, se encuentran dentro de un programa de conservación, ya sea a nivel internacional (IUCN 2004) o nacional (NOM-059-ECOL-2001), la amenaza en contra de todas estas especies sigue latente, debido principalmente a la colecta irracional e ilegal de plantas para su comercio con fines ornamentales (Vovides *et al.* 2003, 2004a, 2004b) y a la destrucción de sus hábitats por medio de la deforestación, ya sea con fines madereros o agricultura extensiva (Stevenson *et al.* 2003). En pocas palabras, su permanencia o extinción está conectada con las actividades humanas (Whitelock 1978). Si bien, no es este el caso de *Ceratozamia longifolia*, debido a que la zona de estudio mantiene una alta conservación, con muy poca tala clandestina, la agricultura no es extensiva y las actividades ganaderas son prácticamente inexistentes.

Uno de los objetivos para conservación es el preservar el potencial evolutivo de las especies manteniendo la mayor cantidad de diversidad genética como sea posible.

Los datos proporcionados por todos y cada uno de los trabajos que se han reportado pueden servir como base para monitorear y evitar la pérdida de diversidad genética en el tiempo, para así poder preservarla. Cualquier pérdida de diversidad de conservación *in situ* o *ex situ* puede ser demostrada solamente si los niveles originales de diversidad son conocidos.

Las poblaciones de *Ceratozamia longifolia* se localizan en una zona muy conservada, con poco o nulo impacto antropogénico, además de que esta especie tiene una mayor diversidad genética que lo reportado por González-Astorga (2003a, 2005), por lo que es de vital importancia, realizar más estudios, tanto en la especie, el género y esta zona. Y en segundo, llevar a cabo una campaña de protección hacia las cícadas, para que de esta manera la gente conozca la gran diversidad de especies que alberga el país y sus estados, y así pueda protegerla, porque:

“Solo podemos amar aquello que conocemos y sólo podemos proteger aquello que amamos”

Tobías Lasser.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez-Buylla ER, R García-Barrios, C Lara-Moreno y M Martínez-Ramos.** 1996. Demographic and genetic models in conservation biology: applications and perspectives for tropical rain forest tree species. *Annual Review of Ecology and Systematics*. Vol. 27: 387-421.
- Álvarez-Buylla ER y AA Garay.** 1994. Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pioneer tree species. *Evolution* 48(2): 437-453.
- Aragón MC.** 2004. Estructura y composición florística de la asociación selva mediana con pino-encino en Santa María Magdalena, Pluma Hidalgo, Oaxaca. Reporte de Servicio Social. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México. 52 pp.
- Arriaga L, JM Espinosa, C Aguilar, E Martínez, L Gómez y E Loa (coordinadores).** 2000. Regiones terrestres prioritarias de México. Escala de trabajo 1:1 000 000. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. México.
- Avise JC.** 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall, New York. 511.
- Balduzzi A, P De Luca y S Sabato.** 1982. A phytogeographical approach to the New World cycads. *Delpinoa* 23-24: 185-202.
- Barrett SCH y JR Kohn.** 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: DA Falk y KE Holsinger. *Genetics and conservation of rare plants*. New York Oxford. Oxford University Press. Pp. 283.
- Berg EE y JL Hamrick.** 1997. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. *Canadian Journal of Forest Research* 27:415-424.
- Burnham RJ y A Graham.** 1999. The history of Neotropical vegetation: new developments and status. *Annals Missouri Botanical Garden* 86: 546-589.
- Byrne M y SH James.** 1991. Genetic diversity in the cycad *Macrozamia riedlei*. *Heredity* 67:35-39.
- Cardoso MA, J Provan, W Powell, PCG Ferreira y DE de Oliveira.** 1998. High genetic differentiation among remnant population of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Molecular Ecology* 7: 601-608.
- Castillo-Guevara C y V Rico-Garay.** 2003. The role of macrozamin and cycasin in cycads (Cycadales) as antiherbivore defenses. *Journal of the Torrey Botanical Society* 130 (3): 26-217.

- Chadwick CE.** 1993. The role of *Tranes lyteroides* and *T. sparsus* Boh (col. Cusculionidae) in the pollination of *Macrozamia communis* (Zamiaceae). In: Stevenson DW y KJ Norstog (eds.). Proceedings on the second international conference on cycad biology. Palm and Cycad Societies of Australia. Milton. Queensland. pp. 77-88.
- Chamberlain CJ.** 1935. Gymnosperms, structure and evolution. University of Chicago Press, Chicago.
- Chao-Luan L, Q Wang, SY Jian, S Ge, KE Wang.** 1999. Genetic diversity of allozymes in populations of *Cycas panzhihuensis* L. Zhou & S. Y. Yang. In: Chen C. J., ed. Biology and conservation of cycads – *proceedings of the fourth international conference on cycad biology* Beijing: International Academic Publishers, 323-327.
- Charlesworth D y B Charlesworth.** 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. Annual Review of Ecology Systematics 18: 237-268.
- Chávez-González AD, B Rendón y AL Luna-José.** 2005. *Ceratozamia* en la Sierra Madre del Sur, Oaxaca, México. Ponencia durante la 7ª Conferencia Internacional sobre Biología de Cícadas; Xalapa, Veracruz, 2005.
- Chung MG, MY Chung, GS Oh y BK Epperson.** 2000. Spatial genetic structure in a *Neolitsea sericea* population (Lauraceae). Heredity 85: 490-497.
- Chung MG y BK Epperson.** 2000. Clonal and spatial genetic structure in *Eurya emarginata* (Theaceae). Heredity 84: 170-177.
- Chung MG y BK Epperson.** 1999. Spatial genetic structure of allozyme polymorphisms in a population of *Eurya japonica* (Theaceae). Silvae Genetica 49 (1): 1-4.
- Clark DB, DA Clark y ME Grayum.** 1992. Leaf demography of a neotropical rain forest cycad, *Zamia skinneri* (Zamiaceae). *American Journal of Botany* 79 (1): 28-33.
- Coney PJ.** 1982. Plate tectonic constraints on the biogeography of Middle America and the Caribbean region. Annals Missouri Botanical Garden 69: 432-443.
- Cornejo RA.** 1998. Estructura genética poblacional de *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae) en el Golfo de México y Mar Caribe. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. pp. 70.
- Crist TO y JA Wiens.** 1996. The distribution of ant colonies in a semiarid landscape: implications for community and ecosystem process. *Oikos* 76: 301-311.

