

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y
ARTES DE CHIAPAS**
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

**VARIACIÓN MORFOLÓGICA E
INTROGRESIÓN GENÉTICA EN *Zamia
splendens*, *Z. katzeriana* y *Z. loddigesii* EN EL
SURESTE DE MÉXICO**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN **CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y
CONSERVACIÓN DE ECOSISTEMAS TROPICALES**

PRESENTA

CHRISTIAN RUIZ CASTILLEJOS

Dr. Miguel Ángel Pérez Farrera
Director
Instituto de Ciencias Biológicas
Universidad de Ciencias y Artes de
Chiapas

Dr. Andrew P. Vovides P.
Codirector
Biología Evolutiva de Cycadales
Instituto de Ecología A. C.

Dra. Angélica Cibrián Jaramillo
Asesora
Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad
CINVESTAV-Irapuato



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Marzo de 2018.

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y
ARTES DE CHIAPAS**
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

**VARIACIÓN MORFOLÓGICA E
INTROGRESIÓN GENÉTICA EN
Zamia splendens, *Z. katzeriana* y *Z.
loddigesii* EN EL SURESTE DE
MÉXICO**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN **CIENCIAS EN
BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN
DE ECOSISTEMAS TROPICALES**

PRESENTA

CHRISTIAN RUIZ CASTILLEJOS



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Marzo de 2018.

Agradecimientos

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** y al **Posgrado en Biodiversidad y Conservación de Ecosistemas Tropicales** de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, por permitirme continuar con mi formación académica. Al **Laboratorio de Ecología Evolutiva**, por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo y todas las herramientas que me fueron proporcionadas durante mi formación.

A los doctores **Miguel Ángel Pérez-Farrera**, **Andrew Vovides** y **Angélica Cibrián-Jaramillo** por aceptar desarrollar conmigo este proyecto, por invertir su tiempo y recursos. Gracias por su apoyo, principalmente por que este proyecto de tesis fue apoyado financieramente por el proyecto **SEP-CONACYT No. CB-2011-01-169468**, otorgado al Dr. Andrew P. Vovides y el proyecto “**Diversidad florística y Ecología evolutiva de especies en peligro en Áreas Naturales Protegidas en Chiapas, México**” otorgado al Dr. Miguel Ángel Pérez Farrera por Christopher Davidson y Sharon Christoph; por lo cual estoy inmensamente agradecida.

A la Dra. **Yuyini Licon-Vera** por su gran apoyo en el análisis molecular en el uso del software indispensable. A la Mtra. **Nancy Gabriela Santos Hernández** por todo su apoyo en los análisis estadísticos moleculares. Al Mtro. **Pablo Alberto Merino García** por su apoyo en los análisis estadísticos y la edición de los gráficos de resultados. Al Dr. **Arturo Carrillo Reyes** por su valioso apoyo con el Software R, gracias por ese script.

A los doctores: **Juan Núñez-Farfán**, **Eduardo E. Espinoza-Medinilla** y el **Dr. Sergio López-Mendoza**, por todo su apoyo en comentarios y correcciones al documento, gracias por su tiempo y dedicación.

A mi compañera del Laboratorio de Ecología Evolutiva, **N Gabriela Santos** gracias por tu apoyo amiga, mi confidente, gracias compa vamos por muchos más días juntas. A **Ariadna Ocaña**, **Brianda Ynteriano** y **Claudia Chacón**, gracias por su apoyo chicas, letra por letra... Y a quienes directa e indirectamente me apoyaron a terminar este trabajo de tesis.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|----------|
| ÍNDICE DE TABLAS..... | I |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | III |
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| CAPÍTULO I..... | 7 |
| VARIACIÓN MORFOLÓGICA ENTRE <i>ZAMIA SPLENDENS</i>, <i>Z. KATZERIANA</i> Y <i>Z. LODDIGESII</i> (CYCADALES: ZAMIACEAE) EN EL SURESTE DE MÉXICO. | 7 |
| RESUMEN | 7 |
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 12 |
| <i>Área de estudio</i> | 12 |
| <i>Variación morfológica.</i> | 14 |
| <i>Análisis de datos morfológicos</i> | 15 |
| RESULTADOS..... | 17 |
| <i>Análisis univariado</i> | 17 |
| <i>Análisis multivariado</i> | 23 |
| DISCUSIÓN. | 31 |
| CONCLUSIONES | 34 |
| LITERATURA CITADA..... | 35 |
| ANEXOS | 42 |
| Anexo I. Test de normalidad de Shapiro-Wilk para las 12 variables analizadas. Ninguna de las variables presenta normalidad en sus valores..... | 42 |
| Anexo II. Prueba de homocedasticidad de varianzas para las 12 variables analizadas. Valores de $p > 0.05$ representan variables con homocedasticidad de varianzas. | 42 |
| Anexo III. Resultados de prueba de Tukey con intervalo de confianza de 95 % con implementación de “Diferencia Honestamente Significativa (HSD en inglés)”.Se incluyen las 12 variables vegetativas consideradas en el estudio dentro de las 10 localidades que representan la distribución de las tres especies de <i>Zamia</i> | 43 |
| Anexo IV. Gráfica de medias y error estándar de los caracteres morfológicos que muestran la variación entre las especies analizadas, NH= Número de hojas, NF= Número de folíolos, | |

| | |
|--|-----------|
| LP= Largo del peciolo, LR= Largo del raquis, AFB= Ancho foliolo basal, AFM= Ancho de foliolo medio, AFA= Ancho de foliolo apical, ADA: Ancho de articulación, LFB= Largo del foliolo basal, LFM= Largo del foliolo medio, LFA= Largo de foliolo apical, DEF= Distancia entre foliolos. SOKT: Selva El Ocote Katzeriana, SOLD; Selva El Ocote Loddigesii, SOSP; Selva el Ocote Splendens..... | 46 |
| CAPÍTULO II..... | 47 |
| HIBRIDACIÓN INTERESPECÍFICA EN TRES ESPECIES DE ZAMIA (ZAMIACEAE) EN EL SUR DE MÉXICO..... | 47 |
| RESUMEN | 47 |
| INTRODUCCIÓN | 49 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 51 |
| <i>Colecta</i> | 51 |
| <i>Extracción y visualización de ADN</i> | 52 |
| <i>Amplificación de ADN con microsatélites</i> | 52 |
| <i>Análisis de microsatélites</i> | 54 |
| <i>Diversidad y estructura genética</i> | 55 |
| RESULTADOS | 56 |
| <i>Diversidad genética</i> | 58 |
| <i>Estructura genética y diferenciación</i> | 62 |
| DISCUSIÓN | 74 |
| CONCLUSIONES | 78 |
| LITERATURA CITADA..... | 79 |
| ANEXOS | 85 |
| Anexo I. Valores de q para Modelos de selección en BayeScan. Valores en negrita representan los valores atípicos en la gráfica. | 85 |
| Anexo II. Método de extracción de ADN por el método de CTAB. | 85 |
| Anexo III. Frecuencias alélicas de 12 loci utilizados para evaluar la diversidad genética de <i>Z. splendens</i> , <i>Z. loddigesii</i> y <i>Z. katzeriana</i> | 87 |
| CAPÍTULO III..... | 93 |
| DISCUSIONES Y CONCLUSIONES GENERALES..... | 93 |
| LITERATURA CITADA | 96 |

ÍNDICE DE TABLAS.

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Descripción de los individuos colectados de tres especies de <i>Zamia</i> consideradas en este estudio. N: Número de muestras..... | 12 |
| Tabla 2. Variables morfológicas vegetativas utilizadas en el análisis de poblaciones de <i>Z. katzeriana</i> , <i>Z. splendens</i> y <i>Z. loddigesii</i> de acuerdo a Pérez-Farrera <i>et al.</i> 2016. | 15 |
| Tabla 3. Promedios (M) y \pm Desviaciones estándar (DE) utilizados para la caracterización de poblaciones de <i>Zamia loddigesii</i> , <i>Z. katzeriana</i> y <i>Z. splendens</i> . Los valores en negritas representan los valores más altos para cada variable. | 18 |
| Tabla 4. Promedios (M) y \pm Desviaciones estándar (DE) utilizados para la caracterización de poblaciones de <i>Zamia splendens</i> (ZS), <i>Z. loddigesii</i> (ZL) y <i>Z. katzeriana</i> (ZK)..... | 19 |
| Tabla 5. Resultados de análisis de varianza para variables paramétricas | 19 |
| Tabla 6. Resumen pareado de las Distancias cuadráticas de Mahalanobis entre las tres especies de <i>Zamia</i> analizadas. ZS= <i>Z. splendens</i> , ZL= <i>Z. loddigesii</i> , ZK= <i>Z. katzeriana</i> . Debajo de la diagonal los valores de Distancias cuadráticas, por arriba de la diagonal valores de F (gl= 12.148). Para todos los casos $p < 0.05$ | 23 |
| Tabla 7. Resumen del análisis de discriminantes para <i>Z. splendens</i> , <i>Z. loddigesii</i> y <i>Z. katzeriana</i> | 26 |
| Tabla 8. Coeficiente de funciones discriminantes estandarizadas para cada factor de las localidades de las especies <i>Z. splendens</i> , <i>Z. loddigesii</i> y <i>Z. katzeriana</i> , consideradas en este estudio. Los valores en negrita representan los valores más altos de cada factor. LD (Linear Discriminant por sus siglas en inglés)..... | 26 |
| Tabla 9. Coeficiente de función de clasificación por localidad de las especies <i>Z. splendens</i> , <i>Z. loddigesii</i> y <i>Z. katzeriana</i> , consideradas en este estudio. Los valores en negrita representan los valores más altos de cada función..... | 27 |
| Tabla 10. Valores de correlación en los componentes principales y eigen-values. Los valores en negritas, representan los más altos registrados. PC= Principal Component. | 29 |
| Tabla 11. Características de los 12 microsatélites diseñados para <i>Zamia integrifolia</i> , <i>Z. erosa</i> , <i>Z. pumila</i> y <i>Z. portoricensis</i> utilizados en este estudio con <i>Z. splendens</i> , <i>Z. loddigesii</i> y <i>Z. katzeriana</i> | 53 |
| Tabla 12. Resultados de la prueba de selección de loci polimórficos en las 10 poblaciones de <i>Zamia</i> consideradas en este estudio. *PP= probabilidad posterior. | 56 |

| | |
|---|----|
| Tabla 13. Estadísticas descriptivas de la variación genética en las 10 poblaciones analizadas de <i>Zamia</i> . % LP= porcentaje de loci polimórficos, N_a = número de alelos por locus, N_e = número de alelos efectivos, I = índice de Shannon, AP= alelos privados, H_E , H_O = Heterocigosidad observada y esperada, F = índice de fijación. Los valores son medias y errores estándar (EE). En negrita los valores más bajos y más altos para cada columna calculada. | 58 |
| Tabla 14. Valores pareados de F_{ST} y Nm entre todas las poblaciones analizadas. Los valores en negrita representan el número de migrantes entre poblaciones <i>Z. katzeriana</i> y <i>Z. splendens</i> . Debajo de cero están representados los valores de F_{ST} | 60 |
| Tabla 15. Estadística de flujo genético por locus, en todas las poblaciones analizadas. | 60 |
| Tabla 16. Valores de significancia (p) de la prueba de Equilibrio de Hardy-Weinberg para 10 poblaciones de <i>Zamia</i> analizadas. Notas: Monomórfico, ns: no significativo. * $p<0.05$; **, $p<0.01$, ***, $p<0.001$ | 61 |
| Tabla 17. Valores pareados de F_{ST} y R_{ST} entre todas las poblaciones analizadas. Los valores de F_{ST} se muestran debajo de la diagonal, mientras que los valores de R_{ST} por arriba de la diagonal. | 62 |
| Tabla 18. Valores pareados de Distancias e Identidades genéticas entre todas las poblaciones analizadas. Los valores de <i>Distancias</i> (NeiD) se muestran debajo de la diagonal, mientras que los valores de <i>Identidad</i> (NeiI) por arriba de la diagonal. Los valores en negritas representan los más bajos y altos encontrados. | 63 |
| Tabla 19. Resultados de los análisis de AMOVA. En negritas se resaltan los valores más altos. | 64 |
| Tabla 20. Valores pareados de F_{ST} y R_{ST} sin considerar loci bajo selección de equilibrio, entre todas las poblaciones analizadas. Los valores de F_{ST} se muestran debajo de la diagonal, mientras que los valores de R_{ST} por arriba de la diagonal. | 69 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. 1-A. <i>Zamia loddigesii</i> , 2-B. <i>Z. splendens</i> , 3-C. <i>Z. katzeriana</i> . Detalle de foliolos..... | 13 |
| Figura 2. Gráfica de medias y error estándar de los caracteres morfológicos que muestran la variación entre las especies analizadas, NH; Número de hojas; LFB= Largo de foliolo basal, DEF= Distancia entre foliolos, NH= Número de hojas, NF; Número de foliolos CINT; Cintalapa, OCOZ; Ocozocoautla, OCOTL; Selva El Ocote, SFER; San Fernando, SOKT; Selva El Ocote III, SSAG; Salto de Agua, TAH: Huimanguillo, Tab., TAP: Tapijulapa, Tab., VER; Choapas, Ver. | 20 |
| Figura 3. Gráfica de medias y error estándar de los caracteres morfológicos que muestran la variación entre las especies analizadas, LP= Largo del peciolo, LR= Largo del raquis, LFM= Largo del foliolo medio, LFA= Largo del foliolo apical. CINT; Cintalapa, OCOZ; Ocozocoautla, OCOTL; Selva El Ocote, SFER; San Fernando, SOKT; Selva El Ocote III, SSAG; Salto de Agua, TAH: Huimanguillo, Tab., TAP: Tapijulapa, Tab., VER; Choapas, Ver..... | 21 |
| Figura 4. Gráfica de medias y error estándar de los caracteres morfológicos que muestran la variación entre las especies analizadas, AFB= Ancho foliolo basal, AFM= Ancho de foliolo medio, AFA= Ancho de foliolo apical, ADA: Ancho de articulación. CINT; Cintalapa, OCOZ; Ocozocoautla, OCOTL; Selva El Ocote, SFER: San Fernando, SOKT: Selva El Ocote II, SOSP: Selva El Ocote III, SSAG: Salto de Agua, TAH: Huimanguillo, Tab, Tab., TAP: Tapijulapa, Tab., VER: Choapas, Ver. | 22 |
| Figura 5. Funciones Lineares de Discriminantes a partir de 12 radios morfométricos. Análisis por individuos de 10 localidades analizadas. | 25 |
| Figura 6 Gráfico de Análisis de Componentes Principales con 12 variables vegetativas y tres especies de <i>Zamia</i> . En color azul <i>Z. loddigesii</i> , en color verde individuos de <i>Z. splendens</i> y de color rojo, la mayoría de los individuos de <i>Z. katzeriana</i> | 30 |
| Figura 7. Extracción de muestras de <i>Zamia katzeriana</i> en un gel de agarosa al 1 % | 52 |
| Figura 8. Amplificación del microsatélite Zam60 con 10 muestras de <i>Z. splendens</i> en un gel de agarosa al 2% y una escalera de 100 pares de bases con banda de interés amplificando a 200 pares de bases. | 54 |
| Figura 9. Prueba de selección en los 12 loci analizados..... | 57 |
| Figura 10. Patrones electroforéticos representativos de 5 poblaciones de <i>Zamia</i> . El número por debajo del pico, representa el tamaño del alelo. B, C y E representan individuos heterocigotos. | 57 |

| | |
|--|----|
| Figura 11. Promedio de número de alelos por población..... | 59 |
| Figura 12. Gráfico de valores de Delta K que se obtuvo mediante el método de Evanno $K=5$... | 65 |
| Figura 14. Asignación bayesiana de genotipos encontrada con STRUCTURE para los individuos (“localidades”) de <i>Zamia</i> analizadas. | 67 |
| *Símbolo indica los individuos con posible mezcla genética de acuerdo a los valores de Q | 67 |
| Figura 15. Análisis de coordenadas principales para las 10 poblaciones analizadas de tres especies <i>Zamia</i> A) Detalle de agrupamiento bajo la variable categórica “Población”, B) Agrupamiento bajo la variable categórica “Individuo/ Especie”. Ambos agrupamientos calculados de acuerdo a los valores de F_{ST} entre las poblaciones analizadas. | 68 |
| Figura 16. Asignación bayesiana de genotipos encontrada con STRUCTURE para las localidades de <i>Zamia</i> analizadas sin considerar loci bajo selección. | 70 |
| Figura 17. Asignación bayesiana de genotipos encontrada con STRUCTURE para los individuos (“localidades”) de <i>Zamia</i> analizadas sin considerar loci bajo selección..... | 70 |
| *Símbolo indica los individuos con posible mezcla genética de acuerdo a los valores de Q | 70 |
| Figura 18. Análisis de coordenadas principales para las 10 poblaciones analizadas de tres especies de <i>Zamia</i> . Arriba: Detalle de agrupamiento bajo la variable categórica “Población”, Abajo: Agrupamiento bajo la variable categórica “Individuo/ Especie”. Ambos agrupamientos calculados sin considerar a los loci bajo selección de equilibrio. | 72 |
| Figura 19. Pareado de asignación de pertenencia entre las 10 poblaciones analizadas de <i>Zamia</i> | 73 |

RESUMEN

Se analizaron 10 localidades que abarcan la distribución de tres especies del Género *Zamia* (*Z. splendens*, *Z. loddigesii* y *Z. katzeriana*). En los estados de Veracruz, Chiapas y Tabasco. *Zamia splendens* es una especie que se distribuye en Selva alta y mediana perennifolia, en altitudes de 600 a 800 m.s.n.m. La distribución de *Z. katzeriana* abarca ambientes de vegetación secundaria de selva mediana perennifolia entre los 600 y 700 m.s.n.m. Por su parte, *Z. loddigesii* se distribuye en Bosque de encino, selva baja caducifolia y vegetación secundaria de selva baja caducifolia entre los 0 y 1000 msnm. Se realizó un análisis morfológico que incluyó un análisis univariado y multivariado de 12 caracteres vegetativos, además de un análisis molecular de diversidad y estructura genética con 12 loci microsatélites nucleares. Los resultados morfológicos muestran diferencias en las variables entre poblaciones y entre especies (Wilk's Lambda: 0.05 aprox. $p < 0.00$). Las distancias cuadráticas de Mahalanobis entre las poblaciones de *Z. katzeriana* y *Z. splendens* presentan los valores más bajos (1.92, $F=3.23$ $p < 0.00$) con menor distancia entre centroides, y entre *Z. katzeriana* y *Z. loddigesii* los valores más altos (75.44, $F=177.84$ $p < 0.00$). Un análisis linear de discriminantes, en conjunto con un análisis de componentes principales, demuestran la mezcla parcial entre las 10 poblaciones; agrupando a *Z. katzeriana* con las dos especies consideradas como parentales, identificando a la variable Ancho de Articulación del Foliolo, como la que mejor discrimina a las especies, porque explica más del 50 % de la variación entre ellas. El análisis molecular muestra un 88.30 % de loci polimórficos y 5.10 alelos en promedio en todas las poblaciones, para las 3 especies. El promedio de Heterocigosidad esperada y observada en las poblaciones fue de $H_E=0.54$ y $H_O=0.28$, respectivamente. El 44 % de variación es intrapoblacional y 23 % entre las poblaciones, de acuerdo al análisis molecular de varianza. El alto índice de endogamia ($F=0.48$), se observa en la definición de 5 grupos en STRUCTURE y 4 grupos cuando se excluyen del análisis los loci bajo selección balanceadora; además del análisis de coordenadas principales (a partir de valores de distancias genéticas), de acuerdo a la diferenciación genética moderada entre las poblaciones ($F_{ST}=0.25$). Un análisis de hibridación basándose en los valores de asignación a grupos (Q), muestra que el 25 % del total de poblaciones analizadas (52 individuos) se consideran de ancestría mixta. Dado que se encontró mayor número de individuos en poblaciones de *Z. splendens*; se puede concluir que el mecanismo de hibridación es posible mediante la introgresión resultante de un retrocruzamiento entre *Z. splendens* y *Z. katzeriana*.

Palabras clave: *Zamia*, variación, morfología, genética, híbrido.

ABSTRACT

We analyzed 10 localities within the distribution of three species of *Zamia* (*Z. splendens*, *Z. loddigesii* and *Z. katzeriana*) in Veracruz, Chiapas and Tabasco. *Zamia splendens* is distributed in high forest and medium-evergreen forest, at altitudes of 600 to 800 m.a.s.l. *Zamia katzeriana* occurs in disturbed environments, of medium-evergreen forest between 600 and 700 m.a.s.l. *Zamia loddigesii* is distributed in oak forest, low deciduous forests and secondary vegetation derived from low deciduous forest. Uni- and multi-variate morphological analyses of twelve vegetative variables were carried out, together with analyses using 12 nuclear microsatellite loci. Results indicate morphological differences in all variables between populations and species (Wilk's lambda: 0.05 approx $p < 0.05$). The Mahalanobis quadratic distances between the populations of *Z. katzeriana* and *Z. splendens* had lowest values (1.92, $F=3.23$ $p < 0.00$) with the smallest distance between centroids, and between *Z. katzeriana* and *Z. loddigesii* the highest (75.44, $F=177.84$ $p < 0.00$). A linear discriminant analysis together with a principal components analysis, demonstrate the partial mixing between the 10 populations, grouping *Z. katzeriana* with the two species considered as parental, the variable leaflet's width articulation is the one that best discriminates between the species, explaining more than 50% of the variation. Molecular analyses show 88.3 % of polymorphic loci, with 5.10 alleles in average in each population. The expected and observed heterozygosity, averaged across populations of $H_E=0.54$ and $H_O=0.27$, respectively. The 44 % of variation is contained within populations and 23 % between the populations, according to AMOVA. The high coefficient of inbreeding ($F=0.48$) is observed in the definition of 5 groups in STRUCTURE and 4 groups when excluded from the analysis, loci under the balancing selection. In addition to the main coordinate analysis ($F_{ST}=0.25$), according to the genetic modification between populations. An analysis of hybridization based on group assignment (Q) values shows that 25 % of the population analyzed (52 individuals) can be considered of admixed ancestry, since it found the largest number of individuals in populations of *Z. splendens*; I suggest that the hybridization had taken place through introgression resulting from backcrossing between *Z. splendens* and *Z. katzeriana*.

Key words: *Zamia*, variation, morphology, genetics, hybrid.

INTRODUCCIÓN

Las cícadas son un grupo de plantas gimnospermas consideradas dentro de las plantas vasculares como las más primitivas, pues su historia fósil puede remontarse a casi 300 millones de años (Mamay, 1969 en Brenner *et al.* 2003). Se encuentran en la división de las Cycadophyta (Norstog y Nicholls, 1997). Según Christenhunz *et al.* 2011, las cícadas están clasificadas en sólo un orden: Cycadales y dos familias (Cycadaceae y Zamiaceae). Tuvieron su mayor desarrollo en el mundo durante el Mesozoico (Crane, 1988), y las especies modernas están desapareciendo debido a la pérdida de hábitat y su popularidad en el comercio de plantas ornamentales, lo que ha llevado a drásticos descensos en el tamaño de sus poblaciones. La mayoría de las especies de cícadas se encuentran actualmente en la Lista Roja de la UICN (UICN, 2011), y en general, el estado de conservación de las cícadas mexicanas es crítico, debido a lo cual todas las especies se encuentran bajo alguna categoría de riesgo de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2010 (Diario Oficial de la Federación, 2001).

La familia Zamiaceae está formada por un grupo de plantas con estróbilos, hojas pinnadas, coriáceas o papiráceas. Se distribuye en varios ambientes incluyendo áreas tropicales y templadas (Contreras-Medina *et al.* 2001), siendo Australia, México y Sudáfrica los países con mayor diversidad en este grupo de plantas (Vovides, 2000). Incluye diez géneros aceptados con un total de 348 especies que son: *Bowenia* (dos especies), *Ceratozamia* (30 especies), *Cycas* con 114 especies distribuidas desde el este de África hasta Japón y Australia, *Dioon* (15 especies), *Encephalartos* (65 especies), *Lepidozamia* (dos especies) *Macrozamia* (41 especies), *Microcycas* (una especie), *Stangeria* (una especie), y *Zamia*. Este último, es uno de los géneros más grandes con alrededor de 77 especies (Calonje *et al.* 2017), que se distribuyen desde el sureste de Norteamérica (Georgia y Florida) hasta Bolivia en América del Sur (Osborne *et al.* 2012); es también uno de los géneros que tiene mayor rango de amplitud en cuanto a hábito y hábitat, desde el nivel del mar hasta los 2500 metros y pueden crecer en manglares, dunas costeras, bosques secos, bosques húmedos y de hábito terrestres, subacuáticas, rupícolas o epífitas (Norstog y Nicholls, 1997). Además, es el

único género dentro de las cícadas que presenta una variación cariotípica inter e intraespecífica ampliamente estudiada (Marchant, 1968; Norstog, 1980; Vovides 1983; Moretti y Sabato, 1984; Schutzman *et al.* 1988, Moretti, 1990; Moretti *et al.* 1991, Vovides y Olivares, 1996) con cambios en los cromosomas de fisión céntrica a metacéntrica, lo que sugiere una alta variabilidad y por lo tanto en la expresión de los mismos (Vázquez, 1989).

Nuestro país por ser la región más diversa y con el mayor número de endemismos de la Familia *Zamiaceae* (88.90 %) en el Neotrópico con los géneros *Dioon*, *Zamia*, *Ceratozamia* y *Microcycas* (endémica a Cuba) (Stevenson y Sabato, 1986, Nicolalde-Morejón *et al.*, 2014), alberga casi un 20 % de la diversidad mundial total. Los géneros de esta familia han sido ampliamente utilizados en estudios con enfoque molecular, sistemático y filogenético, principalmente *Dioon* (De Luca y Sabato, 1979, De Luca *et al.* 1984, Chemnick *et al.* 1997, González-Astorga *et al.* 2003, 2005, 2008; Gregory *et al.* 2003, Cabrera-Toledo *et al.* 2008) y *Zamia* (Walters y Decker-Walters, 1991, González-Astorga *et al.* 2006; Meerow y Nakamura 2007; Nicolalde-Morejón *et al.* 2008, 2011; Limón, 2009; Nicolalde-Morejón, 2009; Meerow *et al.* 2012a, 2012b; Limón *et al.* 2016, Pérez-Farrera *et al.* 2016). Las especies del género *Zamia*, se distribuyen generalmente en bosques primarios con poca o sin perturbación, aunque recientemente, han expandido su distribución en zonas de vegetación secundaria (Nicolalde-Morejón, *et al.* 2011).

La morfología de las hojas se utiliza frecuentemente en la identificación y delimitación de especies de cícadas, ya que las semillas, los conos y los catáfilos no están a menudo disponibles (Lindström, 2004). Por lo que, varias investigaciones han basado su esfuerzo en la morfología, para esclarecer diversas problemáticas, demostrando que es una herramienta valiosa: Limón *et al.* (2016), analizaron la variación fenotípica de *Zamia loddigesii* y *Z. prasina* para evaluar los efectos de la heterogeneidad del ambiente sobre los individuos, se evaluaron 17 caracteres morfológicos en 259 individuos de 14 poblaciones (72 individuos de *Z. loddigesii*, 187

individuos de *Z. prasina*) y se observó una clara separación entre las dos especies exceptuando a la población analizada en Macuspana, Tabasco; que está localizada en los límites geográficas de la distribución de ambas especies, por lo que sugieren que el ambiente heterogéneo parece desempeñar un papel determinante en la expresión fenotípica de las especies.

Nicolalde-Morejón *et al.* (2008) realizaron un análisis morfológico para tratar de aclarar la situación taxonómica de *Z. verschaffeltii* y *Z. katzeriana*. La caracterización de la variación morfométrica incluyó a todas las poblaciones (11) e individuos (115) conocidos en ese momento para el complejo, en todo su rango de distribución en México. El análisis de discriminantes y la caracterización morfométrica, muestran que *Z. verschaffeltii* no está morfométricamente relacionada con ninguna de las especies del complejo y se colocó bajo sinonimia de *Z. katzeriana* a *Z. splendens* que también formaba parte del complejo en estudio.

