

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO EN CIENCIAS FORESTALES

Estructura poblacional y diversidad genética de *Dioon holmgrenii*

Mario Valerio Velasco García

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2016

La presente tesis titulada: **Estructura poblacional y diversidad genética de *Dioon holmgrenii*** realizada por el alumno: **Mario Valerio Velasco García**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
EN CIENCIAS FORESTALES

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Carlos Ramírez Herrera

ASESOR



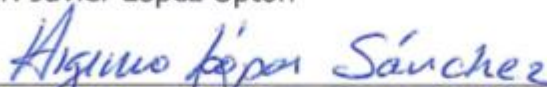
Dr. Juan Ignacio Valdez Hernández

ASESOR



Dr. Javier López Upton

ASESOR



Dr. Higinio López Sánchez

ASESOR



Dr. Lauro López Mata

Montecillo, Texcoco, Estado de México, noviembre de 2016.

ESTRUCTURA POBLACIONAL Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Dioon holmgrenii*
Mario Valerio Velasco García, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2016

RESUMEN

Dioon holmgrenii De Luca, Sabato & Vázq. Torres está en peligro de extinción, es endémica y de distribución restringida en el sur de Oaxaca, México. A pesar de lo anterior no existe información sobre su estructura poblacional y diversidad genética, que permita precisar el nivel de riesgo de extinción de la especie. Los objetivos de este trabajo fueron: 1) conocer la estructura, heterogeneidad de estadios y el patrón de dispersión espacial y 2) determinar la diversidad genética y diferenciación entre poblaciones de *D. holmgrenii*. Unidades de muestreo se establecieron en sitios sin cambio aparente (SCUS) y con cambio de uso de suelo (CCUS) en 10 poblaciones para obtener la estructura poblacional y la dispersión espacial de los individuos. Foliolos de 285 plantas se recolectaron en nueve poblaciones y seis loci microsatélites se usaron para analizar la diversidad y estructura genética. La densidad promedio de individuos fue mayor en sitios SCUS que CCUS (782 vs. 353 plantas ha⁻¹). Porcentaje alto de plántulas y adultos, con porcentaje bajo de plantas, juveniles y pre-reproductivos se registraron en sitios SCUS; porcentaje alto de adultos con porcentaje bajo de plántulas, juveniles y pre-reproductivos se hallaron en sitios CCUS. La heterogeneidad de estadios fue mayor en sitios SCUS que sitios CCUS ($H' = 1.57$ vs. 1.38, $p = 0.048$). La semejanza dentro de sitios en SCUS ($I_{M-H} = 0.93$, $IS_{ct} = 0.81$) y CCUS ($I_{M-H} = 0.83$, $IS_{ct} = 0.61$) fue mayor que entre ambas condiciones ($I_{M-H} = 0.70$, $IS_{ct} = 0.53$). La dispersión espacial de los individuos fue agregada (65 %). En las poblaciones de *D. holmgrenii* el número total de alelos varió de 20 a 39. El porcentaje de loci polimórfico varió de 83 a 100 %, la heterocigocidad promedio esperada de 0.496 a 0.790, heterocigocidad promedio observada de 0.610 a 0.978, índice de fijación de -0.601 a -0.091, el número promedio

de alelos por locus de 3.3 a 6.5 y el índice de diversidad de Shannon de 0.899 a 1.651. Exceso de individuos heterocigotos se encontró a nivel población ($F_{IS} = -0.287$) y déficit de individuos heterocigotos ($F_{IT} = 0.071$) se encontró al considerar las nueve poblaciones juntas. La diferenciación genética entre poblaciones fue alta ($F_{ST} = 0.287$) con un número de migrantes menor a uno. Las distancias genéticas de Nei y los componentes principales (uno y dos) de los parámetros de diversidad genética agruparon a las poblaciones en dos grupos. Los resultados mostraron que las perturbaciones humanas disminuyen la calidad del hábitat para *D. holmgrenii*, siendo las plántulas y los juveniles los más afectados. La diversidad genética y la diferenciación entre poblaciones de *D. holmgrenii* fueron altos.

Palabras clave: cambio de uso de suelo, densidad, distancia genética, índice de Shannon, heterocigocidad, semejanza.

POPULATION STRUCTURE AND GENETIC DEVERSTY OF *Dioon holmgrenii*

Mario Valerio Velasco García, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2016

ABSTRACT

Dioon holmgrenii De Luca, Sabato & Vázq. Torres is an endangered and endemic species that grows in the south of Oaxaca, Mexico although there is no information about its population structure and genetic diversity that allows knowing the level of risk of extinction of the species. The aims of the present research were: 1) to know the structure, heterogeneity of stages, and the pattern of spatial dispersion; 2) to determine the genetic diversity and differentiation among populations of *D. holmgrenii*. Sampling plots were set in conditions without an evident change of land use (SCUS) and with an evident change of land (CCUS) use in ten populations. The DNA was extracted from leaflets of 285 plants from nine populations, and six microsatellite loci were selected to estimate diversity and genetic structure. The average plant density was higher in SCUS sites than that in CCUS (782 vs. 353 plants ha⁻¹). A high seedling percentage, high mature plant percentage, low pre-reproductive percentage and low juvenile plant percentage grew in SCUS; however, a high mature plant percentage, low seedling percentage, low sapling percentage and low pre-reproductive plant percentage occurred in CCUS. The stage heterogeneity was higher in SCUS than that in CCUS ($H' = 1.57$ vs. 1.38). The similarity was higher in SCUS ($I_{M-H} = 0.93$, $I_{S_{CT}} = 0.81$) and CCUS ($I_{M-H} = 0.83$, $I_{S_{CT}} = 0.61$) than that between both conditions ($I_{M-H} = 0.70$, $I_{S_{CT}} = 0.53$). The spatial-dispersion pattern of individuals was aggregate (65 %). *D. holmgrenii* populations had a number of alleles that varied from 20 to 39. Percentages of polymorphic loci were between 83 and 100 %; expected heterozygosity ranged from 0.496 to 0.790; observed mean heterozygosity fluctuated from 0.610 to 0.978; fixation

index ranged between -0.601 and -0.091; the average number of alleles per locus varied from 3.3 to 6.5, and the Shannon diversity index fluctuated from 0.899 to 1.650. An excess of heterozygotes was found in the population level ($F_{IS} = -0.287$), and a deficit of heterozygotes ($F_{IT} = 0.071$) was noticed by considering the nine populations together. The genetic differentiation among populations was high ($F_{ST} = 0.287$). The number of migrants was less than one. Nei genetic distances and the main component of genetic diversity parameters clustered the *D. holmgrenii* populations in two groups. The human disturbances decreased the habitat quality for *D. holmgrenii*. Seedlings and juveniles were the mainly affected. The genetic diversity and differentiation among *D. holmgrenii* populations were high.

Key words: density, heterozygosity, genetic distance, land use change, Shannon index, similarity.

DEDICADO A:

Mis amados y adorados: hijos (J.E. y H.A.) y esposa.

Mis queridos padres, hermanas, hermanos, sobrinos y sobrinas.

La familia Hernández Hernández y sus descendientes.

Quienes luchan por una sociedad con igualdad y sin clases.

Quienes fomentan y realizan el manejo adecuado de la biodiversidad.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Ramírez Herrera, por su dirección, consejo y amistad. Así como por la confianza que me brindó.

Al Dr. Juan Ignacio Valdez Hernández, por dirigir el capítulo I y por la revisión de la tesis.

Al Dr. Javier López Upton, por las revisiones y por estar siempre al pendiente.

Al Dr. Higinio López Sánchez, por sus aportes en el capítulo II, revisión de la tesis y por fomentar la visión filosófica.

Al Dr. Lauro López Mata, por sus revisar la tesis y por sus aportaciones.

A la Ing. Ma. Luisa Hernández H., por participar y financiar los muestreos de campo del capítulo I, así como por respaldarme en todo el doctorado.

A Laura Carrillo Reyes, por sus invaluable enseñanzas, asesorías y consejos durante la fase de laboratorio del capítulo II (extracción de ADN y PCR), así como por sus recomendaciones en el análisis de datos del mismo capítulo.

Al C. Dr. Oscar G. Vázquez C. y M.C. Norma B. Mendoza H., por el gran apoyo en los trabajos de laboratorio y por apoyar a mi familia.

A la M.C. Edith Cruz M., por sus enseñanzas y consejos sobre electroforesis con geles de agarosa.

Al M.C. Héctor Luis Chincoya, por su apoyo y asesoría en el análisis de datos genéticos con el programa estadístico PopGene.

Al Biol. Eduardo García M., Ing. Silvestre B., Lic. Juan L. Hernández H., Lic. Edgar López V. e Ing. Janet Díaz R., por apoyar en los muestreos de capo.

A la Dra. Hilda Rojas, por apoyar con el secuenciador de ADN para la lectura de fragmentos, así como a Berenice, por apoyar en el mismo proceso.

A las autoridades y poseedores que otorgaron los permisos, así como a los guías de campo y quienes apoyaron en la toma de datos, hospedaje y alimentación durante la toma de datos y muestreos de material vegetal: José Baños Santos, Carmen Baños, Juan Cruz González, Isaías Solano Vargas, Florentino Solano Vargas, Gilberto Molina Osorio, Jerónimo Hernández Cruz, Ventura Velasco, Eulogio Santiago Reyes, Gilberto Hernández, Galdino Diego, Prof. Isidro Jiménez Pacheco, Alfonso Ramos García, Herminio López Martínez, Elena León, Julián Sánchez, Moisés Sánchez, Dionicio Jiménez, Víctor Diego Jiménez, Eugenio Gaspar Zurita, Juan Mata Gaspar, Gumersindo Reyes, Abel Jiménez García, Carlos Hernández Santos, Marcelino Osorio, Carlos Hernández, José Olivera, Teodoro Diego Jiménez, Ulmaro Hernández Nicolás, Rogelio Hernández Nicolás, Heladio Ramírez Gómez, Neftalí Jiménez Jiménez y esposa (Sra. Ulda), Rodolfo Jiménez, Sra. Emeteria, Sr. Cirilo y muchas más personas que apoyaron.

Al CONACyT, por la beca otorgada para realizar estudios de doctorado, así como al Colegio de Postgraduados, por contribuir en mi formación científica.

Al “Fideicomiso Revocable de Administración en Inversión No. 167304 para el Establecimiento y Operación de los Fondos para la Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del Colegio de Postgraduados, Modalidad 3”, por el apoyo económico para la toma de datos de campo del capítulo I.

Al Dr. Gregorio Ángeles Pérez, por su apoyo y asesoría en el uso del programa para análisis de distribución espacial del capítulo I.

Al Dr. Amalio Santacruz Varela, por su asesoría y valiosas recomendaciones sobre el trabajo de laboratorio del capítulo II.

Al C. Dr. Guillermo Sánchez de la Vega, Prof. Edwin Jiménez, Biol. Eduardo García Molina, Dr. Noé Ruiz García, Ing. Ignacio Mejía Cuevas, Dr. Carlos A. Ruiz Jiménez, Ing. Brenda Y. Méndez Pérez, y muchas personas más, quienes antes de este proceso participaron en la ubicación de las poblaciones y en la idea de investigar las cícadas de las regiones Sierra Sur y Costa de Oaxaca.

A mi suegra y cuñados (Lic. Ma. Isabel y Lic. Juan L.), por asignar su tiempo en la atención de mis hijos en los momentos complicados de esta etapa.

A mis padres, hermanas, hermanos, cuñados, cuñadas, sobrinas, sobrinos y demás familiares, por todo el apoyo y palabras de aliento.

A la familia Santiago Garduño, por todo el apoyo, atenciones y amistad.

Al M.C. Leodan Tadeo y familia, por todo su apoyo y amistad.

A mis compañeros del posgrado M.C. Mónica Méndez N., M.C. Liliana y M.C. Edgar Máximo, así como al M.C. Nicolás Leal, M.C. Pedro, M.C. Oscar, por el apoyo y amistad.

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Planteamiento del problema	1
Objetivos	3
Hipótesis	3
Revisión de literatura	4
Literatura citada	6
CAPÍTULO I. ESTRUCTURA, HETEROGENEIDAD DE ESTADIOS Y PATRÓN DE DISPERSIÓN ESPACIAL DE <i>DIOON HOLMGRENII</i> (ZAMIACEAE)	13
Resumen	13
Abstract	14
Introducción	15
Materiales y métodos.....	16
Muestreo y medición de variables.....	16
Estructura poblacional	19
Heterogeneidad y semejanza de estadios	20
Patrón de dispersión espacial	20
Resultados	21
Estructura poblacional	21
Heterogeneidad y semejanza de estadios	22

Patrón de dispersión espacial	22
Discusión	28
Estructura poblacional	28
Heterogeneidad y semejanza de estadios	34
Patrón de dispersión espacial	34
Conclusiones	37
Agradecimientos	37
Literatura citada	38
CAPÍTULO II. DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE <i>DIOON</i> <i>HOLMGRENII</i> (CYCADALES: ZAMIACEAE)	46
Resumen	46
Abstract	47
Introducción	48
Materiales y métodos	50
Muestreo	50
Extracción de ADN	50
Selección, análisis y detección de microsatélites	50
Análisis de datos	53
Resultados	54
Diversidad genética	54
Estructura genética	57

Discusión	59
Diversidad genética	59
Estructura genética	63
Conclusiones	66
Agradecimientos	67
Literatura citada	67
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES	76
Conclusiones	76
Recomendaciones	76

LISTA DE CUADROS DEL CAPÍTULO I

	Página
Cuadro 1. Atributos estructurales de <i>Dioon holmgrenii</i> por grados de perturbación en sitios sin (SCUS) y con cambio de uso de suelo (CCUS), considerando por separado individuos reproductivos y no reproductivos. Medias por individuo: DB = diámetro basal (cm), At = altura de tallo (m), DC = diámetro de copa (m), AC = área de copa (m ²), NH = número de hojas. Medias ha ⁻¹ : De = densidad (individuos), AB = área basal (m ²), CC = cobertura de copa (m ²). †Medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$). ...	23
Cuadro 2. Índice de valor de importancia (IVI) e índice de valor forestal (IVF) de los estadios de <i>Dioon holmgrenii</i> en sitios sin cambio aparente de uso de suelo (SCUS) y con cambio de uso de suelo (CCUS). Estadios: Pl = plántula, J1 =	

juvenil 1, J2 = juvenil 2, Pr = pre-reproductivos, A1 = adultos 1, A2 = adultos 2, A3 = adultos 3, A4 = adultos 4). †Medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$)..... 25

Cuadro 3. Indicadores de significancia del índice de heterogeneidad H' y los coeficientes de semejanza (I_{M-H} : Morisita-Horn, I_{Scl} : Sørensen cuantitativo) de estadios de *Dioon holmgrenii*. SCUS = sin cambio aparente de uso de suelo, CCUS = con cambio de uso de suelo. †Valor t de tablas con grados de libertad infinito: $\alpha 0.01 = 2.236$ y $\alpha 0.05 = 1.645$ 27

LISTA DE CUADROS DEL CAPÍTULO II

	Página
Cuadro 1. Características de los iniciadores de microsatélites SSR para nueve poblaciones de <i>Dioon holmgrenii</i> . F= iniciador hacia adelante, R = iniciador en reversa, TA = temperatura de alineamiento.	52
Cuadro 2. Número y clase de alelos encontrados en nueve poblaciones de <i>Dioon holmgrenii</i>	54
Cuadro 3. Diversidad genética de nueve poblaciones de <i>Dioon holmgrenii</i> . PLP: porcentaje de loci polimórficos, NA: número de alelos por locus, Ho: heterocigocidad observada, He: heterocigocidad esperada, IF: índice de fijación, H' = índice de diversidad de Shannon, CP1 = componente principal	

de los índices de diversidad. †Medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$)	55
Cuadro 4. Valores de los estadísticos F de Wright y número de migrantes por generación (Nm) para seis loci en nueve poblaciones de <i>Dioon holmgrenii</i> . F _{IS} : coeficiente de fijación a nivel población, F _{IT} : coeficiente de fijación total, F _{ST} : coeficiente de fijación entre poblaciones.	57
Cuadro 5. Distancias genéticas de Nei entre nueve poblaciones de <i>Dioon holmgrenii</i>	58

LISTA DE FIGURAS DEL CAPÍTULO I

	Página
Figura 1. Ubicación de 10 poblaciones de <i>Dioon holmgrenii</i> estudiadas en el sur de Oaxaca, México.	18
Figura 2. Densidad de individuos de <i>Dioon holmgrenii</i> por grados de perturbación en sitios sin cambio aparente de uso de suelo (SCUS) y con cambio de uso de suelo (CCUS) en el sur de Oaxaca, México.	21
Figura 3. Densidad promedio (barras, escala izquierda) y curva de estructura poblacional (líneas punteadas, escala derecha) por estadios (P1 = plántula, J1 = Juvenil 1, J2 = juvenil 2, Pr = pre-reproductivos, A1 = adultos 1, A2 = adultos 2, A3 = adultos 3, A4 = adultos 4) de <i>Dioon holmgrenii</i> en sitios sin cambio aparente de uso de suelo (SCUS 1, 2, y 3) y con cambio de uso de suelo (CCUS 1, 2 y 3).	24

Figura 4. Matriz del patrón de dispersión espacial de <i>Dioon holmgrenii</i> (A: proyección de copa de individuos reproductivos, B: ubicación de individuos no reproductivos) en tres grados de perturbación en sitios sin cambio aparente de uso de suelo (SCUS 1, 2 y 3), con índices $L_{(t)}$ de Ripley e I_s de Morisita (ns: no significativo al patrón de dispersión aleatorio con $P \leq 0.01$).	26
Figura 5. Matriz del patrón de dispersión espacial de <i>Dioon holmgrenii</i> (A: proyección de copa de individuos reproductivos, B: ubicación de individuos no reproductivos) en tres grados de perturbación en sitios con cambio de uso de suelo (CCUS 1, 2 y 3), con índices $L_{(t)}$ de Ripley e I_s de Morisita (ns: no significativo al patrón de dispersión aleatorio con $p \leq 0.01$).	28

LISTA DE FIGURAS DEL CAPÍTULO II

	Página
Figura 1. Agrupamiento de nueve poblaciones de <i>Dioon holmgrenii</i> con base en dos componentes principales (CP1 y CP2) de los parámetros de diversidad genética (PLP = porcentaje de loci polimórficos, N_a = número de alelos por locus, H_o = heterocigocidad observada, H_e = heterocigocidad esperada, H' = índice de diversidad de Shannon, IF = índice de fijación).	56
Figura 2. Relación entre distancias genéticas y distancias geográficas para las poblaciones de <i>Dioon holmgrenii</i>	59
Figura 3. Agrupamiento de nueve poblaciones de <i>Dioon holmgrenii</i> con base en las distancias genéticas de Nei, mediante el método de agrupamiento UPGMA.	60

INTRODUCCIÓN GENERAL

Planteamiento del problema

El orden Cycadales es un grupo ancestral de plantas con semillas que se originaron en el periodo pérmico y posiblemente en el carbonífero de la era paleozoica, hace 280 a 345 millones de años (Ma) (Mamay, 1976; Zhifeng y Thomas, 1989; Condamine *et al.*, 2015); este orden, actualmente, consta de dos familias (Cycadaceae y Zamiaceae), 10 géneros y 331 especies (Christenhusz *et al.*, 2011; Osborne *et al.*, 2012). Muchas especies son endémicas, raras y de distribución restringida (Donaldson, 2003) y 82 % de éstas están amenazadas por la destrucción del hábitat y la extracción ilegal (Donaldson, 2003).

La familia Zamiaceae se originó al final del pérmico de la era paleozoica, hace 258 Ma, mientras que el género *Dioon* Lindl. apareció en el cretácico inferior de la era mesozoica, hace 144 Ma (Dawson, 1983; Condamine *et al.*, 2015). Los cicadales, además de su importancia evolutiva debido a su origen ancestral (Mamay, 1976; Zhifeng y Thomas, 1989; Condamine *et al.*, 2015), mantienen interacciones especializadas con otros organismos para dispersión de semillas, polinización, obtener nitrógeno y agua, y constituyen el único alimento para algunas especies de mariposas (Pérez-Farrera *et al.*, 2006; Fisher y Vovides, 2004; Terry *et al.*, 2012; Ruiz-García *et al.*, 2015). Las plantas se usan como ornamentales y los tallos y hojas para decoraciones en festividades religiosas, mientras que las semillas son medicinales y comestibles (Vovides y Peters, 1987; Vovides, 2000; Pérez-Farrera y Vovides, 2004; Chemnick, 2013).

México ocupa el segundo lugar en diversidad de cícadas con 54 especies de los géneros *Ceratozamia* Brongn., *Dioon* y *Zamia* L., de la familia Zamiaceae, de las cuales 88.9 % son endémicas (Osborne *et al.*, 2012; Nicolalde-Morejón *et al.*, 2014). Al igual que en todo el mundo (Donaldson, 2003), la destrucción del hábitat ocasionada por cambio de uso de suelo, comercio ilegal e incendios han provocado que la mayoría de las especies mexicanas estén amenazadas o en

peligro de extinción (Vovides e Iglesias, 1994; SEMARNAT, 2010; Lázaro-Zermeño *et al.*, 2012; Nicolalde-Morejón *et al.*, 2014). Oaxaca y Veracruz son los estados con mayor diversidad de especies de Zamiaceae (Osborne *et al.*, 2012; Chemnick, 2013); el primero cuenta con mayor número de endemismos (Nicolalde-Morejón *et al.*, 2014). Siete de las 13 especies mexicanas del género *Dioon* se distribuyen en el estado de Oaxaca (Nicolalde-Morejón *et al.*, 2014).

Dioon holmgrenii De Luca, Sabato & Vázq. Torres es endémica de las subprovincias fisiográficas Sierra Madre del Sur y Planicies Costeras del Pacífico (*sensu* Ortiz-Pérez *et al.*, 2004) en el estado de Oaxaca, México (De Luca *et al.*, 1981; Velasco-García *et al.*, 2011). La situación de esta especie es crítica debido a la fragmentación de su hábitat para la agricultura y el pastoreo (Chemnick *et al.*, 2010; Vovides y Nicolalde-Morejón, 2010); aproximadamente el 80 % de la superficie tiene algún grado de perturbación (Velasco-García *et al.*, 2011). Por lo anterior, *D. holmgrenii* está listada en el apéndice II de CITES y catalogada como en peligro de extinción por la NOM-059-SEMARNAT-2010 y la UICN (CITES, 2015; Chemnick *et al.*, 2010; SEMARNAT, 2010).

A pesar de lo anterior no se han realizado estudios suficientes para generar conocimiento sobre la ecología y la diversidad genética de *D. holmgrenii*. Esta especie fue descrita en el Rancho el Limón, al sur de San Gabriel Mixtepec, Oaxaca en el año de 1981 (De Luca *et al.*, 1981), hasta el año 2008 una segunda población denominada Loxicha se reportó (González-Astorga *et al.*, 2008), y para el año 2011 otras 11 poblaciones de *D. holmgrenii* se ubicaron (Velasco-García *et al.*, 2011).

