

# UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

## TESIS

VARIACIÓN GENÉTICA DE *Zamia prasina* W.  
BULL 1881 (ZAMIACEAE)

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

**BRENDA YESENIA VELASCO MARTÍNEZ**

DIRECTOR

**DR. MIGUEL ÁNGEL PÉREZ FARRERA**  
UNICACH

CO-DIRECTOR

**ANDREW P. VOVIDES**  
INVESTIGADOR DEL INECOL

ASESOR

**DR. SERGIO LÓPEZ MENDOZA**  
UNICACH



# ÍNDICE

## RESUMEN

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>II.</b>	<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>8</b>
2.2.1.	Descripción de la familia Zamiaceae.....	8
2.2.2.	Descripción y biología de la especie <i>Zamia prasina</i> .....	8
2.2.3.	Situación importancia y riesgo .....	10
2.2.4.	Mecanismos de evolución .....	11
2.2.5.	Marcadores moleculares .....	13
<b>III.</b>	<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>15</b>
3.3.1.	Estudios genéticos .....	15
<b>IV.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
4.4.1.	Objetivo general .....	17
4.4.2.	Objetivos específicos .....	17
<b>V.</b>	<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>17</b>
<b>VI.</b>	<b>MÉTODO .....</b>	<b>18</b>
6.6.1.	Área de estudio.....	18
6.6.2.	Análisis genético.....	19
6.6.3.	Extracción y visualización del ADN.....	19
6.6.4.	Amplificación del ADN.....	20
6.6.5.	Análisis estadístico .....	22
<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
7.7.1.	Amplificación del ADN.....	23
7.7.2.	Frecuencias alélicas y polimorfismo .....	23
7.7.3.	Heterocigosidad y equilibrio de Hardy-Weinberg .....	25
7.7.4.	Coeficiente de endogamia.....	27
7.7.5.	Diferenciación genética y flujo génico.....	28
7.7.6.	Distancias genéticas.....	30
<b>VIII.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>31</b>

<b>IX. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>38</b>
<b>X. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>39</b>
<b>XI. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>40</b>
<b>XII. ANEXOS.....</b>	<b>52</b>
<b>Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN por el método-CTAB cloroformo para plantas.....</b>	<b>52</b>
<b>Anexo 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) para visualización de ADN.....</b>	<b>54</b>
<b>Anexo 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida para ADN.....</b>	<b>55</b>

## RESUMEN

*Zamia prasina* pertenece al grupo de las Cicadas, plantas que tienen una suma importancia por su valor histórico, es decir son un grupo muy antiguo perteneciente a la era Paleozoica sin embargo el género *Zamia* es de época más reciente. La especie se encuentra distribuida en poblaciones de la Península Yucatán, Chiapas y Tabasco más una población de Belice refiriéndonos que es una especie de amplia distribución por su ocupación territorial. El estudio que se realizó en esta investigación se trató de la variabilidad genética de las seis poblaciones a través del uso de diez microsatélites (SSR). Los resultados de la diversidad genética fueron altos; (A) porcentaje de loci polimórfico del 90%, el promedio de alelos por locus de 2.66, la heterocigosidad observada de 0.282 y esperada de 0.434. Las poblaciones muestran un déficit de heterocigotos existiendo un desequilibrio de Hardy-Weinberg. Las grandes distancias geográficas y el aislamiento entre las poblaciones dieron como resultado una alta diferenciación genética de 0.209. El AMOVA reveló una variación genética del 83% dentro de las poblaciones. La distribución de la especie hizo que se obtuviera un valor alto de flujo génico de 2.453 manifestando que anteriormente el flujo de genes fue muy activo. Al estudiar las distancias genéticas se determinaron tres grupos Tabasco-Belice, Chiapas-Yucatán y Quintana Roo-Campeche, poblaciones que ahora están aisladas y que en un momento de su historia de vida se comportaron como una sola población.

## I. INTRODUCCIÓN

Las cícadas constituyen el grupo de plantas seminíferas vivientes más primitivas, procedentes de finales de la era Paleozoica (Carbonífero- Pérmico), hace unos 230 millones de años. En el presente son presumiblemente el grupo más antiguo de entre las Gimnospermas (Chamberlain, 1919; Eckenwalder, 1980). Sin embargo, estudios recientes parecen demostrar que los géneros actuales son relativamente recientes (Nagalingum *et al.*, 2011).

El orden Cycadales consta de dos familias: Cycadaceae y Zamiaceae (Christenhusz *et al.*, 2011). Zamiaceae incluye, el mayor número de géneros descritos en el orden con nueve géneros y en el Neotrópico están presentes cuatro: *Microcycas* (Miq.) A. DC., endémico de Cuba; *Ceratozamia* Brongn., *Dioon* Lindl., endémicos de México, y *Zamia* L. Este último género con 71 especies (Osborne, *et al.*, 2012). Actualmente el género se restringe principalmente para el Neotrópico, distribuido desde el sur de Estados Unidos, el Oeste de México, hasta Bolivia y Brasil (Stevenson, 2001; Jones, 2002); es también, uno de los géneros del orden Cycadales más difíciles de caracterizar (Norstog y Nicholls, 1997), debido a que sus patrones de variación morfológica, ecológica, citológica (Marchant, 1968; Vovides, 1983, 1985; Moretti y Sabato, 1984; Moretti, 1990; Moretti *et al.*, 1991; Vovides y Olivares 1996; Norstog y Nicholls, 1997; Nicolalde-Morejón *et al.*, 2009) y genética (González-Astorga *et al.*, 2006; Limón, 2009) son muy complejos.

A nivel mundial existen aproximadamente 331 especies de cícadas y en México 54 especies (Osborne *et al.*, 2012; Nicolalde-Morejón *et al.*, 2013) de las cuales más de 90% son endémicas y nuestro país está considerado como uno de los centros de mayor diversidad en el mundo ocupando el segundo lugar después de Australia (Vovides, 2000). En México únicamente se encuentra la familia Zamiaceae en la cual se ha registrado los géneros *Dioon*, *Zamia* y *Ceratozamia* (Vovides, *et al.*, 1983). No obstante estas plantas están consideradas plantas en peligro de extinción debido principalmente a la destrucción de su hábitat y a la

colecta ilegal para el comercio de plantas ornamentales (Vovides, *et al.*, 1983; Vovides, *et al.*, 2003).

Las especies del genero *Zamia* crecen por lo general en bosques primarios no perturbados, y algunas especies en vegetación secundaria, en elevaciones que van desde el nivel del mar hasta los 1400m (Nicolalde-Morejón *et al.*, 2013), la distribución de *Z. prasina* está en México (Campeche, Quintana Roo, Yucatán, Tabasco y Chiapas) y Belice; desde los 500 metros a nivel del mar (Whitelock, 2002).

Los géneros de la Familia Zamiaceae tienen enfoques en los análisis moleculares sistemáticos filogenéticos (González y Vovides, 2002; Vovides *et al.*, 2004; De Castro *et al.*, 2006), *Dioon* (Moretti *et al.*, 1993; González-Ástorga *et al.*, 2008), *Encephalartos* (Treutlein *et al.*, 2004; Vorster, 2004) y *Zamia* (Caputo *et al.*, 2004).

*Zamia* es el único género dentro de las cícadas en mostrar variación cariotípica inter e intraespecífica (Marchant 1968; Norstog 1980; Moretti, 1990), cambios en los cromosomas de fisión céntrica a metacéntrica o fusión céntrica a telocéntrica lo que ha sugerido la alta variabilidad en los cromosomas (Norstog 1980; Moretti y Sabato 1984, Schutzman *et al.*, 1988; Moretti *et al.*, 1991; Vovides y Olivares, 1996).

Uno de los principales objetivos de la evolución biológica es estimar la estructura genética y la dinámica de la diversidad de las poblaciones naturales (Wright, 1978). La variabilidad genética o diversidad genética en sentido amplio es el componente más básico de la biodiversidad y se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie (Piñero *et al.*, 2008). La cantidad y tipo de variación genética en una población está afectada potencialmente por un número de factores o fuerzas evolutivas, tales como selección, endogamia, deriva génica, flujo génico y mutación (Hedrick, 2000).

Algunas técnicas moleculares que ayudan a revelar la variación genética de una población son *a)* Microsatélites: secuencias simples repetitivas (SSR), *b)* DNA fingerprint: minisatélites o número variable de secuencias repetitivas (VNTR), *c)* Secuenciación de ADN y, *d)* Nucleótidos polimórficos sencillos (SNP), *e)* Polimorfismo no sinónimo, *f)* Polimorfismo sinónimo, *g)* Índice de deleciones/ inserciones polimórficas (Indel), *h)* Fragmentos largos de restricción polimórfica (RFLP) y; *i)* Fragmentos largos de amplificación polimórfica (AFLP) y *j)* Hebras cortas de conformación polimórfica (SSCP) (Frankham *et al.*, 2004).

Los estudios publicados demuestran que la diversidad genética se distribuye de manera diferente entre las clases de historia de vida (Tonsor *et al.*, 1993; Alvarez-Buylla *et al.*, 1996; González-Astorga y Núñez-Farfán 2001; Kalisz *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2003; González-Astorga y Castillo-Campos 2004; Fernández y Sork 2007). Una historia de vida es Z. prasina su aplicación se ha llevado a la industria hortícola y sistemática (Calonje y Meerman, 2009), se encuentra en peligro crítico de acuerdo a los datos proporcionados por el Grupo de Especialistas de la UICN/ SSC Cycad (White *et al.*, 2001), es una especie de amplia distribución las distancias geográficas que hay en las poblaciones influye en su diversidad genética y estructura que se define por el flujo génico y deriva génica, por ello se realiza esta investigación utilizando microsatélites (SSR) con la finalidad de conocer el polimorfismo, saber la variabilidad genética inter-intrapoblacional de la especie además de obtener datos genéticos y determinar si existen problemas en su reserva genética que lleven a riesgos de extinción para así crear estrategias de conservación.

## II.MARCO TEÓRICO

### 2.1. Descripción de la familia

La familia Zamiaceae está formada por un grupo de plantas gimnospermas dioicas con estróbilos, con o sin tallo aparente, con hojas pinnadamente compuestas, coriáceas o herbáceas. Esta familia, también conocida como la familia de las cícadas, habita en varios ambientes, incluyendo áreas tropicales y templadas (Medina *et al.*, 2003). La familia incluye 9 géneros; *Bowenia* (2), *Ceratozamia* (27), *Dioon* (14), *Encephalartos* (65), *Lepidozamia* (2), *Macrozamia* (41), *Microcycas* (1), *Stangeria* (1), y *Zamia* (71), lo cual suma 224 especies (Christenhusz *et al.*, 2011; Osborne *et al.*, 2012). Distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales de la Tierra (Vovides, 1999).

### 2.2. Descripción y Biología de la especie

Plantas terrestres con tallos subterráneos subglobosos 10 cm de diámetro; catafilos con base triangular ápice aristado 3-4 cm de largo, 1.5- 2.5 cm de ancho; hojas de dos a tres, erectas de 50-150 cm de largo; peciolo 15- 50 cm de largo; folíolos de 3 a 12 pares lanceolados a oblanceolados, coriáceos de 20- 30 cm de largo, 2-8 cm de ancho; conos femeninos solitarios, cilíndricos a ovoides de 10-15 cm de largo, 5-8 cm de diámetro color marrón a café claro; conos masculinos solitarios ovoides a cilíndricos de 6-10 cm de largo, 2-4 cm de diámetro densamente tomentoso; pedúnculo de 2-4 cm de largo; esporofilo con seis facetas, ligeramente inclinados; los esporangios se presenta en la superficie inferior del esporofilo; Semillas sarcotesta color roja cuando ha madurado, esclerotesta de 1.5-2 cm de largo, 0.5-0.8 cm de diámetro color marrón (Whitelock, 2002).

Hábitat: Habita en zonas planas con desnivel medio en sol o sombra (Whitelock, 2002), también en rehoyadas en toda la península de Yucatán. El epíteto de *Zamia prasina* se deriva de *prasinus* refiriéndose al verde brillante de las hojas; presenta un número de cromosoma  $2n= 17, 22-28$  (Vovides y Olivares, 1996). Esta especie es polinizada por insectos probablemente del género



*Rhopalotria* sp. su tallo subterráneo, le confiera a la especie, sobrevivir en potreros sometidos a quemas periódicas y sobrepastoreo; sin embargo, se ha observado que la regeneración natural por semilla es escasa (Vovides y Nicolalde-Morejón, 2010).

### **Ubicación taxonómica**

Reino: Vegetal

División: Cicadophyta

Clase: Cycadopsida

Orden: Cycadales

Familia: Zamiaceae

Género: *Zamia* L.

Especie: *Zamia prasina* W. Bull

Sinonimia: *Zamia loddigesii* Miq.; *Zamia polymorpha* D.W. Stev., A. Moretti & Vázq. Torres

### **Sinonimia**

Vovides y Olivares (1996) consideraban un concepto más amplio de *Zamia loddigesii* para incluir las poblaciones de la península de Yucatán.

- *Zamia polymorpha* sinonimia de *Zamia prasina* en su descripción coincide exactamente porque se disponen a ser coriáceas, foliolos fuertemente serrulados. Sus rangos de distribución actualmente circunscritos en México hasta Belice (Calonje y Meerman, 2009). *Zamia prasina* Bull, Hort. Cat. 176:20. 1881. Type: [BRITISH] HONDURAS [BELIZE]: cultivated from Belize, *William Bull s.n.*, 22 Mar 1881 (lectotype, here designated: K!).

