

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA
PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS
AMBIENTALES

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

ESTUDIO PARA LA CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO DE *DIOON EDULE* EN
SAN LUIS POTOSÍ

PRESENTA:

Gabriel Rubio Méndez

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Laura Yáñez Espinosa

CODIRECTOR DE TESIS:

Dr. José Arturo de Nova Vázquez

ASESORES:

Dr. Humberto Reyes Hernández

Dr. Joel Flores Rivas

San Luis Potosí, S. L.P., Agosto de 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

ESTUDIO PARA LA CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO DE *DIOON EDULE* EN SAN LUIS POTOSÍ

PRESENTA:

Gabriel Rubio Méndez

COMITÉ TUTELAR:

DIRECTOR: DRA. LAURA YÁÑEZ ESPINOSA

CODIRECTOR: DR. JOSÉ ARTURO DE NOVA VÁZQUEZ

ASESOR: DR. HUMBERTO REYES HERNÁNDEZ

ASESOR DR. JOEL FLORES RIVAS

SINODALES:

PRESIDENTE: DRA. LAURA YÁÑEZ ESPINOSA

SECRETARIO: DR. JOSÉ ARTURO DE NOVA VÁZQUEZ

VOCAL: DR. CARLOS ALFONSO MUÑOZ ROBLES

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

PROYECTO REALIZADO EN:

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE ZONAS DESÉRTICAS, U. A. S. L. P.

MCGILL UNIVERSITY DEPARTMENT OF PLANT SCIENCE

CON FINANCIAMIENTO DE:

INTER-AMERICAN INSTITUTE FOR COOPERATION ON AGRICULTURE

A TRAVÉS DEL PROYECTO DENOMINADO:

THE CHAMAL, A TOXIC BUT ALSO EDIBLE CYCAD

AGRADEZCO A CONACyT EL OTORGAMIENTO DE LA BECA-TESIS

Becario No. 290685

LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES RECIBE APOYO ATRAVÉS

DEL PROGRAMA NACIONAL DE POSGRADOS DE CALIDAD (PNPC)

DEDICATORIA

A mi familia por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia y en especial a mis padres por su apoyo incondicional durante estos dos años.

A la Dra. Laura Yáñez Espinosa por depositar su confianza en mí para desarrollar la presente Tesis y por su disposición para despejar mis dudas.

Al Dr. José Arturo de Nova Vázquez por su disposición para despejar las dudas que surgían sobre un tema totalmente desconocido para mí.

Al Dr. Humberto Reyes Hernández y Dr. Joel Flores Rivas por disponer de su tiempo para la revisión del presente trabajo.

A la Dra. Jacqueline Bede por permitirme realizar una estancia en su laboratorio de la Universidad McGill.

A Beto Prado por su valiosa ayuda y amistad durante mi estancia en la Universidad McGill y por permitirme participar en su investigación.

A Lalis por toda la paciencia que me tuvo durante estos dos años.

A la Dirección del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas por permitirme realizar la presente tesis

A mis compañeros del PMPCA por los Agradables momentos que pasamos dentro y fuera de las aulas.

A TODOS MUCHAS GRACIAS.....

Contenido

Índice de Figuras	6
Índice de Tablas	7
Resumen.....	8
Abstract	10
1. Introducción	12
2. Antecedentes	14
2.1. Cycadas	14
2.2. El género <i>Dioon</i>	15
2.3. Variación genética en Cycadas.....	18
2.4. Genética de poblaciones.....	20
2.4.1. Marcadores genéticos	21
2.4.1.1. Marcadores proteicos	22
2.4.1.2. Marcadores de ADN.....	22
2.4.1.3. Microsatélites	23
2.4.1.4. Microsatélites fluorescentes	24
3. Hipótesis.....	26
4. Objetivos	26
Objetivo general	26
Objetivos específicos	26
5. Justificación.....	27
6. Materiales y métodos	28
6.1. Área de estudio.....	28
6.2. Colecta de Material	32
6.3. Extracción de ADN	32
6.4. Reacciones PCR.....	32
6.5. Electroforesis.....	33
6.6. Análisis de la variación genética.....	33
6.7. Estructura genética	34
6.8. Análisis de similitud.....	34
6.9. Análisis de las estrategias para la conservación de <i>Dioon edule</i>	36

7. Resultados	36
7.1. Diversidad genética	36
7.2. Estructura genética	40
7.3. Análisis de Clasificación Ascendente Jerárquica (CAJ)	42
8. Discusión.....	45
9. Conclusiones	49
Bibliografía	54
Anexos.....	58
Anexo 1 Modificaciones al protocolo de extracción de ADN DNeasy Plant Mini.....	58
Anexo 2 Protocolo de optimización para los primers propuestos por Moynihan et al (2007)	61
Anexo 3 Frecuencia alélica de tres loci en tres categorías de edad y tres poblaciones de <i>Dioon edule</i>	63
Anexo 4. Variables utilizadas en el análisis CAJ.....	65

Índice de Figuras

Figura 1. Primer Fluorescente: (A,B) los recuadros rayados indican los primer específicos a los microsatélites utilizados; (C) el cuadro ondulado indica la secuencia universal M-13 y la estrella la etiqueta fluorescente FAM: (D) durante los primeros ciclos de la PCR, el primer forward con la etiqueta M-13 se incorpora a los productos PCR; (E) en los ciclos siguientes el primer universal M-13 con la etiqueta FAM se une a la secuencia M-13 del primer forward específico, generando así el producto fluorescente (Shuelke, 2000)	25
Figura 2. Ubicación geográfica de los sitios de estudio de las poblaciones de <i>Dioon edule</i> en San Luis Potosí.	29
Figura 3. Cambio de uso de suelo en Rincón de los Naranjos.	30
Figura 4. Diagramas climáticos para el área de estudio en la sierra Madre Oriental (elaborados con datos obtenidos de CONAGUA http://smn.cna.gob.mx/index2.php?option=com_content&view=article&id=172:san-luis-potosi&catid=14).	30
Figura 5. Frecuencia alélica por categoría de edad de cinco poblaciones de <i>Dioon edule</i> . .	38
Figura 6 Análisis de la estructura poblacional a) por población k=3 (1: Chijol; 2: Rincón; 3: Pocitos; 4: Anteojos; 5: Saucillo) y b) por edades k=3, de 5 poblaciones de <i>Dioon edule</i> (1 adulto; 2 juvenil; 3 plántula), analizadas con tres marcadores microsatélites	41
Figura 7. Dendrograma del análisis de clasificación ascendente jerárquica	42
Figura 8. Perfil de las tres clases incluyendo todas las variables utilizadas	44

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de las cycadas actuales (Stevenson, 1992)	15
Tabla 2. Especies del género <i>Dioon</i> distribuidas en México (Hill, Stevenson, & Osborne, 2007).....	16
Tabla 3. Estudios realizados sobre la genética de poblaciones en cycadas a nivel mundial. N: número de poblaciones estudiadas, A: promedio de alelos por locus, P: porcentaje de loci polimórficos, He: heterocigosis esperada, Gst: diferenciación genética entre poblaciones (Tomado de Limón-Salvador, 2009).....	19
Tabla 4 Variables utilizadas en el Análisis CAJ	35
Tabla 5. Estimadores de la variabilidad genética en tres categorías de edad dentro de cinco poblaciones de <i>Dioon edule</i>	37
Tabla 6. Estimadores de la variabilidad genética en cinco poblaciones de <i>Dioon edule</i>	39
Tabla 7. Índice de diferenciación genética por categoría de edad.....	40
Tabla 8 Índice de diferenciación genética por pares de poblaciones	40
Tabla 9 Descomposición de la variación para la clasificación óptima interclase	43
Tabla 10. Primers utilizados para determinar el polimorfismo en <i>Dioon edule</i>	62

Resumen

La importancia de investigar a la especie *Dioon edule* (Zamiaceae) se puede resumir en tres aspectos: evolutivo, pues al pertenecer a un grupo de plantas monofilético cuyo origen se remonta a 250 millones de años, permite entender las adaptaciones que han desarrollado para sobrevivir a diferentes condiciones ambientales; ecológico, al encontrarse actualmente distribuida en diferentes hábitats; y el cultural pues en el estado de San Luis Potosí, la etnia Xi'iu lo sigue utilizando como alimento y en algunas celebraciones religiosas. Además, esta especie se encuentra catalogada como en peligro de extinción en México (NOM-059-SEMARNAT-2010), debido al deterioro de su hábitat y a la reducción del flujo genético entre las poblaciones. De este modo, al conocer la estructura y diversidad genética de las poblaciones actuales de *Dioon edule* en San Luis Potosí seremos capaces de proponer una estrategia a largo plazo que contribuya a la conservación *in situ* de esta especie. Mediante el uso de marcadores microstélites, se analizaron cinco poblaciones ubicadas en un gradiente latitudinal en la Sierra Madre Oriental teniendo en cuenta la presencia de actividades humanas así como la densidad poblacional. El análisis de los datos obtenidos se realizó utilizando los estadísticos: número de alelos por locus, número efectivo de alelos, frecuencia alélica, heterocigosidad esperada y observada, además se realizaron los análisis de la estructura genética utilizando los estadísticos F de Wright y el software Structure, y un análisis de Clasificación Ascendente Jerárquica para analizar las características demográficas, genéticas y de hábitat de cada población. Los resultados muestran que las poblaciones analizadas presentan un alto índice de fijación alélica así como una heterocigosidad observada muy por debajo de la que se podría esperar en una población con sus características. Este comportamiento probablemente se deba a la expansión de los terrenos agropecuarios y el consecuente aislamiento de las poblaciones de *D. edule*; lo que

está afectando a los individuos jóvenes (<100 años) principalmente, poniendo en riesgo la supervivencia de las poblaciones. No se encontró una estructura definida entre las poblaciones debida a un efecto de amortiguamiento generado por la longevidad de esta especie, mientras que en el caso de las etapas de desarrollo, se detectó una ligera estructura en las categorías adulto y plántula, derivada probablemente de la incidencia de condiciones ambientales adversas durante el establecimiento de estos individuos así como un cuello de botella generado durante las glaciaciones del pleistoceno que afectó a los individuos adultos actuales. El análisis CAJ muestra una mayor similitud en las poblaciones de Antejos, Saucillo y Chijol (grupos 1 y 3) en los que se observa un mayor reclutamiento de plántulas, además de que se encuentran cerca de la Reserva de la Biosfera de Sierra Gorda, favoreciendo la conectividad entre estas poblaciones, el grupo 2 formado por las poblaciones de Pocitos y Rincón de los Naranjos se encuentra dentro de una zona con alta actividad agropecuaria lo que genera que este grupo muestre mayor diferencia con respecto a los otros grupos.

Abstract

The relevance of studying the species *Dioon edule* (Zamiaceae) can be summarized in three aspects: evolutionary, as belonging to a monophyletic group of plants originated 250 million years before, we could understand the adaptations they have developed to survive in different environmental conditions; ecological, as a component of plant communities distributed in different; and cultural, as in the state of San Luis Potosi, Xi'iyu indigenous people use different parts of the plant as food and for ritual ceremonies. In addition, this species is listed as endangered in Mexico (NOM-059-SEMARNAT-2010) due to loss of its habitat and reduced gene flow among populations. Thus, to understand the structure and genetic diversity of current populations of *Dioon edule* in San Luis Potosi, this study will be able to propose a long-term strategy to contribute to conservation *in situ* of this species. Using microsatellite markers, we analyzed five populations located on a latitudinal gradient in the Sierra Madre Oriental, taking into account the presence of human activities and population density. The data analysis was conducted using the statistical: number of alleles per locus, effective number of alleles, allele frequencies, and heterozygosity observed. Further analyses were performed using the genetic structure F statistics, Wright and Structure software, and hierarchical ascendant classification analysis (HAC) to examine the demographic, genetic and habitat of each population. The results showed that the analyzed populations have high allelic fixation index and an observed heterozygosity far below of what would be expected in a population with these features. This behavior could be attributed to the expansion of agricultural land and the consequent isolation of populations of *D. edule*, what is affecting young individuals (< 100 years) mainly, threatening the survival of populations. We found no defined structure between the populations due to a damping effect generated by the longevity of this species, while in the case of the

development stages, a light structure was detected in adult and seedling categories, probably derived from the incidence of adverse environmental conditions during the establishment of these individuals as well as a bottleneck generated during Pleistocene glaciations that affected current adult individuals. HAC analysis showed greater similarity in populations of Antejos, Saucillo and Chijol (groups 1 and 3) in which there is increased recruitment of seedlings, and in addition they are located near the Biosphere Reserve of Sierra Gorda, favoring connectivity between these populations. The populations group 2 consisting of Pocitos and Rincon de los Naranjos, is located in an area with greater agricultural activities, resulting in greater difference of this group from groups 1 and 3.

1. Introducción

México cuenta con una gran diversidad de especies, ecosistemas y comunidades que lo ha llevado a ser considerado como un país megadiverso, esto como resultado en gran medida de la compleja topografía del territorio y la posición de nuestro país en el continente que permite convergencia de diversos climas y confluyen las dos grandes regiones biogeográficas de América: el Neártico y el Neotrópico, lo que origina condiciones de transición de la flora y fauna templada y tropical (CONABIO, 2010).

Sin embargo, esta biodiversidad enfrenta una serie de riesgos que ponen en peligro la continuidad de las especies y sus poblaciones, entre las que destacan las actividades humanas, pues se han transformado la mayor parte de los ecosistemas en campos de cultivo (Allendorf & Luikart, 2007), afectando a la biodiversidad en tres niveles: ecosistemas, especies y genes. La diversidad genética es uno de los tres tipos de biodiversidad reconocidas por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), y juega un papel muy importante en las relaciones entre especies, de tal modo que la extinción de las especies está influenciada hasta cierto punto por factores genéticos, así, la estocasticidad del entrecruzamiento puede generar pérdida de variación genética mediante deriva génica en poblaciones pequeñas, además, la endogamia también se presenta en poblaciones pequeñas reduciendo la fecundidad y viabilidad de los individuos (Allendorf & Luikart, 2007; CONABIO, 2010).

A pesar de que la discusión acerca de si se deben considerar o no los factores genéticos en las predicciones demográficas sobre la persistencia de las poblaciones ha sido inconsistente (Allendorf & Luikart, 2007), es importante determinar bajo qué condiciones influyen los factores genéticos en la persistencia de las especies, además es necesario identificar los

casos en los que las estrategias de manejo basadas en consideraciones genéticas y las basadas en consideraciones demográficas están en conflicto entre ellas, permitiendo por un lado un crecimiento de la población en un tiempo muy corto evitando así problemas asociados con tamaños poblacionales pequeños, pero por otro lado incrementan la tasa de pérdida de variación genética al apoyarse en el éxito reproductivo de algunos individuos (Allendorf & Luikart, 2007).

Dioon edule Lindl. es una cycada que se distribuye en la Sierra Madre Oriental. En el estado de San Luis Potosí esta especie ha sido utilizada por los indígenas Xi'iuy durante mucho tiempo por lo que ha adquirido un valor cultural muy importante, además de ser un componente florístico relevante en la SMO. En la actualidad las poblaciones de *D. edule* se enfrentan a la fragmentación del hábitat así como al saqueo de individuos lo que puede poner en peligro su viabilidad biológica.