- Cole CT.** 2003. Genetic variation in rare and common plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 34: 213-237.
- Cox G, KJ Moran, F Sanders, C Nockolds y PB Tinker.** 1980. Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. III. Polyphosphate granules and phosphorus translocation. *New Phytologist* 84: 649-659.
- Delgado P, D Piñero, A Chaos, N Pérez-Nasser, ER Alvarez-Buylla.** 1999. High population differentiation and genetic variation in the endangered Mexican pine *Pinus rzedowskii* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 86: 669-676.
- Diggle PJ.** 1983. *Statistical Analysis of Spatial Point Patterns*. London Academic Press. London.
- Dolan RW, R Yahr, ES Menges, MD Halfhill.** 1999. Conservation implications of genetic variation in three rare species endemic to Florida rosemary scrub. *American Journal of Botany* 86: 1556-1562.
- Donaldson JS.** 2003. Introduction. In: Donaldson JD, ed. *Cycads. Status survey and conservation action plan*. Gland, Switzerland: IUCN (The World Conservation Union), 1-2.
- Donaldson JS.** 1997. Is there a floral parasite mutualism in cycad pollination? The pollination biology of *Encephalartos villosus* (Zamiaceae). *American Journal of Botany* 84: 1398-1406.
- Donaldson JS, I Nänni y J de W Bösenberg.** 1995. The role of insects in the pollination of *Encephalartos cycadifolius*. In: Vorster P (ed.). *Proceedings of the third international conference on cycad biology*. Cycad Society of South Africa. Stellenbosch. pp. 423-434.
- Duncan R.** 1995. *Statistical Analysis Programs. User manual*. Lincoln University. Canterbury, New Zeland.
- Eguiarte FLE.** 1990. Genética de poblaciones de *Astrocarium mexicanum* Liebm. en Los Tuxtlas, Veracruz. Tesis Doctoral. Centro de Ecología, UNAM. 189.
- Ellstrand NC, R Ornduff y JM Clegg.** 1990. Genetic structure of the Australian cycad, *Macrozamia communis* (Zamiaceae). *American Journal of Botany* 77 (5): 677-681.
- Epperson BK.** 1989. Spatial patterns of genetic variation withing plant populations. Pp. 229-253 In: Brown, A. D. H., M. T. Clegg, A. L. Kahler y B. S. Weir (eds.) *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sinauer, Sunderland, M. A.
- Epperson BK.** 1993. Recent advances in correlation analysis of spatial patterns of genetic variation. *Evolution Biology*. 27: 95-155.

- Epperson BK y RW Allard.** 1989. Spatial autocorrelation analysis of the distribution of genotypes within populations of lodgepole pine. *Genetics* 121: 369-377.
- Epperson BK y ER Álvarez-Buylla.** 1997. Limited seed dispersal and genetic structure in life stages of *Cecropia obtusifolia*. *Evolution* 51: 275-282.
- Evans MEK, RW Dolan, ES Menges, DR Gordon.** 2000. Genetic diversity and reproductive biology in *Warea carteri* (Brassicaceae), a narrowly endemic Florida scrub annual. *American Journal of Botany* 87: 372-381.
- Falk DA y KE Holsinger.** 1991. Genetics and conserve of rare plants. Center for plant conservation. New York Oxford. Oxford University Press. Pp. 283.
- Fan XX, L Shen, X Zhang, XY Chen y CX Fu.** 2004. Assessing genetic diversity of *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae) populations from China by RAPD markers. *Biochemical Genetics*, vol. 42, nos. 7/8.
- Ferrusquía IV.** 1998. Geología de México: una sinopsis. In: Ramamoorthy TP; R Bye, A Lot, J Fa (comp.). *Diversidad Biológica de México: Orígenes y Distribución*. Instituto de Biología, UNAM.
- Frankel OH.** 1970. Variation, the essence of life. Sir William Macleay Memorial Lecture. *Proc Linn Soc New South Wales* 95: 158-169.
- Frankel OH y ME Soulé.** 1981. *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Gitzendanner MA y PS Soltis.** 2000. Patterns of genetic variation in rare and windspread plant congeners. *American Journal of Botany* 87: 783-792.
- Givnish y Sytsma.** 1997. Molecular evolution and adaptative radiation. Cambridge University Press, Cambridge, UK pp. 639. In: Sanderson M. 1998. Book review: reappraising adaptative radiation. *American Journal of Botany* 85 (11): 1650-1655.
- González-Astorga J, AP Vovides, A Cruz-Angón, P Octavio-Aguilar y C Iglesias.** 2005. Allozyme variation in the three extant populations of the narrowly endemic cycad *Dioon angustifolium* Miq. (Zamiaceae) from North-eastern México. *Annals of Botany (in press)*.
- González-Astorga J y G Castillo-Campos.** 2004. Genetic variability of the narrow endemic tree *Antirhea aromatica* Castillo-Campos y Lorence (Rubiaceae, Guettardeae) in a tropical forest of Mexico. *Annals of Botany* 93: 521-528.