Para ninguna de las 13 poblaciones de *D. holmgrenii* conocidas, las cuales cubren una superficie estimada de 3,677 ha (Velasco-García *et al.*, 2011), se conoce su estructura poblacional y el patrón de dispersión espacial de los individuos; tampoco se conoce la magnitud y el efecto real de los disturbios en las poblaciones de esta especie. Esta planta posee una capacidad reproductiva limitada, por lo que la hace sumamente vulnerable al disturbio humano. La información que existe

sobre diversidad genética del género *Dioon* se ha generado con marcadores isoenzimáticos, pero no existe información sobre la estructura genética del género *Dioon* con marcadores microsatélites. La diversidad genética de solo dos poblaciones de *D. holmgrenii* se determinó (González-Astorga *et al.*, 2008; Prado *et al.*, 2016), sin embargo, no existe información para 11 de las 13 poblaciones de *D. holmgrenii* (Velasco-García *et al.*, 2011), por lo que no se conoce la estructura genética y el grado de diferenciación de todas las poblaciones, así como la posible relación entre la diversidad genética con el tamaño de ellas y su grado de perturbación.

El conocimiento de la estructura poblacional y dispersión espacial de los individuos, así como de la diversidad genética y estructura genética de todas las poblaciones analizada mediante marcadores microsatélites es importante para proponer planes de manejo de esta especie.

Objetivos

Los objetivos de esta investigación fueron:

1. Determinar la estructura poblacional, heterogeneidad de estadios y el patrón de dispersión espacial de *D. holmgrenii* con énfasis en las diferencias entre sitios sin cambio aparente de uso de suelo (SCUS) y con cambio de uso de suelo (CCUS) con diferentes grados de perturbación.
2. Estimar la diversidad y la estructura genética de nueve poblaciones de *D. holmgrenii* con marcadores microsatélites.

Hipótesis

1. Cambios en la estructura, heterogeneidad de estadios y en la dispersión espacial de los individuos se espera encontrar entre las unidades de muestreo sin cambio aparente de uso de suelo (SCUS) y las unidades de muestro con cambio de uso de suelo (CCUS) debido a la perturbación ocasionada por la agricultura y la ganadería.

2. La diversidad genética en las poblaciones pequeñas se espera que sea baja debido al nivel de endogamia alto, mientras que la diferenciación genética será alta como consecuencia de la fragmentación y el aislamiento entre poblaciones.

Revisión de literatura

Los estudios de estructura poblacional de las especies proporcionan información para analizar la persistencia o la vulnerabilidad de extinción de especies en riesgo (Kwit *et al.*, 2004; Álvarez-Yépiz *et al.*, 2011; Rivera-Fernández *et al.*, 2012). Mientras que, el conocimiento de la magnitud y distribución de la diversidad genética de las poblaciones de las especies es elemental para diseñar planes de conservación y manejo (Frankham *et al.*, 2002; Rao y Hodgkin, 2002; Diniz-Pilho *et al.*, 2012).

Para *D. homgrenii* no se han realizado estudios sobre estructura poblacional, sin embargo, en otras especies de cícadras varios estudios sobre estructura poblacional se han realizado con el fin de conocer el estado de las poblaciones y generar información para manejo de éstas, entre las cuales destacan las que se describieron por clases de diámetro basal (Pérez-Farrera *et al.*, 2000), de altura (Vovides, 1990; Pérez-Farrera *et al.*, 2006), número de hojas (Negrón-Ortiz y Breckon, 1989; López-Gallego, 2008), clases de tamaños o estadios (Raimondo y Donalson, 2003; Lázaro-Zermeño *et al.*, 2011; Rivera-Fernández *et al.*, 2012) y los que consideraron más de una de estas clases (Watkinson y Powell, 1997; Pérez-Farrera y Vovides, 2004; Yáñez-Espinosa y Sosa-Sosa, 2007). La estructura poblacional de *Ceratozamia mexicana* Brong. (Alejandre-Rosas *et al.*, 1990) y *Dioon spinulosum* Dyer ex Eichler (Salomé-Castañeda, 2009) se estudió con base en clases de diámetro, altura, número de hojas y estadios; el tipo de curva de estructura poblacional fue el mismo en todos los casos. Diferentes tipos de curvas de estructura se obtienen con base en el parámetro que se use para estudiar la estructura poblacional. Estas curvas representan la dinámica de

reincorporación de los individuos a los siguientes estadios y pueden dar información sobre la capacidad de reproducción de la especie y el efecto de las perturbaciones o limitantes ambientales sobre las poblaciones (Bongers *et al.*, 1988; Peters, 1994; Martínez-Ramos y Álvarez-Buylla, 1995). En otras especies de cícadas, algunos estudios se han realizado para conocer las diferencias en la estructura poblacional de sitios con diferentes niveles de perturbación, entre éstos destacan los realizados para *Ceratozamia mirandae* Vovides, Pérez-Farr. & Iglesias, *Zamia melanorrhachis* D.W. Stev., y *Ceratozamia mexicana* (Pérez-Farrera *et al.*, 2006; López-Gallego, 2008; Rivera-Fernández *et al.*, 2012). Esta información puede ser de mucha utilidad; sin embargo, considerando los niveles de perturbación al que están sujetas las poblaciones de cícadas mexicanas, una evaluación más detallada donde se considere el gradiente del grado de perturbaciones es necesaria.

La diversidad y estructura genética de las cícadas se evaluó en varios estudios, la mayoría de estos con marcadores isoenzimáticos, RAPS, AFLPs e ISSR, pero evaluaciones con microsatélites SSR aún son escasos, especialmente para el género *Dioon*. En cícadas del género *Cycas* L. se encontró que la diversidad genética fue baja (Keppel, 2002; Xiao *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2005), sin embargo, varios trabajos demostraron que el género *Dioon* conserva niveles de diversidad altos (González-Astorga *et al.*, 2003, 2005, 2008; Cabrera-Toledo *et al.*, 2008, 2010; Prado *et al.*, 2016). La diversidad genética de las poblaciones Rancho el Limón y San Bartolomé (Loxicha) de *D. holmgrenii* se determinó y se comparó con la diversidad genética de *D. sonorensis* (De Luca, Sabato & Vázq. Torres) Chemnick, Gregory & S. Salas-Mor., *D. tomasellii* De Luca, Sabato & Vázq. Torres (González-Astorga *et al.*, 2008), *D. angustifolium* Miq. y *D. spinulosum* (Prado *et al.*, 2016).

Literatura citada

- Alejandro-Rosas J.A., Sánchez-Tinoco M.Y. y Vázquez-Torres M. 1990. Estructura poblacional de *Ceratozamia mexicana* Brongn. (Zamiaceae) en un bosque del centro de Veracruz. *La Ciencia y el Hombre* **5**:93-112.
- Álvarez-Yépiz J.C., Dovčiak M., and Búrquez A. 2011. Persistence of a rare ancient cycad: Effect of environment and demography. *Biological Conservation* **114**:122-130.
- Bongers F., Popma J., Meave-del Castillo J., and Carabias J. 1988. Structure and floristic composition of the lowland rain forest of Los Tuxtlas, Mexico. *Vegetatio* **74**:55-80.
- Chemnick J. 2013. The Dioons of Oaxaca. *Cactus and Succulent Journal* **85**:19-27.
- Chemnick J., Gregory T., and Morales S. 2010. *Dioon holmgrenii*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. (Consultado 16 agosto 2014).
- Christenhusz M.J.M., Reveal J.L., Farjon A., Gardner M.F., Mill R., and Chase M.W. 2011. A new classification and linear sequence of extant gymnosperms. *Phytotaxa* **19**:55-70.
- CITES. 2015. The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Appendices I, II and III. Valid from 05 February 2015. Ginebra. <www.cites.org/eng/app/appendices.php> (Consultado 11 de marzo de 2016).
- Cabrera-Toledo D., González-Astorga J., and Vovides A.P. 2008. Heterozygote excess in ancient populations of the critically endangered *Dioon caputoi* (Zamiaceae, Cycadales) from central Mexico. *Botanical Journal of the Linnean Society* **158**:436-447.
- Cabrera-Toledo D., González-Astorga J., Nicolalde-Morejón F., Vergara-Silva F., and Vovides A.P. 2010. Allozyme diversity levels in two congeneric *Dioon* spp. (Zamiaceae, Cycadales) with contrasting rarities. *Plant Systematics Evolution* **290**:115-125.

- Condamine F.L., Nagalingum N. S., Marshall C., and Morlon H. 2015. Origin and diversification of living cycads: a cautionary tale on the impact of the branching process prior in Bayesian molecular dating. *BMC Evolutionary Biology* **15**:65.
- Dawson J.W. 1883. On the Cretaceous and Tertiary floras of British Columbia and the Northwest Territory. *Transactions of the Royal Society of Canada* **1**:15-34.
- De Luca P., Sabato S., and Vázquez-Torres M. 1981. *Dioon holmgrenii* (Zamiaceae), a new species from Mexico. *Brittonia* **33**:552-555.
- Diniz-Pilho J.A.F., Borges-Melo D., De Oliveira G., García-Collecatti R., Solares T.N., Nabout J.C., De Souza-Lima J., Dobrovolski R., Chaves L.J., Veloso-Naves R., Dias-Loyola R., and De Campos-Telles M.P. 2012. Planning for optimal conservation of geographical genetic variability within species. *Conservation Genetics* **13**:1085-1093.
- Donaldson J.S. 2003. *Cycads. Status Survey and Conservation Action Plan*. IUCN/SSC Cycad Specialist Group. Gland, Switzerland, and Cambridge, UK.
- Fisher J.B., and Vovides A.P. 2004. Mycorrhizae are present in Cycad roots. *The Botanical Review* **70**:16-23.
- Frankham R., Ballou J.D., and Briscoe D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- González-Astorga J., Vovides A.P., Ferrer M.M., and Iglesias C. 2003. Population genetics of *Dioon edule* Lindl. (Zamiaceae, Cycadales): biogeographical and evolutionary implications. *Biological Journal of the Linnean Society* **80**:457-467.
- González-Astorga J., Vovides A.P., Cruz-Angón A., Octavio-Aguilar P., and Iglesias C. 2005. Allozyme variation in three extant populations of the narrowly endemic cycad *Dioon angustifolium* Miq. (Zamiaceae) from North-eastern Mexico. *Annals of Botany* **95**:999-1007.

- González-Astorga J., Vergara-Silva F., Vovides A.P., Nicolalde-Morejón F., Cabrera-Toledo D., and Pérez-Farrera M.A. 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.
- Keppel G. 2002. Low genetic variation in a pacific cycad: conservation concerns for *Cycas seemannii* (Cycadaceae). *Oryx* **36**:41-49.
- Kwit C., Horvitz C.C., and Platt W.J. 2004. Conserving slow-growing, long-lived tree species: input from the demography of a rare understory conifer, *Taxus floridiana*. *Conservation Biology* **18**:432-443.
- Lázaro-Zermeño J.M., González-Espinoza M., Mendoza A., Martínez-Ramos M., and Quintana-Ascencio P.F. 2011. Individual growth, reproduction and population dynamics of *Dioon merolae* (Zamiaceae) under different leaf harvest histories in central Chiapas, Mexico. *Forest Ecology and Management* **261**:427-439.
- Lázaro-Zermeño J.M., González-Espinoza M., Mendoza A. y Martínez-Ramos M. 2012. Historia natural de *Dioon merolae* (Zamiaceae) en Chiapas, México. *Botanical Sciences* **90**:73-87.
- López-Gallego C. 2008. Demographic variation in cycad populations inhabiting contrasting forest fragments. *Biodiversity and Conservation* **17**:1213-1225.
- Mamay S.H. 1976. *Paleozoic origin of the cycads*. Professional Paper 934, U.S. Geological Survey, Washington, D.C.
- Martínez-Ramos M. y Álvarez-Buylla E. 1995. Ecología de poblaciones de plantas de una selva húmeda en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **56**:121-153.
- Moynihan J., Vovides A.P., González-Astorga J., and Francisco-Ortega J. 2012. Population genetic diversity in the *Dioon edule* Lindl. species complex (Zamiaceae, Cycadales): Evidence from microsatellite data. In: Stevenson D.W., Osborne R., and Taylor-Blake A.S. Eds. *Proceedings*

- of Cycad 2008. The 8th International Conference on Cycad Biology*, pp. 224-250. The New York Botanical Garden Press, Nueva York.
- Negrón-Ortiz V., and Breckon G.J. 1989. Population structure in *Zamia debilis* (Zamiaceae). I. Size classes, leaf phenology, and leaf turnover. *American Journal of Botany* **76**:891-900.
- Nicolalde-Morejón F., González-Astorga J., Vergara-Silva F., Stevenson D.W., Rojas-Soto O., and Medina-Villarreal A. 2014. Biodiversidad de Zamiaceae en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **85**:S114-S125.
- Ortíz-Pérez M.A., Hernández-Santana J.R., and Figueroa-Mah-Eng. 2004. Reconocimiento fisiográfico y geomorfológico. En: García-Mendoza A.J., Ordoñez M.J., Briones-Salas M. Edit. *Biodiversidad de Oaxaca*. Instituto de biología. UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Found, México. pp. 43-54.
- Osborne R., Calonje M.A., Hill K.D., Stanberg L., and Stevenson D.W. 2012. The world list of cycads. *Memoirs of the New York Botanical Gardens* **106**:480-510.
- Pérez-Farrera M.A., and Vovides A.P. 2004. Spatial distribution, population structure, and fecundity of *Ceratozamia mirandae* Lundell (Zamiaceae) in El Triunfo Biosfere Reserve, Chiapas, Mexico. *Botanical Review* **70**:299-311.
- Pérez-Farrera M.A., Quintana-Ascencio P.F., and Salvatierra-Izaba B. 2000. Population dynamics of *Ceratozamia matudai* (Zamiaceae) in El Triunfo Biosfere Reserve, Chiapas, México. *Journal of the Torrey Botanical Society* **127**:291-299.
- Pérez-Farrera M.A., Vovides A.P., Octavio-Aguilar P., González-Astorga J., De la Cruz-Rodríguez J., Hernández-Jonapá R., and Villalobos-Méndez S.M. 2006. Demography of the cycad *Ceratozamia mirandae* (Zamiaceae) under disturbed and undisturbed conditions in a biosphere reserve of Mexico. *Plant Ecology* **187**:97-108.

- Peters C.M. 1994. *Sustainable Harvest of Non-timber Plant Resources in Tropical Moist Forest: An Ecological Primer*. Biodiversity Support Program, Washington D.C.
- Prado A., Cervantes-Díaz F., Pérez-Zavala F.G., González-Astorga J., Bede J.C., and Cibrián-Jaramillo A. 2016. Transcriptome-derived microsatellite markers for *Dioon* (Zamiaceae) cycad species. *Applications in Plant Sciences* **4**:1500087.
- Raimondo D.C., and Donalson J.S. 2003. Responses of cycads with different life histories to the impact of plant collecting: simulation models to determine important life history stages and population recovery times. *Biological Conservation* **111**:345-358.
- Rao V.R., and Hodgkin R. 2002. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **68**:1-19.
- Rivera-Fernández A., Octavio-Aguilar P., Sánchez-Coello N.G., Sánchez-Velásquez L.R., Vázquez-Torrez M. y Iglesias-Andreu L.G. 2012. Estructura poblacional y distribución espacial de *Ceratozamia mexicana* Brong. (Zamiaceae) en un ambiente conservado y en uno perturbado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* **15**:S110-S117.
- Ruiz-García N., Méndez-Pérez B.Y., Velasco-García M.V., Sánchez-de la Vega G. y Rivera-Nava J.L. 2015. Ecología, distribución, ciclo biológico y tabla de vida de *Eumaeus toxea* (Lepidoptera: Lycaenidae) en la provincia fisiográfica Costa de Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **86**:998-1003.
- Salomé-Castañeda E. 2009. Parámetros demográficos de *Dioon spinulisum* Dyer & Eichler (Zamiaceae), en San Miguel Soyaltepec, Oaxaca. Tesis Maestría. Instituto de Ecología A. C., Xalapa, Veracruz, México. 129 p.
- SEMARNAT [Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales]. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental – Especies nativas de México de flora y fauna silvestres – Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión

o cambio – Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*. 2da Sección, 30 de diciembre de 2010.

Terry I., Tang W., Taylor- Blake B.S., Donaldson W.S., Singh R., Vovides A., and Cibrián-Jaramillo A. 2012. *An Overview of Cycad Pollination Studies. Memoirs of the New York Botanical Garden* **106**:394-352.

Velasco-García M.V., Sánchez-De la Vega G., N. Ruiz-García, Ruiz-Jiménez C., Méndez-Pérez B.Y. y Mejía-Cuevas I. 2011. Distribución de *Dioon holmgrenii* (Zamiaceae) y su estado de conservación. En: Toledo-Flores. L.J. Edit. *13° Foro Estatal de Investigación Científica y Tecnológica*. Consejo Oaxaqueño de Ciencia y Tecnología. Oaxaca de Juárez, Oaxaca. pp. 495-500.

Vovides A.P. 1990. Spatial distribution, survival, and fecundity of *Dioon edule* (Zamiaceae) in a tropical deciduous forest in Veracruz, Mexico, with notes on its habitat. *American Journal of Botany* **77**:1532-1543.

Vovides A.P. 2000. México: segundo lugar mundial en diversidad de cícadas. *Biodiversitas* **31**:6-10.

Vovides A.P. y Peters C.M. 1987. *Dioon edule*: la planta más antigua de México. *Ciencia y Desarrollo* **73**:19-24.

Vovides A.P. e Iglesias C.G. 1994. An integrated conservation strategy for the cycad *Dioon edule* Lindl. *Biodiversity and Conservation* **3**:137-141.

Vovides A.P. y Nicolalde-Morejón F. 2010. Ficha técnica de *Dioon holmgrenii*. In: Vovides A.P. Comp. *Base de Datos de las Cícadas Mexicanas*. Instituto de Ecología A.C., INECOL. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. DK008. D.F., México.

Watkinson A.R., and Powell J.C. 1997. The life history and population structure of *Cycas armstrongii* in monsoonal northern Australia. *Oecologia* **111**:341-449.

- Xiao L., Ge X., Gong X., Hao G., and Zheng S. 2004. ISSR variation in the endemic and endangered plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae). *Annals of Botany* **94**:133-138.
- Xiao L., Gong X., Hao G., Ge X., Tian B., and Zheng S. 2005. Comparison of the genetic diversity in two species of cycads. *Australian Journal of Botany* **53**:219-223.
- Yáñez-Espinosa L., and Sosa-Sosa F. 2007. Population structure of *Dioon purpusii* Rose in Oaxaca, Mexico. *Neotropical Biology and Conservation* **2**:46-54.
- Zhifeng G., and Thomas B.A. 1989. A review of fossil cycad megasporophylls, with new evidence of *Crossozamia* Pomel and its associated leaves from the lower Permian of Taiyuan, China. *Review of Palaeobotany and Palynology* **60**:205-223.

CAPÍTULO I

ESTRUCTURA, HETEROGENEIDAD DE ESTADIOS Y PATRÓN DE DISPERSIÓN ESPACIAL DE *DIOON HOLMGRENII* (ZAMIACEAE)¹

Resumen

El objetivo de este trabajo fue conocer la estructura, heterogeneidad de estadios y el patrón de dispersión espacial de diez poblaciones de *Dioon holmgrenii*, especie en peligro de extinción y endémica al sur de Oaxaca, con fines de conservación. Se establecieron once y nueve unidades de muestreo en sitios sin cambio aparente y con cambio de uso de suelo, respectivamente. Los individuos se clasificaron en reproductivos y no reproductivos, y en cada uno los estadios de desarrollo. La densidad promedio de individuos fue mayor en sitios sin cambio aparente que en sitios con cambio (782 vs. 353 plantas ha⁻¹). En sitios sin cambio aparente se determinó alta proporción de plántulas y adultos, y escasos juveniles y pre-reproductivos; en sitios con cambio se encontró alto porcentaje de adultos, baja proporción de plántulas, juveniles y pre-reproductivos. La heterogeneidad de estadios fue mayor en sitios sin cambio aparente que sitios con cambio ($H' = 1.57$ vs. 1.38 , $P = 0.048$). La semejanza dentro de sitios sin cambio aparente ($I_{M-H} = 0.93$, $IS_{ct} = 0.81$) y dentro de los sitios con cambio ($I_{M-H} = 0.83$, $IS_{ct} = 0.61$) fue mayor que entre ambas condiciones ($I_{M-H} = 0.70$, $IS_{ct} = 0.53$). El patrón de dispersión espacial de los individuos fue principalmente agregada (65 %). Los individuos reproductivos y no reproductivos se distribuyeron en agregados en 12 y 14 de 20 unidades de muestreo, respectivamente. Los resultados muestran que la agricultura y el pastoreo afectan en la estructura, heterogeneidad de estadios y dispersión espacial; esto debe considerarse en el manejo futuro de las poblaciones.

Palabras clave: agentes de perturbación, cambio de uso de suelo, densidad, índice de Shannon, semejanza, Ripley.

¹ Publicado en: *Botanical Sciences* 94 (1): 75-87, 2016.

Abstract

The aims of this research were to determine the structure, heterogeneity of stages, and spatial dispersion pattern of ten populations of *Dioon holmgrenii*, an endangered species endemic to southern Oaxaca, for conservation purpose. Eleven and nine sampling units were established in conditions without apparent land use change and change in land use, respectively. The developed stages were identified in non-reproductive and reproductive plants, and inside each of them the development stages. The average density of individuals was higher in conditions without apparent land use change (782 plants ha⁻¹) than in change in land use (353 plants ha⁻¹). High percentage of seedlings and adults was occurring in conditions without apparent land use, and low pre-reproductive and juveniles; however, high percentage of adults and low percentage of seedlings, saplings and pre-reproductive were found in condition change in land use. The heterogeneity of stages was higher ($P = 0.048$) under conditions without apparent land use change ($H' = 1.57$) than with change in land use ($H' = 1.38$). The similarity was higher in conditions without apparent land use change ($I_{M-H} = 0.93$, $I_{SCT} = 0.81$) and within change in land use ($I_{M-H} = 0.83$, $I_{SCT} = 0.61$) than among both conditions ($I_{M-H} = 0.70$, $I_{SCT} = 0.53$). The spatial dispersion pattern of individuals was primarily aggregate (65 %). Reproductive and non-reproductive individuals were distributed in aggregates 12 and 14 out of 20 sampling units, respectively. The results show that agriculture and grazing affect the structure, heterogeneity of stages and the spatial dispersion pattern; so these should be considered in the future management of populations.

Key words: density, land use change, perturbation agents, Shannon index, similarity, Ripley.

Introducción

Dioon holmgrenii De Luca, Sabato & Vázquez-Torres, pertenece al orden Cycadales el cual se originó en el periodo pérmico o en el carbonífero, hace 280 a 325 millones de años (Donaldson, 2003). El orden Cycadales tiene 301 especies, agrupadas en diez géneros y dos familias (Cycadaceae y Zamiaceae), las cuales se distribuyen en zonas tropicales, subtropicales y templadas del mundo (Pérez-Farrera y Vovides, 2006; Christenhusz *et al.*, 2011; Osborne *et al.*, 2012). Muchas especies son endémicas, raras y de distribución restringida y 82 % de ellas están amenazadas por la destrucción del hábitat y la extracción ilegal (Donaldson, 2003).