Pérez-Farrera *et al.* (2014) analizaron la anatomía y morfología en el complejo de especies *Ceratozamia norstogii* (*C. norstogii*, *C. mirandae*, *C. alvarezii* y *C. chimalapensis*) con un total 15 variables morfológicas (9 vegetativas y 6 reproductivas) de 99 individuos en total. Los resultados del análisis de discriminantes muestran que las cuatro especies se separan sin solapamiento entre los grupos. Las distancias cuadráticas de Mahalanobis sugieren que *C. mirandae* y *C. chimalapensis* están estrechamente relacionadas morfológicamente y que *C. chimalapensis* es la más lejana morfológicamente de *C. norstogii*, considerando la distribución y las presiones ambientales que difieren a lo largo de la distribución de las especies.

Keppel *et al.* (2009) analizaron la variación morfológica de 120 individuos en 4 poblaciones de *Cycas seemanii* a lo largo de su distribución, utilizando largo y ancho de los foliolos, longitud de peciolo, longitud del raquis, número de foliolos, longitud del foliolo medio y ancho del foliolo medio, para caracterizar morfométricamente a las poblaciones, encontrando que las diferencias morfológicas observadas entre estas,

parecen estar relacionadas con las variables ambientales de fertilidad del suelo, precipitación y cantidad de luz y recomienda un manejo cuidadoso de estos caracteres para la identificación de especies por la alta variación que presentan.

Aportar mayores evidencias que sustenten el estatus de *Z. katzeriana* como una especie válida desde el punto de vista taxonómico, utilizando herramientas morfológicas y genéticas; es el objetivo principal del trabajo considerando que los patrones morfológicos, su variación, y los niveles de diversidad y estructura genética, han sido ampliamente utilizados en el esclarecimientos de especies desde el punto de vista taxonómico.

Capítulo I

Variación morfológica entre *Zamia splendens*, *Z. katzeriana* y *Z. loddigesii* (Cycadales: Zamiaceae) en el sureste de México.

Resumen

Con la finalidad de estimar la variación para reforzar la validez taxonómica, se analizaron diez poblaciones de tres especies de cícadas del género *Zamia* (*Z. splendens*, *Z. loddigesii* y *Z. katzeriana*) colectadas en los estados de Chiapas, Tabasco y Veracruz. Un total de 162 individuos y 12 variables vegetativas fueron analizadas, mediante análisis univariado y multivariado. El análisis univariado indicó una baja variación morfológica dentro de las 10 poblaciones correspondientes a las tres especies ($\chi^2= 109.90$ $p < 0.05$); Huimanguillo, Tabasco presenta los valores más altos en la mayoría de las variables excepto el número de hojas y de folíolos por hoja. La variable Ancho de Articulación (ADA) es la variable menos regular entre las localidades (0.26 (0.47: *Z. loddigesii*, 0.18: *Z. katzeriana* y 0.16: *Z. splendens*)). De acuerdo a las distancias cuadráticas de Mahalanobis, *Z. splendens* y *Z. katzeriana* presentan los valores más bajos indicando similitud entre las variables analizadas (1.92, Wilks Lambda= 0.23 $F= 3.23$ $p < 0.05$) lo que sugiere que comparten características que permiten agrupar a poblaciones de *Z. splendens* con *Z. katzeriana* y así diferenciarlas de los individuos de *Z. loddigesii*. El análisis de discriminantes, generó dos grupos poco definidos en un espacio bidimensional, identificando de nuevo ADA y la distancia entre los folíolos (DEF), como las variables que discriminan a los grupos de acuerdo a los valores obtenidos en los factores discriminantes, y que explican más del 70 % de la variación en sus dos primeros factores. Los componentes principales, por otro lado; permiten separar a las localidades en 3 grupos definidos que corresponden a las especies estudiadas, siendo las variables ADA y largo del raquis (LR), las que permiten agrupar a las especies, por que explican más del 80 % de la varianza acumulada. Los resultados sugieren, que la mezcla de los grupos encontrada, con los análisis de

discriminantes, identifica a *Z. katzeriana* como híbrido entre las especies analizadas, probablemente como resultado de introgresión, debido a que Selva El Ocote, (localidad en la que se encontraron las tres especies) por presentar diferentes tipos de vegetación (Selva Alta y mediana Perennifolia, Selva Baja Caducifolia y Bosque de Pino), representa la zona de contacto entre las especies progenitoras (*Z. splendens* y *Z. loddigesii*) y que el retrocruzamiento apunta hacia *Z. splendens* por ser la especie con quien *Z. katzeriana* comparte más características

Palabras clave: *Zamia*, morfología, híbrido, Selva El Ocote.

Introducción

El efecto de la variación morfológica depende de los cambios estructurales en el cariotipo celular (White, 1965) y en cícadas, se han encontrado grados variables de asimetría debido a las frecuencias cariotípicas distintas. *Zamia* es el único género dentro de las cícadas en mostrar variación cariotípica inter e intraespecífica (Marchant 1968; Norstog 1980; Vovides 1983; Moretti, 1990; Vovides y Olivares, 1996), cambios en los cromosomas de fisión céntrica a metacéntrica y 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).

Khoshoo (1969) evaluó los cromosomas de 10 géneros de Cícadas (*Microcycas*, *Cycas*, *Encephelartos*, *Dioon*, *Lepidozamia*, *Macrozamia*, *Bowenia*, *Stangeria*, *Ceratozamia* y *Zamia*) y por medio de un análisis de correlación de la asimetría cariotípica y el número base de cromosomas, concluyó que los géneros con cariotipos simétricos tienen menos cromosomas y conforme incrementa el número básico, se incrementa también la asimetría; bajo ese supuesto *Zamia* resultó el género que desarrolló un mecanismo de adaptación por poseer caracteres más susceptibles a condiciones estresantes y sostiene que *Microcycas* y *Cycas*, son las cícadas con frecuencias telocéntricas más altas y son citológicamente especializadas y avanzadas, pues son géneros cuyos cariotipos se pueden ver sólo como caracteres derivados. Antes, Marchant (1968) aporta cierta consideración a la posibilidad de que la telocentría esté relacionada con un fenotipo primitivo (ampliamente estudiados en estos géneros), sin embargo; los resultados de las filogenias recientes han demostrado que *Microcycas* no comparte este carácter, por lo que se ha considerado al género *Cycas* como un grupo basal y a *Microcycas* como género hermano de *Zamia* y *Ceratozamia* (Treutlein y Wink, 2002). Jones (1970), concluye que los cromosomas no son precisamente indicadores independientes de la dirección de la evolución y que existen además ciclos de simetría y asimetría en los cariotipos a lo largo de la misma (Jones, 1977).

Por otra parte, el estudio de la variación morfológica ha demostrado proporcionar la evidencia necesaria que permite identificar y/o asumir las diferencias o similitudes entre especies estrechamente relacionadas y así clarificar la situación taxonómica de éstas cuando sea el caso. El género *Zamia* ha sido estudiado desde el siglo XVII, sin embargo hasta el momento persisten una serie de problemas taxonómicos y nomenclaturales. Sabato (1990), Norstog y Nicholls (1997), Stevenson (2004) y Pérez-Farrera (2004); han detectado y resuelto errores nomenclaturales desde la revisión de Schuster (1932). Ciertamente la citología y la anatomía resultan disciplinas relevantes en el estudio de las cícadas y como base para estudios de taxonomía y de la mano de los análisis morfológicos, otorgan las evidencias claras y concisas cuando se refiere a la discriminación e identificación de las especies.

Schutzman (1984), describió a *Z. splendens* como una especie herbácea de tallo grisáceo y subterráneo ocasionalmente dicotómicamente ramificado, con hojas que al emerger son de color rojo brillante y con peciolo y raquis robustos que poseen de 8 a 20 pares de folíolos opuestos a subopuestos de hasta 35 cm de largo con distribución en zonas de hasta 1500 m. Se describió como muy cercana a *Z. purpurea* por los tallos ramificados y catáfilos largos e irregulares aunque difiere de ésta, pues las hojas emergentes son de color café a café verdoso y los folíolos de *Z. purpurea* son de color verde oscuro por encima y de color verde pálido por debajo; mientras que *Z. splendens* posee folíolos con el mismo tono verde. Además *Z. splendens* posee estructuras reproductivas declinadas o decumbentes. Por su parte, Rettig (1896) describió a *Z. katzeriana* como una cícada de tallo sin ramificaciones de hasta 25 cm de largo y catafilos semidecíduos. De 1 a 2 hojas con hasta 7 pares de folíolos opuestos a subopuestos con la superficie adaxial de color verde brillante de hasta 84 cm de largo y con conos femeninos erectos.

Nicolalde-Morejón *et al* (2008) analizaron el complejo *Z. katzeriana* (*Z. cremnophila*, *Z. lacandona*, *Z. purpurea* y *Z. splendens*) utilizando técnicas morfológicas y concluyeron que *Z. splendens* es una especie no válida, sino un sinónimo de *Z.*

katzeriana. En el trabajo de campo, para las localidades muestreadas no se logró definir que especie se colectaba, debido a la carencia de información sobre la distribución de las especies. En años posteriores, las exploraciones en campo han permitido ampliar el conocimiento sobre la distribución de *Z. katzeriana* y *Z. splendens*, por lo que se consideró que la colocación de *Z. splendens* como un sinónimo de *Z. katzeriana* no fue una conclusión correcta por las inconsistencias respecto a la distribución de las especies, y a partir de esto, se generaron esfuerzos en evaluar y clarificar el estatus taxonómico de *Z. katzeriana*, *Z. splendens* y *Z. loddigesii*, (esta última considerada como especie simpátrica de las primeras) y mediante el análisis de la morfología, la anatomía y la genética; poder determinar el grado de diferenciación de las especies. Pérez-Farrera *et al.* 2016, analizaron morfológica y anatómicamente los caracteres de estas tres especies y el análisis estadístico permitió identificar posibles señales de hibridación entre los individuos de *Z. katzeriana* (*Z. splendens* y *Z. loddigesii*), sugiriendo así la eliminación de sinonimia de *Z. splendens* y *Z. katzeriana*.

Entonces, considerando los resultados de Pérez-Farrera *et al.* (2016), este trabajo busca contribuir, mediante el uso de herramientas morfológicas y la incorporación de nuevos sitios de estudio para *Z. splendens* y *Z. katzeriana*; además de incluir individuos de *Z. loddigesii* de poblaciones simpátricas, para contribuir y reforzar la validez taxonómica de las especies.

Material y Métodos

Área de estudio

Fueron seleccionadas diez poblaciones distribuidas en los estados de Chiapas, Tabasco y Veracruz en los que se contaba con registro de poblaciones de *Zamia splendens*, *Z. katzeriana* y *Z. loddigesii* (Tabla 1). La Figura 1 muestra fotografías de las tres especies y detalle de los foliolos.

Tabla 1. Descripción de los individuos colectados de tres especies de *Zamia* consideradas en este estudio. N: Número de muestras.

| Especie | Clave | N | Localidad |
|----------------------|--------------|----------|-----------------------|
| <i>Z. loddigesii</i> | ZLO | 13 | Ocozocoautla, Chis |
| <i>Z. loddigesii</i> | ZLC | 20 | Cintalapa, Chis. |
| <i>Z. loddigesii</i> | ZLS | 15 | Selva El Ocote, Chis. |
| <i>Z. splendens</i> | ZST | 15 | Tapijulapa, Tab. |
| <i>Z. splendens</i> | ZSH | 18 | Huimanguillo, Tab. |
| <i>Z. splendens</i> | ZSC | 16 | Las Choapas, Ver. |
| <i>Z. splendens</i> | ZSA | 18 | Salto de Agua, Chis. |
| <i>Z. splendens</i> | ZSO | 18 | Selva El Ocote, Chis. |
| <i>Z. katzeriana</i> | ZKS | 17 | Selva El Ocote, Chis. |
| <i>Z. katzeriana</i> | ZKF | 12 | San Fernando, Chis. |



Figura 1. **1-A.** *Zamia loddigesii*, **2-B.** *Z. splendens*, **3-C.** *Z. katzeriana*. Detalle de foliolos.

Variación morfológica.

Se analizó la variación morfológica a través de 12 variables vegetativas (Tabla 2) utilizadas tradicionalmente para definir taxa relacionados con la morfología de las hojas (Lindström, 2004), de las poblaciones de *Zamia katzeriana*, *Z. splendens* y *Z. loddigesii*. Se midió una hoja adulta por individuo y de 12-20 individuos puesto que sólo fueron consideradas para este estudio, plantas adultas en la población.

Posteriormente se analizaron los datos obtenidos mediante técnicas univariadas y multivariadas (Análisis de componentes principales (PCA) y análisis linear de discriminantes (LDA)).

La medición de las variables morfométricas se realizó con ayuda de una cinta métrica de 150 cm, un vernier digital (Truper 15 cm/0-6, resolución 0.01 mm). Las estructuras medidas en milímetros fueron convertidas a unidades de centímetros para un mejor manejo en la base de datos. Se realizó el conteo del número de hojas nuevas y viejas para cada individuo; el largo del peciolo fue medido a nivel del suelo hasta la inserción del primer foliolo; el raquis de la hoja se midió desde la inserción del primer foliolo hasta el final de la estructura; el número de foliolos se contabilizó como la cantidad de foliolos a lo largo del raquis; el largo de los foliolos apical, medio y basal se tomó de la base del foliolo en donde se inserta al raquis, hasta el final de la estructura; el ancho de los foliolos se midió en la parte media de la estructura; las distancia entre los foliolos y el ancho de la articulación fueron medidos entre los foliolos de la parte media de la hoja.

Tabla 2. Variables morfológicas vegetativas utilizadas en el análisis de poblaciones de *Z. katzeriana*, *Z. splendens* y *Z. loddigesii* de acuerdo a Pérez-Farrera *et al.* 2016.

| Variable | Carácter vegetativo | Clave |
|----------|--------------------------------------|-------|
| 1 | Número de hojas | NH |
| 2 | Número de foliolos | NF |
| 3 | Largo de peciolo | LP |
| 4 | Largo de raquis | LR |
| 5 | Largo de foliolo basal | LFB |
| 6 | Largo de foliolo medio | LFM |
| 7 | Largo de foliolo apical | LFA |
| 8 | Ancho de foliolo basal | AFB |
| 9 | Ancho de foliolo medio | AFM |
| 10 | Ancho de foliolo apical | AFA |
| 11 | Distancia entre foliolos | DEF |
| 12 | Ancho de la articulación de foliolos | ADA |

Análisis de datos morfológicos

Cada variable por población se sometió a Pruebas de Normalidad (prueba de Shapiro-Wilk) y Homoscedasticidad (prueba de Bartlett). Los datos morfológicos obtenidos se capturaron en una hoja de cálculo de Microsoft Excel para Mac 15.13.3 2015 y Windows 2010 y se efectuaron los siguientes análisis:

- A) Análisis Univariados para comprobar el grado de variación morfológica entre las tres especies de *Zamia* utilizando el software RStudio V. 1.0.13 para Mac (R. Development, 2011) y STATISTICA V.10 (StatSoft, 2012) para Windows. Los estadísticos descriptivos (media y desviación estándar), y análisis de varianza para variables paramétricas. Además, un agrupamiento mediante la prueba de Tukey que determina las medias individuales que son significativamente

diferentes de un conjunto de medias mostrando la Diferencia Honestamente Significativa (HSD por sus siglas en inglés).

B) Análisis Multivariados de Discriminantes (DA) para estimar la diferenciación entre variables y determinar cuáles son las que poseen mayor influencia sobre la dispersión de la variación, obteniendo distancias para cada población (Distancias cuadráticas de Mahalanobis) como una prueba de significancia de forma cruzada y un Análisis de Componentes Principales (PCA); en donde a cada valor se asigna su correspondiente especie, ambos análisis tienen como propósito, encontrar las combinaciones lineales de las variables que dan la mejor separación posible entre los grupos en el conjunto de datos, basado en la morfometría de cada una de las especies estudiadas.

Resultados

Análisis univariado

Los resúmenes de los promedios y las desviaciones estándar de los datos analizados (162 en total), se muestran en la Tabla 3. Las figuras 2, 3 y 4 muestran una amplia variación morfológica dentro de las poblaciones analizadas, siendo la localidad de Huimanguillo, Tabasco; la única que es separada del resto de las localidades y la variable Ancho de foliolo basal la única que presenta igualdad en sus valores de varianza. Las tablas de normalidad y homocedasticidad de varianza se encuentran en los Anexos 1 y 2.

Se resumen además los valores promedios analizados por especie (Tabla 4), que muestran la clara diferenciación de *Z. loddigesii*, pues posee los valores más altos en número de hojas y número de foliolos y para la variable ancho de articulación. *Z. katzeriana* y *Z. splendens* por su parte comparten valores parecidos en el largo del foliolo basal y apical, así como en la distancia entre foliolos y el ancho de la articulación del foliolo.

Tabla 3. Promedios (M) y \pm Desviaciones estándar (DE) utilizados para la caracterización de poblaciones de *Zamia loddigesii*, *Z. katzeriana* y *Z. splendens*. Los valores en negritas representan los valores más altos para cada variable.

| Especie | <i>Z. loddigesii</i> | | | <i>Z. katzeriana</i> | | | <i>Z. splendens</i> | | | |
|------------|----------------------|--------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| Pob | Cintalapa, Chis. | Ocozocoa- utla, Chis. | Selva El Ocote | San Fernando | Selva El Ocote | Selva El Ocote | Salto de Agua, Chis. | Huiman, Tab. | Tapijulapa, Tab. | Choapas, Ver. |
| N | 20 | 12 | 15 | 12 | 17 | 18 | 16 | 18 | 15 | 19 |
| M \pm DE | | | | | | | | | | |
| NH | 1.80 + 0.52 | 1.83 + 1.03 | 2.47 + 1.81 | 1.33 + 0.49 | 1.06 + 0.24 | 1.67 + 0.69 | 1.19 + 0.40 | 1.61 + 0.70 | 1.13 + 0.35 | 1.79 + 0.92 |
| NF | 31.70+10.42 | 30.08+17.24 | 53.73+14.67 | 5.58 + 0.90 | 6.35 + 1.46 | 10.00 + 2.63 | 6.50 + 0.89 | 11.83 + 1.92 | 7.80 + 2.51 | 3.84 + 0.83 |
| LP | 18.31 + 7.36 | 25.78+11.0 | 32.63+12.23 | 44.98+11.5 | 30.76 + 6.44 | 54.88 + 6.44 | 23.65 + 5.40 | 58.42+11.54 | 25.37 + 9.39 | 39.75 + 8.94 |
| LR | 22.30 + 8.71 | 29.33+12.25 | 35.07+11.61 | 25.93 + 8.62 | 8.51 + 4.59 | 24.73 + 9.99 | 5.87 + 1.90 | 40.26 + 9.83 | 10.51 + 9.00 | 13.78 + 6.12 |
| LFB | 21.77 + 5.74 | 23.57 + 6.39 | 20.57 + 6.21 | 23.41 + 4.87 | 21.29 + 5.97 | 23.56 + 4.56 | 17.68 + 3.38 | 30.54 + 4.94 | 22.23 + 4.96 | 21.30 + 4.49 |
| LFM | 24.71 + 6.03 | 27.29 + 5.91 | 22.85 + 5.42 | 24.71 + 4.27 | 18.99 + 8.13 | 24.90 + 3.86 | 18.83 + 2.64 | 34.94 + 4.27 | 21.87 + 7.88 | 23.21 + 4.17 |
| LFA | 16.76 + 4.75 | 19.58 + 4.57 | 14.11 + 3.62 | 21.94 + 2.96 | 20.38 + 5.17 | 21.24 + 4.00 | 17.61 + 2.68 | 29.50 + 5.22 | 21.80 + 5.11 | 21.35 + 3.11 |
| AFB | 0.93 + 0.20 | 1.04 + 0.33 | 0.79 + 0.37 | 5.54 + 1.14 | 4.38 + 1.00 | 6.46 + 1.23 | 5.68 + 1.08 | 6.50 + 1.29 | 5.07 + 1.92 | 5.69 + 1.62 |
| AFM | 1.03 + 0.32 | 1.16 + 0.41 | 0.91 + 0.39 | 6.41 + 1.10 | 4.06 + 1.70 | 6.74 + 1.30 | 5.91 + 0.78 | 7.90 + 1.08 | 5.19 + 2.34 | 6.39 + 1.26 |
| AFA | 0.87 + 0.29 | 1.09 + 0.30 | 0.67 + 0.18 | 5.88 + 0.96 | 4.71 + 0.93 | 6.50 + 0.96 | 5.78 + 0.63 | 7.38 + 1.35 | 5.62 + 1.76 | 6.15 + 1.50 |
| DEF | 1.31 + 0.34 | 1.65 + 1.10 | 0.94 + 0.24 | 4.67 + 1.21 | 2.31 + 0.73 | 4.44 + 1.05 | 1.70 + 0.60 | 5.95 + 1.24 | 2.40 + 1.52 | 4.00 + 0.97 |
| ADA | 0.30 + 0.05 | 0.38 + 0.05 | 0.34 + 0.05 | 0.80 + 0.15 | 0.58 + 0.11 | 1.00 + 0.18 | 0.55 + 0.08 | 1.42 + 0.31 | 0.67 + 0.29 | 0.67 + 0.22 |

Tabla 4. Promedios (M) y \pm Desviaciones estándar (DE) utilizados para la caracterización de poblaciones de *Zamia splendens* (ZS), *Z. loddigesii* (ZL) y *Z. katzeriana* (ZK).

| VARIABLE/ SP | ZL | ZK | ZS |
|-----------------|----------------------|---------------|----------------------|
| | M \pm DE | M \pm DE | M \pm DE |
| NH | 2.02 + 1.21 | 1.17 + 0.38 | 1.50 + 0.70 |
| NF | 38.32 + 17.20 | 6.03 + 1.30 | 7.99 + 3.42 |
| LP | 24.78 + 11.63 | 36.65 + 11.24 | 41.32 + 17.50 |
| LR | 28.17 + 11.79 | 15.72 + 10.84 | 19.57 + 14.66 |
| LFB | 21.85 + 6.04 | 22.17 + 5.55 | 23.20 + 6.12 |
| LFM | 24.77 + 5.93 | 21.36 + 7.29 | 24.97 + 7.23 |
| LFA | 16.63 + 4.76 | 21.03 + 4.39 | 22.42 + 5.64 |
| AFB | 0.91 + 0.31 | 4.86 + 1.19 | 5.91 + 1.51 |
| AFM | 1.02 + 0.37 | 5.04 + 1.87 | 6.48 + 1.65 |
| AFA | 0.86 + 0.30 | 5.20 + 1.09 | 6.32 + 1.42 |
| DEF | 1.28 + 0.66 | 3.29 + 1.51 | 3.79 + 1.85 |
| ADA | 0.34 + 0.06 | 0.67 + 0.17 | 0.87 + 0.39 |

Debido a la ausencia de normalidad de las variables (Anexo 1), todos los valores fueron normalizados utilizando la transformación Box-Cox en RStudio v. 10.13, a partir de los cuales se realizó el Análisis de varianza (Tabla 5).

Tabla. 5. Resultados de análisis de varianza para variables paramétricas

| Variable | Suma de cuadrados | Valor de F | Valor de <i>p</i> |
|----------|-------------------|------------|-------------------|
| NH | 25.30 | 4.20 | 0.000 |
| NF | 36.36 | 149.90 | 0.000 |
| LP | 2896.6 | 32.27 | 0.000 |
| LR | 1993.0 | 29.80 | 0.000 |
| LFB | 1698.0 | 7.01 | 0.000 |
| LFM | 3258.0 | 11.98 | 0.000 |
| LFA | 2571.0 | 15.79 | 0.000 |
| AFB | 805.3 | 66.41 | 0.000 |
| AFM | 1017.7 | 75.32 | 0.000 |
| AFA | 966.4 | 99.51 | 0.000 |
| DEF | 430.5 | 51.80 | 0.000 |
| ADA | 17.75 | 60.05 | 0.000 |

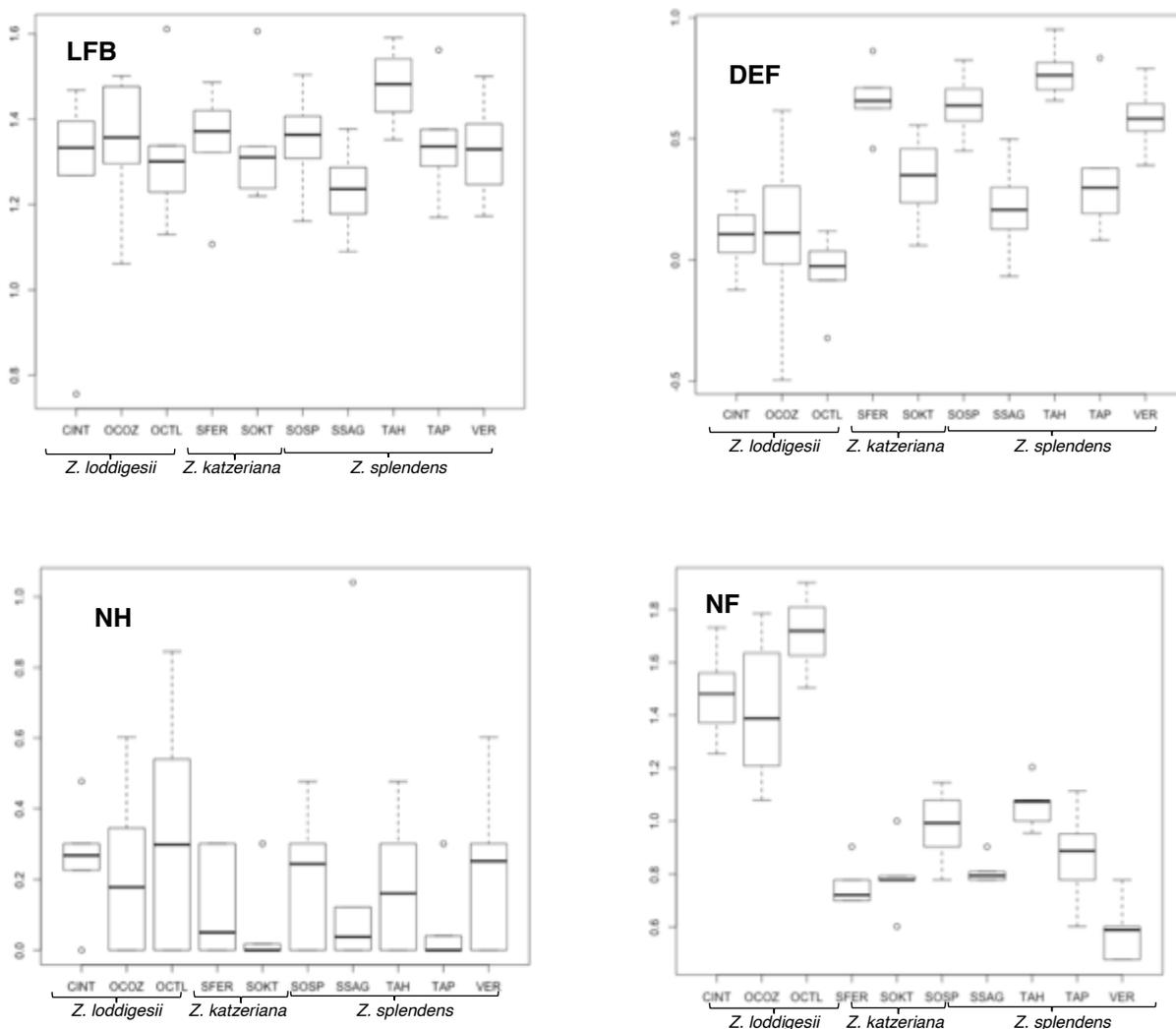


Figura 2. Gráfica de medias y error estándar de los caracteres morfológicos que muestran la variación entre las especies analizadas, NH; Número de hojas; LFB= Largo de foliolo basal, DEF= Distancia entre foliolos, NH= Número de hojas, NF; Número de foliolos CINT; Cintalapa, OCOZ; Ocozocoautla, OCOTL; Selva El Ocote, SFER; San Fernando, SOKT; Selva El Ocote III, SSAG; Salto de Agua, TAH: Huimanguillo, Tab., TAP: Tapijulapa, Tab., VER; Choapas, Ver.