*Zamia polymorpha* D.W. Stev., A Moretti&Vázq.Torres, Delpinoa 37–38:3–8. 1998.  
Type: BELIZE. Cayo: 22 Jan 1989, D. Stevenson et al. 1119 (holotype: NY;  
isotypes: BRH, FTG, MO, NY, U).

### **2.3. Situación, Importancia y Riesgo**

Históricamente esta especie *Z. prasina* ha recibido poca mención en la literatura, pero en los últimos años ha sido el nombre aplicada en la industria hortícola y sistemática de la literatura a un taxón poco conocido (Calonje y Meerman, 2009). Todas las cícadas están listadas como especies en peligro de extinción o amenazadas según la (Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001); *Z. prasina* está bajo amenaza en la NOM-059-SEMARNAT-2001 y sujeta a protección especial (Pr) en la NOM-059-SEMARNAT-2010, se encuentra como una especie en peligro crítico (CR) de acuerdo a los datos proporcionados por el Grupo de Especialistas de la UICN/ SSC Cycad (White et al., 2001).

Evidentemente, es la deforestación y el avance de la frontera agrícola las actividades más preponderantes en el declive de las poblaciones; sin embargo, se debe considerar que la especie por ser una especie con tallo subterráneo presenta resistencia a los incendios forestales, pero no así la regeneración natural, la producción de conos femeninos no es frecuente, y tardan un año en madurar y la producción de semillas es baja, la polinización es por insectos, probablemente específicos y vulnerables por los incendios dado que sus larvas diapausicas "hibernan" en los restos de conos masculinos depositados sobre el suelo, por todos estos factores que encierra la biología reproductiva compleja de la especie, su vulnerabilidad es alta (Vovides y Nicolalde-Morejón 2010).

## **2.4. Mecanismos de evolución**

### **Deriva genética**

La deriva genética se refiere a los cambios en las frecuencias genéticas debido a variaciones al azar en muestreos de generación en generación. Esta variación de muestreo esta inversamente relacionada con el tamaño de la muestra (Ayala, 1984). En poblaciones pequeñas, la varianza del cambio en las frecuencias alélicas es más grande que en las poblaciones grandes (Colby, 1997), una secuencia inevitable es la deriva genética es que las frecuencias genéticas divergen entre las poblaciones de un origen común cuando la migración y la tasa de mutación son bajas (Corander *et al.*, 2003). La deriva genética es uno de los mecanismos que disminuye la variabilidad genética. En muchos casos sin embargo, se considera que un evento reciente en la historia de la población puede explicar la reducción de la variabilidad. Tales eventos que reducen la variabilidad pueden estar dentro de los eventos demográficos (otros factores son los selectivos). Los factores demográficos incluyen eventos de “cuello de botella” y efecto de las poblaciones fundadoras; ambos involucran una reducción temporal del tamaño de la población dando como resultado un incremento en la tasa de la deriva genética (Galtier *et al.*, 2000).

### **Selección natural**

La idea de la selección natural como un proceso fundamental de los cambios evolutivos fue iniciada por Charles Darwin y Alfred Russel Wallace (Ayala, 1984). Consideraron a la selección natural, en supervivencia y reproducción diferencial de los individuos genéticamente distintos, adoptando modificaciones beneficiosas que les permite reproducirse y rechazando las perjudiciales que no permiten la reproducción. Esta diferencia en capacidad reproductiva es llamada selección natural y es el único mecanismo de evolución adaptativa que implica una mezcla de variabilidad y selección como el principal agente de cambio evolutivo (Colby, 1996).

## **Mutación**

Las mutaciones ocasionalmente pueden llegar a producirse errores en la replicación del ADN, los puntos de mutación ocurren cuando la secuencia de ADN de un gen, es alterado y la nueva secuencia nucleotídica es pasada a la descendencia. Otro tipo de mutación se presenta cuando el ADN puede llegar a tener una pérdida o inserción en un gen y finalmente, genes o parte de genes pueden llegar a invertirse o duplicarse. Las mutaciones que resultan en las sustituciones pueden cambiar a una proteína, potencialmente cambiando o eliminado su función. La mutación puede ocurrir en un individuo cuando aparece un nuevo alelo, este alelo subsecuentemente se incrementa en frecuencia hasta fijarse en la población (Colby, 1996). En las poblaciones, ya sean grandes o pequeñas, la tasa del cambio de frecuencias génicas debido a la mutación es pequeño, por que la tasa de mutación para un locus es alrededor de  $10^{-5}$  o  $10^{-6}$  por gameto por generación (Futuyma, 1986).

## **Flujo génico**

El impacto del flujo de genes está determinado por la capacidad de dispersión de especies específicas, así como por barreras geográficas, distancia y estructura poblacional (Orell *et al.*, 1999). El flujo génico es un componente principal de la estructura poblacional porque determina hasta qué punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente. Si existe una gran cantidad de flujo génico entre poblaciones locales, entonces todas poblaciones evolucionan juntas; pero si hay poco flujo genético cada población evoluciona en forma casi independiente (Slatkin, 1994). El entendimiento de las fuerzas microevolutivas a través de la historia de una especie depende de la cuantificación de cómo el flujo de genes interactúa con la deriva genética, mutación y selección natural en la estructura poblacional espacial y temporal (Bohonak, 1999). El modelo de isla de Wright explica el equilibrio alcanzado entre el flujo genético y la deriva genética. Si  $Nm$  es mucho mayor que 1, el flujo génico sobrepasa los efectos de la deriva e impide la diferenciación local. Si  $Nm$  es mucho menor que 1, la deriva actúa casi en forma independiente en cada población (Slatkin, 1994).

## **2.5. Marcadores moleculares de ADN**

Los marcadores de ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales puede ser de carácter dominante o codominante (Karp y Edwards, 1998).

Los marcadores de ADN Según Karp *et al.*, (1997) dentro de este grupo se incluyen tres categorías básicas. Categoría 1: métodos que no se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por ejemplo, RFLP (fragmentos largos de restricción polimórfica y número variable de repeticiones en tandem (VNTRs)). Categoría 2: técnicas que utilizan iniciadores (“primer”) arbitrarios o semiarbitrarios. Por ejemplo, iniciadores PCR múltiples arbitrarios: MAAP (Múltiples perfiles arbitrarios de amplificación), RAPD (DNA polimórfico amplificado al azar), RAMPO (amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatelites). Categoría 3: PCR con sitio “objetivo específico”. Por ejemplo, SSR (secuencias simples repetidas) y ISSR (inter secuencias simples repetidas). Las categorías 2 y 3 son marcadores basados en la PCR.

### **Microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR; MP-PCR)**

Los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) son regiones de secuencias pequeñas (dos a 10 pares de bases) repetidas, arregladas en serie, las cuales se asume que están distribuidas azarosamente por todo el ADN. Son secuencias de ADN altamente variables dispersas a través de los genomas de hongos, plantas y animales, los cuales pueden o no estar asociadas con genes, son loci altamente mutables que pueden estar presentes en muchos sitios del genoma. Dado que, la repetición por sí misma no codifica para formar ninguna proteína, y debido a que las secuencias de ADN repetitivo pueden recombinarse y expandirse más frecuentemente que otros tipos de secuencias, estas regiones son a menudo altamente variables y consecuentemente útiles para medir el

polimorfismo entre especies o variedades muy relacionadas (Phillips *et al.*, 1995; Valadez y Kahl, 2000).

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1. Estudios genéticos

Se han llevado a cabo varios estudios que se centra en la diversidad genética de algunas especies de cícadas con el uso de marcadores moleculares de ADN, algunos ejemplos se expresan a continuación; genética de poblaciones de *Dioon edule* Lindl. (Zamiaceae, Cycadales): implicación biogeográfica y evolución por González-Astorga *et al.*, (2003) donde analizaron 14 loci enzimáticos en 8 poblaciones de *D. edule* a lo largo del rango de distribución del este de México. Los patrones de diversidad dentro y entre poblaciones con el número medio de alelos por locus (A) fue 1.44 y el porcentaje de loci polimórficos fue relativamente alto (P= 54.78). La media observada ( $H_o$ ) y heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) fue de 0.27 y 0.24 respectivamente. La variación genética explicada por las diferencias entre poblaciones fue de un solo 7.5%. En promedio el flujo de genes entre pares de poblaciones fue relativamente alta ( $N_m = 2.98$ ), por otro lado el flujo de genes entre pares de poblaciones se correlacionó significativamente con la distancia genética ( $r = -0.30$ ,  $P = 0.025$ ).

González-Astorga *et al.*, (2006) realizaron estudios con *Zamia loddigesii* Miq. (Zamiaceae): en estructura y diversidad genética con implicaciones para su evolución y conservación se estudiaron cuatro poblaciones de la especie en la llanura costera de México, Tabasco y Tamaulipas. El estudio enzimático se llevó a cabo con 15 loci, el número medio de alelos por locus fue de  $1.80 \pm 0.09$ , el porcentaje de loci polimórficos fue de  $66.6 \pm 5.4$  y la heterocigosidad esperada fue  $0.2666 \pm 0.02$ , la diversidad genética es relativamente más alta, con respecto a las especies de cícadas. La variación genética explicada por las diferencias entre poblaciones fue del 18% en promedio, el flujo de genes entre pares de poblaciones fue similar ( $N_m = 0.6$ ), los resultados indicaron que el aislamiento geográfico entre las poblaciones de *Z. loddigesii* genera pérdida de alelos, así como una variación clinal en las frecuencias de dos loci (MDH y MNR2), en relación con la distribución latitudinal de las poblaciones.

Para el uso de microsatélites (SSR) en poblaciones de *Zamia* se tiene reportado los siguientes trabajos en el Caribe por Meerow *et al.*, (2012), se utilizaron 31 loci en diez poblaciones con tres especies *Z. erosa*, *Z. portoricenses* y *Z. pumila*, los datos obtenidos se analizaron con AMOVA, cluster Bayesiano y el modelo coalescente ABC. Los resultados indican que las poblaciones muestran ligeramente un patrón endogámico, con una alta variación intrapoblacional y poca evidencia en cuellos de botella.

Meerow *et al.*, (2012) hicieron estudios en genética de poblaciones con tres especies de *Zamia*; *Z. amblyphyllidia*, *Z. portoricenses* y *Z. pumila* en Puerto Rico con siete poblaciones utilizando 10 microsatelites (SSR). Presentando diferencias poblacionales *Z. amblyphyllidia* cinco veces más que *Z. portoricenses* existiendo un mayor flujo génico, *Z. amblyphyllidia* tiene un mayor número de alelos privados, las tres especies presentan aislamiento geográfico, teniendo problemas de heterocigosidad y endogamia.



## IV. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Determinar la variabilidad genética interpoblacional e intrapoblacional de *Zamia prasina* en poblaciones de Belice, la Península de Yucatán, Chiapas y Tabasco.

### 4.2. Objetivos específicos

- Evaluar la variación interpoblacional e intrapoblacional en *Z. prasina* con microsatélites (SSR)
- Determinar el nivel de polimorfismo de las poblaciones de *Z. prasina* con el uso de microsatélites (SSR).
- Estimar los valores de las distancias genéticas que existen entre las poblaciones.
- Analizar las relaciones de las distancias genéticas y comparar la variación que existe entre las poblaciones de *Z. prasina*.
- Determinar si existen diferencias genéticas entre las poblaciones.

## V. HIPÓTESIS

La separación que existe entre las poblaciones de *Z. prasina* debido a la fragmentación del hábitat, aislamiento geográfico y escaso flujo génico interpoblacional hacen que exista una disminución genética, aumento de diferenciación genética, teniendo una baja variabilidad genética entre sus poblaciones.

## VI. MÉTODO

### 6.1. Área de estudio

Los ejemplares fueron colectados de manera aleatoria, individuos adultos, en las siguientes áreas de estudio para la especie de *Z. prasina* se encontraron en los estados de Chiapas (17°30'36.73"N, 91°58'51.74"O), Tabasco (17°59'15.21"N, 92°55'44.93"O), Quintana Roo (19°10'54.26"N, 88°28'44.90"O), Campeche (19°49'48.45"N, 90°32'05.67"O), Yucatán (20°42'35.56"N, 89°05'39.62"O) y Belice (17°11'23.56"N, 88°29'51.54"O) (figura 1).