México es centro de diversidad de Cycadales neotropicales con 54 especies de los géneros *Ceratozamia* Brongn., *Dioon* Lindl. y *Zamia* L. correspondientes a Zamiaceae (Vovides e Iglesias, 1994; Osborne *et al.*, 2012; Nicolalde-Morejón *et al.*, 2014), de las cuales 88.9 % son endémicas, aunque todas están amenazadas o en peligro de extinción por la destrucción de su hábitat (Vovides e Iglesias, 1994; Nicolalde-Morejón *et al.*, 2014). Oaxaca y Veracruz son los estados con mayor diversidad de especies de Zamiaceae (Osborne *et al.*, 2012; Chemnick, 2013); el primero cuenta con mayor número de endemismos (Nicolalde-Morejón *et al.*, 2014). Siete de 13 especies mexicanas del género *Dioon* se distribuyen en el estado de Oaxaca (Nicolalde-Morejón *et al.*, 2014). *Dioon holmgrenii* es endémica del flanco externo de la Sierra Madre del Sur, del estado de Oaxaca, con 13 poblaciones que cubren una superficie estimada de 3,677 ha (De Luca *et al.*, 1981; Vovides y Nicolalde-Morejón, 2010; Velasco-García *et al.*, 2011). La situación de esta especie es crítica, debido a la fragmentación de su hábitat para la agricultura y el pastoreo (Chemnick *et al.*, 2010; Vovides y Nicolalde-Morejón, 2010); aproximadamente el 80 % de la superficie tiene algún grado de perturbación (Velasco-García *et al.*, 2011) y su diversidad genética es baja (González-

Astorga *et al.*, 2008), por lo que esta especie está listada en el apéndice II de CITES (CITES, 2013), NOM-059 (SEMARNAT, 2010) y en la lista roja de la UICN (Chemnick *et al.*, 2010).

A pesar de la situación de *Dioon holmgrenii*, no existen actualmente planes de manejo para su conservación (Vovides y Nicolalde-Morejón, 2010), ni hay información sobre su estructura, heterogeneidad y distribución horizontal. Asimismo, la relación entre las perturbaciones antropógenas y los parámetros poblacionales no se han estudiado en las poblaciones de *D. holmgrenii*, pero es de suponer que las perturbaciones debidas a actividades humanas modifican los parámetros poblacionales de *D. holmgrenii*. Por esta razón, el objetivo fue conocer la estructura poblacional, heterogeneidad de estadios y el patrón de dispersión espacial de *D. holmgrenii* en sitios sin cambio aparente de uso de suelo (SCUS) y con cambio de uso de suelo (CCUS) con diferentes grados de perturbación. Lo anterior para que sirva de base para generar, en el futuro, planes de conservación para la especie. Las hipótesis planteadas fueron: (1) tanto la densidad poblacional como los atributos estructurales y estructuras poblacionales son significativamente diferentes en los sitios SCUS y CCUS, (2) existen diferencias significativas en la heterogeneidad de estadios entre los grados de perturbación en sitios SCUS y CCUS y (3) la dispersión espacial de los individuos de *D. holmgrenii* se ve afectada también por las perturbaciones presentes en sitios SCUS y CCUS de las unidades de muestreo.

Materiales y métodos

Muestreo y medición de variables. El muestreo se realizó en 10 poblaciones de *Dioon holmgrenii*, distribuidas en las provincias fisiográficas Sierra Madre del Sur y Planicie Costera del Pacífico (Figura 1). En cada población se ubicaron dos unidades de muestreo (UM) de 50 × 50 m, una en un sitio sin cambio aparente de uso de suelo (SCUS) y otra en un sitio con cambio de uso de suelo

(CCUS), salvo que en la población Cerro Caballo las dos UM se establecieron en sitios SCUS debido a que en esta población no hay deforestación.

Se identificaron cinco agentes de perturbación (incendio, pastoreo, huracán, extracción de leña y extracción de hojas de *Dioon holmgrenii*) en las UM SCUS. La severidad (Turner, 2010) de estos se evaluó cualitativamente (1= nula, 2 = baja, 3 = media y 4 = alta). Para agrupar las UM SCUS por sus grados de perturbación se realizó un análisis de conglomerados, con base en la distancia euclidiana y el método de agrupación jerárquica de varianza mínima de Ward, seguido de un análisis discriminante mediante el método K-medias, usando el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2002).

Ambos análisis permitieron agrupar a las UM SCUS en tres grados de perturbación: SCUS 1, 2 y 3. En SCUS 1 (San Bartolomé UM1, Cerro Caballo UM1) sólo se observaron algunos árboles caídos por efecto de huracán Carlotta del 15 de junio de 2012; SCUS 2 (Río Leche UM1, La Lima UM1, Ocotlán UM1, Llano de León UM1, Cieneguilla UM1, Cerro Caballo UM2) con incidencia baja o media de incendios, pastoreo y extracción de leña; y SCUS 3 (Rancho Viejo UM1, Rancho el Limón UM1, Cerro Antiguo UM1) con alta incidencia de todos agentes de perturbación, incluida la extracción de hojas en Rancho Viejo.

Las UM CCUS, de acuerdo a su uso actual, se agruparon en tres grados de perturbación: CCUS 1, 2 y 3. En CCUS 1 (La Lima UM2 y Cieneguilla UM 2) se cultiva maíz de temporal mediante el sistema roza-tumba-quema; en CCUS 2 (Ocotlán UM 2, Rancho Viejo UM 2, Rancho el Limón UM 2, Llano de León UM) se realiza pastoreo intensivo de ganado bovino; y CCUS 3 (Río Leche UM 2, Cerro Antiguo UM 2, San Bartolomé UM2) son áreas en recuperación, con tres a cinco años sin agricultura o ganadería. La estructura, heterogeneidad de estadios y el patrón de dispersión espacial se analizaron por grados de perturbación.

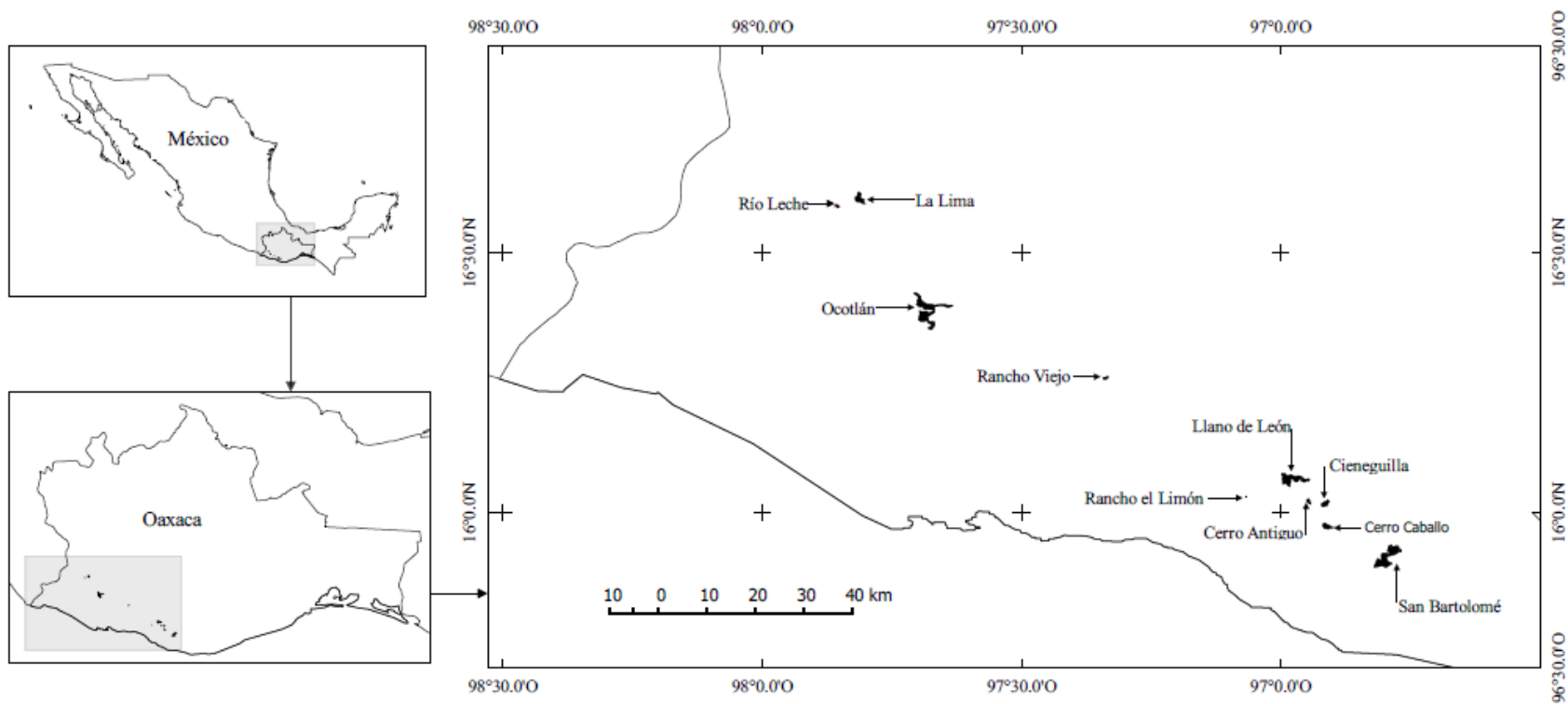


Figura 1. Ubicación de 10 poblaciones de *Dioon holmgrenii* estudiadas en el sur de Oaxaca, México.

Las plantas de *Dioon holmgrenii* se enumeraron y cada individuo se ubicó mediante sus coordenadas cartesianas (X, Y) en las UM. El diámetro basal (DB), área basal (AB), altura de tallo (At), diámetro de copa promedio (DC) y el número de hojas (NH) se registraron para cada individuo en las UM. El área de copa (AC) de los estadios adultos y pre-reproductivos se determinó con la ecuación del área de la circunferencia, mientras que para los individuos juveniles y las plántulas se obtuvo con la ecuación del área de la elipse. La cobertura de copas (CC) en cada UM se obtuvo mediante la suma de las AC de todos los individuos. La densidad, AB y CC se transformó para una superficie de una ha y se obtuvo el promedio para cada grado de perturbación.

Estructura poblacional. Los individuos de *Dioon holmgrenii*, se clasificaron en reproductivos y no reproductivos (At <10 cm) para el estudio de la estructura; los primeros se definieron por la altura mínima con estróbilo (10 cm). Ambos se subclasificaron en estadios de desarrollo con base en la altura de tallo (At) y otras características (modificado de Lázaro- Zermeno *et al.*, 2011). Los estadios no reproductivos fueron: plántula (At < a 2.5 cm, o esclerotesta unida a ellas y de una a dos hojas), juvenil 1 (At de 2.5 a 5.0 cm, tres o cuatro hojas), juvenil 2 (At de 5.0 a 7.5 cm, cinco o más hojas, copa no circular) y pre-reproductivos (At de 7.5 a 9.9 cm, varias hojas, copa circular). Los estadios reproductivos fueron: adultos 1 (At de 0.1 a 1.0 m), adultos 2 (At de 1.0 a 2.0 m), adultos 3 (At de 2.0 a 3.0 m) y adultos 4 (At > 3.0 m).

El supuesto de normalidad de las variables se examinó con la prueba de Shapiro-Wilks. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones de medias de Tukey para las variables (densidad, AB, CC) que cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas.

Se realizaron pruebas no paramétricas de varianza y comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis para las variables (DB, At, DC, AC, NH) que no cumplieron con el supuesto de normalidad.

La frecuencia absoluta y relativa por estadios se obtuvo para cada grado de perturbación. La curva de estructura poblacional se determinó con la frecuencia relativa. La estructura poblacional entre los grados de perturbación se comparó con la prueba de χ^2 . Los índices de valor de importancia (IVI = densidad relativa + dominancia relativa + frecuencia relativa; Curtis y McIntosh, 1951) y valor forestal (IVF = DB relativo + At relativa + CC relativa; Corella-Justavino *et al.*, 2001) se calcularon considerando a los estadios como elementos diferenciados de la población en cada grado de perturbación. Las diferencias de IVI e IVF entre estadios se obtuvieron con las pruebas y comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis con el programa InfoStat versión 2013 (Di Rienzo *et al.*, 2013).

Heterogeneidad y semejanza de estadios. La heterogeneidad (Peet, 1974) de estadios se determinó con el índice de Shannon (H') y también se obtuvieron la varianza de H' y la uniformidad (Magurran, 1988, 2004). Las diferencias de la heterogeneidad de estadios entre los grados de perturbación se determinaron con la prueba de t de Hutcheson modificado (Magurran, 1988; Villavicencio-Enríquez y Valdez-Hernández, 2003). La semejanza de estadios entre los grados de perturbación se determinó con los coeficiente de Morisita-Horn ($IM-H$) y cuantitativo de Sørensen ($ISct$) (Magurran, 1988).

Patrón de dispersión espacial. El patrón espacial de dispersión espacial univariado de los individuos de *Dioon holmgrenii* se analizó en cada UM usando la transformación $L(t)$ de la función $K(t)$ (Besag, 1977; Ripley, 1977). La significancia ($P \leq 0.01$) de la función $L(t)$ se determinó con simulaciones de Monte Carlo (Besag, 1977; Besag y Diggle, 1977; Marriott, 1979). La función $K(t)$ y las simulaciones de Monte Carlo se obtuvieron usando el programa TOOLBOX (Fisher, 2000). El análisis del patrón de dispersión espacial se complementó con el índice $I\delta$ de Morisita (Morisita, 1959).

Resultados

Estructura poblacional. La densidad promedio fue de 589 ± 365 ind. ha^{-1} , de los cuales 250 ± 156 fueron reproductivos y 339 ± 249 no reproductivos. La densidad promedio varió de 489 a 1,000 plantas ha^{-1} en sitios SCUS y de 229 a 532 en sitios CCUS (Figura 2).

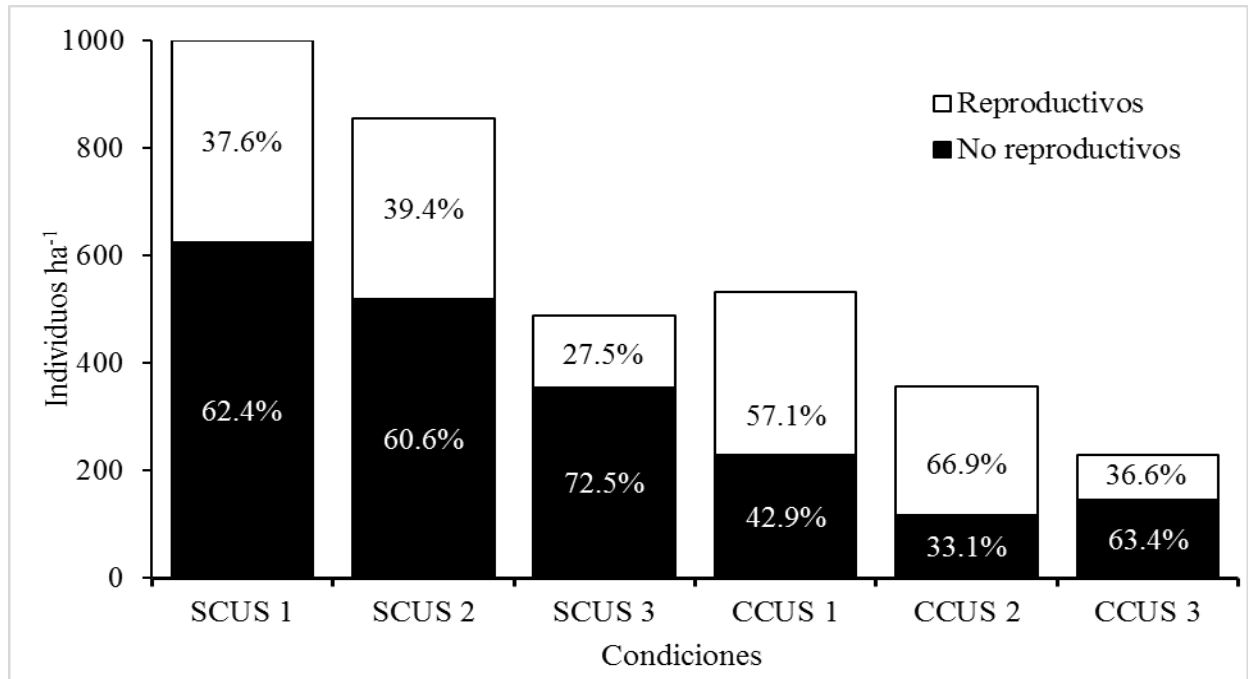


Figura 2. Densidad de individuos de *Dioon holmgrenii* por grados de perturbación en sitios sin cambio aparente de uso de suelo (SCUS) y con cambio de uso de suelo (CCUS) en el sur de Oaxaca, México.

No se rechaza la hipótesis de diferencias en densidad, atributos estructurales y estructuras poblacionales entre las UM con diferentes grados de perturbación. La densidad de individuos reproductivos de *Dioon holmgrenii* no fue significativamente diferente ($p = 0.107$) entre los grados de perturbación; sin embargo, la densidad de plantas no reproductivas fue significativamente ($p = 0.033$) menor en sitios CCUS. Para individuos reproductivos y no reproductivos se encontraron diferencias significativas entre los grados de perturbación en todos los atributos estructurales ($P \leq$

0.034) excepto en área basal ($p \geq 0.293$), cobertura de copa ($p \geq 0.176$), así como el número de hojas ($p \geq 0.999$) en individuos no reproductivos (Cuadro 1). Las estructuras poblacionales fueron estadísticamente diferentes ($p \leq 0.044$) entre todos los grados de perturbación, excepto entre SCUS 2 y 3 ($p = 0.115$) (Figura 3). Se encontraron diferencias significativas en IVI ($P \leq 0.034$) y el IVF ($p \leq 0.046$) entre estadios en todos los grados de perturbación, excepto en CCUS 1 ($p \geq 0.121$) para ambos índices y en CCUS 3 ($p = 0.150$) para el IVF (Cuadro 2).

Heterogeneidad y semejanza de estadios. No se rechaza la hipótesis de diferente heterogeneidad de estadios entre UM con diferentes grados de perturbación. La heterogeneidad de estadios fue significativamente mayor ($p \leq 0.038$) en los sitios SCUC 1 ($H' = 1.60$), 2 ($H' = 1.56$) y 3 ($H' = 1.77$) que en CCUS 1 ($H' = 1.35$) y 2 ($H' = 1.31$) (Cuadro 3). No se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0.101$) entre los tres grados de perturbación SCUS con CCUS 3 ($H' = 1.48$), quizás debido a que la uniformidad de ésta fue mayor (0.90) que en el resto de los grados de perturbación (SCUS 1 = 0.80, SCUS 2 = 0.77, SCUS 3 = 0.79, CCUS 1 = 0.754 y CCUS 2 = 0.73). La semejanza promedio dentro de los sitios SCUS ($IM-H = 0.93$, $ISct = 0.81$) y dentro de los CCUS ($IM-H = 0.83$, $ISct = 0.61$) fue mayor que entre SCUS y CCUS ($IM-H = 0.70$, $ISct = 0.53$).

Patrón de dispersión espacial. No se rechaza la hipótesis de que el patrón de dispersión espacial de los individuos de *Dioon holmgrenii* es afectado por las perturbaciones. Los índices $L(t)$ de Ripley e $I\delta$ de Morisita coincidieron en que el patrón de dispersión espacial de *D. holmgrenii* es agregado (55 %) y aleatorio (30 %). Los valores de ambos índices fueron cercanos al límite de la dispersión espacial aleatoria en los casos donde los índices no coincidieron (15 %). El índice $L(t)$ de Ripley indicó que el patrón de dispersión espacial fue mayoritariamente (65 %) agregado ($P \leq 0.01$) tanto para los individuos reproductivos (12 de 20 UM) como para los no reproductivos (14 de 20 UM) (Figuras 4, 5).

Cuadro 1. Atributos estructurales de *Dioon holmgrenii* por grados de perturbación en sitios sin (SCUS) y con cambio de uso de suelo (CCUS), considerando por separado individuos reproductivos y no reproductivos. Medias por individuo: DB = diámetro basal (cm), At = Altura de tallo (m), DC = diámetro de copa (m), AC = Área de copa (m²), NH = número de hojas. Medias ha⁻¹: De = densidad (individuos), AB = Área basal (m²), CC = Cobertura de copa (m²). †Medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Grado de perturbación	DB	At	DC	AC	NH	De	AB	CC
Individuos reproductivos (altura de tallo ≥ 0.10 m)								
SCUS 1	19.23 ^{c†}	0.89 ^a	1.64 ^a	2.46 ^a	18.44 ^c	376 ^a	12.08 ^a	796.17 ^a
SCUS 2	19.21 ^c	0.78 ^{ab}	1.73 ^a	2.68 ^a	17.66 ^c	337 ^a	10.73 ^a	867.35 ^a
SCUS 3	21.09 ^{ab}	0.89 ^a	1.71 ^a	2.61 ^a	23.38 ^b	135 ^a	5.21 ^a	330.66 ^a
CCUS 1	19.59 ^{bc}	0.40 ^c	1.07 ^c	1.09 ^c	18.10 ^c	304 ^a	9.92 ^a	290.49 ^a
CCUS 2	21.03 ^{ab}	0.74 ^b	1.49 ^b	2.08 ^b	28.91 ^b	239 ^a	9.32 ^a	469.14 ^a
CCUS 3	22.33 ^a	0.77 ^{ab}	1.74 ^a	2.73 ^a	37.87 ^a	84 ^a	3.57 ^a	214.99 ^a
Individuos no reproductivos (altura de tallo < 0.10 m)								
SCUS 1	2.79 ^d	0.04 ^{bc}	0.15 ^d	0.05 ^d	1.40 ^a	624 ^a	0.61 ^a	29.22 ^a
SCUS 2	3.03 ^d	0.04 ^{bc}	0.21 ^b	0.10 ^b	1.60 ^a	519 ^a	0.64 ^a	52.38 ^a
SCUS 3	2.30 ^e	0.03 ^c	0.14 ^c	0.04 ^c	1.28 ^a	355 ^{ab}	0.21 ^a	13.68 ^a
CCUS 1	3.97 ^c	0.04 ^b	0.23 ^b	0.08 ^b	2.67 ^a	228 ^{ab}	0.43 ^a	17.63 ^a
CCUS 2	5.53 ^b	0.06 ^a	0.51 ^a	0.35 ^a	4.58 ^a	118 ^b	0.39 ^a	39.15 ^a
CCUS 3	6.38 ^a	0.07 ^a	0.58 ^a	0.43 ^a	6.22 ^a	145 ^b	0.60 ^a	62.00 ^a

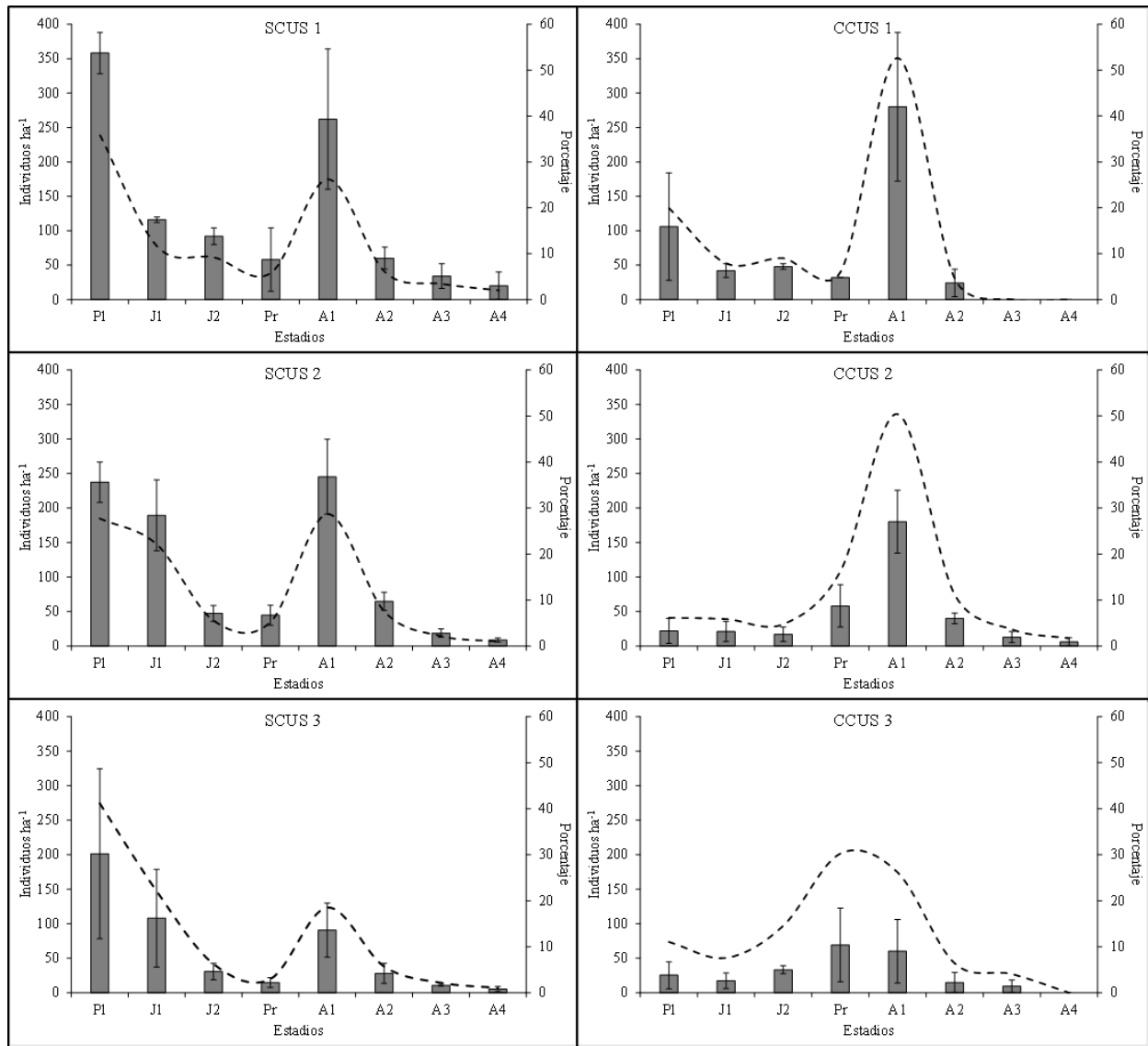


Figura 3. Densidad promedio (barras, escala izquierda) y curva de estructura poblacional (líneas punteadas, escala derecha) por estadios (PI = plántula, J1 = Juvenil 1, J2 = juvenil 2, Pr = pre-reproductivos, A1 = adultos 1, A2 = adultos 2, A3 = adultos 3, A4 = adultos 4) de *Dioon holmgrenii* en sitios sin cambio aparente de uso de suelo (SCUS 1, 2, y 3) y con cambio de uso de suelo (CCUS 1, 2 y 3).