- González-Astorga J, A Cruz-Angón, A Flores-Palacios y AP Vovides.** 2004. Diversity and genetic structure of the Mexican endemic epiphyte: *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* 94: 545-551.
- González-Astorga J, AP Vovides, MM Ferrer y C Iglesias.** 2003a. Population genetics of *Dioon edule* Lindl. (Zamiaceae, Cycadales): biogeographical and evolutionary implications. *Botanical Journal of the Linnean Society* 80:457-467.
- González-Astorga J, AP Vovides y C Iglesias.** 2003b. Morphological and geographical variation of the cycad *Dioon edule* Lindl. (Zamiaceae): ecological and evolutionary implications. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 465-470.
- González-Astorga J y J Núñez-Farfán.** 2001. Effect of habitat fragmentation on the genetic structure of the narrow endemic *Brongniartia vazquezii*. *Evolutionary Ecology Research* 3: 861-872.
- González D y AP Vovides.** 2002. Low interlineage divergence in *Ceratozamia* (Zamiaceae) detected with nuclear ribosomal DNA ITS and chloroplast DNA trnL-F non-coding region. *Systematic Botany* 27: 654-661.
- Greig-Smith P.** 1983. Quantitative plant ecology. 3a Ed., Studies in ecology 9. Blackwell, London.
- Griffiths DA.** 1987. Spatial autocorrelation: a primer. Washington, DC: Association of American Geographers.
- Haase P, FI Pugnaire, SC Clark y LD Incoll.** 1997. Spatial pattern in *Anthyllis cytisoides* shrubland on abandoned land in South-eastern Spain. *Journal of Vegetation Science* 8: 627-634.
- Hamrick JL.** 1983. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: CM Schonewald-Cox, SM Chambers, B MacBryde and L Thomas. Genetics and conservation. Benjamin-Cummings, London, UK. pp. 335-348.
- Hamrick JL y JD Nason.** 1996. Consequences of dispersal in plants. In: OE Rhodess, Jr., RK Chesser y MH Smith (eds.), Population dynamics in ecological space and time, 203-236. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.
- Hamrick JL, MJW Godt y SL Sherman-Broyles.** 1995. Gene flow among plant populations: evidence from genetic markers. In: PC Hoch y AG Stephenson (eds.), Experimental and molecular approaches to plant systematics. Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO. pp. 215-232.

- Hamrick JL y MJW Godt.** 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London B.* 351: 1291-1298.
- Hamrick JL y MJW Godt.** 1990. Allozyme diversity in plant species. In: AHD Brown, MT Clegg, AL Kahler y BS Weir (eds.). *Plant population genetics, breeding and genetics resources.* Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. pp. 43-63.
- Hamrick JL y MJW Godt.** 1989. Allozyme diversity in plant species. In: AHD Brown, MT Clegg, AL Kahler y BS Weir (eds.) *Plant population genetics, breeding and genetic resources.* Sinauer, Sunderland, MA. pp. 43-63.
- Hannan GL y MW Orick.** 2000. Isozyme diversity in *Iris cristata* and the threatened glacial endemic *I. lacustris* (Iridaceae). *American Journal of Botany* 87: 293-301.
- Hartl DL y AG Clarck.** 1989. *Principles of population genetics.* 2a ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Heenan D.** 1977. Some observations on the cycads of Central Africa. *Botanical Journal Society* 74: 279-288.
- Hedrick PW.** 2000. *Genetics of populations.* Second edition. Jones and Bartlett Publishers. USA. 533.
- Hernández Hernández Mireya.** 2004. Evaluación y composición florística de un bosque mesófilo de montaña en la Sierra Madre del Sur de Oaxaca. Reporte de Servicio Social, UAM Iztapalapa.
- Heuertz M, X Vekemans, JF Hausman, M Paladas y J Hardy.** 2003. Estimating seed vs. pollen dispersal from spatial genetic structure in the common ash. *Molecular Ecology* 12: 2483-2495.
- Hewitt GM.** 1996. Some genetic consequences of the ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247-276.
- Hill KD, DW Stevenson y R Osborne.** 2004. The world list of cycads. In: Walters TW, Osborne R, eds. *Cycad classification: concepts and recommendations.* Wallingford, Oxon: CABI Publishing. 219-235.
- Hill KD.** 1996. A taxonomic revision of the genus *Cycas* (Cycadaceae) in Australia. *Telopea* 5: 177-206.
- Hill KD.** 1992. A preliminary account of *Cycas* (Cycadaceae) in Queensland. *Telopea* 5: 177-206.
- INEGI.** 1986. Mapa de uso de suelo vegetación escala 1:1000 000. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.

- INE-SEMARNAP.** 2000. Prep. 6: Protección, Conservación y Recuperación de la Familia Zamiaceae (Cycadales) de México. México: D. F. Instituto Nacional de Ecología.
- IUCN.** 1998. 1997 IUCN Red list of threatened plants. Gland: IUCN.
- Jian S, Y Zhong, N Liu, Z Gao, Q Wei, Z Xie y H Ren.** 2006. Genetic variation in the endangered endemic species *Cycas fairylakea* (Cycadaceae) in China and implications for conservation. *Biodiversity and Conservation* 15: 1681-1694.
- Jones DL.** 1993. *Cycads of the World*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
- Jones DL y P Foster.** 1994. Seven new species of *Macrozamia* section *Parazamia* (Miq.) Miq. (Zamiaceae section *Parazamia*) from Queensland. *Austrobaileya* 4 (2): 269-288.
- Keppel G, SW Lee y PD Hodgskiss.** 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.
- Keppel G.** 2002. Low genetic variation in a Pacific cycad: conservation concerns for *Cycas seemannii* (Cycadaceae). *Oryx* 36 (1): 41-49.
- Keppel G.** 2001. Notes on the natural history of *Cycas seemannii* (Cycadaceae). *South Pacific Journal of Natural Sciences* 19: 35-42.
- Kimura M y JF Crow.** 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738.
- Kirkpatrick REB, PS Soltis y DE Soltis.** 1990. Mating system and distribution of genetic variation in *Gymnocarpium dryopteris* ssp. *disjunctum*. *American Journal of Botany* 77(8): 1101-1110.
- Ledig FT, MT Conkle, B Bermejo-Vázquez, T Eguiluz-Pineda, PD Hodgskiss, DR Johnson, WS Dvorak.** 1999. Evidence for an extreme bottleneck in a rare Mexican pinyon: genetic diversity, disequilibrium, and the mating system in *Pinus maximartinezii*. *Evolution* 53: 91-99.
- Lewis PO y DJ Crawford.** 1995. Pleistocene refugium endemics exhibit greater allozyme diversity than widespread congeners in the genus *Polygonella* (Polygonadaceae). *American Journal of Botany* 82: 141-149.
- Lewontin RC.** 1974. *The genetic basis of evolutionary change*. New York: Columbia University Press.
- Li CC y DG Horvitz.** 1953. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *American Journal of Human Genetics* 5: 107-117.