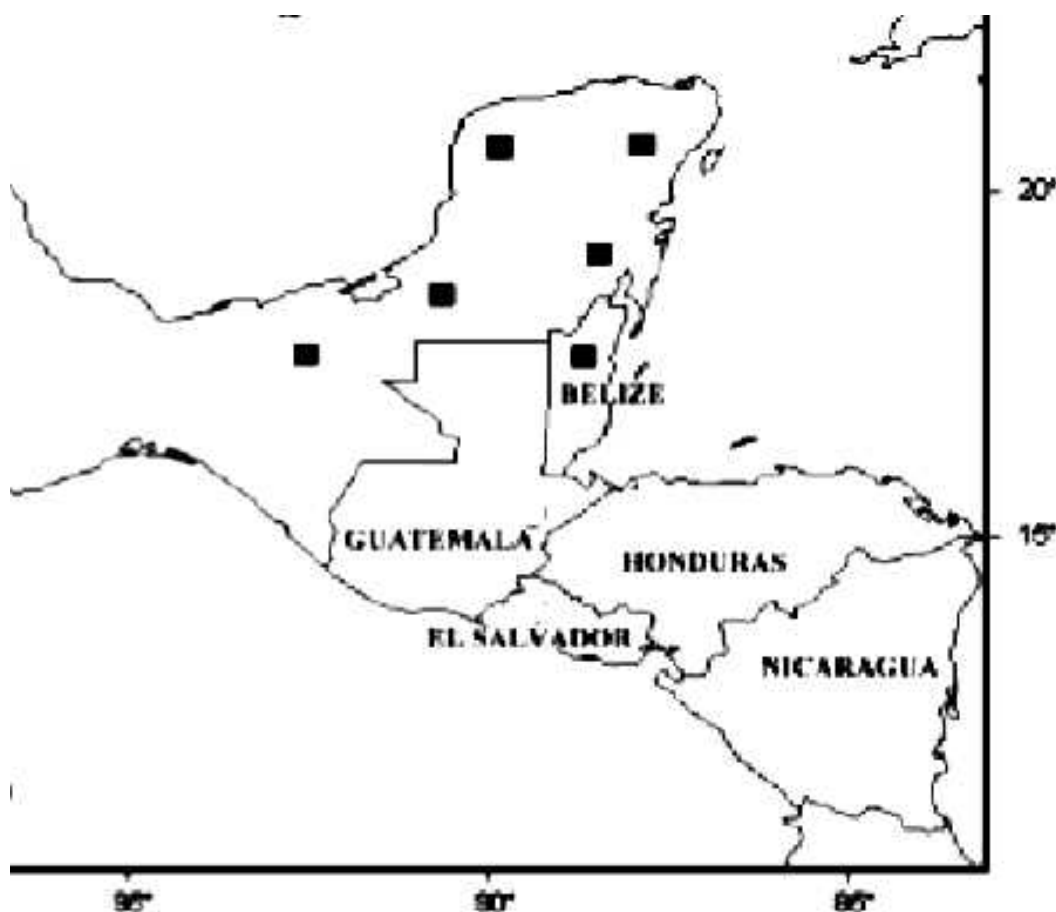


Figura 1. Distribución geográfica de las poblaciones de *Z. prasina*.

## **6.2. Análisis genético**

Se obtuvieron muestras de tejido vegetal (foliolo) de 120 individuos de seis localidades de estudio, las muestras de las poblaciones son 20 por cada área. Posteriormente se colocaron en bolsas de cierre hermético y se mantuvieron a -20°C hasta ser utilizados.

### **6.2.1. Extracción y visualización del ADN**

Para la extracción del Ácido Desoxirribonucleico (ADN), los foliolos se limpiaron previamente con agua destilada, luego se lavaron con alcohol al 70% y nuevamente fueron enjuagados con agua destilada y finalmente secados a temperatura ambiente. Se cortaron aproximadamente 30 mg de cada uno y posteriormente se extrajo el ADN mediante el método CTAB- cloroformo para plantas descrito por Channarayappa (2007), Dehestani y Kazemi (2007) y Doyle (1987,1990). La visualización del ADN se realizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%, donde el ADN de peso molecular alto apareció como una banda definida en la parte superior del gel y el material parcialmente degradado formó un barrido similar a una mancha, el tampón de carga fue de 3 µl de ADN y 1 µl de Azul de bromofenol por cada muestra, el corrimiento del gel fue de 50-60 minutos con voltaje de 100V; posteriormente el gel fue teñido con bromuro de etidio (bromuro de 3,8 diamino -6etil-5fenilfenantridio) que es un colorante fluorescente cancerígeno (Valadez y Kahl, 2000) que al intercalarse con las moléculas de ADN emitió una radiación al emplear el transiluminador de luz ultravioleta donde se evidenciaron las bandas características del ADN total (figura 2), la imagen fue captada por Single UV Benchtop Transiluminators (2 UV marca PhotoDoc-It UVP®). Conectada a una interfase a una computadora, en donde con ayuda del software de la cámara se editaron y se almacenaron.

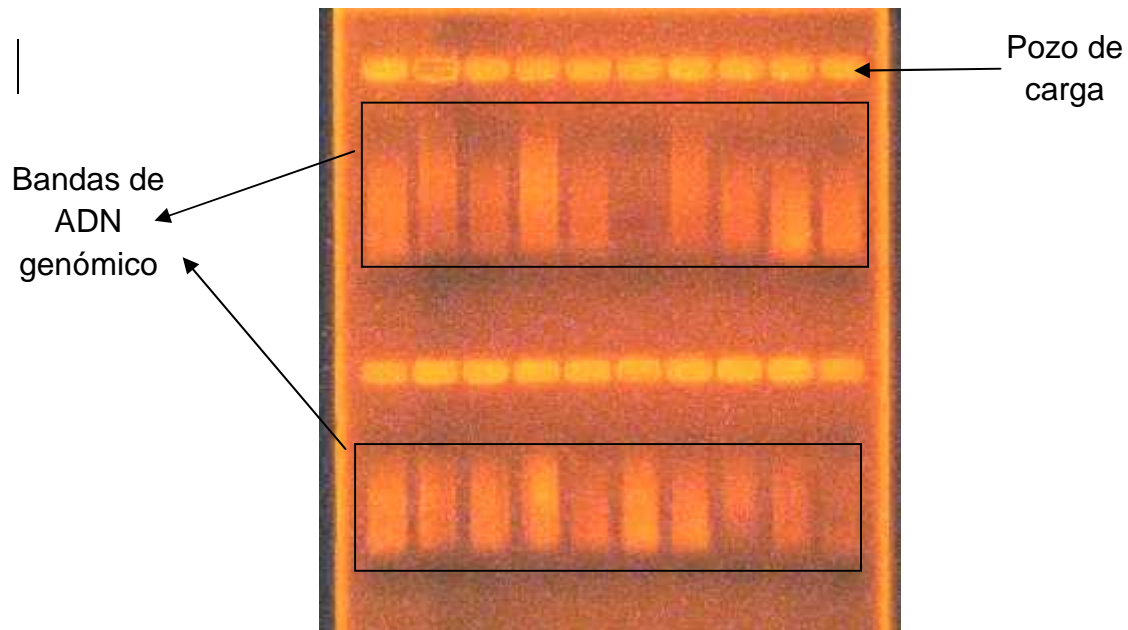


Figura (2). Extracciones de ADN genómico *Z. prasina* en un gel de agarosa al 1% población de Campeche.

### 6.2.2. Amplificación del ADN

La amplificación del ADN se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es un proceso rápido que consiste en la síntesis enzimática *in vitro* de secuencias repetidas de ADN, usando dos oligonucleótidos (*primer* en inglés) que hibridizan en sitios opuestos la región de ADN de interés. Una serie de ciclos repetitivos involucran la desnaturalización, alineación y la extensión de los *primers* alineados. Esta técnica permite amplificar hasta un billón de copias de fragmento de ácido nucleico dado (Erlich y Arnheim, 1992).

Para la amplificación se utilizaron microsatélites ubicados en los cuadros 1 y 2 descritos por (Meerow y Nakamura, 2007; Meerow *et al.*, 2012).

**Cuadro 1. Primers (Microsatélites) utilizados para la amplificación de *Zamia prasina*; temperaturas de alineamiento y rango de amplificación reportadas.**

Locus	Forward primer (5-3)	Reverse primer (5-3)	Rango de amplificación (bp)	T °C
Zam28	CAGGACAAAAGCATATAGGC	TTGGTTTGGTAGGTGATAGG	197-205	61
Zam29	GACTTCCTACCTAAAGATGCTA	TCCTGCTTACTTTAGATGCT	188-245	65
Zam32	CCAACAAGATAGCAAGGG	AGCATGTGTAACCTATAAAGGA	145-151	60
Zam35	TGCATATACATATATACTCATGCAC	TCACTATGCACTCACATACATAA	89-105	58
Zam39	TCACAAAATCTCAGCACCCC	TGAGTTAAACATGCGCCTCC	166-184	60
Zam41	GTAACAATCCCATTCCCAAG	AGTGCCAAACCTCCAAGAAG	225-235	67
Zam45	CCTTAAAGAAGCTCGTAACTCC	TTCCCGAGATTATCCCTAGC	141-145	55
Zam53	AAAAGCATATAGGGAAGTTGTTACTCA	GCCCAAGCCAAATGTCTACTAC	210-236	60
Zam58	AATCCTATGAGTGAGGGAAGTTTAC	AACC AAAAGAGGAAATATGATAAGG	227-233	55
Zam60	TTGCAGCCTACACACCAAAA	AGACAAGGTGTTTATGAATCCACTCT	193-211	60

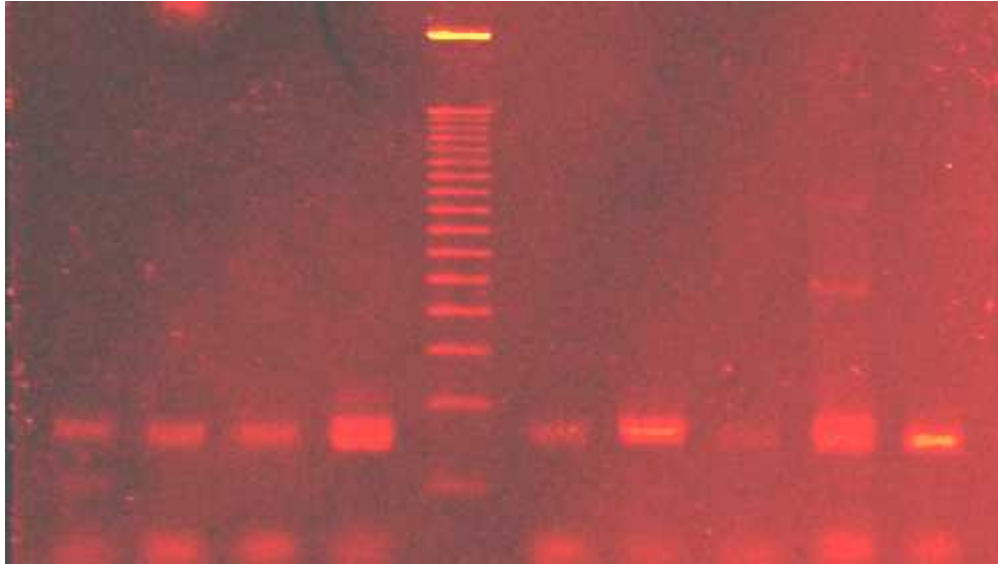
**Cuadro 2. Primers (Microsatélites) utilizados para la amplificación de *Zamia prasina*; temperaturas de alineamiento y rango de amplificación modificadas.**

Locus	Forward primer (5-3)	Reverse primer (5-3)	Rango de amplificación (bp)	T °C
Zam28	CAGGACAAAAGCATATAGGC	TTGGTTTGGTAGGTGATAGG	166-227	61
Zam29	GACTTCCTACCTAAAGATGCTA	TCCTGCTTACTTTAGATGCT	155-275	61
Zam32	CCAACAAGATAGCAAGGG	AGCATGTGTAACCTATAAAGGA	115-181	60
Zam35	TGCATATACATATATACTCATGCAC	TCACTATGCACTCACATACATAA	59-135	56
Zam39	TCACAAAATCTCAGCACCCC	TGAGTTAAACATGCGCCTCC	136-214	60
Zam41	GTAACAATCCCATTCCCAAG	AGTGCCAAACCTCCAAGAAG	195-265	65
Zam45	CCTTAAAGAAGCTCGTAACTCC	TTCCCGAGATTATCCCTAGC	115-175	53
Zam53	AAAAGCATATAGGGAAGTTGTTACTCA	GCCCAAGCCAAATGTCTACTAC	180-266	60
Zam58	AATCCTATGAGTGAGGGAAGTTTAC	AACC AAAAGAGGAAATATGATAAGG	197-263	55
Zam60	TTGCAGCCTACACACCAAAA	AGACAAGGTGTTTATGAATCCACTCT	163-241	60

Las condiciones estándares de amplificación consistieron en 35 ciclos, cada uno de los cuales integrado por desnaturalización inicial de 2 min a 94°C, tres pasos de PCR con una desnaturalización de 1 min a 94°C, alineamiento de 1 minuto a 53-65°C y una extensión de 1 minuto a 72°C. Una vez concluido los 35 ciclos, se realiza una extensión final de 10 min a 72°C (Meerow y Nakamura, 2007 y Meerow *et al.*, 2012).

Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en geles de acrilamida al 6% con un tampón de carga de 6 µl de ADN con 1 µl de azul de bromofenol y 1 µl de ladder 50 pares de bases (pb) (figura 3). El corrimiento del

gel fue de 50 minutos a 1 hora a 65 V, de igual manera para la visualización de la extracción en gel fue teñido con bromuro de etidio y la imagen tomada con la cámara y software Single UV Benchtop Transilluminators (2 UV marca PhotoDoc-It UVP®).



**Figura (3).** Amplificación de alelos *Z. prasina* en gel de acrilamida al 6% microsatélite Zam35 (rango 59-135) población Chiapas.