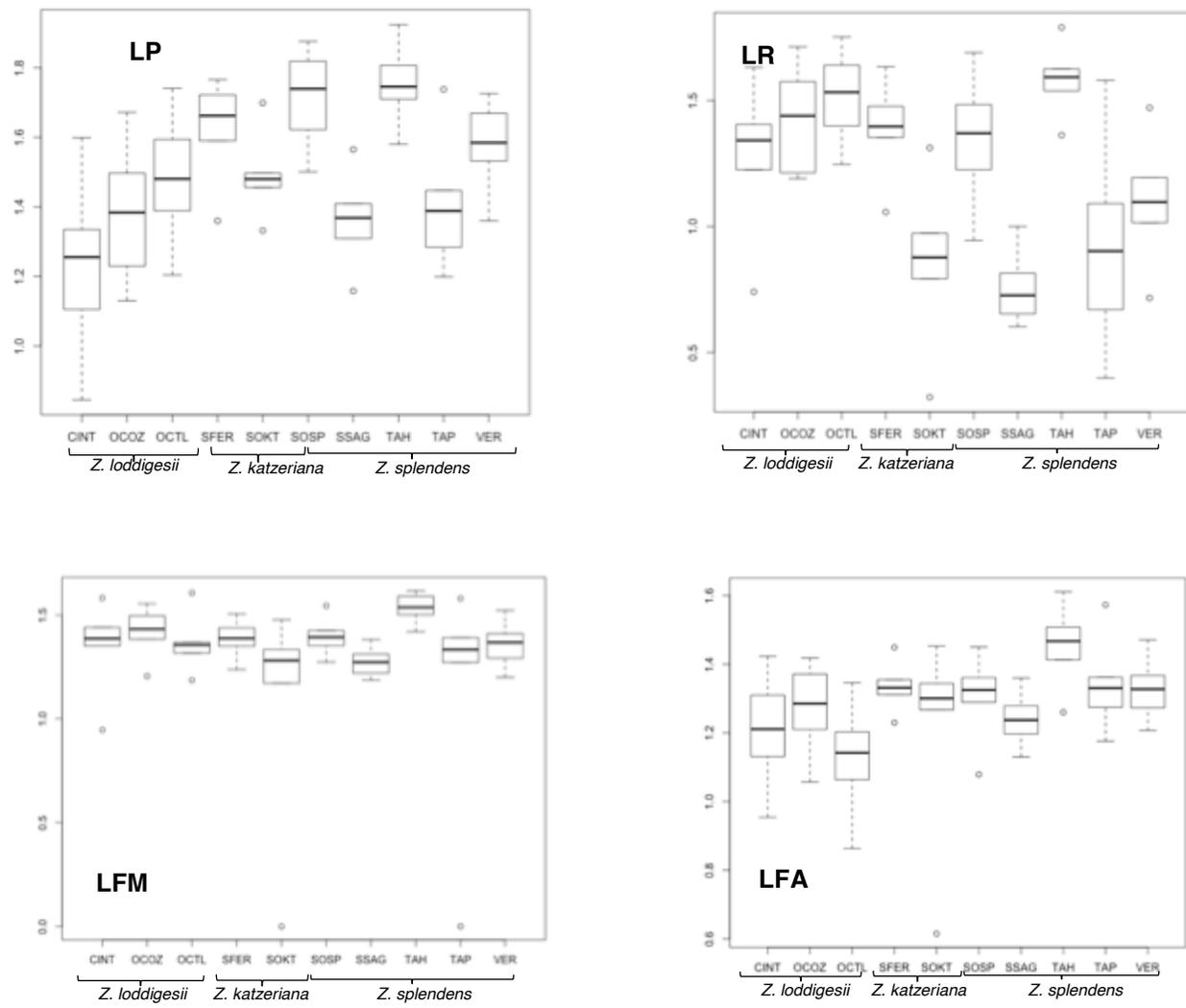


Figura 3. Gráfica de medias y error estándar de los caracteres morfológicos que muestran la variación entre las especies analizadas, LP= Largo del peciolo, LR= Largo del raquis, LFM= Largo del foliolo medio, LFA= Largo del foliolo apical. CINT; Cintalapa, OCOZ; Ocozocoautla, OCOTL; Selva El Ocote, SFER; San Fernando, SOKT; Selva El Ocote III, SSAG; Salto de Agua, TAH: Huimanguillo, Tab., TAP: Tapijulapa, Tab., VER; Choapas, Ver.

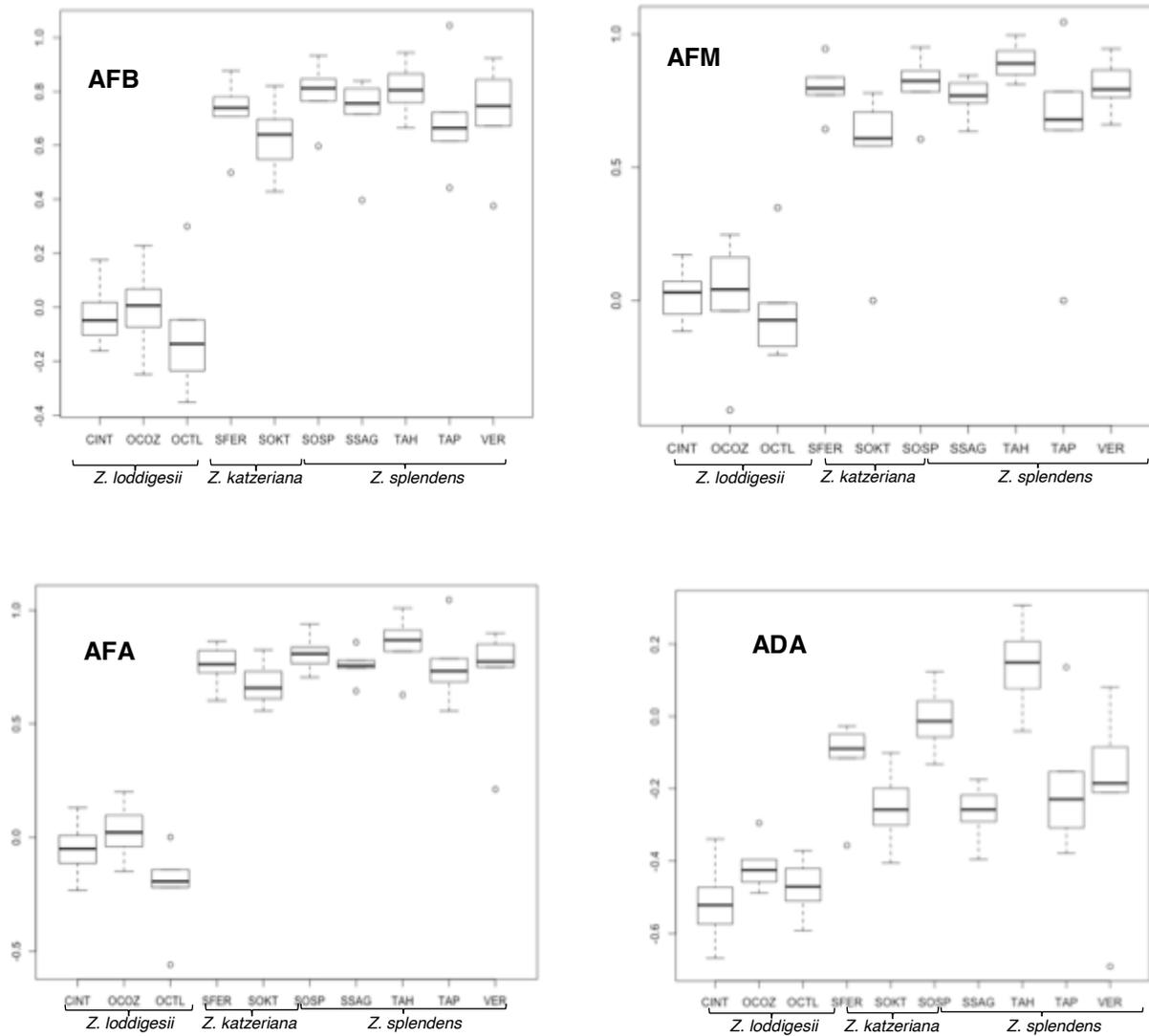


Figura 4. Gráfica de medias y error estándar de los caracteres morfológicos que muestran la variación entre las especies analizadas, AFB= Ancho foliolo basal, AFM= Ancho de foliolo medio, AFA= Ancho de foliolo apical, ADA: Ancho de articulación. CINT; Cintalapa, OCOZ; Ocozocoautla, OCOTL; Selva El Ocote, SFER: San Fernando, SOKT: Selva El Ocote II, SOSP: Selva El Ocote III, SSAG: Salto de Agua, TAH: Huimanguillo, Tab, Tab., TAP: Tapijulapa, Tab., VER: Choapas, Ver.

La prueba de Tukey aplicada a las 12 variables, permite identificar que las variables: Ancho de articulación, ancho de foliolo apical, la distancia entre foliolos, el número de foliolos y el largo del foliolo apical son las que se agrupan a los individuos de las tres especies de acuerdo a su área de distribución (Anexo 3).

Análisis multivariado

Un total de 162 individuos pertenecientes a las tres especies: *Zamia splendens*, *Z. loddigesii* y *Z. katzeriana*, fueron analizados considerando 12 variables vegetativas separadas por las variables categóricas: LOCALIDAD y ESPECIE.

Las distancias cuadráticas de Mahalanobis fueron calculadas por individuo y los valores promedios demuestran que la mayor distancia se encuentra entre *Z. katzeriana* y *Z. splendens* con el valor más bajo y que las especies más diferentes son *Z. splendens* y *Z. loddigesii* (Tabla 6).

Tabla 6. Resumen pareado de las Distancias cuadráticas de Mahalanobis entre las tres especies de *Zamia* analizadas. ZS= *Z. splendens*, ZL= *Z. loddigesii*, ZK= *Z. katzeriana*. Debajo de la diagonal los valores de Distancias cuadráticas, por arriba de la diagonal valores de F (gl= 12.148). Para todos los casos $p < 0.05$.

| | ZS | ZL | ZK |
|----|-------|--------|-------|
| ZS | 0 | 177.84 | 3.23 |
| ZL | 75.44 | 0 | 88.57 |
| ZK | 1.92 | 63.66 | 0 |

Análisis de Discriminantes

La prueba de Wilk's Lambda fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$.) para los dos factores considerando el análisis bajo la variable: ESPECIE (Tabla 6). Los resultados obtenidos de la dispersión de las funciones discriminantes (LDA) permiten observar en el espacio bidimensional a dos grupos con cierto solapamiento entre las localidades (Figura 5).

De las doce variables incluidas en las funciones de discriminantes canónicas estandarizadas, únicamente el ancho de la articulación, la distancia entre los folíolos y el ancho del folíolo medio, muestran los valores más altos en los 7 factores calculados (Tabla 8).

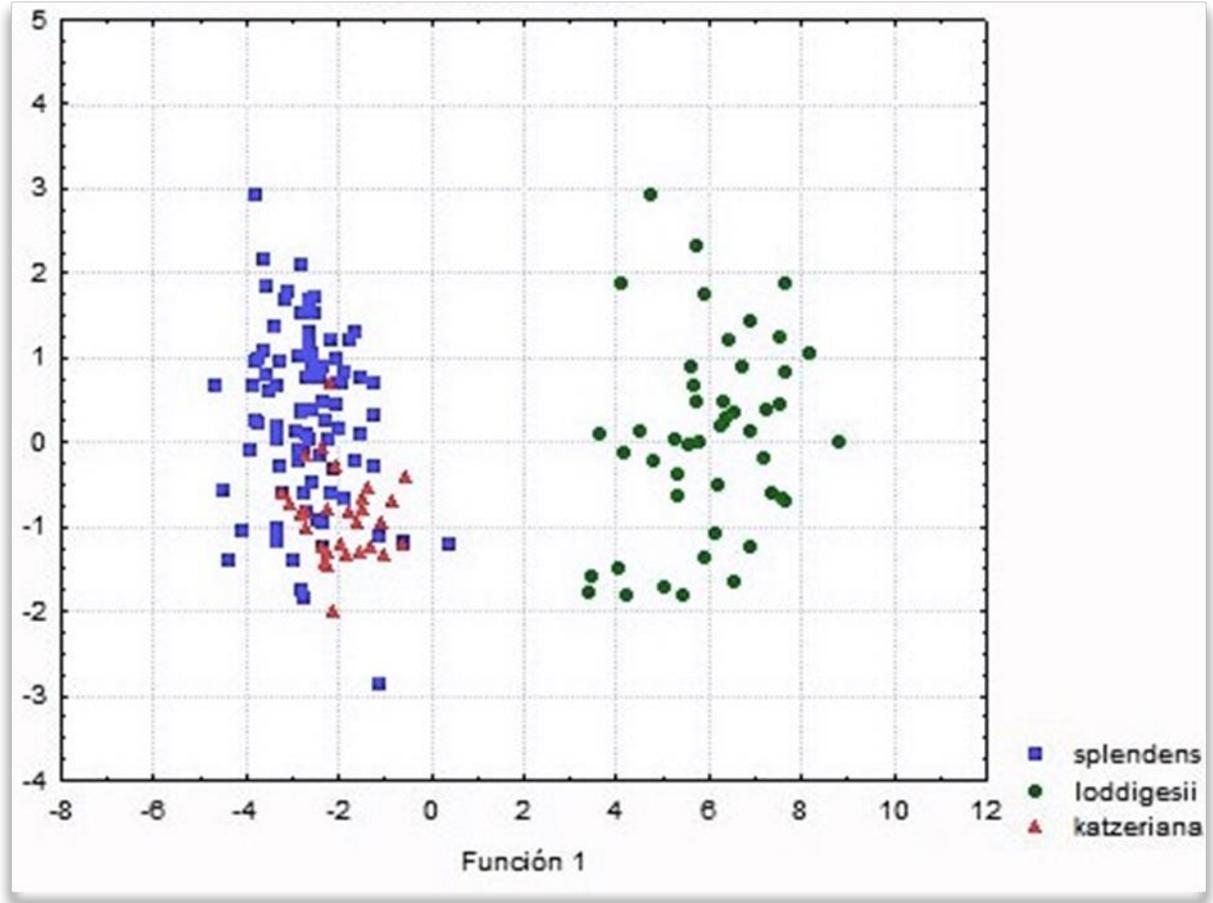


Figura 5. Funciones Lineares de Discriminantes a partir de 12 radios morfométricos. Análisis por individuos de 10 localidades analizadas.

Tabla 7. Resumen del análisis de discriminantes para *Z. splendens*, *Z. loddigesii* y *Z. katzeriana*.

| Función derivada | Wilk's Lambda | χ^2 | gl | Valor de p |
|------------------|---------------|----------|----|--------------|
| 1 | 0.052 | 453.55 | 24 | 0.000 |
| 2 | 0.84 | 25.97 | 11 | 0.001 |

Tabla 8. Coeficiente de funciones discriminantes estandarizadas para cada factor de las localidades de las especies *Z. splendens*, *Z. loddigesii* y *Z. katzeriana*, consideradas en este estudio. Los valores en negrita representan los valores más altos de cada factor. LD (Linear Discriminant por sus siglas en inglés).

| Variable | LD1 | LD2 | LD3 | LD4 | LD5 | LD6 | LD7 |
|------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| NH | 0.03 | 0.15 | 0.07 | 0.07 | -0.22 | 0.42 | 0.25 |
| NF | -0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.04 | 0.05 | 0.06 | 0.04 |
| LP | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.10 | -0.01 | 0.02 | -0.02 |
| LR | 0.05 | 0.04 | 0.03 | 0.01 | -0.07 | 0.13 | 0.01 |
| LFB | -0.03 | 0.06 | 0.04 | 0.03 | 0.18 | 0.10 | 0.03 |
| LFM | 0.03 | 0.00 | 0.05 | 0.14 | -0.16 | 0.14 | -0.12 |
| LFA | 0.07 | 0.01 | 0.06 | 0.05 | 0.04 | 0.02 | 0.04 |
| AFB | -0.30 | 0.39 | 0.28 | 0.16 | -0.74 | 0.00 | -0.47 |
| AFM | -0.13 | 0.43 | 0.06 | 0.25 | 0.15 | 0.36 | 0.96 |
| AFA | 0.18 | 0.00 | 0.33 | 0.09 | 0.46 | 0.17 | -0.34 |
| DEF | 0.14 | 0.14 | 1.04 | 0.41 | 0.58 | 0.43 | 0.12 |
| ADA | 2.77 | -2.84 | 5.29 | -1.13 | -0.32 | 1.46 | 0.13 |
| C.Canónica | 0.56 | 0.24 | 0.11 | 0.05 | 0.02 | 0.01 | 0.00 |

Entre las localidades, las variables que más destacan por su variación son el largo del peciolo, el largo del raquis y el largo del foliolo medio. Para la localidad de Tapijulapa, Tabasco; el largo del foliolo basal representa variación con respecto al resto de las localidades (Tabla 9).

Tabla 9. Coeficiente de función de clasificación por localidad de las especies *Z. splendens*, *Z. loddigesii* y *Z. katzeriana*, consideradas en este estudio. Los valores en negrita representan los valores más altos de cada función.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| NH | 1.8 | 1.79 | 1.61 | 1.73 | 1.81 | 1.33 | 1.72 | 1.133 |
| NF | 31.7 | 3.84 | 11.83 | 18.03 | 6.50 | 5.58 | 28.56 | 7.80 |
| LP | 18.30 | 39.75 | 58.42 | 43.24 | 23.65 | 44.98 | 31.64 | 25.37 |
| LR | 22.31 | 13.78 | 40.26 | 26.57 | 5.87 | 25.93 | 20.96 | 10.51 |
| LFB | 21.77 | 21.31 | 30.54 | 23.56 | 17.67 | 23.40 | 20.96 | 22.23 |
| LFM | 24.71 | 23.21 | 34.94 | 25.86 | 18.83 | 24.71 | 20.80 | 21.87 |
| LFA | 16.76 | 21.35 | 29.51 | 20.58 | 17.61 | 21.94 | 17.44 | 21.80 |
| AFB | 0.93 | 5.69 | 6.50 | 4.29 | 5.68 | 5.54 | 2.70 | 5.07 |
| AFM | 1.03 | 6.39 | 7.89 | 4.51 | 5.91 | 6.41 | 2.58 | 5.19 |
| AFA | 0.87 | 6.15 | 7.38 | 4.34 | 5.78 | 5.88 | 2.81 | 5.62 |
| DEF | 1.31 | 4.00 | 5.95 | 3.32 | 1.70 | 4.67 | 1.67 | 2.40 |
| ADA | 0.30 | 0.69 | 1.42 | 0.75 | 0.55 | 0.79 | 0.47 | 0.67 |
| Prob Prev | 0.12 | 0.12 | 0.11 | 0.19 | 0.10 | 0.07 | 0.20 | 0.10 |

Análisis de Componentes Principales (PCA)

Los valores de funciones de discriminantes revelan que son variables **Ancho de la articulación del foliolo y largo del raquis** las que determinan los primeros dos factores respectivamente y que en conjunto con el número de hojas en el factor 3; son las que mejor discriminan a las localidades y especies explicando más del **80 % de la variación** encontrada, de acuerdo a los valores propios (Eigen values) del análisis (Tabla 10).

El gráfico obtenido del PCA muestra claramente la separación parcial de los individuos de *Z. loddigesii* en color verde claro, de las otras dos especies analizadas y muestra cierta relación entre los individuos de *Z. splendens* (verde) y *Z. katzeriana* (azul) pues hay mezcla de estos últimos individuos hacia la dispersión de lo etiquetado como *Z. splendens* (Figura 6).

Tabla 10. Valores de correlación en los componentes principales y eigen-values. Los valores en negritas, representan los más altos registrados. PC= Principal Component.

| Variable | PC1 | PC2 | PC3 | PC4 | PC5 |
|----------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|
| NH | -0.37 | 1.43 | -5.08 | -3.77 | 0.10 |
| NF | -1.57 | 2.87 | -0.67 | 0.87 | -1.34 |
| LP | 2.06 | 0.95 | -1.69 | 2.52 | 3.60 |
| LR | 0.61 | 3.49 | -0.82 | 2.59 | -1.51 |
| LFB | 1.57 | 2.31 | 1.82 | -2.25 | 3.62 |
| LFM | 1.40 | 2.76 | 1.57 | -1.62 | -1.96 |
| LFA | 2.05 | 0.63 | 2.32 | -2.27 | -0.95 |
| AFB | 2.29 | -1.56 | -1.00 | -0.45 | 0.83 |
| AFM | 2.39 | -1.19 | -0.98 | -0.12 | -2.22 |
| AFA | 2.29 | -1.69 | -0.82 | -0.32 | -1.49 |
| DEF | 2.43 | 0.39 | -0.40 | 1.28 | -0.0 |
| ADA | 2.45 | 0.61 | -0.52 | 1.06 | -1.07 |
| Proporción explicada | 0.51 | 0.22 | 0.08 | 0.07 | 0.03 |
| Proporción acumulada | 0.51 | 0.74 | 0.82 | 0.89 | 0.91 |

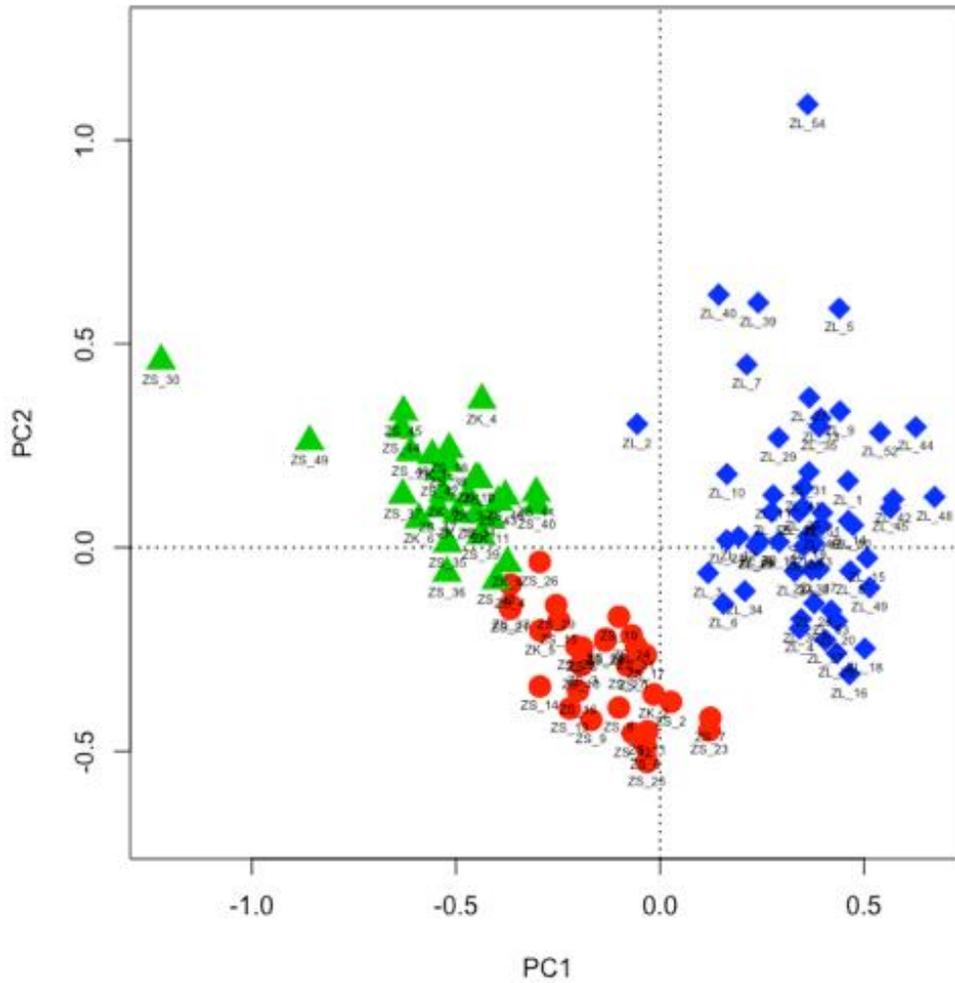


Figura 6 Gráfico de Análisis de Componentes Principales con 12 variables vegetativas y tres especies de *Zamia*. En color azul *Z. loddigesii*, en color verde individuos de *Z. splendens* y de color rojo, la mayoría de los individuos de *Z. katzeriana*.

Discusión.

El análisis univariado muestra como los individuos se distribuyen en dos grupos más o menos definidos con evidente traslape, entre individuos de *Z. katzeriana* y *Z. splendens* para la mayoría de las variables exceptuando el Ancho de Articulación del Foliolo, que delimitan una ligera separación de los individuos de Huimanguillo, Tabasco del resto de las poblaciones en el análisis de varianza. Los individuos de esta localidad se han etiquetado como *Z. splendens* y representan los valores más altos para la mayoría de las variables excepto el número de hojas y de foliolos por planta, pues esta especie rara vez posee más de dos hojas por planta, esta ligera desviación está plasmada en los gráficos de cajas de bigotes que muestran la poca variación entre especies.

Los individuos de la Selva El Ocote en Chiapas, muestran en promedio, valores más dispersos que el resto de las localidades y se reflejan en la Prueba de Tukey, (Anexo 4), considerando que esta localidad presenta mezcla cuando se analiza la variación intraespecífica para *Z. splendens* y *Z. loddigesii*. Lo anterior puede explicarse debido a que se están considerando (en el análisis por especie), a las variables que menos cambian entre ellas de acuerdo a los valores de varianza, que son el largo del foliolo apical (21.80 - 23.10), medio (21.30 - 24.90) y basal (16.60 - 22.40); este último con los valores más bajos encontrados en *Z. loddigesii*, lo que podría expresarse con la variación morfológica en esta especie, reportada por Schuztman y Vovides (1998), exhibiendo variación que depende del ambiente en que se desarrollen, afectando el tamaño y la forma de la planta. La variable con más diferencia por especie es el largo del peciolo, pues es *Z. splendens* quien presenta el valor más alto (reportado en la descripción de Whitelock (2002), de 32.50 a 37.50, con valores de 41.32 para este estudio).

La distribución geográfica y las presiones ambientales juegan un rol importante en la definición de las especies, Limón *et al.* 2016, analizaron el efecto de la heterogeneidad del ambiente sobre las poblaciones, determinando que los ambientes más perturbados pueden dar lugar a procesos de mezcla entre las especies. Moretti y

Sabato (1984), ya consideraban que la diferencia entre hábitats podría causar una fisión cromosómica que permitía a las especies simpátricas, invadir y sobrevivir incluso en ambientes xéricos, que los parientes con cromosomas simétricos; en este trabajo el agrupamiento entre las variables ancho de la articulación y ancho del foliolo apical, en los individuos que son del estado de Chiapas (probablemente atribuido a la variedad de vegetación y las condiciones ambientales en el estado), dan evidencia de que está beneficiándose a la colonización de *Z. splendens* en selvas medianas y altas perennifolias en Selva El Ocote además de las zonas de vegetación secundaria entre selvas bajas caducifolias (San Fernando), selvas medianas y Bosque de Pino (Selva El Ocote), que se han identificado como las áreas más adecuadas para el desarrollo de *Z. katzeriana* de quien se estima, ocupa lugares de vegetación poco conservada (Nicolalde Morejón et al. Pérez-Farrera et al, 2016), mientras que *Z. loddigesii* que se distribuye en Bosques secos, semidecíduos (Cintalapa) y Bosque de Pino (Selva El Ocote); explicando así la ligera separación de las especies con distribución en Veracruz y Tabasco y la marcada diferencia entre los grupos de acuerdo a la Prueba de Tukey de la localidad de Huimanguillo, Tabasco. Newell (1985), no encontró diferencias significativas entre los atributos foliares en *Z. pumilla*, exceptuando el largo del peciolo y largo de la hoja que son las mismas variables que permiten una separación entre *Z. splendens*, *Z. katzeriana* y *Z. loddigesii*.