2. Antecedentes

2.1. Cycadas

Las cycadas representan a las plantas con semilla más antiguas que existen en la tierra, junto con ginkgo y las coníferas, su registro fósil se remonta al periodo Pérmico temprano aproximadamente 280 millones de años, y posiblemente a finales de Carbonífero entre 300 y 325 millones de años (Donaldson, 2003).

Este grupo se caracteriza por ser plantas dioicas derivadas de un ancestro común, presentan hojas pinnadas arregladas en forma radial. Sus estructuras reproductoras se componen de megasporofilos bien definidos los cuales presentan esporofilas biovuladas o multiovuladas, mientras que en los individuos masculinos los esporofilos contienen microsporangios responsables de la producción del polen (Wachtler, 2010; Yáñez-Espinosa, 2006). Presentan dos tipos de raíces, una raíz principal pivotante engrosada, carnosa y alargada, y unas raicillas ramificadas conocidas como coraloides capaces de fijar nitrógeno atmosférico (Wachtler, 2010).

Actualmente se tiene registro de alrededor de 300 especies distribuidas en tres familias y 11 géneros que se distribuyen en las regiones tropicales, subtropicales y templadas del mundo (Tabla 1). En América se distribuyen cinco géneros en 21 países, destacando entre estos México, como el país con mayor diversidad de especies seguido por Colombia, Panamá, Guatemala, Perú y Cuba (Donaldson, 2003).

Tabla 1. Clasificación de las cycadas actuales (Stevenson, 1992)

Orden	Soborden	Familia	Subfamilia	Tribu	Subtribu	Género			
Cycadales	Cycadineae	Cycadaceae				<i>Cycas</i>			
		Stangeriaceae	Stangerioideae			<i>Stangeria</i>			
			Bowenioideae			<i>Bowenia</i>			
	Zamiineae	Zamiaceae	Encephalartoideae	Diooeae			<i>Dioon</i>		
				Encephalarteae	Encephalartinae		<i>Encephalartos</i>		
					Macrozamiinae		<i>Macrozamia</i> <i>Lepidozamia</i>		
			Zamioideae			Ceratozamiaceae		<i>Ceratozamia</i>	
						Zamieae	Microcycadinae		<i>Microcycas</i>
							Zamiinae		

Las especies que se distribuyen en México pertenecen a la familia Zamiaceae y se clasifican en los géneros *Zamia*, *Ceratozamia* y *Dioon*; y representan aproximadamente el 20% del total que se tiene registrado, con un grado de endemismos de cerca del 80%, lo que lo ubica como segundo lugar en diversidad solamente después de Australia, y como centro de diversidad del neo-tropico (Octavio-Aguilar, 2009).

2.2. El género *Dioon*.

El género *Dioon* es el más representado en México y está conformado por 12 especies distribuidas en los siguientes tipos de vegetación: selva baja caducifolia, bosque tropical perennifolio, bosque de *Pinus*, bosque de *Quercus*, bosque mesófilo de montaña, matorral xerófilo y matorral submontano (Yáñez-Espinosa, 2006). Las especies del género *Dioon* distribuidas en México se presentan en la Tabla 2. Las poblaciones de este género, están generalmente confinadas a laderas rocosas en zonas ecotonales, lo que sugiere que sus especies están adaptadas a hábitats en donde otras especies no pueden competir (Chemnick & Gregory, 2010).

Tabla 2. Especies del género *Dioon* distribuidas en México (Hill, Stevenson, & Osborne, 2007)

Especie	Distribución
<i>Dioon angustifloium</i> Miq.	Nuevo León, Tamaulipas
<i>D. argenteum</i> T.J. Greg, Chemnik, Salas-Mor & Vovides	Oaxaca
<i>D. califanoi</i> De Luca & Sabato	Oaxaca, Puebla
<i>D. caputoi</i> De Luca, Sabato & Vázq. Torres	Oaxaca, Puebla
<i>D. edule</i> Lindl.	Veracruz, Tamaulipas, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo
<i>D. holmgrenii</i> De Luca, Sabato & Vázq. Torres	Oaxaca
<i>D. mejiae</i> Standl. & L.O. Williams	Honduras, Nicaragua
<i>D. merolae</i> De Luca, Sabato & Vázq. Torres	Oaxaca, Chiapas
<i>D. purpusii</i> Rose	Oaxaca
<i>D. rzdowskii</i> De Luca, A. Moretti, Sabato & Vázq. Torres	Oaxaca
<i>D. sonorensis</i> (De Luca, Sabato & Vázq. Torres) Chemnick, T.J. Greg. & S. Salas-Mor.	Costa Noroeste De México
<i>D. spinulosum</i> Dyer & Eichler	Oaxaca, Veracruz
<i>D. tomasellii</i> De Luca, Sabato & Vázq. Torres	Costa Suroriental De México

Dioon edule se distribuye a lo largo de la Sierra Madre Oriental desde el sur de Tamaulipas, San Luis Potosí, Hidalgo, Querétaro y Veracruz (De Luca, Sabato, & Vázquez-Torres, 1982). Son plantas que llegan a medir hasta 6 m de alto, con tallo que va de los 30 a 50 cm de diámetro en algunas ocasiones semiprostrado debido al peso de las estructuras reproductivas. Sus hojas son de color verde-azul, agrupadas en forma de corona de 50 a 150, las cuales llegan a medir hasta 2 m de largo (Yáñez-Espinosa, 2006).

Se identifican tres etapas en el desarrollo de esta especie: plántula, individuos que presentan una o más hojas sin que lleguen a formar una corona; juveniles, individuos que presentan

una o más coronas pero con tallo no visible; adultos, individuos que presentan una o más coronas y que tengan tallo visible (Yáñez-Espinosa, 2009).

En trabajos anteriores se determinó que las semillas y plántulas de *Dioon edule* presentan una alta tasa de mortalidad generando una curva de supervivencia tipo III de Deevey sugiriendo una alta mortalidad durante las etapas tempranas de desarrollo (Rubio-Méndez, 2010; Vovides, 1990), pueden llegar a vivir más de 3000 años con una esperanza de vida promedio de 625 años, aunque el 80% de los individuos mueren en rango de 1 y 250 años (Octavio-Aguilar, 2009).

Los individuos femeninos tienen su primer evento reproductivo alrededor de los 250 años y presentan un intervalo en la producción de conos de 10 a 52 años, en el caso de los individuos masculinos el intervalo es de 2.8 a 8.8 años. Presentan una baja dispersión debido a la alta concentración de neurotóxicos, lo que genera que las poblaciones tengan una distribución agregada (Vovides, 1990). Las neurotoxinas presentes en las cycadas son metabolitos secundarios que cumplen una función protectora. Los principales metabolitos encontrados son el Metilazoximetanol (MAM) que es responsable de algunas enfermedades degenerativas de corto y largo plazo, la cycasina y neocycasina que se pueden encontrar en altas concentraciones en tejidos de *Cycas*, y la macrozamina encontrado principalmente en semillas de *Macrozamia* (Méndez-Barredo, 2011; Moretti, Sabato & Siniscalco, 1983; Norstog & Nicholls, 1997).

En el sistema de clasificación para los estados de conservación elaborada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), que compila la llamada Lista Roja de la UICN de especies amenazadas, se considera a *Dioon edule* como especie casi

amenazada (NT: *Near Threatened*; (Hill, *et. al.*, 2007). Esta categoría se refiere a las especies que, después de su evaluación, no se pueden clasificar como especies en peligro o vulnerables, pero que en un futuro cercano estarían enfrentando un riesgo alto de extinción en estado silvestre (Chemnick & Gregory, 2010). En México esta especie se considera como especie en peligro de extinción de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, que comprende las especies silvestres amenazadas, raras y en peligro de extinción de flora y fauna que requieren protección especial.

2.3. Variación genética en Cycadas

Para desarrollar e implementar estrategias efectivas de conservación, es necesario integrar información proveniente de diferentes áreas principalmente la demografía y la genética (Cabrera-Toledo, 2009) pues de esta forma podemos construir conclusiones generales a partir de las observaciones derivadas de cada una de estas aéreas.

Es necesario además, tomar en cuenta la variación genética que existe dentro de la población y tratar de explicarla en términos de su origen y organización para de este modo lograr mantenerla. Además, se debe considerar un gran número de factores como la mutación, deriva génica, endogamia, flujo génico, entre muchos otros que influyen de manera directa en la estructura de la población y la estructura genética (Cabrera-Toledo, 2009). Esto es especialmente relevante al trabajar con cycadas, pues al ser una especie tan longeva, existe la posibilidad de que los parámetros obtenidos representen solamente una parte de la biología de la especie debido a que las fuerzas evolutivas tardan cierto tiempo en expresarse (Octavio-Aguilar, 2009).

Actualmente se encuentran publicados cerca de 20 estudios sobre la genética de poblaciones de cycadas a nivel mundial (Tabla 3) y de manera general se han reportado valores relativamente altos de loci polimórficos, número promedio de alelos por locus, y heterocigosis, lo cual puede indicar que estas especies no han experimentado recientes cuellos de botella y por lo tanto no están expuestas al efecto de la deriva génica o endogamia (Aguirre-Fey, 2004; Piñero et. al, 2008).

Tabla 3. Estudios realizados sobre la genética de poblaciones en cycadas a nivel mundial. N: número de poblaciones estudiadas, A: promedio de alelos por locus, P: porcentaje de loci polimórficos, He: heterocigosis esperada, Gst: diferenciación genética entre poblaciones (Tomado de Limón-Salvador, 2009)

Especie	n	A	P	He	Gst	Referencia
<i>Cycas pectinata</i>	11	1.82	58.5	0.076	0.387	Yang y Meerow (1996)
<i>C. siamensis</i>	13	1.48	58.8	0.134	0.291	Yang y Meerow (1996)
<i>C. panzihuaensis</i>	3	1.13	14.3	0.061	0.139	Chao-Luan, et. al., (1999)
<i>C. guizhouensis</i>	3	1.61	58.3	0.1	0.08	Yang y Meerow (1996)
<i>C. taitungensis</i>	2	1.07	2.5	0.013	0.034	Lin, et. al., (2000)
<i>C. seemanii</i>	5	1.2	21.3	0.057	0.594	Keppel et al., (2002)
<i>Dioon caputoi</i>	4	1.91	79	0.35	0.099	Cabrera-Toledo, et al., (2008)
<i>D. edule</i>	8	1.44	54.8	0.24	0.075	González-Astorga et al., (2003a)
<i>D. edule</i>	5	2.7	86.6	0.446	----	Esta tesis
<i>D. angustifolium</i>	3	1.67	52.4	0.218	0.167	González-Astorga et al., (2005)
<i>D. sonorensis</i>	4	2	81.6	0.314	0.151	González-Astorga et al., (2008)
<i>D. tomasellii</i>	5	1.96	83.1	0.295	0.145	González-Astorga et al., (2008)
<i>D. holmgrenii</i>	2	1.71	63.2	0.17	0.069	González-Astorga et al., (2008)
<i>Macrozamia communis</i>	5	1.61	50	0.045	0.27	Ellstrand et al., (1990)
<i>M. riedlei</i>	15	2.43	93	0.274	0.092	Byrne y James (1991)
<i>M. parcifolia</i>	2	1.2	17.6	0.037	0.037	Sharma et al., 1998
<i>M.</i>	3	1.3	31.3	0.081	0.03	Sharma et al., 1998

<i>pauliguielmi</i>						
<i>M. heteromera</i>	5	1.3	26	0.077	0.1	Sharma <i>et al.</i> , 1999
<i>M. plurinervia</i>	9	1.5	36.6	0.111	0.588	Sharma <i>et al.</i> , 2004
<i>Microcycas calocoma</i>	7	1.49	48.1	0.17	0.337	Pinares de la Fe <i>et al.</i> , (2009)
<i>Zamia loddigessi</i>	4	1.8	66.6	0.266	0.179	González-Astorga <i>et al.</i> , 2006
<i>Z. pumila</i>	2	1.75	16.7	0.047	-----	Walters y Deckers-Walters., 1991
<i>Z. cremnophila</i>	2	2.06	100	0.429	0.174	González-Astorga, sin publicar
<i>Z. katzeriana</i>	3	2.13	87.1	0.298	0.191	González-Astorga, sin publicar
<i>Z. lacandona</i>	3	2.04	69.2	0.216	0.108	González-Astorga, sin publicar
<i>Z. variegata</i>	2	2.02	97.3	0.355	0.085	González-Astorga, sin publicar
<i>Z. purpurea</i>	2	2.03	100	0.485	0.025	González-Astorga, sin publicar
<i>Z. furfuracea</i>	5	1.72	97.8	0.331	0.16	Limón- 2009

La importancia del concepto metapoblacional en conservación de cycadas como *D. edule* radica en que puede ser posible la persistencia a largo plazo de una especie en una determinada región a pesar de que cada población individual tenga un cierto riesgo de extinción a corto plazo. En esencia, una metapoblación se compone de un conjunto de poblaciones susceptibles de extinción en tiempo ecológico y que están interconectadas por fenómenos ocasionales de emigración e inmigración (Gutiérrez, 2002)

2.4. Genética de poblaciones

La genética de poblaciones nos permite describir la composición genética de las poblaciones naturales y predecir sus cambios en respuesta a las diversas fuerzas evolutivas que operan sobre ella, permitiendo identificar algunos riesgos de naturaleza genética que afectan la persistencia de las especies como son la fragmentación del hábitat y la pérdida de potencial adaptativo asociados al deterioro de la diversidad genética y la endogamia (Godoy, 2009;

Griffiths, *et. al.*, 2002), y sus orígenes se remontan a la preocupación por mantener la diversidad genética en especies explotadas, y que después se trasladaron al ámbito de especies silvestres con la descripción de la diversidad reducida la cual se acompaña de problemas reproductivos en especies importantes como el guepardo (Godoy, 2009).

Al analizar estas relaciones, es posible minimizar los problemas relacionados con tamaños de población pequeños, depresión por endogamia, pérdida de diversidad y la capacidad de respuesta ante cambios ambientales, además nos permite estudiar el efecto de la fragmentación y la reducción del flujo genético en poblaciones estructuradas y el efecto de acumulación y pérdida de mutaciones perjudiciales (Eguiarte, *et. al.*, 2007).

En plantas con distribución geográfica restringida, la acción de la endogamia y la deriva génica tienen efectos importantes debido principalmente a “cuellos de botella”, es decir, la reducción drástica del número de individuos en algún momento del pasado, ausencia de polinizadores y establecimiento en sitios perturbados (Cabrera-Toledo, 2009).

2.4.1. Marcadores genéticos

Los marcadores moleculares son fragmentos de ADN que permiten detectar variaciones en el genoma y generar hipótesis sobre los eventos que las generaron (Aguirre-Liguori, 2012), dando una estimación de la diversidad neutral. Se utilizan principalmente en campos de la biología como la evolución, ecología, biomedicina, ciencias forenses y estudios de diversidad, actualmente existen diferentes técnicas que permiten conocer cómo se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales (Eguiarte *et al.*, 2007). Este tipo de estudios son relativamente baratos y ofrecen resultados rápidamente y suelen distinguirse dos grandes grupos de marcadores: los proteicos y los de ADN.