- Loveless MD y JL Hamrick.** 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annals Review Ecology Sistematic* 15: 65-95.
- Luna-José AL.** 2006. Conocimiento y cuantificación de los recursos vegetales en diez comunidades de la Sierra Madre del Sur, Oaxaca. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. De México.
- Luna-José AL.** 2001. Análisis del conocimiento etnobotánico entre los zapotecos de la comunidad Trinidad Buenavista Loxicha, Oaxaca. Reporte de Servicio Social. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.
- Maki M y Y Asada.** 1998. High genetic variability revealed by allozymic loci in the narrow endemic fern *Polystrichum otomasui* (Dryopteridaceae). *Heredity* 80: 604-610.
- Martínez-Palacios A, LE Eguiarte y GR Furnier.** 1999. Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-regineae* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. *American Journal of Botany* 86: 1093-1098.
- Max KN, SK Mouchaty y KE Schwaegerte.** 1999. Allozyme and morphological variation in two subspecies of *Dryas octopetala* (Rosaceae) in Alaska. *American Journal of Botany* 86: 1637-1644.
- Mayorga R, I Luna y O Alcántara.** 1998. Florística del bosque mesófilo de montaña de Molocotlán, Molango-Xochicoatlán, Hidalgo, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 63: 101-119.
- Miller MP.** 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author. <http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>
- Moretti A, S Sabato y GS Gigliano.** 1983. Taxonomic significance of methylazoxymethanol glycosides in the cycads. *Phytochemistry* 22: 115-117.
- Mound LA y I Terry.** 2001. Thrips pollination of the Central Australian cycad. *Macrozamia macdonellii* (Cycadales). *Int J Plant Sci* 162: 147-155.
- Nei M.** 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nei M.** 1972. Genetic distances between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.

- Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001**, que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestre terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial, y que establece especificaciones para su protección.
- Norstog KJ y TJ Nicholls.** 1997. The biology of the cycads. Ithaca, Cornell University Press.
- Norstog KJ, PK Fawcett y AP Vovides.** 1992. Beetle pollination of two species of *Zamia*: evolutionary and ecological considerations. *Paleobotanist* 41: 149-158.
- Norstog KJ y PKS Fawcett.** 1989. Insect-cycad symbiosis and its relation to the pollination of *Zamia furfuracea* (Zamiaceae) by *Rhopalotria mollis* (Curculionidae). *American Journal of Botany* 76: 1380-1394.
- Norstog KJ, DW Stevenson y KJ Nicholls.** 1986. The role of beetles in the pollination of *Zamia furfuracea* (Zamiaceae). *Biotropica* 18: 300-306.
- Oberprieler RG.** 1999. Systematics and evolution of the cycad-associated weevil genus *Apinotropis* Jordan (Coleoptera: Anthribidae) *Afr Entomol* 7: 1-33.
- Palacios CR y J Rzedowski.** 1993. Estudio palinológico de las floras fósiles del Mioceno inferior y principios del Mioceno Medio de la región de Pichucalco, Chiapas, México. *Acta Botánica de México* 24: 1-96.
- Parker KC, JL Hamrick, AJ Parker y EA Stacy.** 1997. Allozyme diversity in *Pinus virginiana* (Pinaceae): intraspecific and interpecific comparisons. *American Journal of Botany* 84 (10):1372-1382.
- Pasteur N.** 1988. Practical isozyme genetics. English Edition Ellis Horwood Limited. pp. 215.
- Peakall R, M Ruibal y DB Lindenmayer.** 2003. Spatial autocorrelation analysis offers new insights into gene flow in the Australian bush rat, *Rattus fuscipes*. *Evolution* 57 (5): 1182-1195.
- Peakall y Smouse.** 2005. GenAEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. The Australian National University, Canberra, Australia. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAEx/>
- Pérez-Farrera MA.** 2005. Estudio sistemático de los complejos *Ceratozamia norstogii* DW Stevenson y *C. miqueliana* H Wendl. (Cycadales, Zamiaceae). Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Queretaro. Facultad de Ciencias Naturales. Santiago de Queretaro, Queretaro, México, pp. 182.
- Pérez-Farrera MA y AP Vovides.** 2004. Spatial distribution, population structure, and fecundity of *Ceratozamia matudai* Lundell (Zamiaceae) in El Triunfo Biosphere Reserve, Chiapas, México.

- In: The Botanical Review 70(2) April-June 2004. Published Quarterly by the New York Botanical Garden.
- Pérez-Farrera MA y AP Vovides.** 2004a. Ecology of Cycads in Southern Mexico. Proceedings of the Sixth Internacional Conference on Cycad Biology. 112-120.
- Pérez-Farrera MA y AP Vovides.** 2004b. Spatial distribution, population structure, and fecundity of *Ceratozamia matudai* Lundell (Zamiaceae) in El Triunfo Biosphere Reserve, Chiapas, México. The Botanical Review 70(2): 299-311.
- Pérez-Farrera MA, PF Quintana-Ascencio y B Salvatierra Izaba.** 2000. Population dynamics of *Ceratozamia matudai* Lundell (Zamiaceae) in el Triunfo Biosphere Reserve, Chiapas, México. Journal of Torrey Botanical Society 127 (4): 291-299.
- Pérez-Farrera MA.** 1999. Dinámica poblacional de *Ceratozamia matudae* en la Reserva de la Biosfera el Triunfo, Chiapas, México. Tesis de Maestría, el Colegio de la Frontera Sur. San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México.
- Phillips DL y JA MacMahon.** 1981. Competition and spacing patterns in desert shrubs. Journal of Ecology 69: 97-115.
- Premoli AC, CP Souto, AE Rovere, TR Allnut y AC Newton.** 2002. Patterns of isozyme variation as indicators of biogeographic history in *Pilgerodendron uviferum* (D. Don) Florín. Biodiversity Research 8: 57-66.
- Ranker TA.** 1994. Evolution of high genetic variability in the rare Hawaiian fern *Adenophorus periens* and implications for conservation management. Biological Conservation 70: 19-24.
- Ripley BD.** 1977. Modelling spatial patterns. Journal of the Royal Statistical Society Series B 39: 172-212.
- Rzedowski J.** 1998. Diversidad Biológica de México: orígenes y distribución. In: Ramamoorthy TP, R Bye, A Lot, J Fa (comp.). Diversidad Biológica de México: Orígenes y Distribución. Instituto de Biología, UNAM.
- _____. 1996. Análisis preliminar de la flora vascular de los bosques mesófilos de montaña de México. Acta Botánica Mexicana 35: 25-44.
- _____. 1988. Vegetación de México. Editorial Limusa. México.
- Rzedowski J y C Palacios.** 1977. El bosque de *Engelhardtia* (*Oreomunnea*) *mexicana* en la región de la Chinantla (Oaxaca, México): una reliquia del Cenozoico. Boletín de la Sociedad Botánica de México 36:93-123.