Las distancias cuadráticas de Mahalanobis determinaron que las poblaciones más similares son aquellas en donde se distribuyen *Z. splendens* y *Z. katzeriana*, considerando la correlación existente entre las 12 variables analizadas. Los resultados de coeficientes de clasificación agrupada y PCA muestran que hay variables que son distintivas entre las especies, siendo el ancho del foliolo y la distancia entre los foliolos las variables que mejor discriminan a las especies en la mayoría de los factores, tal y como fue encontrado por Pérez-Farrera *et al.* (2016 en su validación de *Z. katzeriana* como una especie de origen híbrido (*Z. splendens* x *Z. loddigesii*) y que, mediante análisis morfológicos, Nicolalde-Morejón *et al.* 2008; también reportaron útiles en la separación de las especies.

La población de San Fernando, Chiapas, que ha sido considerada como un sitio de hibridación por Pérez-Farrera *et al.* (2016), presentó valores promedio en las variables en este estudio: el largo del peciolo, el largo del foliolo y el largo del raquis, son las que caracterizan a las especies de este municipio al igual que en el municipio de Huimanguillo, Tabasco. Los individuos colectados en La Selva El Ocote, presentan los valores con menor variación en las variables: número de foliolos, largo del peciolo y largo del raquis, lo que probablemente ocurre, por encontrarse en los límites de la distribución geográfica de *Z. splendens* y *Z. loddigesii*, y ha dado lugar a que la forma y tamaño de las plantas estén homogeneizándose como resultado de la reciente simpatria entre las especies que se refleja en la prueba de Tukey analizando únicamente a los individuos de las tres especies distribuidas en esa región (Anexo 4). Este fenómeno fue identificado por Limón *et al.* (2016) que encontraron que parece determinante en la expresión fenotípica, expresando esa variación en un ligero traslape en los resultados del análisis multivariado, evitando así la separación de las poblaciones y por lo tanto de las especies.

En otras especies de cícadras, la variable: largo del foliolo ha sido constantemente utilizada para discriminar a las especies. Pérez-Farrera *et al.* (2004) determinaron que individuos de *Ceratozamia norstogii* presentan diferencias en largo y ancho del foliolo de acuerdo al ambiente en el que se distribuyen. En 2009, Pérez-Farrera y colaboradores, analizaron el complejo de especies *Ceratozamia miqueliana* y lograron separar el complejo en las cinco especies que lo conforman de acuerdo a la morfología del foliolo. Además del ancho, la forma del foliolo es un carácter diagnóstico para *C. mexicana*, *C. brevifrons*, *C. decumbens* y *C. moretti* (Medina-Villareal y González-Astorga, 2016).

Conclusiones

- La variable **Ancho de la Articulación** es la variable que mejor discrimina a las especies y en segundo término la Distancia entre los foliolos y el largo del Raquis, apoyando la hipótesis de que *Zamia katzeriana* es una especie de origen híbrido entre *Z. loddigesii* y *Z. splendens*, explicando el 73 % y el 80 % de la variación entre ellas (PCA y LDA respectivamente).
- Se observa una marcada inclinación en individuos de *Z. katzeriana* compartir caracteres morfológicos con *Z. splendens* sobre todo en el tamaño de largo del peciolo, largo del raquis y largo del foliolo medio; caracteres en lo que menor variación se observa entre estas dos especies (43.20, 26.50 25.85 para *Z. splendens* y 44.98, 25.93 y 24.70 para *Z. katzeriana* respectivamente) (Anexo 4).
- Los individuos de *Zamia splendens* de Huimanguillo, Tabasco, poseen los valores más altos para la mayoría de las variables exceptuando número de hojas y número de foliolos. Los individuos de Salto de Agua, Chiapas, muestran los valores más bajos para el número de hojas y de foliolos por hoja debido a que poseen el raquis más pequeño registrado.
- Los individuos de las tres localidades consideradas de *Z. loddigesii* muestran valores similares para la mayoría de las variables, siendo los individuos colectados en la localidad de Ocozocoautla, Chiapas los que presentan el mayor número de foliolos por hoja.

Literatura Citada

- Cabrera-Toledo, D, González-Astorga J, Nicolalde-Morejón F, Vergara-Silva F, Vovides AP (2008).** Heterozygote excess in ancient populations of the critically endangered *Dioon caputoi* (Zamiaceae, Cycadales) from Central. *Botanical Journal of the Linnean Society* **158**, 436-447.
- Calonje M, Stevenson DW, Stanberg L (2017).** The World List of Cycads, online edition [Internet]. 2013-2017. [cited 2017 April 04]. Available from:<http://cycadlist.org>.
- Chemnick, J, Gregory TJ, Salas MS (1997)** A revision of *Dioon tomasellii* (Zamiaceae) from western Mexico, a range extension of *D. merolae* and clarification of *D. purpusii*. *Phytologia* **83**, 1-6.
- Christenhunz M, Reveal J, Farjon A, Gardner MF, Mill RR, Chase M (2011)** A new classification and linear sequence of extant gymnosperms. *Phytotaxa*. **19**, 55–70.
- Contreras-Medina R, Morrone JJ, Luna I (2001)** Biogeographic methods identify gymnosperm biodiversity hotspots. *Naturwissenschaften* **88**, 427-430.
- Crane PR (1988)** Major clades and relationships in the "higher" gymnosperms. In: Beck, C.B. Eds. *Origin and Evolution of Gymnosperms*. Pp. 218-272. New York, Columbia University Press.
- De Luca P, Sabato S (1979)** *Dioon califanoi* (Zamiaceae), a new species from Mexico. *Brittonia* **31**, 170-173.
- De Luca P, Sabato S, Vázquez-Torres M (1984)** *Dioon tomasellii* (Zamiaceae), a new species from Mexico. *Brittonia* **33**, 552-555.
- Diario Oficial De La Federación (2001) Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001,** Protección Ambiental-Especies de flora 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.

González-Astorga J, Vovides AP, Iglesias C (2003) Morphological and geographic variation of the cycad *Dioon edule* Lindl. (Zamiaceae): Ecological and evolutionary implications. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **141(4)**, 465-470.

González-Astorga J, Vovides AP, Cruz-Angón A, Octavio-Aguilar P, Iglesias C (2005) Allozyme variation in the three extant populations of the narrowly endemic cycad *Dioon angustifolium* Miq. (Zamiaceae) from North-eastern Mexico. *Annals of Botany* **95**, 999-1007.

González-Astorga J, Vovides AP, Octavio-Aguilar P, Aguirre-Fey L, III - F, Iglesias C (2006) Genetic diversity and structure of the Cycad *Zamia loddigesii* Miq. (Zamiaceae): Implications for evolution and conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society* **152**, 533-544.

González-Astorga J, Vergara-Silva F, Vovides AP, Nicolalde-Morejón F, Cabrera-Toledo D, Pérez-Farrera MA (2008) Diversity and genetic structure of three species of *Dioon* Lindl. (Zamiaceae, Cycadales) from the Pacific seaboard of Mexico. *Biological Journal of the Linnean Society* **94**, 765-776.

Gregory TJ, Chemnick J, Salas-Morales S, Vovides AP (2003) A new species in the genus *Dioon* (Zamiaceae) from north-central Oaxaca, Mexico. *Biological Journal of the Linnean Society* **141**, 471-476.

IUCN (2015) The IUCN red list of threatened species. Available from: <http://iucnredlist.org/> (accessed 18 April 2016)

Jones K (1970) Chromosome changes in Plant evolution. *Taxon*. **19**, No. 2. Pp.172-179.

- Jones K (1977)** "The role of Robertsonian change in karyotype evolution in higher plants." *Chromosomes Today*. **6**, 121-129
- Keppel G, Lee SH, Hodgskiss PD (2009)** Evidence for long isolation among populations of a pacific cycad: Genetic diversity and differentiation in *Cycas seemannii* A. Br. (Cycadaceae). *The Journal of Heredity* **93**, 133-139.
- Khoshoo TN (1969)** Chromosome evolution in Cycads. *Chromosomes Today* **2**, 236-240.
- Limón F (2009)** Genética de Poblaciones de *Zamia furfuracea* L. F. (Zamiaceae); Una cícada endémica al estado de Veracruz, México. Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana, México
- Limón F, González-Astorga J, Nicolalde-Morejón F, Guevara R (2016)** Phenotypic variation of *Zamia loddigesii* Miq. and *Z. prasina* Bull.(Zamiaceae, Cycadales): the effect of environmental heterogeneity. *Plant Systematics and Evolution*, **302(10)**, 1395-1404.
- Lindstrom JA (2004)** Morphological characters useful in determining species boundaries in *Cycas* (Cycadaceae). *Cycad Classification: Concepts and Recommendations*. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK. 45-55.
- Mamay SH (1969)** Cycads: fossil evidence of late paleozoic origin. *Science* **164**: 295-296 en **Brenner DE, Stevenson WD, Twigg WR (2003)** Cycads: evolutionary innovations and the role of plant-derived neurotoxins. *Trends in Plant Science* **8 (9)**, 446-452.
- Marchant CJ (1968)** Chromosome patterns and nuclear phenomena in the Cycad families *Stangeriaceae* and *Zamiaceae*. *Chromosoma* **24**, 100-134.

- Medina-Villarreal A, González-Astorga J (2016)** Morphometric and geographical variation in the *Ceratozamia mexicana* Brongn. (Zamiaceae) complex: evolutionary and taxonomic implications. *Biological Journal of the Linnean Society*, **119(1)**, 213-233.
- Meerow AW, Nakamura K (2007)** Ten microsatellite loci from *Zamia integrifolia* (Zamiaceae). *Molecular Ecology Notes*. **7**, 824-826.
- Meerow AW, Francisco-Ortega J, Calonje M, Griffith MP, Ayala-Silva T, Stevenson DW, Nakamura K (2012a)** *Zamia* (Cycadales: Zamiaceae) on Puerto Rico: asymmetric genetic differentiation and the hypothesis of multiple introductions. *American Journal of Botany*, **99(11)**, 1828-1839.
- Meerow AW, Francisco-Ortega J, Ayala-Silva T, Stevenson DW, Nakamura K, Osborne, R, Taylor-Blake AS (2012b)** Population genetics of *Zamia* in Puerto Rico, a study with ten SSR loci. In Proceedings of Cycad 2008. The 8th International Conference on Cycad Biology, Panama City, Panama, 13-15 January 2008. (pp. 204-223). New York Botanical Garden Press.
- Moretti A, Sabato S (1984)** Karyotype evolution by centromeric fission in *Zamia* (Cycadales). *Plant Systematics and Evolution* **146**, 215–223.
- Moretti A (1990)** Karyotypic data on north and central American *Zamiaceae*, (Cycadales) and their phylogenetic implications. *American Journal of Botany* **77**, 1016–1029.
- Moretti A, Caputo P, Gaudio L, Stevenson DW (1991)** Intraspecific chromosome variation in *Zamia* (Zamiaceae, Cycadales). *Caryologia*. **44**, 1-10.
- Nicolalde-Morejón F, Vovides AP, Stevenson D, Sosa V (2008)** The identity of *Zamia katzeriana* and *Z. verschaffeltii* (Zamiaceae). *Brittonia*, **60(1)**, 38-48.
- Nicolalde-Morejón F, Vovides AP, Stevenson DW (2009)** Taxonomic revisión of *Zamia* in Mega-Mexico, *Brittonia* **61**, 301-335

- Nicolalde-Morejón F, Vergara-Silva F, González-Astorga J, Vovides AP (2011)** Perspectivas Sistemáticas de *Zamia* (Zamiaceae) en Megaméxico: de la taxonomía alfa a los códigos de barras genéticos. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **82**, 341-355.
- Nicolalde-Morejón F, González-Astorga J, Vergara-Silva F, Stevenson DW, Rojas-Soto O, Medina-Villareal A (2014)** Biodiversidad de *Zamiaceae* en México. Biodiversity in *Zamiaceae* in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **85**, 114-125.
- Newell SJ (1985)** Intrapopulational variation in leaflet morphology of *Zamia pumila* L. in relation to microenvironment and sex. *American Journal of Botany* **72**, 217-221.
- Norstog KJ (1980)** Chromosome numbers in *Zamia* (Cycadales). *Caryologia*. **33 (3)**, 419-428.
- Norstog KJ, Nicholls TJ (1997)** The biology of the cycads. Cornell University Press, Ithaca.
- Osborne R, Calonje MA, Hill KD, Stanberg L, Stevenson DW (2012)** The World List of Cycads in **Stevenson D.W, R. Osborne, A. S. Taylor Blake**. Eds. Proceedings of Cycad 2008. The 8th International Conference on Cycad Biology. 13–15 January 2008 Panama City, Panama *Memoirs of The New York Botanical Garden* **106**, 408-508.
- Pérez-Farrera MA, Vovides AP, Hernández-Sandoval L, González D, Martínez M (2004)** A morphometric analysis of the *Ceratozamia norstogii* complex (Zamiaceae). In: **Walters T, Osborne R**. Eds. Cycad classification. Concepts and recommendations. CABI, Wallingford
- Pérez-Farrera MA, Vovides AP, Martínez-Camilo R, Meléndez NM, Iglesias C (2009)** A reassessment of the *Ceratozamia miqueliana* species complex (Zamiaceae) of southeastern Mexico, with comments on species relationships. *Systematics and Biodiversity*, **7(4)**, 433-443

- Pérez-Farrera MA, Vovides AP, Avendaño S (2014)** Morphology and leaflet anatomy of the *Ceratozamia norstogii* (Zamiaceae, Cycadales) species complex in Mexico with comments on relationships and speciation. *International Journal of Plant Sciences*, **175(1)**, 110-121.
- Pérez-Farrera MA, Vovides AP, Ruiz-Castillejos C, Galicia S, Cibrián-Jaramillo A, López S (2016)** Anatomy and morphology suggest a hybrid origin of *Zamia katzeriana* (Zamiaceae). *Phytotaxa* **270(3)**, 161-181.
- Rettig E (1896)** Die cycadeen des botanischen gartens in Petersburg. *Gardenflora*. **45**, 148-149.
- Sabato S (1990)** West Indian and South American Cycads. *Memoirs of The New York Botanical Garden* **57**, 173-185.
- Schuster J (1932)** *Zamia* L. In: Engler, A. Eds. *Das Pflanzenreich*, vol. 4. Engelmann, Leipzig, pp. 132–161.
- Schutzman B (1984)** "A new species of *Zamia* L. (Zamiaceae, Cycadales) from Chiapas, Mexico." *Phytologia* **55(5)**, 299-304.
- Schutzman B, Vovides AP, Dehgan (1988)** Two new species of *Zamia* (Zamiaceae, Cycadales) from southern Mexico. *Botanical Gazette* **149(3)**, 347-360.
- Stevenson DW, Sabato S (1986)** Typification of names in *Zamia* L. and *Aulacophyllum* Regel (Zamiaceae) *Taxon* **35**, 134-144
- Stevenson D (2004)** A new species of *Zamia* (Zamiaceae) from Belize and the Yucatan Peninsula of Mexico. *Delpinoa*. **37(38)**, 3–8.
- Treutlein J, Wink M (2002)** Molecular phylogeny of cycads inferred from rbcL sequences. *Naturwissenschaften*, **89(5)**, 221-225.
- Vovides AP (1983)** Systematic studies on the Mexican Zamiaceae L. Chromosome numbers and karyotypes. *American Journal of Botany* **70**, 1002–1006.

Vovides AP, Olivares M (1996) Karyotype polymorphism in the cycad *Zamia loddigesii* (Zamiaceae) of the Yucatan peninsula, Mexico. *Botanical Journal of the Linnean Society* **120**, 77-83.

Vovides AP (2000) México: segundo lugar mundial en diversidad de cícadas. *Biodiversitas* **6**, 6-10.

Walters T, Decker-Walters D (1991) Patterns of allozyme diversity in the West Indian cycad *Zamia pumila* (Zamiaceae). *American Journal of Botany*. **78**, 436–449.

White MJ (1965) Principles of karyotype evolution in animals. *Genetics Today* **2**, 391-397.

Whitelock LM (2002) The Cycads. Protland, Oregon. Timber Press.

Anexos

Anexo I. Test de normalidad de Shapiro-Wilk para las 12 variables analizadas. Ninguna de las variables presenta normalidad en sus valores.

| VARIABLE | SHAPIRO-WILK | VALOR DE P |
|----------|--------------|------------|
| NH | 0.73 | 0.000 |
| NF | 0.92 | 0.000 |
| LP | 0.98 | 0.0212 |
| LR | 0.96 | 0.0001 |
| LFB | 0.97 | 0.0006 |
| LFM | 0.98 | 0.0078 |
| LFA | 0.94 | 0.000 |
| AFB | 0.83 | 0.000 |
| AFM | 0.82 | 0.000 |
| AFA | 0.80 | 0.000 |
| DEF | 0.97 | 0.0006 |
| ADA | 0.98 | 0.0374 |

Anexo II. Prueba de homocedasticidad de varianzas para las 12 variables analizadas. Valores de $p > 0.05$ representan variables con homocedasticidad de varianzas.

| VARIABLE | PRUEBA DE BARTLETT (K) | VALOR DE P |
|------------|------------------------|---------------|
| NH | 40.10 | 0.0000 |
| NF | 52.80 | 0.0000 |
| LP | 23.78 | 0.004 |
| LR | 25.72 | 0.002 |
| LFB | 17.30 | 0.04 |
| LFM | 19.41 | 0.02 |
| LFA | 37.76 | 0.0000 |
| AFB | 14.02 | 0.1218 |
| AFM | 73.11 | 0.0000 |
| AFA | 32.08 | 0.0001 |
| DEF | 41.41 | 0.0000 |
| ADA | 41.03 | 0.0000 |

Anexo III. Resultados de prueba de Tukey con intervalo de confianza de 95 % con implementación de “Diferencia Honestamente Significativa (HSD en inglés)”. Se incluyen las 12 variables vegetativas consideradas en el estudio dentro de las 10 localidades que representan la distribución de las tres especies de *Zamia*.

*Para cada especie, los agrupamientos son independientes aun cuando se presente la misma simbología.

| ESPECIE/LOCALIDAD | Ancho de Articulación | | | | | | | | | |
|-------------------|-------------------------|---------|----------|------------|---------------|---------|--------------|--------------|-----------|---------|
| | Huimanguillo | Ocote 1 | Veracruz | Tapijulapa | Salto de Agua | Ocote 2 | San Fernando | Ocozocoautla | Cintalapa | Ocote 3 |
| ZS | A | B | C | C | C | | | | | |
| ZL | | | | | | | | A | B | AB |
| ZK | | | | | | A | B | | | |
| ENTRE ESPECIES | A | B | CD | CD | DEF | DE | BC | EFG | G | FG |
| ESPECIE/LOCALIDAD | Ancho de Foliolo Apical | | | | | | | | | |
| | Huimanguillo | Ocote 1 | Veracruz | Tapijulapa | Salto de Agua | Ocote 2 | San Fernando | Ocozocoautla | Cintalapa | Ocote 3 |
| ZS | A | AB | B | B | B | | | | | |
| ZL | | | | | | | | A | B | AB |
| ZK | | | | | | A | B | | | |
| ENTRE ESPECIES | A | AB | B | BC | BC | C | BC | D | D | D |
| ESPECIE/LOCALIDAD | Ancho de Foliolo Medio | | | | | | | | | |
| | Huimanguillo | Ocote 1 | Veracruz | Tapijulapa | Salto de Agua | Ocote 2 | San Fernando | Ocozocoautla | Cintalapa | Ocote 3 |
| ZS | A | AB | BC | BC | C | | | | | |
| ZL | | | | | | | | A | B | C |
| ZK | | | | | | A | B | | | |
| ENTRE ESPECIES | A | AB | BC | CD | BC | D | BC | E | E | E |
| ESPECIE/LOCALIDAD | Ancho de Foliolo Basal | | | | | | | | | |
| | Huimanguillo | Ocote 1 | Veracruz | Tapijulapa | Salto de Agua | Ocote 2 | San Fernando | Ocozocoautla | Cintalapa | Ocote 3 |
| ZS | A | AB | AB | B | AB | | | | | |
| ZL | | | | | | | | A | B | C |
| ZK | | | | | | A | B | | | |
| ENTRE ESPECIES | A | B | B | B | B | B | B | B | B | B |

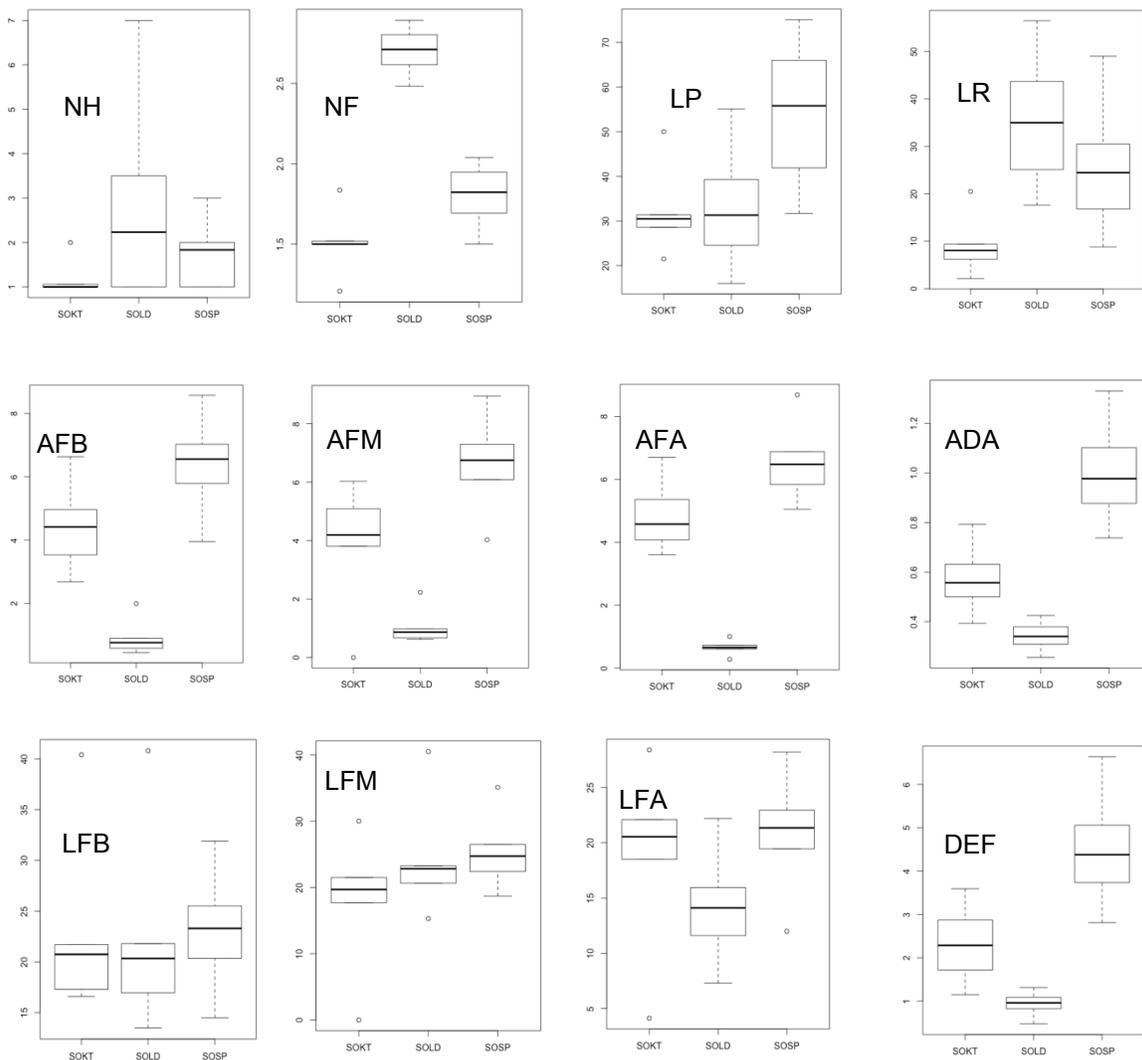
Continua

| ESPECIE/LOCALIDAD | Distancia entre Foliolos | | | | | | | | | |
|-------------------|--------------------------|---------|----------|------------|---------------|---------|--------------|--------------|-----------|---------|
| | Huimanguillo | Ocote 1 | Veracruz | Tapijulapa | Salto de Agua | Ocote 2 | San Fernando | Ocozocoautla | Cintalapa | Ocote 3 |
| ZS | A | B | B | C | C | | | | | |
| ZL | | | | | | | | A | B | AB |
| ZK | | | | | | A | B | | | |
| ENTRE ESPECIES | A | B | B | C | CDE | CD | B | CDE | DE | E |
| ESPECIE/LOCALIDAD | Largo del Pecíolo | | | | | | | | | |
| | Huimanguillo | Ocote 1 | Veracruz | Tapijulapa | Salto de Agua | Ocote 2 | San Fernando | Ocozocoautla | Cintalapa | Ocote 3 |
| ZS | A | AB | B | C | C | | | | | |
| ZL | | | | | | | | AB | B | A |
| ZK | | | | | | | | | | |
| ENTRE ESPECIES | A | AB | CD | EF | EF | DE | BC | EF | F | CDE |
| ESPECIE/LOCALIDAD | Número de Foliolos | | | | | | | | | |
| | Huimanguillo | Ocote 1 | Veracruz | Tapijulapa | Salto de Agua | Ocote 2 | San Fernando | Ocozocoautla | Cintalapa | Ocote 3 |
| ZS | A | A | C | B | B | | | | | |
| ZL | | | | | | | | B | B | A |
| ZK | | | | | | A | B | | | |
| ENTRE ESPECIES | C | CD | F | DE | E | E | E | B | B | A |
| ESPECIE/LOCALIDAD | Número de Hojas | | | | | | | | | |
| | Huimanguillo | Ocote 1 | Veracruz | Tapijulapa | Salto de Agua | Ocote 2 | San Fernando | Ocozocoautla | Cintalapa | Ocote 3 |
| ZS | AB | AB | A | B | AB | | | | | |
| ZL | | | | | | | | A | A | A |
| ZK | | | | | | A | B | | | |
| ENTRE ESPECIES | A | B | CD | CD | DEF | DE | BC | EFG | G | FG |
| ESPECIE/LOCALIDAD | Largo de Foliolo Apical | | | | | | | | | |
| | Huimanguillo | Ocote 1 | Veracruz | Tapijulapa | Salto de Agua | Ocote 2 | San Fernando | Ocozocoautla | Cintalapa | Ocote 3 |
| ZS | A | AB | B | B | B | | | | | |
| ZL | | | | | | | | A | AB | B |
| ZK | | | | | | A | B | | | |
| ENTRE ESPECIES | A | B | B | B | BCD | BC | B | BC | CD | D |

Continua

| ESPECIE/LOCALIDAD | Largo de Foliolo Medio | | | | | | | | | |
|-------------------|------------------------|---------|----------|------------|---------------|---------|--------------|--------------|-----------|---------|
| | Huimanguillo | Ocote 1 | Veracruz | Tapijulapa | Salto de Agua | Ocote 2 | San Fernando | Ocozocoautla | Cintalapa | Ocote 3 |
| ZS | A | AB | BC | C | BC | | | | | |
| ZL | | | | | | | | A | B | A |
| ZK | | | | | | A | B | | | |
| ENTRE ESPECIES | A | BC | BCD | BCD | D | CD | BCD | B | BCD | BCD |
| ESPECIE/LOCALIDAD | Largo de Foliolo Basal | | | | | | | | | |
| | Huimanguillo | Ocote 1 | Veracruz | Tapijulapa | Salto de Agua | Ocote 2 | San Fernando | Ocozocoautla | Cintalapa | Ocote 3 |
| ZS | A | B | B | B | C | | | | | |
| ZL | | | | | | | | A | A | A |
| ZK | | | | | | A | A | | | |
| ENTRE ESPECIES | A | B | B | B | B | B | B | B | B | B |
| ESPECIE/LOCALIDAD | Largo de Raquis | | | | | | | | | |
| | Huimanguillo | Ocote 1 | Veracruz | Tapijulapa | Salto de Agua | Ocote 2 | San Fernando | Ocozocoautla | Cintalapa | Ocote 3 |
| ZS | A | A | B | C | C | | | | | |
| ZL | | | | | | | | A | A | A |
| ZK | | | | | | A | B | | | |
| ENTRE ESPECIES | A | C | DE | E | E | E | BC | BC | CD | AB |

Anexo IV. Gráfica de medias y error estándar de los caracteres morfológicos que muestran la variación entre las especies analizadas, NH= Número de hojas, NF= Número de foliolos, LP= Largo del peciolo, LR= Largo del raquis, AFB= Ancho foliolo basal, AFM= Ancho de foliolo medio, AFA= Ancho de foliolo apical, ADA: Ancho de articulación, LFB= Largo del foliolo basal, LFM= Largo del foliolo medio, LFA= Largo de foliolo apical, DEF= Distancia entre foliolos. SOKT: Selva El Ocote Katzeriana, SOLD; Selva El Ocote Loddigesii, SOSP; Selva el Ocote Splendens.



