



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

**Dinámica de las fases tempranas de desarrollo y
genética de poblaciones de la cícada *Dioon
merolae* en Los Taviches, Oaxaca**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Biología Ambiental)**

P R E S E N T A

Juan Carlos Flores Vázquez

DIRECTORA DE TESIS: Dra. María Teresa Valverde Valdés

MÉXICO, D. F.

Noviembre 2008



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.

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A los miembros del comité Tutorial: Dra. María Teresa Valverde Valdés, por todo en apoyo brindado y su dedicación en todo momento. Dr. Juan Enrique Fornoni Agnelli, por todas las aportaciones, sugerencias y consejos. Dr. Jorge González Astorga por todas las facilidades brindadas para realizar el trabajo de laboratorio y por compartir sus conocimientos.

A los miembros del jurado: Dr. Andrew Vovides y Dra. Adriana Otero Arnaiz por sus valiosos comentarios y sugerencias los cuales mejoraron el presente trabajo

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por haberme otorgado una beca para cubrir mis estudios de maestría.

A Tim Gregory por el apoyo económico brindado para realizar el trabajo de campo

A SERBO, A. C. Por todo el apoyo logístico y moral

Agradecimientos

Antes que nada quiero agradecer a Tere Valverde por haber aceptado dirigir esta tesis con la precisión y eficacia que le caracterizan. Tere, gracias por tu disposición, enseñanzas y paciencia; pero sobre todo, gracias por tu amistad.

A Jorge González Astorga quien aceptó amable y entusiastamente participar en este proyecto, su conocimiento sobre las cícadas y la técnica desarrollada en su laboratorio allanaron el camino para que esta tesis pudiera realizarse. De las pláticas formales e informales que mantuvimos surgieron muchas ideas que le dan estructura a esta tesis. Gracias Jorge por todo lo que aprendí de ti.

A los miembros del jurado; Juan Fornoni, Andrew Vovides y Adriana Otero que con sus comentarios y sugerencias mejoraran el contenido de este trabajo.

A Julia Hernández Villa y Lilián Juárez por toda su ayuda, así como por su agradable compañía que aliviano las extenuantes horas de trabajo en el laboratorio. Quiero hacer un reconocimiento especial a la bióloga Dánae Cabrera Toledo, quien tuvo que lidiar con un Wuatusi (osea yo) que se enfrentaba por vez primera a los vericuetos de la tecnología (todo el equipo de laboratorio). Dánae, gracias por tu tiempo, tu sencillez, tus enseñanzas, paciencia y amistad, sin tu ayuda esta tesis no hubiera sido posible

En el trabajo de campo conté con la ayuda de Arturo Nava y Alfredo Saynes en la primera salida de campo. Posteriormente, a lo largo de año y medio, la ayuda de Arturo Sánchez, Fátima Maldonado, José Luis Lucas, Mayra Hernández y Beatriz Domínguez fue fundamental, a todos ellos, muchas gracias, sobre todo a J. L. Lucas quien, con excepción de una o dos ocasiones, participó en todas las salidas. También a Vitalicio y Tomás Hernández, de San Jerónimo Taviche, por su ayuda invaluable; el conocimiento que ellos tienen de Loma Colorada fue muy útil para llevar a buen fin el trabajo de campo.

A todos mis compañeros de SERBO, A. C. Asociación para la cual trabajo desde hace 10 años; Silvia, Spanky, Rosy, Alfredo y Leo. Gracias por su apoyo moral y logístico para que este trabajo llegara a buen puerto.

A las autoridades comunales y a la Agencia municipal de San Jerónimo Taviche que me permitieron trabajar en la población de Loma Colorada

A Carlos Pacheco Skidmore y Eduardo Muñoz Cano, quienes amablemente me ofrecieron toda su hospitalidad y me abrieron las puertas de Rancho Guegorene para poder estudiar los dióones de este hermoso sitio.

A Tim Gregory, cuyo apoyo económico permitió efectuar las salidas de campo para la realización de esta tesis, así como para presentar los resultados de la misma en el congreso internacional Cycad 2008.

A Dánae Cabrera (otra vez) por haberme instruido en TFPGA y GenAlex, paquetes de cómputo indispensables para analizar los resultados de estructura genética. A Paco Reyes por resolver miles de dudas y también por su instrucción en TFPGA y BOTTLENECK

A Irene Sánchez Gallen, nunca hay palabras que te resuman, simplemente gracias por ser tú y todo lo que significas para quienes te conocen.

A Marco Romero, gracias por su asesoría en los detalles de cómputo.

Finalmente, a Lilia Jiménez y María de Jesús Márquez que durante toda la maestría me atendieron amablemente. También a Yolanda Morales que en la parte final de esta tesis me guió con mucha paciencia para que pudiera realizar los trámites de titulación.

Índice

Capítulo 1. Introducción general	1
1.1 El fenómeno de la rareza y sus implicaciones para la conservación	1
1.2 El estudio de las cícadas en el contexto de la conservación	6
1.2.1 Ecología y conservación de las cícadas mexicanas	9
1.2.2 El género <i>Dioon</i> en México	11
1.3 Objetivos	13
1.3.1 Objetivo general	13
1.3.2 Objetivos particulares.....	13
Capítulo 2. Sitio y especie de estudio	15
2.1 El sitio de estudio	15
2.1.1 Ubicación geográfica	15
2.1.2 Geología, fisiografía e hidrología.....	15
2.1.3 Clima.....	16
2.1.4 Vegetación	17
2.2 La especie en estudio: <i>Dioon merolae</i>	17
Capítulo 3. Estructura poblacional y ecología de las etapas tempranas de desarrollo en <i>Dioon merolae</i>	20
3.1 Introducción	20
3.2 Métodos	25
3.2.1 Estructura poblacional.....	25
3.2.2 Experimento I (Ecología de semillas)	26
3.2.3 Experimento II (Supervivencia de plántulas).....	29
3.3 Resultados	30
3.3.1 Estructura poblacional.....	30
3.3.2 Ecología de semillas.....	31
3.3.3 Supervivencia de plántulas.....	34
3.4 Discusión.....	36

Capítulo 4. Estructura genética y análisis de autocorrelación espacial	41
4.1 Introducción	41
4.2 Métodos.....	43
4.2.1 Colecta de material y extracción de isoenzimas.....	43
4.2.2 Análisis de datos y evaluación de la variación genética inter e intrapoblacional	45
4.2.3 Análisis de poblaciones con cuello de botella.....	47
4.2.4 Análisis detallado de la población de Loma Colorada.....	48
4.3 Resultados	51
4.3.1 Frecuencias alélicas en cuatro poblaciones	51
4.3.2 variación genética inter e intra poblacional.....	53
4.3.3 Análisis de cuello de botella	57
4.3.4 Resultados detallados para la población de Loma Colorada.....	58
4.4 Discusión.....	63
Capítulo 5. Discusión general.....	72
5.1 Producción y remoción de semillas.....	73
5.2 Éxito del establecimiento de plántulas	76
5.3 Variación genética.....	77
5.4 Conclusiones	81
6. Literatura citada	82

Resumen

Dioon merolae es una planta dioica perteneciente a la familia Zamiaceae. Es endémica de México y se distribuye únicamente en los estados de Chiapas y Oaxaca, cubriendo un área de distribución potencial de 1,332 km². Se estima que el número total de individuos en todas sus poblaciones no supera los 5,000. Por esta razón la UICN la considera como una especie vulnerable. Sin embargo, se desconocen muchos aspectos de su ecología básica. En este estudio se evaluó la estructura demográfica y genética de cuatro poblaciones de esta cícada en la región de Los Valles Centrales del estado de Oaxaca, México. Asimismo, en una de las poblaciones se estimaron de manera detallada algunas medidas del éxito de las primeras etapas de desarrollo: la proporción de óvulos fecundados que se convierten en semillas (*seed set*), la proporción de semillas removidas por los dispersores/depredadores y la supervivencia de plántulas bajo condiciones contrastantes de intensidad lumínica y profundidad de suelo. Además, se evaluó la variación genética inter- e intra-poblacional y se llevó a cabo un análisis de autocorrelación espacial para medir el nivel de similitud genotípica de todos los individuos distribuidos en una hectárea.

En las cuatro poblaciones se observó que los adultos son la categoría mejor representada numéricamente, mientras que las plántulas y los juveniles son muy escasos. El “*seed set*” fue de 0.76 ± 0.08 . La supervivencia de plántulas fue de 35% al cabo de ocho meses y no difirió entre las diferentes condiciones de luz y profundidad de suelo utilizadas. La remoción de semillas fue de 10-20% al cabo de 5 días y el efecto de la interacción entre tiempo y densidad de semillas sobre esta variable fue significativa. La variabilidad genética fue alta: número de alelos por locus $A = 1.95 \pm 0.21$, porcentaje de loci polimórficos $P = 95.44 \pm 7.89$; y heterocigosis observada $H_O = 0.646 \pm 0.10$. Los estadísticos F de Wright revelaron un exceso de heterocigos tanto local como globalmente ($F_{IS} = -0.467$ y $F_{IT} = -0.302$). La diferenciación genética entre poblaciones no fue muy alta ($F_{ST} = 11.3\%$). Por último, en la población analizada en detalle se observó que los pares de individuos ubicados a intervalos de distancia de 10 m comparten más alelos de lo que se esperaría por azar, es decir, muestran una autocorrelación espacial, lo que sugiere que la dispersión de semillas se da a cortas distancias.

Los resultados anteriores se discuten en el contexto del papel que se cree que están jugando las etapas tempranas de desarrollo en la limitación del tamaño poblacional de esta cícada. Aparentemente ni la producción de semillas, ni la supervivencia de plántulas (al menos de las etapas evaluadas) constituyen una limitante para su crecimiento poblacional. Probablemente los días posteriores a la germinación de semillas en el campo resultan críticos. La alta variabilidad genética de sus poblaciones sugiere que éstas no presentan un problema de conservación en este sentido. Los principales factores de riesgo para esta cícada parecen ser su distribución geográfica restringida, el tamaño reducido de sus poblaciones, la destrucción del hábitat y la extracción y comercio ilegal.

Abstract

Dioon merolae is a dioecious plant endemic to Mexico. The geographic distribution of this species is restricted to the Mexican states of Chiapas and Oaxaca, with a potential distribution area of 1,332 km². The total number of individuals in its populations is estimated in less than 5,000. For this reason, the IUCN has classified it as a vulnerable species. However, many aspects of its basic ecology are unknown. In this study the demographic and genetic structure of four populations of *Dioon merolae* were evaluated in the Valles Centrales region, in Oaxaca, Mexico. The relative success of the early life-cycle stages was evaluated in detail in one of the populations: the proportion of fertilized ovules that produce seed (seed set), the proportion of seeds removed by dispersers/predators, and the survival probability of seedling under different conditions of light intensity and soil depth. Additionally, intra- and inter-population genetic variability was evaluated and a genetic autocorrelation analysis was performed to test the genetic similarity of individuals within a 1 ha plot.

In the four populations the adult size-class was found to be well represented, whereas seedlings and juveniles were scarce. Seed set was 0.76 ± 0.08 . Seedling survival was 35% after eight months and was not affected by either soil depth or light intensity. Seed removal reached 10-20% after only 5 days and the interaction between time and seed density had a significant effect on this variable. Genetic variability was high: number of alleles per locus $A = 1.95 \pm 0.21$, percentage of polymorphic loci $P = 95.44 \pm 7.89$; observed heterozygosity $H_O = 0.646 \pm 0.10$. The F statistics revealed a heterozygote excess both locally and globally ($F_{IS} = -0.467$ y $F_{IT} = -0.302$). Population differentiation was not too high ($F_{ST} = 11.3\%$). The autocorrelation analysis showed that pairs of individuals located at a distance of 10 m shared a higher number of alleles than those expected by chance alone, which indicates a positive autocorrelation at this spatial scale. This suggests that seeds are dispersed within short distances.

The results are discussed in the context of the role played by the early life-cycle stages in limiting population size in this cycad. Apparently, seed production and seedling survival (at least within the sizes range explored) do not limit population growth. However, the very early seedling stage is probably a critical one. The high genetic variability of its populations suggests that they are not at risk from the genetic point of view. Thus, the main vulnerability factors for this cycad are its limited geographic distribution range, the small size of its populations, habitat destruction and illegal trade.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 El fenómeno de la rareza y sus implicaciones para la conservación

La presión que las actividades humanas ejercen sobre el ambiente repercute en la disminución del hábitat disponible para muchas especies de plantas. Un estudio propone que cerca del 50% de las plantas vasculares del mundo podrían iniciar un proceso de extinción en los próximos 30 años (Ricketts *et al.* 2005). Bajo este panorama, uno de los principales retos de los biólogos de la conservación es realizar estudios que coadyuven a crear estrategias para la conservación de especies raras, amenazadas y en peligro de extinción y comprender los procesos demográficos, evolutivos y socioeconómicos responsables de que se encuentren en esa situación.

De manera general, se considera que las especies raras, o de tamaños poblacionales pequeños, son más vulnerables a los eventos estocásticos (ambientales, demográficos y genéticos) que las especies ampliamente distribuidas (Boyce 1992, Ellstrand y Elam 1993, Menges 2000). Teóricamente se ha probado que las especies con tamaños poblacionales pequeños, los cuales son característicos de las especies raras, son más proclives a extinguirse por motivos demográficos y más susceptibles a sufrir deriva génica y endogamia (Ellstrand y Elam 1993, Hamrick y Godt 1996, Oostermeijer *et al.* 2003, Esparza-Olguín 2004). (Schemske *et al.*, 1994). Sin embargo, establecer el grado de rareza de una especie no es un hecho trivial; uno de los trabajos más conocidos que aborda el nivel de rareza de especies de plantas es el de Rabinowitz (1981), en el cual se reconocen tres criterios para aquilatar el nivel de rareza de una especie, a saber: 1) área de distribución geográfica, 2) especificidad de hábitat y 3) tamaño local de la población. Rabinowitz (1981) propone que cada uno de estos atributos se puede evaluar de forma dicotómica, de

tal manera que se puede tener un área de distribución amplia o restringida, una especificidad de hábitat alta o baja y un tamaño poblacional grande o pequeño. De la combinación de cada par de extremos para los tres atributos se obtienen ocho categorías (Tabla 1), una de ellas que corresponde a las especies comunes y las otras siete a diferentes tipos y/o intensidades de rareza; las especies con un área geográfica restringida, una alta especificidad de hábitat y un tamaño poblacional pequeño son las más raras y, por ende, las más proclives a extinguirse.

Tabla 1. Tipificación de las especies raras de acuerdo con los criterios de Rabinowitz 1981.

ÁREA GEOGRÁFICA		Grande		Pequeña	
ESPECIFICIDAD DE HÁBITAT		Amplia	Reducida	Amplia	Reducida
TAMAÑO POBLACIONAL	Grande	ESPECIES COMUNES	Especies limitadas por su ocupación de hábitats muy específicos	Especies limitadas por su distribución geográfica	Especies limitadas por su distribución geográfica y su requerimiento de hábitats específicos
	Pequeño	Especies subdominantes, debido a sus tamaños poblacionales	Especies subdominantes debido a su especificidad de hábitat y a sus tamaños poblacionales	Especies subdominantes por su distribución geográfica y sus tamaños poblacionales	ESPECIES MUY RARAS

Bajo el esquema de clasificación propuesto por Rabinowitz (1981) existen algunos inconvenientes de interpretación, ya que una población puede ser escasa a escala local, pero abundante a escala regional (Gaston 1994). Por otra parte, la clasificación categórica de atributos puede crear confusión, ya que el umbral crítico entre abundante y escaso ó amplio y restringido puede ser ambiguo.

Por su parte, Gaston (1994) propone que, de manera general, el concepto de rareza está estrechamente relacionado con el de endemismo, ya que una especie endémica de un área particular tendrá una distribución más limitada que una especie no endémica.

Obviamente, pueden existir especies endémicas de regiones geográficas más o menos amplias, de tal manera que pueden concebirse como endémicas de amplia distribución, pero lo más habitual es que las especies endémicas presenten una distribución limitada y frecuentemente una alta especificidad de hábitat, por lo que este tipo de especies son las que nos pueden servir como referencia para comprender la noción de rareza.

La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN por sus siglas en inglés) no utiliza el concepto de rareza, pero sí considera la reducción del área geográfica de distribución y la reducción del tamaño poblacional de las especies como resultado de procesos de degradación o pérdida de hábitat, por ejemplo, y los utiliza como criterios importantes para definir categorías de amenaza (IUCN 2003). Además, otro criterio muy importante para identificar a las especies que formarán parte de las listas rojas de la IUCN es la posibilidad de determinar, mediante análisis cuantitativos, la probabilidad de extinción de sus poblaciones en periodos de tiempo definidos (por ejemplo, 100 años) (Mace y Lande 1991). Con base en estos criterios, la IUCN ha definido que las especies endémicas y de distribución limitada se pueden clasificar en diversas categorías, tres de las cuales (En Peligro Crítico, En peligro y Vulnerable) se reconocen como categorías con diferente grado de amenaza (IUCN 2003).

Es importante notar que ambas clasificaciones, tanto la de Rabinowitz (1981), como la de la IUCN (2003), le dan importancia a los criterios demográficos y de reducción del hábitat, pero ignoran los aspectos genéticos y su posible efecto sobre el nivel de riesgo de las poblaciones de especies endémicas. Muchos autores han destacado la importancia de conocer la estructura genética de las poblaciones de una especie endémica, para generar herramientas indispensables en el desarrollo de un plan de conservación adecuado y completo (Ellstrand y Elam 1993, Hamrick y Godt 1996, Oostermeijer *et al.*2003,

Frankham 2005). Una de las correlaciones encontradas a partir de los estudios de genética de poblaciones, es que las especies endémicas, con tamaños poblacionales pequeños presentan una menor diversidad genética que las especies ampliamente distribuidas, de tal manera que el porcentaje de loci polimórficos (P), el número efectivo de alelos por locus (A) y la heterocigocidad observada (H_o), alcanzan valores más altos en especies ampliamente distribuidas que en las de distribución restringida. (Hamrick y Godt 1996, Oostermeijer *et al.* 2003, Esparza-Olguín 2004). Asimismo, especies de vida larga, i.e. árboles, tiene mayor diversidad genética que especies con esperanza de vida más efímera, i. e. hierbas (Hamrick 2004)

Un aspecto de la genética poblacional que tiene relevancia en el contexto de la conservación, es que cuando se presentan tamaños poblacionales pequeños, las cruas entre parientes son más probables, lo que puede desembocar en una depresión por endogamia que se manifieste en problemas de supervivencia y fecundidad. Otro fenómeno que se presenta con frecuencia en poblaciones pequeñas y que puede derivar en problemas de conservación es la deriva génica, la cual involucra una fluctuación aleatoria de las frecuencias génicas, en unas cuantas generaciones, que puede llevar a una reducción de la variación genética al traducirse en la pérdida o la fijación de alelos (Lande 1988, Hedrick 2000, Oostermeijer *et al.* 2003).

No obstante que se han realizado muchos trabajos para justificar la importancia de los estudios genéticos en la conservación de especies endémicas, algunos autores proponen que la información demográfica es más importante y de mayor relevancia, a corto plazo, para determinar la viabilidad de las poblaciones y generar información útil para proponer programas de conservación (Lande 1988, Schemske *et al.* 1994). En gran parte, estos autores se basan en el argumento de que las poblaciones empiezan a disminuir por causas

demográficas y de deterioro del hábitat, antes de que los problemas genéticos lleguen a impactarlas. Sin embargo, otros autores argumentan que de no ser tomados en cuenta los factores genéticos, muchas especies amenazadas corren peligro de desaparecer (Hamrick y Godt 1996, Oostermeijer *et al.* 2003, Frankham 2005). Un ejemplo elocuente de lo anterior se puede percibir en especies con tamaños poblacionales muy grandes, sin problemas demográficos, pero con una variabilidad genética muy baja que las pone en riesgo de extinción, como es el caso de especies domésticas (Taberlet *et al.* 2008). Además, para el caso de plantas con ciclo de vida muy largo no siempre es posible obtener los datos demográficos necesarios para evaluar su estado de conservación en un corto plazo; mientras que los estudios de genética de poblaciones pueden hacer una evaluación rápida del estado de conservación genética de las diferentes etapas de desarrollo. Por otra parte, un estudio basado en un meta-análisis de especies amenazadas propone, incluso, que para la mayoría de los casos, es posible registrar una reducción de la diversidad genética antes de que los factores demográficos afecten a las poblaciones (Spielman *et al.* 2004).

Diversas especies de plantas han registrado una pérdida de la variación genética por deriva génica y endogamia (Oostermeijer *et al.* 2003). Asimismo, factores demográficos pueden tener una fuerte injerencia y afectan negativamente a otras tantas especies (Lande 1988, Schemske *et al.* 1994, Menges 2000). En este sentido, el debate no debería estar dirigido a ponderar qué factores son más importantes para la conservación, sino a considerar la posibilidad de complementar diferentes enfoques para proponer una estrategia de conservación más completa. El mismo Lande (1988), quien inició esta controversia hace dos décadas, propone que la biología de la conservación requiere de la interacción de los enfoques demográfico y genético para comprender mejor los factores que determinan la extinción de poblaciones pequeñas.