- Sabato S y P De Luca.** 1985. Evolutionary trends in *Dion* [*sic*] (Zamiaceae). *American Journal of Botany* 72: 1353-1363.
- Schaal BA, WJ Leverich y SH Rogstad.** 1991. A comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation of rare plants. In: DA Falk y KE Holsinger (eds.). *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, New York. pp. 123-134.
- Schnabel A y JL Hamrick.** 1995. Understanding the population genetic structure of *Gleditsia triacanthos* L.: the scale and pattern of pollen flow. *Evolution* 49: 921-931.
- Schnabel A, RH Laushman y JL Hamrick.** 1991. Comparative analysis of population genetic structure for two co-occurring tree species, *Maclura pomifera* (Moraceae) and *Gleditsia triacanthos* (Leguminosae). *Heredity* 67: 357-364.
- Schneider D, M Wink y F Sporer.** 2002. Cycads: their evolution, toxins, herbivores and insect pollinators. *Naturwissenschaften* 89: 281-294.
- Schneider CJ, TB Smith, B Larison y C Moritz.** 1999. A test of alternative model of diversification in tropical forest: ecological gradients vs. rainforest refugia. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* 96 (24): 13869-13873.
- Schneider A.** 1894. Mutualistic symbiosis of algae and bacteria with *Cycas revoluta*. *Botanical Gazette* 19: 25-32.
- Sharma IK, DL Jones y PI Forster.** 2004. Genetic differentiation and phenetic relatedness among seven species of the *Macrozamia plurinervis* complex (Zamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 313-327.
- Sharma IK, DL Jones, PI Foster y AG Young.** 1999. Low isozymic differentiation among five species of the *Macrozamia heteromera* group (Zamiaceae). *Biochemical Systematic and Ecology* 27: 67-77.
- Sharma IK, DL Jones, PI Foster, AG Young.** 1998. The extent and structure of variation in the *Macrozamia pauli-guilielmi* complex (Zamiaceae). *Biochemical Systematic and Ecology* 26: 45-54.
- Simberloff D.** 1988. The contribution of population and community biology to conservation science. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 19: 473-511.
- Skarpe C.** 1991. Spatial patterns and dynamics of woody vegetation in an arid savanna. *Journal of Vegetation Science* 2: 565-572.

- Slatkin M.** 1994. Gene flow and population structure. In: Real L, ed. Ecological genetics. New Jersey: Princenton University Press, 3-17.
- Slatkin M.** 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47: 264-279.
- Slatkin M.** 1990. Flujo génico en poblaciones naturales. *Ciencias* 17: 10-14.
- Slatkin M y NH Barton.** 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43: 1349-1368.
- Slatkin M.** 1987. Gene flow and geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-792.
- Smouse PE y R Peakall.** 1999. Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity* 82: 561-573.
- Sokal RR y FJ Rohlf.** 1995. *Biometry*. 3ra Ed., WH Freeman. New York.
- Soltis PS y DE Soltis.** 1991. Genetic variation in endemic and widespread plant species: examples from Saxifragaceae and *Polystichum* (Dryopteridaceae). *Aliso* 13: 215-223.
- Soltis PS y DE Soltis.** 1990. Genetic variation within and among populations of ferns. *American Fern Journal* 80 (4): 161-172.
- Soltis PS y DE Soltis.** 1987. Population structure and estimates of gene flow in the homosporous fern *Polisticum munitum*. *Evolution* 41: 620-629.
- Swofford DL y RB Selander.** 1997. BIOSYS-2. Department of Genetics and Development. University of Illinois at Urbana-Champaign Urbana, Illinois 60801, U.S.A.
- Stevenson DW, AP Vovides y J Chemnick.** 2003. Regional overview: New World. pp. 31-38. In: J Donaldson (ed.) Status, survey and conservation action plan Cycads. IUCN. Gland, Suiza.
- Stevenson DW.** 1993. The Zamiaceae in Panama with comments on phytogeography and species relationships. *Brittonia* 45: 1-16.
- Stevenson D, S Sabato y M Vázquez-Torres.** 1986. A new species of *Ceratozamia* (Zamiaceae) from Veracruz, México with comments on species relationships, habitats, and vegetative morphology in *Ceratozamia*. *Brittonia* 38: 17-26.
- Tang W, RG Oberprieler y SL Yang.** 1999. Beetles (Coleoptera) in cones of Asian *Cycas*: diversity, evolutionary patterns, and implications for *Cycas* taxonomy. In: ChenCJ (ed.). Biology and conservation of cycads: proceedings of the fourth international conference on cycad biology. International Academic Publishers, Beijing, China. pp. 280-297.