2.4.1.1. Marcadores proteicos

Los marcadores proteicos son generalmente codominantes, y permiten el análisis a la vez de varios loci con bajo coste. Los genotipos resultantes de dichos análisis se pueden procesar como cualquier clase de datos mendelianos codominantes y los resultados obtenidos se pueden utilizar en análisis de poblaciones, relaciones inter e intrapoblacionales, taxonomía, análisis de parentesco, estudio de ligamientos e identificación de híbridos. Las técnicas más utilizadas son el análisis isoenzimático y la electroforesis en dos dimensiones (Jiménez & Collada, 2000).

2.4.1.2. Marcadores de ADN

Los marcadores de ADN presentan una serie de ventajas frente a los proteicos: no se ven afectados por variaciones ambientales ni de desarrollo, muestran la base misma de la variación de los individuos, permiten seleccionar regiones concretas dentro de la molécula de ADN para estudios determinados, el número de polimorfismos detectables es teóricamente ilimitado, permiten analizar tanto la información que se expresa como la que no y en la actualidad se han desarrollado un gran número de técnicas adecuadas a diferentes situaciones (Jiménez & Collada, 2000).

Con el desarrollo de tecnologías basadas en ADN este tipo de investigaciones se ha visto beneficiada al desarrollarse una mayor cantidad de marcadores basados en Fragmentos de Restricción Polimórficos y en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), lo que ha derivado en múltiples técnicas entre las que destacan los microsatélites.

2.4.1.3. Microsatélites

Los microsatélites son secuencias repetidas de 1 a 5 nucleótidos distribuidos a lo largo del genoma, y permiten medir la diversidad de genotipos amplificando mediante PCR la región del ADN genómico que contiene secuencias repetidas. Estos marcadores presentan un elevado grado de polimorfismo, su herencia es mendeliana simple, son codominantes, fáciles de medir y tienen una confiabilidad de 100% y son comúnmente utilizados en el análisis de la estructura genética de poblaciones de plantas silvestres y cultivadas (Aranguren-Méndez, *et al.*, 2005).

Algunas de las ventajas de los microsatélites son su codominancia, multiallelismo, y su alta heterocigosidad. Otra ventaja de estos marcadores es que utilizan muy poca cantidad de ADN comparados con otros marcadores como los RAPD's. La principal desventaja de los microsatélites es el tiempo y costo invertido en el diseño de los cebadores aunque existe la posibilidad de utilizar los mismos cebadores en más de una especie debido a que existe un grado de conservación de estos entre genomas de especies tan distantes como algunos mamíferos, plantas anuales y perennes (Becerra & Paredes, 2000).

Las estimaciones de las tasas de mutación que se han realizado muestran que la mutación en los microstélites es de 1×10^{-3} a 1×10^{-6} , esta información nos brinda una base importante para realizar análisis robustos de la genealogía que a su vez nos permite conocer acerca de la historia evolutiva de las especies (Eguiarte *et al.*, 2007).

2.4.1.4. Microsatélites fluorescentes

Uno de los métodos más precisos para determinar los alelos generados por los microsatélites es la marcación fluorescente, en la cual uno de los cebadores está marcado con un colorante fluorescente en su extremo 5', permitiendo así reducir errores durante la genotipificación de estos marcadores. Sin embargo la síntesis de cebadores fluorescentes eleva considerablemente los costos y además, estos cebadores solo se utilizan unas cuantas veces provocando que el excedente se almacene por mucho tiempo con lo cual decae la fluorescencia, lo que limita su uso en algunos laboratorios (Londoño-Caicedo, 2011).

Para reducir el costo de genotipificación, con microsatélites marcados fluorescentemente, se utilizan cebadores con una etiqueta en su extremo 5' la cual es complementaria al primer universal M-13, el cual genera un producto fluorescente que puede ser detectado en un secuenciador automático de ADN. De este modo en lugar de sintetizar un primer forward fluorescente para cada locus, se utiliza un solo cebador universal marcado (Londoño-Caicedo, 2011)

El primer universal M-13 es una secuencia derivada de un vector bacterial y no presenta homología con alguna secuencia conocida en la base de datos lo que reduce ampliaciones inespecíficas que puedan provocar interpretaciones erróneas de los resultados. La Figura 1 muestra el proceso de hibridación del primer marcado con M-13.

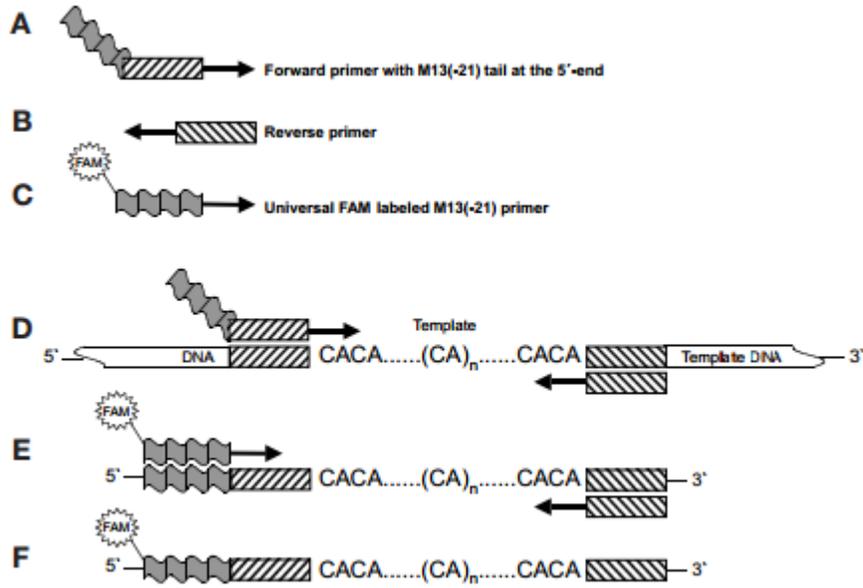


Figura 1. Primer Fluorescente: (A,B) los recuadros rayados indican los primer específicos a los microsatélites usados; (C) el cuadro ondulado indica la secuencia universal M-13 y la estrella la etiqueta fluorescente FAM: (D) durante los primeros ciclos de la PCR, el primer forward con la etiqueta M-13 se incorpora a los productos PCR; (E) en los ciclos siguientes el primer universal M-13 con la etiqueta FAM se une a la secuencia M-13 del primer forward específico, generando así el producto fluorescente (Shuelke, 2000)

3. Hipótesis

La fragmentación del hábitat en la Sierra Madre Oriental de San Luis Potosí ha reducido el flujo genético entre poblaciones de *Dioon edule*, provocando efectos adversos en la dinámica poblacional y dificultando la conservación *in situ* de la especie.

4. Objetivos

Objetivo general

Conocer la diversidad y estructura genética de *Dioon edule* en las poblaciones distribuidas en la Sierra Madre Oriental de San Luis Potosí y su relación con la fragmentación del hábitat.

Objetivos específicos

- ⊙ Estimar los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones de *Dioon edule* en la sierra Madre Oriental de San Luis Potosí, con base en tres etapas de desarrollo.
- ⊙ Analizar la similitud entre las diferentes poblaciones estudiadas de acuerdo a variables ambientales, genéticas y demográficas y con relación a su distribución espacial.
- ⊙ Plantear una estrategia a mediano y largo plazo para la conservación *in situ* de *Dioon edule* en la Sierra Madre Oriental del San Luis Potosí.

5. Justificación

Dioon edule es una especie con un alto valor de importancia basado en tres componentes: biológico, al ser una especie longeva, permite estudiar las fuerzas evolutivas que han actuado sobre las poblaciones y comunidades; ecológico, *D. edule* es un componente de la flora nativa de la Sierra Madre Oriental de San Luis Potosí pues su hábitat se extiende en un gradiente altitudinal que va de los 200 a los 1500 msnm, ubicándose en distintos tipos de vegetación como son el bosque de encinos, matorral submontano, selva baja caducifolia, así como los ecotonos formados por estos tipos; cultural, esta especie ha sido utilizada por la etnia Xi'iuy como alimento durante la escases del maíz así como en diferentes celebraciones religiosas indígenas y mestizas.

El estudio de la genética poblacional de *Dioon edule* nos permitirá establecer las directrices para el manejo y conservación *in situ* a largo plazo de esta especie, identificando los riesgos a los que se enfrenta, entre los que destacan los factores demográficos y genéticos como decisivos en la viabilidad de las poblaciones.

6. Materiales y métodos

6.1. Área de estudio

El área de estudio se seleccionó con base en la estructura poblacional de *Dioon edule* en nueve localidades de la Sierra Madre Oriental de San Luis Potosí distribuidas en un gradiente altitudinal que va de los 200 a los 1500 msnm abarcando los municipios de Tamasopo, Rayón, Aquismón, Santa Catarina y la comunidad de El Chijol en el municipio de Jalpan, Querétaro (Figura 2). Se seleccionaron cinco localidades para la elaboración de este estudio: Rincón de los Naranjos al norte del municipio de Tamasopo, la cual se encuentra dentro de la zona cañera del municipio y se ve afectada por el cambio de uso de suelo para el establecimiento de campos de cultivo (Figura3), Los Pocitos al sur de Tamasopo, Saucillo y Antejos en el municipio de Santa Catarina y El Chijol en Jalpan Querétaro, esta última localidad se encuentra sobre la misma provincia fisiográfica y está ubicada dentro de la reserva de la biosfera de la Sierra Gorda (Figura 2). Los climas que predominan en el área de estudio son los semicálidos, que se caracterizan por presentar temperaturas medias anuales superiores a 18 °C y se clasifican de acuerdo al régimen de lluvias, humedad y extensión en el estado en: semicálido húmedo con abundantes lluvias en verano; semicálido subhúmedo con lluvias en verano, de menor humedad; semicálido subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media; semicálido húmedo con lluvias todo el año y semicálido subhúmedo con lluvias en verano, de mayor humedad (INEGI, 2003). En la Figura 4 se muestran los diagramas climáticos para cada uno de los sitios de muestreo.

Sitios de Estudio

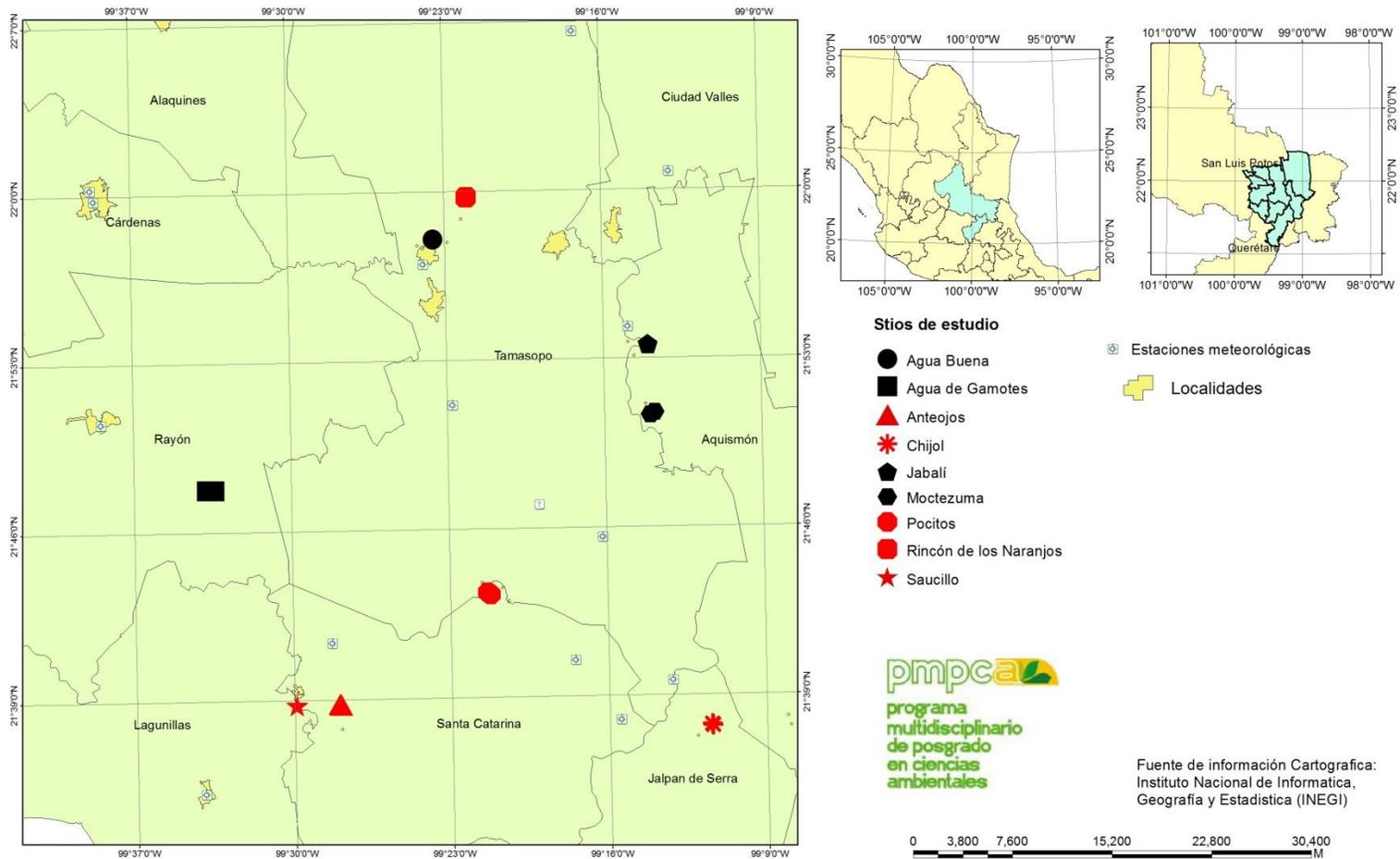


Figura 2. Ubicación geográfica de los sitios de estudio de las poblaciones de *Dioon edule* en San Luis Potosí.



Figura 3. Cambio de uso de suelo en Rincón de los Naranjos.