1.2 El estudio de las cícadas en el contexto de la conservación

Las cícadas son un grupo de plantas que se distribuyen en las zonas tropicales y subtropicales del planeta. El inventario más reciente de la cicadoflora mundial reconoce la existencia de 303 especies (Hill *et al.* 2007). De acuerdo a evaluaciones recientes, el 52% de estas especies están amenazadas, principalmente por la destrucción de sus hábitats naturales y por la extracción ilegal de individuos para ser vendidos como plantas de ornato, por lo que se han incluido en las listas rojas de la IUCN (Donaldson *et al.* 2003). Lo anterior implica que, de manera global, las cícadas se pueden considerar dentro de los grupos de plantas más amenazadas y, por ende, deben concebirse como altamente prioritarias para la conservación. De aquí se desprende que es fundamental realizar estudios que contribuyan a su conocimiento biológico, principalmente desde los puntos de vista demográfico y genético, como se enfatizó en la sección anterior.

Otro aspecto que subraya el interés biológico hacia el grupo de las cícadas, es que éstas tienen una historia evolutiva muy interesante, pues son consideradas como el grupo basal de todas las angiospermas. El registro fósil de especies de cícadas se remonta al carbonífero tardío, hace *ca.* 300 millones de años, muchos millones de años antes de la aparición de las plantas con flor. Durante la era mesozoica las cícadas fueron un componente dominante de la flora del planeta y han logrado subsistir hasta nuestros días (Norstog y Nicholls 1997).

En lo que atañe a los aspectos ecológicos de estas plantas, algunos de los temas de interés están relacionados con el hecho de que, en gran parte del mundo (p. e. México y Sudáfrica, China y Vietnam), muchas especies tienen una distribución restringida y el tamaño de sus poblaciones es reducido lo cual las incluye en la categoría de especies raras o endémicas que enfrentan graves problemas de conservación (Donaldson *et al.* 2003).

Además, se ha reportado que las interacciones que mantienen algunas cícadadas con sus herbívoros y polinizadores pueden ser sumamente específicas (Schneider *et al.* 2002). A continuación se detallan algunos de los aspectos ecológicos de algunas especies de cícadadas que se han estudiado en diversas partes el mundo y que son relevantes en el contexto de este trabajo.

a) Demografía

Las cícadadas son especies que presentan dificultades intrínsecas para su estudio desde el punto de vista demográfico, ya que es común que los individuos crezcan muy lentamente y no produzcan estructuras reproductivas cada año. Esto dificulta que se puedan obtener datos demográficos a partir de sus poblaciones en periodos de tiempo de corto y mediano plazo. Por tal motivo, son muy exiguas las investigaciones donde se aplican modelos matriciales de proyección poblacional para estimar sus principales parámetros demográficos y conocer las fases más vulnerables de su ciclo de vida (para excepciones, ver Negrón-Ortiz *et al.* 1996, Raimondo y Donaldson 2003). El estudio de Negrón-Ortiz *et al.* (1996) se realizó en Puerto Rico, por un periodo de dos años, con *Zamia amblyphyllidia*. Para ambos años se registró una tasa finita de incremento poblacional (λ) cercana a la unidad (para 1982-83, $\lambda = 0.96$; para 1983-84, $\lambda = 0.99$). Con respecto al estudio de Raimondo y Donaldson (2003), se contó con un periodo de registro de ocho años con el objeto de poder estimar los valores de las tasas vitales y construir las matrices de proyección poblacional; este estudio se realizó en Sudáfrica y consideró dos especies, *Encephalartos villosus* y *E. cycadifolius*, cuyas tasas de crecimiento poblacional (λ) fueron de 1.047 y 1.0005, respectivamente. Aunque en ninguno de estos dos estudios se reportan límites de confianza para λ , es evidente que las poblaciones de las tres especies se

encuentran muy cercanas al equilibrio numérico. La necesidad de datos de largo plazo que enfatizan Raimondo y Donaldson (2003) en su trabajo es un ejemplo elocuente del por qué son escasos los estudios de dinámica poblacional en cícadadas. Por tal motivo, la mayor parte de las investigaciones demográficas en cícadadas se han enfocado al registro de parámetros poblacionales más descriptivos y puntuales, tales como la estructura de tamaños, la proporción sexual y el recambio foliar (Clark y Clark 1987, 1988, Ornduff 1989, 1990, Negrón-Ortíz y Breckon 1989, Watkinson y Powell 1997).

Algunos estudios realizados con cícadadas han reportado que las primeras fases de desarrollo representan un filtro poblacional muy importante. Por ejemplo, para el caso de *Microcycas calacoma*, una especie endémica de Cuba, se realizó un monitoreo en tres localidades, en las que se encontraron 44 conos femeninos, pero solamente uno portaba semillas, cuyo porcentaje de germinación en el laboratorio fue del 40%. La baja producción de semillas parece estar relacionada con la escasez de su polinizador (las cícadadas son polinizadas por escarabajos, cuya presencia es indispensable para que se realice la polinización). Además, solamente en una de las tres localidades en las que se estudió *M. calacoma* se registró reclutamiento y éste fue muy escaso (i.e. dos plántulas) por lo que se puede intuir que la regeneración natural es muy baja (Vovides *et al.* 1997).

b) Genética de poblaciones

En contraste con los estudios demográficos, los estudios de genética de poblaciones de especies de cícadadas se encuentran en la bibliografía en mayor número, principalmente los dirigidos a conocer la estructura y la variación genética (en su mayoría por el método de electroforesis de isoenzimas). Los resultados de estos estudios permiten darnos una idea de la estructura y variación genética de muchas especies de este orden (Byrne y James 1991,

Walteres y Decker-Walters 1991, Yang y Meerow 1996, Sharma *et al.* 1998, Keppel *et al.* 2002, González-Astorga *et al.* 2005).

De manera general, se ha documentado que los niveles de heterocigosis para muchas cícadas son bajos, principalmente para las especies del género *Cycas*, el cual se considera como el linaje más ancestral entre las cícadas actuales (Yang y Meerow 1996, Chao-Luan *et al.* 1999, Lin *et al.* 2000, Keppel *et al.* 2002). Por otra parte, el porcentaje de loci polimórficos es muy variable: entre los valores bajos para esta variable está *Cycas taitungensis* ($P= 2.5$, Lin *et al.* 2000) y entre los altos está el de *Macrozamia riedlei* ($P= 93$, Byrne y James 1991). Asimismo, la diferencia genética entre poblaciones (F_{ST}) es muy variable, pues depende en gran medida de la distancia entre las poblaciones estudiadas (González-Astorga *et al.* 2003).

1.2.1 Ecología y conservación de las cícadas mexicanas

En el continente americano se reconocen cinco géneros de cícadas: *Ceratozamia*, *Chigua*, *Dioon*, *Microcycas* y *Zamia*, en los cuales se han descrito cerca de 89 especies. Del total de especies presentes en todo el continente, aproximadamente el 50% se encuentra en México (ca. de 45 especies en tres géneros: *Ceratozamia*, *Dioon* y *Zamia*); de éstas, cerca del 86% son endémicas, lo cual determina que México sea el segundo país con mayor diversidad y endemismo del orden cicadales en todo el mundo (el primero es Australia, Vovides 2000). Muchas de las especies de cícadas mexicanas tienen una distribución restringida, se componen de pocas poblaciones fragmentadas, sus tamaños poblacionales son pequeños y enfrentan graves riesgos de desaparecer (Stevenson *et al.* 2003, Vovides *et al.* 2003). Entre las principales amenazas que enfrentan estas especies podemos mencionar la destrucción de su hábitat por presiones agropecuarias y la extirpación de plantas de sus poblaciones

naturales, ya sea para ser comercializadas en la industria de la jardinería (i.e. “landscaping”) o para venderlas a coleccionistas privados. Las 12 especies de *Dioon* que se distribuyen en México están en la NOM-ECOL-059 que enlista a las especies vulnerables. Una de las especies que presenta los mayores niveles de riesgo es *Dioon caputoi*, que al igual que la mayoría de las especies de este género, se distribuye en bosques tropicales caducifolios, uno de los tipos de vegetación con mayores tasas de deforestación y cambio de uso de suelo en México (Challenger 1998, Trejo y Dirzo 2000). No obstante la relevancia de México a nivel mundial para la conservación de estas plantas, se conoce muy poco del estado actual de las poblaciones, y menos aún de sus patrones genéticos y demográficos.

a) Demografía

Los estudios de dinámica poblacional que evalúan la estructura poblacional y describen algunas variables de fecundidad para cícadas mexicanas son muy pocos (Vovides 1990, Pérez-Farrera y Vovides 2004, Flores-Vázquez *et al.* 2007). Los estudios demográficos que aplican modelos matriciales de proyección poblacional para estimar con mayor precisión los procesos demográficos, la tasa finita de incremento poblacional y las fases más sensibles del ciclo de vida, son aún más escasos (Aguirre-Fey 2004, Pérez-Farrera *et al.* 2006). En el estudio de Aguirre-Fey (2004), quien estudió a *Zamia loddigesii* en el estado de Veracruz, se registró un valor de λ de 0.78 ± 0.08 , lo que denota una población en franco decremento. Por su parte, Pérez-Farrera *et al.* (2006) estudiaron dos poblaciones de *Ceratozamia mirandae* en el estado de Chiapas; estos autores utilizaron tanto tablas de vida como matrices de transición como herramientas de análisis. Las matrices de transición

arrojaron valores de λ de 0.086 y 1.039 (aunque los resultados del análisis con tablas de vida dieron valores muy distintos).

b) Genética de poblaciones

Por otra parte, relativamente en pocas especies de cícadas mexicanas se han realizado investigaciones que exploren la estructura genética de las poblaciones (González-Astorga *et al.* 2003, 2005, 2006). Dos de los estudios de González-Astorga *et al.* se llevaron a cabo con especies del género *Dioon* y el tercero con *Zamia lodiggesii*. Ambas especies de *Dioon* (*D. edule* y *D. angustifolium*) exhibieron altos niveles de variación genética (para *D. edule*, $H_e=0.24$ y $P= 54.8$; para *D. angustifolium*, $H_e= 0.2185$ y $P= 52.4$) comparados con la media de otras especies endémicas $P=40.0$ $H_e= 0.096$ (Hamrick y Godt 1996) y con la media de especies perennes $P= 47.8$. $H_e= 0.144$ (Hamrick 2004). Aunque, el nivel de diferenciación entre poblaciones en ambas cícadas *D. edule* ($F_{ST} = 0.075$) y *D. angustifolium* ($F_{ST}= 0.167$) caen dentro del intervalo regular de especies endémicas y perennes de vida larga. Lo anterior ilustra que el conocimiento que se tiene sobre la estructura genética de especies mexicanas de cícadas es limitado y existe poca información disponible para hacer propuestas de conservación integrales de estas plantas tan importantes para México.

1.2.2 El género *Dioon* en México

Entre los géneros de cícadas presentes en México destaca el género *Dioon*, ya que con excepción de una especie que se ubica en Honduras, las otras 12 especies reconocidas hasta el momento son endémicas del país. No obstante que la distribución del género es relativamente amplia, distribuyéndose desde los 15° hasta los 29° de latitud N en el continente americano, la mayoría de las especies tienen un número reducido de

poblaciones, generalmente de tamaño pequeño y con un alto nivel de aislamiento geográfico (Sabato y De Luca 1985). Lo anterior determina que todas las especies estén incluidas en alguna de las categorías de riesgo que consideran las instituciones nacionales (NOM059, 2001) ó catalogadas con algún grado de amenaza por instancias internacionales (IUCN 2003).

Aunque se han realizado muchas investigaciones y de muy diversos temas biológicos (sistemática, morfología, filogenia, evolución) con especies del género *Dioon*, se conoce relativamente poco de las características demográficas y genéticas de las especies de este género. Como se mencionó en las secciones anteriores, tan sólo se ha realizado un estudio de dinámica poblacional con *Dioon edule* en Veracruz (Vovides 1990) y dos de genética de poblaciones con esta misma especie y con *D. angustifolium* (González-Astorga *et al.* 2003, 2005). Por otra parte, se sabe muy poco de los aspectos básicos de la ecología de las primeras etapas del ciclo de vida de este género. En el trabajo de Vovides (1990) se presenta poco detalle de estas etapas y sólo para una especie.

El conocimiento de los procesos que se llevan a cabo en las primera etapas de desarrollo de estas plantas, tales como la producción de semillas, su depredación y/o remoción, su germinación en condiciones naturales, y el establecimiento y supervivencia de las plántulas, pueden ser muy relevantes para la conservación, pues constituyen etapas de alto riesgo y de ellas depende el crecimiento de las poblaciones. En *Dioon caputoi*, una especie mexicana que tiene un área de distribución muy restringida (menos de 10 km²) y que se compone de cinco poblaciones, dos de las cuales presentan tamaños poblacionales muy reducidos (<50 individuos), la cantidad de conos con semillas y el número de semillas viables son altos, por lo que puede suponerse que estas fases no representan un problema para la persistencia de esta especie (Flores-Vázquez *et al.* 2007). Sin embargo, debido al

avanzado estado de deterioro del hábitat donde se encuentran sus poblaciones, es casi imposible que se establezcan las plántulas. Por lo tanto, sus poblaciones están formadas principalmente por individuos juveniles y adultos (Flores-Vázquez *et al.* 2007).

Las poblaciones compuestas principalmente por individuos adultos o de etapas avanzadas del ciclo de vida, como es el caso de las poblaciones de *D. caputoi*, pueden considerarse como poblaciones en declinación o en descenso. Esto quiere decir que pueden mantenerse en un aparente equilibrio demográfico gracias a la alta supervivencia de los adultos, pero la falta de reclutamiento llevaría a que disminuyeran rápidamente si algún evento catastrófico o de presión antropogénica (e.g. un cambio de uso del suelo o un evento de saqueo masivo) produjera una alta mortalidad de adultos (Menges 2000).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

En esta tesis se buscó evaluar el éxito de las primeras fases del ciclo de vida en una población de *Dioon merolae*, así como su diversidad genética inter- e intra-poblacional en la región de “Los Taviches” (San Jerónimo y San Pedro), Oaxaca, con el objeto de contribuir al conocimiento de su biología y para coadyuvar a su conservación.

1.3.2 Objetivos particulares

- a) Describir la estructura demográfica poblacional de cuatro poblaciones de *Dioon merolae* en la zona de estudio.
- b) Dar seguimiento a las fases tempranas de desarrollo de esta especie (i. e. producción de semillas, tasa de remoción de semillas por depredadores/dispersores y establecimiento de plántulas), evaluando el éxito relativo de cada una en diferentes microambientes.

c) Analizar la estructura genética y el grado de contacto entre cuatro poblaciones de *Dioon merolae* en la zona de estudio, utilizando la técnica de electroforesis de isoenzimas. d) Evaluar, en una de las cuatro poblaciones, si existe una estructura genética espacial a nivel local (o microespacial); en caso de que exista, determinar si es igual, aumenta o disminuye respecto a las diferentes etapas del ciclo de vida (plántulas, preadultos y adultos) para conocer el vecindario genético, inferir distancias de dispersión y evaluar las posibles presiones de selección natural en cada etapa.

CAPÍTULO 2

SITIO Y ESPECIE DE ESTUDIO

2.1 El sitio de estudio

2.1.1 Ubicación geográfica

El presente estudio se realizó en cuatro poblaciones de *Dioon merolae* ubicadas en los municipios de San Jerónimo Taviche y San Pedro Taviche, los cuales forman parte de la sub-provincia fisiográfica de los Valles Centrales del estado de Oaxaca. Dichos municipios abarcan la región comprendida entre las coordenadas 16° 56' y 16° 38' de latitud norte, y 96° 53' y 96° 32' de longitud oeste (Figura 1).

2.1.2 Geología, fisiografía e hidrología

La región sur de la sub-provincia fisiográfica Valles Centrales, que es en donde se sitúan los municipios de San Jerónimo Taviche y San Pedro Taviche, está formada por una planicie acumulativa de sedimentos continentales de edad reciente, constituidos por unidades carbonatadas, aluvión, gravas, arenas, limos y arcillas; además, en la parte meridional de la sub-provincia hay aflojamiento de rocas metamórficas (gneis) de edad precámbrica, así como de rocas calizas (Ortiz Pérez *et al.* 2004).

Una característica distintiva de la sub-provincia Valles Centrales es la existencia de una gran estructura circular, constituida por elementos anulares del relieve, en los que destaca el Cerro “El Labrador” con una altitud de 3,000 m (Ortiz Pérez *et al.* 2004); este cerro se encuentra al suroeste del sitio de estudio y es visible desde el lugar.

Las poblaciones de *Dioon merolae* que se estudiaron se ubican sobre las pendientes de diferentes cerros locales, al fondo de las cuales hay corrientes permanentes de agua que forman parte del sistema del río Santa María, que es el principal río de la región (Fig. 1).



Figura 1. Ubicación del sitio de estudio, municipios de San Jerónimo y San Pedro Taviche, Oaxaca y poblaciones de *Dioon merolae* estudiadas.

2.1.3 Clima

De acuerdo a los datos de la estación meteorológica de San Jerónimo Taviche (33 años de datos de precipitación y 29 años de datos de temperatura) el clima de la zona se puede clasificar como semicálido subhúmedo con régimen de lluvias de verano, (A) Cb (w₀) (w) (García 1988). El promedio de precipitación total anual es de 665.5 mm y la temperatura

promedio anual es de 18°C. El porcentaje de precipitación invernal es menor al 5% y se presenta una oscilación isotermal y una marcha anual de temperatura tipo Ganges. Además, hay presencia de canícula en verano (García, 1988).

2.1.4. Vegetación

El tipo de vegetación que presenta la zona de estudio, es el bosque tropical caducifolio (BTC), con algunos elementos escasos de encinares (que dominan en las partes más altas de los cerros). Los BTCs se caracterizan por que más del 75% de sus árboles dominantes pierden totalmente el follaje durante un periodo de 5 a 8 meses al año (Rzedowski, 1994). En este BTC, los árboles presentan una altura entre 4 y 8 m; donde los elementos dominantes pertenecen a las familias Leguminosae (*Acacia pennatula*, *Leucaena trichandra*, *Lysiloma acapulcense*, *L. microphyllum* y *Mimosa lacerata*), Burseraceae (*Bursera aloexylon*, *B. galeottiana*, *B. glabrifolia* y *B. sp.*) y Fagaceae (*Quercus glaucoides*). En el estrato arbustivo las especies dominantes pertenecen principalmente a las familias Leguminosae (*Acacia farnesiana*, *Mimosa albida*), Rubiaceae (*Bouvardia multiflora*, *B. ternifolia* y *B. xylosteoides*) y Euphorbiaceae (*Cnidioscolus sp.*). En el estrato herbáceo, la familia dominante es Asteraceae (*Dahlia coccinea*, *Sanvitalia procumbens* y *Sclerocarpus sp.*), Además, se presentan de manera característica algunas especies de cactáceas candelabroformes

2.2 La especie en estudio: *Dioon merolae*

Las plantas del género *Dioon* son arborescentes, presentando un tronco epigeo, robusto, de cilíndrico a columnar, que mide de 0.2 a 5 m de altura y de 25 a 45 cm de diámetro. El tronco rara vez se ramifica; presenta una corteza gris oscura, áspera, con cicatrices

persistentes que dejan las hojas y los catáfilos. En el estado adulto, las hojas miden de 8 a 30 cm de ancho, son pinnadas y se disponen en espiral, formando una corona cerrada. Los microestróbilos (conos masculinos) son cilíndricos a cónicos, verdoso-blanquecinos. Los megaestróbilos (conos femeninos) emergen en el centro de la corona foliar y son erectos, ovoides y más voluminosos que los estróbilos masculinos. Cada estróbilo está conformado por escamas. A las escamas del cono femenino se le denominan megasporófilos, mientras que las del cono masculino son los microsporófilos. Los microsporófilos producen el polen, que se forma dentro de cámaras polínicas llamadas microsporangios, los cuales se encuentran en el envés de cada microsporófilo (Vovides, 1999)

Las poblaciones de la especie de *Dioon* que se estudiaron en este trabajo se ubicaron en 2003. Por sus características particulares, originalmente se pensó que se trataba de una especie aún no descrita (Gregory, Chemnick y Salas-Morales, com. pers.). Si fuera el caso, aún no se cuenta con una descripción formal de la especie en la que se detallan sus características distintivas. No obstante, otros investigadores (Vovides y González-Astorga, com. pers.) han propuesto que podría tratarse de *Dioon merolae*, descrita por De Luca, Sabato y Vázquez-Torres en 1981, puesto que entre sus características morfológicas destaca que la inserción del foliolo en el raquis es de forma oblicua, carácter exclusivo de *Dioon merolae* dentro de este género. Además, las poblaciones de *Dioon* más cercanas geográficamente a nuestras poblaciones de estudio en los Taviches son las de *Dioon merolae* del sur de Oaxaca (*i.e.* Santiago Lachiguiri, Chemnick *et al.* 1997). Por lo anterior, hemos optado por referirnos a la especie en estudio como *Dioon merolae*.

Dioon merolae

Estas plantas presentan un **tronco** cilíndrico, erecto o inclinado de 3 m de alto o más, de 25 a 40 cm de diámetro. Catáfila densamente lanuda, cerca de 10 cm de largo. **Hojas** numerosas, planas, rígidas, coriáceas, ascendentes, en estado juvenil tomentosa, posteriormente glabra, de 100 cm o más larga. Raquis semiredondeado recto o irregularmente torcido; pecíolos semiteretes, de 7-10 cm de largo, la base de 2-3 cm de ancho. **Folíolos** 120 o más a cada lado, subopuestos, linearlanceolados, agudos con espina en la punta, los distales insertos de manera oblicua, excepto los proximales que se encuentran superpuestos, márgenes revolutos angostándose por encima de la base. Los primeros folíolos proximales de 1 cm de largo y 2 mm de ancho, márgenes enteros; los folíolos de la parte media de la hoja de 7-9 cm de largo, 10-12 mm de ancho; nervios cerca de 20, márgenes enteros o la parte superior dentados, con 1-2 espinas de 1 mm de largo; los folíolos distales decrecen en tamaño hasta 1.5-2 cm de largo y 3 mm de ancho, los márgenes inferiores enteros o dentados, con 1 o raramente 2 espinas, los márgenes superiores dentados con 1-4 espinas de 1 mm de largo. **Estróbilo femenino** ovoideo, 45 por 25 cm ápice agudo, escamas lanceoladas de 10-12 por 4-5 cm, el exterior densamente lanoso, semillas ovoideas, 3 cm de diámetro. **Estróbilo masculino** cilíndrico elongado, 30-40 × 8-10 cm; microesporófilo con las bases angostas, 2.5 cm de largo; la parte fértil bilobada, la parte superior estéril erecta. (De Luca *et al.* 1981).