Cuadro 2. Índice de valor de importancia (IVI) e índice de valor forestal (IVF) de los estadios de *Dioon holmgrenii* en sitios sin cambio aparente de uso de suelo (SCUS) y con cambio de uso de suelo (CCUS). Estadios: Pl = plántula, J1 = Juvenil 1, J2 = juvenil 2, Pr = pre-reproductivos, A1 = adultos 1, A2 = adultos 2, A3 = adultos 3, A4 = adultos 4). †Medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Estadios	SCUS 1		SCUS 2		SCUS 3		CCUS 1		CCUS 2		CCUS 3	
	IVI	IVF	IVI	IVF	IVI	IVF	IVI	IVF	IVI	IVF	IVI	IVF
Pl	55.4 ^{ab†}	8.9 ^b	50.8 ^a	8.7 ^c	62.7 ^a	11.4 ^{bcd}	39.1 ^a	3.5 ^a	10.1 ^{cd}	0.6 ^b	18.5 ^b	4.8 ^a
J1	27.4 ^{ab}	5.3 ^b	42.1 ^{ab}	10.6 ^c	36.7 ^{abc}	9.6 ^{bc}	25.3 ^a	6.1 ^a	14.2 ^{cd}	3.0 ^b	20.1 ^b	3.5 ^a
J2	25.3 ^{ab}	7.3 ^b	18.1 ^{bc}	5.8 ^c	16.8 ^{bc}	4.2 ^d	28.1 ^a	11.0 ^a	10.4 ^{cd}	2.1 ^b	66.4 ^{ab}	28.5 ^a
Pr	17.7 ^b	8.3 ^b	16.6 ^c	8.9 ^c	13.6 ^c	6.9 ^{bc}	20.5 ^a	11.5 ^a	33.3 ^{abc}	15.7 ^{ab}	65.8 ^{ab}	53.6 ^a
A1	94.3 ^a	127.5 ^a	100.8 ^a	141.0 ^a	93.8 ^a	130.7 ^a	165.3 ^a	231.2 ^a	147.2 ^a	153.4 ^a	105.1 ^a	113.9 ^a
A2	37.0 ^{ab}	63.0 ^a	44.4 ^a	75.2 ^{ab}	44.7 ^{ab}	81.1 ^{ab}	21.7 ^a	36.7 ^a	61.8 ^{ab}	87.7 ^a	11.7 ^b	76.0 ^a
A3	25.9 ^{ab}	48.5 ^a	16.7 ^c	28.1 ^{bc}	20.6 ^{bc}	33.2 ^{abc}			17.2 ^{bcd}	27.0 ^{ab}	12.4 ^b	19.7 ^a
A4	17.0 ^b	31.2 ^a	10.5 ^c	21.7 ^{bc}	11.1 ^{bc}	22.9 ^{bcd}			5.8 ^d	10.5 ^b		
Total	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0

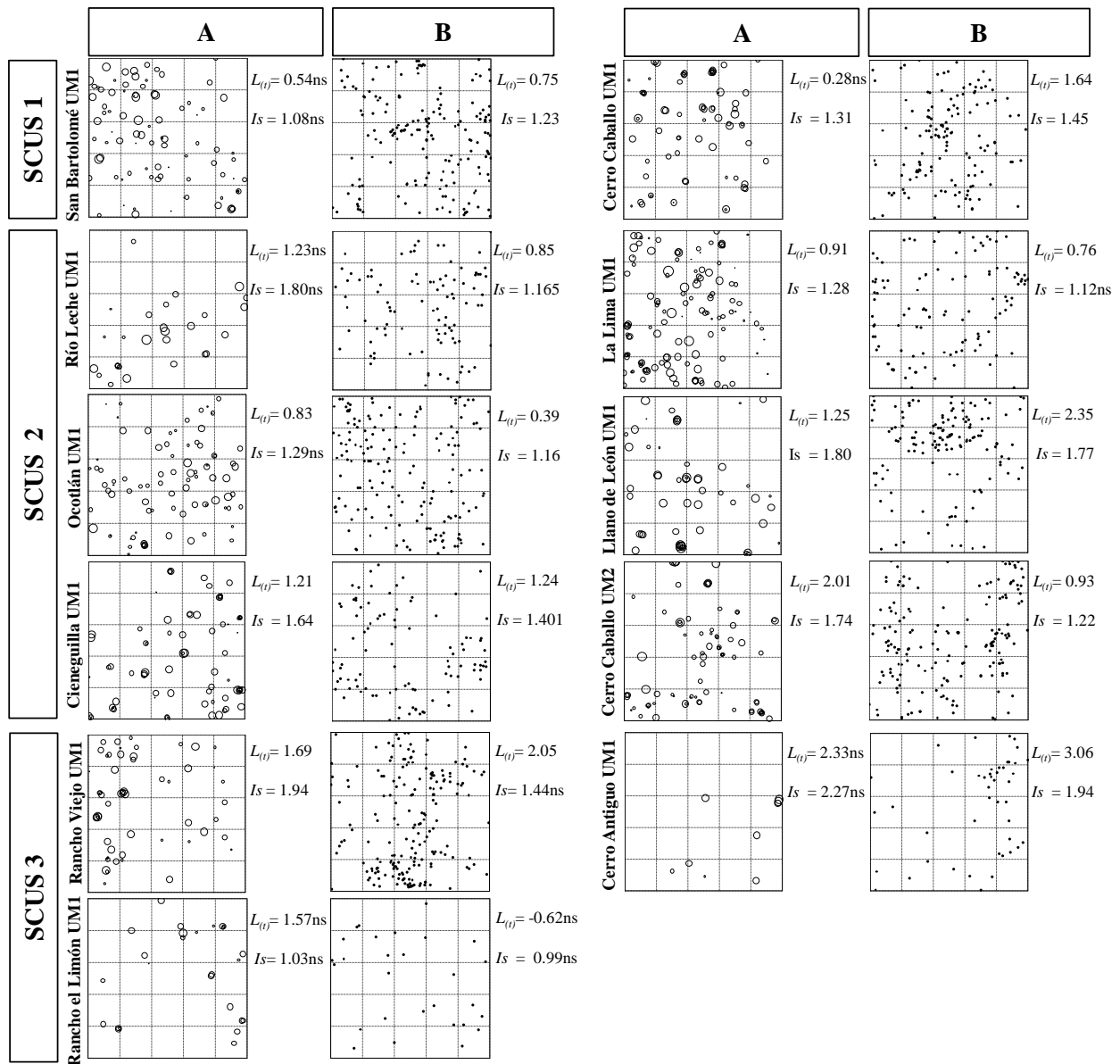


Figura 4. Matriz del patrón de dispersión espacial de *Dioon holmgrenii* (A: proyección de copa de individuos reproductivos, B: ubicación de individuos no reproductivos) en tres grados de perturbación en sitios sin cambio aparente de uso de suelo (SCUS 1, 2 y 3), con índices $L_{(r)}$ de Ripley e I_s de Morisita (ns: no significativo al patrón de dispersión aleatorio con $p \leq 0.01$).

Cuadro 3. Indicadores de significancia del índice de heterogeneidad H' y los coeficientes de semejanza (I_{M-H} : Morisita-Horn, IS_{ct} : Sørensen cuantitativo) de estadios de *Dioon holmgrenii*. SCUS = sin cambio aparente de uso de suelo, CCUS = con cambio de uso de suelo. †Valor t de tablas con grados de libertad infinito: $\alpha 0.01 = 2.236$ y $\alpha 0.05 = 1.645$.

Grados de perturbación comparados		Significancia de la heterogeneidad H'			Semejanza	
		t calculada [†]	gl	probabilidad	I_{M-H}	IS_{ct}
SCUS 1	SCUS 2	0.507	1,629.623	0.306	0.944	0.909
SCUS 1	SCUS 3	0.293	575.499	0.385	0.945	0.605
SCUS 1	CCUS 1	2.759	470.630	0.003	0.826	0.671
SCUS 1	CCUS 2	2.298	478.796	0.011	0.689	0.526
SCUS 1	CCUS 3	1.271	309.750	0.102	0.708	0.355
SCUS 2	SCUS 3	0.076	690.805	0.470	0.897	0.931
SCUS 2	CCUS 1	2.231	587.493	0.013	0.863	0.793
SCUS 2	CCUS 2	1.945	537.204	0.026	0.754	0.637
SCUS 2	CCUS 3	0.820	383.246	0.206	0.701	0.431
SCUS 3	CCUS 1	1.882	632.580	0.030	0.655	0.536
SCUS 3	CCUS 2	1.772	672.934	0.038	0.497	0.436
SCUS 3	CCUS 3	0.735	506.487	0.231	0.573	0.412
CCUS 1	CCUS 2	1.224	589.382	0.111	0.940	0.666
CCUS 1	CCUS 3	1.224	416.244	0.111	0.738	0.480
CCUS 2	CCUS 3	1.228	528.618	0.110	0.817	0.688

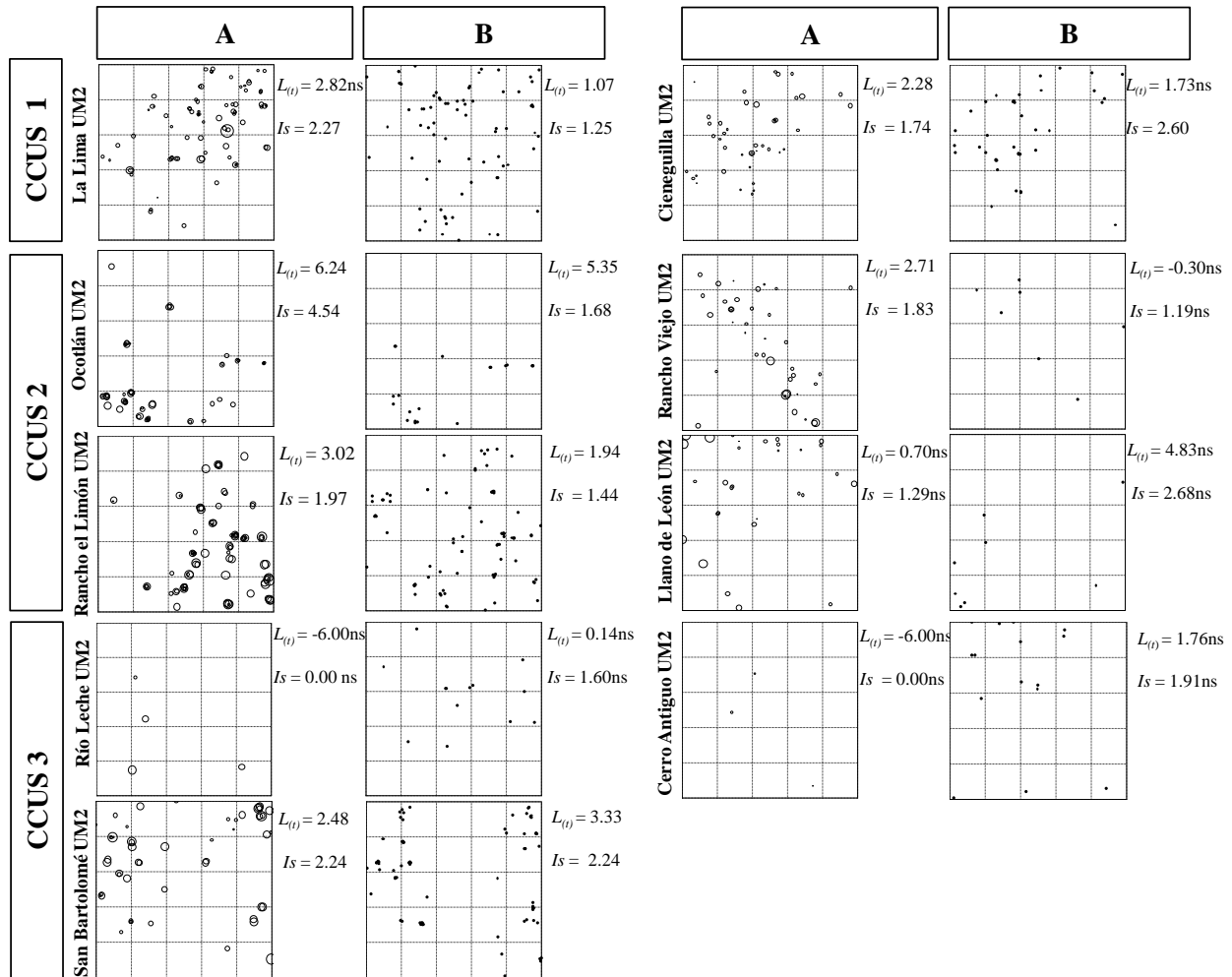


Figura 5. Matriz del patrón de dispersión espacial de *Dioon holmgrenii* (A: proyección de copa de individuos reproductivos, B: ubicación de individuos no reproductivos) en tres grados de perturbación en sitios con cambio de uso de suelo (CCUS 1, 2 y 3), con índices $L(r)$ de Ripley e I_s de Morisita (ns: no significativo al patrón de dispersión aleatorio con $p \leq 0.01$).

Discusión

Estructura poblacional. La densidad de *Dioon holmgrenii* disminuyó con el grado de perturbación (Figura 2), lo cual es indicativo que estas pueden disminuir la calidad de hábitat para la especie, por tratarse de áreas bajo perturbación recurrente, dedicadas a la agricultura, ganadería o ambas.

La densidad y el tamaño de plantas son atributos poblacionales que indican que los bosques perturbados representan hábitats de menor calidad (López-Gallego, 2008). Menores densidades se reportaron en ambientes perturbados donde crecen *Ceratozamia matudae* Lundell, *Ceratozamia mirandae* Vovides, Pérez-Farr. & Iglesias, *Zamia melanorrhachis* D.W. Stev. y *Ceratozamia mexicana* Brongn. (Pérez-Farrera y Vovides, 2004; Pérez-Farrera *et al.*, 2006; López-Gallego, 2008; Rivera-Fernández *et al.*, 2012). La densidad promedio de individuos de *D. holmgrenii* en los sitios SCUS fue menor a la densidad que se encontró en poblaciones de *Dioon edule* Lindl. (2,100 a 4,633 ind. ha⁻¹) en el centro de Veracruz (Octavio-Aguilar *et al.*, 2008; Vovides, 1990).

La densidad promedio de individuos de *Dioon holmgrenii* en sitios CCUS es mayor a la densidad que se reporta para *Dioon purpusii* Rose (37 plantas ha⁻¹) y *Dioon merolae* De Luca, Sabato & Vázquez Torres (116 a 167 individuos ha⁻¹) en áreas con vegetación arbórea o con aprovechamiento de hojas (Yáñez-Espinosa y Sosa-Sosa, 2007; Lázaro-Zermeño *et al.*, 2011; Flores-Vázquez *et al.*, 2012). Las plantas adultas y juveniles responden diferencialmente a las perturbaciones humanas (López-Gallego, 2008). La proporción de individuos no reproductivos fue mayor en sitios SCUS (60.6 a 72.5 %); mientras que esta proporción fue menor (42.9 y 33.1%) en CCUS 1 y 2 (Figura 2), lo que indicó que la supervivencia de los individuos no reproductivos fue menor en áreas perturbadas por la agricultura y la ganadería. Una elevada proporción de individuos no reproductivos en hábitats SCUS se reportó también para *D. edule* (78.4 y 91.7 %) (Octavio-Aguilar *et al.*, 2008). La proporción baja de individuos no reproductivos de *D. holmgrenii* en áreas donde se practica la agricultura y la ganadería ponen en riesgo a la población; sin embargo, esta proporción vuelve a ser similar a los sitios SCUS cuando estas actividades se suspenden. El grado de perturbación CCUS 3 debido a que anteriormente en él se realizó agricultura y ganadería intensiva, presenta la densidad promedio más baja, pero la proporción de individuos no

reproductivos es mayor que la de los individuos reproductivos (Figura 2), esto último posiblemente porque al suspenderse las perturbaciones humanas, las condiciones de captación de agua y las propiedades químicas del suelo mejoran (Cruz-Ruiz *et al.*, 2012).

Los individuos no reproductivos tuvieron, en promedio, mayor diámetro basal, altura de tallo, diámetro de copa y área de copa en sitios CCUS (Cuadro 1), influenciados por la alta proporción de individuos juveniles y pre-reproductivos (53.5 a 82.6 %) en comparación con la proporción de plántulas (17.4 a 46.5 %). En cambio, los promedios en altura total, diámetro de copa y área de copa de individuos reproductivos fueron mayores en sitios SCUS, lo cual posiblemente se debe a la mayor disponibilidad de humedad en el suelo por tratarse de áreas con cobertura de copa de otras especies arbóreas (López-Gallego, 2008). González-Espinoza *et al.* (2012) encontraron individuos de *Dioon merolae* con mayor humedad. Asimismo, diferencias de altura y diámetro de *Ceratozamia matudae* (Pérez-Farrera *et al.*, 2000) y *Dioon purpusii* (Yáñez-Espinosa y Sosa-Sosa, 2007) se han encontrado por diferencias de perturbación.

Contrario a lo que ocurre con los individuos no reproductivos de *Dioon holmgrenii*, el número de hojas de individuos reproductivos es afectado por las perturbaciones. Las condiciones con menor grado de perturbación en sitios SCUS (SCUS 1y 2) y CCUS (CCU 1) tuvieron menores cantidades de hojas. La cobertura del dosel influye en las características de hojas de *Zamia melanorrhachis* (López-Gallego, 2008). En *Zamia skinneri* Warsz la producción de hojas se correlacionó positivamente con la apertura del dosel (Klark y Klark, 1988), por lo que el menor número de hojas de los individuos reproductivos en SCUS 1y 2 (Cuadro 1) probablemente se debe a la mayor cobertura de dosel observada, que limita la entrada de luz provocando la muerte de hojas adultas. Diferencias de 1 a 3 % de apertura del dosel ocasionan diferencias en irradiación fisiológicamente importantes (Klark y Klark, 1988). Cantidades abundantes de hojas muertas en la parte inferior de

las copas de *D. holmgrenii* se observaron en SCUS 1 y 2. Resultados contrarios se encontraron en SCUS 3 donde la cobertura de dosel observada es menor.

El mayor número de hojas en CCUS 2 y 3 se debe a la presencia de ramas. En promedio 18.2 % (CCUS 2) y 17.9 % (CCUS 3) de los individuos reproductivos tuvieron de una a 14 ramas, mientras que en el grado de perturbación CCUS 1 sólo 5.5 % de estos individuos tuvieron de una a seis ramas. Lázaro-Zermeño *et al.* (2011) encontraron mayor frecuencia de plantas con varias copas en individuos de *Dioon merolae* severamente defoliados. Las ramas de *Dioon holmgrenii*, como en *Dioon edule* y *D. merolae*, se originan por la decapitación, quemadas severas recurrentes y daños mecánicos por humanos y animales (Octavio-Aguilar *et al.*, 2008; González-Espinoza *et al.*, 2012). En los sitios con ganadería intensiva, individuos adultos de *D. holmgrenii* son defoliados y decapitados para evitar que las hojas causen heridas al ganado; sólo en la población Rancho Viejo se constató la defoliación para el uso en ceremonias religiosas Chatinas; sin embargo, esta defoliación no es severa, contrario a lo que ocurre con *D. edule* y *D. merolae* donde la decapitación de plantas para su venta como plantas ornamentales y la defoliación para ceremonias constituyen una amenaza (Octavio-Aguilar *et al.*, 2008; Lázaro-Zermeño *et al.*, 2012).