Capítulo II

Hibridación interespecífica en tres especies de *Zamia* (Zamiaceae) en el sur de México.

Resumen

Para probar la probable hibridación, se analizaron 208 individuos pertenecientes a 10 poblaciones de tres especies del género *Zamia* (*Z. splendens*, *Z. katzeriana* y *Z. loddigesii*), abarcando su área de distribución en los estados de Chiapas, Tabasco y Veracruz con 12 loci de microsatélites diseñados para *Z. integrifolia*; con el objetivo de evaluar la estructura poblacional y el flujo genético y estimar así posibles procesos de retrocruzamiento o hibridación en las poblaciones de *Z. katzeriana*. Se incluyeron análisis de poblaciones cercanas de *Z. loddigesii* debido a que existen evidencias que la sugieren como un progenitor putativo de acuerdo a su parecido morfológico y anatómico. De los 12 loci utilizados, siete de ellos se encuentran bajo selección balanceadora y los análisis de diferenciación fueron realizados suprimiendo dichos loci para evaluar las variaciones en los resultados. El 88.3 % de los loci fueron polimórficos. Se obtuvo un promedio de 5.1 alelos por localidad (2.60 a 7.50), la Heterocigosidad esperada encontrada es de 0.54 en promedio (SD=0.02) mientras que la Heterocigosidad observada resultó igual a 0.28 promedio (SD=0.03). Se estimó el grado de diferenciación genética a partir de los valores de F_{ST} (0.18 a 0.37) resultando moderado entre la mayoría de pares de poblaciones. Los valores del coeficiente de endogamia (F) para las 10 poblaciones presentaron valores positivos con un promedio de $F=0.48$ lo que sugiere niveles moderadamente altos de endogamia dentro de cada población con valores de variación respecto a las subpoblaciones de $F_{IS}= 0.46$ (SD=0.07) y dentro de los individuos, con respecto al total analizado de $F_{IT}=0.59$ (SD=0.06), todas las poblaciones se encuentran fuera del Equilibrio de Hardy-Weinberg ($p<0.05$). El análisis de varianza molecular (AMOVA) muestra una estructura moderada entre las poblaciones debido a que el 44 % de la variación es atribuida a diferencias

entre los individuos y sólo el 23 % corresponde a diferencias entre las poblaciones ($Nm= 1.36$), por lo que teóricamente, el flujo génico supera los efectos de la deriva genética, evitando así la diferenciación local. El análisis de Asignación Bayesiana realizado en STRUCTURE, agrupa a los individuos en una $K=5$ y $K=4$ cuando son removidos los loci bajo selección balanceadora, señala a la localidad de Selva El Ocote como el sitio en donde se encuentra un mayor número de individuos con ancestría mixta, apoyando la hipótesis de que ésta es una zona de contacto entre los progenitores putativos y está funcionando como zona de retrocruzamiento, que resulta a los individuos de *Z. katzeriana* en Chiapas.

Palabras clave: *Zamia*, microsatélites, retrocruzamiento, Chiapas.

Introducción

Los patrones de variación morfológica, ecológica, citológica (Moretti *et al.* 1991; Vovides y Olivares, 1996; Norstog y Nicholls, 1997; Nicolalde-Morejón *et al.* 2008) y genética (González-Astorga *et al.* 2006; Limón, 2009) en *Zamia* son muy complejos, lo que ha dificultado la caracterización del género, por lo que el uso de marcadores moleculares representa una buena opción para detectar fenómenos de variación estimando así la diversidad genética, y explicando las relaciones genéticas entre poblaciones e individuos.

En la mayoría de las especies, las poblaciones están subdivididas en unidades más pequeñas debido a factores geográficos, ecológicos o de comportamiento (Hedrick, 2011). Las relaciones genéticas dependen entonces, de la migración efectiva entre las distintas poblaciones o subpoblaciones, es decir; la homogeneización de la variación de las poblaciones depende del flujo genético, considerando que en plantas, este depende del movimiento de los gametos masculino (polen) y de los cigotos (que se encuentran dentro de las semillas). (Gillespie, 1998; Hoskin *et al.* 2005; Hedrick, 2011, Nora *et al.* 2011). Los análisis de marcadores genéticos pueden revelar alelos o haplotipos compartidos que sean consistentes con fenómenos como la hibridación o la introgresión (Addison y Hart, 2005), pues son diversos los procesos que pueden resultar del intercambio de genes entre las especies. La introgresión es un fenómeno que se refiere a la introducción en una población de material genético de otras especies o subespecies, dando como resultado una mezcla entre las dos formas previamente diferenciadas, por lo que el retrocruzamiento y la hibridación pueden ser consideradas como un posible mecanismo de especiación (Soltis y Soltis, 2009).

El marcador genético ideal para estimar los niveles de variación, debe ser selectivamente neutro, biparental, heredado, codominante y diagnóstico entre los taxa de interés en múltiples loci (Pritchard *et al.* 2007). Los microsatélites, son una herramienta ideal para poder evaluar la diversidad genética de las plantas a varios niveles de investigación (Chase *et al.* 1996, Powell *et al.* 1996, Zhang y Hewitt, 2003),

debido a su alto contenido de información, facilidad de genotipificación, por ser un marcador codominante multialélico, y posee alto poder discriminatorio así como una alta reproductibilidad de resultados (Morgante y Olivieri, 1993; Powell *et al.* 1996; Jones *et al.* 1997; Russel *et al.* 1997).

Se incluyen en este estudio a las especies consideradas por Pérez-Farrera (*et al.* 2016): *Z. splendens*, *Z. katzeriana* y *Z. loddigesii*; quienes con evidencias morfológicas y anatómicas esclarecieron la situación taxonómica del grupo de especies concluyeron la naturaleza híbrida de *Z. katzeriana* por posible introgresión en la poblaciones. Se busca entonces; con evidencia molecular mediante el uso de microsatélites, realizar análisis de agrupamientos genéticos; estimar la estructura genética de las especies, su variación y con esto lograr la separación de las especies de modo que demuestran si *Z. katzeriana* es resultado de las interacciones entre poblaciones de *Z. splendens* y *Z. loddigesii*.

Materiales y métodos

Colecta

Fueron seleccionadas diez poblaciones distribuidas en los estados de Chiapas, Tabasco y Veracruz en los que se contaba con registro de poblaciones de *Zamia splendens*, *Z. katzeriana* y *Z. loddigesii* (Pérez-Farrera y Vovides, comentarios personales) (Tabla 1). En donde fue colectado un foliolo de la parte media de la hoja. Posteriormente se colocaron en bolsas de cierre hermético para su transporte al laboratorio y su almacenamiento a -20°C hasta iniciar con el proceso de análisis.

Tabla 1. Especies, tamaño de muestra y localidades de colecta de tres especies de *Zamia* consideradas en este estudio.

| Especie | Clave | N | Localidad |
|----------------------|--------------|----------|-----------------------|
| <i>Z. loddigesii</i> | ZLO | 19 | Ocozocoautla, Chis. |
| <i>Z. loddigesii</i> | ZLC | 20 | Cintalapa, Chis. |
| <i>Z. loddigesii</i> | ZLS | 20 | Selva El Ocote, Chis. |
| <i>Z. splendens</i> | ZST | 20 | Tapijulapa, Tab. |
| <i>Z. splendens</i> | ZSH | 25 | Huimanguillo, Tab. |
| <i>Z. splendens</i> | ZSC | 24 | Las Choapas, Ver. |
| <i>Z. splendens</i> | ZSA | 25 | Salto de Agua, Chis. |
| <i>Z. splendens</i> | ZSO | 20 | Selva El Ocote, Chis. |
| <i>Z. katzeriana</i> | ZKS | 21 | Selva El Ocote, Chis. |
| <i>Z. katzeriana</i> | ZKF | 14 | San Fernando, Chis. |

Extracción y visualización de ADN

Se realizó la extracción de ADN genómico por medio del método CTAB (Anexo 1). La calidad y concentración del ADN se observaron en geles de agarosa al 1 % (Figura 7). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (bromuro de 3, 8 diamino-6-etil-5-fenilnantridio) (Valadez y Kahl, 2000) y se corrieron en un buffer TAE 0.5X.

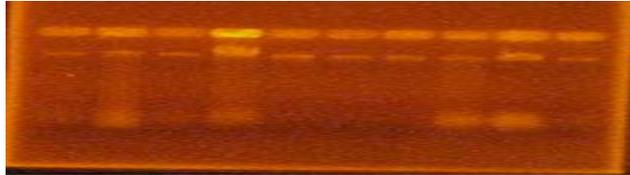


Figura 7. Extracción de muestras de *Zamia katzeriana* en un gel de agarosa al 1 %

Amplificación de ADN con microsatélites

Se utilizaron microsatélites de ADN nuclear diseñados para *Zamia integrifolia* (descritos por Meerow y Nakamura, 2007; Meerow *et al.* 2012a; 2012b) debido a los altos niveles de polimorfismo reportados (Tabla 11). Las condiciones estándares de amplificación consistieron en 35 ciclos cada uno integrado por: desnaturalización inicial de 1 min a 94°C, alineamiento variable detallado en la Tabla 11, extensión de 1 min a 72°C y una extensión final de 10 min a 72°C (Meerow y Nakamura, 2007).

Las reacciones para la amplificación se prepararon con un volumen final de 25 μ l con las siguientes concentraciones: 1.25 U de GoTaqFlexi DNA Polimerasa (Promega), 3 mM de MgCl₂, 10 μ M de cada oligonucleótido, 1X de Green GoTaq Flexi Buffer PCR, 0.5 - 1 μ l de ADN y agua libre de nucleasas, para completar el volumen. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2 % con un tampón de carga de 1 μ l de azul de bromofenol y 4 μ l de muestra (Figura 8). Los fragmentos de microsatélites fueron genotipados por servicio GeneScan con el secuenciador de capilares ABI3730XL de la empresa MAROGEN Inc. con un marcador de tamaño estándar interno 400 HD.

Tabla 11. Características de los 12 microsatélites diseñados para *Zamia integrifolia*, *Z. erosa*, *Z. pumila* y *Z. portoricensis* utilizados en este estudio con *Z. splendens*, *Z. loddigesii* y *Z. katzeriana*.

| Oligonucleótido | Repeat Type | Temp. Alineamiento | Dye | Autor |
|------------------------|--|---------------------------|------------|------------------------------|
| Zam 05 | (GA) ¹³ | 60 ° C | 6-FAM | Merrow <i>et al.</i> (2012a) |
| Zam 16 | (GA) ¹³ | 60 ° C | 6-FAM | Merrow <i>et al.</i> (2012b) |
| Zam 28 | (GT) ¹² | 61 ° C | HEX | Meerow y Nakamura (2007) |
| Zam 29 | (AGT) ¹⁵ | 61 ° C | 6-FAM | Meerow y Nakamura (2007) |
| Zam 32 | (GT) ⁶ (GA) ¹⁴ | 60 ° C | HEX | Meerow y Nakamura (2007) |
| Zam 35 | (TG) ¹⁴ (TA) ¹⁰ (TG) ¹⁰ | 58 ° C | 6-FAM | Meerow y Nakamura (2007) |
| Zam 40 | (AG) ¹⁹ | 61 ° C | HEX | Meerow y Nakamura (2007) |
| Zam 45 | (GA) ⁹ | 58 ° C | 6-FAM | Meerow y Nakamura (2007) |
| Zam 53 | (GA) ¹⁸ | 58 ° C | 6-FAM | Merrow <i>et al.</i> (2012b) |
| Zam 58 | (TC) ¹¹ | 60 ° C | HEX | Merrow <i>et al.</i> (2012b) |
| Zam 60 | (CA) ¹¹ | 60 ° C | HEX | Merrow <i>et al.</i> (2012b) |
| Zam 62 | (AG) ¹¹ | 61 ° C | HEX | Merrow <i>et al.</i> (2012b) |

Análisis de microsatélites

Los archivos de microsatélites obtenidos del secuenciador fueron importados al programa GeneMapper 4.0 (AppliedBiosystems, 2005) para ser analizados. Los loci polimórficos se sometieron a pruebas de selección positiva o balanceadora, utilizando el programa BayeScan 2.1 (Foll y Gaggiotti, 2008). Posteriormente se generó una matriz de datos en Excel para Mac con el programa GenAlEx v 6.5 (Peakall y Smouse, 2006).

Se analizó el equilibrio de Ligamento (DL) en cada población con el programa Arlequín 3.5 (Excoffier *et al.* 2005), utilizando la prueba de verosimilitud (Slatkin y Excoffier, 1996). Se aplicó un método de Cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC) con 100, 000 iteraciones, 10, 000 de burn-in y un nivel de significancia establecido en $p < 0.001$.

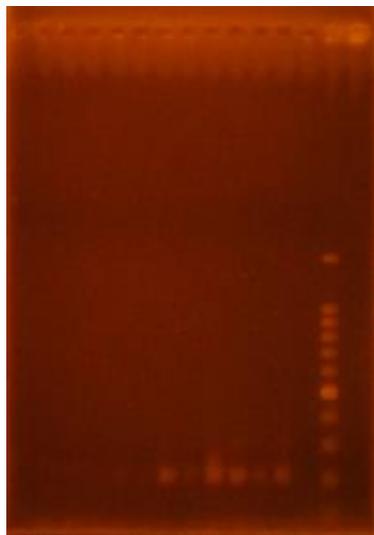


Figura 8. Amplificación del microsatélite Zam60 con 10 muestras de *Z. splendens* en un gel de agarosa al 2% y una escalera de 100 pares de bases con banda de interés amplificando a 200 pares de bases.

Diversidad y estructura genética

La estadística descriptiva (número de alelos por locus (Anexo 2), número de alelos privados, Heterocigocidad observada y esperada y el índice de fijación (o coeficiente de endogamia) fueron calculados mediante los estadísticos F (F_{IS} y F_{IT}) en Arlequín 3.5 (Wright, 1965). La prueba de Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) se corrió en el programa GENEPOP 4.2 (Rousset, 2008), además del índice de diferenciación F_{ST} y el equivalente estadístico utilizado para microsatélites (R_{ST}) en Arlequín 3.5. Se estimó el número de migrantes (Nm) entre pares de poblaciones y se consideró que un valor de $Nm > 1$ es una evidencia de flujo genético efectivo entre ellas. El análisis de varianza molecular (AMOVA) y el cálculo pareado de F_{ST} se realizó en los programas Arlequín 3.5 y GenAlEx con 10 000 permutaciones de los datos.

STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) fue utilizado para evaluar la estructura de las poblaciones y la mezcla entre las poblaciones. Se ejecutaron 20 réplicas por cada millón de MCMC, para obtener la probabilidad de asignación a determinado número de poblaciones (K) con los siguientes parámetros: un modelo de ancestría “admixed” con las frecuencias alélicas correlacionadas y un set de K de 1 a 20. Los resultados fueron analizados en el portal web Structure Harvester (Ear y VonHoldt, 2012) para obtener el número de K adecuado utilizando los métodos de Evanno, ΔK , tasa de cambio de la distribución de la verosimilitud y la probabilidad de la verosimilitud, obteniendo además una matriz Q de consenso a partir de las 20 réplicas en el valor K óptimo (Evanno *et al.* 2005).

Un análisis de Coordenadas Principales (PCO) fue realizado en R Studio v. 10.13 para corroborar el agrupamiento de los individuos, debido a que los posiciona en un espacio de reducida dimensionalidad, preservando al mismo tiempo sus relaciones mínimas de distancia (Podani y Miklos, 2002), de acuerdo a los valores de distancias genéticas.

Resultados

Se obtuvieron en total 2, 496 lecturas correspondientes a 208 individuos y 12 loci amplificados. Las pruebas de selección (neutral, positiva o balanceadora) a las que se sometieron los 12 loci analizados en BayeScan 2.1 se describen en la Tabla 12. BayeScan, calcula directamente, los valores q para cada locus. Para este análisis se eligió un umbral de valor de q de 5%, lo que significa que serán marcadores atípicos (outliers) aquellos que posean un valor inferior al 5 % y que en este estudio resultan ser los loci Zam05 y Zam45 (Anexo 1) (Figura 9). Siete de ellos se encuentran bajo una selección balanceadora con valores de probabilidad posterior de 0.16 a 0.24.

Se observó un DL poco significativo, con el porcentaje más alto entre los loci Zam32 y Zam35 ($p=0.014^{**}$) y entre Zam29 y Zam60 ($p=0.019^{**}$).

Tabla 12. Resultados de la prueba de selección de loci polimórficos en las 10 poblaciones de *Zamia* consideradas en este estudio. *PP= probabilidad posterior.

| Locus | Tipo de selección | | |
|--------------|-------------------|--------------|-----------|
| | Positiva | Balanceadora | Neutral |
| Zam05 | - | - | PP= 0.316 |
| Zam16 | - | - | PP= 0.244 |
| Zam28 | - | - | PP=0.243 |
| Zam29 | - | PP= 0.241 | - |
| Zam32 | - | PP= 0.242 | - |
| Zam35 | - | - | PP= 0.243 |
| Zam40 | - | PP= 0.242 | - |
| Zam45 | - | PP= 0.155 | - |
| Zam53 | - | - | PP=0.243 |
| Zam58 | - | PP= 0.232 | - |
| Zam60 | - | PP= 0.242 | - |
| Zam62 | - | PP= 0.242 | - |

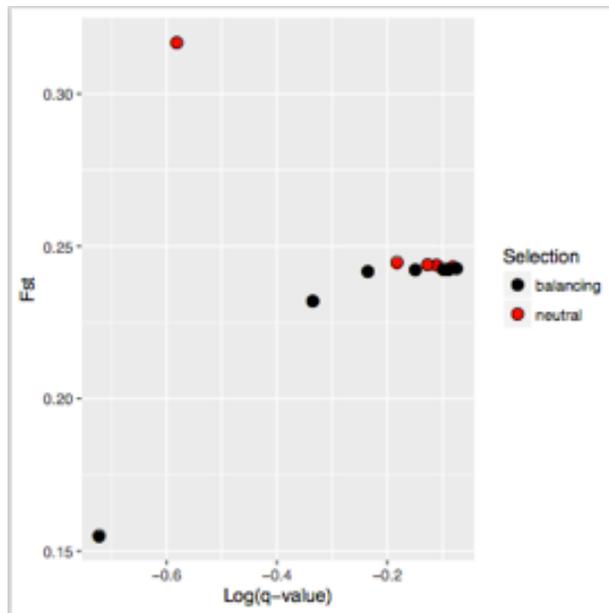


Figura 9. Prueba de selección en los 12 loci analizados.

En la Figura 10. Se observan los cromatogramas representativos generados en el programa GeneMapper 4.0.

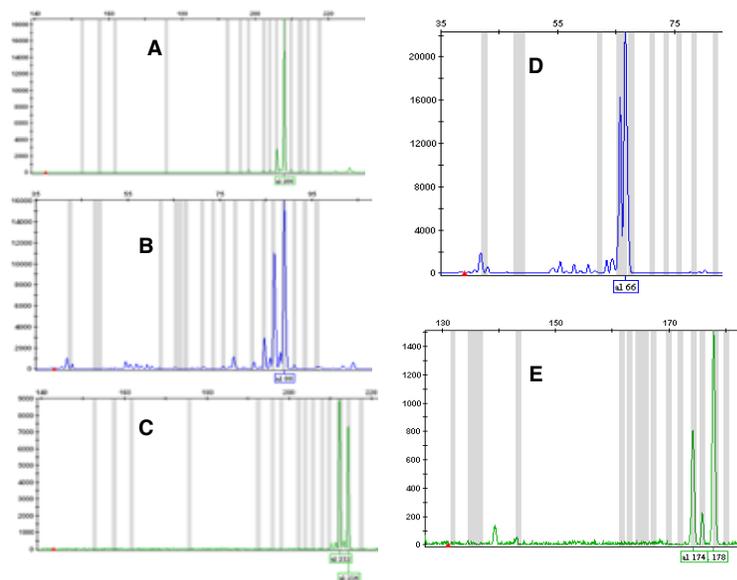


Figura 10. Patrones electroforéticos representativos de 5 poblaciones de *Zamia*. El número por debajo del pico, representa el tamaño del alelo. B, C y E representan individuos heterocigotos.

Diversidad genética

Los análisis estadísticos descriptivos muestran un porcentaje de loci polimórficos promedio de 88.30 % (EE= 3.56 %) con un rango de 66.60 a 100 %. El número de alelos por locus osciló entre 2.60 y 7.50 en las 10 poblaciones (Tabla 13, Figura 11). El mayor número de alelos privados se presentó en la población de *Z. katzeriana* en Selva El Ocote, Chiapas (1.67); mientras que el valor de completa ausencia se presentó en la misma localidad pero de la especie *Z. loddigesii*. Los valores del índice de fijación reflejan una carencia de heterocigotos en la población.

Tabla 13. Estadísticas descriptivas de la variación genética en las 10 poblaciones analizadas de *Zamia*. % LP= porcentaje de loci polimórficos, N_a = número de alelos por locus, N_e = número de alelos afectivos, I = índice de Shannon, AP= alelos privados, H_E , H_O = Heterocigosidad observada y esperada, F = índice de fijación. Los valores son medias y errores estándar (EE). En negrita los valores más bajos y más altos para cada columna calculada.

| Población | %LP | | N_a | N_e | I | AP | H_E | H_O | F |
|--------------|--------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| ZLO | 91.67% | Media | 6.08 | 3.35 | 1.25 | 0.75 | 0.58 | 0.38 | 0.33 |
| | | EE | 0.93 | 0.62 | 0.18 | 0.31 | 0.07 | 0.07 | 0.10 |
| ZLC | 83.33% | Media | 3.92 | 2.38 | 0.87 | 0.50 | 0.45 | 0.29 | 0.35 |
| | | EE | 0.57 | 0.34 | 0.17 | 0.23 | 0.09 | 0.08 | 0.11 |
| ZLS | 66.67% | Media | 2.67 | 2.02 | 0.70 | 0.00 | 0.40 | 0.17 | 0.57 |
| | | EE | 0.50 | 0.32 | 0.16 | 0.00 | 0.09 | 0.05 | 0.10 |
| ZST | 100% | Media | 7.17 | 3.98 | 1.44 | 1.08 | 0.65 | 0.50 | 0.19 |
| | | EE | 0.96 | 0.79 | 0.17 | 0.45 | 0.06 | 0.07 | 0.11 |
| ZSH | 100% | Media | 5.91 | 3.29 | 1.23 | 0.75 | 0.59 | 0.24 | 0.58 |
| | | EE | 0.94 | 0.48 | 0.18 | 0.33 | 0.07 | 0.06 | 0.08 |
| ZSC | 83.33% | Media | 4.58 | 2.32 | 0.92 | 0.17 | 0.45 | 0.20 | 0.61 |
| | | EE | 0.97 | 0.43 | 0.20 | 0.11 | 0.09 | 0.06 | 0.09 |
| ZSA | 75.00% | Media | 4.00 | 2.16 | 0.84 | 0.33 | 0.43 | 0.17 | 0.62 |
| | | EE | 0.86 | 0.42 | 0.18 | 0.19 | 0.09 | 0.05 | 0.07 |
| ZSO | 91.67% | Mean | 4.67 | 3.01 | 1.15 | 0.33 | 0.57 | 0.29 | 0.51 |
| | | EE | 0.51 | 0.42 | 0.15 | 0.19 | 0.07 | 0.07 | 0.10 |
| ZKS | 100% | Media | 7.58 | 4.41 | 1.52 | 1.67 | 0.67 | 0.33 | 0.45 |
| | | EE | 1.03 | 0.70 | 0.19 | 0.38 | 0.07 | 0.08 | 0.11 |
| ZKF | 91.67% | Media | 4.42 | 3.01 | 1.16 | 0.67 | 0.60 | 0.18 | 0.69 |
| | | EE | 0.43 | 0.35 | 0.14 | 0.28 | 0.06 | 0.07 | 0.12 |
| Total | 88.33% | Media | 5.10 | 3.00 | 1.11 | 1.11 | 0.54 | 0.28 | 0.48 |

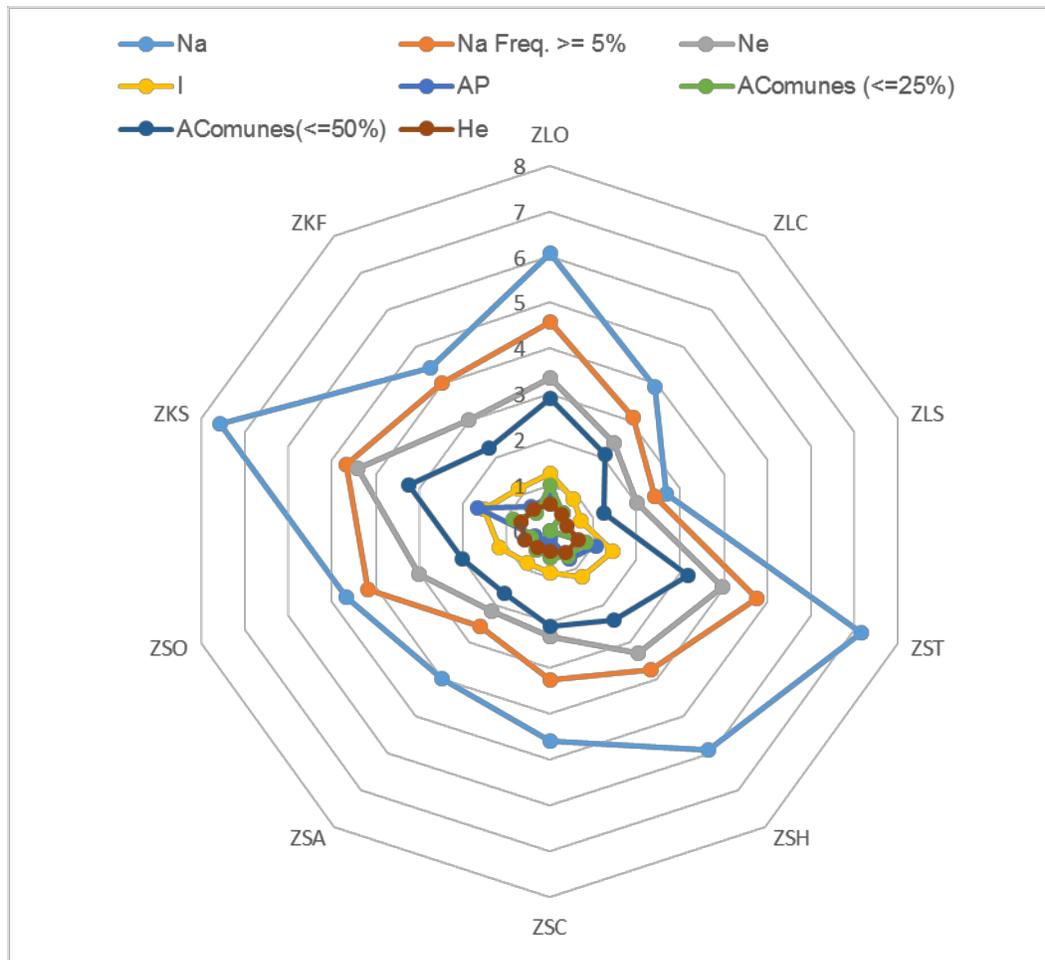


Figura 11. Promedio de número de alelos por población.