### **6.2.3. Análisis estadístico**

Se evaluó estadísticamente la genética entre y dentro las poblaciones se determinó las medidas de diversidad y estructura genética, se elaboró una base de datos en block de notas y Excel delimitada por las poblaciones y microsatélites (loci), con el número de alelos por locus. Se utilizaron los programas TFPGA (*Tools For Population Genetic Analyses*) versión 1.3 (Miller, 1997) y GenAIEx (*Genetic Analysis en Excel*) versión 6.5 (Peakall y Smouse, 2012) con los cuales se calcularon las frecuencias alélicas, porcentaje de loci polimórficos (criterio de 95 %), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y heterocigosidad observada ( $H_o$ ) de las poblaciones, Equilibrio de Hardy Weinberg (EHW), coeficiente de endogamia y coeficientes de distancias genéticas de Nei (1972) con las cuales por medio del programa TFPGA se obtuvo un dendograma mediante el método de agrupamiento de UPGMA.

## VII. RESULTADOS

### 7.1. Amplificación de ADN

En la extracción de las 120 muestras se utilizó el método descrito por Meerow y Nakamura, (2007) Meerow *et al.*, (2012) (cuadro 1); se utilizaron 10 microsátélites obteniéndose una efectividad del 94%, con amplificación para los siguientes loci: Zam28 con 115 muestras, Zam29 con 116 muestras, Zam32 con 114 muestras, Zam35 con 113, Zam39 con 107 muestras, Zam41 con 116 muestras, Zam45 con 101 muestras, Zam58 con 99 muestras, Zam53 con 107 muestras, Zam60 con 118 muestras.

### 7.2. Frecuencias alélicas y polimorfismo

El número promedio de alelos por locus fue de 2.66 para todas las poblaciones. En el cuadro 3 se expresa el número de alelos encontrados para cada una de las poblaciones donde los alelos A y B se encuentran en mayor frecuencia en la mayoría de las poblaciones analizadas de *Z. prasina*. El alelo C está en mayor frecuencia en Chiapas en el locus Zam28 pero también encontrándose en menor frecuencia en las demás poblaciones hasta no estar presente en otras. El alelo D muestra una mayor frecuencia en los loci Zam28 y Zam41 para el primero en las poblaciones de Tabasco, Yucatán, Campeche, Quintana Roo y Belice y el segundo en las poblaciones de Quintana Roo, Campeche y Belice.

Los alelos exclusivos, de Chiapas son: Zam28 A y B. El de Tabasco es Zam60 D. Los de Quintana Roo son Zam29 C y D con sus respectivas frecuencias vistas en el Cuadro 3.

El polimorfismo obtenido fue del 100% para las poblaciones de Chiapas-Yucatán, el 90% para Tabasco-Belice, el 80% para Quintana Roo-Campeche aunque exista un polimorfismo muy alto es decir la presencia de hasta cuatro alelos no explica la heterocigosidad presente en las poblaciones debido al porcentaje total de homocigotos del 65.75% seguido de los heterocigotos con un 26.41% y el 7.83% sin amplificar (cuadro 4).

Cuadro 3. Frecuencias alélicas, Ae=alelos exclusivos de Z. prasina en seis poblaciones utilizando diez microsatélites (loci).

Locus (Rango pb)	alelo	Chiapas	Tabasco	Yucatán	Quintana Roo	Campeche	Belice
<b>Zam28</b> (166-227)	<b>A</b>	<b>0.100*</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	<b>B</b>	<b>0.150*</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	<b>C</b>	0.600	0.000	0.053	0.000	0.000	0.000
	<b>D</b>	0.150	1.000	0.947	1.000	1.000	1.000
<b>Zam29</b> (155-275)	<b>A</b>	0.550	0.575	0.500	0.475	0.794	0.550
	<b>B</b>	0.450	0.425	0.500	0.400	0.206	0.450
	<b>C</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.100*</b>	0.000	0.000
	<b>D</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.025*</b>	0.000	0.000
<b>Zam32</b> (115-181pb)	<b>A</b>	0.333	0.425	0.775	0.400	0.526	0.150
	<b>B</b>	0.467	0.400	0.100	0.475	0.368	0.450
	<b>C</b>	0.200	0.175	0.125	0.125	0.105	0.400
<b>Zam35</b> (59-135)	<b>A</b>	0.353	0.600	0.579	0.150	0.441	0.325
	<b>B</b>	0.412	0.325	0.421	0.550	0.382	0.475
	<b>C</b>	0.235	0.075	0.000	0.300	0.176	0.200
<b>Zam39</b> (136-214)	<b>A</b>	0.306	0.737	0.684	0.773	0.500	0.500
	<b>B</b>	0.139	0.158	0.263	0.000	0.075	0.000
	<b>C</b>	0.222	0.000	0.000	0.182	0.325	0.150
	<b>D</b>	0.333	0.105	0.053	0.045	0.100	0.350
<b>Zam41</b> (195-265)	<b>A</b>	0.675	0.200	0.825	0.105	0.000	0.083
	<b>B</b>	0.125	0.250	0.125	0.026	0.053	0.139
	<b>C</b>	0.075	0.175	0.050	0.158	0.211	0.111
	<b>D</b>	0.125	0.375	0.000	0.711	0.737	0.667
<b>Zam45</b> (115-175)	<b>A</b>	0.882	0.676	0.800	0.861	0.750	0.882
	<b>B</b>	0.118	0.324	0.200	0.139	0.250	0.118
<b>Zam58</b> (197-263)	<b>A</b>	0.036	0.233	0.132	0.333	0.500	0.105
	<b>B</b>	0.643	0.533	0.737	0.528	0.357	0.447
	<b>C</b>	0.321	0.233	0.132	0.139	0.143	0.447
<b>Zam53</b> (180-266)	<b>A</b>	0.500	0.000	0.625	1.000	1.000	0.000
	<b>B</b>	0.471	0.188	0.313	0.000	0.000	0.325
	<b>C</b>	0.029	0.813	0.063	0.000	0.000	0.675
<b>Zam60</b> (163-241)	<b>A</b>	0.658	0.525	0.800	0.000	0.925	0.475
	<b>B</b>	0.211	0.300	0.200	0.211	0.050	0.350
	<b>C</b>	0.132	0.150	0.000	0.789	0.025	0.175
	<b>D</b>	0.000	<b>0.025*</b>	0.000	0.000	0.000	0.000

% DE LOCI POLIMÓRFICOS 100%

90%

100%

80%

80%

90%



**Cuadro 4. Porcentaje total de homocigosidad y heterocigosidad en poblaciones de *Z. prasina*.**

Locus	Homocigotos	Heterocigotos	S/Amplificar
<b>Zam28</b>	99	16	5
<b>Zam29</b>	59	57	4
<b>Zam32</b>	63	51	6
<b>Zam35</b>	68	45	7
<b>Zam39</b>	35	72	13
<b>Zam41</b>	75	41	4
<b>Zam45</b>	100	1	19
<b>Zam58</b>	87	12	21
<b>Zam53</b>	99	8	13
<b>Zam60</b>	104	14	2
% Total	65.75%	26.41%	7.83%

### 7.3. Heterocigosidad y equilibrio de Hardy-Weinberg

La heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) fue mayor que la observada ( $H_o$ ) en todas las poblaciones, el valor más alto fue en Chiapas con 0.532 de  $H_e$  y el menor en Campeche 0.369 de  $H_o$ , la heterocigosidad observada obtuvo un promedio de 0.282 (cuadro 5).

**Cuadro 5. Valores de diversidad genética en seis poblaciones de *Z. prasina* con 10 locis,  $H_o$ = Heterocigosidad observada  $H_e$ = Heterocigosidad esperada promedio.**

Población	$H_o$	$H_e$
<b>Chiapas</b>	0.401	<b>0.532</b>
<b>Tabasco</b>	0.241	0.475
<b>Yucatán</b>	0.179	0.379
<b>Quintana Roo</b>	0.253	0.378
<b>Campeche</b>	0.230	0.369
<b>Belice</b>	0.389	0.472
<b>Promedio</b>	<b>0.282</b>	0.434

El análisis de la prueba estadística Chi-cuadrada( $\chi^2$ ) bajo, condiciones del equilibrio de Hardy-Weinberg por población, muestra diferencias altamente significativas por un déficit de heterocigotos; en Chiapas con los loci Zam41, Zam45 y Zam60; para Tabasco en los loci Zam28, Zam35, Zam45, Zam58, Zam53 y Zam60; en Yucatán para los loci Zam28, Zam39, Zam41, Zam45, Zam58 y Zam53; Quintana Roo con los loci Zam41, Zam45, Zam58 y Zam60, Campeche en los loci Zam35, Zam41, Zam45, Zam58 y Zam60 por último la población de Belice en los loci Zam39, Zam45, Zam58, Zam53 y Zam60, indicando que las poblaciones no se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg; las diferencias altamente significativas se encuentran en más de tres loci (cuadro 6). Por otro lado los loci que cuentan con un solo alelo (loci monomórfico) son Zam28 en Tabasco, Quintana Roo, Campeche y Belice además de Zam53 en Quintana Roo y Campeche.

**Cuadro 6. Valores de la Prueba de Chi-cuadrada ( $\chi^2$ ) bajo condiciones de equilibrio Hardy-Weinberg (HW) en seis poblaciones de *Z. prasina*, M= monomórfico, ns= diferencias no significativas; \*P<0.05; \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001**

	Palenque		Tabasco		Yucatán		Q. Roo		Campeche		Belice	
	$\chi^2$	P	$\chi^2$	P	$\chi^2$	P	$\chi^2$	P	$\chi^2$	P	$\chi^2$	P
Zam28	8.889	0.180ns	M	--	19.000	<b>0.000***</b>	M	--	M	--	M	--
Zam29	0.900	0.343ns	0.126	0.723ns	1.316	0.251ns	14.636	0.023*	0.172	0.679ns	3.430	0.064ns
Zam32	11.069	0.011*	12.445	0.006**	15.671	0.001**	9.422	0.024*	6.179	0.103ns	11.111	0.011*
Zam35	15.065	0.002**	21.065	<b>0.000***</b>	6.134	0.013*	5.422	0.143ns	17.297	<b>0.001***</b>	14.366	0.002**
Zam39	6.415	0.378ns	1.853	0.604ns	7.060	0.070ns	0.952	0.813ns	6.655	0.354ns	20.000	<b>0.000***</b>
Zam41	27.306	<b>0.000***</b>	17.400	0.008**	31.849	<b>0.000***</b>	25.802	<b>0.000***</b>	20.551	<b>0.000***</b>	16.105	0.013*
Zam45	17.000	<b>0.000***</b>	12.738	<b>0.000***</b>	20.000	<b>0.000***</b>	10.610	0.001**	12.000	<b>0.000***</b>	17.000	<b>0.000***</b>
Zam58	9.852	0.02*	19.061	<b>0.000***</b>	22.246	<b>0.000***</b>	19.795	<b>0.000***</b>	28.000	<b>0.000***</b>	17.833	<b>0.000***</b>
Zam53	3.361	0.339ns	16.000	<b>0.000***</b>	16.640	<b>0.001***</b>	M	--	M	--	15.701	<b>0.000***</b>
Zam60	19.760	<b>0.000***</b>	40.045	<b>0.000***</b>	9.453	0.002**	19.000	<b>0.000***</b>	20.015	<b>0.000***</b>	16.618	<b>0.001***</b>

#### 7.4. Coeficiente de endogamia

El coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) calcula la probabilidad de que dos gametos que se unen para dar un cigoto lleven copias idénticas de un gen debido a su parentesco. Cuando este parámetro presenta valores positivos indica un déficit de heterocigotos (Caballero, 1994), para *Z. prasina* muestra valores positivos cercanos a uno en los loci, Zam32, Zam35, Zam41, Zam45, Zam58, Zam53 y Zam60, solo tres loci presentaron valores negativos, existiendo bajos niveles de heterocigosidad. El promedio total del coeficiente de endogamia para todas las poblaciones es positivo existiendo una deficiencia de heterocigotos expresando que no se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) para el total de las seis poblaciones con los diez microsatélites.**

<b>Locus</b>	<b>Fis</b>
<b>Zam28</b>	-0.168
<b>Zam29</b>	-0.018
<b>Zam32</b>	0.196
<b>Zam35</b>	0.328
<b>Zam39</b>	-0.224
<b>Zam41</b>	0.296
<b>Zam45</b>	0.936
<b>Zam58</b>	0.786
<b>Zam53</b>	0.703
<b>Zam60</b>	0.718
Promedio	0.355

## 7.5. Diferenciación genética y Flujo génico

El Parámetro  $F_{ST}$  mide el flujo genético entre poblaciones basado en Wright (1965) este parámetro fue de 0.209 para los diez loci utilizados en *Z. prasina*. El valor  $F_{ST}$  en un rango 0-0.05 demuestra poca diferenciación genética, un valor entre 0.05-0.15 moderada diferenciación genética y un valor entre 0.15-0.25 alta diferenciación genética (Wright, 1978; Hartl y Clark, 1997). Por lo cual el valor promedio calculado indica una alta diferenciación genética entre pares de poblaciones, el valor de  $F_{ST}$  más alto está en las poblaciones de Yucatán-Quintana Roo, el valor moderado en Chiapas-Yucatán y Tabasco-Yucatán, el valor más bajo en Tabasco-Belice (Cuadro 8). Los valores de varianza molecular mostraron que el 18% de la variación genética está entre las poblaciones y el 83% dentro de las poblaciones (Gráfica 1- cuadro 9).