CAPÍTULO 3

ESTRUCTURA POBLACIONAL Y ECOLOGÍA DE LAS ETAPAS TEMPRANAS DE DESARROLLO EN *Dioon merolae*

3.1 Introducción

La manera en que están representadas las diferentes etapas de desarrollo (plántulas, brinzales, juveniles y adultos) en las poblaciones de una especie vegetal constituye lo que se conoce como estructura poblacional. De manera general, los ecólogos que han realizado este tipo de análisis han descrito tres tipos de estructuras poblacionales:

- 1) Tipo I, conformada por muchos individuos en las primeras etapas de desarrollo y la frecuencia de individuos va disminuyendo paulatinamente hacia las etapas adultas. Una estructura de este tipo denota un buen potencial regenerativo de la población. En bosques tropicales húmedos, este tipo de estructura se ha registrado en especies arbóreas con una amplia efectividad de reclutamiento en todo el mosaico regenerativo (claros y dosel cerrado) como *Pseudolmedia oxyphyllaria* (Martínez-Ramos y Álvarez-Buylla 1995) y *Brosimum alicastrum* (Peters 1994).
- 2) Tipo II, constituida por una mayor frecuencia de individuos en las categorías tempranas y tardías, y una menor frecuencia de individuos de etapas intermedias. Este tipo de estructura es frecuente en especies secundarias tardías que dependen de aperturas de claros en el dosel para el establecimiento de sus plántulas, tal es el caso de *Cecropia obtusifolia*, (Martínez-Ramos y Álvarez-Buylla, 1995). Este tipo de estructura, también puede reflejar a una población cuya regeneración ha sido parcialmente interrumpida por un exceso en la cosecha de frutos y semillas (Peters 1994).

3) Tipo III, en el que la frecuencia de individuos en las primeras etapas (i.e. plántulas y juveniles) es muy escasa y las etapas más tardías están mejor representadas, lo cual puede reflejar que las primeras etapas de desarrollo, por algún motivo, presentan dificultades para su establecimiento (Bongers *et al.* 1988, Peters 1994, Martínez-Ramos y Álvarez-Buylla 1995). Una estructura de este tipo puede ocurrir de manera natural o por extracción selectiva de individuos jóvenes. Si este tipo de estructura se mantiene por un periodo muy prolongado de tiempo puede conducir eventualmente a la extinción de una población (Peters 1994).

El análisis de la estructura poblacional en especies vegetales de vida larga es importante ya que constituye una primera aproximación para inferir aspectos relacionados con la dinámica de regeneración de las poblaciones, la cual está íntimamente relacionada con la efectividad de reclutamiento de nuevos individuos (Bongers *et al.* 1988, Peters 1994, Martínez-Ramos y Álvarez-Buylla 1995). Asimismo, en algunos casos particulares, mediante este tipo de análisis es posible colegir aspectos relacionados con la sobreexplotación de algunas especies (Peters 1994).

En bosques tropicales húmedos muchas especies de árboles dependen de la dinámica de apertura de claros para su regeneración; por ejemplo, una especie pionera puede cambiar de una estructura tipo I en sitios recientemente perturbados, a una tipo III en sitios sucesionales con dosel cerrado (Peters 1994, Martínez-Ramos y Álvarez-Buylla 1995). Sin embargo, en otras especies de plantas, con ciclos de vida muy longevos y condiciones ambientales más homogéneas, la estructura poblacional puede ser más persistente y, por lo tanto, un indicador más fidedigno de cómo se ha realizado históricamente la regeneración de una población.

Considerando que la mayoría de las cícadas no están sometidas a la dinámica de claros y considerando, además, que la mayoría presentan ciclos de vida muy extensos, donde la permanencia en una categoría de tamaño puede durar muchos años; podemos suponer que la estructura poblacional en una población es un fiel indicador del potencial regenerativo y que dicha estructura se ha mantenido sin grandes cambios por un periodo de tiempo muy prolongado.

La mayoría de los estudios de dinámica poblacional que se han efectuado con especies de cícadas reportan estructuras poblacional de tipo I (Ornduff 1989, Vovides 1990, Watkinson y Powell 1997, Pérez-Farrera y Vovides 2000, Aguirre-Fey 2004, Pérez-Farrera *et al.* 2006, Flores-Vázquez *et al.* 2007). Sin embargo, en algunos de estos casos se definieron las etapas de desarrollo basándose en la longitud del tronco o el diámetro del tallo, por lo que la representatividad de la etapa de plántulas (que aun no tienen tronco) no queda clara. En estos casos, la omisión de la etapa de plántulas puede conducir a interpretaciones erróneas las cuales pueden considerar que hay buena regeneración de las poblaciones, cuando en realidad la ausencia de plántulas determina que la estructura sea tipo III, el reclutamiento muy escaso y que las poblaciones sean muy vulnerables a la extracción de adultos.

Otros pocos estudios en cícadas, los cuales consideraron explícitamente la fase de plántulas, han reportado una estructura poblacional tipo III (Negrón-Ortiz *et al.* 1996, Raimondo y Donaldson 2003), en estos dos estudios se ha concluido que existen fuertes limitantes para el establecimiento de plántulas y la regeneración de las poblaciones.

Lo anterior ilustra como el estudio detallado de las primeras etapas de desarrollo, *i. e.* plántulas, puede ser relevante en la obtención de una estructura poblacional más apegada a la realidad y en la interpretación adecuada del potencial regenerativo de las poblaciones.

Las primeras etapas de desarrollo (semillas y plántulas) suelen pasar por una serie de filtros que tienen consecuencias directas en el potencial regenerativo de las poblaciones. Una de las posibles fuerzas que puede afectar el crecimiento de las poblaciones de plantas es la limitación por semillas (“seed limitation”), la cual se puede manifestar mediante una limitante en la producción y/o dispersión de semillas (Nathan y Muller-Landau 2000, Turnebull *et al.* 2000. Muller-Landau 2002). Otra fuerza que puede intervenir es la limitación de establecimiento (“establishment limitation”), este fenómeno se presenta cuando las semillas no llegan a los sitios adecuados para germinar y las plántulas no se pueden establecer (Nathan y Muller-Landau 2000, Turnebull *et al.* 2000. Muller-Landau *et al.* 2002).

La producción de semillas en cícadras está fuertemente influenciada por el desempeño de polinizadores especializados de la familia curculionidae. En experimentos de exclusión, en los cuales se evitó la llegada de los escarabajos a los conos femeninos, se ha reportado una disminución considerable en la producción, estimada como la proporción óvulos que produjeron semillas “seed set” (Norstog *et al.* 1986, Terry 2001, Kono y Tobe 2007). En poblaciones naturales de *Microcycas calacoma*, una cícada endémica de Cuba, se reportó que de 44 conos femeninos solamente uno produjo semillas de las cuales el 40% germinaron en el laboratorio; el “sed set” extremadamente bajo de esta especie se atribuyó a la escasez de polinizadores (Vovides *et al.* 1997). Esto pone de manifiesto que bajo condiciones naturales, algunas especies de cícadras pueden estar padeciendo limitación por polen, lo cual repercute directamente en una baja producción de semillas.

Específicamente en el caso de las cícadras, se ha realizado muy pocos estudios acerca del papel que juega la producción y dispersión de semillas, así como el establecimiento de plántulas en la dinámica regenerativa de las poblaciones. Muchos

estudios han confirmado la remoción de semillas por mamíferos (Eckenwalder 1980, Burbidge y Whelan 1982, Bellardie y Whelan 1986, Tang 1989, Negrón-Ortiz y Breckon 1989b). Sin embargo, sólo en tres estudios se ha registrado directamente la remoción de semillas y la distancia de dispersión (Burbidge y Whelan 1982, Bellardie y Whelan 1986, Tang 1989).

En lo que atañe al establecimiento de plántulas, se ha visto que la profundidad del suelo y la intensidad lumínica son algunos de los principales factores que afectan el establecimiento de plántulas de muchas especies de plantas (Schupp 1995). Para el caso particular de las cícadas, se ha documentado que la intensidad lumínica es un factor importante para el establecimiento de plántulas (Burbrigde y Whelan 1986, Tang 1989).

En recorridos de campo se observó una gran acumulación de semillas en pequeñas cuevas, además, en una alta proporción de estas semillas había rastros de incisivos por lo que se planteó la hipótesis de la intervención de un roedor en la remoción de las mismas. Por otra parte, también se observó que las plántulas estaban muy escasamente representadas y se ubicaban a una distancia considerable de plantas adultas femeninas, por lo que la se contempló la hipótesis de que la mayoría de las semillas eran removidas a sitios inadecuados para el establecimiento. A continuación, se reportan los resultados de experimentos de dispersión de semillas y establecimiento de plántulas de *Dioon merolae* que llevados a cabo con el objeto de comprender en mayor detalle la importancia de estas fases tempranas de desarrollo en su dinámica poblacional.

3.2 Métodos

3.2.1 Estructura poblacional

Este estudio se llevó a cabo en cuatro poblaciones de *Dioon meroalae* en la zona de Los Taviches, en la región de Los Valles Centrales de Oaxaca. Para dos de las poblaciones con mayor número de plantas, El Ciruelo y Loma Colorada, se delimitó un área de 1 ha, la cual se subdividió en 25 cuadros de 20 × 20m, en cada cuadro se etiquetaron y se midieron todos los individuos de *D. meroalae* encontrados, tomando sus coordenadas de ubicación dentro de la hectárea. A partir de esto se realizó un mapa en el que se ubicó a cada uno de los individuos. Para las poblaciones de San Antonio y San Antoñito, debido a que presentan menores densidades que las dos antes referidas y a que se encuentran en pendientes pronunciadas, no se delimitó un área particular para llevar a cabo el muestreo; solamente se etiquetaron y midieron todos los individuos que se observaron.

Para cada uno de los individuos se registraron las siguientes variables:

- 1) Longitud del tronco (para los individuos que presentaron tronco)
- 2) Diámetro del tronco (idem)
- 3) Número de hojas
- 4) Longitud de la hoja más grande
- 5) Número de conos (para los individuos que los presentaron)
- 6) Sexo

A partir de las medidas de tamaño y de características morfológicas tales como: tronco desarrollado, presencia de conos, número y tamaño de las hojas, se reconocieron cuatro categorías de estado: 1) plántulas, 2) juveniles, 3) preadultos y 4) adultos (Tabla 3.1) y se describió la estructura poblacional en términos de la abundancia relativa de estas categorías.

Tabla 3.1 Definición de las categorías de estado utilizadas para describir la estructura poblacional de las cuatro poblaciones de *Dioon merolae* estudiadas.

Categoría	Características
Plántulas	Recién germinadas, hasta dos hojas < de 30 cm de largo
Juveniles	Más de dos hojas > de 30 cm, sin tronco, no reproductiva
Preadultos	Con tronco desarrollado, no mayor de 15 cm de diámetro, sin estructuras reproductivas
Adultos	Con tronco desarrollado, mayor de 15 cm de diámetro, con potencial reproductivo

3.2.2 Experimento I (Ecología de semillas)

Este experimento fue diseñado para estimar la eficiencia del polinizador mediante el número promedio de óvulos fecundados y para determinar si la dispersión secundaria de semillas juega un papel importante en la remoción de semillas lejos de la planta madre. Ambos factores son importantes para determinar si en una población de *D. merolae* se presenta el fenómeno de limitación por semillas.

Se cosecharon ocho conos femeninos maduros; cada uno de los cuales se abrió y se contó el número total de semillas por cono que incluyó viables, inviables y abortivas. Las semillas inviables se distinguieron de las viables a partir del método de flotación; las abortivas eran semillas muy pequeñas, que no alcanzaron a desarrollarse. Con estos datos se calcularon la media y la desviación estándar del número total de semillas por cono y el “seed set” expresado como la proporción de semillas viables entre el número total de óvulos por cono.

De las semillas obtenidas de estos ocho conos, se tomaron 250 que se pusieron a germinar en condiciones controladas para evaluar el tiempo, la velocidad y porcentaje de germinación. Este trabajo está siendo analizado y será reportado por el Pas. de Biol. José Luis Lucas. Las demás semillas (n=720) se utilizaron para montar un experimento de remoción de semillas cuyo objetivo fue evaluar el efecto de la distancia, la orientación y la densidad de semillas en el suelo, con respecto al individuo parental, sobre la probabilidad de que una semilla sea removida por dispersores/depredadores potenciales.

El 11 de octubre de 2005 en la población de Loma Colorada, se localizaron ocho individuos femeninos focales; se asignaron cuatro de estos individuos al tratamiento de baja densidad (n= 5 semillas); y los otros cuatro al de alta densidad (n=20 semillas). Se depositaron los grupos de semillas alrededor de cada planta focal a tres distancias: 1 m, 5 m y 10 m; y en cuatro direcciones diferentes: norte, sur, este y oeste. De esta manera, cada planta focal tenía a su alrededor 12 grupos de semillas (*i. e.* a tres distancias y en cuatro direcciones para cada distancia) depositadas a la densidad asignada (alta o baja) (Fig. 3.1).

Baja densidad
(5 semillas)

Alta densidad
(20 semillas)

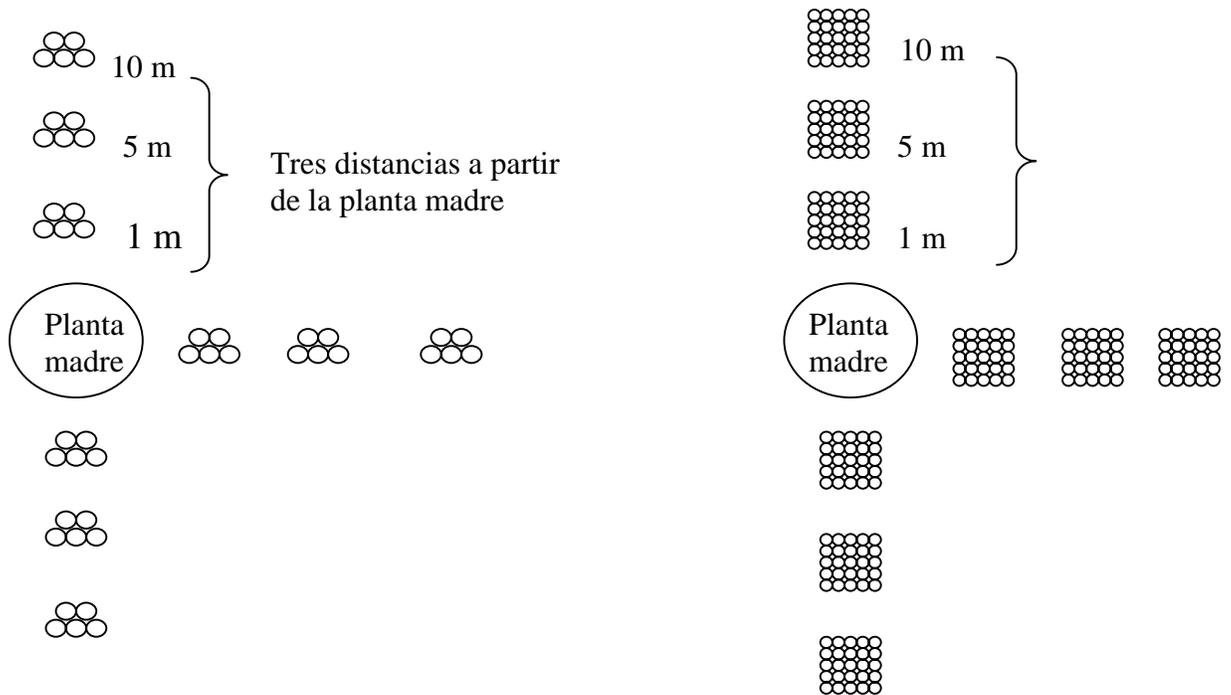


Figura 3.1. Esquema del diseño experimental para la remoción de semillas.

Estas ocho plantas focales se visitaron diariamente por cinco días después de haber colocado las semillas, para cuantificar el número de semillas removidas, y con ello, la probabilidad de remoción (número de semillas removidas / número total de semillas sembradas). Las probabilidades de remoción se transformaron a arcoseno antes de someterlas a un ANOVA anidado de medidas repetidas. Los factores cuyo efecto se evaluó fueron *densidad* de semillas (con dos niveles, alta y baja), *distancia* al individuo focal (con tres niveles, 1, 5 y 10 m; anidado en el factor *orientación*), y *orientación* (con cuatro niveles, N, S, E y O; anidado en el factor *densidad*), además del número de días que las semillas estuvieron expuestas a los dispersores (efecto que se evaluó a través del diseño de medidas repetidas).

Por último, se colocó un carrete de hilo a 10 semillas con el objeto de identificar a dónde estaban siendo dispersadas al ser removidas

3.2.3 Experimento II (Supervivencia de plántulas)

Para evaluar si la heterogeneidad espacial en la disponibilidad de luz y profundidad del suelo pueden afectar el establecimiento de plántulas de *Dioon merolae* se realizó un experimento estimando la supervivencia de plántulas bajo diferentes condiciones ambientales.

Este experimento se llevó a cabo en la población de Loma Colorada. Se obtuvieron 80 plántulas a partir de las semillas germinadas en vivero por J. L. Lucas; los micrositios en los que se introdujeron las plántulas variaron con respecto a dos factores ambientales: radiación lumínica (con dos niveles: soleado y sombreado; en promedio $2458.75 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ para sitios soleados y $219.54 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ para sitios sombreados) y profundidad de suelo (con dos niveles: superficial y profundo; 15 cm de profundidad para suelos superficiales y 22.3

para suelos profundos). La combinación de estos factores dio lugar a cuatro tratamientos: 1) micrositio soleado y con suelo profundo, 2) sombreado y con suelo profundo, 3) soleado y con suelo superficial y 4) sombreado y con suelo superficial. Cada unidad muestral constó de cinco plántulas y se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento. Las plántulas se introdujeron al campo el 31 de agosto del 2006, cuando se les midió su tamaño (tamaño inicial, dado en términos de la altura de la hoja). A partir de esa fecha, se registró la supervivencia de las plántulas en cada uno de los tratamientos cada 15 días durante ocho meses. Al final de este periodo (11 de abril de 2007) se volvió a medir el tamaño de las plántulas sobrevivientes. Con estos datos se construyeron curvas de supervivencia y se obtuvo la supervivencia final promedio por tratamiento. Las curvas de supervivencia de cada tratamiento se contrastaron de manera pareada a través de una prueba no paramétrica de Peto y Peto, esta prueba compara la distribución de las curvas a lo largo del tiempo utilizando un estadístico de χ^2 (Pyke y Thompson 1986). Por otra parte, se utilizó un ANOVA de dos vías para evaluar el efecto de los dos factores experimentales (radiación y profundidad de suelo) sobre la proporción de plántulas supervivientes al final del experimento (transformada a arcoseno).

3.3 Resultados

3.3.1 Estructura poblacional

La estructura poblacional de las cuatro poblaciones fue similar y estuvo caracterizada por una alta representación de los individuos adultos, seguidos por los preadultos (Fig. 3.2). Por otro lado, los juveniles y las plántulas fueron escasos. En la población de Loma Colorada destaca la escasez de juveniles ($n=6$), mientras que para las poblaciones de San Antonio,

San Antoñito y El Ciruelo, la menor abundancia correspondió a la categorías de plántulas (Fig. 3.2).

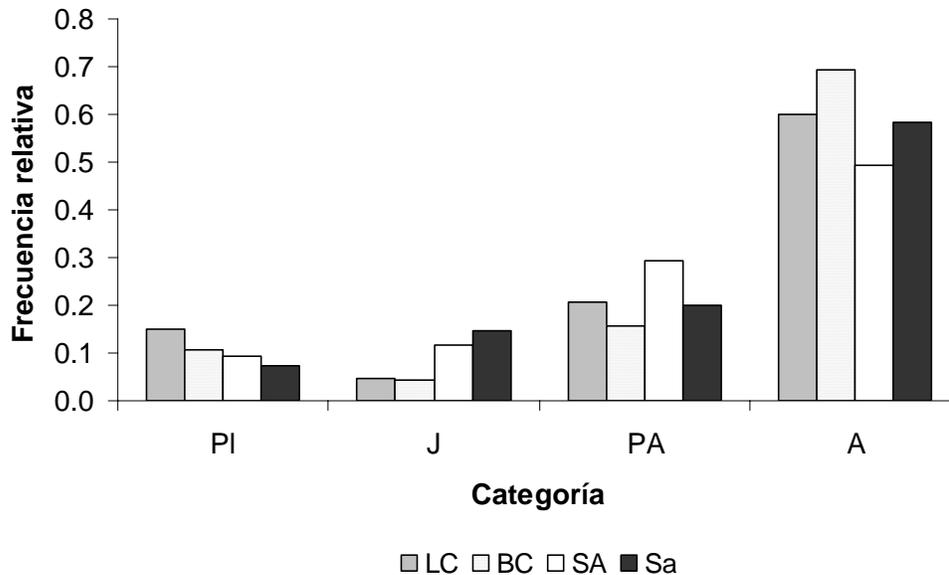


Figura 3.2. Estructura poblacional de cuatro poblaciones de *Dioon merolae* en términos del porcentaje de individuos en cada categoría. Las poblaciones son: **LC**= Loma Colorada, **BC**=Barranca el Ciruelo, **SA**=San Antonio y **Sa**= San Antoñito, en la región de los Taviches, Oaxaca. Las categorías corresponden a las definidas en la Tabla 3.1. El número total de individuos muestreados fueron 195 en LC, 140 en BC, 85 en SA y 55 en Sa.