La estructura poblacional de plantas puede ser descrita por clases de tamaños o de diámetro (Peters, 1994). En cícadas, la estructura poblacional se ha descrito por clases de diámetro basal (Pérez-Farrera *et al.*, 2000), de altura (Vovides, 1990; Pérez-Farrera *et al.*, 2006), número de hojas (Negrón-Ortiz y Breckon, 1989; López-Gallego, 2008), clases de tamaños o estadios (Raimondo y Donalson, 2003; Lázaro-Zermeño *et al.*, 2011; Rivera-Fernández *et al.*, 2012) y considerado dos o más de estas clases (Watkinson y Powell, 1997; Pérez-Farrera y Vovides, 2004; Yáñez-Espinosa y Sosa-Sosa, 2007). De acuerdo con el parámetro que se use para estudiar la estructura poblacional, se obtienen diferentes tipos de curvas de estructura (Bongers *et al.*, 1988; Peters, 1994; Martínez-

Ramos y Álvarez-Buylla, 1995). La estructura poblacional de *Ceratozamia mexicana* (Alejandre-Rosas *et al.*, 1990) y *Dioon spinulosum* Dyer ex Eichler (Salomé-Catañeda, 2009) se estudió con base en clases de diámetro, altura, número de hojas y estadios; el tipo de curva de estructura poblacional fue el mismo en todos los casos. Sin embargo, la representatividad del estadio de plántulas no es clara y puede llevar a conclusiones erróneas cuando se usan clases de diámetro o altura (Flores-Vázquez *et al.*, 2012).

Varios tipos estructurales se obtuvieron con el uso de estadios para los sitios SCUS y CCUS de *Dioon holmgrenii* (Figura 3). La curva tipo II (sensu Bongers *et al.*, 1988; Peters, 1994) se presentó en los sitios SCUS, similar a las obtenidas para *Encephalartos villosus* Lem. (Raimondo y Donalson, 2003). Estas curvas estructurales se caracterizaron por alta proporción de plántulas, disminución gradual de la proporción de juveniles y pre-reproductivos, alta proporción de adultos y disminución progresiva de la proporción de adultos; esto indicó reproducción adecuada pero con incorporación discontinua. Esta estructura es común en especies que dependen de claros para su repoblación, aunque también puede ser el reflejo de una interrupción temporal en la repoblación por factores físicos y biológicos (Peters, 1994).

La proporción alta de plántulas y proporción baja de juveniles y pre-reproductivos en las sitios SCUS puede ser consecuencia de incendios esporádicos que promueven la producción de conos (Negrón-Ortiz y Gorchoy, 2000; Pérez-Farrera y Vovides, 2004) y ocasionan mortalidad alta de plántulas, disminuyendo la transición al estadio superior (Pérez-Farrera *et al.*, 2006). Las cícadas presentan diferentes patrones estructurales en áreas con vegetación arbórea; *Zamia debilis* L.f. (Negrón-Ortiz y Breckon, 1989), *Ceratozamia mirandae* (Pérez-Farrera *et al.*, 2006), *Ceratozamia mexicana* (Alejandre-Rosas *et al.*, 1990; Rivera-Fernández *et al.*, 2012) y *Zamia melanorrhachis* (López-Gallego, 2008) mostraron curvas tipo I (Bongers *et al.*, 1988); *Dioon edule* (Vovides 1990),

Ceratozamia matudae (Pérez-Farrera *et al.*, 2000; Pérez-Farrera y Vovides, 2004) y *Dioon purpusii* (Yáñez-Espinosa y Sosa-Sosa, 2007) presentaron curvas tipo III (Bongers *et al.*, 1988); *Cycas armstrongii* Miq. mostró ambos patrones estructurales (Watkinson y Powell, 1997).

Curvas de estructura poblacional de tipo III (*sensu* Peters, 1994) o su equivalente tipo II (*sensu* Martínez-Ramos y Álvarez-Buylla, 1995) se encontraron en sitios CCUS de *Dioon holmgrenii*. Estas curvas estructurales se caracterizaron por baja proporción de los primeros y últimos estadios y alta proporción de estadios intermedios como resultado de fuertes limitantes para el establecimiento y supervivencia de plántulas y juveniles (Martínez-Ramos y Álvarez-Buylla, 1995). Este tipo de estructura poblacional también se encontró para *Encephalartos cycadifolius* (Jacq.) Lehm. en un sitio afectado por el fuego (Raimondo y Donalson, 2003), para *Zamia melanorrhachis* en bosque secundario (López-Gallego, 2008) y para *Dioon merolae* en áreas afectadas por cosecha de hojas (Lázaro-Zermeño *et al.*, 2011) y ganado (Flores-Vázquez *et al.*, 2012). La elevada intensidad lumínica, evapotranspiración, quemadas controladas y pastoreo interfieren en la captación de agua y nutrientes en las áreas agrícolas y de pastoreo (Alejandre-Rosas *et al.*, 1990; Lázaro-Zermeño *et al.*, 2012). Estos factores pudieron disminuir la supervivencia de los primeros estadios de *D. holmgrenii* en áreas CCUS del presente estudio. Pérez-Farrera y Vovides (2004) mencionan que insectos del género *Eumaeus* que consumen hojas de *Ceratozamia matudae* también pueden influir en la reproducción y reincorporación. Larvas de *E. childrenae* se observaron alimentándose de las hojas de *D. holmgrenii* en todas las poblaciones del presente estudio.

El estadio adultos 1 tuvo mayores IVI e IVF en todas los grados de perturbación; sin embargo, estos índices jerarquizaron de manera diferente a los demás estadios de *Dioon holmgrenii*, como ocurre en estudios de la estructura de vegetación arbórea (Zarco-Espinoza *et al.*, 2010; López-

Toledo *et al.*, 2012; Carreón-Santos y Valdez-Hernández, 2014). Plántula fue el segundo estadio de mayor IVI en todas las grados de perturbación, excepto en CCUS 2 y 3; mientras adultos 2 fue el segundo estadio con mayor IVF (Cuadro 2). Adultos 4 tuvo los IVI menores, excepto en CCUS 1 y 3; en cambio, plántula, juvenil 1 y juvenil 2 tuvieron los IVF menores (Cuadro 2). Esto se debe a que el IVI involucra variables de tipo horizontal, mientras que el IVF incluye una variable de tipo vertical (Curtis y McIntosh, 1951; Corella-Justavino *et al.*, 2001). Los IVI altos de adultos 1 y plántula en SCUS y CCUS 1 fue resultado de la alta densidad relativa de éstos (Figura 3); en cambio, los valores bajos y altos de IVF en plántula y adultos 2, respectivamente, se debieron a la influencia de la altura relativa. Los valores altos de IVI e IVF del estadio adultos 1 en sitios CCUS, puede favorecer a la regeneración natural de la especie, debido a que los individuos de este estadio pueden tener mayor vigor reproductivo; sin embargo, la agricultura y la ganadería deben moderarse en estos sitios para mejorar las propiedades químicas y la captación de agua en los suelos (Jamioy-Orozco, 2011; Cruz-Ruiz *et al.*, 2012).

Heterogeneidad y semejanza de estadios. La actividad agrícola en CCUS 1 y la ganadera en CCUS 2 posiblemente disminuyó la heterogeneidad y uniformidad de estadios. La heterogeneidad y uniformidad fueron similares en CCUS 3 y en los sitios SCUS debido a la suspensión de dichas actividades en CCUS 3 (Cuadro 3). Los resultados demostraron que H' y los coeficientes de semejanza de Morisita-Horn ($IM-H$) y de Sørensen cuantitativo ($ISct$), como medidas de heterogeneidad y semejanza de estadios, permitieron evaluar la relación entre los disturbios y *Dioon holmgrenii*.

Patrón de dispersión espacial. El patrón de dispersión agregado de *Dioon holmgrenii* puede deberse a múltiples factores biológicos relacionados con la dispersión de semillas y factores físico-ambientales como en otras especies del género *Dioon* (Vovides, 1990; Octavio-Aguilar *et al.*, 2008;

Rivera-Fernández *et al.*, 2012). La separación de plantas reproductivas femeninas y el tamaño de las semillas pueden ser los principales factores que definen el patrón de dispersión espacial y el establecimiento de plántulas (Pérez-Farrera y Vovides, 2004). Abundancia de plántulas y juveniles de *D. holmgrenii* se observaron alrededor de la planta progenitora formando agregados. Los estróbilos femeninos de *D. holmgrenii* permanecen unidos a la planta durante el proceso pasivo de dispersión de semillas, ocasionando que una elevada proporción de ellos permanezcan a una distancia cercana a ella; además de que el tamaño de sus semillas puede reducir la distancia al progenitor (Pérez-Farrera *et al.*, 2000; Pérez-Farrera y Vovides, 2004). La dispersión espacial en agregados y la mayor densidad de plántulas y juveniles alrededor de la planta madre de *Ceratozamia matudae*, *Ceratozamia mirandae* y *Dioon edule* puede deberse a deficiencias en los mecanismos de dispersión y bajos niveles de depredación de la semilla (Pérez-Farrera *et al.*, 2000; Pérez-Farrera y Vovides, 2004; Pérez-Farrera *et al.*, 2006; Octavio-Aguilar *et al.*, 2008). Las semillas de las Cycadales contienen compuestos altamente tóxicos para los mamíferos (Khabazian *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2002; Monson *et al.*, 2003), los cuales pueden ser factores limitantes para su dispersión (Pérez-Farrera *et al.*, 2006). Otro factor que puede determinar el patrón de dispersión agregado de *D. holmgrenii* es la profundidad del suelo. Por ejemplo *C. matudae*, *C. mirandae*, *D. edule* y *Dioon spinulosum* crecen en suelos someros para evitar la competencia con angiospermas de rápido crecimiento (Pérez-Farrera *et al.*, 2000; Pérez-Farrera *et al.*, 2006; Octavio-Aguilar *et al.*, 2008; Salomé-Castañeda, 2009). Se ha demostrado que algunas gimnospermas tienen menor capacidad de competir en ambientes mésicos por lo que se confinan en ambientes inhóspitos (Bond, 1989; Becker, 2000). Asimismo, la pendiente del terreno define la distancia de dispersión en semillas de *C. matudae* y *C. mirandae* (Pérez-Farrera *et al.*, 2000; Pérez-Farrera *et al.*, 2006).

El patrón de dispersión espacial de *Dioon holmgrenii* fue aleatorio en individuos reproductivos y agregado en los no reproductivos en todas las UM de SCUS 1y en una UM de SCUS 3. Octavio-

Aguilar *et al.* (2008) encontraron un patrón agregado para adultos y aleatorio para plántulas y juveniles, es decir, un patrón de dispersión espacial entre estadios inverso al anterior, lo que puede deberse a la distinta inclinación de los terrenos la cual es de 6 a 36° en esas UM de *D. holmgrenii* y de 50° para *Dioon edule*.

La dispersión espacial aleatoria fue mayor en sitios CCUS (44.4 % de las UM) que en sitios SCUS (27.3 % de las UM) considerando individuos reproductivos y no reproductivos. Tanto los individuos reproductivos y no reproductivos presentaron un patrón aleatorio de dispersión espacial en 33 % de las UM CCUS y solo en 9 % de las UM SCUS. Las UM Llano de León 2, Río Leche 2 y Cerro Antiguo 2 de CCUS y Rancho el Limón 1 de SCUS tuvieron mayor perturbación y menor densidad de individuos; por lo que este patrón de dispersión espacial aleatorio parece ocurrir en áreas con baja densidad de individuos, ocasionada por factores de perturbación más intensos y frecuentes. Trabajos publicados sobre la relación de los factores de perturbación con el patrón de dispersión espacial no existen para Cycadales. Otro factor que puede estar generando el patrón de dispersión horizontal aleatoria es la mayor interacción entre las semillas y dispersores en sitios CCUS. En las poblaciones estudiadas se observó que las semillas de *Dioon holmgrenii* son consumidas y dispersadas por ardillas (*Sciurus* spp.) y urracas (*Calocitta formosa* Swainson). Las semillas de *Dioon edule* son depredadas y dispersadas por *Peromiscus mexicanus* Saussure (González-Christen, 1990; Vovides, 1990), y las de *Ceratozamia matudae* y *Ceratozamia mirandae* por pecaríes (*Pecari tajacu* L.) (Pérez-Farrera *et al.*, 2000; Pérez-Farrera y Vovides, 2004; Pérez-Farrera *et al.*, 2006); asimismo, las semillas de *Zamia pumila* L. y *Zamia furfuracea* L. f. son dispersadas por cenizotes (*Mimus polyglottos* L.) (Eckenwalder, 1980).

Conclusiones

Las perturbaciones humanas disminuyen la calidad de hábitat para *Dioon holmgrenii*. La actividad agrícola y la ganadería intensiva disminuyen la densidad de plantas y la heterogeneidad de estadios y modifican los patrones estructurales, las curvas de estructura poblacional y el patrón de dispersión espacial. Las plántulas y los individuos juveniles son los más afectados por estas actividades, lo que pone en riesgo la persistencia indefinida de la especie en los sitios con cambio de uso de suelo. Una disminución de la agricultura e intensidad del pastoreo podrían contribuir al éxito de la repoblación natural de *D. holmgrenii* y reducir los riesgos de extinción local de estas poblaciones. Actualmente, ninguna de las poblaciones cuenta con planes de conservación. Los resultados del presente trabajo sugieren la urgencia de diseñar planes de manejo para *D. holmgrenii*, donde se consideren estrategias para la recuperación de áreas con cambio de uso de suelo y que reduzcan la actividad agrícola y el pastoreo.

Agradecimientos

A las autoridades (comunales, ejidales y administrativas) y a los poseedores de los terrenos por permitir la toma de datos. A los guías de campo de las comunidades, así como a Silvestre B. Ramírez López, Juan L. Hernández Hernández, Eduardo Molina García y Edgar López Velasco, por el apoyo en la toma de datos. Al “Fideicomiso Revocable de Administración en Inversión No. 167304 para el Establecimiento y Operación de los Fondos para la Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del Colegio de Postgraduados, Modalidad 3”. Al CONACyT por la beca otorgada al primer autor para realizar estudios de doctorado en el Colegio de Posgraduados. A los dos revisores anónimos de Botanical Sciences quienes sugirieron cambios importantes que mejoraron sustancialmente el manuscrito original.

Literatura citada

- Alejandro-Rosas J.A., Sánchez-Tinoco M.Y. y Vázquez-Torres M. 1990. Estructura poblacional de *Ceratozamia mexicana* Brongn. (Zamiaceae) en un bosque del centro de Veracruz. *La Ciencia y el Hombre* **5**:93-112.
- Becker P. 2000. Competition in the regeneration niche between conifers and angiosperms: Bond's slow seedling hypothesis. *Functional Ecology* **14**:401-212.
- Besag J. 1977. Contribution to the discussion on Dr Ripley's paper. *Journal of the Royal Society B (Methodological)* **39**:193-195.
- Besag J., and Diggle P.J. 1977. Simple Monte Carlo test for spatial pattern. *Journal of the Royal Statistical Society C (Applied Statistics)* **26**:327-333.
- Bond W.J. 1989. The tortoise and the hare: ecology of angiosperm dominance and gymnosperm persistence. *Biological Journal of the Linnean Society* **36**:227-249.
- Bongers F., Popma J., Meave-del Castillo J., and Carabias J. 1988. Structure and floristic composition of the lowland rain forest of Los Tuxtlas, Mexico. *Vegetatio* **74**:55-80.
- Carreón-Santos R.J. y Valdez-Hernández J.I. 2014. Estructura y diversidad arbórea de la vegetación secundaria derivada de una selva mediana subperennifolia en Quintana Roo. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* **20**:119-130.
- Chemnick J. 2013. The Dioons of Oaxaca. *Cactus and Succulent Journal* **85**:19-27.
- Chemnick J., Gregory T., and Morales S. 2010. *Dioon holmgrenii*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. (Consultado 16 agosto 2014).
- Christenhusz M.J.M., Reveal J.L., Farjon A., Gardner M.F., Mill R.R., and Chase M.W. 2011. A new classification and linear sequence of extant gymnosperms. *Phytotaxa* **19**:55-70.

- CITES [The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora]. 2013. Appendices I, II and III. Valid from 24 June 2014. Ginebra. <<http://www.cites.org/eng/app/appendices.php>> (Consultado 19 agosto 2014).
- Corella-Justavino F., Valdez-Hernández J.I., Cetina-Alcalá V.M, González-Cossio F.V., Trinidad-Santos A. y Aguirre-Rivera J.R. 2001. Estructura forestal de un bosque de mangles en el noreste del estado de Tabasco, México. *Revista Ciencia Forestal en México* **26**:73-102.
- Cruz-Ruiz E., Cruz-Ruiz A., Aguilera-Gómez L.I., Norman-Mondragón H.T., Velázquez R.A. Nava-Bernal G., Dendooven L. y Reyes-Reyes B.G. 2012. Efecto en las características edáficas en un bosque templado por el cambio de uso de suelo. *Terra Latinamericana* **30**:189-197.
- Curtis J.T., and McIntosh R.P. 1951. An upland forest continuum in the prairie-forest border region of Wisconsin. *Ecology* **32**:476-496.
- De Luca P., Sabato S., and Vázquez-Torres M. 1981. *Dioon holmgrenii* (Zamiaceae), a new species from Mexico. *Brittonia* **33**:552-555.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., and Robledo C.W. 2013. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <<http://www.infostat.com.ar>> (Consultado 19 agosto 2014).
- Donaldson J. 2003. *Cycads. Status Survey and Conservation Action Plan*. IUCN/SSC Cycad Specialist Group, Gland y Cambridge
- Eckenwalder J.E. 1980. Dispersal of the West Indian cycad, *Zamia pumila* L. *Biotropica* **12**:79-80.
- Fisher M. 2000. Software available for sophisticated spatial statistics. University of South Pacific, Suva, Fiji.
- Flores-Vázquez J.C., Valverde T., and Lucas-González J.L. 2012. How critical are the early life-cycle stages in the population ecology of cycads? A case study with *Dioon merolae* in southeastern Mexico. En: Stevenson D.W., Osborne R y Taylor-Blake A.S. Eds. *Proceedings*

- of *Cycad 2008. The 8th International Conference on Cycad Biology*, pp. 40-58. The New York Botanical Garden Press, Nueva York.
- González-Astorga J., Vergara-Silva F., Vovides A.P., Nicolalde-Morejón F., Cabrera-Toledo D., and Pérez-Farrera M.A. 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.
- González-Christen A. 1990. Algunas interacciones entre *Dioon edule* (Zamiaceae) y *Peromyscus mexicanus* (Rodentia: Cricetidae). *La Ciencia y el Hombre* **5**:77-92.
- González-Espinoza A., Pérez-Espinoza B.A. y Ramírez-Marcial N. 2012. Distribución espacial y respuesta fototrópica de *Dioon merolae* (Zamiaceae) en poblaciones relictuales del centro de Chiapas. *Botanical Sciences* **90**:63-72.
- Jamioy-Orozco D.D. 2011. Propuesta de indicadores de calidad edafológicos para valorar la influencia de los sistemas productivos sobre algunas propiedades físicas y química en oxisoles del piedemonte llanero colombiano. Tesis maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Palmeira, Colombia. 110 pp.
- Khabazian I., Bains J.S., Williams D.E., Cheung J., Wilson J.M.B., Pasqualotto B.A., Pelech S.L., Andersen R.J., Wang Y.-T., Liu L., Nagai A., Kim S.U., Craing U-K., and Shaw C.A. 2002. Isolation of various forms of sterol β -d-glucoside from the seed of *Cycas circinalis*: neurotoxicity and implications for ALS-parkinsonism dementia complex. *Journal of Neurochemistry* **82**:516-528.
- Klark D.B., and Klark D.A. 1988. Leaf production and the cost of reproduction in the neotropical rain forest cycad, *Zamia skinneri*. *Journal of Ecology* **76**:1153-1163.
- Lázaro-Zermeño J.M., González-Espinoza M., Mendoza A. y Martínez-Ramos M. 2012. Historia natural de *Dioon merolae* (Zamiaceae) en Chiapas, México. *Botanical Sciences* **90**:73-87.

- Lázaro-Zermeño J.M., González-Espinoza M., Mendoza A., Martínez-Ramos M., and Quintana-Ascencio P.F. 2011. Individual growth, reproduction and population dynamics of *Dioon merolae* (Zamiaceae) under different leaf harvest histories in central Chiapas, Mexico. *Forest Ecology and Management* **261**:427-439.
- López-Gallego C. 2008. Demographic variation in cycad populations inhabiting contrasting forest fragments. *Biodiversity and Conservation* **17**:1213-1225.
- López-Toledo J.F., Valdez-Hernández J.I., Pérez-Farrera M.A., and Cetina-Alcalá V.M. 2012. Composición y estructura arbórea de un bosque tropical estacionalmente seco en la Reserva de la Biosfera La Sepultura, Chiapas. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* **3**:43-56.
- Magurran A.E. 1988. *Ecological Diversity and its Measurement*. Princeton University Press, Princeton.
- Magurran A.E. 2004. *Measuring Biological Biodiversity*. Blackwell Publishing, Malden.
- Marriott F.H.C. 1979. Barnard's Monte Carlo test: how many simulations? *Journal of the Royal Statistical Society C (Applied Statistics)* **28**:75-77.
- Martínez-Ramos M. y Álvarez-Buylla E. 1995. Ecología de poblaciones de plantas de una selva húmeda en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **56**:121-153.
- Monson C.S., Banack S.A., and Cox P.A. 2003. Conservation implications of Chamorro consumption of flying foxes as a possible cause of amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia complex in Guam. *Conservation Biology* **17**:678-686.
- Morisita M. 1959. Measuring the dispersion and analysis of distribution patterns. *Memories of the Faculty of Science, Kyushu University, Series E (Biology)* **2**:215-235.
- Negrón-Ortiz V., and Breckon G.J. 1989. Population structure in *Zamia debilis* (Zamiaceae). I. Size classes, leaf phenology, and leaf turnover. *American Journal of Botany* **76**:891-900.

- Negrón-Ortíz V., and Gorchov D.L. 2000. Effects of fire season and postfire herbivory on the Cycad *Zamia pumila* (Zamiaceae) in slash pine savanna, Everglades National Park, Florida. *International Journal of Plant Sciences* **161**:659-669.
- Nicolalde-Morejón F., González-Astorga J., Vergara-Silva F., Stevenson D.W., Rojas-Soto O., and Medina-Villarreal A. 2014. Biodiversidad de Zamiaceae en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **85**:S114-S125.
- Octavio-Aguilar P., González-Astorga J., and Vovides A.P. 2008. Population dynamics of the Mexican cycad *Dioon edule* Lindl. (Zamiaceae): life history stages and management impact. *Botanical Journal of the Linnean Society* **157**:381-391.
- Osborne R., Calonje M.A., Hill K.D., Stanberg L., and Stevenson D.W. 2012. The world list of cycads. En: Stevenson D.W., Osborne R y Taylor-Blake A.S. Eds. *Proceedings of Cycad 2008. The 8th International Conference on Cycad Biology*, pp. 480-510. The New York Botanical Garden Press, Nueva York.
- Peet R.K. 1974. The measurements of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics* **5**:285-307.
- Pérez-Farrera M.A, Vovides A.P., Octavio-Aguilar P., González-Astorga J., de la Cruz-Rodríguez J., Hernández-Jonapá R., and Villalobos-Méndez S.M. 2006. Demography of the cycad *Ceratozamia mirandae* (Zamiaceae) under disturbed and undisturbed conditions in a biosphere reserve of Mexico. *Plant Ecology* **187**:97-108.
- Pérez-Farrera M.A., and Vovides A.P. 2004. Spatial distribution, population structure, and fecundity of *Ceratozamia mirandae* Lundell (Zamiaceae) in El Triunfo Biosfere Reserve, Chiapas, Mexico. *Botanical Review* **70**:299-311.