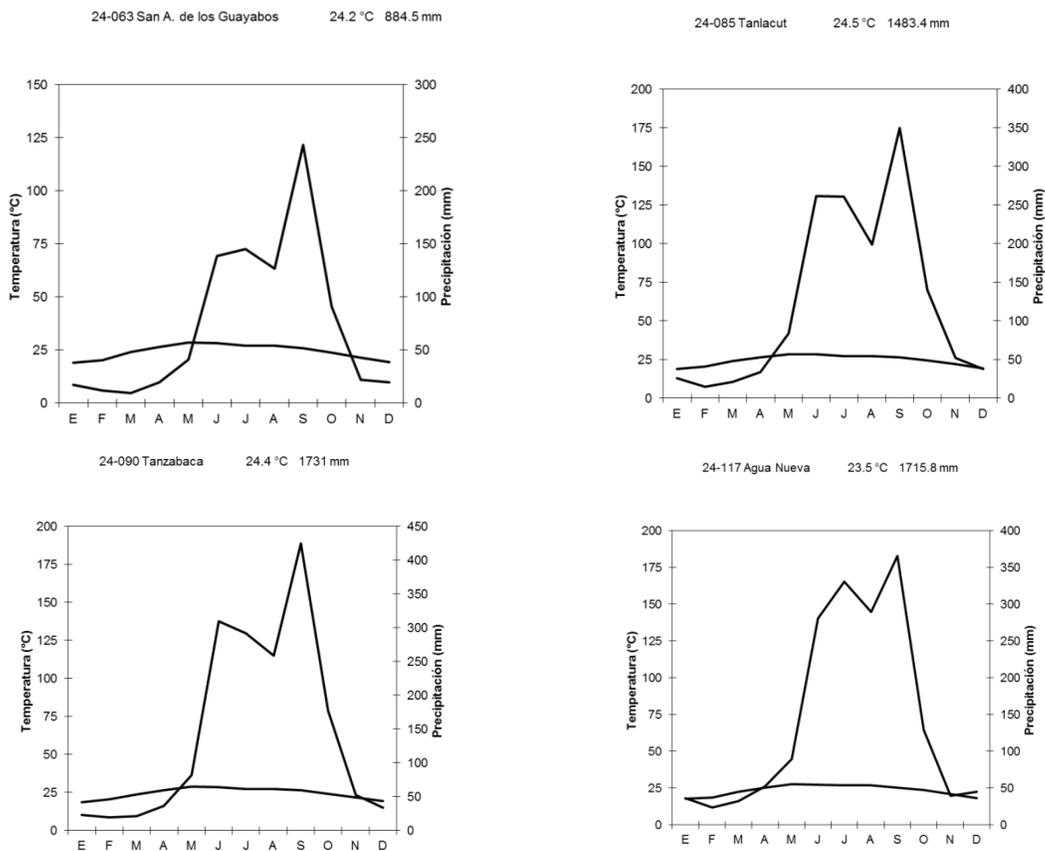


Figura 4. Diagramas climáticos para el área de estudio en la sierra Madre Oriental (elaborados con datos obtenidos de CONAGUA http://smn.cna.gob.mx/index2.php?option=com_content&view=article&id=172:san-luis-potosi&catid=14).

Los suelos en donde se desarrollan estas poblaciones no sobrepasan los 15 cm de profundidad, son en su mayoría de textura arcillosa con un contenido de materia orgánica de 14% en promedio, el pH es de básico a ligeramente alcalino. La pendiente oscila entre el 15 y 20%, en todos los sitios se pueden observar afloramientos de roca caliza (Rubio-Méndez., 2010).

Existe una alta densidad de algunos elementos arbóreos asociados a las poblaciones de *Dioon edule* estudiadas, las especies más comunes son: *Quercus laeta* en El Chijol, Los Pocitos, Antejos y Saucillo, *Bursera simaruba* en Rincón de los Naranjos así como *Brahea dulcis* que se encuentra presente en las cinco localidades (Rubio-Méndez, 2010). Se ha observado que estas especies pueden proporcionar una cantidad importante de sombra durante las etapas iniciales del establecimiento de *D. edule* posiblemente ayudando con ello a su desarrollo.

En la comunidad de Pocitos, la densidad de población es de 2100 ind-ha⁻¹ con una mayor dominancia de individuos en etapa de plántula (43.37%) y una proporción de sexos de 1.2:1 (M:F); en El Chijol la densidad de población es de 2150 ind-ha⁻¹ con una mayor proporción de plántulas (53.49%) y una proporción de sexos de 0.33:1(M:F); mientras que en Rincón de los Naranjos la densidad poblacional de 1075 ind-ha⁻¹ con una mayor dominancia de individuos adultos reproductivos y una proporción de sexos 1.85:1 (M:F), en esta población no se encontraron individuos adultos no reproductivos; en Antejos, la densidad poblacional fue de 2700 ind-Ha⁻¹ con una mayor representación de plántulas (50-93%) y una proporción de sexos de 3:1 (M:F); por último, en la localidad de Saucillo la densidad de población fue de 3775 ind-Ha⁻¹ con una mayor representación de plántulas y una

proporción de sexos de 0.66:1 (M:F), en esta localidad no se encontraron individuos no reproductivos (Rubio-Méndez, 2010).

6.2. Colecta de Material

En cada una de las poblaciones seleccionadas se recolectó tejido foliar de un total de 21 individuos, siete de cada categoría correspondiente a tres estados de vida (plántula, juvenil y adulto) seleccionados al azar. De cada individuo se tomaron las hojas en mejor estado, evitando aquellas que presentaban daños causados por las orugas de *Eumaeus* sp., las cuales se alimentan de los folíolos de *Dioon edule*. De cada hoja se colectaron aproximadamente 15 folíolos. Cada muestra fue separada en sobres de papel con sílica gel como agente deshidratador y se transportaron en hielo hasta su almacenamiento en un congelador a -20°C en donde se mantuvieron hasta que se realizó la extracción de ADN.

6.3. Extracción de ADN

Se tomaron aproximadamente 100 mg de tejido foliar al cual se le desprendió la cutícula que lo cubre y se pulverizaron en un mortero con Nitrógeno líquido, para realizar la extracción de ADN se utilizó el kit DNeasy Plant mini® (Quiagen), siguiendo el protocolo proporcionado dentro del kit con algunas modificaciones para adecuarlo a las condiciones y equipos disponibles en el laboratorio (Anexo1).

6.4. Reacciones PCR

Se realizaron reacciones PCR utilizando cebadores marcados con la etiqueta M-13(-21bp) para obtener productos fluorescentes.

Las condiciones para la amplificación con los cebadores específicos se modificaron de Moynihan *et al.*, (2007) de acuerdo a las pruebas preliminares realizadas en el laboratorio

de Interacción Planta-Insecto de la Universidad de McGill (Anexo 2); seguido de 8 ciclos a 94°C(30s), 53°C(45s), 72°C(45s) (Shuelke, 2000), con una extensión final a 72°C por 10 minutos.

6.5. Electroforesis

La electroforesis para la separación de los microsatélites se realizó utilizando el equipo LICOR 4300 DNA analyzer (LI-COR Biosciences) en un gel de poliacrilamida 6.5% (LI-COR Biosciences).

Se prepararon 20 ml de gel añadiendo 150 µl de Persulfato de Amonio (0.1g Persulfato de Amonio, 1 ml ddH₂O) y 15 µl de TEMED (Invitrogen), y se cargaron entre dos placas de vidrio con espaciadores de 0.25 mm y se utilizó un peine rectangular de 64 pozos.

Los productos PCR fueron desnaturalizados antes de cargarlos al gel, añadiendo 2 µl de buffer (9.5ml Formamida, 100µl NaOH, 400µl ddH₂O, Xilenocianol, Azul de bromofenol como colorantes), y se llevaron a 94°C en una termocicladora.

Antes de comenzar la electroforesis en el equipo fue necesario ejecutar un programa de calibración o *Prerun*, por 10 minutos con las siguientes condiciones: 1450V, 40W, 30mA, y 45°C; una vez completado este ciclo se cargaron las muestras en el gel y se realizó la electroforesis con las mismas condiciones y utilizando buffer TBE1x (1.2g Tris, 2g EDTA, 1 l ddH₂O), durante 90 minutos.

6.6. Análisis de la variación genética.

Se obtuvo el tamaño de los alelos en pares de bases (PB) y se calculó la heterocigosidad esperada y la frecuencia alélica utilizando el programa GenAlex (Peakall & Smouse, 2006). Con estos datos se calculó además el número promedio de alelos por locus, el número de

alelos efectivos por locus, porcentaje de locus polimórficos, la heterocigosidad esperada, Heterocigosidad observada.

6.7. Estructura genética

La estructura genética de la población fue estimada mediante los estadísticos F (F_{st} , F_{it} , F_{is}), así como el número total de migrantes efectivos (Nm), utilizando el software GenAlex (Peakall & Smouse, 2006).

La estructura de la población fue analizada mediante el programa *Structure* (Pritchard, Wen, & Falush, 2012) el cual plantea subdividir la muestra en poblaciones en las que se logre el equilibrio de H-W mediante un algoritmo de análisis de clúster, basado en criterios de genética de poblaciones, (probabilidad condicionada) y con la ventaja que ofrece resultados con un cierto grado de objetividad, por lo que la agrupación final no depende sólo del criterio del investigador (Londoño-Caicedo, 2011).

6.8. Análisis de similitud

Se realizó también un análisis de Clasificación Jerárquica Ascendente (CAJ) el cual realiza una clasificación que permite definir y confirmar posibles agrupaciones de acuerdo a características similares (Paredes, *et. al.*, 2003) y permite minimizar alguna distancia o maximizar una similitud, de tal modo que si tenemos un conjunto de n individuos en una muestra de donde resulta el clúster el nivel $K=0$, con n grupos que corresponden a cada uno de los individuos presentes en la muestra. En el siguiente nivel se agruparan aquellos dos individuos que tengan la mayor similitud, resultando así en $n-1$ grupos, y sucesivamente en los niveles posteriores se agruparan los dos individuos o clústeres con mayor similitud hasta que: se forma un solo grupo, se alcanza el número de grupos prefijado, se detecta, a

través de un contraste de significación, que hay razones estadísticas para no continuar agrupando clústeres, ya que los más similares no son lo suficientemente homogéneos como para determinar una misma agrupación

Estos análisis permiten además, la construcción de un árbol de clasificación o dendrograma, en el cual se puede seguir de forma gráfica el procedimiento de unión seguido mostrando que grupos se van uniendo, en qué nivel lo hacen, así como el valor de la medida de asociación entre los grupos (Universidad de Granada, 2013).

Para analizar la similitud entre las poblaciones estudiadas se tomaron variables obtenidas en un estudio ecológico previo (Rubio-Méndez, 2010) y corresponden a las características ambientales y demográficas de cada población, además se incluyeron algunos datos genéticos obtenidos en el presente estudio (Anexo 4), en la Tabla 4 se muestran las variables utilizadas. Los datos continuos se transformaron en discretos para poder utilizar el índice de similitud de Jaccard. Este análisis y el dendrograma se realizaron con el programa XLSTAT v.2013.4.03 de Addinsoft© 1995-2013.

Tabla 4 Variables utilizadas en el Análisis CAJ

Variable	Tipo	Fuente
Tipo de vegetación	Ambiental	INEGI
Tipo de suelo	Ambiental	INEGI
Sistema de topofomas	Ambiental	INEGI
Geología	Ambiental	INEGI
Clima	Ambiental	INEGI
Densidad de población por etapa de desarrollo	Demográfica	Rubio-Méndez, 2010
Distancia de Nei para cada etapa de desarrollo	Genética	Este estudio
Estadísticos F para cada etapa de desarrollo	Genética	Este estudio

6.9. Análisis de las estrategias para la conservación de *Dioon edule*.

Para plantear las estrategias de conservación, se realizó una revisión bibliográfica que incluyó algunos planes de manejo de áreas naturales protegidas así como algunas Normas Oficiales Mexicanas que regulan el aprovechamiento de recursos forestales, la Ley General de Desarrollo Forestal Sustentable (Anónimo, 2003) y el Reglamento de la Ley General de Desarrollo Forestal Sustentable (Anónimo, 2005), con el fin de encontrar las estrategias más apropiadas para nuestra área de estudio, considerando las condiciones ambientales y genéticas analizadas.

7. Resultados

7.1. Diversidad genética

El locus que presentó mayor número de alelos fue ED9 con un promedio de 5.4 alelos por población seguido de TOM5 3.2 alelos. En la población de El Chijol los marcadores presentaron un polimorfismo del 100% en las tres categorías, mientras que en la población de Anteojos se encontró el menor valor de polimorfismo (33.33%) en la categoría de plántulas (Tabla 5). No se encontraron alelos únicos dentro de la categoría adultos mientras que en las categorías juvenil y plántula se encontraron cuatro y tres alelos únicos respectivamente y el locus que presentó mayor número de alelos únicos fue ED9 (Figura 5). En el Anexo 3 se muestran las frecuencias alélicas para cada loci y cada población.

Tabla 5. Estimadores de la variabilidad genética en tres categorías de edad dentro de cinco poblaciones de *Dioon edule*.

	Pop	N	Na	Ne	Ho	He	F	% loci polimorficos
Adultos	Chijol	7.000	2.667	2.426	0.048	0.541	0.934	100.00%
	Rincón	7.000	2.333	1.765	0.286	0.303	0.354	66.67%
	Pocitos	7.000	2.667	1.842	0.238	0.418	0.605	100.00%
	Anteojos	6.667	3.000	2.293	0.143	0.511	0.791	100.00%
	Saucillo	6.000	2.667	2.226	0.133	0.489	0.810	100.00%
		promedio		2.667	2.110	0.170	0.452	0.699
Juvenil	Chijol	6.333	3.333	2.475	0.222	0.543	0.636	100.00%
	Rincón	6.667	2.667	2.393	0.278	0.445	0.423	66.67%
	Pocitos	7.000	2.333	1.932	0.238	0.446	0.605	100.00%
	Anteojos	5.000	3.333	2.961	0.333	0.634	0.556	100.00%
	Saucillo	6.333	3.000	2.621	0.167	0.355	0.695	66.67%
		promedio		2.933	2.476	0.248	0.484	0.583
Plántula	Chijol	6.667	3.333	2.931	0.167	0.613	0.786	100.00%
	Rincón	6.667	2.667	1.715	0.325	0.334	0.197	100.00%
	Pocitos	7.000	3.000	2.206	0.333	0.429	0.239	66.67%
	Anteojos	3.000	1.333	1.320	0.000	0.163	1.000	33.33%
	Saucillo	6.333	2.667	1.967	0.111	0.464	0.795	100.00%
		promedio		2.600	2.028	0.187	0.401	0.603
			2.733	2.205	0.201	0.446	0.628	86.67%

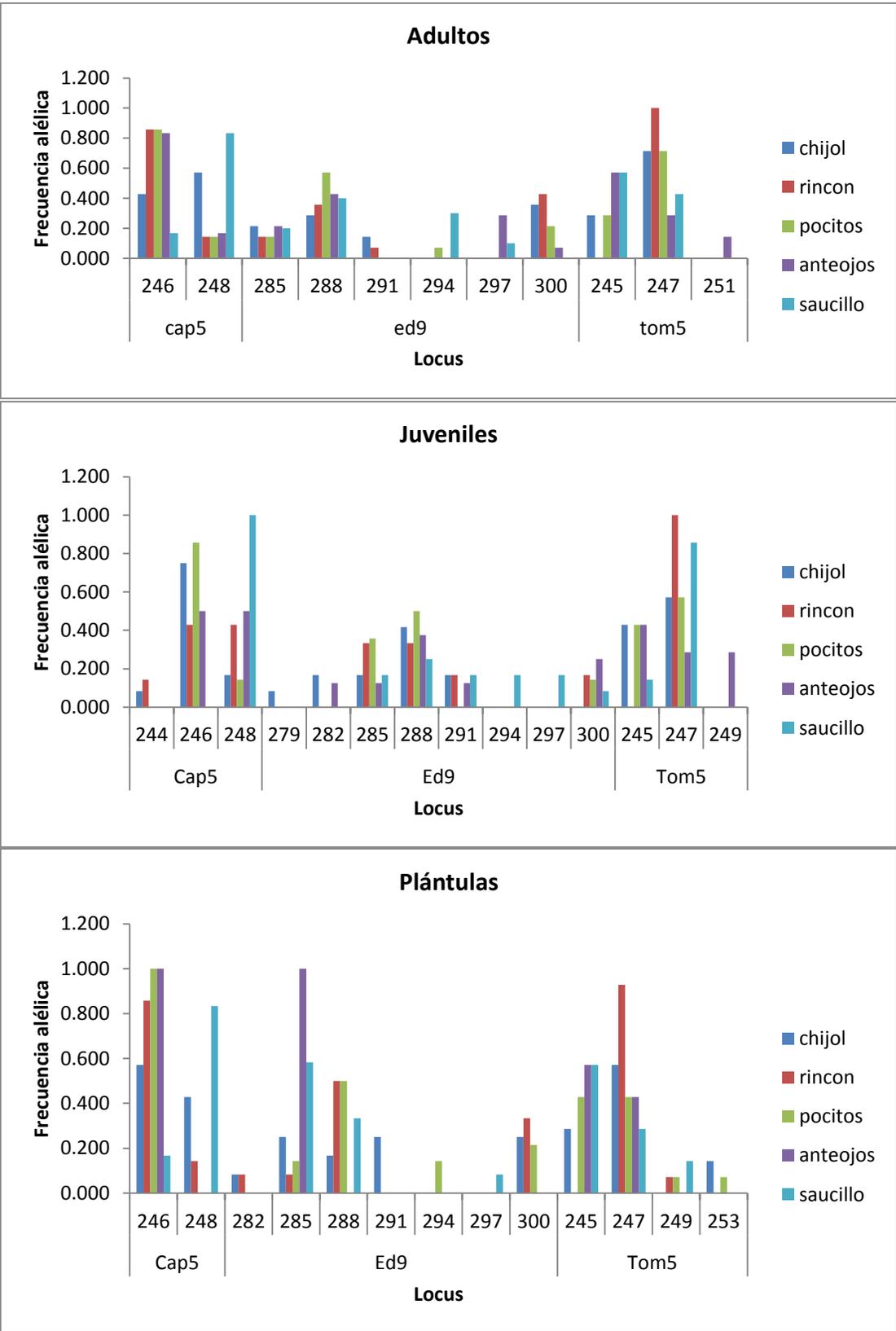


Figura 5. Frecuencia alélica por categoría de edad de cinco poblaciones de *Dioon edule*.