La estimación de flujo génico entre las poblaciones indica niveles moderados entre las poblaciones (Tabla 14) y entre los loci analizados (Tabla 15), con un promedio de 1.47 individuos migrantes entre las poblaciones y una variación promedio de los individuos con respecto a las subpoblaciones como F_{IS} de 0.46 (SE=0.07) y dentro de los individuos en relación con el total, como F_{IT} =0.059 (SE= 0.06).

Tabla 14. Valores pareados de F_{ST} y Nm entre todas las poblaciones analizadas. Los valores en negrita representan el número de migrantes entre poblaciones *Z. katzeriana* y *Z. splendens*. Debajo de cero están representados los valores de F_{ST} .

| ZLO | ZLC | ZLS | ZST | ZSH | ZSC | ZSA | ZSO | ZKS | ZKF | |
|------|------|------|------|------|------|------|------|-------------|-------------|------------|
| 0 | 1.74 | 0.99 | 2.02 | 1.77 | 0.96 | 0.89 | 1.97 | 2.52 | 1.45 | ZLO |
| 0.13 | 0 | 1.00 | 1.18 | 1.55 | 0.83 | 0.54 | 1.54 | 1.23 | 0.86 | ZLC |
| 0.20 | 0.20 | 0 | 1.06 | 1.29 | 0.54 | 0.49 | 1.08 | 1.02 | 0.83 | ZLS |
| 0.11 | 0.18 | 0.19 | 0 | 2.74 | 1.07 | 1.07 | 1.96 | 2.29 | 1.65 | ZST |
| 0.12 | 0.14 | 0.16 | 0.08 | 0 | 1.14 | 1.05 | 2.37 | 2.38 | 1.41 | ZSH |
| 0.21 | 0.23 | 0.32 | 0.19 | 0.18 | 0 | 0.60 | 0.81 | 1.07 | 0.96 | ZSC |
| 0.22 | 0.32 | 0.34 | 0.19 | 0.19 | 0.29 | 0 | 0.87 | 0.98 | 0.67 | ZSA |
| 0.11 | 0.14 | 0.19 | 0.11 | 0.10 | 0.24 | 0.22 | 0 | 2.67 | 1.42 | ZSO |
| 0.09 | 0.17 | 0.20 | 0.10 | 0.10 | 0.19 | 0.20 | 0.09 | 0 | 2.72 | ZKS |
| 0.15 | 0.23 | 0.23 | 0.13 | 0.15 | 0.21 | 0.27 | 0.15 | 0.08 | 0 | ZKF |

Tabla 15. Estadística de flujo genético por locus, en todas las poblaciones analizadas.

| Locus | F_{IS} | F_{IT} | Nm |
|------------|-------------|----------|-------------|
| Zam05 | 0.58 | 0.74 | 0.42 |
| Zam16 | 0.28 | 0.52 | 0.49 |
| Zam28 | 0.34 | 0.60 | 0.39 |
| Zam29 | 0.15 | 0.17 | 9.40 |
| Zam32 | 0.32 | 0.54 | 0.54 |
| Zam35 | 0.52 | 0.65 | 0.68 |
| Zam40 | 0.83 | 0.87 | 0.84 |
| Zam45 | 0.07 | 0.22 | 1.23 |
| Zam53 | 0.69 | 0.77 | 0.69 |
| Zam58 | 0.53 | 0.62 | 1.17 |
| Zam60 | 0.37 | 0.51 | 0.86 |
| Zam62 | 0.81 | 0.85 | 0.87 |
| Promedio | 0.46 | 0.59 | 1.47 |
| Error stnd | 0.07 | 0.06 | 0.73 |

Los resultados de heterocigosis con el programa GENEPOP 4.2 para todos los loci en relación a la prueba de EHW, muestran que ninguna de las poblaciones se encuentran en equilibrio ($p < 0.05$) presentando un déficit de heterocigotos (Tabla 16).

Tabla 16. Valores de significancia (p) de la prueba de Equilibrio de Hardy-Weinberg para 10 poblaciones de *Zamia* analizadas.

Notas: Monomórfico, ns: no significativo. * $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$.

| POB | ZAM05 | ZAM16 | ZAM28 | ZAM29 | ZAM32 | ZAM35 | ZAM40 | ZAM45 | ZAM53 | ZAM58 | ZAM60 | ZAM62 | TOT |
|------|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| ZLO | 0.001** * | 0.01* | 0.00*** | - | 0.00*** | 0.72ns | 0.01** | 0.00** | 0.00*** | 0.00*** | 0.11ns | 0.00*** | 0.00*** |
| ZLC | 0.01** | 0.95ns | 0.18ns | - | 0.00*** | - | 0.00*** | 0.02* | 0.00** | 0.81ns | 0.39ns | 0.16ns | 0.00*** |
| ZLS | - | 0.00*** | 0.00*** | - | - | - | 0.00*** | 0.79ns | 0.03* | 0.00*** | 0.00*** | 0.00*** | 0.00*** |
| ZST | 0.00*** | 0.00*** | 0.34ns | 0.10ns | 0.03* | 0.51ns | 0.00*** | 0.10ns | 0.05* | 0.00** | 0.15ns | 0.00*** | 0.00*** |
| ZSH | 0.00*** | 0.00*** | 0.13ns | 0.00*** | 0.00** | 0.00*** | 0.00*** | 0.56ns | 0.00*** | 0.00*** | 0.00*** | 0.00*** | 0.00*** |
| ZSC | 0.14ns | 0.00*** | - | - | 0.00*** | 0.00*** | 0.00*** | 0.08ns | 0.00*** | 0.00*** | 0.00*** | 0.00*** | 0.00*** |
| ZSA | 0.00*** | - | - | - | 0.00*** | 0.00*** | 0.00*** | 0.08ns | 0.01* | 0.00*** | 0.00*** | 0.00*** | 0.00*** |
| ZSO | 0.00*** | 0.00*** | 0.00*** | - | 0.01** | 0.00** | 0.00*** | 0.09ns | 0.00*** | 0.00ns | 0.90ns | 0.00*** | 0.00*** |
| ZKS | 0.00*** | 0.00** | 0.04* | 0.91ns | 0.01* | 0.00*** | 0.00*** | 0.14ns | 0.00*** | 0.17ns | 0.00** | 0.00*** | 0.00*** |
| ZKF | 0.00*** | 0.89ns | 0.00*** | - | 0.68ns | 0.00*** | 0.00*** | 0.00** | 0.00*** | 0.01** | 0.00*** | 0.00*** | 0.00*** |
| Tot. | 0.00*** | 0.00*** | 0.00*** | 0.03* | 0.00*** | 0.00*** | 0.00*** | 0.00*** | 0.00*** | 0.00*** | 0.00*** | 0.00*** | 0.01* |

Estructura genética y diferenciación

Los valores de F_{ST} y R_{ST} son concordantes y muestran una moderada diferenciación, indicando variaciones significativas mayores entre las localidades de *Z. loddigesii* en Cintalapa y *Z. splendens* de Salto de Agua, en el estado de Chiapas; mientras que el valor más bajo fue encontrado entre las poblaciones de *Z. katzeriana* en Selva El Ocote y San Fernando, Chiapas (Tabla 17). La diferenciación entre las poblaciones de *Z. splendens* va de baja a moderada, siendo las poblaciones con menos diferenciación Huimanguillo y Tapijulapa, Tabasco; y las que poseen mayor valor de diferenciación son Las Choapas, Veracruz y Salto de Agua, Chiapas (0.08 y 0.29 respectivamente). Para *Z. loddigesii* las poblaciones menos diferenciadas son Ocozocoautla y Cintalapa, Chiapas con un valor de F_{ST} de 0.11 y el valor más alto de diferenciación entre Ocozocoautla y los individuos colectados en Selva El Ocote, Chiapas (0.20). Las poblaciones muestreadas de *Z. katzeriana* poseen un bajo nivel de diferenciación (0.09) con los individuos de *Z. splendens* en La Selva El Ocote, Chiapas.

Tabla 17. Valores pareados de F_{ST} y R_{ST} entre todas las poblaciones analizadas. Los valores de F_{ST} se muestran debajo de la diagonal, mientras que los valores de R_{ST} por arriba de la diagonal.

| POBLACIÓN | ZLO | ZLC | ZLS | ZST | ZSH | ZSC | ZSA | ZSO | ZKS | ZKF |
|-----------|------|-------|-------------|-------------|------|------|------|------|-------------|--------|
| ZLO | - | 0.08* | 0.20 | 0.23 | 0.15 | 0.29 | 0.20 | 0.27 | 0.25 | 0.55** |
| ZLC | 0.13 | - | 0.17 | 0.20 | 0.13 | 0.33 | 0.18 | 0.23 | 0.24 | 0.49 |
| ZLS | 0.20 | 0.20 | - | 0.21 | 0.31 | 0.36 | 0.41 | 0.25 | 0.25 | 0.41 |
| ZST | 0.11 | 0.18 | 0.19 | - | 0.32 | 0.53 | 0.44 | 0.01 | 0.11 | 0.38 |
| ZSH | 0.12 | 0.14 | 0.16 | 0.08 | - | 0.22 | 0.17 | 0.36 | 0.25 | 0.47 |
| ZSC | 0.21 | 0.23 | 0.32 | 0.19 | 0.18 | - | 0.18 | 0.54 | 0.37 | 0.55** |
| ZSA | 0.22 | 0.32 | 0.34 | 0.19 | 0.19 | 0.29 | - | 0.48 | 0.37 | 0.68** |
| ZSO | 0.11 | 0.14 | 0.19 | 0.11 | 0.10 | 0.24 | 0.22 | - | 0.09* | 0.38 |
| ZKS | 0.09 | 0.17 | 0.20 | 0.10 | 0.10 | 0.19 | 0.20 | 0.09 | - | 0.21 |
| ZKF | 0.15 | 0.23 | 0.23 | 0.13 | 0.15 | 0.21 | 0.27 | 0.15 | 0.08 | - |

Las distancias genéticas de *Nei* (*NeiD*) sugieren que las poblaciones más distintas desde el punto de vista genético, de acuerdo a las diferencias en número de repeticiones entre los alelos son Salto de Agua, Chiapas, correspondiente a *Z. splendens* y San Fernando, Chiapas de *Z. katzeriana* (1.06), mientras que el valor más bajo encontrado (*NeiD*=0.33) se encuentra entre las poblaciones de *Z. loddigesii* de Ocozocoautla y Cintalapa, Chiapas (Tabla 18).

Tabla 18. Valores pareados de Distancias e Identidades genéticas entre todas las poblaciones analizadas. Los valores de *Distancias* (*NeiD*) se muestran debajo de la diagonal, mientras que los valores de *Identidad* (*NeiI*) por arriba de la diagonal. Los valores en negritas representan los más bajos y altos encontrados.

| ZLO | ZLC | ZLS | ZST | ZSHT | ZSC | ZSA | ZSO | ZKC | ZKF | |
|-------------|------|------|------|------|------|-------------|------|------|------|------------|
| - | 0.72 | 0.57 | 0.61 | 0.59 | 0.49 | 0.52 | 0.68 | 0.66 | 0.52 | ZLO |
| 0.33 | - | 0.65 | 0.50 | 0.63 | 0.53 | 0.37 | 0.65 | 0.46 | 0.39 | ZLC |
| 0.56 | 0.43 | - | 0.52 | 0.66 | 0.41 | 0.39 | 0.62 | 0.49 | 0.49 | ZLS |
| 0.50 | 0.70 | 0.65 | - | 0.72 | 0.48 | 0.53 | 0.61 | 0.58 | 0.48 | ZST |
| 0.53 | 0.45 | 0.49 | 0.37 | - | 0.57 | 0.57 | 0.71 | 0.66 | 0.48 | ZSH |
| 0.71 | 0.64 | 0.89 | 0.73 | 0.56 | - | 0.44 | 0.41 | 0.44 | 0.51 | ZSC |
| 0.65 | 1.00 | 0.94 | 0.64 | 0.57 | 0.83 | - | 0.53 | 0.46 | 0.35 | ZSA |
| 0.40 | 0.43 | 0.48 | 0.50 | 0.35 | 0.89 | 0.63 | - | 0.70 | 0.53 | ZSO |
| 0.42 | 0.77 | 0.71 | 0.54 | 0.42 | 0.82 | 0.77 | 0.36 | - | 0.70 | ZKS |
| 0.65 | 0.95 | 0.72 | 0.73 | 0.74 | 0.68 | 1.06 | 0.64 | 0.36 | - | ZKF |

Los resultados de AMOVA (Tabla 19) muestran que el mayor porcentaje de variación, se encuentra entre los individuos (44 %), indicando la alta estructura poblacional entre las poblaciones, con un valor de F_{ST} para AMOVA igual a 0.22 es decir; la diferenciación es elevada entre ellas y suficiente para separar a las especies de cada población.

Tabla 19. Resultados de los análisis de AMOVA. En negritas se resaltan los valores más altos.

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Componentes de la variación | Variación (%) |
|--|-------------------|-----------------------------|---------------|
| 10 poblaciones | | | |
| Entre especies | 311361.52 | 794.39 | 16.00 |
| Entre poblaciones | 385982.14 | 1186.00 | 23.98 |
| Entre individuos dentro de poblaciones | 1150399.90 | 2844.77 | 57.52 |
| Dentro de los individuos | 25076.50 | 120.56 | 2.43 |
| <i>Zamia splendens</i> | | | |
| Entre poblaciones | 367053.09 | 1879.79 | 37.15 |
| Entre individuos dentro de poblaciones | 682949.95 | 3085.76 | 60.99 |
| Dentro de los individuos | 10724.50 | 94.07 | 1.86 |
| <i>Z. loddigesii</i> | | | |
| Entre poblaciones | 112443.92 | 1290.69 | 31.64 |
| Entre individuos dentro de poblaciones | 306294.80 | 2681.19 | 65.73 |
| Dentro de los individuos | 6323.00 | 107.17 | 2.63 |
| <i>Z. katzeriana</i> | | | |
| Entre poblaciones | 14141.47 | 275.53 | 9.73 |
| Entre individuos dentro de poblaciones | 161155.16 | 2327.04 | 82.17 |
| Dentro de los individuos | 8029 | 229.40 | 8.10 |

El valor más alto de Delta K indicó que $K= 5$ es el número de clústeres genéticos más probable dentro de las 10 poblaciones analizadas ($\ln P (K)=8549.17$ y una desviación estándar de 56.99) (Figura 12), agrupando en un mismo clúster a los individuos de *Z. loddigesii* de las localidades de Ocozocoautla y Cintalapa en Chiapas (Rojo), en un segundo grupo a los individuos de *Z. loddigesii* de Selva El Ocote y *Z. katzeriana* de San Fernando ambas en el estado de Chiapas (verde). El grupo tres está constituido por individuos del estado de Tabasco (Huimanguillo y Tapijulapa) identificados como *Z. splendens* (rosa). Un cuarto clúster agrupa a los individuos de las localidades de Las Choapas, Veracruz y Salto de Agua, Chiapas pertenecientes a las especies de *Z. splendens* (amarillo), mientras que en el último clúster se agrupan a individuos distribuidos en la Selva El Ocote en Chiapas, morfológicamente identificados como *Z. splendens* y *Z. katzeriana* (azul) (Figuras 13 y 14).

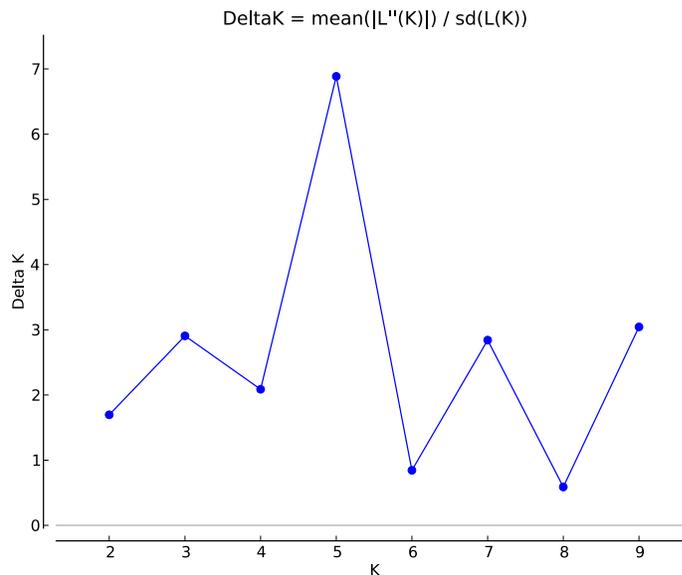


Figura 12. Gráfico de valores de Delta K que se obtuvo mediante el método de Evanno $K=5$

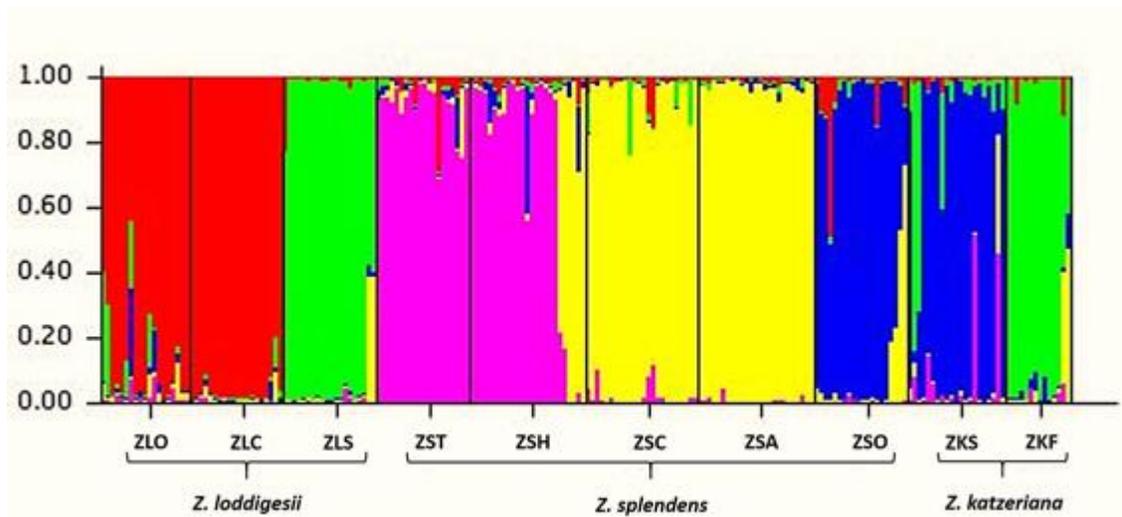


Figura 13. Asignación bayesiana de genotipos encontrada con STRUCTURE para las localidades de *Zamia* analizadas.

Se utilizó la proporción individual de los valores de pertenencia (Q) del total de las iteraciones, para clasificar a los individuos analizados como individuos puros o con cierta mezcla genética. El valor mínimo de Q observada en las poblaciones putativas de *Z. splendens* y *Z. loddigesii* sirvió de referencia para definir individuos puros. Aquellos con valores inferiores al mínimo, se tomaron como individuos con mezcla.

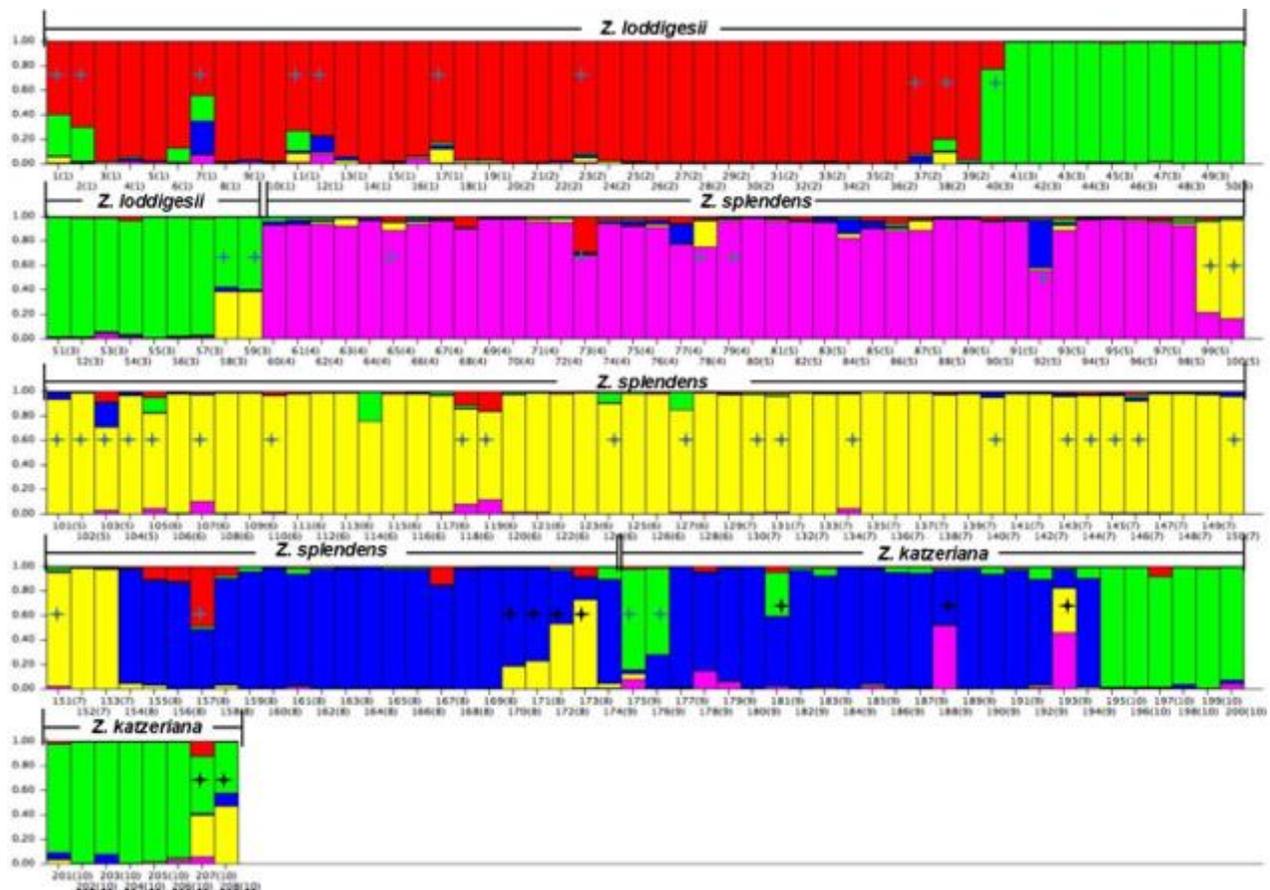


Figura 14. Asignación bayesiana de genotipos encontrada con STRUCTURE para los individuos (“localidades”) de *Zamia* analizadas.

*Símbolo indica los individuos con posible mezcla genética de acuerdo a los valores de Q .

El PCO se llevó a cabo sobre la matriz pareada de valores de diferenciación genética (F_{ST}) en los genotipos de microsatélites individuales. El PCO obtenido muestra 2 grupos más o menos definidos entre las 10 poblaciones analizadas (Figura 15) en donde se agrupa a los individuos de manera similar a STRUCTURE entre las especies de *Z. splendens* - *Z. katzeriana* (elipse roja) y entre *Z. loddigesii* - *Z. katzeriana* (elipse verde).

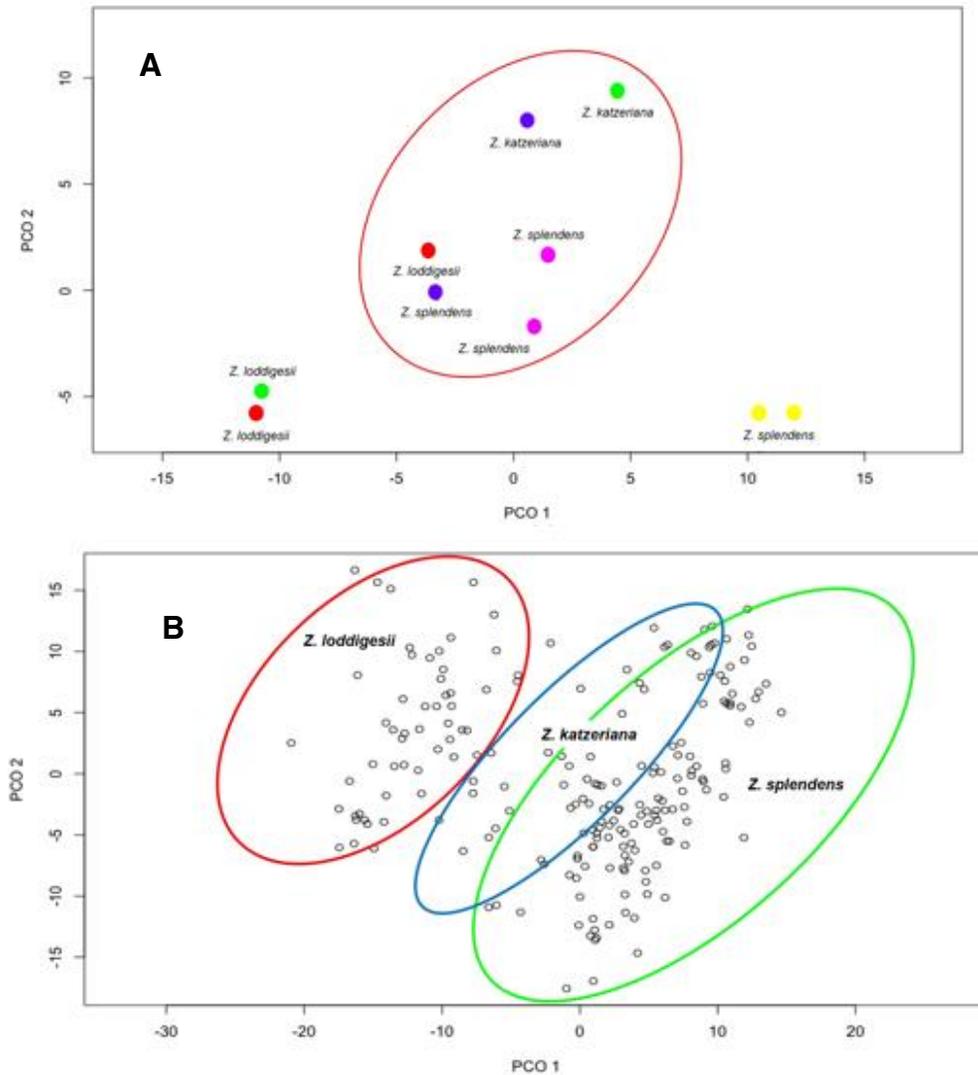


Figura 15. Análisis de coordenadas principales para las 10 poblaciones analizadas de tres especies *Zamia* **A)** Detalle de agrupamiento bajo la variable categórica “Población”, **B)** Agrupamiento bajo la variable categórica “Individuo/ Especie”. Ambos agrupamientos calculados de acuerdo a los valores de F_{ST} entre las poblaciones analizadas.

Se realizaron además, los análisis de diferenciación genética basándonos en los valores de F_{ST} y el agrupamiento mediante STRUCTURE, esta vez sin considerar a los siete loci bajo selección balanceadora (Zam29, Zam32, Zam40, Zam45, Zam58, Zam60 y Zam62) (Anexo 3) y se obtuvieron los resultados que se resumen en la Tabla 20.