- Pérez-Farrera M.A., and Vovides A.P. 2006. The ceremonial use of the threatened “Espadaña” cycad (*Dioon merolae*, Zamiaceae) by a community of the Central Depression of Chiapas, Mexico. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **78**:107-113.
- Pérez-Farrera M.A., Quintana-Ascencio P.F., and Salvatierra-Izaba B. 2000. Population dynamics of *Ceratozamia matudai* (Zamiaceae) in El Triunfo Biosphere Reserve, Chiapas, México. *Journal of the Torrey Botanical Society* **127**:291-299.
- Peters C.M. 1994. *Sustainable Harvest of Non-timber Plant Resources in Tropical Moist Forest: An Ecological Primer*. Biodiversity Support Program, Washington D.C.
- Raimondo D.C., and Donalson J.S. 2003. Responses of cycads with different life histories to the impact of plant collecting: simulation models to determine important life history stages and population recovery times. *Biological Conservation* **111**:345-358.
- Ripley B.D. 1977. Modelling spatial patterns. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B (Methodological)* **39**:172-212.
- Rivera-Fernández A., Octavio-Aguilar P., Sánchez-Coello N.G., Sánchez-Velásquez L.R., Vázquez-Torres S.M., and Iglesias-Andreu L.G. 2012. Estructura poblacional y distribución espacial de *Ceratozamia mexicana* Brongn. (Zamiaceae) en un ambiente conservado y en uno perturbado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* **15**:S110-S117.
- Salomé-Castañeda E. 2009. Parámetros demográficos de *Dioon spinulosum* Dyer & Eichler (Zamiaceae), en San Miguel Soyaltepec, Oaxaca. Tesis maestría, Instituto de Ecología A. C., Xalapa, Veracruz, México. 129p.
- SAS [Statistical Analysis System Institute]. 2002. SAS/STAT Computer Software. Versión 9.00. SAS Institute Inc. Cary.
- Schneider D., Wink M., Sporer F., and Lounibos P. 2002. Cycads: their evolution, toxin, herbivores and insect pollinators. *Naturwissenschaften* **89**:201-294.

SEMARNAT [Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales]. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental – Especies nativas de México de flora y fauna silvestres – Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio – Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*. 2da Sección, 30 de diciembre de 2010.

Turner M.G. 2010. Disturbance and landscape dynamics in a changing world. *Ecology* **91**:2833-2849.

Velasco-García M.V., Sánchez-De la Vega G., Ruiz-García N., Jiménez- Ruiz C., Méndez-Pérez B.Y. y Mejía-Cuevas I. 2011. Distribución de *Dioon holmgrenii* (Zamiaceae) y su estado de conservación. En: Toledo-Flores. L.J. Edit. *13° Foro Estatal de Investigación Científica y Tecnológica*. pp. 495-500. Consejo Oaxaqueño de Ciencia y Tecnología. Oaxaca de Juárez.

Villavicencio-Enríquez L. y Valdez-Hernández J.I. 2003. Análisis de la estructura arbórea del sistema agroforestal rusticano de café en San Miguel, Veracruz, México. *Agrociencia* **37**:413-423.

Vovides A.P. 1990. Spatial distribution, survival, and fecundity of *Dioon edule* (Zamiaceae) in a tropical deciduous forest in Veracruz, Mexico, with notes on its habitat. *American Journal of Botany* **77**:1532-1543.

Vovides A.P. e Iglesias C.G. 1994. An integrated conservation strategy for the cycad *Dioon edule* Lindl. *Biodiversity and Conservation* **3**:137-141.

Vovides A.P. y Nicolalde-Morejón F. 2010. Ficha técnica de *Dioon holmgrenii*. En: Vovides A.P. Comp. *Base de datos de las cícadas mexicanas*. Instituto de Ecología A.C., INECOL. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. DK008. D.F., México. <<http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/ise/fichasnom/Dioon%20holmgrenii.pdf>>

(Consultado 19 agosto 2014).

- Watkinson A.R., and Powell J.C. 1997. The life history and population structure of *Cycas armstrongii* in monsoonal northern Australia. *Oecologia* **111**:341-449.
- Yáñez-Espinosa L., and Sosa-Sosa F. 2007. Population structure of *Dioon purpusii* Rose in Oaxaca, Mexico. *Neotropical Biology and Conservation* **2**:46-54.
- Zarco-Espinoza V.M., Valdez-Hernández J.I., Ángeles-Pérez G., and Castillo-Acosta O. 2010. Estructura y diversidad de la vegetación arbórea del parque estatal Agua Blanca, Macuspana, Tabasco. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo* **26**:1-17.

CAPÍTULO II

DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE *DIOON HOLMGRENII* (CYCADALES: ZAMIACEAE)

Resumen

Dioon holmgrenii es endémica y de distribución restringida al sur de Oaxaca, México, catalogada como en peligro de extinción. La mayoría de sus poblaciones están fragmentadas y de tamaño pequeño debido a perturbaciones humanas, pero no se cuenta con información sobre su diversidad y estructura genética. El objetivo de este estudio fue determinar la diversidad genética y el grado de diferenciación entre poblaciones de *D. holmgrenii*. El ADN se extrajo en folíolos de 285 plantas recolectadas en nueve poblaciones. Seis loci microsatélites se amplificaron mediante PCR y la electroforesis se realizó con secuenciador de ADN. Sesenta y seis alelos se encontraron en las poblaciones. El número promedio de alelos por locus fue 4.7, porcentaje de loci polimórfico 96.3, heterocigocidad observada 0.761, heterocigocidad esperada 0.603, índice de fijación -0.205 e índice de diversidad de Shannon 1.127. Déficit de heterocigotos ($F_{IT} = 0.071$) se encontró al considerar las nueve poblaciones juntas y exceso de heterocigotos se registró a nivel población ($F_{IS} = -0.287$). La diferenciación genética entre poblaciones fue alta ($F_{ST} = 0.287$) con número de migrante menor a uno. Las distancias genéticas de Nei y los componentes principales de los parámetros de diversidad genética agruparon a las poblaciones en dos grupos. La diversidad genética fue alta, pero esta disminuyó en poblaciones pequeñas y con grado alto de perturbación. El intercambio genético bajo entre las poblaciones provoca diferenciación genética alta, lo cual está asociado a la fragmentación, aislamiento, tamaño pequeño y las barreras geográficas.

Palabras clave: loci polimórfico, heterocigocidad, índice de fijación, distancia genética, endémico.

Abstract

Dioon holmgrenii is an endemic and restricted species that occurs in the south of Oaxaca State, Mexico. It is an endangered species. Most populations are fragmented and small due to human disturbances, but no information about their diversity and genetic structure is available. The aim of the present study was to determine the genetic diversity and degree of differentiation among populations of *D. holmgrenii*. DNA was extracted from leaflets of 285 plants from nine populations, and six microsatellite loci were selected to estimate diversity and genetic structure. The electrophoresis was performed using a DNA sequencer. Sixty-six alleles were found in the nine populations. The alleles per locus was 4.7. The average percentage of polymorphic loci was 96.3 %. Observed heterozygosity and expected heterozygosity were 0.761 and 0.603, respectively. The fixation index was -0.205, and diversity index of Shannon was 1.127. A deficit of heterozygotes ($F_{IT} = 0.071$) was found in the nine populations together, while an excess of heterozygotes was recorded at population level ($F_{IS} = -0.287$). The genetic differentiation among populations was high ($F_{ST} = 0.287$) with less than one migrant per generation. Nei genetic distances and the main components of genetic diversity parameters grouped the nine population in two groups. *D. holmgrenii* had high genetic diversity. However, there was low genetic diversity in small and deteriorate populations. Low genetic exchange among populations causes high genetic differentiation because of fragmentation, isolation, small population size and geographical barriers.

Key words: polymorphic loci, heterozygosity, fixation index, genetics, endemic distance, endemic.

Introducción

Los cicadales tienen importancia evolutiva debido a su origen ancestral en el período pérmico y posiblemente en el carbonífero de la era paleozoica, entre 280 a 345 Ma (Mamay, 1976; Zhifeng y Thomas, 1989; Condamine *et al.*, 2015). Además mantienen interacciones específicas con pocos organismos para la dispersión de semillas, polinización, obtención de nitrógeno y agua, y constituyen el único alimento para algunas especies de mariposas (Fisher y Vovides, 2004; Pérez-Farrera *et al.*, 2006; Terry *et al.*, 2012; Ruiz-García *et al.*, 2015). México ocupa el segundo lugar en diversidad de cícadas con 54 especies de la familia Zamiaceae, de las cuales, alrededor del 90 % son endémicas (Osborne *et al.*, 2012; Nicolalde-Morejón *et al.*, 2014).

Dioon holmgrenii De Luca, Sabato & Vázq. Torres es endémica de México y crece en trece poblaciones aisladas en altitudes entre 500 y 1400 msnm en las subprovincias fisiográficas Sierra Madre del Sur y Planicies Costeras del Pacífico (*sensu* Ortiz-Pérez *et al.*, 2004) en el estado de Oaxaca (De Luca *et al.*, 1981; Velasco-García *et al.*, 2011; Velasco-García *et al.*, 2016). El cambio de uso de suelo por agricultura de temporal y ganadería intensiva presente en las poblaciones de esta especie cambia la estructura poblacional y la dispersión espacial de los individuos y disminuye la densidad de individuos, además, el cambio de uso de suelo conduce a la fragmentación, aislamiento y reducción del tamaño de las poblaciones (Chemnick *et al.*, 2010; Velasco-García *et al.*, 2011; Velasco-García *et al.*, 2016). Debido a lo anterior, *D. holmgrenii* está listada en el apéndice II de CITES y catalogada como en peligro de extinción en la NOM-059-SEMARNAT-2010 y por la UICN (SEMARNAT, 2010; Chemnick *et al.*, 2010; CITES, 2015).

La evaluación de la diversidad y estructura genética de las poblaciones de las especies es importante para el diseño de planes para su conservación (Frankham *et al.*, 2002; Rao y Hodgkin, 2002; Diniz-Pilho *et al.*, 2012). Todas las cícadas mexicanas están en situación crítica de conservación y en alguna categoría de riesgo (SEMARNAT, 2010; Nicolalde-Morejón *et al.*,

2014), por lo que estudios sobre la magnitud y distribución de la diversidad genética son necesarios para identificar problemas de endogamia, exogamia, flujo génico y mutaciones deletéreas (Frankham *et al.*, 2002). En este sentido, la diversidad genética *D. edule* Lindl. (González-Astorga *et al.*, 2003; Octavio-Aguilar *et al.*, 2009), *D. angustifolium* Miq. (González-Astorga *et al.*, 2005), *D. sonorensis* (De Luca, Sabato & Vázquez Torres) Chemnick, Gregory & S. Salas-Mor., *D. tomasellii* De Luca, Sabato & Vázquez Torres (González-Astorga *et al.*, 2008), *D. caputoi* De Luca, Sabato & Vázquez Torres (Cabrera-Toledo *et al.*, 2008; Cabrera-Toledo *et al.*, 2010) y *D. merolae* De Luca, Sabato & Vázquez Torres (Cabrera-Toledo *et al.*, 2010) se ha evaluado con marcadores isoenzimáticos; sin embargo, estudios con marcadores microsatélites aún son escasos, entre ellos resaltan los realizados en *D. edule* y *D. angustifolium* (Moynihan *et al.*, 2012). Estos estudios demostraron que el género *Dioon*, aun en poblaciones reducidas conserva diversidad genética alta y exceso de individuos heterocigotos (Cabrera-Toledo *et al.*, 2008; Cabrera-Toledo *et al.*, 2010), contrario a lo que ocurre con especies del género *Cycas* L. (Keppel, 2002; Xiao *et al.*, 2004, 2005).

La diversidad y estructura genética de dos poblaciones (Rancho el Limón y San Bartolomé) de *D. holmgrenii* se evaluó con marcadores isoenzimáticos (González-Astorga *et al.*, 2008), mientras que con marcadores microsatélites solo se evaluó la diversidad genética de ellas (Prado *et al.*, 2016). Diversidad genética baja se encontró para *D. holmgrenii* con marcadores isoenzimáticos (González-Astorga *et al.*, 2008), mientras que, diversidad genética alta se encontró con marcadores microsatélites (Prado *et al.*, 2016); sin embargo, no existe información sobre la diversidad y estructura genética para 11 poblaciones.

Dada la importancia y la situación crítica de *D. holmgrenii*, el conocimiento de la diversidad y estructura genética de todas sus poblaciones es necesario para el diseño de programas de conservación. Por lo anterior, el objetivo del estudio presente fue estimar la diversidad y la estructura genética de nueve poblaciones de *Dioon holmgrenii* con marcadores microsatélites. Se

esperaría encontrar una diversidad genética baja en las poblaciones reducidas como consecuencia del apareamiento entre un número bajo de individuos. También, un nivel alto de diferenciación entre poblaciones es de esperarse debido al aislamiento de las poblaciones y la dificultad del flujo génico entre éstas.

Materiales y métodos

Muestreo. El tamaño de muestra en cada una de las nueve poblaciones fue 30 a 36 individuos de *D. holmgrenii* (285 en total). Para la extracción de ADN se obtuvieron folíolos en 285 plantas de todos los estadios de desarrollo definidos por Velasco-García *et al.* (2016) en poblaciones con y sin cambio de uso de suelo. La distancia mínima entre plantas muestreadas fue de 100 m en todas las poblaciones, excepto en Rancho el Limón donde la distancia mínima fue 30 m debido al tamaño de esa población (< 5 ha). Las muestras de follaje se depositaron en bolsas de plástico y se colocaron sobre hielo para transportarlas al laboratorio del Postgrado en Ciencias Forestales del Colegio de Postgraduados, en donde se almacenaron a -20 °C hasta la extracción del ADN.

Extracción de ADN. La extracción del ADN se realizó en 100 mg de tejido mediante el paquete comercial ChargeSwitch® gDNA Plant DNA extraction de Invitrogene, utilizando un robot de extracción de ADN (King Fisher Flex, Thermo Scientific™). La calidad (absorbancia a 260/280) y la concentración del ADN se determinaron con un espectrómetro de volumen ultra bajo (NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Scientific™).

Selección, análisis y detección de microsatélites. Mediante geles de agarosa se probaron 17 iniciadores para seleccionar los seis utilizados en este estudio (Cuadro1). Cinco iniciadores seleccionados fueron desarrollados para *D. edule* (Moynihan *et al.*, 2007) y un iniciador fue desarrollado para *Zamia integrifolia* L.f. (Meerow y Nakamura, 2007).

Las temperaturas de desnaturalización, alineamiento y extensión se ajustaron de acuerdo a los resultados observados en los geles de agarosa. La PCR se realizó en un termociclador (C1000™ Thermal Cycler, Bio Rad®). El ADN genómico se diluyó a una concentración de 20 ng μl^{-1} con agua HPLC. Cada mezcla de reacción de PCR múltiple de 20 μl estuvo integrada por 5 μl de 5X Buffer PCR, 0.6 μl 25 mM de MgCl_2 , 0.5 μl de 10 mM de DNTP, 5 μl de 10 pM de cada par de iniciador hacia adelante (2.5 μl de cada uno), 5 μl de 10 pM de cada par de iniciador en reversa (2.5 μl de cada uno), 0.25 μl de 5 unidades de Taq ADN polimerasa (GoTaq Flexi DNA Polymerase, Promega) y 2.0 μl de ADN molde (20 ng μl^{-1}) y 1.65 μl de agua HPLC. La PCR múltiple consistió de 5 minutos de desnaturalización inicial a 94 °C; seguido de 35 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94 °C, un minuto de alineación a 58.1 (grupo 1) o 57.3 °C (grupo 2), 2 minutos de extensión a 72 °C, con una extensión final de 15 minutos a 72 °C.

Los iniciadores que amplificaron se marcaron con etiquetas fluorescentes en el extremo 5'. Los iniciadores con temperaturas de alineamiento similares se agruparon por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) múltiple para la amplificación (Cuadro 1). La electroforesis de los productos de PCR se realizó en un secuenciador de ADN (Genetic Analyzer 3130, Applied Biosystem). Cada reacción para electroforesis consistió de 2 μl de producto de PCR, 0.25 μl de Size Standar LIZ®500 y 7.75 μl de formamida. Las reacciones fueron desnaturalizadas a 96 °C durante tres minutos en un termociclador (C1000™ Thermal Cycler, Bio Rad®) y después congeladas a -20°C por tres minutos antes de ingresar al secuenciador.

Cuadro 1. Características de los iniciadores de microsatélites SSR para nueve poblaciones de *Dioon holmgrenii*. F= iniciador hacia adelante, R = iniciador en reversa, TA = temperatura de alineamiento.

Grupo	Locus	Iniciador (5'-3')	Unidad Repetida	Número de alelos	Tamaño (pb)	Etiqueta fluorescente	TA (° C)
1	Ed3	F: GCATGAGGAGCTTGTTCCGT R: CTGTGAACTCCTGAAAGCATC	(CT) ₁₉	7	88-98	6-FAM	58.1
1	Cap5	F: CACTACCACCCCTATAACCAC R: GACTTGAGCTTGTCTTTGTTG	(CT) ₂₃	7	162-173	HEX	58.1
2	Ed5	F: AGGCATAAATGGCTAAGCATAAC R: GCATTTCTAGTGGACAAACCAG	(AG) ₁₆	12	149-167	HEX	57.3
2	Ed6	F: ATGCAGATGAAACACACCC R: TCCTAACCATCCATCACTACC	(TGG) ₈	5	119-154	ROX	57.3
3	1660	F: GGTGCTGAAGAGGAAGAAGAA R: AGGGGAGAAGACATAACAAAGT	(GAA) ₁₆	14	171-248	6-FAM	58.9
3	Zam29	F: ACTTCCTACCTAAAGATGCTA R: TCCTGCTTACTTTAGATGCT	(AGT) ₁₅	13	161-247	HEX	58.9

Análisis de datos. Los alelos se identificaron con el programa GeneMapper® (Applied Biosystem, 2005) y se nombraron dentro de cada locus de acuerdo a su tamaño en pares de bases. Los parámetros de diversidad genética como el número promedio de alelos por locus, porcentaje de loci polimórficos, heterocigocidad observada, heterocigocidad esperada, índice de fijación (F) (Wright, 1951) e índice de Shannon (H') (Shannon y Weaver, 1949) se calcularon con el programa POPGENE 1.31 (Yhe *et al.*, 1997). De cada parámetro de diversidad genética se obtuvieron 5000 remuestreos *bootstrap* en cada población y se obtuvo el componente principal de los parámetros de diversidad genética. Las diferencias entre poblaciones de los parámetros de diversidad genética y de los componentes principales uno (CP1) y dos (CP2) se determinaron con pruebas no paramétricas de varianza y comparaciones múltiples de rangos de Kruskal-Wallis (Kruskal y Wallis, 1952; Conover e Iman, 1981) usando el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2002). El número y porcentaje de alelos comunes, raros y exclusivos fueron identificados para cada población. Los alelos se denominaron raros cuando su frecuencia fue menor a 0.05, y comunes cuando su frecuencia fue igual o mayor a 0.05 (Marshall y Brown, 1975). Los alelos exclusivos fueron aquellos que sólo se encontraron en una población. La estructura genética de las poblaciones se estimó mediante los estadísticos F de Wright (1951), los cuales describen la fijación de alelos o los efectos de la endogamia a nivel población (F_{IS}), entre poblaciones (F_{ST}) y considerando todas las poblaciones como una sola (F_{IT}). El número de migrantes por generación (Nm) se calculó con la igualdad $Nm = (1 - F_{ST}) / (4 F_{ST})$ (Wright, 1951). Las distancia genéticas de Nei (Nei, 1972) se calcularon entre las poblaciones, y se construyó un dendrograma con el método de agrupamiento de pares no ponderados con promedios aritméticos (UPGMA). La relación entre las distancias genéticas de Nei y las distancias geográficas entre poblaciones se obtuvo.

Resultados

Diversidad genética. En las poblaciones de *D. holmgrenii* 66 alelos se encontraron en los seis loci incluidos en este estudio. El porcentaje de alelos comunes varió entre 72 y 90 %, mientras que el porcentaje de alelos raros fluctuó entre 5.1 en la población Ocotlán a 28 % en Cerro Caballo. Nueve alelos exclusivos se encontraron en cuatro poblaciones (Cuadro 2).

Cuadro 2. Número y clase de alelos encontrados en nueve poblaciones de *Dioon holmgrenii*.

Población	Alelos						
	Totales	Comunes	%	Raros	%	Exclusivos	%
Río Leche	37	32	86.5	5	13.5	3	8.1
La Lima	24	21	87.5	3	12.5	0	0.0
Ocotlán	39	37	94.9	2	5.1	1	2.6
Rancho Viejo	20	18	90.0	2	10.0	0	0.0
Rancho el Limón	22	18	81.8	4	18.2	1	4.5
Cerro Antiguo	26	22	84.6	4	15.4	4	15.4
Cieneguilla	23	20	87.0	3	13.0	0	0.0
Cerro Caballo	25	18	72.0	7	28.0	0	0.0
San Bartolomé	24	20	83.3	4	16.7	0	0.0
Promedio	26.7	22.9	85.3	3.8	14.7	1.0	3.4

Todos los loci fueron polimórficos en *D. holmgrenii*, excepto el loci Ed6 en la población Rancho el Limón y el loci Zam29 en Cieneguilla (Cuadro 3). El número de alelos por locus (NA) y la heterocigocidad observada (H_o) no fueron diferentes ($p \geq 0.4868$) entre poblaciones, mientras que la heterocigocidad esperada (H_e), el índice de fijación (IF) y el índice de diversidad de Shannon

(H') fueron diferentes ($p < 0.0001$) entre poblaciones (Cuadro 3). El NA mayor se registró en La Lima y Ocotlán, y el NA menor se halló en Rancho Viejo. Las heterocigocidades observadas mayor y menor se registraron en La Lima y Rancho el Limón, respectivamente. La He mayor se encontró en la población Ocotlán, mientras que menores He se encontraron en Rancho Viejo, Rancho el Limón y Cerro Caballo. El IF menor ocurrió en la población La Lima y el IF mayor se encontró en Cerro Antiguo. El H' mostró que la población Ocotlán tuvo diversidad mayor, mientras que Rancho Viejo tuvo diversidad menor (Cuadro 3).