El número promedio de alelos diferentes por categoría fue de 2.7 y el número de alelos efectivos por categoría en cada población fue de 2.2 alélos.

La heterocigosidad observada promedio fue de 0.201 y el valor más alto se encontró en la categoría de plántulas en la localidad de Pocitos con un valor de 0.33, en la localidad de Antejos el valor de heterocigosidad esperada fue de 0.0 (Tabla 5 y 6). Para la Heterocigosidad esperada el valor más alto fue de 0.634 en la categoría juvenil para la localidad de Pocitos.

Tabla 6. Estimadores de la variabilidad genética en cinco poblaciones de *Dioon edule*

Pop	Locus	N	Na	Ne	Ho	He	F
Chijol	CAP5	20	3.000	2.036	0.050	0.509	0.902
	ED9	19	6.000	4.688	0.368	0.787	0.532
	TOM5	21	3.000	2.014	0.000	0.503	1.000
Rincón	CAP5	21	3.000	1.757	0.000	0.431	1.000
	ED9	19	5.000	3.374	0.842	0.704	-0.197
	TOM5	21	2.000	1.049	0.048	0.046	-0.024
Pocitos	CAP5	21	2.000	1.208	0.000	0.172	1.000
	ED9	21	4.000	2.765	0.762	0.638	-0.194
	TOM5	21	4.000	2.115	0.048	0.527	0.910
Antejos	CAP5	11	2.000	1.658	0.000	0.397	1.000
	ED9	12	6.000	4.000	0.583	0.750	0.222
	TOM5	21	4.000	2.520	0.000	0.603	1.000
Saucillo	CAP5	18	2.000	1.246	0.000	0.198	1.000
	ED9	17	6.000	4.014	0.412	0.751	0.452
	TOM5	21	3.000	2.172	0.000	0.540	1.000

7.2. Estructura genética

Los valores de los estadísticos F de Wright son más altos en la etapa de adultos ($F_{is}=0.749$, Tabla 7), sin embargo, en todas las categorías se observa una déficit de heterocigos ($F>0$). En la categoría de plántulas se observa el valor más alto para el índice de diferenciación genética ($F_{st}=0.313$).

Tabla 7. Índice de diferenciación genética por categoría de edad

Categoría	Locus	F_{is}	F_{it}	F_{st}	Nm
Adultos	CAP5	1.000	1.000	0.342	0.480
	ED9	0.246	0.313	0.089	2.567
	TOM5	1.000	1.000	0.228	0.846
	Promedio	0.749	0.771	0.220	1.297
Juvenil	CAP5	0.905	0.938	0.349	0.467
	ED9	0.023	0.077	0.055	4.264
	TOM5	1.000	1.000	0.223	0.871
	Promedio	0.643	0.672	0.209	1.867
Plántula	CAP5	1.000	1.000	0.499	0.251
	ED9	0.032	0.289	0.266	0.691
	TOM5	0.880	0.901	0.173	1.194
	Promedio	0.638	0.730	0.313	0.712

Las poblaciones que comparten más alelos son Chijol y Anteojos ambas ubicadas en la parte sur del área de estudio; las que menos alelos comparten son Rincón de los Naranjos ubicada al norte del área de estudio y Saucillo al sur (Tabla 8).

Tabla 8 Índice de diferenciación genética por pares de poblaciones

Población1	Población2	F_{st}	Nm
Chijol	Anteojos	0.033	7.337
Pocitos	Anteojos	0.037	6.491
Chijol	Pocitos	0.055	4.259
Chijol	Rincón	0.072	3.216
Rincón	Pocitos	0.092	2.471
Chijol	Saucillo	0.096	2.361

Rincón	Anteojos	0.125	1.753
Anteojos	Saucillo	0.142	1.513
Pocitos	Saucillo	0.223	0.873
Rincón	Saucillo	0.227	0.850

El análisis realizado con el software *Structure* mostró que el k óptimo fue $k=3$ para el análisis de poblaciones en el que se aprecia que En la población de Chijol existe un mayor flujo genético mientras que en las poblaciones restantes se observa una leve estructuración (Figura 6 a), mientras que para el análisis por edades la k óptima fue de $k=3$. En este análisis se encontró una ligera estructura en las categorías adulto y plántula (Figura 6 b).

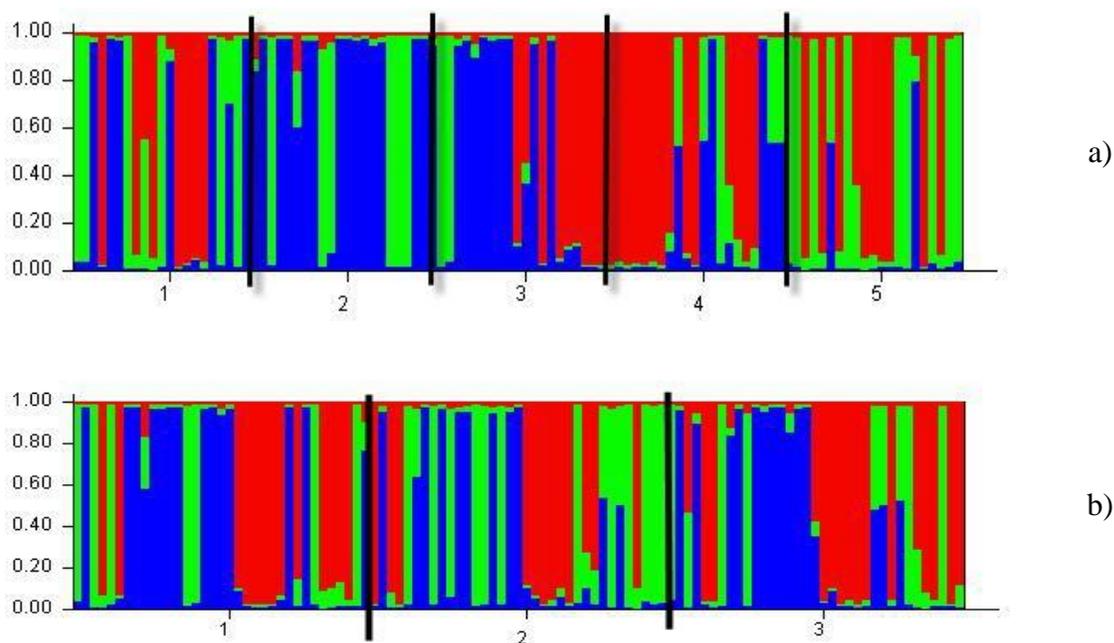


Figura 6 Análisis de la estructura poblacional a) por población $k=3$ (1: Chijol; 2: Rincón; 3: Pocitos; 4: Anteojos; 5: Saucillo) y b) por edades $k=3$, de 5 poblaciones de *Dioon edule* (1 adulto; 2 juvenil; 3 plántula), analizadas con tres marcadores microsatélites

7.3. Análisis de Clasificación Ascendente Jerárquica (CAJ)

El análisis de Clasificación Ascendente Jerárquica nos agrupa a las poblaciones en estudio en tres grupos tomando como base las características demográficas y del hábitat descritas por Rubio-Méndez (2010) así como los datos moleculares recogidos en esta investigación (Anexo 4). En el primer grupo se encuentra la población de Chijol (similitud=0.228), en el grupo 2 se incluyen Pocitos y Rincón de los Naranjos (similitud=0.449) y en el grupo 3 Anteojos y Saucillo (similitud=0.629) (Figura 7). Este análisis muestra también que existe mayor variación dentro de los grupos que entre estos (Tabla 9).

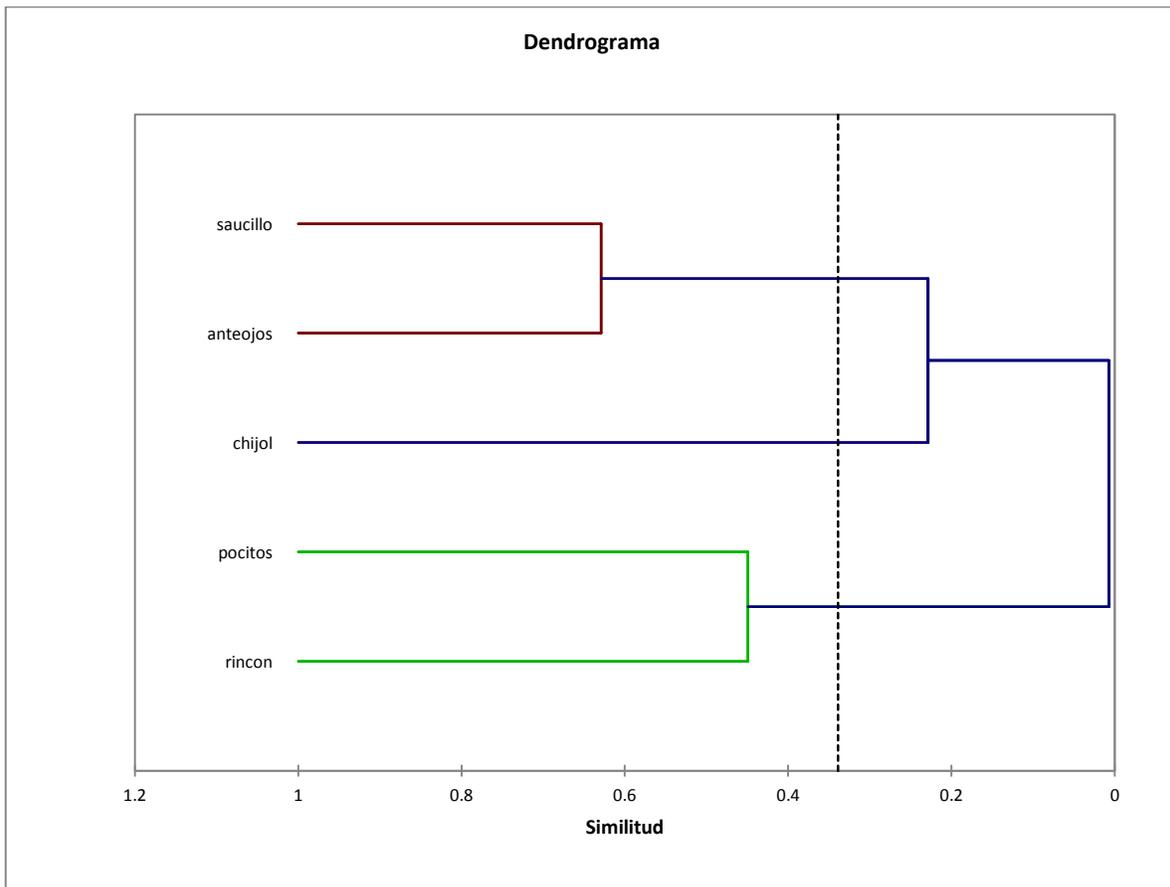


Figura 7. Dendrograma del análisis de clasificación ascendente jerárquica

Tabla 9 Descomposición de la variación para la clasificación óptima interclase

	Absoluto	Porcentaje
Intraclase	2.970	56.28%
Interclases	2.307	43.72%
Total	5.276	100.00%

La densidad de plántulas fue la variable más relevante en la clasificación jerárquica de los grupos 1 y 3 con valores de 1.150 y 2.013 respectivamente, mientras que en el grupo 2 fue la distancia de Nei en la categoría plántulas para la localidad de Saucillo la variable con mayor peso con un valor de 0.868 (Figura 8).