- Tang W.** 1990. Maturity in cycads. *Encephalartos* 24: 24-26.
- Tang W.** 1988. Seed dispersal in the cycad *Zamia pumila* in Florida. *Can. Journal of Botany* 67: 2066-2070.
- Tang W.** 1987. Insect pollination in the cycad *Zamia pumila* (Zamiaceae). *American Journal of Botany* 74: 90-99.
- Templeton AR.** 1986. Coadaptation and outbreeding depression. In: ME Soulé (ed.). *Conservation Biology – The Science of Scarcity and Diversity*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, USA. pp. 105-116.
- Terry I.** 2001. Thrips and weevils as dual, specialist pollinators of the Australian cycad *Macrozamia communis* (Zamiaceae). *Int J Plant Sci* 162: 1293-1305.
- Tribsch A.** 2004. Areas of endemism of vascular plants in the Eastern Alps in relation to Pleistocene glaciation. *Journal of biogeography* 31: 747-760.
- Tsan-Piao L, YC Sun, HC Lo y YP Cheng.** 2000. Low genetic diversity of *Cycas taitungensis* (Cycadaceae), an endemic species in Taiwan, revealed by allozyme analysis. *Taiwan J. For. Sci.* 15 (1): 13-19.
- Toledo VM.** 1982. Pleistocene changes of vegetation in Tropical México. In: Prance, G. T. (ed.) *Biological Diversification in the tropics. Proceedings of the Fifth International Symposium of the Association for Tropical Biology*. Columbia University Press, New York, pp. 93-111.
- Van der Bank H, M Wink, P Voster, J Treutlein, L Brand M Van der Bank y J Hurter.** 2001. Allozyme and DNA sequence comparisons of nine species of *Encephalartos* (Zamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 241-266.
- Vazquez-Torres.** 1999. Algunos datos etnobotánicos de las cícadas en México. *Memoirs of the New Cork Botanical Garden* 57: 144-147.
- Vovides AP, MA Pérez-Farrera, D González y S Avendaño.** 2004a. Relationships and Phytogeography in *Ceratozamia* (Zamiaceae). In: ade. T. Walters and R. Osborne. CAB International. *Cycad Classification: Concepts and Recommendations*: 109-125
- Vovides AP, D González, MA Pérez-Farrera, S Avendaño, C Bárcenas.** 2004b. A review of research on the cycad genus *Ceratozamia* Brongn. (Zamiaceae) in México. *Taxon* 53 (2): 291-297.
- Vovides AP, MA Pérez-Farrera, J González-Astorga, D González, T Gregory, J Chemnick, C Iglesias, P Octavio-Aguilar, S Avendaño, C Bárcenas y S Salas-Morales.** 2003. An outline

- of our current knowledge on Mexican cycads (Zamiaceae, Cycadales). *Plant Biology*, vol. 4: 159-174.
- Vovides AP, N Ogata, V Sosa y E Pena-García.** 1997. Pollination of endangered Cuban cycad *Mycrocycas calocoma* (Miq.) A.DC. *Botanical Journal of the Linnean Society* 125: 201-210.
- Vovides AP.** 1991. Insect symbionts of some Mexican cycads in their natural habitat. *Biotropica* 23 (1): 102-104.
- Vovides AP.** 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 (12): 1532-1543.
- Walters TW, DS Decker-Walters.** 1991. Patterns of allozyme diversity in the west Indies cycad *Zamia pumila* (Zamiaceae). *American Journal of Botany* 78: 436-445.
- Weir BS.** 1990. Genetic data analysis. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Weir BS y CC Cockerham.** 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wendt T.** 1987. Las selvas de Uxpanapa, Veracruz-Oaxaca, México: evidencia de refugios florísticos Cenozoicos. *Annales del Instituto de Biología UNAM-Serie Botánica* 58, 29-54.
- Whitelock LM.** 2004. Range and variation in the genus *Ceratozamia* (Zamiaceae). *The Botanical Review* 40 (2): 235-239.
- Whitelock LM.** 1978. The twilight of the cycads. *Garden* (New York) 2: 6-10.
- Widmer A y C Lexer.** 2001. Glacial refugia: sanctuaries for allelic richness, but not for gene diversity. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 267-269.
- Workman PL y JD Niswander.** 1970. Population studies on southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. *American Journal of Human Genetics* 22: 24-49.
- Wright S.** 1978. Evolution and genetics of populations, Vol. 4. Variability within and among natural populations. University of Chicago, Chicago.
- Wright S.** 1969. The theory of gene frequencies. Vol. 2. Chicago, London: University of Chicago Press.
- Wright S.** 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- Wright S.** 1946. Isolation by distance under diverse systems of mating. *Genetics* 31: 39-59.
- Wright S.** 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.
- Wright S.** 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159

- Xiao LQ, XJ Ge, X Gong, G Hao y SX Zheng.** 2004. ISSR variation in the endemic and endangered plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae). *Annals of Botany* 94: 133-138.
- Xiao Long-Qian y Xun Gong.** 2006. Genetic differentiation and relationships of populations in the *Cycas balansae* Complex (Cycadaceae) and its conservation implications. *Annals of Botany* 97: 807-812.
- Yang SL y AW Meerow.** 1999. Genetic variation in Chinese cycad population. *Biology and Conservation de Cycads. Proceedings of the Fourth International Conference on Cycad Biology* (Panzhihua, China). CJ Chen, ed. International Academic Publishers, Beijing, pp. 175-186.
- Yang SL y AW Merrow.** 1996. The *Cycas pectinata* (Cycadaceae) complex: genetic structure and gene flow. *International Journal of Plant Science* 157: 468-483.
- Yáñez Espinosa L.** 2006. Las cycadas: biología y conservación en México. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. México D.F. pp. 209.

ANEXO 1

Indices de diversidad y estructura genética reportados para varias especies de cicadas.