Tabla 20. Valores pareados de F_{ST} y R_{ST} sin considerar loci bajo selección de equilibrio, entre todas las poblaciones analizadas. Los valores de F_{ST} se muestran debajo de la diagonal, mientras que los valores de R_{ST} por arriba de la diagonal.

| POBLACIÓN | ZLO | ZLC | ZLS | ZST | ZSH | ZSC | ZSA | ZSO | ZKS | ZKF |
|-----------|------|------|-------------|------|-------------|------|-------|-------|------|------|
| ZLO | - | 0.05 | 0.2 | 0.27 | 0.15 | 0.32 | 0.15 | 0.28 | 0.27 | 0.58 |
| ZLC | 0.15 | - | 0.08 | 0.2 | 0.11 | 0.33 | 0.17 | 0.24 | 0.24 | 0.49 |
| ZLS | 0.22 | 0.24 | - | 0.18 | 0.32 | 0.38 | 0.27 | 0.18 | 0.24 | 0.43 |
| ZST | 0.22 | 0.27 | 0.28 | - | 0.37 | 0.61 | 0.49 | 0.01 | 0.13 | 0.42 |
| ZSH | 0.18 | 0.24 | 0.27 | 0.12 | - | 0.24 | 0 | 0.39 | 0.28 | 0.53 |
| ZSC | 0.23 | 0.26 | 0.34 | 0.25 | 0.11 | - | 0.1 | 0.58 | 0.41 | 0.61 |
| ZSA | 0.16 | 0.32 | 0.35 | 0.16 | 0.08 | 0.15 | - | 0.51 | 0.39 | 0.71 |
| ZSO | 0.15 | 0.2 | 0.24 | 0.2 | 0.17 | 0.23 | 0.22 | - | 0.08 | 0.36 |
| ZKS | 0.16 | 0.27 | 0.25 | 0.21 | 0.15 | 0.24 | 0.203 | 0.11 | - | 0.21 |
| ZKF | 0.25 | 0.33 | 0.28 | 0.27 | 0.23 | 0.23 | 0.26 | 0.202 | 0.11 | - |

El agrupamiento con STRUCTURE permite identificar a 4 grupos ($K=4$) con cierta mezcla entre los individuos de las tres especies (Figuras 16 y 17). En un primer clúster se encuentran los individuos identificados como *Z. loddigesii* (amarillo), en un segundo clúster se encuentran los individuos del estado de Tabasco pertenecientes a *Z. splendens* (rojo), el tercer grupo está conformado por individuos de *Z. splendens* de Salto de Agua, Chiapas y Las Choapas, Veracruz (verde), seguido del agrupamiento de los individuos etiquetados como *Z. katzeriana* (azul). Todos los individuos de la población de Selva El Ocote de *Z. splendens* presentan una clara mezcla de lo grupos anteriores.

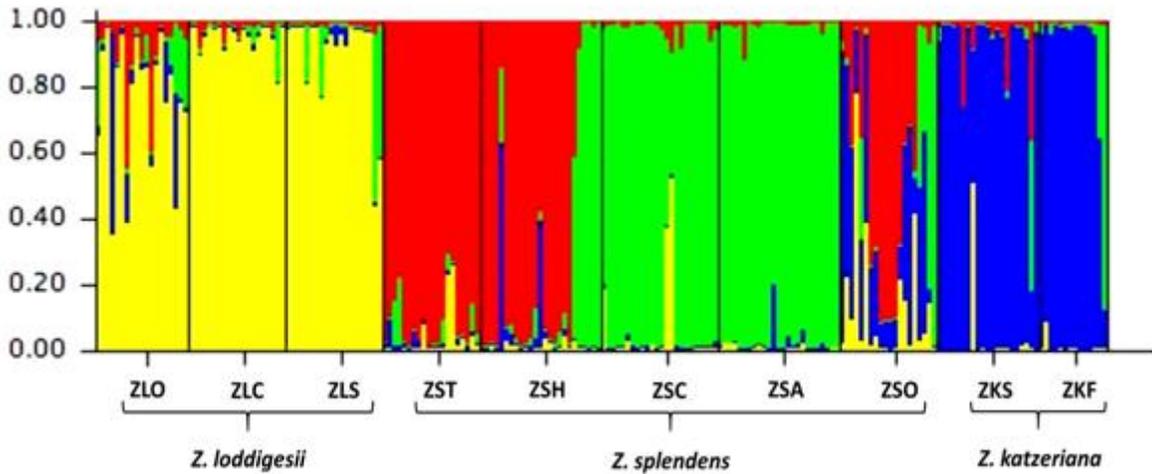


Figura 16. Asignación bayesiana de genotipos encontrada con STRUCTURE para las localidades de *Zamia* analizadas sin considerar loci bajo selección.

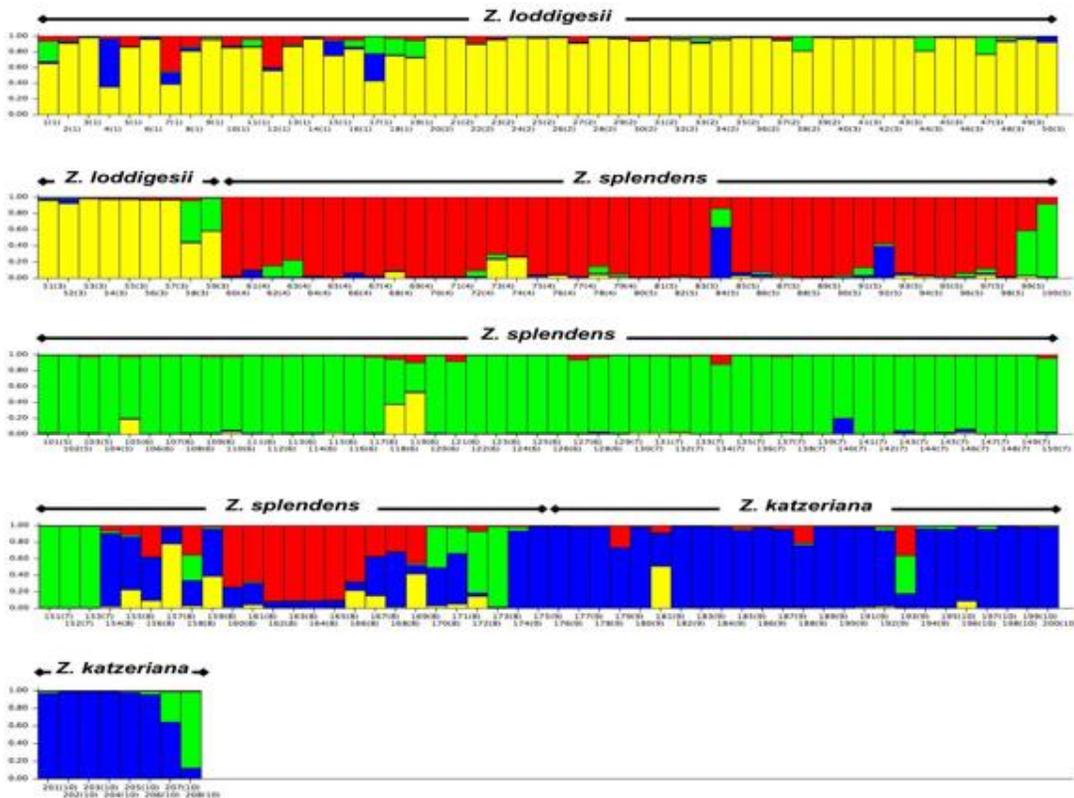


Figura 17. Asignación bayesiana de genotipos encontrada con STRUCTURE para los individuos (“localidades”) de *Zamia* analizadas sin considerar loci bajo selección.

*Símbolo indica los individuos con posible mezcla genética de acuerdo a los valores de Q .

Se realizó el agrupamiento de los individuos en un PCO, basándonos en los valores de F_{ST} pareados, resultando dos grupos más o menos definidos formados a nivel poblacional por *Z. loddigesii* y *Z. splendens*, pertenecientes al estado de Tabasco (amarillo y rojo) y por otro lado a *Z. katzeriana* y *Z. splendens* de Selva El Ocote, Chiapas (Figura 18, Arriba).

El análisis considerando los valores de F_{ST} entre individuos, agrupan de la misma forma a los individuos de Tabasco de *Z. splendens* (rojo), a la mayoría de los individuos de *Z. loddigesii* en un grupo marcado con ovalo amarillo. Un tercer grupo formado por todos los individuos de *Z. katzeriana*, los individuos de *Z. splendens* de Selva El Ocote, Salto de Agua, Chiapas y Las Choapas, Veracruz y algunos individuos de la localidad de Selva el Ocote pertenecientes a *Z. loddigesii* (Figura 18, abajo).

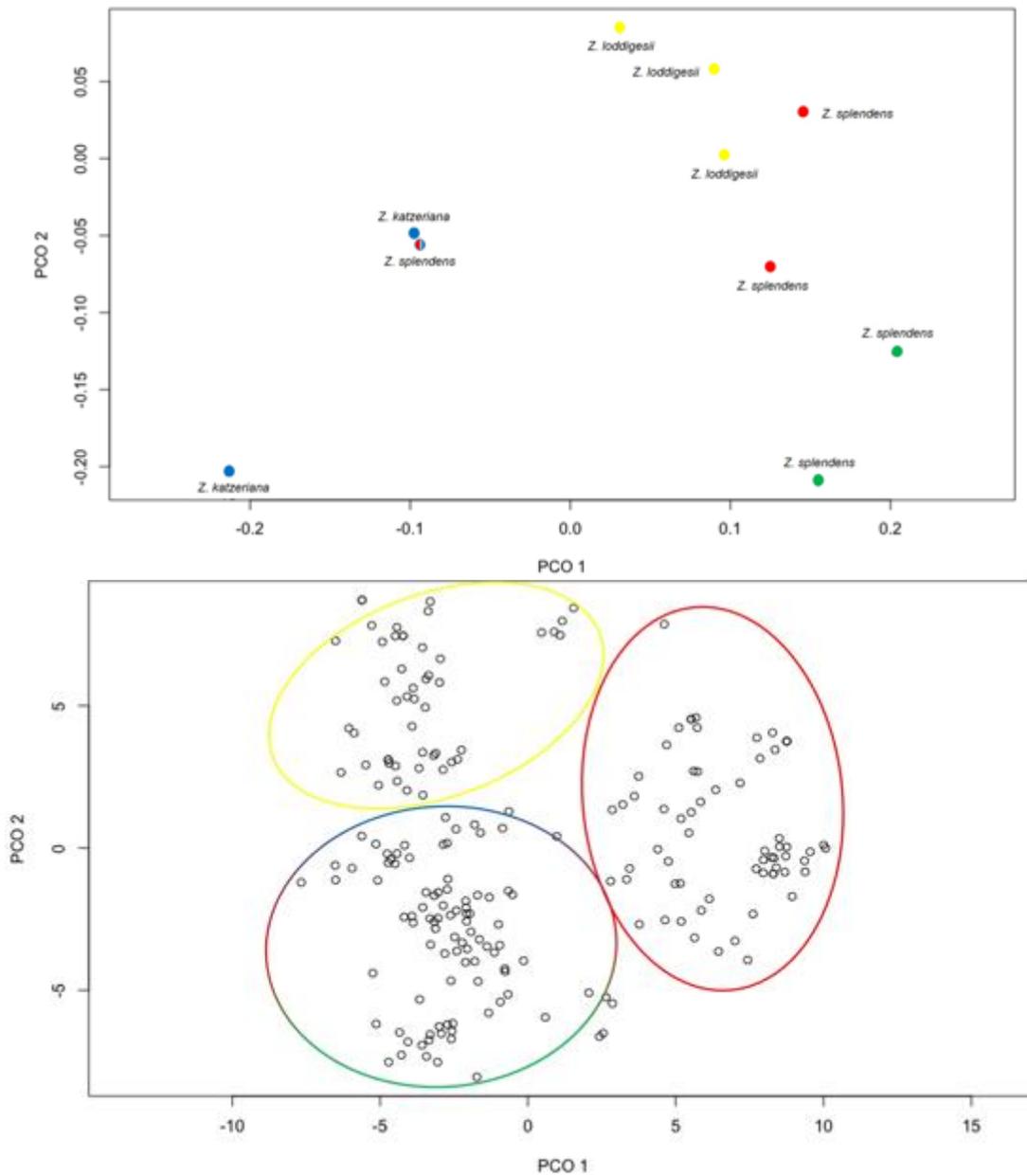


Figura 18. Análisis de coordenadas principales para las 10 poblaciones analizadas de tres especies de *Zamia*. **Arriba:** Detalle de agrupamiento bajo la variable categórica “Población”, **Abajo:** Agrupamiento bajo la variable categórica “Individuo/ Especie”. Ambos agrupamientos calculados sin considerar a los loci bajo selección de equilibrio.

Para corroborar los agrupamientos anteriores, se realizó una prueba de asignación a grupos, mediante la probabilidad de pertenencia de los individuos en base a funciones discriminantes. Los valores fueron mayores a 95 % para las poblaciones, indicando clústeres claros y solamente los individuos de *Z. katzeriana* presentaron valores más bajos (92.8 %) (Figura 19).

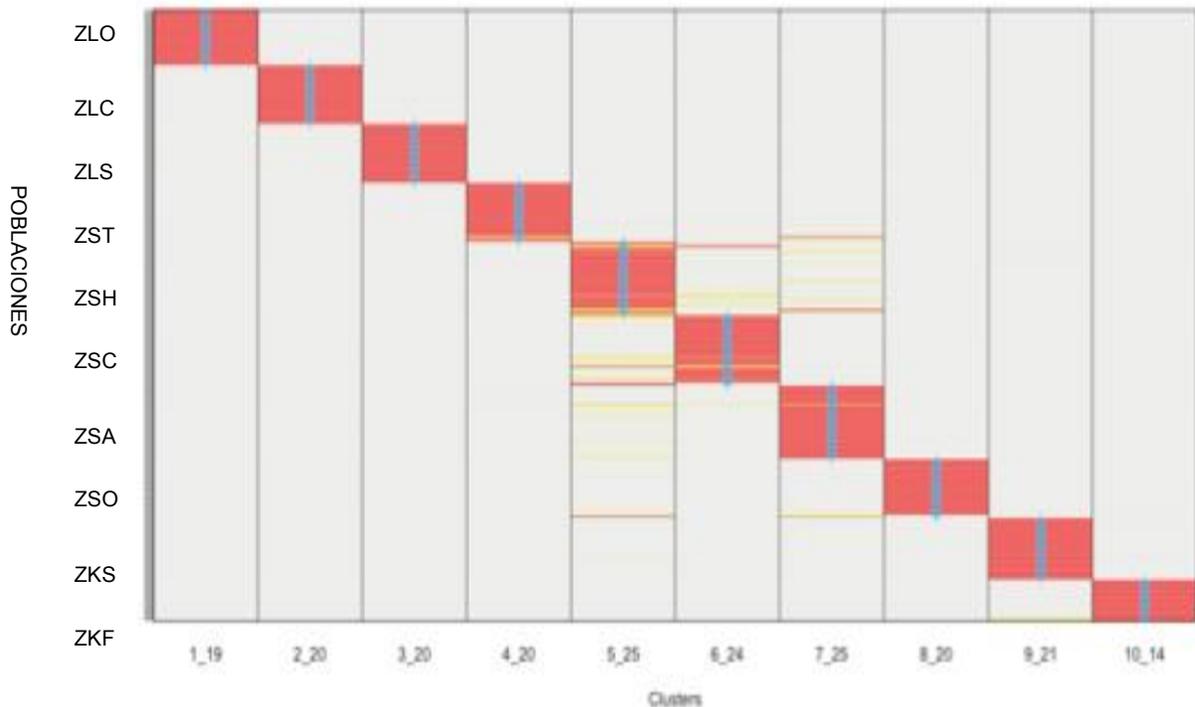


Figura 19. Pareado de asignación de pertenencia entre las 10 poblaciones analizadas de *Zamia*.

La asignación de pertenencia pareada (Figura 19), detalla altas probabilidades de pertenencia (considerando que bandas de rojo representan un 100%). Las bandas azules representan los grupos proporcionados por el análisis de hibridación que para este caso son consistentes (bandas azules dentro de los rectángulos rojos) exceptuando las bandas amarillas de individuos de la población 5 de *Z. splendens* en Huimanguillo que muestra mezcla con *Z. splendens* Veracruz y Selva El Ocote en Chiapas y con individuos de San Fernando pertenecientes a *Z. katzeriana*. El mismo caso se presenta en las poblaciones de Huimanguillo y Salto de Agua de *Z. splendens* que muestran individuos con posible mezcla genética.

Discusión

Los análisis de selección realizados a los loci estudiados, muestran que, aun cuando no presentaron indicios de selección positiva, la mayoría de éstos se encuentran bajo una selección balanceadora y los análisis se realizaron considerando y excluyendo dichos loci para comprobar si tenían efecto directo sobre los niveles de polimorfismo y la diversidad de alelos en las poblaciones analizadas. La mayoría de los estudios genéticos de poblaciones de cícadas se han reportado valores de F_{ST} altos entre las poblaciones y una baja diferenciación intrapoblacional (Walters y Decker- Walters, 1991, Yang y Meerow, 1996, Lin *et al.* 2000, Huang *et al.* 2004, Cibrán-Jaramillo *et al.* 2010). Es posible que el alto número de loci bajo selección balanceadora, sea la causa de la variación intrapoblacional para las 10 poblaciones analizadas (valores elevados), lo que se ve reflejado en el 44 % de la varianza molecular atribuida a diferencias entre los individuos de las poblaciones analizadas de *Zamia*, y considerando que los valores de F (0.48) indican los niveles altos de endogamia debido a la variación dentro de los individuos (F_{IS} = 0.46 SD:0.07), queda evidenciada la carencia de heterocigotos, algo que es muy común en microsatélites (Selkoe y Toonen, 2006; Hedrick, 2011), pero no similar a lo encontrado en *Z. pumila* (Salas-Leiva *et al.* 2017) cuyas poblaciones analizadas en Bahamas presentaron valores de 0.03-0.11 para F como resultado de un posible “barrido selectivo” en poblaciones costeras que presentan divergencias morfológicas y ecológicas, de la misma forma que ocurrió con *Z. erosa* (Meerow *et al.* 2012b). Nuestros valores contrastan con los bajos niveles de Heterocigosidad reportados para algunas poblaciones de *Zamia* en el Caribe, Walters y Decker - Walters (1991) informaron Heterocigosidad observada de sólo 0.05 (para este estudio H_O =0.57). Ellstrand y colaboradores (1990) encontraron que la Heterocigosidad total entre *Macrozamia* en Australia fue de 0.08 muy por debajo de los valores encontrados entre *Z. splendens*, *Z. katzeriana* y *Z. loddigesii*.

De acuerdo con la teoría neutral, los niveles altos de heterocigosis, pueden ser causados por tasas de mutación o tamaños efectivos muy elevados (461.93 en MIGRATE Software) (Kimura 1968, Small *et al.* 2007). Los bajos valores de

heterocigosidad se han atribuido a hábitat destruidos o que las poblaciones se encuentren reducidas por amenazas antropogénicas, lo que trae consigo intercambio de genes entre las especies que se distribuyen en zonas de transición y con ello el aumento de la endogamia; Pérez-Farrera y colaboradores (2016) reportan que las tres especies de *Zamia* consideradas en este estudio, se distribuyen principalmente en zonas conservadas, los individuos de *Z. splendens* en Selva Tropical Perennifolia y algunas áreas que bordean el bosque de *Quercus*; este último ambiente representa el hábitat de *Z. loddigesii*. La áreas de contacto entre estos dos ambientes, reconocidos como Bosques secundarios o zonas de sucesión, posiblemente han propiciado la colonización de individuos de *Z. katzeriana*, y son precisamente las localidades de esta especie, las que poseen los valores más altos de Heterocigosidad y valores de Nm de 0.83 a 2.72 entre ellas y con el resto de las poblaciones, además de una diferenciación baja con respecto a poblaciones de *Z. splendens* (0.18). Es entonces, la carencia de heterocigotos, la causa principal de la reducida variación entre grupos de especies y la alta estructura poblacional atribuida a la moderada diferenciación entre ellas (F_{ST} para AMOVA=0.22) considerando que niveles de F_{ST} cercanos a 0 indican que no hay divergencia genética, dejando entonces abierta la consideración de que *Z. katzeriana* aún no puede diferenciarse genéticamente de los posibles progenitores, sustentando así la hipótesis central del trabajo que considera a esta especie, resultante de la hibridación entre *Z. splendens* y *Z. loddigesii*.

La reciente colonización de poblaciones de *Z. katzeriana* a lo largo de la distribución de las otras dos especies, o la posible conexión ecológica entre las poblaciones geográficamente cercanas, es probablemente resultado del intercambio constante de individuos entre dichas poblaciones, considerando que, ya se ha reportado este fenómeno en cícadas. González-Astorga *et al.* (2006) reportaron 1.60 migrantes entre las poblaciones de *Z. loddigesii*. El intercambio genético entre los individuos de las especies de *Zamia* analizadas en este estudio, podría considerarse el necesario para evitar que las poblaciones se aislen (diferenciación local), favoreciendo así a la diversidad genética, reduciendo el impacto de la deriva genética.

El número de alelos privados en las poblaciones fue mayor a 1 en dos poblaciones; individuos de *Z. splendens* en Tapijulapa, Tabasco (1.08) y en San Fernando, Chiapas (*Z. katzeriana*) (1.10), y que por ser los valores bajos no hay evidencia de que tengan alguna significancia sobre las poblaciones. Meerow *et al.* (2012a), encontraron alta frecuencia de alelos privados (10 – 20 %) y un alto número de ellos (13) en *Z. erosa*, con posible importancia adaptativa representando signos de “barrido selectivo” dentro de la población.

El coeficiente de endogamia estimado para las 10 poblaciones analizadas (0.482), es similar al reportado por Cibrián-Jaramillo (2010) para *Cycas micronesica* una especie endémica de Guam con alta estructura genética entre poblaciones pero baja conectividad entre ellas debido a niveles altos de endogamia con variación dentro de los individuos (0.315).

Zamia katzeriana se encuentra distribuida en un clúster con *Z. splendens* en Selva El Ocote y en otro con *Z. loddigesii* en el municipio de San Fernando, Chiapas. Este último considerado como el sitio de origen de retrocruzamiento entre las especies *Z. loddigesii* y *Z. splendens* por Pérez-Farrera *et al.* (2016); sin embargo el estudio no incluyó colectas en la zona de La Selva El Ocote; localidad que se ha identificado como posible zona de introgresión entre las especies progenitoras putativas y que posee tipos de vegetación que facilitan el establecimiento de *Z. katzeriana*, lo que comprueba que las zonas de transición (ecotonos) actúan como determinantes en la variación de las especies (Limón *et al.* 2016), en donde los individuos localizados en los extremos de las distribuciones de *Z. prasina* y *Z. loddigesii* no pudieron distinguirse morfológicamente y son considerados como especies distintas a las estudiadas.

Considerando que las especie del género *Zamia* se distribuyen generalmente en bosques primarios con poca perturbación, y aunque en tiempos recientes han expandido su distribución en zonas de vegetación secundaria (Nicolalde-Morejón, *et al.* 2011), o bien son poblaciones relictas como resultando de la destrucción de su hábitat

primario (debido principalmente al tallo subterráneo que poseen) (Vovides, comentarios personales), han dado origen entonces, a la mezcla entre ellas.

La localidad de San Fernando, Chiapas; mostró niveles promedio de todos los parámetros analizados. Las poblaciones genéticamente más distintas son *Z. loddigesii* en Selva El Ocote y *Z. splendens* en Salto de Agua, Chiapas con valores de diferenciación moderadamente altos ($F_{ST} = 0.34, 0.35$ este último en el análisis sin los loci sujetos a selección balanceadora) y un número de migrantes menor a 1 (0.05) lo que indica que el intercambio de individuos entre las poblaciones se ve sesgado principalmente por la distancia entre ellas, y que la deriva génica puede probablemente estar actuando de manera independiente en cada población.

En total, se encontraron 52 individuos con ancestría mixta. Los bajos niveles de hibridación entre las poblaciones de acuerdo al número de individuos considerados con ancestría mixta (25 % del total de la muestra analizada) sugieren que la zona “híbrida” (Selva El Ocote) presenta alelos que pueden incorporarse rápidamente a las poblaciones considerando que el valor de F para esta localidad fue de 0.51, incrementando así la homogeneización entre ellas (0.33 alelos privados con respecto al resto de las localidades). La localidad de Selva El Ocote, ha sido reconocida como zona de mezcla, considerando que los genotipos intercambiados son más parecidos a *Z. splendens* que a *Z. loddigesii*; por lo que se considera que es la introgresión generada por la hibridación entre las especies, facilitada mezcla genética con *Z. splendens*; esto como resultado de un reciente entrecruzamiento (si tomamos en cuenta los niveles de diferenciación moderados y un número de migrantes constante).

Conclusiones

El intercambio entre los individuos de las poblaciones de *Z. katzeriana*, *Z. splendens* y *Z. loddigesii* ha propiciado que las poblaciones no presenten diferenciación local (valores de flujo genético mayor a 1), y se vea favorecida la variación genética entre ellos, principalmente entre individuos de *Z. katzeriana* y *Z. splendens*.

Los análisis de clústeres posibles en STRUCTURE identifican a los posibles híbridos o individuos resultantes del retrocruzamiento entre *Z. loddigesii* y *Z. splendens* explicando así la moderada estructura poblacional e identificando que la variación está determinada por los individuos. Esto considerando que las zonas de solapamiento entre los progenitores putativos funcionan como zonas híbridas, por lo que es posible que puedan contener individuos híbridos de retrocruzamiento, que se espera correspondan a los individuos de *Z. katzeriana*.

Las pruebas que se realizaron excluyendo a los loci bajo selección balanceadora representan valores similares en cuanto a diferenciación genética, sin embargo, la definición de grupos genéticos estimados por STRUCTURE da lugar a una estimación más aproximada del agrupamiento entre los individuos de *Z. splendens* y *Z. katzeriana*, indicando probablemente la forma en cómo los genotipos compartidos, se están conservando y/o adquiriendo mayores similitudes morfológicas y genéticas con éste último progenitor putativo, al agruparse en su mayoría con individuos de *Z. splendens* en las localidades en las que se observa solapamiento de distribución.

Literatura Citada

- Addison JA, Hart MW (2005)** Colonization, dispersal and hybridization influence phylogeography of North Atlantic sea urchins (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Evolution*. **59**, 532-543.
- Applied Biosystems (2005)** GeneMapper® Software Version 4.1 Getting Started Guides for microsatellite analysis (PN 4403672)
- Chase M, Kesseli R, Bawa K (1996)** Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. *American Journal of Botany* **83**, 51–57.
- Cibrián-Jaramillo A, Daly AC, Brenner ED, DeSalle R, Marler, TE (2010)** When North and South don't mix: genetic connectivity of a recently endangered oceanic cycad, *Cycas micronesica*, in Guam using EST-microsatellites. *Molecular Ecology*, **19**, 2364–2379.
- Earl DA, VonHoldt BM (2012)** STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing. STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. **4**, (2) 359-361.
- Ellstrand N, Ornduff R, Clegg JM (1990)** Genetic structure of the Australian cycad, *Macrozamia communis* (Zamiaceae). *American Journal of Botany*. **77**, 677–681.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005)** Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**, 2611–2620.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005)** Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47–50.