3.3.2 Ecología de semillas

Producción de semillas y “seed set”

En la población de Loma Colorada se colectaron ocho de los diez conos femeninos disponibles, de los cuales se obtuvo el número promedio de semillas por cono (199.29 ± 49.76). La proporción de semillas abortivas para cada cono cosechado varió entre el 13 y el 43%; la proporción de semillas inviables fue extremadamente baja y para tres de los conos completamente ausente. Por otra parte, el promedio de la proporción de semillas viables

con respecto al número total de las semillas producidas (“seed set”) fue del 77% (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Promedio y desviación estándar del número de semillas fértiles, semillas abortivas, semillas infértiles y “seed set”, obtenidos a partir de ocho conos femeninos de *D. merolae* cosechados en octubre de 2005 en la población de Loma Colorada.

Individuo	No. de semillas fértiles	Semillas Abortivas / Porcentaje	Semillas infértiles	No. total de semillas	"Seed set"
62	197	28 / 14%	0	223	0.883
35	129	48 / 37%	3	180	0.717
77	248	55 / 22%	0	301	0.824
104	126	49 / 38%	2	177	0.712
20	152	23 / 15%	2	177	0.859
75	123	22 / 18%	5	150	0.820
34	130	57 / 43%	0	187	0.695
Promedio	157.57			199.29	0.767
Desv. Est.	465.86			49.76	0.08

Remoción de semillas

En general, el porcentaje de semillas removidas en el tratamiento de alta densidad fue mayor que en el de baja densidad. Esto se observó a partir del segundo día de registro de datos (Tabla 3.3) y se fue acentuando al pasar el tiempo. El cabo de cinco días, en el tratamiento de alta densidad se registró una remoción de 20.4%, mientras que el porcentaje de semillas removidas en el tratamiento de baja densidad fue del 10.6% (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Porcentaje acumulado de semillas de *Dioon merolae* removidas en los experimentos de remoción en la población de Loma Colorada (del 30 de agosto al 3 de septiembre de 2005).

Tratamiento (densidad)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Alta	0.3	4.9	12.2	16.8	20.4
Baja	1.0	1.0	9.4	10.0	10.6

El ANOVA que se hizo para evaluar el efecto de los factores experimentales sobre el porcentaje de remoción de semillas mostró que ninguno de ellos (densidad, y orientación y distancia con respecto a la planta focal) tuvo efectos significativos sobre la variable de respuesta (proporción de semillas removidas al final del experimento) (Tabla 3.4). Sin embargo el número de días que las semillas estuvieron expuestas a los dispersores sí tuvo un efecto significativo ($P>0.0001$): al avanzar el tiempo, la proporción de semillas removidas fue aumentando (Tablas 3.3 y 3.4). Asimismo, la interacción entre la densidad de siembra y el día de registro fue marginalmente significativa ($P>0.068$, Tabla 3.4), lo cual significa que hubo una tendencia a que la proporción de semillas removidas a lo largo del tiempo, dependiera, a su vez, de la densidad: las semillas sembradas a mayor densidad mostraron una mayor probabilidad de ser removidas al pasar el tiempo (Tabla 3.3).

Tabla 3.4. Resultados del análisis de varianza anidado y de medidas repetidas para evaluar el efecto de los factores experimentales sobre la proporción de semillas removidas. Los factores están referidos como: Or = orientación, Dens = densidad de siembra, Dist = distancia a la planta focal y Día= día de registro (se tuvo un total de cinco días de observación). El factor distancia estuvo anidado en el factor orientación, y este último a su vez, anidado en el factor densidad. Como producto del anidamiento, hubo interacciones que no se pudieron evaluar.

	SC Efecto	gl Efecto	CM Efecto	gl Error	CM Error	F	P
Orientación	2.424	6	0.404	48	0.402	1.011	0.432
Densidad	1.114	1	1.114	48	0.402	2.772	0.102
Distancia	1.376	8	0.172	48	0.402	0.427	0.899
Día	4.06	4	1.015	192	0.054	18.92	0.000
Dens × Dist	0.976	8	0.122	48	0.402	0.303	0.961
Or × Día	1.8	24	0.075	192	0.054	1.402	0.109
Dens × Día	0.476	4	0.119	192	0.054	2.215	0.068
Dist × Día	0.608	32	0.019	192	0.054	0.369	0.999
Dens × Dist × Día	0.928	32	0.029	192	0.054	0.552	0.976

3.3.3 Supervivencia de plántulas

La supervivencia global de las plántulas fue de 37.5%, en promedio, al cabo de 8 meses de registro. Este porcentaje de supervivencia casi no varió entre tratamientos (35% para los tratamientos de sombreado con suelo profundo y soleado con suelo superficial; y 40% para los tratamientos de soleado con suelo profundo y sombreado con suelo superficial). El ANOVA no detectó efectos significativos de ninguno de los factores experimentales (profundidad de suelo y radiación solar) sobre esta variable, ni tampoco de la interacción entre ambos (Tabla 3.5).

Tabla 3.5 Resultados del ANOVA de dos vías para evaluar el efecto de la profundidad de suelo y la radiación solar sobre la proporción de plántulas sobrevivientes al final del experimento.

	SC	g.l.	CM	<i>F</i>	<i>P</i>
Suelo	0.003	1, 12	0.003	0.033	0.858
Radiación	0.005	1, 12	0.005	0.054	0.820
Suelo × Radiación	0.005	1, 12	0.005	0.054	0.820

Las curvas de supervivencia de los cuatro tratamientos mostraron un comportamiento muy similar (Fig. 3.3). Se puede apreciar que para los tratamientos sombreado con suelo profundo, soleado con suelo profundo y sombreado con suelo superficial la mortalidad en los primeros tres meses fue muy baja, mientras que para el tratamiento soleado con suelo superficial la mortalidad durante los primeros tres meses fue ligeramente mayor (Fig. 3.3). Esto determinó que la curva de supervivencia de este tratamiento difiriera significativamente de todas las demás. Es importante notar que esta diferencia fue más marcada con respecto a los tratamientos que involucraron sombra, independientemente de la profundidad del suelo (según el nivel de significancia que arrojó el análisis) (Tabla 3.6).

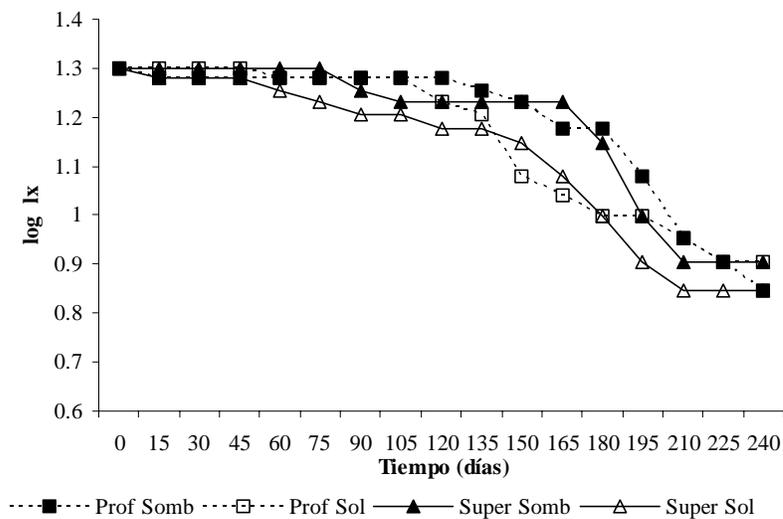


Figura 3.3 Curvas de supervivencia de las plántulas de *D. merolae* sembradas en Loma Colorada en cuatro tratamientos, logrados por la combinación de dos profundidades de suelo y dos niveles de radiación lumínica. El día 0 corresponde al 31 de agosto de 2006 y el día 240 es el 11 de abril de 2007.

Tabla 3.6 Valores de χ^2 obtenidos a partir de la comparación pareada de las curvas de supervivencia de plántulas de *D. merolae* usando el método de Peto y Peto (1986). Niveles de significancia: n.s. = no significativo ($p > 0.05$), * = significativo con $p < 0.05$, ** = significativo con $p < 0.01$.

	Suelo Profundo con sombra	Suelo Profundo soleado	Suelo Superficial con sombra	Suelo Superficial soleado
Suelo Profundo con sombra				
Suelo Profundo soleado	3.70 n.s.			
Suelo Superficial con sombra	0.10 n.s.	2.57 n.s.		
Suelo Superficial soleado	15.32 **	3.97 *	13.02 **	

3.4 Discusión

La estructura poblacional de las cuatro poblaciones estudiadas de *D. merolae* fue de tipo III, caracterizada por una escasez de las etapas tempranas de desarrollo. En primera instancia, esto sugiere que la regeneración puede ser una etapa crítica para la persistencia de las poblaciones; si este fuera el caso, el bajo éxito de la regeneración poblacional podría convertirse en un factor de riesgo para las poblaciones, ya que éstas serían altamente vulnerables a eventos de saqueo de adultos ó alteraciones del hábitat por actividades humanas (ganadería, cultivo, saqueo, etc.). Sin embargo, aunque en otras cícadas esta presión es muy intensa, en las poblaciones estudiadas no se encontraron evidencias de alteraciones de esa naturaleza; si acaso, se observaron adultos a los cuales se les habían removido las hojas (que se utilizan para hacer adornos en las fiestas de Semana Santa). Aunque en principio la remoción de hojas no parece causar daños irreversibles a los adultos de *D. merolae* en esta localidad, sería importante evaluar el efecto de esta actividad extractiva sobre la reproducción, crecimiento y supervivencia de los individuos.

De entre los procesos involucrados en la regeneración de una población, podemos contar los siguientes: la cantidad y calidad de las semillas, su dispersión, su germinación y la supervivencia de las plántulas. A partir de los resultados de este trabajo, podemos suponer que el primer proceso, relacionado con la formación de las semillas, no parece representar una limitante para la persistencia de la población: la producción de conos por parte de las hembras, así como su polinización y proceso de maduración fue relativamente exitoso (con un “seed set” = 77%). En lo que respecta a la dispersión de las semillas, los resultados confirmaron que hay dispersión (ca. 15% de las semillas fueron removidas en 5 días). Sin embargo, el destino de estas semillas removidas es un tanto incierto: nuestras observaciones sugieren que los roedores simplemente las apilan en sus madrigueras una vez

que han consumido la sarcotesta. A pesar de que dichas semillas tendrían la potencialidad de germinar, pues el embrión no ha sido dañado por la actividad del roedor, la mayoría no lo hace debido a que los micrositios (madrigueras y pequeñas cuevas, ambas con escasez de luz) en los que son depositadas no son favorables para la germinación. Es decir, parece existir una limitación en el acceso a los sitios seguros (*sensu* Harper 1977) para la germinación y el establecimiento. Una vez germinadas, la probabilidad de supervivencia de las plántulas es relativamente alta (*ca.* 37% al cabo de 8 meses), aunque una fuente importante de mortalidad en esta fase es el pisoteo por ganado caprino y vacuno, que es común en la zona de estudio.

En contraste con los resultados obtenidos en este estudio, en otros trabajos realizados con cícadadas se han reportado estructuras poblacionales de tipo I, con una alta abundancia relativa de las primeras etapas de desarrollo (Vovides 1990, Pérez-Farrera y Vovides 2004, Flores-Vázquez *et al.* 2007, Pérez-Farrera *et al.* 2006). Sin embargo, cabe destacar que en estos estudios se consideraron la altura y el diámetro del tronco para categorizar a los individuos, lo que implica que la fase de plántulas quedó incluida en la misma categoría junto con individuos ya establecidos, lo que impide sacar conclusiones reales con respecto al estado de la regeneración de estas poblaciones, pues no queda claro cómo es la abundancia de plántulas en comparación con otras etapas. Quizá por esta razón pocos estudios con cícadadas han registrado una estructura poblacional de tipo III, tal como las que se obtuvieron en este estudio. Una especie de cícada sudafricana, *Encephalartos cycadifolius*, sí mostró una estructura poblacional de tipo III, aunque su tasa finita de incremento poblacional fue $\lambda=1$, lo que sugiere que se encuentra en equilibrio numérico (Raimondo y Donaldson 2003). En el trabajo de Negrón-Ortíz *et al.* (1996) con *Zamia ampliphyllidia*, en el que sí se considero explícitamente la fase de plántulas, se obtuvo, al

igual que en las poblaciones estudiadas de *D. merolae*, una estructura poblacional del tipo III. Este tipo de estructura poblacional también se ha reportado en poblaciones de *D. caputoi* en Tehuacán (Cabrera-Toledo, en preparación).

Por otro lado, la tasa de remoción de las semillas (15% en 5 días) sugeriría que una buena proporción de las mismas podrían quedarse cerca de la planta madre: Sin embargo, no se observaron plántulas bajo la sombra de las plantas madre, lo que sugeriría que su éxito relativo en estos micrisitios es bajo, o bien que realmente la remoción de semillas es mucho más alta de la que pudimos cuantificar en este periodo de cinco días.

Hasta el momento son pocos los estudios que se han realizado sobre la remoción de semillas en cícadas. Burbidge y Whelan (1982) y Ballardie y Whelan (1986) trabajaron con *Macrozamia riedlei* y *M. communis*, respectivamente, y encontraron que la mayor parte de las semillas fueron dispersadas por zarigüeyas a distancias cortas respecto a la planta madre (entre 1-3 m); muy pocas semillas fueron dispersadas a distancias mayores a 12 m. De las 10 semillas a las cuales se les colocó un carrete de hilo, sólo fueron removidas tres, y la máxima distancia que recorrieron desde su sitio de origen fue de 5 m, lo cual coincide con las observaciones de otros autores. El bajo tamaño de muestra en nuestro caso no nos permite sacar conclusiones firmes de estas observaciones; sin embargo, sí apuntan hacia una baja proporción de remoción, con destinos situados a una distancia corta respecto a la planta madre.

Tang (1989) estudio la remoción de semillas en *Zamia pumila* durante un periodo de dos meses, al cabo del cual observó un porcentaje de remoción del 23%. Este valor es un poco más alto del que registramos en *D. merolae*. Sin embargo, el tiempo de observación en nuestro estudio fue sólo de cinco días, debido a que ya para el último día la sarcotesta

que cubre a las semillas parecía estar en descomposición. Queda por investigar si aún bajo estas condiciones las semillas siguen siendo atractivas para los dispersores.

La supervivencia de plántulas de *D. merolae* ocho meses después de la siembra fue del 37%. Este valor es inferior al registrado por Negrón-Ortiz *et al.* (1996) en *Zamia amblyphyllidia*, en la cual la supervivencia de las plántulas al cabo de ese mismo periodo de tiempo fue de ca. 60%. Cabe mencionar que estos autores siguieron a las plántulas por dos años, al cabo de los cuales la supervivencia fue del 20%. En el presente estudio, los resultados no se refieren a plántulas germinadas *in situ*, sino que se introdujeron al sitio de estudio cuando tenían 8 meses de edad. Es imposible saber en qué medida esto llevó a una sobreestimación de la supervivencia, pues el hecho de que las plántulas ya eran de un tamaño mediano en el momento de la siembra, probablemente aumentó sus probabilidades de supervivencia; sin embargo, el trasplante mismo y el cambio de condiciones que éste representó pudieron haber afectado negativamente a las plántulas. Lo que es claro en los resultados es que las diversas condiciones de siembra (diferentes profundidades de suelo y niveles contrastantes de exposición lumínica) no afectaron la supervivencia. Probablemente las plántulas no responden a las condiciones específicas de los micrositos, sino a variables que se expresan de manera más gruesa en el espacio, por ejemplo, las condiciones de humedad en el suelo como resultado de la precipitación y la temperatura regionales, o el pisoteo por parte del ganado.

Implicaciones para la conservación

Nuestros resultados sugieren que la fase de establecimiento de plántulas en *D. merolae* es crítica, lo cual puede notarse a partir de la escasez marcada de esta categoría en todas las poblaciones. Son de preocupar principalmente las poblaciones de San Antonio y San

Antoñito, donde además de la escasez de plántulas, se registran pocos individuos preadultos y adultos, en comparación con las poblaciones de Loma Colorada y Barranca El Ciruelo (Fig. 3.2). Aunado a las limitaciones naturales que enfrentan estas poblaciones para su crecimiento, las plántulas se ven sometidas a los disturbios generados por la presencia de ganado. Estas presiones podrían llevar a una menor supervivencia de plántulas y a largo plazo representar un riesgo para la persistencia de las poblaciones, pues a partir de nuestro estudio se hace evidente que las fases comprendidas entre la germinación de las semillas y el establecimiento de las plántulas son las más vulnerables del ciclo de vida de *D. merolae*. Para poder concluir de manera más clara en cuanto a esto, sería necesario profundizar en nuestra comprensión de los factores ecológicos que afectan estos procesos.

CAPÍTULO 4

ESTRUCTURA GENÉTICA Y ANÁLISIS DE AUTOCORRELACIÓN ESPACIAL

4.1 Introducción

El 52% de las especies de cícadas descritas hasta hoy se encuentran incluidas en alguna categoría de amenaza en las listas rojas de la IUNC (Donaldson 2003). Esta organización se basa en el tamaño de las poblaciones y en las tasas de reducción del hábitat para fijar criterios del nivel de amenaza que sufren las especies (Walter y Gillet 1997). El hecho de que tantas especies de cícadas se encuentren consideradas en las listas rojas de la IUNC nos habla de que con frecuencia se encuentran en poblaciones muy reducidas y/o en hábitats que se están perdiendo a tasas muy aceleradas. Sin embargo, entre los criterios de la IUNC no se incluye el nivel de variación genética de las especies, a pesar de que es un aspecto que se considera explícitamente en el concepto de análisis de viabilidad poblacional (AVP), por ejemplo (Solué 1987, Menges 2000, Frankham 2005), pues se reconoce que la baja variabilidad genética también puede representar un grado de amenaza. En general, se abordan tres niveles espaciales en los que se expresa la variación genética: a nivel de especie, entre poblaciones y al interior de cada población (Hedrick 2000).

Por otra parte, la diversidad genética al seno de una población puede estar espacialmente estructurada entre los individuos que se encuentran más cercanos, los cuales compartirán más alelos en común respecto a individuos más alejados (Smouse y Peakall 1999, Epperson 2003, Escudero *et al.* 2003). Este fenómeno se conoce como autocorrelación espacial y es importante investigarlo ya que puede tener repercusiones para la conservación debido a la acción de presiones selectivas locales, flujo génico restringido y

deriva génica entre los vecindarios de una población (Epperson 1995, Smouse y Peakall 1999, Hardy y Vekemans 1999, Escudero *et al* 2003).

Algunos autores han hecho hincapié en la importancia de la información sobre la variación genética como un aspecto central que permite estimar el nivel de amenaza en especies endémicas y de distribución limitada. En particular, este tipo de especies, al presentarse frecuentemente en poblaciones aisladas y/o de pequeño tamaño, son proclives a la deriva génica y la endogamia (lo que puede derivar en depresión por endogamia), que constituyen fuerzas evolutivas que se traducen en la pérdida de variación genética, llevando a las especies a “vórtices de extinción” (Ellstrand y Elam 1993, Hamrick y Godt 1996, Oostermeijer *et al.* 2003, Frankham 2005). Además, si las poblaciones se presentan de manera aislada y/o las especies tienen una capacidad limitada de dispersión de semillas y polen, puede haber un flujo génico restringido entre poblaciones, disminuyendo la variación genética interpoblacional y aumentando el nivel de endogamia al seno de cada población (Ellstrand y Elam 1993, Hamrick y Godt 1996).

De manera general, las cícadas pueden concebirse como especies de distribución restringida que presentan poblaciones aisladas, con escaso flujo génico entre ellas. En gran medida, la escasez de flujo génico se debe a la naturaleza de la biología reproductiva de estas plantas, pues la gran mayoría, sino es que todas, son entomófilas (Terry 2001). En la polinización de las cícadas intervienen principalmente coleópteros de la familia Curculionidae, los cuales mantienen una interacción altamente especializada con ellas debido a que requieren de la planta para llevar a cabo las distintas etapas de su ciclo de vida. Dadas las características morfológicas y de tamaño de los curculiónidos, se presume que no llegan a desplazarse a distancias considerables (> 1 km). Por otra parte, las semillas de muchas especies de cícadas son de gran tamaño (de más de 2.5 cm de longitud), lo que

impide que los dispersores las transporten a grandes distancias (Ballardie y Whelan 1986, Tang 1989, este trabajo, capítulo 3); así, es posible suponer que el grado de aislamiento entre poblaciones puede llegar a ser alto (Donaldson 1997). El problema de la escasez de flujo génico es más evidente en especies que presentan una distribución disyunta, como es el caso de *Cycas seemanni*, una cícada que se distribuye en diversas islas de un archipiélago del Pacífico Sur y cuyas poblaciones han mostrado una diferenciación genética muy alta entre ellas (Keppel *et al.* 2002).

Las cícadas, independientemente del nivel de aislamiento de sus poblaciones, muestran niveles bajos de variación genética (*He*) y altos niveles de diferenciación genética entre poblaciones comparados con otras especies perennes de vida larga (Hamrick 2004). Por lo anterior, si se desea contribuir a la conservación de estas plantas es fundamental abordar los aspectos de su variación genética a diferentes niveles, así como identificar a las poblaciones con mayor variación genética. En este contexto, podría ser útil detectar cuáles poblaciones actúan como fuente (*source*) y cuáles como vertederos (*sink*) de la variación genética que existe a nivel global.