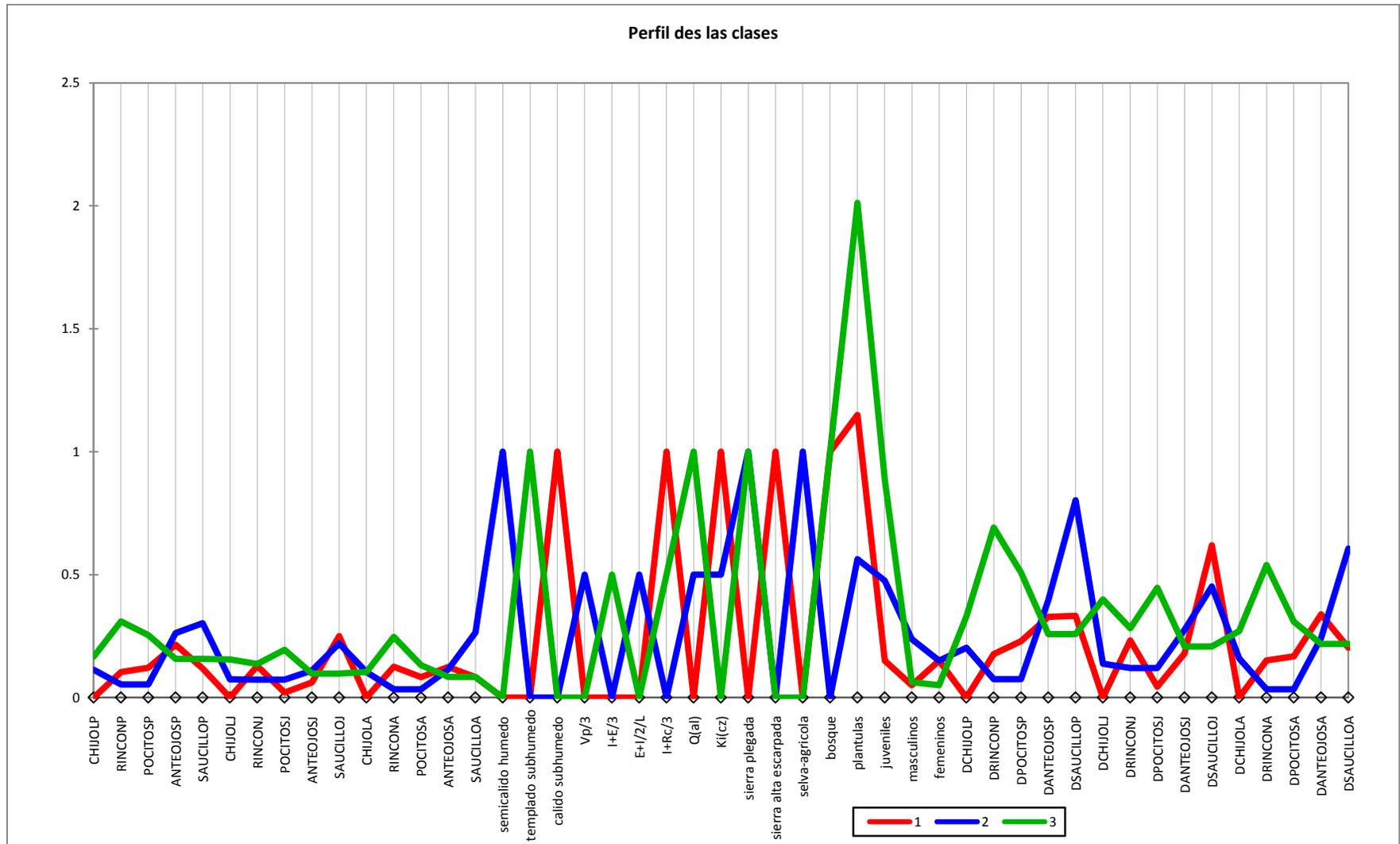


Figura 8. Perfil de las tres clases incluyendo todas las variables utilizadas

8. Discusión.

Las poblaciones analizadas muestran un exceso de homocigotos en las tres categorías de edad propuestas, contrario a lo que se esperaría para los individuos adultos que se cree se establecieron antes de las perturbaciones que pudieron afectar a estas poblaciones. González-Astorga *et. al.*(2003) encontraron un comportamiento similar en un estudio realizado en Veracruz y menciona que las poblaciones que se encuentran fuera de los refugios de flora y fauna del pleistoceno ubicados en Veracruz y Oaxaca probablemente sufrieron un cuello de botella debido a la exposición a condiciones ambientales adversas lo que generó una disminución significativa del tamaño poblacional reflejándose en los niveles bajos de heterocigosidad observada detectados.

Por otro lado, algunos autores (Bohonak, 1999; Cabrera-Toledo, 2009; González-Astorga *et al.*, 2003; Mathiasen, *et. al.*, 2006; Octavio-Aguilar, 2009) sugieren que algunas cuestiones de la historia de vida tienen importantes consecuencias en la estructura genética y en los niveles de variabilidad genética en las poblaciones naturales, como el área de distribución geográfica sistemas de reproducción y los sistemas de dispersión de polen y semillas (González-Astorga *et al.*, 2003; Mathiasen *et al.*, 2006; Octavio-Aguilar, 2009). Estos factores son especialmente relevantes en las cycadas pues su distribución es en áreas muy específicas además de que presentan reproducción vegetativa formando manchones de individuos reproductivos con un tamaño considerable, lo que puede aumentar la incidencia de endogamia al interior de las poblaciones.

En los sitios de estudio se han observado una gran cantidad de plántulas alrededor de plantas adultas de *Dioon edule* así como *Quercus laeta* y *Bursera simaruba*, similar a un banco de plántulas (Rubio-Méndez, 2010), de este modo, las plántulas obtienen una cantidad de sombra suficiente para su establecimiento y paso a las siguientes etapas de su desarrollo. Estos “bancos de plántulas” actúan como un gran reservorio de variación genética que se eventualmente se pierde debido a las altas tasas de mortalidad que presenta esta especie (Alvarez-Buylla, *et. al.*, 1996; Alvarez-Buylla, *et. al.*, 1996). Cabrera-Toledo (2009) menciona que esta mortalidad podría deberse a que las condiciones ambientales actuales, derivadas de la fragmentación del hábitat, no permiten el establecimiento de las plántulas debido a la exposición a largos periodos de sequías así como a la incidencia de radiación solar. Aunado a esto, la fragmentación del hábitat también reduce el tamaño poblacional provocando deriva génica en la población causando que la selección natural sea menos efectiva expresándose genotipos deletéreos o poco tolerantes a las condiciones ambientales actuales (Allendorf & Luikart, 2007).

Los estadísticos F de Wright muestran los valores más altos en la categoría plántulas posiblemente como efecto de la reducción en el flujo genético lo que ha propiciado la endogamia al interior de las poblaciones, mientras que en las categorías adultos y juveniles los valores son muy similares, en este sentido, Mathiasen *et. al.*, (2006) menciona que esta similitud podría ser mantenida por la autoincompatibilidad creando una dependencia hacia los polinizadores para facilitar la reproducción.

La mayor similitud encontrada entre los pares de poblaciones probablemente esté relacionada con la formación de corredores naturales y la menor incidencia de barreras

geográficas (e.g. ríos, elevaciones; Figura 2.) entre estas poblaciones lo que permite un libre intercambio de genes mediante el movimiento de los polinizadores.

Los análisis realizados con el software *Structure* (Pritchard *et al.*, 2012) muestran una ligera estructura en las categorías adulto y plántula. En el caso de los adultos como ya se mencionó, se podría deber a un efecto derivado de un cuello de botella ocasionado durante las glaciaciones ocurridas en el pleistoceno. Por otro lado, las plántulas actuales, están expuestas a la fragmentación del hábitat ocasionado posiblemente por la incidencia de actividades agropecuarias en la zona de estudio, lo que altera las condiciones del hábitat propiciando mayor mortalidad y probablemente afecte negativamente a las poblaciones de polinizadores ocasionando que los individuos de esta categoría se vean afectados por fenómenos como la endogamia y la deriva génica (Cabrera-Toledo, 2009; Mathiasen *et al.*, 2006). Al realizar el mismo análisis tomando en cuenta a las poblaciones como grupos de trabajo, no encontramos una estructura definida probablemente como efecto de la longevidad y la exocruza obligada que presenta esta especie debido a que son plantas dioicas (Cabrera-Toledo, 2009). Se postula que las poblaciones en estudio estuvieron conectadas en algún momento del pasado, ya sea por algún corredor que permitía la dispersión de semillas o que permitía el movimiento de los polinizadores entre las poblaciones (metapoblaciones). Cabrera-Toledo (2009) encontró un comportamiento similar en poblaciones de *D. caputoi* y *D. merolae* y menciona que puede ser explicado como una pérdida gradual de la diversidad genética debido a que el tiempo entre el disturbio inicial y el tiempo actual es muy corto al compararlo con la longevidad y la generación de esta especie.

El análisis CAJ muestra una mayor influencia de la categoría de plántulas en los grupos 1 y 3, en las poblaciones que conforman estos grupos podemos observar un mayor reclutamiento de plántulas (Rubio-Méndez, 2010) posiblemente como resultado de una mayor cobertura vegetal lo que favorece el establecimiento de esta especie, además, la población de Chijol se encuentra dentro de la Reserva de la Biosfera Sierra Gorda y se encuentra conectada con las poblaciones de Antejos y Saucillo por medio de corredores naturales ubicados en las partes bajas de las sierras que confluyen en el área. En esta zona, se realiza el aprovechamiento de semilla de *Dioon edule* por parte de la etnia Xi'iuy, los cuales colectan semillas en las poblaciones silvestres ubicadas en un radio considerable propiciando un flujo genético artificial entre estas poblaciones.

En el caso del grupo 2 conformado por las poblaciones de Pocitos y Rincón de los Naranjos, estas se encuentran en una zona con alta incidencia de actividades agropecuarias, especialmente Rincón de los Naranjos se encuentra en el medio de una serie de campos de cultivo de caña de azúcar, y probablemente, se esté aislando geográficamente de las demás poblaciones, viéndose reflejado en una mayor diferenciación con los otros dos grupos. La mayor variación se encontró en la categoría de plántulas, los cuales se piensa que tienen entre uno y 10 años de vida, de este modo, los individuos parentales, han estado expuestos a la perturbación y reducción de su hábitat lo que probablemente ha mermado la presencia de polinizadores así como también la cobertura vegetal dificultando el establecimiento de los nuevos individuos.

9. Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que las poblaciones de Rincón de los Naranjos y Pocitos se encuentran en riesgo de extinción al ubicarse en zonas en donde se realizan actividades agropecuarias, lo cual se ve reflejado en los niveles bajos de heterocigosidad encontrados, a diferencia de las poblaciones de Chijol, Saucillo y Antejos, las cuales, debido a su cercanía con la reserva de la Biosfera de Sierra Gorda, se ven beneficiadas por la formación de corredores naturales que permiten el flujo genético entre estas, amortiguando así el impacto de las actividades agropecuarias que se realizan en la zona.

Es importante mencionar que las poblaciones estudiadas muestran una deficiencia de heterócigos como consecuencia probable de las condiciones ambientales que se presentaron durante las glaciaciones del Pleistoceno, lo provoca que las poblaciones de Rincón de los Naranjos y Pocitos sean aún más vulnerables a la perturbación, por lo que es necesario plantear estrategias que permitan la permanencia de esta especie en el área.

Considerando los resultados obtenidos se proponen tres estrategias para la conservación *in situ* de esta especie en la Sierra Madre Oriental de San Luis Potosí:

Relación con el Corredor Ecológico Sierra Madre Oriental

El Corredor Ecológico Sierra Madre Oriental (CESMO) comprende territorios de los estados de Hidalgo, Puebla, San Luis Potosí, Tamaulipas y Veracruz con una extensión de 2 millones y medio de hectáreas y está constituido por un sistema de sucesiones de valles intermontanos y lomeríos (Anónimo, 2013).

Debido a su ubicación geográfica el CESMO posee altos niveles de diversidad, riqueza y endemismos de especies vegetales y animales, que prestan importantes servicios

ecosistémicos que inciden en las interacciones entre los otros componentes mejorando la capacidad adaptativa de los mismos, constituyendo un activo ambiental que debe ser considerado en los planes estratégicos de conservación (Anónimo, 2013).

Las principales amenazas para los ecosistemas y especies presentes en la región del CESMO son el cambio climático y las modificaciones en la configuración original del paisaje que asociados entre sí, incrementan la vulnerabilidad de estos ecosistemas. Los cambios en el paisaje tienen como expresión más clara los efectos de fragmentación, la cual produce un mosaico de manchas más pequeñas a menudo parcelas aisladas de bosque, pradera o terreno de arbustos, si las parcelas se reducen por debajo de un tamaño crítico, la zona restante puede que no sea capaz de soportar muchas de sus especies originales y se produce la extinción local (Smith & Smith, 2007)

Este comportamiento afecta principalmente a especies con distribución restringida como es el caso de *Dioon edule*, aun cuando se encuentren en el interior de un área de reserva como lo es el CESMO. Para mitigar los efectos de la pérdida de conectividad se ha propuesto utilizar un enfoque basado en la teoría de insular de McArthur y Wilson (Gutiérrez, 2002).

Sin embargo, como no se conseguía un consenso este acercamiento comenzó a perder credibilidad, surgiendo así el enfoque metapoblacional bajo la premisa de que era posible la persistencia a largo plazo de una especie en una determinada región a pesar de que cada población individual tenga un cierto riesgo de extinción a corto plazo (Gutiérrez, 2002).

Al utilizar un enfoque metapoblacional dentro del CESMO, estaríamos en posibilidades de conservar todas las poblaciones estudiadas y asegurar su conectividad para facilitar el flujo genético.

Regulación del aprovechamiento de *Dioon edule* en las comunidades Xi'iuy

La etnia Xi'iuy que habita en la Sierra Madre Oriental utiliza las semillas de *Dioon edule* para la elaboración de alimentos como tamales (Chávez-Acuña, 2010), sin que se tenga algún registro de los volúmenes de semilla que se extraen de las poblaciones locales. Esto ha disminuido la tasa de sustitución de los individuos afectando así la adecuación de las poblaciones.

En este sentido, la Ley General de Desarrollo Forestal Sustentable y su reglamento, se refieren en los artículos 97 y 55 respectivamente al aprovechamiento de los recursos forestales no maderables, dentro de los que se incluyen **plantas completas** de la Familia Zamiaceae y menciona que para su aprovechamiento se requiere la presentación de un Programa de Manejo Forestal Simplificado, así como la autorización de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (Anónimo, 2003, 2005)

Algunos de los puntos que debe de contener el Programa de Manejo Forestal son los siguientes:

- Diagnostico general de las características físicas, biológicas y ecológicas del predio o predios donde se realiza el aprovechamiento.
- Especies con nombre científico y común de las especies o partes a aprovechar
- Superficie en Hectáreas y las cantidades por aprovechar anualmente en metros cúbicos, litros o kilogramos, las cuales **deberán ser menores a la tasa de regeneración.**

- Estimaciones de las existencias reales y tasas de regeneración de las especies o de sus partes por aprovechar, incluyendo la descripción del procedimiento de estimación.
- La estructura de la población indicando el porcentaje de organismos juveniles, maduros y seniles en un cuadro en donde se indiquen las características de la población de acuerdo al número de individuos, distribución por edades, entre otros.
- La distribución y número de plantas factibles de aprovechamiento, de acuerdo a la madurez de cosecha y el programa de aprovechamiento para el periodo de vigencia propuesto, mostrando la relación entre los individuos a extraer y la población total, así como las superficies donde se aprovechará anual y cronológicamente el periodo de aprovechamiento.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, se propone la integración del aprovechamiento de las semillas de *Dioon edule* como producto forestal no maderable, con el objetivo de registrar los volúmenes reales de extracción y poder regular su uso y crear así programas de manejo adecuados que permitan asegurar la permanencia de las poblaciones actuales.

Restauración genética

Se sabe que los inmigrantes de las poblaciones aledañas pueden prevenir la extinción de poblaciones pequeñas mediante el proceso llamado restauración genética. Este método consiste en la introducción de uno o más inmigrantes en un población con problemas de endogamia, con la intención de generar una heterosis (vigor híbrido) la cual tiene un influencia positiva sobre la adecuación y disminuye la expresión de alelos recesivos deletéreos (Eguiarte *et al.*, 2007).

Tomando en cuenta las similitudes encontradas en el análisis CAJ, podemos considerar a la población de Chijol como el sitio más apto para la producción de individuos que pueden ser introducidos en las poblaciones vecinas para aumentar la heterosis en estas. Esta población se encuentra dentro de la reserva de la biosfera Sierra Gorda, lo que propicia el flujo genético entre las poblaciones locales lo que se puede aprovechar para introducir mayor variación a las poblaciones estudiadas, además de esto, las condiciones ambientales presentes en el área son similares a las encontradas en las poblaciones de Saucillo y Antejos, y en menor grado con la población de Pocitos, lo que de alguna manera nos podría asegurar el éxito en el establecimiento de los individuos.