Se estimó el flujo genético que fue de 2.453 este valor es el número efectivo de migrantes por generación ( $N_m$ ) para todas las poblaciones de *Z. prasina*. Si  $N_m$  es mayor que 1, teóricamente el flujo génico supera los efectos de la deriva génica y previene la diferenciación local, pero si es menor que 1 entonces se puede decir que la deriva actúa independientemente en cada una de las poblaciones. Sin embargo, si es mayor a 4 entonces las poblaciones se comportan como una gran población panmíctica es decir, todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse y el apareamiento es al azar (Slatkin, 1995). Entre pares de poblaciones el mayor flujo genético se encontró entre las poblaciones Tabasco-Belice y el menor en Yucatán-Quintana Roo (Cuadro 8).

El tamaño efectivo ( $N_E$ ) de alelos por población promedio para Palenque fue de 2.299, seguido de Tabasco con 2.148, Belice 2.099, Campeche 1.820, Quintana Roo 1.811 y Yucatán con 1.665.

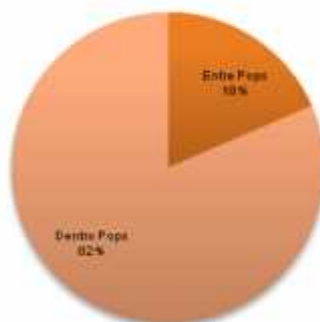
**Cuadro 8. Índice de Fijación ( $F_{ST}$ ), diferenciación genética (Wright, 1978; Clark, 1997) y flujo genético en pares de poblaciones de *Z. prasina*.**

Población		Fst	Diferenciación	Nm
Chiapas	Tabasco	0.160	Alta	1.220
Chiapas	Yucatán	<b>0.129</b>	Moderada	1.530
Tabasco	Yucatán	<b>0.123</b>	Moderada	1.579
Chiapas	Quintana Roo	0.205	Alta	0.913
Tabasco	Quintana Roo	0.189	Alta	0.999
Yucatán	Quintana Roo	<b>0.246</b>	Alta	0.722
Chiapas	Campeche	0.207	Alta	0.905
Tabasco	Campeche	0.168	Alta	1.142
Yucatán	Campeche	0.210	Alta	0.880
Quintana Roo	Campeche	0.172	Alta	1.112
Chiapas	Belice	0.165	Alta	1.196
Tabasco	Belice	<b>0.032</b>	Baja	<b>5.581</b>
Yucatán	Belice	0.208	Alta	0.906
Quintana Roo	Belice	0.183	Alta	1.053
Campeche	Belice	0.201	Alta	0.947

**Cuadro 9. Valores de AMOVA en las poblaciones de *Z. prasina*.**

Fuente de variación	df	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Varianza de los componentes	Porcentaje de variación	st	Valor de P
Entre poblaciones	5	128.342	25.668	0.578	18%	0.185	0.001
Dentro poblaciones	234	596.150	2.548	2.548	82%		
Total	239	724.492		3.126	100%		

**Porcentaje de Varianza Molecular**



**Grafica 1. Porcentaje de variación genética dentro y entre las poblaciones de *Z. prasina*.**

## 7.6. Distancias genéticas.

Con el fin de analizar las relaciones genéticas entre todas las poblaciones, se realizó la prueba de Nei (1972) como resultado se observó que los sitios más próximos son Tabasco-Belice y los más alejados Chiapas-Quintana Roo (Cuadro 10). Posteriormente se realizó un dendograma utilizando el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean), con el programa TFPGA (Miller, 1997), donde el agrupamiento definió a Tabasco-Belice y Chiapas-Yucatán en un primer grupo, separando a Campeche-Quintana Roo en un segundo grupo (figura 3).

Cuadro 10. Distancias genéticas (Nei, 1972) obtenidas entre las poblaciones analizadas de *Z. prasina*.

Población	Chiapas	Tabasco	Yucatán	Q. Roo	Campeche
Chiapas					
Tabasco	0.349				
Yucatán	0.180	0.188			
Q. Roo	<b>0.403</b>	0.305	0.314		
Campeche	0.334	0.249	0.209	0.171	
Belice	0.315	<b>0.071</b>	0.304	0.267	0.258

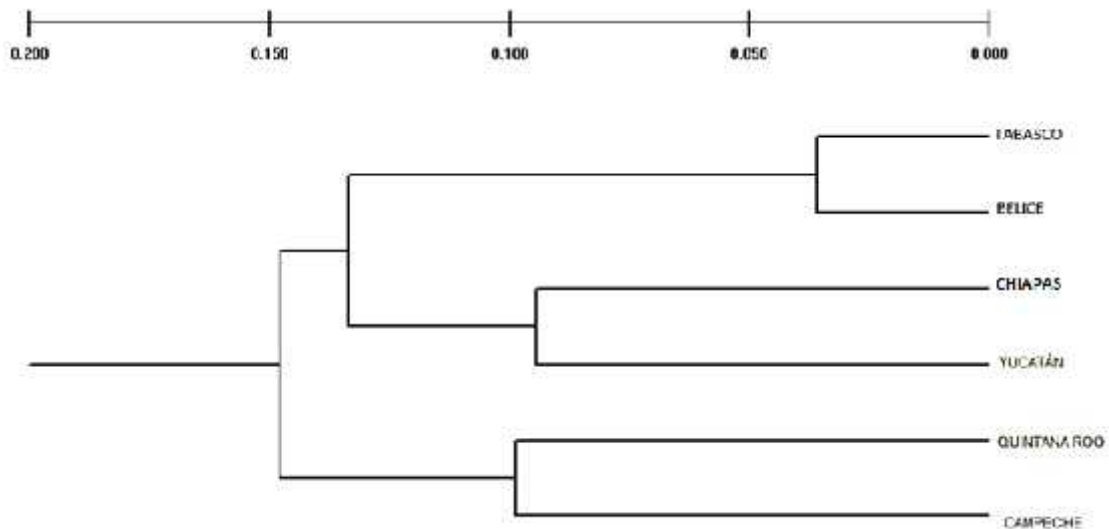


Figura 3. Dendrograma UPGMA basado en las distancias genéticas de Nei (1972) en poblaciones de *Z. prasina*

## VIII. DISCUSIÓN

El promedio del porcentaje total de loci polimórficos observado para las poblaciones de la especie *Z. prasina* fue del 90%. El resultado es cercanamente inferior, comparado con estudios realizados en *Macrozamia riedlei* del 93% (Byrne and James 1991) y por arriba de otras Cicadas (cuadro 10). El criterio que se utilizó fue del 95% de Peakall y Smouse (2012), para determinar este polimorfismo se usaron microsatélites que dieron información del estado de un loci en específico, su herencia fue mendeliana y de carácter co-dominante, ya q se pudo diferenciar entre heterocigotos y homocigotos (Feldman *et al.*, 1997; Parker *et al.*, 1998; Becerra y Paredes, 2000; Chistiakov *et al.*, 2006., Allendorf y Luikart, 2007). Las características antes mencionadas se demostraron en esta investigación usando 10 microsatelites diseñados de especies de *Zamia* (Meerow y Nakamura, 2007; Meerow *et al.*, 2012) (cuadro 1 y 2).

El número de alelos únicos en una población son conocidos como alelos exclusivos o privados (“private alleles”), ésta es una medida simple de diferenciación poblacional (Kalinowski, 2004). El número de alelos exclusivos presentes en *Z. prasina* presenta una frecuencia muy baja (cuadro 3) que no provoca que una población se diferencia de otra. En *Cycas seemanni* (Keppel 2002) y *Cycas micronesica* (Cibrián-Jaramillo *et al.*, 2010) cuentan con alelos exclusivos teniendo frecuencias bajas y no indican que precisamente sean exclusivos ya que su frecuencia es muy baja. Frecuencias altas indican la deriva genética y también puede implicar que estas poblaciones están ahora en el proceso de especiación (Keppel 1999). Conociéndose que el número de alelos privados es una estimativa indirecta del flujo génico (Takahashi *et al.*, 2005), y cuanto más bajo sea éste, más alelos de este tipo surgen por mutación, y estos son fijados por eventos de deriva genética en la población (Slatkin, 1985). Además, que la presencia de estos alelos, parece caracterizar a poblaciones antiguas y relictas, por el contrario, su completa ausencia podría indicar que las poblaciones tienen un origen relativamente reciente (Fernández-Palacios, 2004). Cabe aclarar que aunque el grupo de las cícadas son antiguas que existieron

desde el paleozoico, la aparición del género *Zamia* es mas reciente durante el período mioceno (Nagalingum *et al.*, 2011).

Los altos niveles de diversidad genética son típicos de especies dioicas de larga vida (Hamrick, 2004), excepcionalmente altos para la familia Zamiaceae, particularmente en los géneros *Dioon* Lindl. y *Zamia* L. Por lo tanto, los valores aquí registrados de diversidad genética, para el género y especialmente en *Z. prasina* son altos, la heterocigosidad esperada ( $H_e=0.434$ ) es mayor que la heterocigosidad observada ( $H_o= 0.282$ ) y el promedio de alelos por locus  $A=2.66$ . Los altos niveles de diversidad genética se tiene reportados para el género *Cycas*, en la especie *Cycas micronesica* particularmente ( $H_e =0.545$ ,  $H_o=0.349$ ,  $A=4.2$ ) (Cibrián-Jaramillo, 2010); hay otros trabajos de Cícadas reportados en la literatura que tienen menor diversidad genética (cuadro 10) y respectivamente por arriba de las plantas perennes ( $H_e = 0.180$  Hamrick y Godt 1996), especies leñosas perennes ( $H_e = 0.144$  Hamrick 2004) y para los árboles de los bosques tropicales (Álvarez-Buylla y Garay, 1994; González-Astorga y Castillo-Campos, 2004).



**Cuadro 10. Variación genética de especies de Cicadas reportadas en la literatura.**

Especies	Literatura	Sitio de estudio	N	A	P	Ho	He	Fst
<b>Cycas pectinata</b>	Yang and Meerow (1996)	China, India, Tailandia y Vietnam	11	1.82	58.8	0.066	0.076	0.387
<b>Cycas seemannii</b>	Keppel (2002)	Sur Pacifico Islas	5	1.80	35.0	0.048	0.138	0.594
<b>Cycas siamensis</b>	Yang and Meerow (1996)	Tailandia y Vietnam	13	1.48	58.9	0.114	0.134	0.291
<b>Cycas taitungensis</b>	Lin <i>et al.</i> (2000)	Taiwan	2	1.10	10.7	0.021	0.039	0.051
<b>Cycas micronesica</b>	Cibrián-Jaramillo, (2010)	Isla de Guam	24	4.2		0.349	0.545	0.245
<b>Ceratozamia robusta Miq.</b>	Chavez (2010)	Sureste de México y Belice	7					0.75822
<b>Dioon edule</b>	González-Astorga <i>et al.</i> (2003)	Costa Este de México	8	1.44	54.8	0.273	0.24	0.075
<b>Dioon sonorensis</b>	González-Astorga <i>et al.</i> (2009)	Sonora, México	4	2	81.6	0.330	0.314	0.153
<b>Dioon angustifolium Miq</b>	González-Astorga <i>et al.</i> (2005)	Noreste de México	3	1.67	52.4	0.215	0.218	0.167
<b>Macrozamia heteromera</b>	Sharma <i>et al.</i> (1999)	Nueva Gales del Sur, Australia	5	1.30	25.86	0.049	0.061	0.10
<b>Macrozamia pauli-guilielmi</b>	Sharma <i>et al.</i> (1998)	Sur de Queensland	3	1.30	27.43	0.039	0.071	0.109
<b>Macrozamia riedlei</b>	Byrne and James (1991)	Oeste de Australia	15	2.43	<b>93</b>	0.263	0.274	0.092
<b>Macrozamia communis</b>	Ellstrand, Ornduff & Clegg (1990)	Australia	5	1.61	50.0	-	0.045	0.270
<b>Macrozamia plurinervia</b>	Sharma <i>et al.</i> 2004	Este de Australia	9	1.50	36.58	0.080	0.111	0.588
<b>Zamia pumila</b>	Walters and Decker-Walters (1991)	Antillas, norte Bahamas Islas de, Florida, y sur-este de Georgia	4	1.21	16.7	0.047	0.041	-
<b>Zamia loddigesii Miq</b>	González-Astorga <i>et al.</i> (2006)	Noreste y Sureste de México	4	1.80	66.6	0.263	0.266	0.179
<b>Zamia prasina</b>	Velasco (2015)	Península de Yucatán, Tabasco, Chiapas y Belice.	6	2.66	90	0.282	0.434	0.246

*N= número de poblaciones, A= número de alelos, P= porcentaje de loci polimórfico Ho y He= promedio de heterocigosidad observada y esperada, Fst= diferenciación genética*

El análisis de la prueba  $\chi^2$  bajo condiciones del equilibrio de Hardy-Weinberg demostró que cada población de *Z. prasina* muestra un déficit de heterocigotos por lo tanto se encuentra fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg ya que las diferencias altamente significativas se encuentran en más de 3 loci esto se puede deber al proceso de selección, a la presencia de alelos nulos que dan la impresión falsa de exceso de homocigotos, a la consanguinidad o al efecto Wahlund por la existencia de estructura poblacional que no se ha tomado en cuenta (Linhart *et al.*, 1981; Waser, 1987; Eguiarte *et al.*, 1992; Caujapé-Castells, 2006). Los alelos nulos no muestran un valor con significancia (cuadro 4) que expresen la carencia de los heterocigotos. La presente homocigosidad podría

deberse a factores como los antropogénicos, efectos de fragmentación, cambio de uso de suelo, sistema de dispersión (polinización cruzada/insectos-viento) que hacen que las poblaciones vayan reduciéndose. Otro factor que promueve el exceso de homocigosis es la endogamia debido al cruzamiento entre individuos relacionados aunque no tiene un gran efecto en la estructura genética de las poblaciones a diferencia del flujo génico y la deriva génica (Cruzan, 2001; Moreno, 2007; Hamilton, 2009; Hedrick, 2011). Cabe mencionar que la endogamia no altera las frecuencias genéticas dentro de una población, pero incrementa la proporción de homócigos en los loci, disminuyendo los niveles de diversidad genética individual y siendo más probable en poblaciones aisladas o pequeñas, debido al aumento de las posibilidad de cruzarse con un individuo relacionado, aun cuando esto sea al azar (Freeland, 2005). El coeficiente de endogamia para *Z. prasina* fue positivo para 7 loci (cuadro 6) con un valor promedio de  $F_{IS} = 0.355$  indicativo de un déficit de heterocigotos no existiendo una disminución en niveles de diversidad genética por lo que al contrario los valores presentados de heterocigosidad esperada y observada fueron altos ya anteriormente mencionados.