Gran parte de los estudios que se han realizado sobre genética de poblaciones en cícadas se han basado en la técnica de electroforesis en geles horizontales de almidón para medir la variación genética presente en diferentes loci de isoenzimas (Ellstrand *et al.* 1990, Walters y Decker-Walters 1991, Yang y Meerow 1996, Sharma *et al.* 1998, Lin *et al.* 2000, Keppel *et al.* 2002, González-Astorga *et al.* 2003, 2005, 2006). Esta técnica ha sido muy útil para generar conocimiento sobre la estructura genética en cícadas.

4.2 Métodos

4.2.1 Colecta de material y extracción de isoenzimas

Se muestrearon cuatro poblaciones de *Dioon merolae* (Loma Colorada, San Antonio, San Antoñito y Barranca el Ciruelo) en la región de los Taviches, Oaxaca (Figura 1). Se obtuvo tejido foliar de 30 individuos adultos de cada una de las cuatro poblaciones. El mismo día de la colecta, el tejido foliar se transportó a la ciudad de Xalapa en un recipiente con hielo para evitar la desnaturalización de las proteínas. Este tejido se almacenó posteriormente en un congelador Revco a -70°C hasta el momento en el que se realizaron las extracciones de las enzimas (ca. 20 días después).

Para la extracción de las enzimas, se sacó el tejido foliar del congelador, se cortó una porción de aproximadamente 200 mg de tejido fresco de cada individuo, se colocó en un mortero y se pulverizó con nitrógeno líquido. Al tejido pulverizado se añadieron 250 μl de búfer de extracción (0.1 M Tris-HCl, pH 7.5; 4 % PVP-40; 0.001 M EDTA; 0.01 M MgCl_2 ; y 0.1% de β -mercaptoetanol; Chao-Luan *et al* 1999). Este búfer se utilizó para diluir y estabilizar el extracto de enzimas. Por último, se impregnaron tiritas de papel filtro con el extracto de enzimas, (“wicks”, seis para cada individuo) las cuales se depositaron en tubos Eppendorf y se almacenaron en el congelador Revco a -70°C hasta el momento de aplicar la técnica de electroforesis horizontal en gel de almidón.

Se utilizaron dos sistemas de búfer para preparar el gel de almidón: 1) sistema R y 2) sistema Poulik (Wendel y Weeden 1989). Los geles se cortaron horizontalmente a 2.5 cm de uno de sus extremos y en el corte se colocaron las “wicks” correspondientes a los individuos de cada población. La electroforesis para el sistema R se corrió a una temperatura de 4°C , con una corriente de 35 mA, un voltaje de 200 v, por un periodo de 7 h. Para el sistema Poulik, la electroforesis se corrió a una temperatura de 4°C , con una corriente de 50 mA y un voltaje de 200 v, por un periodo de 5h.

Una vez que terminaron las respectivas electroforesis, cada gel se cortó longitudinalmente con un hilo para obtener varias capas (ca. 6) del mismo; éstas se colocaron en charolas de plástico a las que se adicionaron sustancias específicas para teñir cada enzima en particular. Después de adicionar la sustancia de tinción, las charolas se introdujeron a una incubadora a 30°C y en condiciones de oscuridad. Los protocolos de tinción para las enzimas visualizadas fueron los propuestos por Wendel y Weeden (1989). Muchas de estas tinciones ya se habían practicado previamente en otras especies de *Dioon* (González-Astorga *et al.* 2003, 2005; Cabrera-Toledo en prep.), por lo que se tenía la expectativa de que fueran adecuadas también para los individuos en estudio.

Una vez que se obtuvo la tinción de los geles para cada enzima, se realizó la lectura de los mismos, registrando su patrón de bandeo de acuerdo con la técnica propuesta por Wendel y Weeden (1989) para distinguir las enzimas monoméricas, diméricas y tetraméricas.

4.2.2 Análisis de datos y evaluación de la variación genética inter e intrapoblacional

Del patrón de bandeo obtenido en los geles, se determinó si los individuos eran homocigos o heterocigos para cada enzima. A partir de esto se construyó una matriz de datos con todos los individuos, todas las poblaciones y todas las enzimas analizadas, y se utilizó el programa TFPGA 1.3 (Miller 1997) para describir los principales parámetros de variación y estructura genética para la especie en estudio: la heterocigocidad observada (H_O), el número de alelos por locus (A), el porcentaje de loci polimórficos (P) y la heterocigocidad esperada (H_E) con respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg. (Hedrick 2000).

La distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones se determinó mediante los estadísticos F de Wright. El estadístico F_{ST} evalúa el nivel de diferenciación genética

entre poblaciones, mientras que los estadísticos F_{IS} y F_{IT} estiman el exceso (<0) y el déficit (>0) de heterocigosis con respecto a lo esperado en el equilibrio de Hardy-Weinberg en cada población local y en el total de las poblaciones, respectivamente. El intervalo de confianza, al 95%, para los estadísticos F se obtuvieron por un método de remuestreo completo con reemplazo (Botstrap) sobre todos los loci, y un remuestreo completo sin reemplazo (Jackknife) para cada locus (Wier y Cockerham 1984). Para estimar si los valores de F_{IS} y F_{IT} , para cada locus, eran significativamente diferentes de cero, se aplicó una prueba de ji- cuadrada:

$$\chi^2 = F (2N) (k-1)$$

$$\text{Grados de libertad} = k \frac{(k-1)}{2}$$

donde N es el tamaño de muestra (30 individuos por población en este caso) y k es el número de alelos por locus.

Para estimar con qué nivel de confianza se podía afirmar que los valores de F_{ST} eran diferentes de cero, se aplicó otra prueba de ji-cuadrada:

$$\chi^2 = (2N) F_{ST} (k-1),$$

$$\text{Grados de libertad} = (k-1) (S-1)$$

donde S es el número de poblaciones.

Para estimar el flujo génico entre poblaciones (Nm = número de migrantes por generación entre dos poblaciones dadas), se utilizó la variable F_{ST} para pares de poblaciones y se despejó Nm de la ecuación:

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

$$\text{donde } \alpha = [S/(S-1)]^2$$

Los resultados de este análisis se reportan en dos secciones. En la primera se incluyen sólo tres poblaciones (i.e. San Antonio, San Antoñito y El Ciruelo) para las cuales se extrajeron 22 isoenzimas (Cuadro 4.1). En la segunda sección se incorporan las cuatro poblaciones muestreadas (i.e., las anteriores, más la de Loma Colorada), pero sólo se presentan resultados para 11 isoenzimas. Lo anterior se debió a que el material biológico de la población de Loma Colorada se colectó en una segunda visita al campo y, por lo tanto, estos individuos no se analizaron al mismo tiempo que los anteriores. Por problemas logísticos en el laboratorio de Genética de Poblaciones del INECOL, en donde se corrieron los análisis, sólo fue posible revelar 11 enzimas en esta segunda serie de trabajo de laboratorio.

4.2.3. Análisis de poblaciones con cuello de botella

La identificación de poblaciones que han sufrido recientemente una reducción en su tamaño poblacional (cuello de botella) es importante debido a que este fenómeno puede provocar un incremento de la estocasticidad demográfica, la tasa de endogamia, pérdida de la variación genética y la fijación de alelos deletorios (Cournet y Luikart 1996, Luikart y Cournet 1998). Las poblaciones que recientemente han sufrido una reducción en sus tamaños efectivos poblacionales muestran una reducción del número de alelos y de la heterocigosis en loci polimórficos, pero el número de alelos se reduce más rápido que la heterocigosis (H_e); de tal manera, que H_e es más mayor que la heterocigosis esperada en el modelo en equilibrio mutación-deriva (H_{eq}), por lo que se registrará un exceso de heterocigosis (Cournet y Luikart 1996, Luikart y Cournet 1998). Para explorar esta posibilidad se examinaron los datos de frecuencias alélicas de cuatro poblaciones de *Dioon merolae* utilizando el software Bottleneck versión 2.1, considerando el modelo de alelos

infinitos (IAM por sus siglas en inglés) ya que se considera que es el más adecuado para datos generados por lectura de isoenzimas (Cournet y Luikart 1996, Luikart y Cournet 1998, Piriy *et al.* 1999).

4.2.4. Análisis detallado de la población de Loma Colorada

Para la población de Loma Colorada, no se colectó material biológico solamente los 30 individuos que se mencionaron en la sección anterior (y que se utilizaron para evaluar la variación genética inter e intrapoblacional con las 11 isoenzimas), sino que se incluyeron en la muestra a todos los individuos localizados en un área de 100×100 m. Estos individuos se mapearon, se clasificaron según su tamaño (ver Capítulo 3) y se utilizaron para llevar a cabo los análisis que se detallan a continuación.

a) Variación genética entre individuos de diferentes categorías de tamaño

La información sobre el genotipo de cada individuo se utilizó para obtener las variables de estructura y variabilidad genética detalladas en la sección anterior, pero en este caso de compararon tres categorías de tamaño: individuos pequeños (plántulas y juveniles, $N = 21$), preadultos ($N=18$) y adultos ($N=77$). Para el caso de los adultos se hicieron, además del análisis conjunto, un análisis por separado para hembras, machos y organismos adultos de sexo indeterminado, con el objeto de saber si presentan patrones diferentes de diversidad genética. Para cada grupo se obtuvieron los valores de A , H_O , H_E , F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} .

b) Análisis de autocorrelación espacial

Se registraron 116 individuos dentro de la hectárea delimitada en Loma Colorada (Figura 4.1); de cada individuo se registraron las coordenadas y se colectó tejido foliar el cual fue

procesado para aplicar la técnica de electroforesis en gel de almidón para obtener la diversidad genética de isoenzimas como ya se describió en la sección 4.2 .1

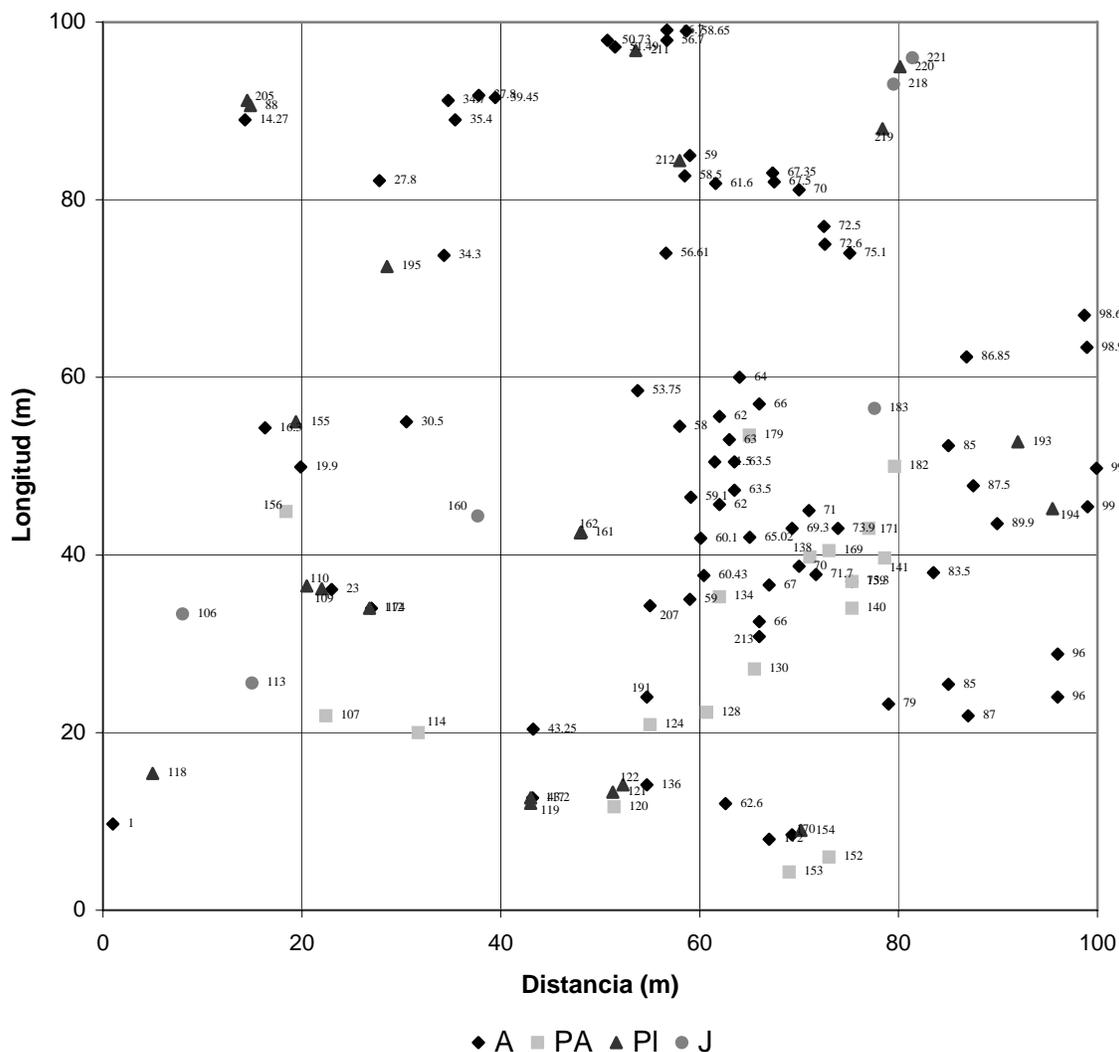


Figura 4.1 Distribución espacial de los individuos de diferentes etapas de desarrollo, ◆A= adultos, ■PA= preadultos, ●J= juveniles y ▲PI= plántulas, de *Dioon merolae*, en una hectárea de la población de Loma Colorada. San Jerónimo Taviche, Oaxaca.

Para realizar el análisis de autocorrelación se consideró la variación de genotipos y la distancia entre cada uno de los individuos de la hectárea. Los datos de los genotipos para 11 isoenzimas y de las coordenadas de cada individuo se capturaron en una hoja de cálculo del

programa GenAlex versión 6 (Peakall y Smouse 2006). Este programa es un macro de excel en el que se pueden combinar los datos de los genotipos y las coordenadas de cada individuo, con estos datos, el programa construye una matriz de distancias genéticas y otra matriz de distancias geográficas entre todos los individuos analizados. Asimismo, este programa obtiene un coeficiente de autocorrelación espacial (r), muy relacionado con el índice I de Moran, considerando las variables de genotipos y distancias, denotado por la ecuación:

$$r = \frac{n \sum \sum W_{ij} (x_i - \bar{x})(x_j - \bar{x})}{\sum (x_i - \bar{x})^2}$$

en donde n = número de unidades (puntos en el mapa) y W_{ij} es la matriz de distancia que define si los puntos geográficos, i y j . son vecinos y comparten más alelos en común. Los valores de r varían entre 1 y -1 ; si los valores son positivos y se acercan a 1, se dice que los pares de individuos a una distancia dada comparten más alelos en común de lo que se esperaría por azar, si el valor es 0 ó cercano a 0 se interpreta como que no hay autocorrelación y los genotipos de los pares de individuos se distribuyen al azar y si los valores son negativos y cercanos a -1 , se interpreta como que los pares de individuos comparten menos alelos en común de los esperados por azar.

GenAlex 6 ofrece la posibilidad de calcular el índice de Moran con diferentes categorías de distancia y elegir la que presente los resultados más robustos, es decir, el coeficiente más alto. En este estudio se realizaron los cálculos con diversas categorías de distancia y optamos por emplear categorías de distancia de intervalos regulares cada 5 metros.

4.3 Resultados

4.3.1 Frecuencias alélicas en cuatro poblaciones

En el laboratorio se obtuvieron un total de nueve isoenzimas con 11 locus polimórficos, los cuales denotaron una amplia variación genética considerando que la gran mayoría de los alelos estuvieron representados con sus dos variantes. Solamente dos locus, MDH-II y MNR-I, fueron monomórficos en una población (Tabla 4.1)

Tabla 4.1. Frecuencia de alelos para 11 loci polimórficos en cuatro poblaciones de *Dioon merolae* en la región de Los Taviches, Oaxaca.

Locus	Alelo	Población			
		El Ciruelo	San Antonio	San Antoñito	Loma Colorada
APX	A	0.729	0.389	0.517	0.603
	B	0.271	0.611	0.482	0.397
IDH	A	0.417	0.500	0.362	0.233
	B	0.583	0.500	0.638	0.767
6PGD	A	0.5000	0.500	0.500	0.267
	B	0.5000	0.500	0.500	0.733
MDH-I	A	0.680	0.536	0.552	0.593
	B	0.320	0.464	0.448	0.407
MDH-II	A	0.167	0.200	1.000	0.450
	B	0.833	0.800	0.000	0.550
MNR-I	A	0.500	0.500	1.000	0.517
	B	0.500	0.500	0.000	0.483
MNR-II	A	0.500	0.500	0.633	0.600
	B	0.500	0.500	0.367	0.400
ME	A	0.500	0.733	0.475	0.733
	B	0.500	0.267	0.525	0.267
GOT	A	0.583	0.583	0.600	0.867
	B	0.417	0.417	0.400	0.133
PGM	A	0.500	0.517	0.750	0.367
	B	0.500	0.483	0.250	0.633
ACO	A	0.350	0.450	0.400	0.467
	B	0.650	0.550	0.600	0.533

4.3.2 Variación genética inter e intrapoblacional

Como se mencionó con anterioridad, en esta sección se presentan dos series de resultados: en la primera se consideran sólo tres poblaciones las cuales se analizaron utilizando 22 isoenzimas; en la segunda se presentan los resultados de las cuatro poblaciones, pero sólo con 11 isoenzimas (que fueron las que se lograron correr en común para todos los análisis).

a) Estructura genética de tres poblaciones de *Dioon merolae* (22 isoenzimas)

En primera instancia, para las poblaciones de El Ciruelo, San Antonio y San Antoñito se obtuvieron 22 isoenzimas en los dos sistemas utilizados. Para el sistemas R* se revelaron una total de 12 isoenzimas y para el sistema Poulik (PK), se obtuvieron un total de 10 isoenzimas (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Isoenzimas que se obtuvieron mediante la técnica de electroforesis en gel de almidón para tres poblaciones de *Dioon merolae*, en la región de los Taviches, Oaxaca.

Isoenzima	Sistema	Isoenzima	Sistema
APX-I	R*	ME-II	PK
IDH	R*	ME-I	PK
6PGDH	R*	ME-IV	PK
G3PDH-I	R*	HK-I	PK
G3PDH-II	R*	HK-II	PK
EST-I	R*	HK-III	PK
EST-II	R*	GOT	PK
SDH	R*	PGM	PK
MDH-I	R*	ACO-I	PK
MDH-II	R*	ACO-II	PK
MNR-I	R*		
MNR-II	R*		

Los resultados de variación genética indican que el número de alelos por locus fue 1.93 ± 0.37 , el porcentaje de loci polimórficos por población varió de 100 a 86.33%, con una media de 95.44 % , y las media de las heterocigosis observada y esperada fueron $H_O = 0.696$ y $H_E = 0.452$ respectivamente (Tabla 4.3).

Tabla 4.3 Principales medidas de variación genética de tres poblaciones de *Dioon merolae* en la región de los Taviches Oaxaca (con 22 isoenzimas).

Población	n	A	P	H_O	H_E
El Ciruelo	30	1.97	100	0.750	0.481
San Antonio	30	1.96	100	0.736	0.463
San Antoñito	30	1.86	86.33	0.603	0.412
Media ± D. S.		1.93 ± 0.37	95.44 ± 7.89	0.696±0.08	0.452±0.04

Los estadísticos F_{IT} y F_{IS} para estas tres poblaciones fueron negativos y significativamente diferentes de cero para la mayoría de los loci. Las medias de estos valores fueron $F_{IT} = -0.399 \pm 0.118$ y $F_{IS} = -0.561 \pm 0.075$. En ambos casos, los valores negativos difieren significativamente de cero, lo cual denota un exceso de heterocigotos. La media de $F_{ST} = 0.102$, lo cual sugiere que el 10.2% de la variación genética en *Dioon merolae* se debe a diferencias entre las poblaciones (Tabla 4.4).

Tabla 4.4 Estadísticos F de Wright para tres poblaciones de *Dioon merolae* en la región de los Taviches, Oaxaca (con 22 isoenzimas).

Locus	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}
APX-I	-0.417	0.102	-0.578
IDH	-0.400	0.106	-0.566
6PGDH	-0.372	0.107	-0.535
G3PDH-I	-0.386	0.107	-0.551
G3PDH-II	-0.402	0.105	-0.567
EST-I	-0.386	0.107	-0.551
EST-II	-0.384	0.106	-0.548
SDH	-0.401	0.106	-0.566
MDH-I	-0.488	0.066	-0.592
MDH-II	-0.404	0.091	-0.544
ME-II	-0.380	0.106	-0.543
ME-I	-0.454	0.093	-0.604
ME-IV	-0.391	0.106	-0.555
HK-I	-0.389	0.103	-0.549
HK-II	-0.386	0.107	-0.551
HK-III	-0.402	0.104	-0.563
GOT	-0.404	0.103	-0.566
PGM	-0.395	0.107	-0.562
ACO-I	-0.388	0.103	-0.548
ACO-II	-0.416	0.093	-0.561
MNR-I	-0.395	0.106	-0.561
MNR-II	-0.372	0.107	-0.535
Media	-0.389	0.102	-0.561
D. S.	0.118	0.420	0.075
I.C. 95%	-0.118-0.599	0.185-0.034	-0.398-0.689

b) Estructura genética de cuatro poblaciones de *Dioon merolae* (11 isoenzimas)

En este análisis se incorporó la población de Loma Colorada, además de las tres de la sección anterior. Las 11 isoenzimas que se pudieron revelar en común para las cuatro poblaciones se reportan en el Tabla 4.5.