- Foll M, Gaggiotti OE (2008)** A genome scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: A Bayesian perspective. *Genetics* **180**, 977-993.
- Gillespie J (1998)** Population Genetics: A concise guide. Johns Hopkins University Press, United States of America, 169 pp.
- González-Astorga J, Vovides AP, Aguilar PO, Fey DA, Nicolalde-Morejón F, Iglesias C (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.
- Hedrick P (2011)** Genetics of populations, 2nd ed. Jonas and Bartlett, Sudbury, Massachusetts, USA
- Hoskin CJ, Higgie M, McDonald KR, Moritz C (2005)** Reinforcement drives rapid allopatric speciation. *Nature*, 437, 1353–1356.
- Huang S, Hsieh HT, Fang K, Chiang YC (2004)** Patterns of genetic variation and demography of *Cycas taitungensis* in Taiwan. *The Botanical Review*, **70**, 86–92.
- Jones CJ, Edwards K, Castaglione S, Windfield M, Sala F, Van de Wiel C, Bredemeijer G, Vosman B, Mathes M, Daly A, Brettschneider R, Bettini P, Buiatti M, Maestri E, Malcevski A, Marmioli N, Aert R, Volckaert G, Rueda J, Linacero R, Vásquez A, Karp A (1997)** Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* **3**, 381–390.
- Kimura M (1968)**. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, **217(17)**: 624-626.
- Limón SF (2009)** Genética de Poblaciones de *Zamia furfuracea* L. f. (Zamiaceae); una cícada endémica al estado de Veracruz, México. Tesis de licenciatura, Universidad Veracruzana, México

- Lin TP, Sun YC, Lo HC, Cheng YP (2000)** Low genetic diversity of *Cycas taitungensis* (Cycadaceae), an endemic species in Taiwan, revealed by allozyme analysis. *Taiwan Journal Forest Science* **15**, 13–19.
- Meerow A, Nakamura K (2007)** Ten microsatellite loci from *Zamia integrifolia* (Zamiaceae). *Molecular Ecology Notes*. **7**, 824-826.
- Meerow AW, Francisco-Ortega J, Calonje M, Griffith MP, Ayala-Silva T, Stevenson DW, Nakamura K (2012a)** *Zamia* (Cycadales: Zamiaceae) on Puerto Rico: asymmetric genetic differentiation and the hypothesis of multiple introductions. *American Journal of Botany*, **99(11)**, 1828-1839.
- Meerow A, Francisco-Ortega J, Ayala-Silva T, Stevenson D, Nakamura K, Osborne R, Blake TAS (2012b)** Population genetics of *Zamia* in Puerto Rico, a study with ten SSR loci. In *Proceedings of Cycad 2008*. The 8th International Conference on Cycad Biology, Panama City, Panama, 13-15 January 2008. (pp. 204-223). *New York Botanical Garden Press*.
- Moretti A, Caputo P, Gaudio L, Stevenson DW (1991)** Intraspecific chromosome variation in *Zamia* (Zamiaceae, Cycadales). *Caryologia*. **44**, 1-10.
- Morgante M, Olivieri AM (1993)** PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal* **3**, 175–182.
- Nicolalde-Morejón F, Vovides AP, Stevenson D, Sosa V (2008)** The identity of *Zamia katzeriana* and *Z. verschaffeltii* (Zamiaceae). *Brittonia*, **60(1)**, 38-48.
- Nicolalde-Morejón F, Vergara-Silva F, González-Astorga J, Vovides AP (2011)** Perspectivas Sistemáticas de *Zamia* (Zamiaceae) en Megaméxico: de la taxonomía alfa a los códigos de barras genéticos. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. **82**, 341-355

- Nora S, Albaladejo RG, González-Martínez SC, Robledo-Arnuncio JJ, Aparicio A (2011).** Movimiento de genes (polen y semillas) en poblaciones fragmentadas de plantas. *Ecosistemas* **20(2-3)**:35-45.
- Norstog KJ, Nicholls TJ (1997)** *The biology of the cycads*. Cornell University Press, Ithaca.
- Peakall R, Smouse PE (2006)** GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**, 288–295.
- Pérez-Farrera MA, Vovides AP, Ruiz-Castillejos C, Galicia S, Cibrián-Jaramillo A, López S (2016)** Anatomy and morphology suggest a hybrid origin of *Zamia katzeriana* (Zamiaceae). *Phytotaxa* **270 (3)**, 161-181.
- Podani J, Miklos I (2002)** Resemblance coefficients and the horseshoe effect in principal coordinates analysis. *Ecology*, **83(12)**, 3331-3343.
- Powell Y, Machray GC, Provan JA (1996)** Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science* **1**, 215–222.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000)** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945–959.
- Pritchard VL, Jones K, Cowley D (2007)** Estimation of introgression in cutthroat trout populations using microsatellites. *Conservation Genetics* **8**, 1311–1329.
- Rousset F (2008)** Genepop'007: A complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**: 103-106.
- R Development Core Team (2011)** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- Russell JR, Fuller JD, Macaulay M, Hatz BG, Jahoor A, Powell W, Waugh R (1997)** Direct comparison of levels of genetic variation among barely accessions

detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theoretical and Applied Genetics* **95** (4), 714–722.

Salas-Leiva DE, Meerow AW, Calonje M, Francisco-Ortega J, Griffith MP, Nakamura K, Sánchez V, Knowles L, Knowles D (2017) Shifting quaternary migration patterns in the Bahamian archipiélago: Evidence from the *Zamia pumila* complex at the northern limits of the Caribbean island biodiversity hotspot. *American Journal of Botany*. **104**(5), 757-771.

Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*. **9**, 615-629.

Slatkin M, Excoffier L (1996) Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the EM algorithm. *Heredity* **76**, 377–383.

Small KS, Brudno M, Hill MM, Sidow A (2007) Extreme genomic variation in a natural population. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 5698-5703.

Soltis PS, Soltis DE (2009) The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology* **60**, 561-588.

Valadéz ME, Kahl G (2000) Huellas de ADN en Genomas de Plantas (Teoría Protocolos de Laboratorio). Editorial MUNDI-PRENSA. 147 pp.

Vovides AP, Olivares M (1996) Karyotype polymorphism in the cycad *Zamia loddigesii* (Zamiaceae) of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Botanical Journal of the Linnean Society* **120**, 77–83.

Walters T, Decker-Walters D (1991) Patterns of allozyme diversity in the West Indian cycad *Zamia pumila* (Zamiaceae). *American Journal of Botany*. **78**, 436–449.

Wright S (1965) The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* **19**, 395–420.

Yang SL, Meerow AW (1996) The *Cycas pectinata* (Cycadaceae) complex: genetic structure and gene flow. *International Journal of Plant Sciences* **157**, 468–483.

Zhang D, Hewitt CM (2003) Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology* **12**, 563–584

Anexos

Anexo I. Valores de q para Modelos de selección en BayeScan. Valores en negrita representan los valores atípicos en la gráfica.

| Locus | Valor de q | Selección |
|-------|--------------|---------------|
| 1 | 0.26 | Neutral |
| 2 | 0.656 | Neutral |
| 3 | 0.78 | Neutral |
| 4 | 0.58 | De equilibrio |
| 5 | 0.80 | De equilibrio |
| 6 | 0.75 | Neutral |
| 7 | 0.71 | De equilibrio |
| 8 | 0.19 | De equilibrio |
| 9 | 0.83 | Neutral |
| 10 | 0.56 | De equilibrio |
| 11 | 0.82 | De equilibrio |
| 12 | 0.84 | De equilibrio |

Anexo II. Método de extracción de ADN por el método de CTAB.

Día 1.

Maceración de la muestra: Tomar un trozo de hoja de aproximadamente 1.5 x 1.5 cm y cortar en pedazos pequeños e introducirlos en un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml de capacidad. Agregar 50 μ l de Buffer CTAB. Macerar las muestras hasta obtener una pasta consistente. Agregar 650 μ l de Buffer CTAB para cada tubo. Agitar en el vortex 20 segundos. Centrifugar 1 min a 16 000 revoluciones por minuto (rpm). Incubar a 65 °C 18 horas.

Día 2.

Lavados con cloroformo y precipitación.

Agregar 1 μ l de RNAasa (10 mg/ml) y dejar reposar en baño maría por una hora media a 37 ° C. Centrifugar las muestras durante 5 minutos a 16 000 rpm. Tomar la mayor cantidad de sobrenadante y pasar a un set de tubos nuevos etiquetados. Añadir 500 μ l de cloroformo a cada tubo. Vortex por 20 segundos. Centrifugar los tubos por 5 minutos

a 16 000 rpm. Extraer 400 µl de la solución de la capa superior del tubo. Agregar este sobrenadante a la segunda serie de tubos etiquetados añadir 400 µl de cloroformo a cada tubo. Agitar. Centrifugar los tubos durante 10 minutos a 16 000 rpm. Extraer 250 µl de la solución de la capa superior del tubo. Agregarlo al tercer set de tubos etiquetados y añadir 148.7 µl de Isopropanol 20.4 µl de Acetato de Amonio a 7.5 M a cada tubo Centrifugar durante 10 minutos a 16 000 rpm. Decantar. Agregar 1000 µl de etanol al 70% a cada tubo. Invertir cuidadosamente el tubo de 2 a 3 veces. Dejar reposar el tubo por 10 minutos.

Secado del 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. Dejar evaporar alcohol por 12 horas.

Día 3.

Reconstitución del botón: Agregar 50 µl de Agua estéril a cada tubo. Incubar en baño maría o baño seco a 65 °C por 20 minutos. Centrifugar a 16 000 rpm por unos segundos.

Anexo III. Frecuencias alélicas de 12 loci utilizados para evaluar la diversidad genética de *Z. splendens*, *Z. loddigesii* y *Z. katzeriana*.

| | Alelo/Tamaño | <i>Z. splendens</i> | <i>Z. loddigesii</i> | <i>Z. katzeriana</i> |
|---------------|--------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| ZAM 05 | 138 | 0.0339 | 0.0307 | 0 |
| | 142 | 0.13559 | 0.02632 | 0 |
| | 144 | 0 | 0.03509 | 0 |
| | 148 | 0.04237 | 0.11404 | 0.11429 |
| | 152 | 0.00847 | 0 | 0 |
| | 160 | 0.21186 | 0.10526 | 0.74286 |
| | 162 | 0 | 0.02193 | 0 |
| | 164 | 0.0339 | 0.13596 | 0 |
| | 166 | 0.05085 | 0.24123 | 0 |
| | 170 | 0.00847 | 0 | 0 |
| | 172 | 0 | 0.03947 | 0 |
| | 174 | 0 | 0.01316 | 0 |
| | 176 | 0 | 0.01316 | 0 |
| | 178 | 0 | 0.01754 | 0 |
| | 184 | 0 | 0.01754 | 0.12857 |
| | 204 | 0.01695 | 0 | 0 |
| 234 | 0 | 0 | 0.01429 | |
| ZAM 16 | 161 | 0.08475 | 0.12281 | 0.31429 |
| | 163 | 0 | 0 | 0.04286 |
| | 165 | 0 | 0 | 0.01429 |
| | 177 | 0 | 0 | 0.01429 |
| | 179 | 0 | 0.04386 | 0.3 |
| | 181 | 0.00847 | 0 | 0.01429 |
| | 187 | 0.07627 | 0 | 0 |
| | 193 | 0 | 0.00877 | 0 |
| | 195 | 0.02542 | 0 | 0 |
| | 197 | 0.05932 | 0.00439 | 0 |
| | 199 | 0.00847 | 0.00439 | 0 |
| | 203 | 0.00847 | 0.00439 | 0 |
| | 205 | 0.18644 | 0.02632 | 0 |
| | 207 | 0.18644 | 0.17105 | 0.02857 |
| 209 | 0.13559 | 0.11842 | 0 | |
| 211 | 0.01695 | 0.08772 | 0 | |

| | | | | |
|---------------|-----|---------|---------|---------|
| ZAM 16 | 215 | 0.00847 | 0.02193 | 0 |
| | 217 | 0.00847 | 0 | 0 |
| | 225 | 0.04237 | 0 | 0 |
| | 227 | 0.0339 | 0 | 0 |
| | 231 | 0 | 0 | 0.05714 |
| | 233 | 0.00847 | 0 | 0 |
| | 237 | 0.01695 | 0 | 0.14286 |
| ZAM 28 | 151 | 0 | 0.00439 | 0.04286 |
| | 159 | 0 | 0.01316 | 0 |
| | 165 | 0 | 0 | 0.15714 |
| | 169 | 0.07627 | 0.01754 | 0.17143 |
| | 171 | 0 | 0.13158 | 0.11429 |
| | 173 | 0 | 0.00439 | 0 |
| | 187 | 0.05085 | 0.02193 | 0.05714 |
| | 191 | 0 | 0 | 0.02857 |
| | 197 | 0.01695 | 0 | 0 |
| | 201 | 0.16949 | 0.00439 | 0 |
| | 205 | 0.23729 | 0.14912 | 0.17143 |
| | 207 | 0.24576 | 0.01754 | 0.1 |
| | 209 | 0.09322 | 0.04386 | 0 |
| | 211 | 0.04237 | 0.03947 | 0.01429 |
| ZAM29 | 159 | 0.9322 | 0.85088 | 0.98571 |
| | 196 | 0 | 0.00877 | 0.01429 |
| | 201 | 0 | 0.00877 | 0 |
| ZAM 32 | 125 | 0 | 0 | 0.01429 |
| | 127 | 0.01695 | 0 | 0 |
| | 129 | 0.00847 | 0.01316 | 0 |
| | 131 | 0.00847 | 0.03509 | 0 |
| | 133 | 0.01695 | 0 | 0 |
| | 135 | 0.0339 | 0.02193 | 0.14286 |
| | 137 | 0.08475 | 0.10965 | 0.34286 |
| | 139 | 0.02542 | 0.02632 | 0.01429 |
| | 141 | 0.62712 | 0.32018 | 0.15714 |
| | 143 | 0 | 0.00877 | 0.02857 |
| | 145 | 0 | 0 | 0.01429 |
| | 149 | 0.00847 | 0.02193 | 0.01429 |
| | 151 | 0 | 0 | 0.01429 |

| | | | | |
|---------------|-----|---------|---------|---------|
| ZAM 32 | 161 | 0.05932 | 0.22807 | 0 |
| | 163 | 0.04237 | 0.05702 | 0 |
| ZAM 35 | 42 | 0 | 0 | 0.02857 |
| | 60 | 0 | 0 | 0.01429 |
| | 62 | 0 | 0 | 0.02857 |
| | 66 | 0 | 0 | 0.24286 |
| | 68 | 0 | 0 | 0.11429 |
| | 70 | 0 | 0.00877 | 0 |
| | 74 | 0 | 0.01316 | 0 |
| | 76 | 0 | 0 | 0.1 |
| | 78 | 0 | 0.01316 | 0 |
| | 82 | 0 | 0.20175 | 0.18571 |
| | 84 | 0.00847 | 0.17982 | 0.04286 |
| | 86 | 0 | 0.04386 | 0.01429 |
| | 88 | 0.05932 | 0.12281 | 0.11429 |
| | 90 | 0 | 0.07895 | 0.1 |
| | 92 | 0 | 0.05702 | 0 |
| | 94 | 0 | 0.01316 | 0.01429 |
| | 96 | 0.9322 | 0.21053 | 0 |
| 100 | 0 | 0.00439 | 0 | |
| ZAM 40 | 186 | 0 | 0.00439 | 0 |
| | 190 | 0 | 0.00877 | 0 |
| | 194 | 0.10169 | 0.13596 | 0 |
| | 196 | 0 | 0 | 0.02857 |
| | 202 | 0.21186 | 0.01316 | 0.12857 |
| | 204 | 0.11017 | 0.0307 | 0.31429 |
| | 206 | 0 | 0.00877 | 0.02857 |
| | 208 | 0 | 0.05702 | 0.04286 |
| | 210 | 0 | 0.03509 | 0.07143 |
| | 212 | 0.08475 | 0.08772 | 0.02857 |
| | 214 | 0 | 0.01754 | 0.01429 |
| | 216 | 0 | 0.02193 | 0 |
| | 220 | 0 | 0.24123 | 0.17143 |
| | 222 | 0.14407 | 0.13596 | 0.04286 |
| | 226 | 0.16102 | 0.03509 | 0.04286 |
| 230 | 0 | 0.01754 | 0 | |
| 232 | 0 | 0.01754 | 0.01429 | |

| | | | | |
|---------------|---------|---------|---------|---------|
| ZAM 40 | 234 | 0 | 0 | 0.02857 |
| | 238 | 0 | 0.09649 | 0 |
| | 244 | 0 | 0 | 0.01429 |
| | 248 | 0 | 0.00877 | 0 |
| ZAM 45 | 94 | 0.42373 | 0.46053 | 0.32857 |
| | 96 | 0.01695 | 0.00877 | 0 |
| | 98 | 0 | 0.01754 | 0 |
| | 100 | 0 | 0.00877 | 0 |
| | 108 | 0.00847 | 0 | 0 |
| | 128 | 0 | 0.00439 | 0.01429 |
| | 136 | 0.0339 | 0 | 0 |
| | 138 | 0.01695 | 0.0307 | 0 |
| | 140 | 0.13559 | 0.29825 | 0.24286 |
| | 142 | 0.11864 | 0.10526 | 0.01429 |
| | 144 | 0.00847 | 0.02193 | 0 |
| 158 | 0.23729 | 0.04386 | 0.4 | |
| ZAM 53 | 160 | 0.35593 | 0.29825 | 0 |
| | 164 | 0 | 0 | 0.05714 |
| | 166 | 0.21186 | 0.00877 | 0.05714 |
| | 168 | 0 | 0.16667 | 0.02857 |
| | 174 | 0 | 0 | 0.02857 |
| | 178 | 0 | 0.0307 | 0 |
| | 196 | 0 | 0.00439 | 0 |
| | 208 | 0 | 0.07456 | 0 |
| | 212 | 0.00847 | 0.09211 | 0 |
| | 214 | 0.02542 | 0 | 0.02857 |
| | 216 | 0 | 0.02193 | 0.05714 |
| | 218 | 0 | 0.0307 | 0.05714 |
| | 220 | 0 | 0.00439 | 0.2 |
| | 222 | 0.11017 | 0 | 0.11429 |
| | 224 | 0.00847 | 0.00877 | 0.08571 |
| | 226 | 0 | 0 | 0.02857 |
| | 228 | 0 | 0.02632 | 0.05714 |
| 230 | 0.07627 | 0.01316 | 0.05714 | |
| 232 | 0 | 0.00877 | 0 | |

| | | | | |
|---------------|-----|---------|---------|---------|
| ZAM 58 | 209 | 0.04237 | 0.03509 | 0.07143 |
| | 211 | 0.23729 | 0.39474 | 0.17143 |
| | 213 | 0.64407 | 0.50877 | 0.47143 |
| | 215 | 0.02542 | 0.02632 | 0.18571 |
| | 217 | 0 | 0 | 0.04286 |
| | 219 | 0 | 0 | 0.04286 |
| | 229 | 0 | 0 | 0.01429 |

| | | | | |
|---------------|-----|---------|---------|---------|
| ZAM 60 | 152 | 0 | 0.00439 | 0 |
| | 158 | 0 | 0.00439 | 0 |
| | 160 | 0 | 0.00439 | 0.02857 |
| | 162 | 0 | 0 | 0.2 |
| | 176 | 0 | 0.00877 | 0 |
| | 192 | 0 | 0.01754 | 0 |
| | 194 | 0 | 0.02632 | 0 |
| | 198 | 0.08475 | 0.02193 | 0 |
| | 200 | 0.0339 | 0.02632 | 0.05714 |
| | 202 | 0.11017 | 0.22807 | 0.24286 |
| | 204 | 0.11864 | 0.48684 | 0.14286 |
| | 206 | 0.11864 | 0.04825 | 0.02857 |
| | 208 | 0.45763 | 0.0307 | 0.02857 |
| | 210 | 0.01695 | 0.02193 | 0.2 |
| | 212 | 0.01695 | 0.02632 | 0 |
| | 214 | 0 | 0.0307 | 0 |
| | 216 | 0 | 0 | 0.01429 |
| | 218 | 0.04237 | 0 | 0.02857 |
| 220 | 0 | 0 | 0.02857 | |

| | | | | |
|---------------|-----|---------|---------|---------|
| ZAM 62 | 144 | 0 | 0.02632 | 0.02857 |
| | 162 | 0.01695 | 0 | 0 |
| | 164 | 0.29661 | 0.25 | 0.11429 |
| | 166 | 0.33898 | 0.22807 | 0.11429 |
| | 168 | 0 | 0.04825 | 0.05714 |
| | 170 | 0 | 0.03509 | 0.1 |
| | 174 | 0.12712 | 0.12281 | 0.11429 |
| | 176 | 0.01695 | 0.0307 | 0.08571 |
| | 178 | 0.00847 | 0.01754 | 0.05714 |
| | 180 | 0 | 0.01316 | 0 |

| | | | | |
|---------------|-----|---------|---------|---------|
| ZAM 62 | 182 | 0.01695 | 0 | 0 |
| | 184 | 0 | 0.00439 | 0 |
| | 186 | 0.01695 | 0.00877 | 0 |
| | 202 | 0 | 0.00439 | 0 |
| | 204 | 0 | 0 | 0.02857 |
| | 208 | 0 | 0.00877 | 0 |
| | 212 | 0 | 0.00877 | 0 |
| | 214 | 0.01695 | 0.00439 | 0.02857 |

Capítulo III

Discusiones y conclusiones generales.

Pérez-Farrera et al. (2016) concluyeron que existen similitudes anatómicas y morfológicas entre *Z. splendens* y *Z. katzeriana* y debido a la distribución de esta última en las zonas que ocupan las poblaciones de *Z. loddigesii* en el estado de Chiapas, se puede considerar que esta zona es potencialmente un lugar de simpatría para varias especies vegetales, pues hay registros de hibridación en la zona de San Fernando, Chiapas (Croat, 1983; Hodel, 1992) la cual resultó la localidad con indicios de hibridación para ese estudio y como se mencionó anteriormente; son las zonas de contacto las más propicias para el intercambio genético pues los genotipos se ven afectados directamente por la homogeneidad del ambiente (Limón et al. 2016).

Se ha considerado a la introgresión como el fenómeno que facilita el intercambio de variación potencialmente adaptativa entre individuos y poblaciones en contacto (Rieseberg y Soltis, 1991; Baack y Rieseberg, 2007); siendo este el principal objetivo de nuestro trabajo al pretender estimar la hibridación como fenómeno potencial en tres especies de *Zamia*. La variación genética individual influye directamente sobre la poblacional favoreciendo a procesos de hibridación, retrocruzamiento y una introgresión que a largo plazo pueda permitir diferencias a las poblaciones y con ello aumentar la diversidad de las especies. De ahí, la importancia de haber analizado los niveles de variación intrapoblacional en *Z. splendens*, *Z. loddigesii* y *Z. katzeriana* para estimar el intercambio entre sus poblaciones y comprobar si *Z. katzeriana* es una especie resultante de esta variación.

De acuerdo a los valores de la prueba de neutralidad, los loci indican que las poblaciones deberían de estar siendo beneficiadas en un aumento de heterocigotos, pues si la selección de equilibrio se fundamenta en un favorecimiento de ambos extremos de la variación, sin embargo, es probable que el tiempo aun no sea suficiente para el establecimiento de nuevos alelos en la población; dando como resultado los patrones endogámicos obtenidos ($H_E=0.76$, $H_O=0.56$), lo que se explica al excluir del

análisis a los loci que no están bajo selección balanceadora, por lo que es posible que una selección ecológica, es decir; que el entorno mediante cualquier componente ecológico, esté favoreciendo la interacción (la utilización de espacios físicos, la explotación de recursos tróficos o las adaptaciones para optimizar la evasión de depredadores , entre las más importantes) (Nosil, 2012), y actúe sobre las poblaciones manteniendo así, caracteres compartidos entre las especies (baja diferenciación tanto morfológica como genética).

La dirección de la hibridación, puede deducirse de la presencia y la frecuencia de individuos con características intermedias y utilizando las herramientas moleculares, pues se puede estimar si los genotipos son compartidos de forma equitativa o son más similares a una de las especies parentales, en este caso; el número de individuos calculados con ancestría mixta basándonos en las probabilidades de pertenencia a un grupo, se considera a *Z. katzeriana* como resultado de la introgresión o mezcla con poblaciones de *Z. splendens*.

Zamia loddigesii y *Z. katzeriana* son especies que coexisten en la simpatria, por lo que los caracteres morfológicos han funcionado en este estudio, como herramientas útiles en la distinción de los grupos, sin asumir que la plasticidad esté actuando sobre ellos, si no; que la expresión genética es la suficiente para diferenciar a los grupos parentales de los posibles híbridos y establecer así las distribuciones potenciales. La exclusión de los loci bajo selección balanceadora, se realizó para eliminar la premisa de que ésta influye directamente sobre los individuos y no sobre las poblaciones, dando lugar así al flujo génico moderado y con ello interpretar que las poblaciones se estén comportando como un sola. Al excluir dichos loci del análisis, nos aseguramos de que la variación intrapoblacional es el resultado del intercambio de alelos en las poblaciones y no de una selección que beneficie directamente a los individuos, lo que restaría credibilidad a los porcentajes de frecuencias alélicas obtenidos.

El análisis global en relación al Equilibrio Hardy-Weinberg muestra que ninguna de las poblaciones presentan diferencias significativas ($p= 0.05$) por lo que no se

encuentran en equilibrio, lo que podría traducirse como un efecto indirecto sobre los niveles bajos de endogamia ($F_{ST}= 0.38$), si consideramos que un F_{ST} cercano a 1 es el equivalente a la diferenciación completa de las especies), siendo la población de *Z. katzeriana* en la localidad de La Selva El Ocote la que presenta los valores más altos de H_E (0.69) indicándonos que las poblaciones están iniciando un proceso de diferenciación que no ha permitido que la diversidad alélica supere las frecuencias alélicas ya establecidos, lo que se ve reflejado en los valores obtenidos de F_{ST} y R_{ST} (sin diferencias significativas entre las localidades analizadas de las tres especies), lo que podría indicarnos que los alelos más relacionados no se encuentran dentro de cada población estudiada, sino entre los individuos de todas las localidades y que los alelos que estos poseen, no están contribuyendo a la diferenciación genética.

La moderada estructura genética encontrada entre las 10 localidades analizadas, es probablemente resultado del retrocruzamiento entre las especies progenitoras putativas y *Z. katzeriana*, sin embargo; se necesitan más estudios sobre el papel de los procesos ambientales e intrínsecos que puedan afectar directa e indirectamente a la aptitud híbrida, lo que proporcionaría la evidencia completa de nuestras conclusiones.

Considerando las recomendaciones de Walters y colaboradores (2004) sobre la conceptualizando y reconocimiento de especies en cícadras, podemos entonces proponer que *Z. katzeriana* es una especie de reciente origen y probablemente resultado de la hibridación entre *Z. loddigesii* y *Z. splendens* de acuerdo a los resultados intrapoblaciones (que nos permiten estimar la baja diferenciación entre las especies) para así proponer, que la mezcla entre los individuos, el flujo génico entre ellas y la conexión geográfica y ecológica existente entre las localidades; son los factores que han influido en el surgimiento y el establecimiento de *Z. katzeriana* como una nueva especie.

Literatura citada

- Baack EJ, Rieseberg L (2007)** A genomic view of introgression and hybrid speciation. *Current Opinion in Genetics and Development* **17**, 513-518.
- Croat TB (1983)** A revision of the genus *Anthurium* (Araceae) of Mexico and Central America. Part I. México and Middle America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **70**, 211-420.
- Hodel DR (1992)** *Chamaedorea* palms: the species and their cultivation. Allen, Lawrence.
- Limón F, González-Astorga J, Nicolalde-Morejón F, Guevara R (2016)** Phenotypic variation of *Zamia loddigesii* Miq and *Z. prasina*. Bull. (Zamiaceae, Cycadales): the effect of environmental heterogeneity. *Plant Systematics and Evolution*. **302(10)**, 1395-1404.
- Nosil P (2012)** Ecological speciation. Oxford University Press.
- Pérez-Farrera MA, Vovides AP, Ruiz-Castillejos C, Galicia s, Cibrán-Jaramillo A, López S (2016)** Anatomy and morphology suggest a hybrid origin of *Zamia katzeriana* (Zamiaceae). *Phytotaxa* **270 (3)**, 161-181.
- Rieseberg L, Soltis DE (1991)** Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evolutionary Trends in Plants* **5**, 65-84
- Rieseberg L, Wendel JF (1993)** Introgression and its consequences in polyploids. In Harrison RG Eds. Hybrid zones and the evolutionary process, 70-109. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Walters T, Osborne R, Decker-Walters D (2004)** "We hold these truths..." Cycad classification: Concepts and Recommendations. Eds. T. Walters y R. Osborne.