Especie	N	A _L	PLP	H _O	H _E	H _T	H _S	D _{ST}	G _{ST}	Nm	Trabajo
<i>Macrozamia communis</i>	5	1.61	50		0.045	0.08	0.09	0.10	0.27		Ellstrand <i>et al.</i> , 1990
<i>Zamia pumila</i>	2	1.21	16.7	0.047	0.041						Walters y Decker- Walters, 1991
<i>Macrozamia pauli-guilielmi</i>	3	1.3	31.3	0.043	0.081	0.23	0.12	0.11	0.03		Sharma <i>et al.</i> , 1998
<i>Macrozamia riedlei</i>	15	2.43	93	0.263	0.274	0.30	0.27		0.09	2.47	Byrne y James 1991
<i>Cycas pectinata</i>	11	1.82	58.5	0.066	0.076	0.19	0.17	0.05	0.39		Yang y Meerow 1996
<i>Cycas siamensis</i>	13	1.48	58.9	0.114	0.134				0.29	5.954	Yang y Merrow 1996
<i>Macrozamia parcifolia</i>	2	1.2	17.6	0.02	0.037				0.09		Sharma <i>et al.</i> , 1998
<i>Cycas panzhihuaensis</i>	3	1.13	14.3	0.043	0.061				0.14		Chao-Luan Li <i>et al.</i> , 1999
<i>Macrozamia heteromera</i>	5	1.3	26.0	0.072	0.077	0.16	0.15	0.19	0.10		Sharma <i>et al.</i> , 1999
<i>Cycas taitungensis</i>	2	1.07	2.5	0.014	0.013				0.03		Tsan-Piao Lin <i>et al.</i> , 2000
<i>Encephalartos</i>	9	1.6	35.7	0.135		0.15			0.15		Van der Bank 2001
<i>Cycas seemannii</i>	5	1.2	21.3	0.047	0.057			0.42	0.59	0.11	Keppel 2002
<i>Dioon edule</i>	8	1.44	54.8	0.273	0.239				0.07	2.98	González- Astorga <i>et al.</i> , 2003a
<i>Macrozamia plurinervia</i>	9	1.5	36.6	0.14	0.111	0.35	0.14	0.21	0.59	8.24	Sharma <i>et al.</i> , 2004
<i>Dioon angustifolium</i>	3	1.67	52.4	0.215	0.218			0.17	0.16	1.55	González-Astorga <i>et al.</i> , 2005
<i>Cycas balansae</i> *	8	1.36	60.19	0.316	0.211				0.602	0.33	Xiao y Gong 2006
<i>Cycas fairylakea</i> **	4		60.22	0.225					0.315	0.544	Jian <i>et al.</i> 2006
<i>Gimnospermas</i>		2.35	70.9			0.3	0.27		0.07		Yang y Merrow 1999
<i>Polisticum munitum</i>		2.23	0.542	0.106	0.111				0.024	24.0	Soltis y Soltis 1987
<i>Gymnocarpium dryopteris</i> ssp. <i>disjunctum</i>	15	1.79	0.586	0.194	0.186			0.97	0.108	3.41	Kirkpatrick <i>et al.</i> 1990
<i>Pinus virginiana</i>	19	1.22	64	0.125	0.139	0.15	0.139		0.053	4.48	Parker <i>et al.</i> 1997
<i>Polisticum otomasui</i>	10	1.93	61.9	0.166	0.177	0.18	0.202		0.108	2.072	Maki M. y Asada Y. 1998
<i>Pilgerodendron uviferum</i>	20	1.19	11.4	0.024	0.033			0.07	0.159		Premoli <i>et al.</i> 2002
<i>Ginkgo biloba</i>	9		75		0.316	0.377	0.316		0.161	1.304	Fan XX <i>et al.</i> 2004

Número de alelos por loci (A_L), porcentaje total de loci polimórficos (PLP), heterocigosis observada (H_O) y heterocigosis esperada (H_E), diversidad genética total (H_T), diversidad genética entre poblaciones (H_S), diversidad genética dentro de las poblaciones o divergencia (D_{ST}), coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}), y flujo génico estimada (Nm). *Estudio realizado con marcadores *ISSRs* (*Inter-simple sequence repeats*), **Estudio realizado con marcadores *AFLP* (*Amplified fragment length polymorphism*)

ANEXO 2

BUFFERS DE EXTRACCIÓN.

Buffer de extracción

0.1M Tris HCL pH 7.5
4% v/w PVP 40
0.001M EDTA
0.01M Cloruro de calcio
0.01M Cloruro de magnesio
0.1% 2-mercaptoetanol

Gel pH 8

0.009M Tris
0.005M Histidina-HCL
Correr a 50 mA constantes por 8 hrs.

SISTEMAS DE CORRIMIENTO.

Walters y Decker-Walters 1991

PK
Electrodo pH 8.1
0.3M H_3BO_3
0.056M NaOH
Gel pH 8.7
0.083M Tris
0.05M ácido cítrico monohidratado
Correr a 50 mA hasta que alcance 200V y luego voltaje constante (8.5 hrs.)

Li *et al.* 1999

R
Electrodo pH 8.0
0.4M Tris
0.105M ácido cítrico monohidratado
Gel pH 8.0
0.009M Tris
0.005M Histidina-HCL
Correr a 40 mA constantes (6hrs.)

TÉCNICAS DE TINCIÓN ENZIMÁTICA.**Fosfatasa ácida (ACPH)**

Pesar:	
Fast garnet GBC sal	100mg
Añadir:	
1M acetato de sodio pH 5.0	4ml
Agua	40ml
MgCl ₂ 1%	1ml
α naftil fosfato ácido	2ml

Incubar en oscuridad a temperatura ambiente.

Alcohol deshidrogenasa (ADH)

Añadir:	
0.2M Tris-HCL pH 8.0	50ml
MgCl ₂ 1%	1ml
Etanol (95°)	3ml
NAD 1%	2ml
NBT 1%	1ml
MTT 1%	0.25ml
PMS1%	0.5ml

Incubar en oscuridad a temperatura ambiente.

Peroxidasa anódica (APX)

Pesar:	
3-9 amyno-etil-carbazole	100mg
Añadir:	
Dimetilformamida	7ml
Agua destilada	90ml
Peróxido de hidrógeno	3ml
CaCl ₂	1ml
1M acetato de sodio pH 5.0	5ml

Teñir en oscuridad una hora a temperatura ambiente.