Cuadro 3. Diversidad genética de nueve poblaciones de *Dioon holmgrenii*. PLP: porcentaje de loci polimórficos, NA: número de alelos por locus, Ho: heterocigocidad observada, He: heterocigocidad esperada, IF: índice de fijación, H' = índice de diversidad de Shannon, CP1 = componente principal uno y CP2 = componente principal dos de los índices de diversidad. †Medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Población	PLP	NA	Ho	He	IF	H'	CP1	CP2
Río Leche	100	6.2 ^{a†}	0.964 ^a	0.737 ^b	-0.352 ^c	1.452 ^b	2.59 ^b	0.23 ^c
La Lima	100	6.5 ^a	0.978 ^a	0.636 ^d	-0.601 ^a	1.112 ^d	2.29 ^c	-1.98 ⁱ
Ocotlán	100	6.5 ^a	0.952 ^a	0.790 ^a	-0.231 ^f	1.651 ^a	2.96 ^a	1.36 ^a
Rancho Viejo	100	3.3 ^a	0.666 ^a	0.496 ^f	-0.121 ^e	0.872 ^h	-1.78 ^g	0.07 ^d
Rancho el Limón	83	3.7 ^a	0.610 ^a	0.500 ^f	-0.108 ^e	0.899 ^g	-2.42 ⁱ	0.01 ^e
Cerro Antiguo	100	4.3 ^a	0.628 ^a	0.611 ^c	-0.091 ^g	1.145 ^c	-0.67 ^e	1.07 ^b
Cieneguilla	83	3.8 ^a	0.636 ^a	0.518 ^c	-0.209 ^h	0.975 ^c	-1.90 ^h	-0.32 ^g
Cerro Caballo	100	4.1 ^a	0.735 ^a	0.574 ^f	-0.299 ^b	1.018 ^e	-0.34 ^d	-0.42 ^h
San Bartolomé	100	4.0 ^a	0.683 ^a	0.565 ^e	-0.227 ^d	1.018 ^f	-1.73 ^f	-0.02 ^f
Promedio	96.3	4.7	0.761	0.603	-0.205	1.127	-0.11	0.00

El componente principal uno (CP1) de los índices de diversidad explicó el 73 % de la variabilidad y el componente principal dos (CP2) el 15 % (Figura 1). La Ho, He y NA tuvieron influencia mayor (0.45 a 0.47) para explicar la variabilidad del CP1 y el IF tuvo influencia mayor (0.77) en la variabilidad del CP2; en cambio, el PLP tuvo influencia menor para explicar la variabilidad de ambos componentes (0.28, 0.10). El CP1 y el CP2 fueron diferentes ($p < 0.0001$) entre las poblaciones; Ocotlán tuvo el valor mayor para ambos componentes, mientras que Rancho el Limón y La Lima tuvieron el menor valor para el CP1 y CP2, respectivamente (Cuadro 3).

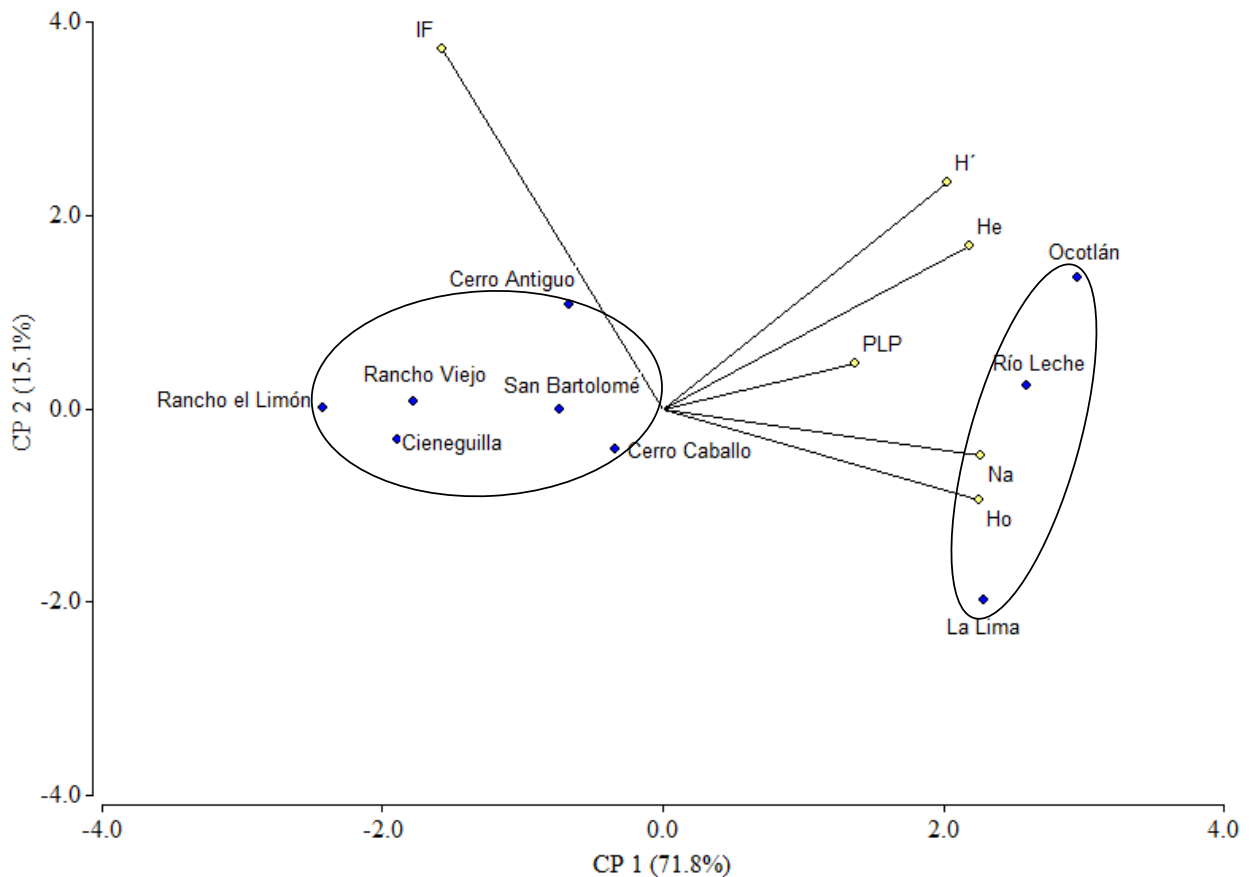


Figura 1. Agrupamiento de nueve poblaciones de *Dioon holmgrenii* con base en dos componentes principales (CP1 y CP2) de los parámetros de diversidad genética (PLP = porcentaje de loci polimórficos, Na = número de alelos por locus, Ho = heterocigocidad observada, He = heterocigocidad esperada, H' = índice de diversidad de Shannon, IF = índice de fijación).

Estructura genética. El índice de fijación a nivel poblacional (F_{IS}) varió de -0.526 a 0.290, mientras que el índice de fijación total (F_{IT}) fue de -0.155 a 0.515 (Cuadro 4). El índice de fijación entre poblaciones (F_{ST}) mostró una diversidad genética mayor dentro (72.2 %) de poblaciones que entre ellas (27.8 %, $F_{ST} = 0.278$) (Cuadro 4). Menos de un migrante por generación (N_m) se encontró para cinco loci, mientras que más de N_m se encontró en un loci (Cuadro 4).

Cuadro 4. Valores de los estadísticos F de Wright y número de migrantes por generación (N_m) para seis loci en nueve poblaciones de *Dioon holmgrenii*. F_{IS} : coeficiente de fijación a nivel población, F_{IT} : coeficiente de fijación total, F_{ST} : coeficiente de fijación entre poblaciones.

Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	N_m
Ed3	-0.526	-0.143	0.251	0.746
Cap5	-0.433	-0.095	0.236	0.812
Ed5	-0.288	0.009	0.230	0.836
Ed6	-0.453	0.296	0.515	0.235
1660	-0.310	-0.155	0.118	1.865
Zam29	0.290	0.515	0.317	0.539
Promedio	-0.287	0.071	0.278	0.839

La distancia genética promedio entre las nueve poblaciones de *D. holmgrenii* fue 1.184. La menor diferenciación genética se encontró entre las poblaciones Cerro Caballo y San Bartolomé, y entre Rancho el Limón y Cieneguilla, mientras que la diferenciación genética mayor se presentó entre Río Leche y Rancho el Limón (Cuadro 5). La distancia genética entre poblaciones tuvo correlación positiva y significativa ($r = 0.68$, $p < 0.0001$) con la distancia geográfica de las poblaciones (Figura 2).

Cuadro 5. Distancias genéticas de Nei entre nueve poblaciones de *Dioon holmgrenii*.

Población	La Lima	Ocotlán	Rancho Viejo	Rancho el Limón	Cerro Antiguo	Cieneguilla	Cerro Caballo	San Bartolomé
Río Leche	0.206	0.516	2.381	4.036	1.629	2.989	1.507	1.357
La Lima		0.398	1.777	2.650	1.639	2.281	1.493	1.427
Ocotlán			0.955	1.659	1.763	1.431	1.513	1.371
Rancho Viejo				0.300	0.941	0.121	0.603	0.783
Rancho el Limón					0.836	0.067	0.620	0.825
Cerro Antiguo						0.804	0.205	0.130
Cieneguilla							0.527	0.731
Cerro Caballo								0.066

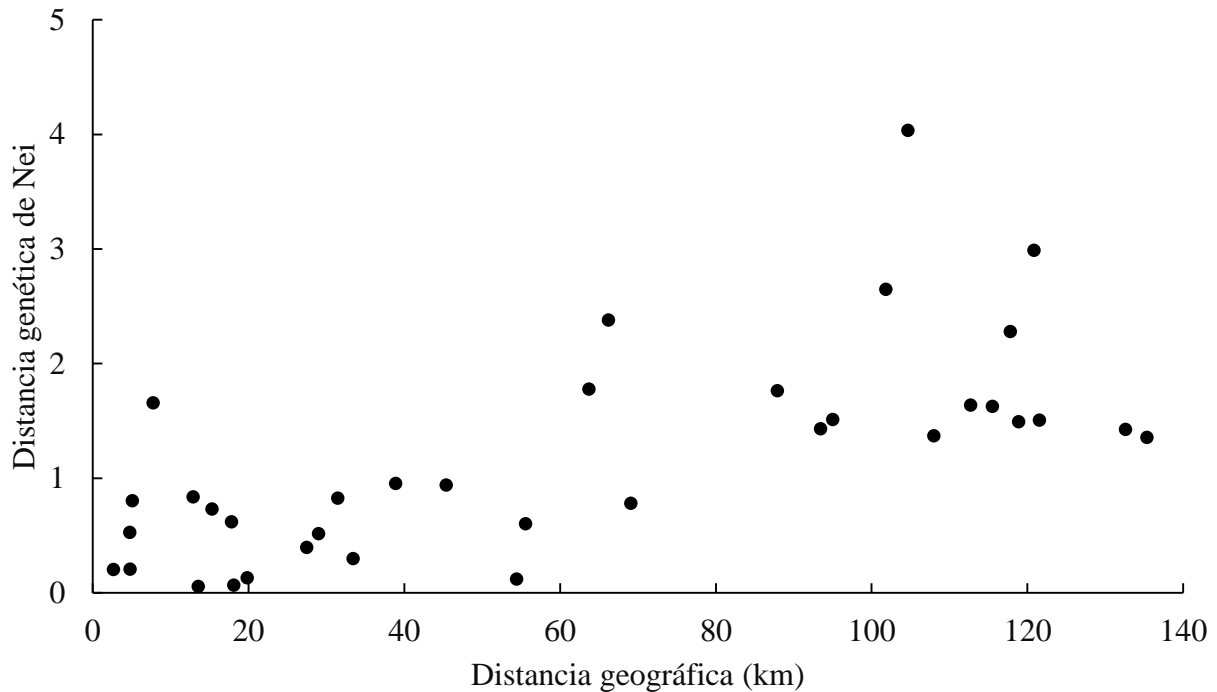


Figura 2. Relación entre distancias genéticas y distancias geográficas para las poblaciones de *Dioon holmgrenii*.

Las poblaciones de *D. holmgrenii* se agruparon en dos grupos de acuerdo a las distancias genéticas de Nei (Figura 3), y esos mismos grupos se confirmaron al graficar el componente principal 1 en contra del componente principal 2 (Figura 1).

Discusión

Diversidad genética. Generalmente, una diversidad genética reducida se esperaría en especies de plantas con poblaciones pequeñas como consecuencia de la deriva genética y endogamia (Hamrick *et al.*, 1991; Hedrick, 2000; Leimu *et al.*, 2006). Sin embargo, en este estudio se encontró que el nivel de diversidad genética en *D. holmgrenii* fue alto, a pesar de que como reporta Velasco-García *et al.* (2016) ésta cícada crece en poblaciones fragmentadas y aisladas como consecuencia del

cambio de uso de suelo. El valor de diversidad genética en *D. holmgrenii* en el estudio presente fue superior a los valores de diversidad genética encontrados en especies endémicas y leñosas perennes (Hamrick y Godt, 1996; Hamrick, 2004). Esto confirmó que especies raras conservan niveles altos de diversidad genética (Gitzendanner y Soltis, 2000; Cole, 2003), al igual que en otras especies del género *Dioon* (González-Astorga *et al.*, 2008; Cabrera-Toledo *et al.*, 2008; Prado *et al.*, 2016). En contraste, el género *Cycas* presenta niveles bajos de diversidad genética (Keppel, 2002; Xiao *et al.*, 2004, 2005). La diversidad genética alta de *D. holmgrenii* puede ser consecuencia de la longevidad de los individuos, la historia evolutiva y el sistema de cruzamiento de la especie (Cabrera-Toledo *et al.*, 2008, 2010).

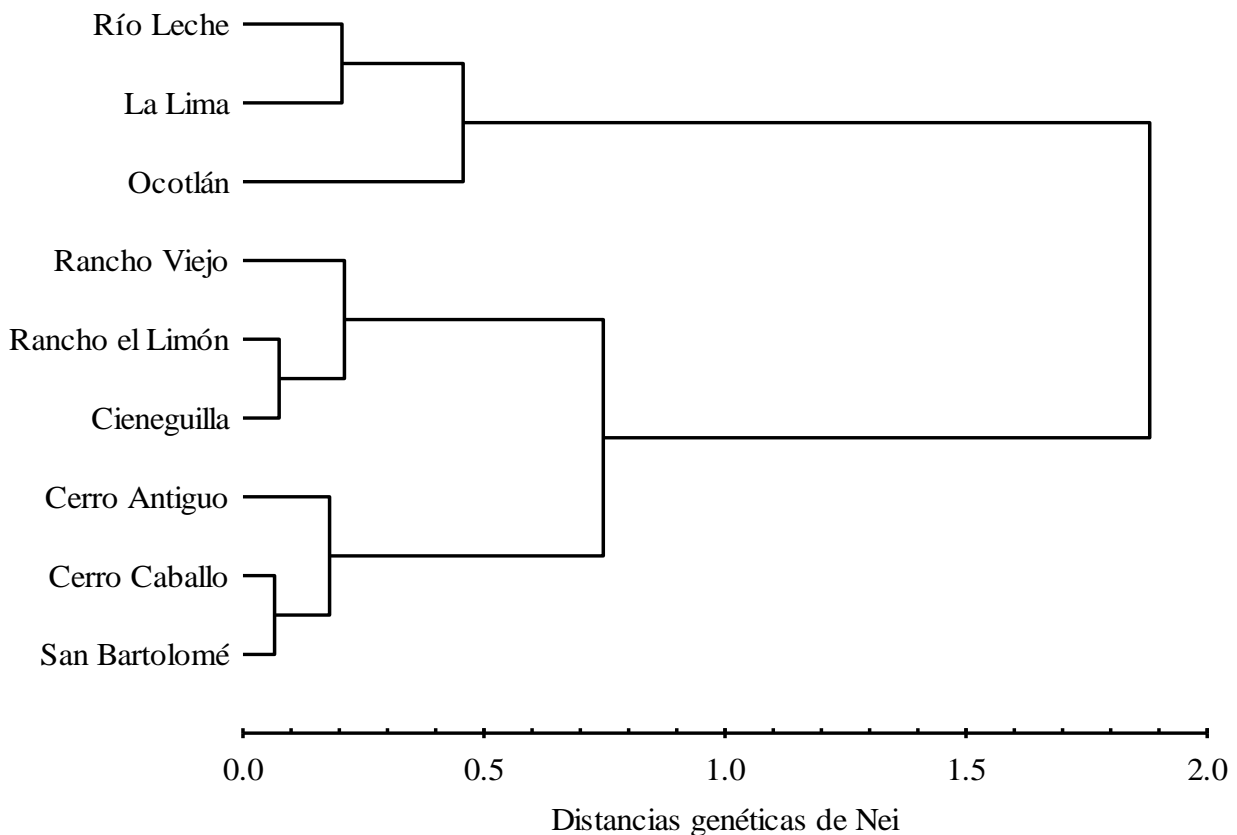


Figura 3. Agrupamiento de nueve poblaciones de *Dioon holmgrenii* con base en las distancias genéticas de Nei, mediante el método de agrupamiento UPGMA.

El porcentaje de loci polimórficos (PLP) de todas las poblaciones de *D. holmgrenii* fue superior al de *D. angustifolium* (PLP = 71.43) y *D. edule* (PLP = 48.57) evaluadas con marcadores microsátélites (Moynihan *et al.*, 2012), así como al de todas las especies del género *Dioon* (PLP = 52.4 a 83.15) evaluadas con isoenzimas (González-Astorga *et al.*, 2003, 2005, 2008; Cabrera-Toledo *et al.*, 2008, 2010), excepto *D. edule* (PLP = 95.41) y *D. merolae* (PLP = 96.3) (Octavio-Aguilar *et al.*, 2009; Cabrera-Toledo *et al.*, 2010). Los PLP obtenidos para la mayoría de las poblaciones de *D. holmgrenii* fueron iguales a los valores promedios (PLP = 100) reportados para las especies de *Zamia* L. (Meerow *et al.*, 2012b), pero superiores a los valores reportados para la mayoría de las especies del género *Cycas* (PLP = 88.11 a 94.12) (Meerow *et al.*, 2012b; Gong *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2014, 2016a). Rancho el Limón y Cieneguilla tuvieron los porcentajes de loci polimórficos más bajos, valores inferiores a los porcentajes reportados para *D. merolae* (PLP = 96.3, Cabrera-Toledo *et al.*, 2010) y *D. edule* (PLP = 95.41, Octavio-Aguilar *et al.*, 2009), similares a aquellos para *D. caputoi*, *D. sonorensis* y *D. tomasellii* (PLP = 78.95 a 83.15) (Cabrera-Toledo *et al.*, 2008; González-Astorga *et al.*, 2008), pero superiores a los de *D. edule*, *D. angustifolium* y *D. caputoi* (PLP = 52.4 a 76.90) evaluadas con isoenzimas (González-Astorga *et al.*, 2003, 2005; Cabrera-Toledo *et al.*, 2010). Los PLP de las poblaciones Rancho el Limón y San Bartolomé fueron mayores al promedio reportado para dichas poblaciones evaluadas con isoenzimas, los cuales por lo regular son menores que con microsátélites (González-Astorga *et al.*, 2008).

El número promedio de alelos por locus (NA) resultó superior en todas las poblaciones de *D. holmgrenii* que los valores promedios reportados para *D. angustifolium* (NA = 1.93, 2.86) y *D. edule* (NA = 1.91) (Moynihan *et al.*, 2012; Prado *et al.*, 2016), pero menores en la mayoría de las poblaciones de *D. holmgrenii* a los valores reportados para *D. edule* (NA = 5.86) y *D. spinulosum* Dyer ex Eichler (NA = 5.57) (Prado *et al.*, 2016). Los valores de NA obtenidas en las poblaciones

de *D. holmgrenii* fueron similares a los reportados para especies del género *Cycas* (NA = 3.5 a 5.8) (Cibrián-Jaramillo *et al.*, 2010; Gong *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2016b), *Zamia* (NA = 4.7 a 6.8) (Meerow *et al.*, 2012a, 2012b; Calonje *et al.*, 2013) y *Macrozamia* Miq. (NA = 5.4, Elliott *et al.*, 2014). El NA de las poblaciones Rancho el Limón y San Bartolomé fueron ligeramente superiores al promedio reportado para las mismas poblaciones evaluadas con microsátélites (NA = 3.57, Prado *et al.*, 2016) y muy superiores al promedio obtenido mediante isoenzimas (NA = 1.71, González-Astorga *et al.*, 2008).

La H_o y H_e de las poblaciones de *D. holmgrenii* fueron superiores o similares a los promedios de otras especies de los géneros *Dioon* ($H_o = 0.291$ a 0.664) (Moynihan *et al.*, 2012; Prado *et al.*, 2016), *Zamia* ($H_o = 0.446$ a 0.603 , $H_e = 0.450$ a 0.572) (Meerow y Nakamura, 2007; Meerow *et al.*, 2012a; Calonje *et al.*, 2013), *Cycas* ($H_o = 0.195$ a 0.600 , $H_e = 0.357$ a 0.497) (Zheng-Feng *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010; Gong *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2016a) y *Macrozamia* ($H_o = 0.524$, $H_e = 0.520$, Elliott *et al.*, 2014). Los valores de H_o y H_e obtenidos para las poblaciones Rancho el Limón y San Bartolomé fueron menores ($H_o = 0.647$, $H_e = 0.532$) que los valores ($H_o = 0.676$, $H_e = 0.606$) reportados para las misma poblaciones usando microsátélites distintos a los usados en este estudio (Prado *et al.*, 2016), mientras que los valores de H_o y H_e obtenidos con isoenzimas fueron menores ($H_o = 0.204$, $H_e = 0.170$) (González-Astorga *et al.*, 2008).

El índice de diversidad de Shannon de las poblaciones de *D. holmgrenii* ($H' = 0.872$ a 1.145) fue superior o similar al reportado para especies del género *Cycas* como *C. simplicipinna* (Smitinand) K.D. Hill ($H' = 0.603$ a 1.268 , Feng *et al.*, 2014), *C. multipinnata* C.J. Chen & S.Y. Yang ($H' = 0.910$ a 1.122 , Gong *et al.*, 2015), *C. guizhouensis* K.M. Lan & R.F. Zou ($H' = 0.053$ a 0.127 y 0.543 a 1.175) (Xiao *et al.*, 2004; Feng *et al.*, 2016b).

Aun cuando el CP1 mostró que todas las poblaciones fueron diferentes entre ellas, tres poblaciones tuvieron valores positivos y las demás valores negativos (Cuadro 3), estas poblaciones

conforman dos grupos al graficar el CP1 y CP2 (Figura 1). Entre las poblaciones del primer grupo Ocotlán tuvo el valor mayor del CP1 y CP2 por tener mayor superficie, mientras que La Lima tuvo el valor menor por ser la población más afectada por la agricultura de temporal y la ganadería intensiva (Velasco-García *et al.*, 2016). Entre las poblaciones del segundo grupo Cerro Caballo tuvo valor mayor del CP1 por ser la población menos perturbada, mientras que Rancho el Limón tuvo el valor menor por ser una población reducida de menos de 5 ha y más afectada por la ganadería intensiva (Velasco-García *et al.*, 2016). La combinación entre el tamaño y los niveles de perturbación en las poblaciones parecen definir los niveles de diversidad genética de las poblaciones de *D. holmgrenii*.

Estructura genética. En las poblaciones de *D. holmgrenii* evaluadas el índice de fijación total (F_{IT}) fue positivo ($F_{IT} = 0.009$ a 0.515) para la mitad de los loci polimórficos, lo cual indicó deficiencia de individuos heterocigotos (De Jong *et al.*, 1994; Altukhov, 2006); mientras que, valores negativos de F_{IT} ($F_{IT} = -0.155$ a -0.095) se obtuvo para la otra mitad, lo que indicó exceso de individuos heterocigotos (De Jong *et al.*, 1994; Altukhov, 2006). El coeficiente de fijación total promedio ($F_{IT} = 0.071$) de *D. holmgrenii* indicó deficiencia de heterocigotos y fue menor al reportado para *D. angustifolium*, *D. sonorensis*, *D. tomasellii* y *D. edule* ($F_{IT} = 0.116$ a 0.336) (González-Astorga *et al.*, 2005, 2008; Octavio-Aguilar *et al.*, 2009), mientras que en poblaciones de *D. edule*, *D. caputoi* y *D. merolae* se encontró un exceso de heterocigotos ($F_{IT} = -0.482$ a -0.172) (González-Astorga *et al.*, 2003; Cabrera-Toledo *et al.*, 2008, 2010).