La diferenciación genética entre poblaciones de *Z. prasina* de acuerdo a los criterios de Wright, 1978; Clark, 1997, mostró como resultado una alta diferenciación genética  $F_{ST} = 0.209$  la estimación no está por encima de lo reportado para; *Cycas pectinata* (Yang & Meerow, 1996), *Cycas seemannii* (Keppel, 2002), (*Cycas siamensis*) (Yang & Meerow 1996), *Ceratozamia robusta* Miq (Chavez, 2010) en cambio para otras Cicadas es mucho mayor (cuadro 10). Esta elevada diferenciación genética podría deberse al aislamiento geográfico, sistema de dispersión, la cantidad y dirección de flujo génico, la distancia geográfica-topográfica, condiciones ambientales y ecológicas (tamaño, número y edad de los individuos que contienen cada población) (Hartl y Clark, 1997; Vázquez- Domínguez, 2009).

El análisis de diferenciación genética entre poblaciones de *Z. prasina* fue del 18% (Grafica 1), similar a *Z. loddigesii* (González-Astorga *et al.* 2006); esto quiere decir que la mayor cantidad de variación genética se encuentra dentro de las poblaciones (83%). Para Hamrick y Godt, (1989) y Hamrick *et al.*, (1992), la cantidad y distribución de la diversidad genética de las especies leñosas está relacionada con la historia de vida y sus características ecológicas. Los factores que influyen para que la mayor variación genética se encuentre dentro de las poblaciones son: el tamaño de la planta, la longevidad, la fecundidad, el sistema de apareamiento y la distribución geográfica. *Z. prasina* no es una planta leñosa pero comparte rasgos de vida similares por mencionar la longevidad de la planta es de vida larga y la distribución geográfica amplia.

El resultado de flujo génico para esta investigación es alto. Se obtuvo un promedio de  $Nm = 2.453$ , los reportes que existen parecidos a este flujo génico elevado son en el complejo *Cycas pectinata* (Yang and Meerow 1996) y *Dioon edule* (González-Astorga *et al.*, 2003). Los autores mencionan que los alelos se compartieron históricamente y el flujo real ocurre entre poblaciones geográficamente cercanas, por mencionar un ejemplo, Tabasco y Belice presentan el mayor flujo génico entre poblaciones comportándose como una gran población panmíctica y evolucionando de manera conjunta (Slatkin, 1994;1995), aunque estas no están cercanas geográficamente a comparación con las otras poblaciones, en un momento determinado *Z. prasina* se comportaría como una sola población siendo el flujo de genes una fuerza evolutiva cohesiva, manteniendo como un todo evolutivo a la población por lo que el tamaño de la población influyo en el elevado flujo de genes entre las poblaciones con el paso del tiempo las poblaciones han quedado aisladas por los efectos de fragmentación, hay una hipótesis que dice que la fragmentación del hábitat puede conducir a un aumento de flujo y posiblemente mayor variación genética de la población. Una variación genética alta maximiza la viabilidad poblacional y potencial evolutivo (Young *et al.*, 1996). Existen poblaciones en que la deriva génica está actuando independientemente lo que contribuirá al aislamiento reproductivo y el establecimiento de linajes evolutivamente independientes

(Slatkin, 1987; 1994) esto favorecido por los bajos niveles de heterocigosidad que llevara a las poblaciones hacerse mas endogámicas y cuanto menor sea el tamaño efectivo de la población menor será la cantidad de alelos a formar la próxima generación (valores obtenidos de  $N_E$  2.299 a 1.665) como consecuencia a ello el efecto de fragmentación podría estar afectando el sistema de dispersión y polinización entre poblaciones teniendo consecuencias genéticas en la homocigosidad y endogamia. Vovides y Nicolalde-Morejón, 2010; mencionan que la polinización de *Z. prasina* probablemente podría ser efectuada por un escarabajo del género *Rhopalotria sp.* cuya capacidad de vuelo podría ser pobre y no pudiendo abarcar grandes distancias, lo que afectaría el flujo entre poblaciones. Por otro lado, la semilla para el género *Zamia* indica un sistema de dispersión biológico por el color brillante de la cubierta (Eckenwalder, 1980; Whitelock, 2002;) en el que las aves probablemente juegan un papel importante, al igual que los roedores como dispersores en *Z. prasina*, pero no se tienen estudios del sistema de dispersión y polinización en esta especie.

Cuando una especie presenta una distribución geográfica amplia, generalmente se espera que las poblaciones más cercanas geográficamente también sean las más parecidas genéticamente, ya que se supone que el flujo génico debe ser más probable entre las poblaciones contiguas que entre las más lejanas. A esta idea se le conoce como “aislamiento por distancia” (Wright, 1943) y nos dice que los individuos tienden a aparearse más con aquellos más cercanos geográficamente, lo contrario pasa en Chiapas y Yucatán son poblaciones más alejadas geográficamente pero que al analizar sus relaciones genéticas son las más cercanas. Hamrick *et al.*, (1991), (1996); Frankham, (1996) mencionan que una forma de vida es la distribución geográfica o rango geográfico, *Z. prasina* se encuentra distribuida en la península de Yucatán, Tabasco, Chiapas y Belice teniendo una amplia ocupación territorial por lo que al estudiar sus relaciones genéticas entre poblaciones el dendograma mostro a dos grupos; el primero coloco a Tabasco junto con Belice, Chiapas junto con Yucatán mientras que el segundo grupo a Quintana Roo junto con Campeche desde mi punto de vista *Z.*

*prasin*a posiblemente se comporto como una sola población por sus relaciones genéticas que existe entre las poblaciones y que por resultado de actividades antropogénicas, efectos de fragmentación, cambio de uso de suelo las poblaciones quedaron aisladas o bien la selección natural pudo ser mucho más eficaz que la deriva genética previniendo o estableciendo diferencias locales, la selección a favor de los mismos alelos o los mismos rasgos, produjeron esa uniformidad independientemente de cualquier flujo de genes o bien la selección favoreció a los alelos de cada una de las poblaciones en diferentes ubicaciones reflejando adaptaciones genéticas a las condiciones locales. En términos de las fuerzas evolutivas, el flujo de genes pudo ser más débil, que la selección en algunos loci aún mucho más fuerte que la deriva genética en otros (Barton, 1983). Existe una teoría que ha concentrado las interacciones entre estas fuerzas, explicando que la selección afecta a diferentes loci siguiendo el mismo patrón geográfico en especies que experimentan diferentes condiciones ecológicas en diferentes áreas, entonces la selección en esos loci se refuerza por vinculación (Bengtsson, 1985).

## IX. CONCLUSIÓN

- Los resultados encontrados en esta investigación muestran que, por lo reportado para esta especie, efectivamente son altos los grados de diversidad genética y alélica, la diferenciación genética y el flujo génico para el género.
- La distribución geográfica que ocupa actualmente *Z. prasina* es amplia. La información del registro fósil sugiere que el género prevaleció con mayor auge en el periodo Mioceno, y que probablemente fue una sola población; por lo que al estudiar su genética, se encontró una diferenciación genética alta y flujo génico entre poblaciones. El aislamiento reciente, entre las poblaciones, es el resultado de efectos de la fragmentación severa por actividades antrópicas que genera grandes distancias entre fragmentos.
- La mayoría de los marcadores están fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg, hay mas heterocigosidad esperada que observada que conlleva a la endogamia además la estructura genética está siendo afectada por diferentes fuerzas evolutivas.

## X. RECOMENDACIONES

- El declive para la mayoría de las poblaciones naturales es inminente por la reducción del hábitat debido al aumento de las actividades humanas. Aunque *Z. prasina* no se encuentra en la categoría de peligro de extinción, es necesario realizar acciones que promuevan la colecta de semillas en poblaciones naturales, y su traslado a un recinto donde exista una conservación *in situ* y *ex situ*; por ejemplo, un jardín botánico o un banco de germoplasma que resguarde la diversidad genética.
- Es necesario realizar estudios más específicos que incluyan variables que no se tomaron en cuenta en esta investigación para dejar en claro los resultados obtenidos, estudios en su biología reproductiva, demográfica y realizar las correspondientes comparaciones con la morfología de la especie además de la utilización de mas microsatelites y un mayor número de individuos para descartar cualquier duda.

## XI. LITERATURA CITADA

- Allendorf, F.W. and Luikart G. 2007. Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing. Reino Unido. 663 pp.
- Alvarez-Buylla, E.R., A. Garay. 1994. Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia* a tropical pioneer tree species. *Evolution*. 48: 437–453.
- Ayala, F. 1984. Genética moderna. España. Fondo educativo interamericano.
- Barton, N. H. 1983. Multilocus clines. *Evolution*. 37:454-71.
- Becerra, V.V. y M.C. Paredes. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura técnica*. 60 (3): 270-281.
- Bengtsson, B. O. 1985. Essays in Honour of John Maynard Smith, P. J. Greenwood, P. H. Harvey, M. Slatkin. in *Evolution* (Eds.). Cambridge Univ. Press, Cambridge. Pp 31-42.
- Bohonak, A. 1999. Dispersal gene flow and population structure. *Rev. Biol.* 74: 21-45.
- Byrne, M. and S.H. James. 1991. Genetic Diversity in the cycad *Macrozamia riedlei*. *Heredity*. 67:35-39.
- Calonje, M. and J. Meerman. 2009. What is *Zamia prasina* (Zamiaceae: Cycadales)? *J. Bot. Res. Inst. Texas*. 3(1):43–49.
- Caputo, P., S. Cozzolino, P. De Luca, A. Moretti and D. Stevenson. 2004. Molecular phylogeny of *Zamia* (Zamiaceae). In: Walters T and R. Osborne, eds. *Cycads classification concepts and recommendations*. Wallingford: CABI Publishing. Pp 149–157.
- Caujapé-Castells, J. 2006. Brújula para Bótanicos Desorientados en la Genética de Poblaciones. Exegen Ediciones. Gran Canaria, España. 133 pp.
- Céspedes, M., M.V. Gutierrez, N.M. Holbrook and O.J. Rocha. 2003. Restoration of genetic diversity in the dry forest tree *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) after pasture abandonment in Costa Rica. *Molecular ecology*. 12: 3201-3212.



- Cibrian-Jaramillo, A., A.C. Daly, E. Brenner, R. Desalle and T.E. Marlers. 2010. When North and south don't mix: genetic connectivity a recently endangered oceanic cycad, *Cycas micronesica* in Guam using EST-microsatellites. *Molecular Ecology*. 19: 2364-2379.
- Colby, C. 1996. Introduction to evolutionary biology. Exploring the creation/evolution controversy. [Http://www.talkorigins.org/faqs/faq-intro-tobiology.html](http://www.talkorigins.org/faqs/faq-intro-tobiology.html).
- Corander, J., P. Waldmann y M. Sillampaa. 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*. 163: 367-374.
- Chamberlain, C.J. 1919. The living cycads. New York: Hafner.
- Channarayappa. 2007. Molecular Biotechnology, Principles and Practices. University press, London, ISBN-13: 9781420051575.
- Chávez, C. Angélica. Variación Morfológica y Genética del Complejo *Ceratozamia robusta* Miq. (Zamiaceae) en el Sureste de México y Belice, Mayo del 2010. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. UNICACH. 73 pp.
- Chistiakov, D.A., B. Hellemans y F.A. Volckaert. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*. 255: 1-29.
- Chung, M. Y., B. K. Epperson, y M. G. Chung. 2003. Genetic structure of age classes in *Camellia japonica* (Theaceae). *Evolution*. 57: 62-73.
- Christenhusz, J.M, L. J. Reveal, A. Farjon, M. F. Gardner, R. R. Mill and M. W. Chase. 2011. A new classification and linear sequence of extant gymnosperms. *Phytotaxa*. 19: 55–70.
- Cruzan, M. B. 2001. Population size and fragmentation thresholds for the maintenance of genetic diversity in the herbaceous endemic *Scutellaria montana* (Lamiaceae). *Evolution*. 55 (8): 2569-1580.
- Dehestani, A. and S. K. Kazemi Tabar. 2007. A rapid efficient method for DNA isolation from plants with high levels of secondary metabolites. *Asian J. PlantSci*. 6: 977-981

- Diario Oficial De La Federación. 2001. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección Ambiental- Especies de flora y fauna silvestres en México Categorías de Riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio- Lista de especies en riesgo. Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales. México.
- Diario Oficial De La Federación. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010. Protección Ambiental- Especies de flora y fauna silvestres en México Categorías de Riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio- Lista de especies en riesgo. Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales. México, D.F. 21- 59 pp.
- De Castro, O., M. Vázquez-Torres and P. De Luca. 2006. Utility of AFLP markers for the assessment of molecular relationships in *Ceratozamia* Brongn. (Zamiaceae). *Plant Biosystems*. 140: 221–228.
- Doyle, J. J. and J. L, Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh doyle leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Doyle, J.J. and J. L, Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13-15
- Eckenwalder, J. 1980. The cycads: the prime of their lives. Bull. *Fairchild Tropical Garden*. 35 (1): 11-19.
- Eguiarte, L.E., N. Perez-Nasser and D. Piñero. 1992. Genetic Structure, Outcrossing Rate and Heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): Implications for evolution and conservation. *Heredity*. 69: 217-228.
- Ellstrand, N.C., R. Ornduff and J.M. Clegg. 1990. Genetic structure of the Australian cycad, *Macrozamia communis* (Zamiaceae). *American Journal of Botany*. 77: 677–681.
- Erlich, H. A. and N. Arnheim. 1992. Genetics analysis using the polymerase chain reaction. *Genetics*. 26: 479-506.
- Fernández-Palacios, J.M. 2004. Introducción a las islas. In: Ecología Insular /Island Ecology. Fernández-Palacios, J.M. and Morici, C. (Eds). AEET/Cabildo Insular de La Palma. Pp 21-55.