Es importante mencionar que la población de Rincón de los Naranjos, por su ubicación geográfica, representará un problema mayor, pues al ubicarse en el centro de la zona cañera del municipio de Tamasopo, S. L. P., se encuentran muchas barreras físicas que no permiten el flujo genético y la conectividad con las demás poblaciones, por lo que será necesario además planear corredores que permitan el libre flujo genético hacia esta población para así asegurar su viabilidad biológica.

Bibliografía

- Aguirre-Fey, D. (2004). *Demografía y Genética de Poblaciones de Zamia loddigesii* Miq. (Zamiaceae) en el Centro de Veracruz, México. Facultad de biología. Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México.
- Aguirre-Liguori, J. A. (2012). *Genética de poblaciones y filogeografía de Fouquieria shrevei* (Familia Fouquieriaceae), especie gipsófila endémica de Coahuila. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Allendorf, F. W., & Luikart, G. H. (2007). *Conservation and the Genetics of Populations* (primera., p. 663). Blackwell Publishing.
- Alvarez-Buylla, E. R., Chaos, A., Piñero, D., & Garay, A. A. (1996). Demographic genetics of a pioneer tropical tree species: patch dynamics, seed dispersal and seed banks. *Evolution*, 50(3), 1155–1166.
- Alvarez-Buylla, E. R., Garcia-Barrios, R., Lara-Moreno, C., & Martínez-Ramos, M. (1996). Demographic and genetic models in conservation biology: applications and perspectives for tropical rain forest tree species. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics.*, 27, 387–421.
- Anónimo. (2003). Ley General de Desarrollo Forestal Sustentable. Mexico, D. F. Retrieved from www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/259.pdf
- Anónimo. (2005). Reglamento de la Ley General de Desarrollo Forestal Sustentable. Retrieved from www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/regley/Reg_LGDFS.pdf
- Anónimo. (2013). *Programa de adaptación al cambio climático corredor ecológico de la Sierra Madre Oriental* (Primera., p. 66). CONANP, GIZ.
- Aranguren-Méndez, J. A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., & Jordana, J. (2005). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Archivos latinoamericanos de producción animal*, 13(1), 1–13.
- Becerra, V., & Paredes, M. (2000). Uso de Maradores Bioquímicos y Moleculares en Estudios de Diversidad Genética. *Agricultura Técnica*, 60(3), 1–14. doi:10.4067/S0365-28072000000300007
- Bohonak, A. J. (1999). Dispersal, gene flow and population structure. *The Quarterly review of biology*, 74(1), 21–45.
- Cabrera-Toledo, D. (2009). *Biología poblacional de dos cycadas mexicanas con distintos niveles de rareza*. Instituto de Ecología, A. C., Xalapa, Veracruz.

- Chávez-Acuña, I. J. (2010). *Análisis estructural de dos poblaciones de Dioon edule Lindl. (Zamiaceae) en comunidades indígenas y mestizas de la región Xi'uy de La Palma, S. L. P.: Implicaciones ecológicas y culturales*. Programa Multidisciplinario de Posgrados en Ciencias Ambientales. Cologne University of Applied Sciences. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Chemnick, J., & Gregory, T. (2010). *Dioon edule*. (IUCN, Ed.) *IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2*. Retrieved from <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/42158/0>
- CONABIO. (2010). Programa de conservación de especies en riesgo PROCER 2007-2012. Retrieved from <http://procer.conanp.gob.mx/>
- De Luca, P., Sabato, S., & Vázquez-Torres, M. (1982). Distribution and variation of *Dioon edule* (Zamiaceae). *Brittonia*, 34(3), 7.
- Donaldson, J. (2003). *Cycads: status survey and conservation action plan* (primera., p. ix+86). Cambridge, UK: IUCN/SSC Cycad Specialist Group. IUCN.
- Eguiarte, L., Souza, V., & Aguirre, X. (2007). *Ecología Molecular* (primera ed.). México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Godoy, J. A. (2009). La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas*, 18(1), 10. Retrieved from <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=54012158005>
- González-Astorga, J., Vovides A., P., Ferrer M., M., & Iglesias, C. (2003). Population genetics of *Dioon edule* Lindl. (Zamiaceae, Cycadales): biogeographical and evolutionary implications. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 80, 11.
- Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., & Gelbart, W. M. (2002). *Genética* (septima., p. 845). McGrawhill.
- Gutiérrez, D. (2002). Metapoblaciones: un pilar básico en biología de conservación. *Ecosistemas*, 1(3). Retrieved from www.aeet.org/ecosistemas/investigacion3.htm
- Hill, K. D., Stevenson, D. W., & Osborne, R. (2007). The World List of Cycads. *Proceedings of the 7th International Conference on Cycad Biology*. Xalapa, Veracruz, México: New York Botanical Garden.
- INEGI. (2003). Síntesis Geográfica del estado de San Luis Potosí. Aguascalientes, México: INEGI. Retrieved from <http://www.inegi.gob.mx/>.
- Jiménez, p., & Collada, P. (2000). Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales*, fuera de s(2), 237–248.

- Limón-Salvador, F. (2009). *Genética de poblaciones de Zamia furfuracea L. f. (Zamiaceae): una cícada endémica al estado de Veracruz*. Universidad Veracruzana.
- Londoño-Caicedo, J. M. (2011). *Estructura poblacional y diversidad genética en frijol común (Phaseolus vulgaris L.) en 202 genotipos por medio de SSR fluorescentes*. Universidad del Quindío.
- Mathiasen, P., Rovere, A., & Premoli, A. (2006). Genetic structure and early effects of inbreeding in fragmented temperate forest of a self-incompatible tree, *Embothrium coccineum*. *Conservation biology*, 21(1), 232–240. doi:10.1111/j.1523-1739.2006.00565.x
- Méndez-Barredo, L. H. (2011). *Caracterización electrofisiológica del nervio sural de ratas expuestas con semillas de Dioon edule Lindl.* Programa Multidisciplinario de Posgrados en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Moretti, A., Sabato, S., & Siniscalco, G. (1983). Taxonomic significance of methylazoxymethanol glycosides in the cycads. *Phytochemistry*, 22, 4.
- Norstog, K. J., & Nicholls, T. J. (1997). *The Biology of the Cycads*. Ithaca, New York, USA: Cornell University Press.
- Octavio-Aguilar, P. (2009). *Demografía y genética de poblaciones para tres localidades de Dioon edule Lindl. (Zamiaceae) en el estado de Veracruz*. Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz.
- Paredes, L., Hidalgo, V., Vargas, T., & Molinett, A. (2003). Diagnósticos esstructurales en los sistemas de producción de ganadería de doble proposito en el municipio Alberto Aryelo Torrealba del estado Barinas. *Zootecnia Tropical*, 21(21), 87–108.
- Peakal, R., & Smouse, P. E. (2006). GenAIEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1), 288–295. doi:10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
- Piñero et. al, D. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. In conabio (Ed.), *Capital Natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad* (Vol. 1, p. 57). México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Pritchard, J., Wen, X., & Falush, D. (2012). Structure 2.3.4.
- Rubio-Méndez, G. (2010). *Estructura Poblacional de Dioon edule en la Sierra Madre Oriental de San Luis Potosí. Facultad de Ingeniería*. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí.

- Shuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *nature Biotechnology*, 18, 233–234. Retrieved from <http://biotech.nature.com>
- Smith, T., & Smith, R. L. (2007). *Ecología* (6th ed., p. 776). Madrid, España: Pearson Educación, S. A.
- Universidad de Granada. (2013). Análisis de datos multivariados. Retrieved July 09, 2013, from <http://www.ugr.es/~gallardo/#adm>
- Vovides, A. P. (1990). Spatial distribution, Survival and Fecundity of *Dioon edule* (Zamiaceae) in a Tropical Deciduous Forest in Veracruz, México, with notes on its habitat. *American Journal of Botany*, 77(12), 12.
- Wachtler, M. (2010). About the origin of cycads and some enigmatic angiosperm-like fructifications from the early-middle triassic (anisian) braies dolomites (northern Italy). *Dolomythos*, 1, 52.
- Yáñez-Espinosa, L. (2006). *Las Cycadas: biología y conservación en México* (primera., p. 193). Departamento de Publicaciones, Dirección General de Difusión Cultural y Servicio, UACH.
- Yáñez-Espinosa, L. (2009). Chamal (*Dioon edule*) in the state of San Luis Potosí. *the Cycad Newsletter*, 32(2), 3.

Anexos

Anexo 1 Modificaciones al protocolo de extracción de ADN DNeasy Plant Mini.

La extracción de ADN genómico se realizó siguiendo el protocolo proporcionado con el kit DNeasy (Qiagen) el cual fue modificado para obtener mayores cantidades de ADN.

Protocolo de extracción:

1. Triturar 100mg de tejido fresco en nitrógeno líquido con ayuda de mortero y pistilo.
2. Agregar 400 µl de buffer AP1 y 4 µl de RNAsa agitar en un vortex e incubar por 10 minutos a 65°C.
 - Debido a que la cantidad de tejido estaba en el límite máximo de lo que puede ser procesado con este kit, fue necesario aumentar la cantidad de buffer utilizada a 800 µl, así mismo, en lugar de utilizar un vortex se utilizó un disruptor de tejido en el cual se colocaron las muestras por 5 minutos, y enseguida se colocaron en un baño María a 65°C por 30 minutos.
3. Agregar 130 µl de buffer AP2, mezclar e incubar en hielo por 5 minutos, se recomienda centrifugar el sobrenadante por 8 minutos a 14000rpm.
 - Al aumentar la cantidad de buffer AP1, se hizo necesario aumentar también la cantidad de buffer AP2 quedando en 260µl, el tiempo de centrifugación fue de 10 min a 13200 rpm.
4. Transferir el sobrenadante a una columna QIAshredder© y centrifugar por 2 min a 14000 rpm
 - Los tubos con el sobrenadante fueron centrifugados por 2.5 min a 13200 rpm.

5. Transferir el fluido que paso a través de la columna a un tubo cuidando de no tocar el pellet formado. Agregar 1.5 vol. de buffer AP3 y mezclar.
6. Transferir 650µl de la mezcla a una columna DNeasy mini© y centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm, se retira el fluido resultante. Repetir este pasó con la mezcla restante.
7. Transferir la columna a un nuevo tubo colector de 2 ml y agregar 500 µl de buffer AW, y centrifugar por 1 min a 8000 rpm. Retirar el fluido resultante.
8. Agregar otros 500µl de buffer AW y centrifugar por 2 min a 14000rpm
 - El tiempo final de centrifugado fue de 2.5 min a 13200 rpm.
9. Transferir la columna a un nuevo tubo de 2ml y se agregan 100 µl de buffer AE, se incuba 5 min a temperatura ambiente y se centrifuga por 1 minuto a 8000 rpm, este paso se repite dos veces.
 - Se agregaron primero 50 µl de buffer AE y después 25 µl para tener un volumen final de 75µl

El tejido de *Dioon edule* fue preparado para la extracción de ADN removiendo la cutícula que cubre los foliolos y estos fueron triturados en una mortero con nitrógeno líquido. La adición de Buffer AP1 y RNasa en el paso 2 ayuda provocar una lisis celular rompiendo la membrana celular dejando expuesto su contenido, así como a digerir e inactivar el RNA presente. El Buffer AP2 ayuda a precipitar las los polisacáridos y proteínas presentes quedando atrapados en la columna QIAshredder©. El Buffer AP3/E permite la precipitación del ADN en solución y facilita su unión a la membrana de la columna. El Buffer AW se utiliza para eliminar los restos de polisacáridos y proteínas que puedan

quedar adheridos a las moléculas de ADN; por último, el buffer AE es utilizado para la elución final del ADN.

Para cuantificar la concentración y pureza del ADN extraído, se utilizó el equipo Infinite© 200 PRO Nano Quant. Este equipo expone las muestras de ADN a una haz de luz UV de una longitud de onda de 260nm, que corresponde a la máxima absorbancia que presentan la moléculas, mediante la medición de la cantidad de luz absorbida por la muestra, se puede calcular su concentración. Por otro lado, los principales contaminantes del ADN tienen una máxima absorbancia a una longitud de onda de 280, de este modo la pureza de la muestra se determina como el cociente de A_{260}/A_{280} .

Anexo 2 Protocolo de optimización para los primers propuestos por Moynihan et al (2007)

Para determinar la temperatura de hibridación de los primer específicos se utilizó el siguiente protocolo: se probaron las siguientes concentraciones de primer mix (primer forward+primer reverse): 0.5 μ l, 0.8 μ l y 1.0 μ l, en un gradiente de 6 temperaturas (50, 51.7, 54.1, 55.4, 57.9, 59.9°C), obteniendo un total de 18 reacciones simultaneas. Cada reacción contenía 0.25 μ l de dNTP's, 0.125 μ l TAq, 2.5 μ l de buffer estándar para TAq y 2.5 del ADN molde, se aforó a 25 μ l añadiendo agua doble destilada. En algunos casos fue necesario utilizar DMSO (Dimetil sulfóxido) para facilitar la amplificación de los fragmentos de interés. Este solvente orgánico actúa afectando la estabilidad térmica de los primers y de la TAq polimerasa incrementando la especificidad de la amplificación. En la Tabla 10 se muestran los primer utilizados y las condiciones para su hibridación

Tabla 10. Primers utilizados para determinar el polimorfismo en *Dioon edule*

Primer	Secuencia	Repetición	Núm. alelos	tamaño (BP)	Temperatura de hibridación	Primer mix vol.
ED9 Fwd	5'-CCTTGTGTTACTTTGAGCACC-3'	(CAT)9int	5	244-268	60°C	0.8µl
ED9 Rev	5'-CAACAATGTAAGTGATGATGCC-3'					
CAP5 Fwd	5'-CACTACCACCCCTATACCAC-3'	(CT)23	3	225-241	58°C	0.5µl
CAP5 Rev	5'-GACTTGAGCTTGTCTTTGTTG-3'					
TOM5 Fwd	5'-CGTTTCCATTGGAGAGACAAG-3'	(TC)23	2	224-226	56°C	0.5µl
TOM5 Rev	5'-CCATCCAAGTGAGTGATACAAG-3'					

Anexo 3 Frecuencia alélica de tres loci en tres categorías de edad y tres poblaciones de