Tabla 4.5 Isoenzimas que se obtuvieron para cuatro poblaciones de *Dioon merolae* en la región de los Taviches, Oaxaca.

Isoenzima	Sistema	Isoenzima	Sistema
APX	R*	ME	PK
IDH	R*	GOT	PK
6PGD	R*	PGM	PK
MDH-I	R*	ACO	PK
MDH-II	R*		
MNR-I	R*		
MNR-II	R*		

Los resultados de variación genética muestran que el número de alelos por locus para estas cuatro poblaciones fue 1.95 ± 0.54 y el porcentaje de loci polimórficos por población varió entre 100 y 81.81%, con una media de 95.45 % , siendo este valor muy similar al que se había obtenido para las tres primeras poblaciones (con 22 isoenzimas). Las media de las heterocigosis observada y esperada fueron $H_O = 0.646$ y $H_E = 0.437$ respectivamente (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Variación genética de cuatro poblaciones de *Dioon merolae* en la región de los Taviches, Oaxaca (con 11 isoenzimas).

Población	n	A	P	H_O	H_E
El Ciruelo	30	2	100	0.739	0.458
San Antonio	30	2	100	0.729	0.469
San Antoñito	30	1.8	81.81	0.559	0.387
Loma Colorada	30	2	100	0.555	0.434
Media \pm D. S.		1.95 ± 0.54	95.44 ± 7.89	0.646 ± 0.10	0.437 ± 0.04

Los estadísticos F_{IT} y F_{IS} fueron negativos y significativamente diferentes de cero para todas las isoenzimas. Las medias de estos valores fueron $F_{IT} = -0.302 \pm 0.047$ y $F_{IS} = -0.467 \pm 0.031$, lo que denota nuevamente un exceso de heterocigotos. La media de $F_{ST} = 0.113$, ligeramente mayor que la calculada para tres poblaciones (con 22 isoenzimas) e indica que el 11.3% de la variación genética de *Dioon merolae* se debe a diferencias entre las poblaciones (Tabla 4.7).

Tabla 4.7 Valores de los estadísticos F de Wright para cuatro poblaciones de *Dioon merolae* en la región de los Taviches Oaxaca (con 11 isoenzimas).

Locus	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}
APX	-0.325***	0.118	-0.502***
IDH	-0.298***	0.120	-0.475***
6PGD	-0.255***	0.119	-0.425***
MDH-I	-0.297***	0.124	-0.479***
MDH-II	-0.428***	0.067	-0.530***
ME	-0.313***	0.100	-0.459***
GOT	-0.257***	0.123	-0.433***
PGM	-0.301***	0.117	-0.474***
ACO	-0.302***	0.117	-0.473***
MNR-I	-0.275***	0.115	-0.440***
MNR-II	-0.272***	0.124	-0.451***
Media	-0.302	0.113	-0.467
D. S.	0.047	0.017	0.031
I. C. 95%	-0.142-0.530	0.213-0.039	-0.268-0.630

*** $p < 0.0001$

4.3.3. Análisis de cuello de botella

Las cuatro poblaciones de *D. merolae* consideradas en este estudio, registraron algunos loci polimórficos que acaban de pasar por un reciente cuello de botella; se observaron diferencias significativas entre la heterocigocidad esperada (H_e), la cual fue mayor, y la heterocigocidad esperada en equilibrio mutación-deriva (H_{eq}). La población con mayor

número de individuos, Loma Colorada, solamente muestra dos locus que sufrieron recientemente un cuello de botella, mientras que la población más pequeña, San Antoñito, muestra cuatro locus con cuello de botella, además de que MDH2 y MNR1 se registraron como alelos monomórficos fijos (Tabla 4.8)

Tabla 4.8. Locus que registraron cuellos de botella en cuatro poblaciones de *Dioon merolae* en la región de Los Taviches, Oaxaca.

Población	Locus	H_e	H_{eq}	P
El Ciruelo	6PGD	0.508	0.206	0.014
	MNR1	0.508	0.214	0.026
	MNR2	0.508	0.205	0.021
	ME	0.508	0.212	0.021
	PGM	0.508	0.205	0.021
San Antonio	IDH	0.508	0.206	0.024
	6PGD	0.508	0.218	0.025
	MDH1	0.506	0.209	0.033
	MNR1	0.508	0.202	0.014
	MNR2	0.508	0.203	0.0210
	PGM	0.508	0.212	0.014
San Antoñito	ACO	0.503	0.211	0.046
	APX	0.508	0.204	0.018
	6PGD	0.508	0.207	0.021
	MDH1	0.503	0.203	0.031
Loma Colorada	ME	0.512	0.233	0.040
	MNR1	0.508	0.209	0.021
	ACO	0.506	0.208	0.026

4.3.4 Resultados detallados para la población de Loma Colorada

Esta sección incluye dos series de resultados, en este caso tomando en cuenta a todos los individuos establecidos en una parcela de 1 ha en la población de Loma Colorada (n=116).

En la primera sección se analiza la variación genética de estos individuos, separados por

categorías de tamaño, y en la segunda sección se presentan los resultados de un análisis de autocorrelación espacial para evaluar la similitud genética entre vecinos; a través de de esta evaluación, se analizan más adelante aspectos relacionados con la dispersión del polen y las semillas en la población.

a) Variación genética en las diferentes categorías de tamaño

El número de alelos por locus fue ligeramente menor entre las plántulas y juveniles que entre los preadultos y adultos. Asimismo, tanto la heterocigosis observada como la esperada fueron menores en el grupo de las plántulas y juveniles, aumentando ligeramente entre los preadultos y alcanzando sus valores máximos en los adultos. En resumen, para todas las variables calculadas se registró un aumento de los valores conforme la categoría de estado fue mayor (Tabla 4.9).

Tabla 4.9 Estimadores de la variación genética para 10 loci enzimáticos en tres categorías de tamaño para la población de Loma Colorada, en San Jerónimo Taviche, Oaxaca.

Categoría	n	A	H_O	H_E
Plántulas y juveniles	21	1.87	0.374	0.315
Preadultos	18	1.93	0.404	0.333
Adultos	77	1.95	0.446	0.349
Media \pm DE		1.92\pm0.04	0.408\pm0.04	0.332\pm0.02

b) Análisis de autocorrelación espacial

Considerando a los individuos de *D. merolae* de todas las categorías de tamaño en una hectárea de la población de Loma Colorada (n=116) y tomando en cuenta categorías de distancia de cinco metros, encontramos que los pares de individuos ubicados a una

distancia de 15 m comparten más alelos en común que lo esperado por azar, aunque el intervalo de confianza para esta distancia cae dentro de lo esperado al azar (Figura 4.2). A partir de esto puede decirse que la población exhibe una estructura genética espacial, pues se puede apreciar una autocorrelación significativa ($r=0.06$, $P= 0.01$) a esta distancia (Figura 4.2), no siendo así para distancias menores o mayores de 15m. Conforme la distancia entre individuos se va incrementando o disminuyendo, la similitud genética entre ellos disminuye paulatinamente, sin que esta disminución sea mayor de la esperada por azar.

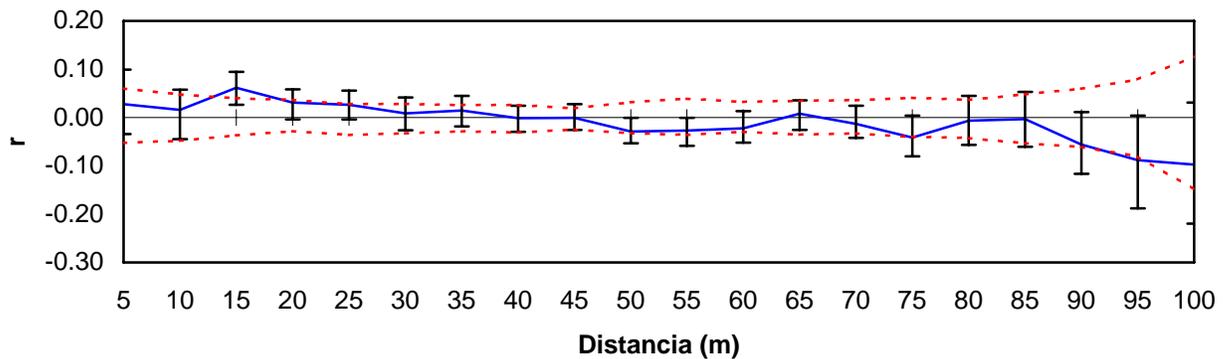
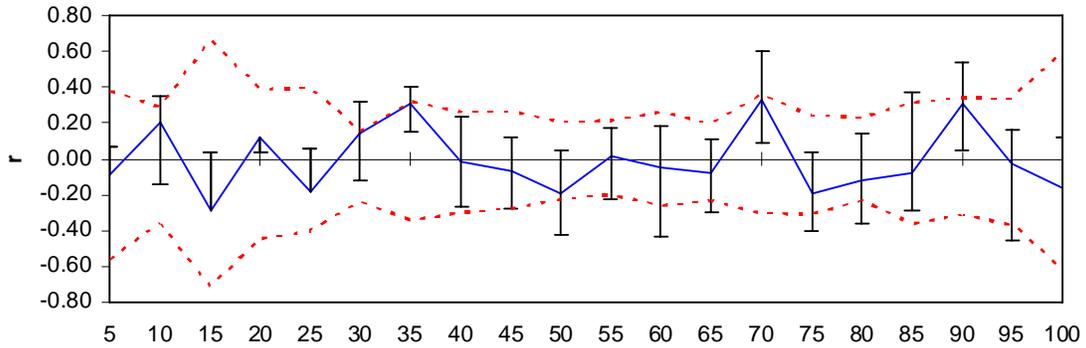


Figura 4.2 Resultados del análisis de autocorrelación espacial, incluyendo a todas las categorías de tamaño en conjunto, de la población de Loma Colorada. La distancia se analizó como variable categórica, y el valor de r asociado a cada categoría es el índice de Moran para todos los pares de individuos encontrados en esa categoría de distancia. Los intervalos de confianza (95%) están delimitados por las líneas punteadas, y las barras negras son la desviación estándar del valor de r .

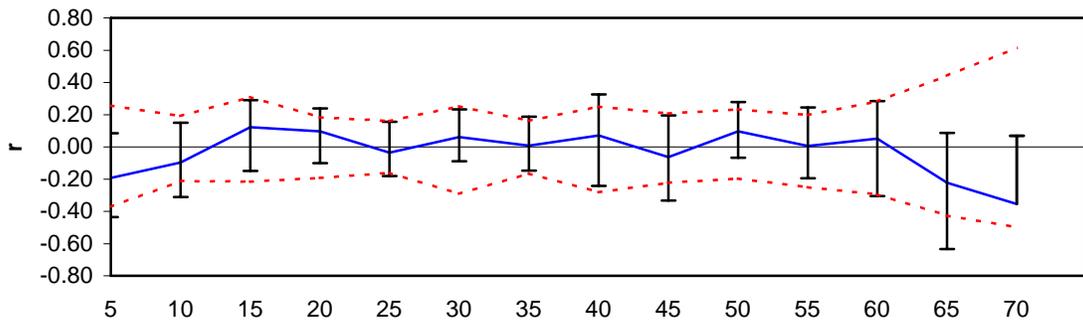
Se llevaron a cabo otros análisis de autocorrelación espacial, pero en este caso analizando la similitud entre individuos de categorías de tamaño particulares, con el objeto de disectar con más detalle el resultado anterior e identificar en qué categorías de tamaño es en las que se presenta una mayor similitud genética. Los resultados de estos análisis mostraron que no existe una autocorrelación espacial entre pares de plántulas ($n=15$), ni tampoco entre pares de preadultos ($n=18$) (Figura 4.3 A y B). Sin embargo, en el correlograma generado a partir del análisis de los adultos ($n=77$) se obtuvo que hay una

mayor similitud genética que la esperada por azar entre pares de individuos que se encuentran a 5 m ($r=0.08$, $P=0.03$) y a 15 m ($r=0.06$, $P=0.01$) entre ellos (Figura 4.3 C).

A



B



C

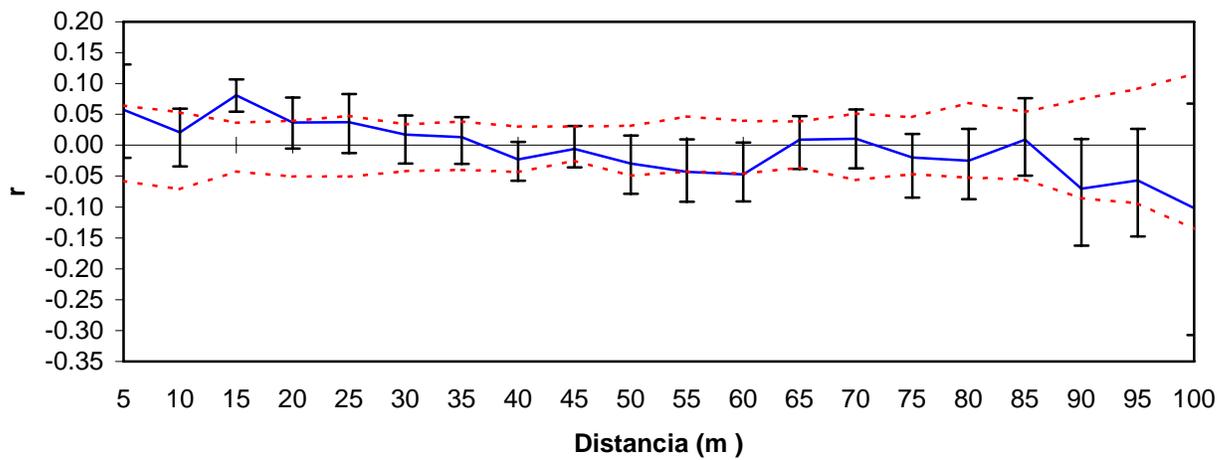


Figura 4.3 Resultados del análisis de autocorrelación espacial, incluyendo sólo a las plántulas (A), sólo a los preadultos (B) y sólo a los adultos (C), de la población de Loma Colorada. Ver los detalles de la simbología y las variables en la figura 4.2.

4.4 Discusión

Variación genética intrapoblacional

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que las poblaciones de *Dioon merolae* en la región de los Taviches, Oaxaca, presentan altos niveles de variación genética intrapoblacional en comparación con otras especies de cícadas (Tabla 4.10). En *D. merolae* el número de alelos por locus, el porcentaje de loci polimórficos y la heterocigosis, tanto observada (H_O) como esperada (H_E), fueron considerablemente mayores que los valores registrados en todas las demás especies de cícadas estudiadas hasta el momento. De las aproximadamente 15 especies para las que se tienen datos al respecto, sólo en *Macrozamia riedlei*, una especie australiana, se reporta un mayor número de alelos por locus ($A= 2.43$) que en *Dioon merolae*, y un porcentaje similar de loci polimórficos (Byrne y James 1991). Al comparar a *D. merolae* con otra especie del mismo género, como *D. edule* y *D. angustifolium*, también se puede observar que la primera tiene mayores valores de variación genética (Tabla 4.10), a pesar de que difiere de las otras dos en cuanto a su área de distribución geográfica (*D. edule* presenta una mayor área de distribución, y *D. angustifolium* una menor área de distribución que *D. merolae*). Es difícil explicar este resultado con base en la biología reproductiva de las especies, pues todas ellas comparten el hecho de que son dioicas y son polinizadas por escarabajos. Tampoco puede sugerirse que la alta variación genética de *D. merolae* está relacionada con un área de distribución relativamente extensa, pues ésta es relativamente restringida, y su variación genética es mayor que la de una especie cercanamente emparentada y de distribución más amplia (como *D. edule*). Probablemente la alta variación genética de *D. merolae* tiene que ver con aspectos históricos, como el hecho de que se distribuye en zonas más o menos bien

conservadas y probablemente sus poblaciones no han pasado por eventos severos de cuellos de botella, cómo parece ser el caso de *D. angustifolium* (González-Astorga *et al.* 2005).

Es importante mencionar que el número de alelos por locus encontrado puede depender mucho de la cantidad de poblaciones estudiadas y del número de isoenzimas obtenidas (Hedrick 2000). Para el caso de *Dioon merolae* estudiamos cuatro poblaciones y obtuvimos 11 isoenzimas, valores similares a los de la gran mayoría de los estudios que se han realizado en cícadas.

Tabla 4.10. Medidas de variación genética reportadas en la literatura para diversas especies de cícadas, incluyendo los datos del presente estudio. N = número de poblaciones estudiadas; A = número de alelos por locus; P = porcentaje de loci polimórficos; H_E = heterocigocidad esperada; F_{ST} = diferenciación genética entre poblaciones; n. d.= no disponible.

Especie	N	A	P	H_E	F_{ST}	Referencia
<i>Cycas panzhihuaensis</i>	3	1.13	14.3	0.061	0.139	Chao-Luan <i>et al.</i> 1999
<i>Cycas guizhouensis</i>	3	1.61	58.3	0.100	0.080	Yang y Meerow 1996
<i>Cycas pectinata</i>	11	1.82	58.5	0.076	0.387	Yang y Meerow 1996
<i>Cycas siamensis</i>	13	1.48	58.9	0.134	0.291	Yang y Meerow 1996
<i>Cycas taitungensis</i>	2	1.07	2.5	0.013	0.034	Lin <i>et al.</i> 2000
<i>Cycas seemanii</i>	5	1.20	21.3	0.057	0.594	Keppel 2002
<i>Macrozamia communis</i>	5	1.61	50.0	0.045	0.270	Ellstrand <i>et al.</i> 1990
<i>Macrozamia riedlei</i>	15	2.43	93.0	0.274	0.092	Byrne y James 1991
<i>Macrozamia parcifolia</i>	2	1.20	17.6	0.037	0.090	Sharma <i>et al.</i> 1998
<i>Macrozamia pauli-guilielmi</i>	3	1.30	31.3	0.051	0.030	Sharma <i>et al.</i> 1998
<i>Macrozamia heteromera</i>	5	1.30	26.0	0.077	0.100	Sharma <i>et al.</i> 1999
<i>Zamia lodiggesii</i>	4	1.80	66.6	0.266	0.790	González-Astorga <i>et al.</i> 2006
<i>Zamia pumila</i>	4	2.21	16.7	0.041	n. d.	Walters y Decker-Walters 1991
<i>Dioon angustifolium</i>	3	1.67	52.4	0.218	0.167	González-Astorga <i>et al.</i> 2005
<i>Dioon edule</i>	8	1.44	54.8	0.240	0.075	González-Astorga <i>et al.</i> 2003
<i>Dioon merolae</i>	4	1.95	95.4	0.437	0.113	Este estudio

En un estudio reciente efectuado con dos especies de *Dioon*, pero utilizando microsatélites, se reportaron niveles muy altos de heterocigosis en dos de los siete loci analizados ($H_O= 0.982$, $H_E= 0.632$ para *D. edule* y $H_O=0.839$, $H_E=0.609$ para *D. caputoi*) (Moynihan *et al.* 2007); a pesar de que los resultados obtenidos con microsatélites y con

isoenzimas no son en absoluto comparables, el estudio de Moynihan *et al.* (2007) apunta hacia la existencia de altos niveles de variación en las especies de este género.

La alta variación genética intrapoblacional reconocida en este estudio para *D. merolae* puede estar relacionado con su sistema reproductivo. El carácter dioico de las plantas de esta especie determina que la reproducción sólo se pueda dar por entrecruza, lo que promueve altos niveles de variación genética al seno de cada una de las poblaciones. Por otra parte, contrario a lo que se ha pensado, existe la posibilidad de que los curculiónidos responsables de la polinización puedan desplazarse a distancias considerables, lo cual permitiría la cruce entre individuos espacial y genéticamente distantes. Esto lo sugerimos con base en los resultados de un estudio de polinización en el que se utilizaron polvos fluorescentes en la población de Loma Colorada (Maldonado-Ruíz, 2008). El mencionado estudio reveló que un megaestróbilo receptivo recibió polen de un individuo masculino ubicado a una distancia de 57 m, aunque no recibió polen de otro ubicado a sólo 7 m, a pesar de que ambos individuos masculinos estuvieron liberando polen simultáneamente. Si bien 57 m no es una gran distancia, es suficiente para evitar que las cruces se den entre individuos cercanos en el espacio, a 15 m de distancia, que como ya vimos, presentan una mayor similitud genética de la esperada por azar (Fig. 4.2).

Otra posibilidad es que el alto nivel de variación genética, expresada en los altos valores de heterocigosis, sea el resultado de una eliminación del aislamiento entre las cuatro poblaciones estudiadas. Es posible que en el pasado, la perturbación provocada por la roza, tumba y quema practicada en la zona haya afectado la abundancia de los polinizadores, sobre todo en las poblaciones de San Antonio, San antoñito y El Ciruelo, provocando un aislamiento entre las poblaciones; posteriormente la abundancia se ha reestablecido y el

flujo génico se ha intensificado provocando un aumento de la heterocigosis de manera global.

Variación genética interpoblacional

Los valores de F_{IS} y F_{IT} fueron negativos y significativamente diferentes de cero, lo cual se interpreta como una evidencia de que existe un exceso de heterocigosis. Esto coincide con los resultados de los valores de heterocigocidad intrapoblacional descritos en párrafos anteriores. Como se discutió con anterioridad, estos altos niveles de heterocigosis pueden estar relacionados con el dioicismo de *D. merolae*, aunque también con una probable selección natural que favorece la dominancia de genotipos heterocigos o la historia de fragmentación de las poblaciones.

La diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas de *D. merolae* fue de 11% ($F_{ST}= 0.113$). Este valor es ligeramente mayor que los valores de F_{ST} reportados para otras especies de cícadras (Byrne y James 1991, Sharma *et al.* 1998, Lin *et al.* 2000, González-Astorga *et al.* 2003) y otras especies perennes (Hamrick 2004). No obstante, aproximadamente la mitad de las cícadras estudiadas hasta el momento reportan valores más altos de F_{ST} . (Tabla 4.10) Algunas de estas cícadras, con altos valores de F_{ST} tienen algunas peculiaridades p. e. grandes áreas de distribución (como *Cycas pectinata*, $F_{ST}=0.387$, Yang y Meerow 1996), y otras presentan una distribución fragmentada (como *Cycas seemannii*, que se distribuye en un archipiélago con grandes distancias entre islas, $F_{ST}=0.594$, Keppel 2002).

Debe recordarse que el presente estudio se realizó sólo en cuatro poblaciones que se encuentran separadas por distancias relativamente cortas (máxima de 6.5 km). A pesar de las cortas distancias entre ellas, la diferenciación genética es apreciable. Esto implica que, aunque en la sección anterior sugerimos que la polinización podría darse a distancias

relativamente largas, existe una limitante para el flujo de polen (y semillas) que ha llevado a cierta diferenciación, aún entre estas poblaciones cercanas. Algo similar se ha encontrado en la palma *Astrocaryum mexicanum*, la cual también es polinizada por escarabajos que se pueden desplazar grandes distancias y mantener una conectividad entre las diferentes subpoblaciones, pero en las cuales se encuentra cierto grado de diferenciación entre ellas (Eguiarte et al. 1987).

Se están estudiando otras poblaciones de *Dioon merolae* que se encuentran a grandes distancias (desde 35 km hasta 72 km) de nuestro sitio de estudio (Cabrera-Toledo y González-Astorga, en prep.). Esto posibilitará en un futuro cercano efectuar un análisis a mayor escala geográfica para detallar este aspecto de la variación genética de esta especie

Análisis de autocorrelación espacial

Los modelos teóricos de genética de poblaciones predicen que las poblaciones de plantas pueden exhibir estructura genética a nivel local si el flujo génico es restringido (Smouse y Peakall 1999). De manera general, el intercambio de genes entre subpoblaciones, o incluso, dentro de una población, disminuye con la distancia (Hardy y Vekemans 1999, Smouse y Peakall 1999). Dentro de los principales factores que determinan el escaso intercambio de genes entre subpoblaciones, o vecinos distantes dentro de una población de plantas, se encuentran la capacidad limitada de dispersión de polen y semillas (Hardy y Vekemans 1999, Smouse y Peakall 1999, Epperson 2003, Escudero *et al.* 2003, Jacquemyn *et al.* 2006).

En el presente estudio, nosotros partimos con la premisa de que dadas las características de dispersión del polen y de las semillas de *Dioon merolae* era muy probable encontrar una estructura genética a nivel local. Por una parte, las semillas de *D. merolae*

son grandes ($>$ a 3 cm de longitud y en prom. 27 gr de peso), lo cual establece que sean difíciles de ser dispersadas a grandes distancias por sus agentes dispersores (que suponemos son roedores, como ya se mencionó en el capítulo 3). Por otra parte, los polinizadores son pequeños escarabajos de la familia curculionidae, los cuales, al momento de iniciar este estudio, supusimos incapaces de desplazarse a grandes distancias ($>$ 1km).

Considerando lo anterior y de acuerdo a los criterios establecidos por Epperson (2003) con base en el análisis de varios estudios de estructura genética espacial; esperaríamos que la población de *D. merolae*, en Loma Colorada, exhibiera una estructura genética espacial fuerte; no obstante que es la que menor exceso de heterocigosis mostró y la que se encuentra más aislada del conjunto de las poblaciones, seguramente en poblaciones con mayor heterocigosis esperaríamos una autocorrelación menor debido a una posibilidad menor de endogamia. Sin embargo, al realizar el análisis de autocorrelación espacial con los individuos de una hectárea en la población de Loma Colorada, encontramos una autocorrelación positiva ($r=0.06$, $P=0.01$), pero débil, entre los pares de individuos ubicados a 15 m de distancia; esto coincide parcialmente con nuestras observaciones de campo, ya que muy pocas semillas son desplazadas a distancias mayores a 15 m; pero en teoría, si las semillas son dispersadas a distancias cortas, las plántulas que resultan de dichas semillas deberían presentar una autocorrelación más fuertes. Parte del problema puede ser que el ciclo de vida de *Dioon merolae* es muy largo y existan aspectos generacionales que el análisis de autocorrelación no puede detectar en su totalidad. Algunos autores han señalado que dentro de una población los diversos estados del ciclo de vida pueden presentar diferencias en densidad, en la tasa de mortalidad y aspectos reproductivos. De tal manera, que pueden estar sometidos a distintos factores ecológicos y evolutivos que pueden provocar diferencias en la estructura genética entre cada etapa de desarrollo

(Epperson y Álvarez-Buylla 1997, Smouse y Peakall 1999, Chung *et al.* 2000, 2003, Kalisz *et al.* 2001, Jacquemyn *et al.* 2006). Considerando lo anterior, nosotros decidimos realizar un análisis de autocorrelación en tres etapas del ciclo de vida, plántulas, preadultos y adultos. Las etapas de plántulas y preadultos no presentaron autocorrelación espacial, mientras que los adultos mostró una autocorrelación entre los pares de individuos situados a 5, 15 y 20 metros, siendo los pares ubicados a 15 metros los que presentaron la autocorrelación más alta ($r=0.08$, $p 0.01$). De manera general, todo indica que en la población de Loma Colorada de *Dioon merolae* la etapa de adultos presenta mayor estructura genética espacial que otras etapas (plántulas y preadultos.).

De manera general, los estudios que han explorado la existencia de estructura genética espacial, considerando diferentes categorías de estado en una población, han reportado dos tipos de patrones de autocorrelación. Por un lado, algunas especies muestran una mayor autocorrelación en las primeras etapas de desarrollo, *i. e.* plántulas, y posteriormente esta autocorrelación va disminuyendo hacia las etapas tardías, *i. e.* adultos (Hamrick y Nason 1996, Epperson y Álvarez-Buylla 1997, Chung *et al.* 2003). Por otro lado, también se ha observado el patrón inverso, es decir, mayor autocorrelación en adultos disminuyendo en intensidad hacia plántulas (Kalisz *et al.* 2001, Jacquemyn *et al.* 2006). La reducción de estructura genética de plántulas hacia adultos se ha atribuido mayormente a una reducción en el tamaño de las cohortes debido al autoaclareo de individuos hacia categorías de edad más avanzadas (Hamrick y Nason 1996, Epperson y Álvarez-Buylla 1997, Jacquemyn 2006); mientras que el aumento de la estructura genética hacia etapas adultas, se ha relacionado con eventos históricos y selección local (Hamrick y Nason 1996, Jacquemyn *et al.* 2006).

En este estudio, se observó que las etapas de plántulas y preadultos no exhibieron autocorrelación espacial, como se puede apreciar en la figura 4.2 A y B respectivamente. Sin embargo, si se puede apreciar una autocorrelación en la etapa de adultos, figura 4.2 C. Esto puede indicar que en el pasado ocurrieron presiones de selección local, tal que, solamente algunos genotipos se vieron favorecidos para establecerse en lugares adecuados, los cuales se ubicaban a distancias medias, esto puede ser la explicación del por qué notamos una estructura genética en los individuos adultos a un intervalo de distancia de 15 m. No obstante, en la misma etapa de adultos, no se registró autocorrelación en los pares de individuos ubicados a distancias menores, p. e. 10 m, esto puede indicar que en el pasado los eventos establecimiento sucedieron de manera intermitente en el tiempo.

En teoría, la etapa de plántulas de *Dioon merolae* debería mostrar una autocorrelación positiva, ya que las semillas de las que provienen no tienen una alta capacidad de dispersión y las plántulas ubicadas en un radio relativamente corto respecto a una planta madre deberían tener algún parentesco. Sin embargo, debemos considerar que el tamaño de muestra de plántulas en la hectárea de Loma Colorada es muy reducido ($n=15$) y esto puede influir en que no observemos estructura genética en esta etapa. Además, como se puede apreciar en la figura (4.1) la densidad de individuos femeninos adultos puede ser alta, esto puede provocar que en un intervalo de distancia pequeño puedan coexistir plántulas de diferentes madres y con un bajo parentesco, lo cual se puede expresar en una ausencia de autocorrelación espacial para esta etapa. Por otra parte, la etapa de preadultos puede ser el resultado de eventos reproductivos y de establecimiento de mucho tiempo atrás, cuando las condiciones pudieron haber sido muy diferentes a las actuales, bajo este esquema, la falta de estructura en esta etapa puede interpretarse como un evento histórico en el cual solamente los genotipos más adecuados podían establecerse en sitios seguros.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN GENERAL

D. merolae es una especie rara en el sentido de que forma poblaciones pequeñas y tiene una distribución geográfica muy reducida. Además de su rareza geográfica y demográfica debida a sus características biológicas intrínsecas, el hecho de que se trate de una cícada la coloca en un nivel de amenaza aún mayor, pues las cícadas frecuentemente son sujetos de extracción ilegal con fines de ornato (Donaldson *et al.* 2003). La posible pérdida de poblaciones de cícadas por esta causa es un fenómeno particularmente grave, debido a la larga historia que tienen las cícadas en nuestro planeta y a que son los representantes conocidos más antiguos del grupo de organismos que dio origen de las plantas con semilla. Por todas estas razones, es muy común que los estudios ecológicos sobre especies de cícadas se ubiquen en el contexto de la conservación, y que la información ecológica que se va generando en torno a ellas se utilice para entender mejor sus factores de amenaza.

En este trabajo hemos abordado tres áreas de la ecología de *D. merolae*: la producción y remoción de semillas, el establecimiento de plántulas y la variación genética intra- e inter-poblacional, buscando utilizar esta última herramienta como un elemento que nos permita inferir sobre la dispersión de semillas. La razón por la cual nos hemos concentrado en las fases tempranas del ciclo de vida de esta especie es porque frecuentemente lo que ocurre con ellas funciona como un “filtro” poblacional que puede tener consecuencias importantes para el mantenimiento de las poblaciones a largo plazo (Harper 1977; Silvertown y Lovett-Doust 1993). Por otro lado, en el caso de organismos tan longevos como la mayoría de las cícadas, en las que los procesos poblacionales relevantes ocurren seguramente en la escala de décadas (Stembergh y Lowe 1973, Vovides 1992, Raimondo y Donaldson 2003) y, por lo tanto, es prácticamente imposible evaluarlos

en detalle, existe la opción de estudiar sus procesos ecológicos más dinámicos (i.e. los destinos de las fases tempranas) y a partir de ellos inferir sobre sus repercusiones demográficas. En este contexto, a continuación discutiremos la relevancia de los resultados obtenidos en cada una de las secciones de la tesis y buscaremos interpretarlos a la luz de la dinámica poblacional y conservación de esta especie.

5.1 Producción y remoción de semillas

Se observó que el *seed set* de los conos femeninos de *D. merolae* fue de cerca del 77%. A pesar de que el número de conos observados no fue muy alto (n=8) y de que se obtuvo este dato sólo en una población y en un único evento reproductivo, la variación en torno a esa media no fue muy elevada (intervalo: 69 – 88%), por lo que puede suponerse que esta estimación no se hubiera modificado mucho de tener un tamaño de muestra mayor o un muestreo más extendido espacio-temporalmente. Vemos, entonces, que el *seed set* es elevado y que la producción de semillas de *Dioon merolae* no parece ser un proceso crítico para la persistencia de sus poblaciones. En otros estudios realizados con cícadas se han calculado *seed sets* más bajos (53.7 para *Zamia amblyphyllidia* y 68.2 para *Cycas armstrongii*, Negrón-Ortiz *et al.* 1996, Watkinson y Powell 1997). Sin embargo, Donaldson (1993) reportó que algunas cícadas del género *Encephalartos* muestran periodos de alta producción de semillas (*mast-seeding*), lo cual sugiere que la variación interanual en la producción de semillas puede ser grande. La producción de conos y semillas en las poblaciones estudiadas de *D. merolae* no parece haber variado tanto a través del tiempo, de acuerdo con nuestras observaciones de campo (desde 2005 a la fecha); sin embargo,

claramente este es un aspecto que debe evaluarse con más detalle para poder concluir de manera más clara sobre esta posible limitante reproductiva para el crecimiento poblacional.

Como mencionamos en el capítulo 4, existe una estrecha relación entre el gorgojo polinizador, *Parallocorynus sp.* y nuestra especie en estudio. El gorgojo lleva a cabo todo su ciclo de vida en los conos y aparentemente es el único polinizador de esta planta, la cual depende totalmente del gorgojo para su polinización (Maldonado-Ruíz 2008). Lo anterior sugiere que el alto *seed set* de *D. merolae* es producto de la alta eficiencia del polinizador. Las posibles variaciones interanuales en la producción de semillas pueden estar asociadas, por lo tanto, a la variación en la actividad y abundancia de los gorgojos, pues el otro componente de esta producción, la emergencia de conos femeninos, parece ser bastante constante (i.e. en los tres años que se ha estado visitando la población, cada año se observa más o menos el mismo número de conos por hectárea).

Una de las preguntas derivadas de este trabajo y que aún queda por contestar, es sobre el grado de parentesco genético de las semillas que produce un cono femenino y sobre las repercusiones que tiene este probable parentesco en la estructura genética espacial de la siguiente fase de desarrollo, *i. e.* plántulas. En la población de Loma Colorada se ha visto que la producción de conos masculinos es más sincrónica y abundante que la de conos femeninos. Dadas estas condiciones, es posible que varios conos masculinos aporten polen a un mismo cono femenino y que, por lo tanto, las semillas producidas sean medias hermanas entre ellas, iniciando desde la fase de formación de semillas cierta diferenciación que se va acentuando hacia etapas posteriores del ciclo de vida como plántulas y juveniles.

Otro aspecto importante de la ecología de semillas de *D. merolae* que evaluamos en este estudio fue lo relacionado con su remoción por dispersores potenciales. En principio, la teoría ecológica sugiere que la dispersión de semillas lejos de la planta parental puede ser

uno de los factores que afecte su éxito subsecuente (Janzen 1970, Howe y Smallwood 1982, Muller-Landau 2000). Esto se ha explorado muy limitadamente en cícadas. Entre los estudios que se encuentran referidos en la literatura, se documenta que la mayoría de las semillas de las especies de cícadas permanecen cerca de la planta parental (Burbridge y Whelan 1982, Ballardie y Whelan 1986, Tang 1989). En *Encephalartus cycadifolius* se exploró el éxito de las semillas dispersadas, pero no con respecto a la distancia de la planta parental, sino al tipo de microambiente en el que fueron depositadas: las semillas depositadas en sitios sombreados presentaron mayor porcentaje de germinación que las depositadas en sitios soleados (Tang 1989, Raimondo y Donaldson 2003).

En el caso de nuestra especie de estudio, no estudiamos en detalle el proceso de dispersión, pero sí abordamos un aspecto del mismo: la remoción de semillas, que fue del 15% en un periodo de cinco días y que no se vio afectada por la distancia a la planta madre, ni por la orientación con respecto a la misma, pero sí por la densidad (en interacción con el tiempo). Otros estudios realizados con cícadas han reportado mayores porcentajes de remoción, e. g., 30% en *Zamia amblyphyllidia* (Negrón-Ortiz *et al* 1996) y 60% en *Zamia pumila* (Tang 1989), aunque en éstos se utilizaron periodos de tiempo mayores (*i. e.* dos meses). Sin embargo, en uno de los sitios de estudio de Tang (1989, en los Everglades, Florida, durante febrero) sí se registraron porcentajes de remoción muy similares (16%) a los que nosotros observamos en *D. merolae*, a pesar de que en su estudio se siguió el experimento por todo un mes. Como puede concluirse de este análisis, el porcentaje de remoción de semillas debe variar entre sitios, entre épocas del año, y por supuesto, entre especies. Es importante llevar a cabo estudios de dispersión de semillas más detallados para tener una idea de en qué medida este proceso afecta su germinación y establecimiento subsecuentes, por ejemplo, como resultado del mordisqueo de la testa por parte de los

roedores o a través del transporte de las semillas hacia sitios seguros. Estos temas siguen siendo una interrogante en el caso de *D. merolae*.

5.2 Éxito del establecimiento de plántulas

Como se vio en el análisis de la estructura poblacional, la categoría de plántulas está muy escasamente representada en las cuatro poblaciones analizadas en este estudio. Otros estudios en cícadas también han detectado una escasa representación de plántulas (Negrón Ortiz *et al.* 1996, Vovides *et al.* 1997, Raimonddo y Donaldson 2003, Flores-Vázquez *et al.* 2007).

Negrón-Ortiz *et al.* (1996) registraron una producción relativamente alta de semillas en *Z. amblyphyllidia*, pero al cabo de tres años sólo entre el 1% y el 2% de las mismas eran plántulas vivas. Esto ejemplifica cómo las primeras etapas del ciclo de vida efectivamente constituyen un filtro poblacional muy importante en estas especies. Sin embargo, en ese mismo trabajo Negrón-Ortiz *et al.* (1996) reportan que una vez que las plántulas emergen, su tasa de supervivencia es mucho mayor (de 60% a los ocho meses, aunque después de 24 meses baja a 20%). En *D. merolae*, los experimentos de germinación realizados por J.L. Lucas mostraron porcentaje de germinación altos (de 70%). Las plántulas resultantes, que se utilizaron en los experimentos de campo en la población de Loma Colorada, mostraron también una alta una tasa de supervivencia (37%) después de ocho meses. Como puede inferirse de estos resultados, la germinación en sí misma no parece constituir una etapa crítica, ni tampoco la supervivencia de las plántulas una vez que ya emergieron. La baja representación de la etapa de plántulas en las poblaciones debe estar dada, por consiguiente, por el alto riesgo que experimentan las plántulas en su etapa más temprana, entre la germinación de la semilla y la emergencia de la plántula.

Por otra parte, la supervivencia de las plántulas de *D. merolae* fue igualmente exitosa en las diferentes condiciones lumínicas y de profundidad de suelo probadas. Esto mismo se observó en *Zamia pumila*, en la que no se encontró una supervivencia diferencial de plántulas en sitios sombreados y soleados (Tang 1989). Asimismo, en una cícada africana, *Encephalartos cycadifolius*, se encontró que la supervivencia de plántulas fue similar en sitios sombreados y soleados (Raimondo y Donaldson 2003). De acuerdo con esta evidencia, aparentemente la calidad lumínica del micrositio es importante para la germinación de semillas, pero no para la supervivencia de las plántulas. En ningún otro trabajo se ha analizado el efecto de la profundidad de suelo. Nosotros lo habíamos considerado como un factor potencialmente importante porque seguramente afecta la disponibilidad de humedad para las plántulas. Sin embargo, no se obtuvo una supervivencia contrastante entre los dos tipos de microambientes edáficos probados. Obviamente nuestros resultados y los de otros autores cuentan con evaluaciones sólo en el corto plazo. Es necesario llevar a cabo estudios a más largo plazo para entender en mayor detalle el efecto del microambiente de las plántulas y juveniles sobre su supervivencia, y para comprender de qué manera lo que ocurre en esas etapas del ciclo de vida limitan el crecimiento de las poblaciones.

5.3 Variación genética

Como ya se menciona en el capítulo 4, muchas cícadas presentan bajos niveles de variación genética a nivel de especie, además de una baja diversidad genética al interior de las poblaciones (Yang y Meerow, 1996; Keppel *et al.* 2002; Lin *et al.* 2000; Sharma *et al.* 1998, 1999). En algunos de estos casos se observa, por otro lado, un alto grado de diferenciación entre poblaciones (Yang y Meerow, 1996; Keppel *et al.* 2002; Lin *et al.*

2000). Estas características tienen repercusiones importantes en el contexto de la conservación, pues los bajos niveles de variabilidad genética probablemente sean el resultado de la disminución en el tamaño poblacional, a partir de lo cual puede surgir una mayor pérdida de diversidad genética por deriva génica y por endogamia, limitando la viabilidad de las poblaciones (Soulé 1987, Lande y Barrowclough 1987, Menges 2000).

Para el caso de *Dioon merolae*, observamos una alta diversidad genética en todos los sentidos: a nivel de la especie, al seno de cada población y entre poblaciones. Incluso si consideramos aisladamente a la población de San Antoñito, la cual presentó la menor variación genética intra-poblacional, el porcentaje de loci polimórficos y los valores de heterocigosis fueron mayores que los reportados para cualquier otra especie de cícada. Lo anterior nos habla del buen estado de diversidad genética de que gozan todas las poblaciones consideradas en este estudio. Los altos valores de diversidad genética obtenidos en este estudio, muy altos porcentajes de loci polimórficos y altos niveles de heterocigocidad, coinciden, en gran medida, con la alta variación genética registrada en *Dioon merolae* en un amplio intervalo de distribución en Oaxaca y Chiapas. (Cabrera-Toledo en prep.). Además, las distancias genéticas entre la población de Loma Colorada, la cual se analizó en el presente estudio, y las poblaciones de Jiquipilas 1 y 2 de *Dioon merolae*, en Chiapas, es muy cercana; lo cual indica que muy probablemente se trate de la misma especie. Lo anterior, implica que *Dioon merolae* puede ser una de las especies del género con distribución geográfica relativamente amplia y con la mayor diversidad genética registrada para el género; esta diversidad genética sería, muy similar en cada una de las poblaciones en todo su intervalo de distribución. Otra especie del género con distribución geográfica más amplia, *Dioon edule*, muestra menor variación genética (González-Astorga et al. 2003). Asimismo, otra especie del género, *Dioon caputoi*, la cual presenta una

distribución geográfica restringida, registra una menor diversidad genética (Cabrera-Toledo en prens.)