- Fernandez M.J.F. and V.L Sork. 2007. Genetic variation in fragmented forest stands of the Andean oak *Quercus humboldtii* Bonpl (Fagaceae). *Biotropica*. 39: 72–78.
- Feldman, M.V., A. Bergman., D.D. Pollock and D.B. Goldstein. 1997. Microsatellite genetic distances with range constraint: analytic description and problems of estimation. *Genetic*. 145: 207-216.
- Futuyma, D. 1986. Evolutionary biology. Sunderland, Massachusetts. Sinauer Associates. 2da edition. Pp 600
- Frankham R. 1996. Relationship of Genetic Variation to Population Size in Wildlife. *Conservation Biology*. 10 (6): 1500-1508.
- Frankham, R., J.D. Ballou and D. A. Briscoe. 2004. A primer of conservation Genetic. Cambridge University Press. Cambridge, England.
- Freeland J.R. 2005. Molecular ecology. John Wiley and Sons, Ltd. Inglaterra. Pp 373.
- Galtier, N., F. Depaulis, and N. Barton. 2000. Detecting bottlenecks and selective sweeps from DNA sequence polymorphism. *Genetics*. 155: 981-987.
- González-Astorga J. and J. Nuñez-Farfan. 2001. Effect of hábitat fragmentation on the genetic structure of the narrow endemic *Brongniartia vazquezii*. *Evolutionary Ecology Research*. 3: 861–872.
- González, D. y A. P. Vovides. 2002. Low intralineaage divergence in *Ceratozamia* (Zamiaceae) detected with nuclear ribosomal DNA ITS and chloroplast DNA *trnL-F* non coding region. *Systematic Botany*. 27:654-661.
- González-Astorga, J., A. P. Vovides, M. M. Ferrer and C. Iglesias. 2003. Population genetics of *Dioon edule* Lindl. (Zamiaceae, Cycadales): biogeographical and evolutionary implications. *Biological Journal of the Linnean Society*. 80: 457-467.
- González-Astorga J. and G. Castillo-Campos. 2004. Genetic variability of the narrow endemic tree *Antirhea aromatic* Castillo-Campos and Lorente (Rubiaceae, Guettardeae) in a tropical forest of Mexico. *Annals of Botany*. 93: 521–528.

- González-Astorga, A. J., A. P. Vovides, A. Cruz-Angon, P. Octavio-Aguilar And Carlos Iglesias. 2005. Allozyme Variation in the 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. O. Aguilar, D. A. Fey, F. N. Morejón and C. Iglesias. 2006. Genetic diversity and structure of the cycad *Zamia loddigesii* Miq. (Zamiaceae): implications for evolution and conservation. *Biological Journal of the Linnean Society*. 152: 533-544.
- González-Astorga. J., F. Vergara S., A. P. Vovides, F. N. Morejon, D. Cabrera T. and M. Pérez F. 2008. Diversity and genetic structure of three species of *Dioon* Lindl. (Zamiaceae, Cycadales) from the Pacific seaboard of Mexic. *Biological Journal of the Linnean Society*. 94: 765-776.
- González-Astorga, A.J., A.P. Vovides, D. Cabrera-Toledo, F. Nicolalde-Morejón. 2009. Diversity and genetic structure of the endangered cycad *Dioon sonorensis* (Zamiaceae) from Sonora, Mexico: Evolutionary and conservation implications. *Biochemical Systematics and Ecology*. 36: 891–899.
- Hamilton, M., E. Pincus, A. Di Fiore y R.C. Fleischer. 1999. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques*. 27: 500-507.
- Hamilton, M. 2009. Population genetics. Wiley-Blackwell. Malasia. ISBN. 978-1-4051-3277-0. 424 pp.
- Hamrick, J.L. and M.J.W. Godt. 1989. Allozyme diversity in plant species. In: Plant population genetics breeding and genetic resources. Brown A.H.D, M.T. Clegg., A. Kahler. L, and B.S. Weir (Eds). Sunderland, MA: Sinauer Associates. Pp 43–63.
- Hamrick, J.L., J. Mary, W. Godt and S. L. Sherman-Broyles. 1991. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*. 6: 95-124.
- Hamrick, J.L., M.J.W. Godt and S.L. Sherman-Broyles. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in plant species. *New For*. 6: 95–124.

- Hamrick, J.L. and M.J.W. Godt. 1996. Conservation genetics of endemic plant species. Conservation genetics—case histories from nature (Avisé J. C. and J. L Hamrick (Eds). New York: Chapman & Hall. Pp 281–304.
- Hamrick, J. L. 2004. Response of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecology and Management*. 197: 323-335.
- Hartl, D.L. and A.G. Clark 1997. Principles of populations genetics. 3<sup>a</sup>. ed. Sinauer Associates, Inc. Canada. 479 pp.
- Hedrick, P. W. 2000. Genetics of populations. 2<sup>a</sup> ed. Jones and Bartlett Publishers. USA. 553 pp.
- Hedrick, P. W. 2011. Genetics of populations. 4<sup>a</sup> ed. Jones and Bartlett Publishers. USA. 659 pp.
- Jones, D. L. 2002. Cycads of the World. Smithsonian Institution Press. Washington, D. C. 312 pp.
- Kalisz, S., J.D. Nason, F.M. Hanzawa and S.J. Tonsor. 2001. Spatial population genetic structure in *Trillium grandiflorum*: the roles of dispersal, mating, history, and selection. *Evolution*. 55: 1560–1568.
- Kalinowski, S.T. 2004. Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling design. *Conservation Genetics*. 5: 539–543.
- Karp, A., S. Kresovich, K. Bhat, W. Ayad and T. Hodgkin. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Roma Italia. 47 pp.
- Karp, A. and K. Edwards. 1998. DNA markers: a global overview. In: G. Caetano-Anollés, P.M. (Eds). DNA markers: protocols, applications and overviews. Gress hoff. New York. Pp 1-13.
- Keppel, G. 1999. Population genetics, phylogeny, ecology and the conservation status of *Cycas seemannii* A.Br. (Cycadaceae) (MS thesis). Suva, Fiji: University of the South Pacific.
- Keppel, G. 2002. Low genetic variation in a Pacific cycad: conservation concerns for *Cycas seemannii* (Cycadaceae). *Oryx*. 36: 41–49.

- Limón, F. L. 2009. Genética de Poblaciones de *Zamia furfuracea* L. f. (Zamiaceae); una cícada endémica al estado de Veracruz, México. Tesis de licenciatura Facultad de Biología Universidad Veracruzana, Xalapa. 58 pp.
- Lin, T.P., Y.C. Sun, H.C. Lo and Y.P. Cheng. 2000. Low genetic diversity of *Cycas taitungensis* (Cycadaceae), an endemics species in Taiwan, revealed by allozyme analysis. *Taiwan Journal of Forest Science*. 15: 13–19.
- Linhart, Y.B. Mitton, J.B. Sturgeon and M.L. Davis. 1981. Genetic Variation in Space and Time in a Population of Ponderosa Pine. *Heredity*. 46:407-426.
- Marchant, C.J. 1968. Chromosome patterns and nuclear phenomena in the cycads families: Stangeriaceae and Zamiaceae. *Chromosoma*. 24: 100-134.
- Medina, C. R., I. Luna V. y O. Alcántara A. 2003. Zamiaceae en Hidalgo, México. Anales del Instituto de Biología Nacional Autónoma de México. *Serie Botánica*. 74 (2): 289-301
- Merrow, A.W. y K. Nakamura. 2007. Ten microsatellite loci from *Zamia integrifolia* (Zamiaceae). *Molecular Ecology Notes*. 7: 824–826.
- Meerow, A. W., J. Francisco Ortega, T. Ayala-Silva, D. W. Stevenson, and K. Nakamura. 2012. Population genetics of *Zamia* in Puerto Rico, a study with ten SSR loci. *Memoirs of the New York Botanical Garden*. 106: 204– 223.
- Meerow, A. W., J. Francisco-Ortega, M. Calonje, M. P. Griffith, T. Ayala-Silva, D. W. Stevenson and K. Nakamura. 2012. *Zamia* (Cycadales: Zamiaceae) on Puerto Rico: asymmetric genetic differentiation and the hypothesis of multiple introductions. *American Journal of Botany*. 99 (11): 1828–1839.
- Miller, M.P. 1997. Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) version 1.3.
- Moreno-Letelier, A. 2007. Tamaño efectivo de la población. Eguiarte L. E., V. Souza y X. Aguirre (Eds.). Ecología molecular. Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAT, CONABIO. México.
- Moretti, A. and S. Sabato. 1984. Karyotype evolution by centromeric fission in *Zamia* (Cycadales). *Plant Syst. Evol.* 146: 215-223.

- Moretti, A. 1990. Karyotypic data on North and Central American Zamiaceae (Cycadales) and their phylogenetic implications. *Amer. J. Bot.* 77: 1016-1029.
- Moretti, A., P. Caputo, L. Gaudio and D.W. Stevenson. 1991. Intraspecific chromosome variation in *Zamia* (Zamiaceae, Cycadales). *Caryologia.* 44: 1-10.
- Moretti, A., P. Caputo, S. Cozzolino, P. De Luca, L. Gaudio, G.S. Gigliano, and D.W. Stevenson. 1993. A phylogenetic analysis for *Dioon* (Zamiaceae). *American Journal of Botany.* 80: 204–214.
- Nagalingum, N. S., C. R Marshall, T. B. Quental, H. S. Rai, D. P Little and S. Mathews. 2011. Recent synchronous radiation of a living fossil. *Science.* 334 (6057): 796-799.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist.* 949: (106) 283-292.
- Nicolalde-Morejón, F., A. P. Vovides y D. W. Stevenson. 2009. Taxonomic revision of *Zamia* in MegaMexico. *Brittonia.* 61: 301-335.
- Nicolalde-Morejón, F., J. González-Astorga, F. Vergara-Silva, D. W. Stevenson, O. Rojas-Soto y A. Medina-Villarreal. 2013. Biodiversidad de Zamiaceae en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad.* 84. DOI: 10.7550/rmb.38114.
- Norstog, K.J. 1980. Chromosome numbers in *Zamia* (Cycadales). *Caryologia.* 33: 419-428.
- Norstog, K.J. and T.J. Nicholls. 1997: *The Biology of the Cycads.* Cornell University Press, Ithaca.
- Orell, M. Latí, K. Koivula, K. Rytönen, and P. Welling. 1999. Immigration and gene flow in a northern willow tit (*Parus montanus*) population. *Department of biology. Finland.* 12: 283-295.
- Osborne, R., M.A. Calonje and K.D. Hill, L. Stanberg and D.W. Stevenson. 2012. The World List Cycads. *Proceedings of Cycad 2008.* The New York Botanical Garden Press. *Memoirs of The New York Botanical Garden.* 106: 480-507.

- Parker, P.G., A.A Snow, M.D Schug, G.C. Booton and P.A. Fuerst.1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*. 79 (2): 361-382.
- Peakall, R. y P.E. Smouse. 2006. Genetic Analysis in Excel (GENAIEX 6.4). population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6: 288-295.
- Piñero, D., A. Barahona, L. Eguiarte, A. Rocha-Olivares and R. Salas-Lizana. 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, en *Capital natural de México*, vol. I: *Conocimiento actual de la biodiversidad*. CONABIO, México. 437-494 pp.
- Phillips, W., H. Rodríguez, P. Fritz. 1995. Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie técnica. Informe técnico N°252. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 183 pp.
- Slatkin, M. 1985. Gene Flow in Natural Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 16: 393-430.
- Slatkin, M., 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*. 236: 787-792.
- Slatkin, M. 1994. Gene flow and population structure. *Ecological Genetics*. Princeton University Press. Pp 3-18.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite alleles frequencies. *Genetics*. 139: 457-462.
- Schutzman, B., A.P. Vovides and B. Dehgan 1988. Two new species of *Zamia* (Zamiaceae, Cycadales) from Southern Mexico. *Bot. Gaz*. 149: 347-360.
- Sharma, I.K., D.L. Jones, P.I. Forster and A.G. Young. 1998. The extent and structure of variation in the *Macrozamia pauli-guilielmi* complex (Zamiaceae). *Biochemical Systematic and Ecology*. 26: 67-77.