Dioon edule

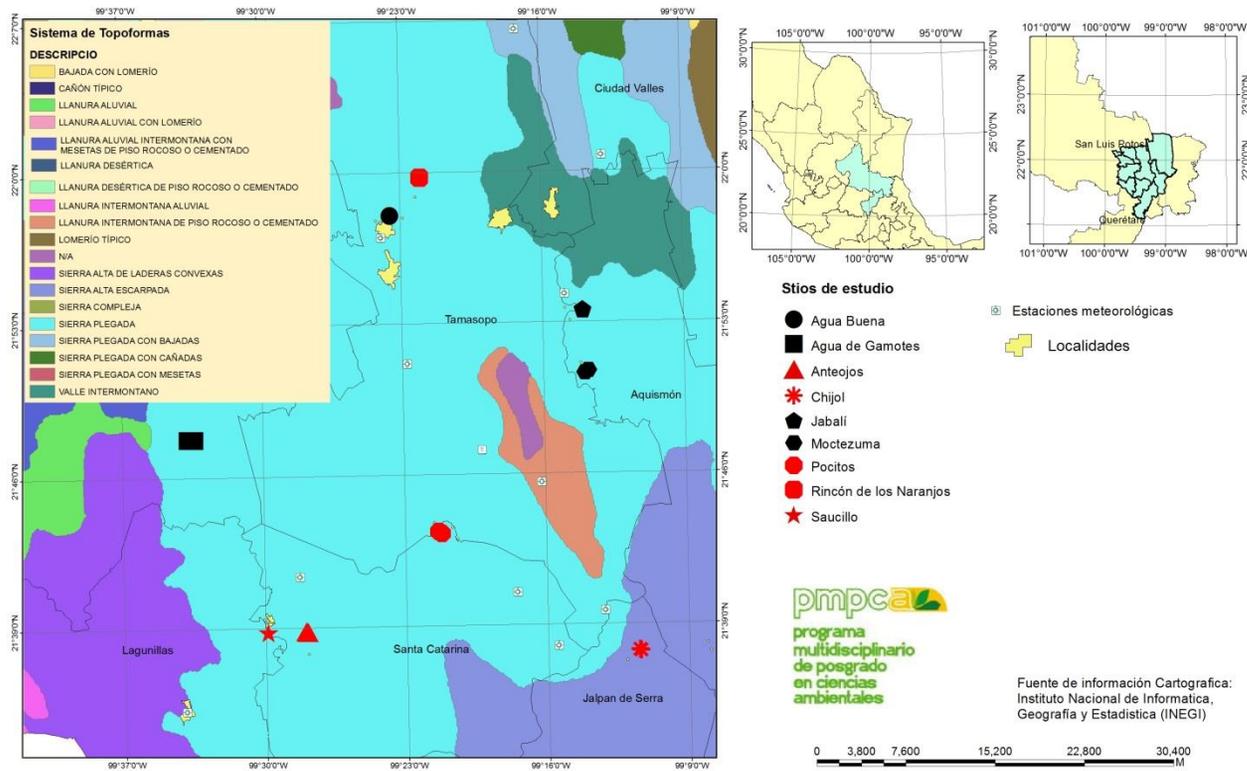
	Locus	Alelo	Chijol	Rincón	Pocitos	Anteojos	Saucillo	
Adultos	CAP5	246	0.429	0.857	0.857	0.833	0.167	
		248	0.571	0.143	0.143	0.167	0.833	
		285	0.214	0.143	0.143	0.214	0.200	
	ED9	288	0.286	0.357	0.571	0.429	0.400	
		291	0.143	0.071	0.000	0.000	0.000	
		294	0.000	0.000	0.071	0.000	0.300	
		297	0.000	0.000	0.000	0.286	0.100	
		300	0.357	0.429	0.214	0.071	0.000	
		TOM5	245	0.286	0.000	0.286	0.571	0.571
			247	0.714	1.000	0.714	0.286	0.429
	251		0.000	0.000	0.000	0.143	0	
	Juvenil	CAP5	244	0.083	0.143	0.000	0.000	0.000
			246	0.750	0.429	0.857	0.500	0.000
248			0.167	0.429	0.143	0.500	1.000	
ED9		279	0.083	0.000	0.000	0.000	0.000	
		282	0.167	0.000	0.000	0.125	0.000	
		285	0.167	0.333	0.357	0.125	0.167	
		288	0.417	0.333	0.500	0.375	0.250	
		291	0.167	0.167	0.000	0.125	0.167	
		294	0.000	0.000	0.000	0.000	0.167	
		297	0.000	0.000	0.000	0.000	0.167	
TOM5		300	0.000	0.167	0.143	0.250	0.083	
		245	0.429	0.000	0.429	0.429	0.143	
		247	0.571	1.000	0.571	0.286	0.857	
	249	0.000	0.000	0.000	0.286	0.000		
	Plántula	CAP5	246	0.571	0.857	1.000	1.000	0.167
			248	0.429	0.143	0.000	0.000	0.833
ED9		282	0.083	0.083	0.000	0.000	0.000	
	285	0.250	0.083	0.143	1.000	0.583		
	288	0.167	0.500	0.500	0.000	0.333		
	291	0.250	0.000	0.000	0.000	0.000		
	294	0.000	0.000	0.143	0.000	0.000		
	297	0.000	0.000	0.000	0.000	0.083		
		300	0.250	0.333	0.214	0.000	0.000	

Estudio para la conservación a largo plazo de *D. edule*

	TOM5	245	0.286	0.000	0.429	0.571	0.571
		247	0.571	0.929	0.429	0.429	0.286
		249	0.000	0.071	0.071	0.000	0.143
		253	0.143	0.000	0.071	0.000	0.000

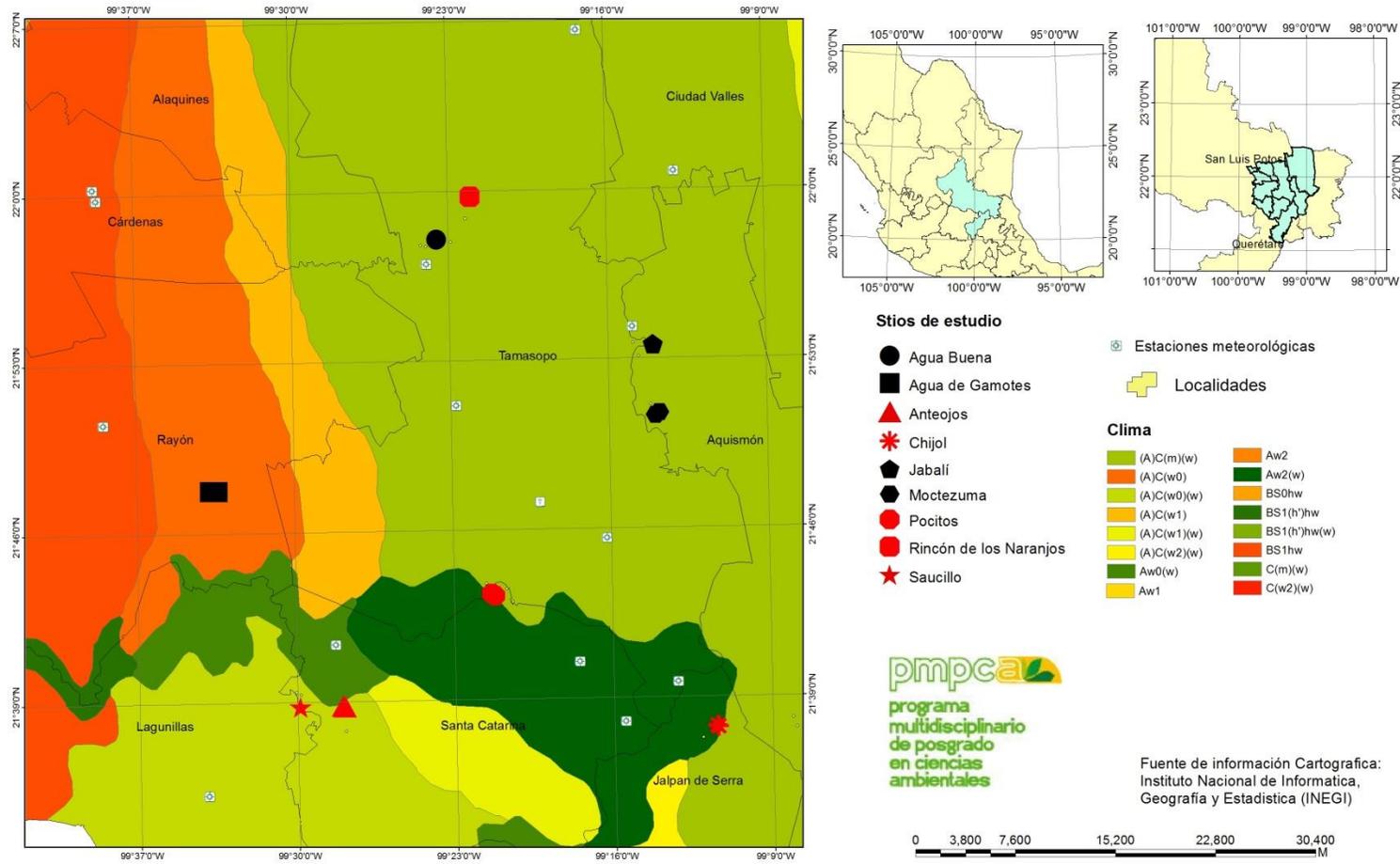
Anexo 4. Variables utilizadas en el análisis CAJ

Sitios de Estudio



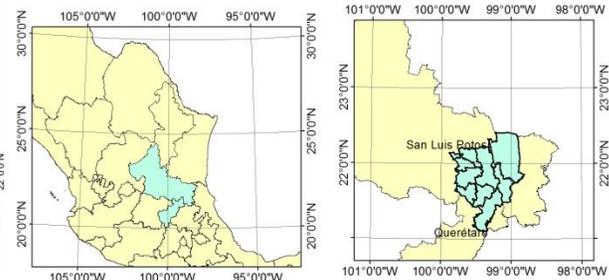
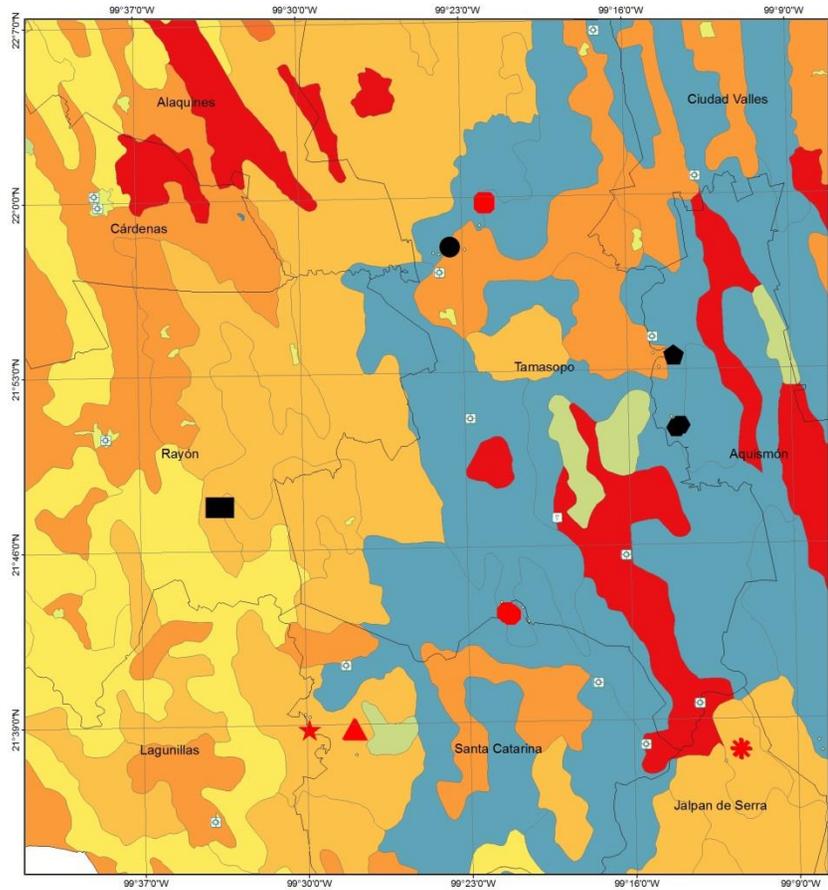
Sistema de Topoformas

Sitios de Estudio



Clima

Sitios de Estudio



Sitios de estudio

- Agua Buena
- Agua de Gamotes
- ▲ Antejos
- * Chijol
- ◆ Jabalí
- Moctezuma
- Pocitos
- Rincón de los Naranjos
- ★ Saucillo

⊠ Estaciones meteorológicas

⊕ Localidades

Vegetación y uso de suelo

- | | |
|---------------------|-----------------------------|
| ■ AREA AGRICOLA | ■ CUERPO DE AGUA |
| ■ AGRICOLA-PASTIZAL | ■ MATORRAL |
| ■ AGRICOLA-SELVA | ■ OTROS TIPOS DE VEGETACION |
| ■ AREA URBANA | ■ PASTIZAL |
| ■ BOSQUE | ■ SELVA |
| ■ SELVA-PASTIZAL | ■ SELVA-AREA AGRICOLA |



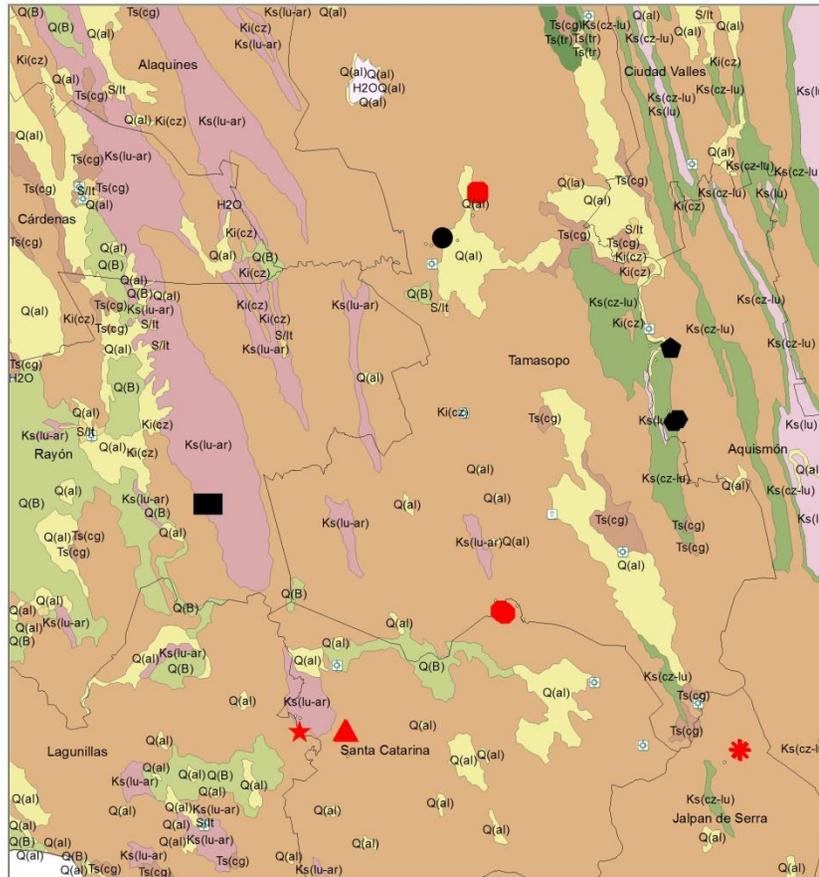
Fuente de información Cartográfica:
Instituto Nacional de Informática,
Geografía y Estadística (INEGI)



Vegetación

Estudio para la conservación a largo plazo de *D. edule*

Sitios de Estudio



Sitios de estudio

- Agua Buena
- Agua de Gamotes
- ▲ Anteosojos
- ★ Chijol
- ⬠ Jabalí
- ⬡ Moctezuma
- Pocitos
- Rincón de los Naranjos
- ★ Saucillo

- ⊠ Estaciones meteorológicas
- ⊠ Localidades



Fuente de información Cartográfica:
Instituto Nacional de Informatica,
Geografía y Estadística (INEGI)



Geología