Para la parte catódica utilizar la rebanada inferior.

Diaforasa (DIA)

Pesar:	
Vaso 1	
β-NADH forma reducida	12mg
MTT	8mg
Vaso 2	
Agar bacteriológico	360mg
Vaso 3	
2-6 Diclorofenol-indofenol	4mg

Añadir:

Vaso 1
0.025M Tris-HCL pH 8.6 20ml

Vaso 2
Agua destilada 24ml

Vaso 3
Agua destilada 4ml

Poner a hervir vaso 2 y después mezclar vasos 1, 2 y 3.

Incubar en oscuridad 1hr a 36°C.

Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH)

Pesar:

D Fructuosa 1,6 difosfato sal trisódica 50mg

Añadir:

0.2M Tris-HCL pH 8.0 50ml

Aldolasa 5uni. o 0.5ml

Incubar en oscuridad 30 minutos a 36°C.

0.5M ácido arsénico sal disódica 1ml

NADP 1% 1ml

MTT 1% 1ml

PMS 1% 0.25ml

Incubar en oscuridad a 36°C.

Isocitrato deshidrogenasa (IDH)

Pesar:

Vaso 1
Ácido isocítrico (sal trisódica) 100mg

Vaso 2
Agar bacteriológico 360mg

Añadir:

Vaso 1
0.2M Tris-HCL pH 8.0 25ml

MgCl₂ 1% 1ml

NADP 1% 1ml

MTT 1% 1ml

PMS 1% 0.5ml

Vaso 2
Agua destilada 24ml

Poner a hervir vaso 2 y después mezclar vasos 1 y 2.

Teñir en oscuridad 1 hora, a temperatura ambiente.

Malato deshidrogenasa (MDH)

Pesar:

β NADH forma reducida 8mg

MTT 8mg

Añadir:

0.2M Tris-HCL pH 8.0	50ml
1M DL Malato pH 7.0	5ml
PMS 1%	0.1ml
Incubar en oscuridad a temperatura ambiente.	

Menadione reductasa (MNR)

Pesar:	
β NADH forma reducida	25mg
NBT	10mg
Menadione	25mg
Añadir:	
0.05M Tris-HCL pH 7.0	75ml

Fosfoglucoisomerasa (PGI)

Pesar:	
D-Fructuosa-6-fosfato sal disódica	20mg
Añadir:	
0.1M Tris-HCL pH 7.5	50ml
Glucosa-6 fosfato deshidrogenasa	2ml (20 μ l o 10 U por gel)
MgCl ₂ 1%	1ml
NADP 1%	1ml
PMS 1%	0.5ml
MTT 1%	1ml
Incubar en oscuridad a temperatura ambiente.	

6-Fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD)

Pesar:	
Ácido 6 fosfogluconico sal de bario	30mg
Añadir:	
0.2M Tris-HCL pH 8.0	50ml
MgCl ₂ 1%	1ml
NADP 1%	1ml
MTT 1%	1ml
PMS 1%	0.5ml
Incubar en oscuridad a 36°C.	

Aconitato hidratasa (ACO)

Vaso 1	
Ácido Cis-aconic	75mg
Vaso 2	
Agar bacteriológico	360mg

Añadir:

Vaso 1	
0.05M Tris-HCL pH 7.0	18ml
MgCl ₂ 1%	1ml
NADP 1%	1ml
MTT 1%	0.5ml
PMS 1%	0.25ml
Vaso 2	
Agua destilada	25ml

Incubar en oscuridad a temperatura ambiente.

Aspartato amino transferasa (Glutamato oxalacetato transaminasa) (AAT o GOT)

Pesar:

Pyridoxal 5-fosfato	4mg
Fast Blue BB sal	150mg

Añadir:

0.2M Tris-HCL pH 8.0	40ml
Sustrato GOT pH 7.0	10ml

Teñir en oscuridad 1 hora, a 36°C.

Enzima málica (ME)

Añadir:

0.2M Tris-HCL pH 8.0	50ml
1.0M DL-ácido málico pH 7.0	5ml
MgCl ₂ 1%	1ml
NADP 1%	1ml
MTT 1%	1ml
PMS 1%	0.25ml

Incubar en oscuridad a temperatura ambiente.

Esterasa (EST)

Pesar:

Fast Blue RR	75mg
--------------	------

Añadir:

α-naftil acetato 1%	3ml
β-naftil acetato 1%	3ml
Agua	40ml
Buffer de fosfatos pH 6.0	3ml

Incubar en oscuridad a temperatura ambiente.

Fosfoglucomutasa (PGM)

Pesar:

Glucosa-1 fosfato sal disódica	50mg
--------------------------------	------

Añadir:	
0.2M Tris-HCL pH 8.0	50ml
MgCl ₂ 1%	1ml
Glucosa-6 fosfato deshidrogenasa	2ml (2µl o 10 U por gel)
NAD 1%	0.5ml
MTT 1%	1ml
PMS 1%	0.25ml
Incubar en oscuridad a 37°C.	

Shikimato deshidrogenasa (SDH)

Pesar:	
Vaso 1	
Ácido shikimico	40mg
Vaso 2	
Agar bacteriológico	360mg
Añadir:	
Vaso 1	
0.2M Tris-HCL pH 8.0	25ml
MgCl ₂ 1%	1ml
NADP 1%	1ml
MTT 1%	1ml
PMS 1%	0.5ml
Vaso 2	
Agua destilada	24ml
Poner a hervir vaso 2 y después mezclar vasos 1 y 2.	
Teñir en oscuridad a temperatura ambiente.	

Aldolasa (ALD)

Pesar:	
D Fructuosa 1-6 difosfato	200mg
Añadir:	
0.05M Tris-HCL pH 8.0	50ml
0.5M ácido arsénico	1ml
Glyceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa	10 uni. 1ml (3.4µl)
NADP 1%	1ml
MTT 1%	1ml
PMS 1%	0.25ml
Incubar a temperatura ambiente.	