- Sharma, I.K., D.L. Jones, P.I. Forster and A.G. Young. 1999. Low isozymic differentiation among five species of the *Macrozamia heteromera* group (Zamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 27: 67–77.
- Sharma IK, Jones DL, Foster PI. 2004. Genetic differentiation and phenetic relatedness among seven species of the *Macrozamia plurinervia* complex (Zamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 32: 313–32.
- Stevenson, D. W. 1992. A formal classification of the extant cycads. *Brittonia*. 44: 220-223.
- Stevenson, D. W. 2001. Orden Cycadales. Flora de Colombia. Monografía 21. Unibiblos, Bogotá D.C. Pp 92.
- Takahashi, T., N. Tani, H. Taira and Y. Tsumura. 2005. Microsatellite markers reveal high allelic variation in natural populations of *Cryptomeria japonica* near refugial areas of the last glacial period. *Journal of Plant Resource*. 118: 83-90.
- Tonsor, S.J., S. Kalisz, J. Fisher and T.P. Holtsford. 1993. A life history based study of population genetic structure: seed bank to adults in *Plantago lanceolata*. *Evolution*. 47: 833–843.
- Treutlein, J., P. Vorster and M. Wink. 2004. Molecular relationships in *Encephalartos* (Zamiaceae, Cycadales) based on nucleotide sequences of nuclear ITS 1&2, Rbcl, and genomic ISSR fingerprinting. *Plant Biology*. 7: 79–90.
- Valadez, M. E. y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas. Universidad Autónoma Chapingo. México D.F. 147 pp.
- Vázquez-Domínguez, E., A. Hernández-Valdés, A. Rojas-Santoyo and L. Zambrano. 2009. Contrasting genetic structure in two codistributed freshwater fish species of highly seasonal system. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 80: 181-192.
- Vorster, P. 2004. Classification concepts in *Encephalartos* (Zamiaceae). In: Walters T and R. Osborne, eds. Cycads classification concepts and recommendations. Wallingford: CABI Publishing. Pp 69–83.

- Vovides, A. P. 1983. Systematic studies on the Mexican Zamiaceae I. Chromosome numbers and karyotypes. *American Journal of Botany*. 70: 1002–1006.
- Vovides, A.P., J.D. Res y Vázquez-Torres. 1983. Flora de Veracruz. Zamiaceae. Fascículo. Pp 26- 31.
- Vovides, A. P. 1985. Systematic studies on Mexican Zamiaceae II. Additional notes on *Ceratozamia kuesteriana* from Tamaulipas, Mexico. *Brittonia*. 37: 226–361.
- Vovides, A. P., and M. Olivares. 1996. "Karyotype polymorphism in the cycad *Zamia loddigesii* (Zamiaceae) of the Yucatán Peninsula, Mexico". *Botanical Journal of the Linnean Society*. 120: 77-83.
- Vovides, A.P. 1999. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes: Zamiaceae. Departamento de Sistemática Vegetal. Instituto de Ecología A.C. Xalapa, Veracruz. Fascículo. Pp 71. 16.
- Vovides, A.P. 2000. México: segundo lugar mundial en diversidad de cícadas. *Biodiversitas*. 6: 6-10.
- Vovides, A.P., M.A. Pérez-Farrera, C. Iglesias, S. Avendaño y S. Salas-Morales. 2003. New Cycad (Zamiaceae) reports from, Chiapas and Tabasco, México. *Rhodora*. 105: 71-76.
- Vovides A. P., M. A. Pérez-Farrera, D. González y S. Avendaño. 2004. Relationships and phytogeography in *Ceratozamia* (Zamiaceae). In: Walters T and R. Osborne, eds. *Cycads classification concepts and recommendations*. Wallingford: CABI Publishing. Pp 109–125.
- Vovides, A. P. y F. Nicolalde-Morejón. 2010. Ficha técnica de *Zamia polymorpha*. En: Vovides, A. P. (compilador). Base de datos de la cícadas mexicanas. Instituto de Ecología A.C., INECOL. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. DK008. México, D.F.
- Walters, T. and D.S. Decker-Walters. 1991. Patterns of allozyme diversity in the west Indies cycad *Zamia pumila* (Zamiaceae). *American Journal of Botany*. 78: 436–445.

- Waser, N.M. 1987. Spatial Genetic Heterogeneity in a Population of the Montane Perennial Plant *Delphinium nelsonii*. *Heredity*. 58: 249-256.
- White, G.M., D.H. Boshier and W. Powell. 2002. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99: 2038-2042.
- Whitelock, L. M. 2002. The cycads. Timber Press. Portland. 374 pp.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*. 28: 114-138
- Wright, S. 1978. Evolution and the genetics of populations. Vol.4. Chicago: University of Chicago Press.
- Yang, S.L. and A.W. Meerow. 1996. The *Cycas pectinata* (Cycadaceae) complex: genetic structure and gene flow. *International Journal of Plant Science*. 157: 468–483.
- Young, A., T. Boyle and T. Brown. 1996. The population genetics consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution*. 11: 413-418.

## **XII. ANEXOS**

### **Anexo 1: Protocolo de extracción de ADN por el método-CTAB cloroformo para plantas.**

#### **Primer día.**

##### **Maceración de la muestra:**

- Es necesario contar en todo momento con bata de laboratorio y guantes, tomar un trozo de hoja (foliolo) aproximadamente 1.5x1.5 cm y cortar pequeños pedazos e introducirlos en un tubo para microcentrifuga de 1.5 ml de capacidad.
- Agregar 50 ul de Buffer CTAB macerar las muestras con un palito de madera estéril hasta obtener una pasta consistente esparciendo la muestra en las paredes inferiores del tubo evitando que la muestra se quede pegada en el fondo.
- Agregar 650 ul de Buffer CTAB para cada tubo agitar en el vortex a cada tubo hasta que las muestras estén completamente en resuspensión en el CTAB, centrifugar por unos segundos a 16 000 revoluciones por minuto (rpm) para bajar la muestra y el líquido e Incubar a 65° C toda la noche en baño maría o baño seco.

#### **Segundo día**

##### **Lavados con cloroformo y precipitación:**

- Agregar 1 ul de RNAasa (10 mg/ml) y dejar reposar en baño maria o baño seco por una hora y media a 37° C.
- Centrifugar las muestras durante 5 minutos a 16 000 rpm y tomar la mayor cantidad de sobrenadante pasandolo a un set de tubos nuevo etiquetados de 1.5 ml.

- Añadir 500 ul de cloroformo a cada tubo pasar los tubos a vortex por 20 segundos centrifugar los tubos por 5 minutos a 16 000 rpm extraer 400 ul de la solución de la capa superior del tubo agregar este sobrenadante a la segunda serie de tubos etiquetados y añadir 400 ul de cloroformo a cada tubo agitar en vortex por unos segundos y centrifugar los tubos durante 10 minutos a 16 000 rpm.
- Extraer 250 ul de la solución de la capa superior del tubo. Agregarlo al tercer set de tubos etiquetados añadir 148.7 ul de isopropanol a cada tubo y 20.4 ul de Acetato de Amonio a 7.5 M a cada tubo. Agitar a cada tubo en el vortex por 20 segundos, dejar reposar los tubos por 10 minutos.

#### **Lavado de botón:**

- Centrifugar durante 10 minutos a 16 000 rpm
- Identificar el botón blanco de ADN en la parte inferior del tubo. Vierta la solución en un vaso de precipitados con residuos.
- Secar el borde del tubo con mucho cuidado sin contaminar la parte de adentro obteniendo la última gota del líquido fuera del tubo. Verter cuidadosamente hasta mantener el botón. Agregar 1000 ul de etanol al 70% a cada tubo taparlo e invertir cuidadosamente el tubo de 2 a 3 veces, dejar reposar el tubo por 10 minutos.

#### **Secado de botón:**

- Centrifugar 2 minutos a 16 000 rpm, volver a derramar la solución, secar el borde del tubo para obtener la última gota del líquido fuera del tubo con cuidado de mantener el botón.
- Colocar en una gradilla los tubos con las tapas abiertas y cubrir completamente con servilletas dejando secar las muestras a temperatura ambiente por dos horas o toda la noche.

## **Tercer día**

### **Reconstitución del botón:**

Agregar 50 ul de agua estéril a cada tubo, incubar en baño maría o baño seco a 65°C por 20 minutos posteriormente mezclar la muestra golpeando con el dedo a los tubos en la parte inferior y centrifugar a 16 000 rpm por unos segundos finalmente la muestras pueden ser visualizadas en un gel agarosa al 1% o ser almacenada la muestra en el congelador para su posterior visualización.

### **Anexo 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) para visualización de ADN.**

- Se prepara una solución de agarosa al 1% en TAE al 1%. Se disuelven 0.375 mg de agarosa en 37.5 ml de amortiguador TAE 1X en un matraz.
  - El matraz se mete al horno de microondas aproximadamente un minuto y veinte segundos hasta que la mezcla se vea cristalina y el hervor disminuya.
1. La mezcla se deja enfriar a temperatura ambiente aproximadamente 5 minutos.
  2. Antes de vaciar la mezcla en el molde de la cámara de electroforesis se coloca el peine para diez pozos.
  3. La mezcla se vierte en el molde y se deja pasar aproximadamente 15 a 20 minutos para que el gel solidifique.
  4. Una vez que haya solidificado el gel, se remueve el peine evitando que se rompa el gel y se sumerge el gel en la cámara de electroforesis que contiene amortiguador TAE 1X.
  5. Para cargar el gel de agarosa, se utiliza un tampón de carga con 5 ul de la extracción ADN y 3 ul azul, mezclando sobre un papel parafilm con una

micropipeta resuspendiendo hasta mezclar bien para colocar el ADN en los pozos del gel.

6. Tapar la cámara de electroforesis y colocar los electrodos de acuerdo a sus terminales negativo y positivo, encender la fuente de poder a un voltaje de 110 volts por una hora aproximadamente.
7. Cuando el gel haya corrido se retira de la cámara y se coloca en una charola que contiene agua corriente más 25 ul de bromuro de etidio.
8. Se retira el gel de la charola y se observa en el transiluminador de luz ultravioleta por unos instantes.
9. Se fotografía el gel directamente del transiluminador y se imprime la foto en blanco y negro en papel normal.

### **Anexo 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida para visualización de ADN al 6%.**

- Las placas de vidrio que son utilizadas se limpian con sanitas primeramente usando el alcohol al 70% y posteriormente se enjuaga con agua destilada. Estando los vidrios ya secos se une la placa más gruesa con la más delgada, la unión se hará mediante marcos fundidos.
- La preparación de la solución para los geles de poliacrilamida es la siguiente:

La solución es para 4 geles 25 ml utilizando un vaso de precipitados.

Agua destilada 17 ml

TBE 10X 2.5 ml

Acrilamida al 30% 5 ml

\*APS 10% 450 ul

\*TEMED 25 ul

Los últimos dos reactivos se agregan siempre al final y al mismo tiempo. Finalmente se mezclan todos los ingredientes (reactivos) con una jeringa apropiada a los mililitros que se utilizan a la solución, todo esto se hace de manera rápida sin dejar que polimerice la solución. Una vez mezclados los reactivos se toma un poco de la solución con una jeringa y se deposita en las placas de vidrios que se encuentran ya preparadas después que se coloca la solución en las placas se pone el peine en la parte superior del gel y esperar que los geles polimericen.

- Una vez ya polimerizados los geles se sacan las bases, los peines y los marcos fundidos. Si sobre las placas quedan restos de gel polimerizado se limpia con el amortiguador TBE 0.5X este mismo amortiguador lo va a contener una cámara de electroforesis donde se colocan los geles.
- Antes de depositar el ADN sobre los pozos se hace un precorrimento de 15 min a 70 V.
- Realizado el precorrimento se ordenan las muestras de ADN, el azul de bromofenol y ladder. Se deja un pozo libre para el marcador molecular. Teniendo listo lo anterior se toma un tampón de carga de 6 ul de ADN colocándolo en el pozo que le corresponde una vez depositada todas las muestras al final se carga el marcador de peso molecular 1.5 ul de ladder más 1.5 ul de azul de bromofenol.
- Con los geles listos cargados ya con las muestras se corre a 70 V. La cámara de electroforesis se tapa de acuerdo a los polos correspondientes revisando que todo este puesto correctamente sin que haya ninguna interrupción durante el corrimiento en un periodo de 80 minutos aproximadamente.
- Ya finalizado el corrimiento se apaga la fuente se sacan los geles de la cámara electroforética y se tiñen en bromuro de etidio durante 10 minutos.



- Se retira el gel de la charola y se observa en el transiluminador de luz ultravioleta por unos instantes. Se fotografía el gel directamente del transiluminador y se imprime la foto en blanco y negro en papel normal.