Una característica demográfica importante de las poblaciones estudiadas de *D. merolae* es que sus estructuras poblacionales estuvieron dominadas por la etapa de adultos. Esta misma etapa del ciclo de vida la que mostró la mayor diversidad genética. Tomando en cuenta, además, que la mayoría de los modelos demográficos aplicados a cícadas y a otras especies longevas de lento crecimiento sugieren que los adultos son los que contribuyen en mayor medida a la dinámica poblacional (Silvertown *et al.* 1993; Esparza-Olguín *et al.* 2005; Raimondo y Donaldson 2003; Vovides 1990), podemos concluir que esta etapa del ciclo de vida es de gran importancia para la conservación de esta especie, tanto desde el punto de vista genético como demográfico.

Por otra parte, los adultos de *D. merolae* mostraron una estructuración genética espacial, pues se vio que tienen un mayor parentesco genético del esperado por azar a distancias de aproximadamente 15 m. En principio, esto podría llevar a un cierto riesgo de endogamia. Sin embargo, en la etapa de plántulas, las cuales surgen de la dispersión y el establecimiento de las semillas producidas por los adultos, no se encontró una estructura genética espacial. Esto podría llevar, a largo plazo, a que disminuya el riesgo de endogamia en la población de Loma Colorada, pues los nuevos individuos que se están incorporando a la población difieren genéticamente entre ellos a pesar de encontrarse establecidos a distancias cortas. Probablemente, la alta densidad a la que se presentan los adultos en esta población, y consecuentemente la cercanía entre ellos, determine que las sombras de semillas de dos o más hembras se superpongan, contribuyendo así a la baja estructura genética espacial encontrada entre las plántulas.

A pesar de que los adultos que se encuentran cercanos en el espacio (*ca.* 15 m) se parecen genéticamente, es probable que no se reproduzcan entre ellos, evitando así la endogamia, pues los eventos de producción de conos no necesariamente se dan en sincronía. Además, como ya se mencionó en el capítulo 4, la polinización puede ocurrir entre individuos que se encuentran a distancias relativamente grandes (57 m), lo cual llevaría a aumentar la diversidad genética en la progenie.

En resumen, aparentemente tanto la dinámica poblacional como la genética de poblaciones de *D. aff. merolae* dependen fuertemente de la etapa de adultos y, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, no parece existir un riesgo demográfico y/o genético que incida negativamente en la posible persistencia de las poblaciones estudiadas de *D. merolae*. Aún así, es necesario profundizar nuestra comprensión sobre los procesos que ocurren entre la germinación de semillas y el establecimiento de las plántulas, que en este trabajo no se abordaron con tanto detalle y que parecen ser cruciales para la demografía de estas poblaciones; de hecho, la escasez de la etapa de plántulas sugiere que a largo plazo podría disminuir la abundancia de *D. merolae*. Por otro lado, es necesario evaluar los efectos demográficos y genéticos de la extracción de hojas y adultos con fines ornamentales, factores que pueden convertirse en un riesgo para la estabilidad de las poblaciones.

5.4 Conclusiones.

1. La producción de semillas en *Dioon merolae* no parece limitar el crecimiento poblacional.
2. La supervivencia de las plántulas fue alta y no hubo un efecto significativo de la intensidad lumínica ni de la profundidad del suelo.
3. Los niveles de variación genética inter e intrapoblacional en *Dioon merolae* son altos comparados con otras cícadas y con otras especies de plantas dioicas de vida larga.
4. Existe una autocorrelación espacial entre los individuos ubicados a una distancia de 15 m, los cuales comparten más alelos en común de lo que se esperaría por azar
5. La estructura genética espacial es más intensa en la etapa de adultos, lo cual sugiere que las presiones de selección en el pasado fueron diferentes a las que se presentan actualmente en las etapas tempranas del ciclo de vida..
6. La etapa de adultos es muy importante para los procesos demográficos y genéticos de *Dioon merolae* y, por ende, gran parte del funcionamiento de las poblaciones depende de esta etapa.
7. la vulnerabilidad de las poblaciones de *Dioon merolae* no parece estar relacionada con aspectos reproductivos o genéticos. Todo parece indicar que los principales factores de riesgo para esta cícada son: su distribución restringida, el tamaño reducido de sus poblaciones, la destrucción del hábitat y la extracción ilegal.

6. LITERATURA CITADA

- Aguirre-Fey, D. 2004. Demografía y genética de poblaciones de *Zamia loddigesii* Miq. (Zamiaceae) en el centro de Veracruz. Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana.
- Ballardie, R. T. y R. J. Whelan. 1986. Masting, seed dispersal and seed predation in the cycad *Macrozamia communis*. *Oecologia* 70: 100-105.
- Bongers, F., J. Popma, J. Meave del castillo y J. Carabias. 1988. Structure and floristic composition of the lowland rain forest in Los Tuxtlas, Mexico. *Vegetatio* 74: 55-80.
- Boyce, M. S. 1992. Population viability analysis. *Annual Review of Ecology and Systematics* 23: 481-506.
- Burbidge, A. H. y R. J. Whelan. 1982. Seed dispersal in a cycad, *Macrozamia riedlei*. *Australian Journal of Ecology* 7: 63-67.
- Byrne, M. y S. H. James. 1991. Genetic diversity in the cycad, *Macrozamia riedlei*. *Heredity* 67: 35-39.
- Challenger, A. 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México: pasado, presente y futuro. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Instituto de Biología, UNAM y Agrupación Sierra Madre, S. C. México, D.F.
- Chao-Luan, L. Q. Wang, S. Y. Jiang y Ge Wang. 1999. Genetic diversity of allozymes in populations of *Cycas panzihuaensis* L. Zhou and S. Y. Yang. En: C. J. Chen (ed.) *Biology and conservation of cycads. Proceedings of the fourth International Conference on Cycad Biology*. Beijing. International Academic Publishers, 323-327.
- Chung, M. G. M. Y. Chung, G. S. Oh y B. K. Epperson. 2000. Spatial genetic structure in *Neolitsea sericea* population (Lauraceae). *Heredity* 85: 490-497.
- Chung, M Y., B. K: Epperson y M. G. Chung. 2003. Genetic structure of age classes in *Camellia japonica* (Theaceae). *Evolution* 57: 62-71.
- Clark, D. A. y D. B. Clark. 1987. Temporal and environmental patterns of reproduction in *Zamia skinneri*, a tropical rain forest cycad. *Journal of Ecology* 75: 135-149.
- Clark, D. B. y D. A. Clark. 1988. Leaf production and the cost of reproduction on in *Zamia skinneri*. *Journal of Ecology* 76: 2-11.
- Cournet, J. M. y G. Liukart. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.
- De Luca, P., S. Sabato y M. Vázquez-Torres. 1981. *Dioon merolae* (Zamiaceae), a new species from Mexico. *Brittonia* 33: 179-183.

- Donaldson, J. S., K. D. Hill y D. W. Stevenson. 2003. Cycads of the World: An Overview. En: J. S. Donaldson (ed.) Cycads, Status survey and conservation action plan. Gland, Switzerland: IUCN 3-8.
- Eckenwalder, J. E. 1980. Dispersal of the West Indian cycad, *Zamia pumila* L. *Biotropica* 12: 79-80.
- Ellstrand, N. C., R. Ornduff y J. M. Clegg. 1990. Genetic structure of the Australian cycad. *Macrozamia communis* (Zamiaceae). *American Journal of Botany* 77: 677-681.
- Ellstrand, N. C. y D. R. Elam. 1993. Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 217-242.
- Epperson, B. K. y E. Álvarez-Buylla. 1997. Limited seed dispersal and genetic structure in life status of *Cecropia obtusifolia*. *Evolution* 51: 275-282.
- Epperson, B. K. 2003. *Geographical Genetics*. Princeton University Press.
- Escudero, A., J. M. Iriondo y M. E. Torres. 2003. Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biological Conservation* 113: 351-365.
- Esparza-Olguín, L. 2004. ¿Qué sabemos de la rareza en especies vegetales? Un enfoque genético-demográfico. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 75: 17-32.
- Flores-Vázquez, J. C., S. Salas-Morales, A. Saynes-Vásquez. 2007. The populations of *Dioon caputoi* in the Tehuacán-Cuicatlán Biosphere Reserve. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 97: 388-399.
- Frankham, R. 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation* 126: 131-140.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen.
- Gaston, K. J. 1994. *Rarity*. Chapman and Hall. Londres.
- González-Astorga, J., A. P. Vovides, M. Ferrer y C. Iglesias. 2003. Population genetics of *Dioon edule* Lindl. (Zamiaceae, Cycadales): biogeographical and evolutionary implications. *Biological Journal of Linnean Society* 80: 457-467.
- González-Astorga, J., A. P. Vovides, A. Cruz-Angón, P. Octavio-Aguilar y C. Iglesias. 2005. Allozyme variation in three extant populations of the narrowly endemic cycad *Dioon angustifolium* Miq. (Zamiaceae) from north-eastern Mexico. *Annals of Botany* 95: 999-1007.
- González-Astorga, J., A. P. Vovides, P. Octavio-Aguilar, D. Aguirre-Fey, F. Nicolalde-Morejón y C. Iglesias. 2006. Genetic diversity and structure of the cycad *Zamia loddigessi*

Miq.(Zamiaceae): implications for evolution and conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society* 152: 533-544.

Gregory, T. J. y J. Chemnick. 2004. Hypothesis on the relationship between biogeography and speciation in *Dioon* (Zamiaceae). In: Walters T. y R. Osborne (eds.) *Cycad classification: concepts and recommendations*. Wallingford, Oxon: CABI Publishing. 137-148.

Hamrick, J. L. y M. W. J Godt. 1996. Conservation Genetics of Endemic Plant Species. En: J. C. Avise y J. L. Hamrick (eds.) *Conservation genetics. Case histories from nature*. New York, Chapman and Hall, 281-304.

Hamrick, J. L. y J. D. Nason. 1996. Cosequences of dispersal in plants. En: O. E. J. Rhodes, R. K. Chesser y M. H. Smith (eds.) *Population dynamics in ecological space and time*. The University Chicago Press. 203-236.

Hamrick, J. L. 2004. Response of the forest trees to global environmental changes. *Forest Ecology and Management* 197: 323-335.

Hardy, O. J. y X Vekemans. 1999. Isolation by distance in a continuous population: reconciliation between analysis and population genetics models. *Heredity* 83: 145-154.

Hedrick, P. W. 2000. *Genetics of population*. Second edition, Jones and Bartlett Publishers.

Hill, K. D., D. W. Stevenson y R. Osborne. 2007. The World cycad list [La lista mundial de cícadas]. *Memoirs of the New York Botanical garden* 97: 454-483.

Howe, H. F. y J. Smallwood. 1982. Ecology of seed dispersal. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13. 201-228.

Jacquemyn, H., R. Brys, K. Vadepitte, O. Honnay e I. Roldán-Ruiz. 2006. Fine-scale genetic structure of life history stages in the food-deceptive orchid *Orchis purpurea*. *Molecular Ecology* 15: 2801-2808.

Kalisz, S., J. D. Nason, F. M. Hanzawa y S. J. Tensor. 2001. Spatial population genetic structure in *Trilium grandiflorum*: the roles of dispersal, mating, history and selection. *Evolution* 55: 1560-1568.

Keppel, G., S. W. Lee y P. D. Hodgskiss. 2002. Evidence for large isolation among populations of Pacific cycads: genetic diversity and differentiation in *Cycas seemannii* A. Br. (Cycadaceae). *Journal of Heredity* 93: 133-139.

Lande, R. y G. F. Barrowclough. 1987. Effective population size, genetic variation and their use in populations management. En: M. E. Soulé (ed.) *Viable populations for conservation*. Cambridge University Press. p. 87-123.

- Lande, R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science* 241: 1455-1460.
- Lin, T. P., Y. S. Lo y H. C. Cheng. 2000. Low genetic diversity of *Cycas taitungensis* (Cycadaceae), an endemic species in Taiwan, revealed by allozyme analysis. *Taiwan Journal of Forest Science* 15: 13-19.
- Luikart, G. y J. M. Cournet. 1998. Empirical evaluation of test for Identifying recently bottleneck populations from allele frequency data. *Conservation Biology* 12: 228-237.
- Mace, G. M. y R. Lande. 1991. Assessing extinction threats: Toward a reevaluation of IUCN threatened species categories. *Conservation Biology* 5: 148-157.
- Maldonado Ruíz M. de F. 2008. Fenología de estructuras reproductivas y polinizadores de *Dioon* sp. nov. En San Jerónimo Taviche, Oaxaca. Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca.
- Martínez-Ramos M. y E. Álvarez-Buylla. 1995. Ecología de poblaciones de plantas en selvas húmedas de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 56: 121-153.
- Menges, E. S. 2000. Population viability analyses in plant, challenges and opportunities. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 51-56.
- Moynihan, J., A. W. Meerow y J. Francisco-Ortega. 2007. Isolation and cross-species amplification of microsatellite loci in the cycad genus *Dioon* (Zamiaceae). Potential utilization in population genetics studies of *Dioon edule*. *Molecular Ecology Notes* 7: 72-74.
- Muller-Landau, H. C., S. J. Wright, O. Calderón, S. P. Hubell y R. B. Foster. 2002. Recruitment Limitation: Concepts, Methods and Case-studies from a Tropical Forest. En: D. J. Levy, W. R. Silva y M. Galletti (eds.) *Seed dispersal and frugivory: Ecology, Evolution and Conservation..* CAB. International. p. 35-52.
- Nathan, R. y H. C. Muller-Landau. 2000. Spatial patterns of seed dispersal, their determinants and consequences for recruitment. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 278-285.
- Negrón-Ortíz, V. y G. J. Breckon. 1989a. Population structure in *Zamia debilis* (Zamiaceae) I. Size classes, leaf phenology, and leaf turnover. *American Journal of Botany* 76: 891-900.
- Negrón-Ortíz, V. y G. J. Breckon. 1989b. A note on the dispersal of *Zamia* (Zamiaceae) in Puerto Rico. *Caribbean Journal of Science* 25: 86-87
- Negrón-Ortíz, V., D. I. Gorchov y G. J. Breckon. 1996. Population structure in *Zamia* (Zamiaceae) in northern Puerto Rico. II. Seed germination and stage-structured population projection. *International Journal of Plant Science* 157: 605-614.

- Norstog, K. y T. J. Nicholls. 1997. *The Biology of the cycads*. Ithaca and London: Cornell University Press.
- Oostermeijer, J. G. B., S. H. Luitjen y J. C. M. den Nijs. 2003. Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation. *Biological Conservation* 113: 389-398.
- Ornduff, R. 1989. Size distribution and coning behavior of the Australian cycad *Lepidozamia peroffskyana*. *Australian Journal of Ecology* 14: 241-245.
- Ornduff, R. 1990. Geographic variation in reproductive behavior and size structure of the Australian cycad *Macrozamia Communis* (Zamiaceae). *American Journal of Botany* 77: 92-99.
- Ortiz-Pérez M. A., J. R. Hernández-Santana y J. M. Figueroa Mah-Eng. 2004. Reconocimiento fisiográfico y geomorfológico. En: A. J. García-Mendoza, M. J. Ordoñez y M. Briones-Salas (eds.) *Biodiversidad de Oaxaca*. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund, México, p. 43-54.
- Pérez-Farrera, M. A. y A. P. Vovides. 2004. spatial distribution, population and fecundity of *Ceratozamia matudai* Lundell (Zamiaceae) in El Triunfo Biosphere Reserve, Chiapas, Mexico. *The Botanical Review* 70: 299-311.
- Pérez-Farrera, M. A., A. P. Vovides, P. Octavio-Aguilar, J. González-Astorga, J. de la Cruz, R. Hernández-Jonapá y S. Maza. 2006. Demography of the cycad *Ceratozamia mirandae* (Zamiaceae) under disturbed and undisturbed conditions in a biosphere reserve of Mexico. *Plant Ecology* 187: 97-108.
- Peters, C. M. 1994. Sustainable harvest of non-timber plant resources in tropical moist forest: An ecological primer. USAID.
- Piry, S., G. Luikart y J. M. Cournet. 1999. A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *The Journal of Heredity* 90: 502-503.
- Pyke, D. y J. Thompson. 1986. Statistical analysis of survival and removal rate experiments. *Ecology* 67: 240-245.
- Rabinowitz, D. 1981. Seven forms of rarity. En: H. Sygne (ed.) *The biological aspects of rare plants conservation*. John Wiley and Sons. USA. p. 205-217.
- Raimondo, D. C. y J. S. Donaldson. 2003. Responses of cycad with different life histories to the impact of plant collecting: simulation models to determine important life history stages and population recovery times. *Biological Conservation* 111: 345-358.
- Ricketts, T. H., Dirnestein, E., Broucer T., Brooks T. M. Butchart S.H.M., Hoffman M., Lamoreux J.F. Morrison, J. Parr M. Pilgrim, J.D., Rpodroques A.S.L., Scherst W., Wallace

G.E. Berlin K. Bielby J., Burgess N.D., Church D.R., Cox N., Knox D., Loucks C. Luck G.W., Master L.L., Moore R., Naidoo R. Riedgely r.Schatz G.E. Shire G. 2005. Pinpointing and preventing imminent extinctions. Proceedings of the national Academy of Sciences USA 102: 18497-118501.

Sabato, S. y P. De Luca. 1985. Evolutionary trends in *Dion* (Zamiaceae). American Journal of Botany 72: 1353-1363.

Schemske, D. W., B. C. Husband, M. H. Ruckelshaus, C. Goodwillie, I. M. Parker y J. G. Bishop. 1994. Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants. Ecology 75: 584-606.

Schneider, D., M. Wink, F. Sporer y P. Lounibos. 2002. Cycad: their evolution, toxins, herbivores and insect pollinators. Naturwissenschaften 89: 281-294.

Schupp, E. W. 1995. Seed-seedling conflicts, habitat choice and patterns of plant recruitment. American Journal of Botany 82: 399-409.

Sharma, I. K., D. L. Jones, P. I. Foster y A. G. Young. 1998. The extant and structure of genetic variation in The *Macrozamia pauli-guilielme* complex. (Zamiaceae). Biochemical Systematics and Ecology 26: 45-54.

Sharma, I. K., D. L. Jones, P. I. Foster y A. G. Young. 1999. Low isozimic differentiation among five species of the *Macrozamia heteromera* group (Zamiaceae). Biochemical Systematics and Ecology 27: 67-77.

Smouse, P. E. y R. Peakall. 1999. Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. Heredity 82: 561-573.

Spielman, D., B. W. Brook, R. Frankham. 2004. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1001: 1521-1526.

Stevenson, D. W., A. P. Vovides y J. Chemnick. 2003. Regional overview: New World. En: J. S. Donaldson (ed.), Status survey and conservation action plan. Cycads. The World Conservation Union, Cambridge. p. 31-38.

Taberlet, P., A. Valentini, H. R., Rezaei, S. Naderi, F. Pompanon, R. Negrini y J. Ajmone-Marsen. 2008. Are cattle, sheep and goats endangered species? Molecular Ecology 17: 257-284.

Tang, W. 1989. Seed dispersal in the cycad *Zamia pumila* in Florida. Canadian Journal of Botany 67: 2066-2070.

Trejo, I. y R. Dirzo. 2000. Deforestation of seasonally dry tropical forest: a national and local analysis in Mexico. Biological Conservation 94: 132-142.

- Turnebull, L. A., M. J. Crawley y M. Rees. 2000. Are plant population seed-limited? A review of seed sowing experiments. *Oikos* 88: 225-238.
- Vovides, A. P. 1990. Spatial distribution, survival and fecundity of *Dioon edule* (Zamiaceae) in a tropical deciduous forest in Veracruz, Mexico, with note on its habitat. *American Journal of Botany* 77: 1532-1543.
- Vovides, A. P., N. Ogata, V. Sosa y E. Peña-García. 1997. Pollination of endangered Cuban cycad *Microcycas calacoma* (Miq.) A. DC. *Botanical Journal of Linnean Society* 152: 201-210.
- Vovides, A. P. 1999. Flora del Bajío y regiones adyacentes. Fascículo 71. Familia Zamiaceae. Instituto de Ecología, A. C. Centro Regional del Bajío Pátzcuaro, Michoacán. México.
- Vovides, A. P. 2000. México: Segundo lugar mundial en diversidad de cícadas. *Biodiversitas* 31: 6-10.
- Vovides, A. P., M. A. 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). *Current Topics in Plant Biology* 4: 159-174.
- Watkinson, A. R. y J. C. Powell. 1997. The life history and population structure of *Cycas armstrongii* in monsoonal northern Australia. *Oecologia* 111: 341-349.
- Walters, T. W. y D. Decker-Waltres. 1991. Patterns of allozyme diversity in the West Indies cycad *Zamia pumilla* (Zamiaceae). *American Journal of Botany* 78: 436-445.
- Wendel, J. F. y Weeden N. F. 1989. Visualization an interpretation of plant isoenzymes. En: Soltis, D. E. y P. S. Soltis (eds.). *Isoenzymes in plant biology*. Portland Oregon. USA: Dioscorides Press. p. 5-45.
- Wier , B. S. y Cockerham, C. C. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of populations structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Yang, S. L. y A. W. Meerow. 1996. The *Cycas pectinata* (Cycadaceae) complex: genetic structure and gene flow. *International Journal of Plant Sciences* 157: 468-483.