El índice de fijación a nivel poblacional (F_{IS}) de *D. holmgrenii* fue negativo en cinco de seis loci polimórficos ($F_{IS} = -0.526$ a -0.388), lo cual indicó exceso de heterocigotos (De Jong *et al.*, 1994), en cambio, solo en un loci mostró deficiencia de heterocigotos ($F_{IS} = 0.290$). El del índice de

fijación promedio a nivel poblacional ($F_{IS} = -0.287$) de *D. holmgrenii* mostró, también un exceso de heterocigotos el cual fue mayor al de *D. edule* ($F_{IS} = -0.270$, González-Astorga *et al.*, 2003), pero menor a los de *D. caputoi* ($F_{IS} = -0.452$) y *D. merolae* ($F_{IS} = -0.592$) (Cabrera-Toledo *et al.*, 2010), mientras que para *D. angustifolium*, *D. sonorensis*, *D. tomasellii* y *D. edule* se reportó deficiencia de heterocigotos ($F_{IS} = 0.007$ a 0.173) en evaluaciones con isoenzimas (Cabrera-Toledo *et al.*, 2010; González-Astorga *et al.*, 2008; Octavio-Aguilar *et al.*, 2009). Aunado a lo anterior, la heterocigocidad observada (H_o) fue mayor que la heterocigocidad esperada (H_e) en todas las poblaciones de *D. holmgrenii* en el estudio presente, por lo que existe un exceso de individuos heterocigotos, esto pudo indicar que la deriva génica y la endogamia no tienen efecto (Templeton y Read, 1994) en las poblaciones de *D. holmgrenii*. Asimismo, el índice de fijación (IF) negativo en las poblaciones de *D. holmgrenii* (Cuadro 3) indica exceso de heterocigotos (Hartl y Clark, 2007), contrario a lo reportado para *D. edule* (IF = 0.274, Octavio-Aguilar *et al.*, 2009) y para especies del género *Cycas* (IF = 0.170 a 0.248) (Feng *et al.*, 2014, 2016b; Gong *et al.*, 2015) y *Zamia* (IF = -0.0003 a 0.610) (Meerow *et al.*, 2012a; 2012b; Calonje *et al.*, 2013).

Contrario a los resultados de este estudio, una deficiencia de heterocigotos a nivel poblacional y total ($F_{IS} = 0.201$, $F_{IT} = 0.116$) se reportó en las poblaciones de *D. holmgrenii* de Rancho el Limón y San Bartolomé evaluadas con isoenzimas (González-Astorga *et al.*, 2008). Asimismo, en *Cycas micronesica* K.D. Hill evaluada con marcadores microsatélites se encontró deficiencia de heterocigotos a nivel poblacional y total ($F_{IS} = 0.370$, $F_{IT} = 0.525$) (Cibrián-Jaramillo *et al.*, 2010).

El coeficiente de fijación entre poblaciones (F_{ST}) promedio de *D. holmgrenii* fue 0.278, lo cual indica diferenciación entre poblaciones (Wright, 1978; Frankham *et al.* 2002). La diferenciación entre poblaciones de *D. holmgrenii* fue alta comparada con especies del género *Dioon* evaluadas con microsatélites ($F_{ST} = 0.038$ a 0.085 , Moynihan *et al.*, 2012) y las evaluadas con isoenzimas

($F_{ST} = 0.060$ a 0.194) (González-Astorga *et al.*, 2005; Octavio-Aguilar *et al.*, 2009; Cabrera-Toledo *et al.*, 2010), así como a la diferenciación entre poblaciones de especies del género *Zamia* ($F_{ST} = 0.066$ a 0.172) (Meerow *et al.*, 2012a; Calonje *et al.*, 2013) y *Cycas micronesica* ($F_{ST} = 0.245$, Cibrián-Jaramillo *et al.*, 2010), en cambio, las poblaciones de *C. multipinnata* ($F_{ST} = 0.296$, Gong *et al.*, 2015) y *C. simplicipinna* ($F_{ST} = 0.916$, Feng *et al.*, 2014) presentaron mayor diferenciación.

La cantidad promedio de migrantes por generación (Nm) de las poblaciones de *D. holmgrenii* fue menor al valor mínimo requerido para evitar la diferenciación genética por deriva genética (Wright, 1965; Hartl y Clark, 2007). El bajo Nm implica que el intercambio genético reducido en las poblaciones de *D. holmgrenii* provocó diferenciación alta entre éstas, lo que puede estar asociado a la fragmentación, aislamiento y al tamaño pequeño de la mayoría de las poblaciones (Velasco-García *et al.*, 2016). El Nm de *D. holmgrenii* fue similar al Nm determinado para poblaciones de *D. angustifolium* y *D. edule* ($Nm = 0.864$) evaluadas con microsatélites, pero inferior para las mismas especies evaluadas con isoenzimas ($Nm = 1.55$ y 2.98) (González-Astorga *et al.*, 2003; González-Astorga *et al.*, 2005; Moynihan *et al.*, 2012). Asimismo, los Nm de las poblaciones de *D. holmgrenii* fueron menores a lo reportado para *Zamia lucayana* Britton ($Nm = 3.6$, Calonje *et al.*, 2013), *Z. pumila* L. ($Nm = 2.4$, Meerow *et al.*, 2012b), *Z. portoricensis* Urban ($Nm = 9.03$, 2.63) (Meerow *et al.*, 2012a, 2012b) y *Z. amblyphyllidia* D.W. Stev. ($Nm = 1.83$, Meerow *et al.*, 2012a), en cambio fue similar a lo encontrado para *Z. erosa* ($Nm = 0.85$, Meerow *et al.*, 2012b).

La distancia genética promedio de las poblaciones de *D. holmgrenii* fue superior a lo reportado para poblaciones de *D. edule* (0.04) evaluadas con isoenzimas (González-Astorga *et al.*, 2003), así como a las distancias genéticas de poblaciones de *C. guizhouensis* (0.054 , Xiao *et al.*, 2004), *Z. amblyphyllidia* (0.206) y *Z. portoricensis* (0.897) (Meerow *et al.*, 2012a). La relación positiva entre las distancias genéticas y geográficas de las poblaciones de *D. holmgrenii* puede ser resultado del

flujo de genes bajo entre poblaciones más distantes (González-Astorga *et al.*, 2003). Una correlación positiva entre la diferenciación genética y la distancia geográfica de las poblaciones se reportó para *D. merolae* (Cabrera-Toledo *et al.*, 2010), mientras que en *D. caputoi* (Cabrera-Toledo *et al.*, 2008), *D. edule* y *D. angustifolium* (Moynihan *et al.*, 2012) no existió esta relación. El agrupamiento de las poblaciones de *D. holmgrenii* obtenido con la distancia genética de Nei (Figura 3) coincidió con el agrupamiento obtenido a través de los CP1 y CP2 de los parámetros de diversidad genética (Figura 1), el primer grupo lo conforman tres poblaciones ubicadas al poniente del Río Verde, mientras que el segundo grupo se formó con seis del oriente del Río Verde. La depresión formada por el afluente del Río Verde parece ser una barrera física importante que influye en el flujo de genes entre los grupos. La diferenciación alta entre localidades es resultado de un flujo génico bajo (Hartl y Clark, 2007).

Conclusiones

Esta investigación confirma que el género *Dioon* conserva niveles altos de diversidad genética. En todas las poblaciones de *D. holmgrenii* existe diversidad genética alta, pero el tamaño y el grado de perturbación influyen en los niveles diversidad genética de sus poblaciones. *D. holmgrenii* posee diferenciación genética mayor entre sus poblaciones que otras especies del género *Dioon*. El flujo genético bajo entre poblaciones de *D. holmgrenii* ocasiona diferenciación genética alta entre éstas. El índice de fijación considerando la totalidad de poblaciones indicó una deficiencia de heterocigotos, sin embargo, el índice de fijación a nivel poblacional mostró exceso de heterocigotos. El índice de fijación inter poblacional reveló una diferenciación alta entre poblaciones indicando que el 27.8 % del total de la diversidad genética se distribuyó entre estas. Dos grupos de poblaciones de *D. holmgrenii* se formaron de acuerdo a las distancias genéticas y el análisis multivariado.

Agradecimientos

A las autoridades, poseedores de los terrenos y guías de campo, así como a Eduardo Molina García y Janet Díaz Ríos por permitir y apoyar en el muestreo. A Noé Ruiz García, Ignacio Mejía Cuevas y Guillermo Sánchez De la Vega por el apoyo para la ubicación de las poblaciones. A Laura Carrillo Reyes, Oscar G. Vázquez C. y Norma P. Mendoza Hernández por el apoyo en el trabajo de laboratorio. Al CONACyT por la beca otorgada al primer autor para realizar estudios de doctorado en el Colegio de Postgraduados.

Literatura citada

- Altukhov Y.P. 2006. *Intraspecific Genetic Diversity. Monitoring, Conservation and Management*. Springer. Germany.
- Applied Biosystem. 2005. GeneMapper® Software Version 4.0 Reference and Troubleshooting Guide. Applied Biosystem Inc. Foster City, CA. 82 p.
- Cabrera-Toledo D., González-Astorga J., and Vovides A.P. 2008. Heterozygote excess in ancient populations of the critically endangered *Dioon caputoi* (Zamiaceae, Cycadales) from central Mexico. *Botanical Journal of the Linnean Society* **158**:436-447.
- Cabrera-Toledo D., González-Astorga J., Nicolalde-Morejón F., Vergara-Silva F., and Vovides A.P. 2010. Allozyme diversity levels in two congeneric *Dioon* spp. (Zamiaceae, Cycadales) with contrasting rarities. *Plant Systematics Evolution* **290**:115-125.
- Calonje L., Meerow A.W., Knowles L., Knowles D., Griffith M.P., Nakamura K., and Francisco-Ortega F. 2013. Cycad biodiversity in the Bahamas archipelago and conservation genetics of the threatened *Zamia lucayana* (Zamiaceae). *Oryx* **47**:190-198.

- Chemnick J., Gregory T., and Morales S. 2010. *Dioon holmgrenii*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. < <http://www.iucnredlist.org/details/42129/0>>. (Consultado 11 de marzo de 2016).
- Cibrián-Jaramillo A., Daly A.C., Brenner E., Desalle R., and Marler T.E. 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.
- CITES. 2015. The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Appendices I, II and III. Valid from 05 February 2015. Ginebra. <www.cites.org/eng/app/appendices.php> (Consultado 11 de marzo de 2016).
- Cole C.T. 2003. Genetic variation in rare and common plants. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **34**:213-237.
- Condamine F.L., Nagalingum N. S., Marshall C., and Morlon H. 2015. Origin and diversification of living cycads: a cautionary tale on the impact of the branching process prior in Bayesian molecular dating. *BMC Evolutionary Biology* **15**:65.
- Conover W.J., and Iman R.L. 1981. Rank transformation as a bridge between parametric and nonparametric statistics. *The American Statistician* **35**:124-129.
- De Jong G., De Ruiter J.R., and Haring R. 1994. *Genetic Structure of a Population with Social Structure and Migration*. In: Loeschke V., Tomiuk J., and Jain S.K. Edits. *Conservation Genetic*. Springer Basel AG. Switzerland. pp. 147-164.
- De Luca P., Sabato S., and Vázquez-Torres M. 1981. *Dioon holmgrenii* (Zamiaceae) a new species from Mexico. *Brittonia* **33**:552-555.
- Diniz-Pilho J.A.F., Borges-Melo D., De Oliveira G., García-Collecatti R., Solares T.N., Nabout J.C., De Souza-Lima J., Dobrovolski R., Chaves L.J., Veloso-Naves R., Dias-Loyola R., and De

- Campos-Telles M.P. 2012. Planning for optimal conservation of geographical genetic variability within species. *Conservation Genetics* **13**:1085-1093.
- Elliott C.P., Enright N.J., Allcock R.J.N., Gardner M.G., Megléc E., Anthony J., and Krauss S.L. 2014. Microsatellite markers from the Ion Torrent: a multi-species contrast to 454 shotgun sequencing. *Molecular Ecology Resources* **14**:554-568.
- Feng X., Wang Y., and Gong X. 2014. Genetic diversity, genetic structure and demographic history of *Cycas simplicipinna* (Cycadaceae) assessed by DNA sequences and SSR markers. *BMC Plant Biology* **14**:187.
- Feng X, Liu J., and Gong X. 2016a. Species delimitation of the *Cycas segmentifida* complex (Cycadaceae) resolved by phylogenetic and distance analyses of molecular data. *Frontiers in Plant Science* **7**:134. doi: 10.3389/fpls.2016.00134.
- Feng X., Zheng Y., and Gong X. 2016b. Middle-Upper Pleistocene climate changes shaped the divergence and demography of *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae): Evidence from DNA sequences and microsatellite markers. *Scientific Reports* **6**:27368. doi: 10.1038/srep27368.
- Fisher J.B., and Vovides A.P. 2004. Mycorrhizae are present in Cycad roots. *The Botanical Review* **70**:16-23.
- Frankham R., Ballou J.D., and Briscoe D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Gitzendanner M.A., and Soltis P.S. 2000. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany* **87**:783-792.
- Gong Y-Q., Zhan Q-Q., Nguyen K.S., Nguyen H.T., Wang Y-H., and Gong X. 2015. The historical demography and genetic variation of the endangered *Cycas multipinnata* (Cycadaceae) in the Red River Region, examined by chloroplast DNA sequences and microsatellite markers. *PLoS ONE* **10**(2): e0117719. doi:10.1371/journal.pone.0117719.

- González-Astorga J., Vergara-Silva F., Vovides A.P., Nicolalde-Morejón F., Cabrera-Toledo D., and Pérez-Farrera M.A. 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.
- González-Astorga J., Vovides A.P., Cruz-Angón A., Octavio-Aguilar P., and Iglesias C. 2005. Allozyme variation in three extant populations of the narrowly endemic cycad *Dioon angustifolium* Miq. (Zamiaceae) from North-eastern Mexico. *Annals of Botany* **95**:999-1007.
- González-Astorga J., Vovides A.P., Ferrer M.M., and Iglesias C. 2003. Population genetics of *Dioon edule* Lindl. (Zamiaceae, Cycadales): biogeographical and evolutionary implications. *Biological Journal of the Linnean Society* **80**:457-467.
- Hamrick J.L. 2004. Response of forest trees to global environment changes. *Forest Ecology and Management* **197**:323-335.
- Hamrick J.L., and Godt M.J.W. 1996. Conservation genetics of endemic plant species. In: Avise J.C. and Hamrick J.L. Eds. *Conservation Genetics; Case Histories from Nature*. Chapman & Hall, New York. pp. 281-304.
- Hamrick J.L., Godt M.J.W., Murawsky D.A., and Loveless M.D. 1991. Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. In: Falk D.A., Holsinger K.E. Eds. *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, New York. pp. 75-86.
- Hartl, D.L., and Clark A.G. 2007. *Principles of Population Genetics*. 4th ed. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts. 651 p.
- Hedrick P.W. 2000. *Genetics of Populations*, 2nd ed. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury, MA.
- Keppel G. 2002. Low genetic variation in a pacific cycad: conservation concerns for *Cycas seemannii* (Cycadaceae). *Oryx* **36**:41-49.

- Kruskal W.H., and Wallis W.A. 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* **47**:583-621.
- Leimu R., Mutikainen P., Koricheva J., and Fischer M. 2006. How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation. *Journal of Ecology* **94**:942-952.
- Mamay S.H. 1976. *Paleozoic origin of the cycads*. Professional Paper 934, U.S. Geological Survey. Washington, D.C.
- Marshall D. R., and Brown A. H. D. 1975. Optimum sampling strategies in genetic conservation. In: Frankel, O. H., and J. G. Hawkes (eds). *Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow*, Cambridge University Press. London. pp. 53-80.
- Meerow A.W., and Nakamura K. 2007. Ten microsatellite loci from *Zamia integrifolia* (Zamiaceae) *Molecular Ecology Notes* **7**:824-826.
- Meerow A.W., Francisco-Ortega J., Ayala-Silva T., Stevenson D.W., and Nakamura K. 2012a. Population genetics of *Zamia* in Puerto Rico, a study with ten SSR Loci. In: Stevenson D.W., Osborne R and Taylor-Blake A.S. Eds. *Proceedings of Cycad 2008. The 8th International Conference on Cycad Biology*. The New York Botanical Garden Press, New York. pp. 204-223.
- Meerow A.W., Francisco-Ortega J., Calonje M., Griffith M.P., Ayala-Silva T., Stevenson D.W., and Nakamura K. 2012b. *Zamia* (Cycadales: Zamiaceae) on Puerto Rico: asymmetric genetic differentiation and the hypothesis of multiple introductions. *American Journal of Botany* **99**:1828-1839.
- Moynihan J., Meerow A.W., and Francisco-Ortega J. 2007. Isolation, characterization and cross-species amplification of microsatellite loci in the cycad genus *Dioon* (Zamiaceae). Potential utilization in population genetic of *Dioon edule*. *Molecular Ecology Notes* **7**: 72-74.
- Moynihan J., Vovides A.P., González-Astorga J., and Francisco-Ortega J. 2012. Population genetic diversity in the *Dioon edule* Lindl. species complex (Zamiaceae, Cycadales): Evidence

- from microsatellite data. In: Stevenson D.W., Osborne R., and Taylor-Blake A.S. Eds. *Proceedings of Cycad 2008. The 8th International Conference on Cycad Biology*. The New York Botanical Garden Press, New York. pp. 224-250.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist* **106**:283-292.
- Nicolalde-Morejón F., González-Astorga J., Vergara-Silva F., Stevenson D.W., Rojas-Soto O. y Medina-Villarreal A. 2014. Biodiversidad de Zamiaceae en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **85**:S114-S125.
- Octavio-Aguilar P., González-Astorga J., and Vovides A.P. 2009. Genetic diversity through life history of *Dioon edule* Lindley (Zamiaceae, Cycadales). *Plant Biology* **11**:525–536.
- Ortíz-Pérez M.A., Hernández-Santana J.R. y Figueroa-Mah-Eng J.M. 2004. Reconocimiento fisiográfico y geomorfológico. En: García-Mendoza A.J., Ordoñez M.J., Briones-Salas M. Eds.). *Biodiversidad de Oaxaca*, Instituto de Biología. UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Found, México. pp. 43-54.
- Osborne R., Calonje M.A., Hill K.D., Stanberg L., and Stevenson D.W. 2012. The world list of cycads. *Memoirs of the New York Botanical Gardens* **106**:480-510.
- Parraguirre-Lezama C., Vargas-Hernández J.J., Ramírez-Vallejo P., Azpíroz-Rivero H.S. y Jasso-Mata J. 2002. Estructura de la diversidad genética en poblaciones naturales de *Pinus greggii* Engelm. *Revista Fitotecnia Mexicana* **25**:279-287.
- Pérez-Farrera M.A, Vovides A.P., Octavio-Aguilar P., González-Astorga J., de la Cruz-Rodríguez J., Hernández-Jonapá R., and Villalobos-Méndez S.M. 2006. Demography of the cycad *Ceratozamia mirandae* (Zamiaceae) under disturbed and undisturbed conditions in a biosphere reserve of Mexico. *Plant Ecology* **187**:97-108.

- Pérez-Farrera M.A., and Vovides A.P. 2006. The ceremonial use of the threatened “espadana” cycad (*Dioon merolae*, Zamiaceae) by a community of the central depression of Chiapas, Mexico. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 78: 107-113.
- Prado A., Cervantes-Díaz F., Pérez-Zavala F.G., González-Astorga J., Bede J.C., and Cibrián-Jaramillo A. 2016. Transcriptome-derived microsatellite markers for *Dioon* (Zamiaceae) cycad species. *Applications in Plant Sciences* 4:1500087.
- Rao V.R., and Hodgkin R. 2002. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68:1-19.
- Ruiz-García N., Méndez-Pérez B.Y., Velasco-García M.V., Sánchez-de la Vega G. y Rivera-Nava J.L. 2015. Ecología, distribución, ciclo biológico y tabla de vida de *Eumaeus toxea* (Lepidoptera: Lycaenidae) en la provincia fisiográfica Costa de Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 86:998-1003.
- SAS (Statistical Analysis System) Institute. 2002. SAS/STAT Computer Software. Release 9.00. SAS Institute Inc. Cary.
- SEMARNAT [Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales]. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental – Especies nativas de México de flora y fauna silvestres – Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio – Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*. 2da Sección, 30 de diciembre de 2010.
- Shannon C.E., and Weaver W. 1949. *The Mathematical Theory of Communication*. Univ. of Illinois Press, Urbana.
- Templeton A.R., and Read B. 1994. Inbreeding: *One Word, Several Meanings, Much Confusion*. In: Loeschke V., Tomiuk J., and Jain S.K. Edits. *Conservation Genetic*. Springer Basel AG. Switzerland. pp. 90-105.

- Terry I., Tang W., Taylor-Blake B.S., Donaldson W.S., Singh R., Vovides A., and Cibrián-Jaramillo A. 2012. An overview of cycad pollination studies. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **106**:394-352.
- Velasco-García M.V., Sánchez-De la Vega G., Ruiz-García N., Ruiz-Jiménez C., Méndez-Pérez B.Y. y Mejía-Cuevas I. 2011. Distribución de *Dioon holmgrenii* (Zamiaceae) y su estado de conservación. En: Toledo-Flores. L.J. Edit. *13° Foro Estatal de Investigación Científica y Tecnológica*. Consejo Oaxaqueño de Ciencia y Tecnología. Oaxaca de Juárez, Oaxaca. pp. 495-500.
- Velasco-García M.V., Valdez-Hernández J.I., Ramírez-Herrera C., Hernández-Hernández M.L., López-Upton J., López-Mata L. y López-Sánchez H. 2016. Estructura, heterogeneidad de estadios y patrón de dispersión espacial de *Dioon holmgrenii* (Zamiaceae). *Botanical Sciences* **94**:75-87.
- Wright S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* **15**:323-354.
- Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* **19**:395-420.
- Wright S. 1978: Evolution and the Genetics of Populations: A Treatise in Four Volumes. Vol. 4. *Variability Within and Among Natural Populations*. University of Chicago Press, Chicago.
- Xiao L., Gong X., Hao G., Ge X., Tian B., and Zheng S. 2005. Comparison of the genetic diversity in two species of cycads. *Australian Journal of Botany* **53**:219-223.
- Xiao L-Q., Ge X-J., Gong X., Hao G., and Zheng S-X. 2004. ISSR variation in the endemic and endangered plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae). *Annals of Botany* **94**:133-138.
- Yhe, F., Yang R. and Boyle T. 1997. Popgene. Versión 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Quick User Guide. University of Alberta and Centre for International Forestry Research. Alberta, Canada. 28 p.

- Zhang F., Su T., Yang Y., Zhai Y., Ji Y., and Chen S. 2010. Development of seven novel EST-SSR markers from *cycas panzhihuaensis* (cycadaceae). *American Journal of Botany*: e159-e161.
- Zheng-Feng W., Wan-Hui Y., Hong-Lin C., Zhong-Chao L., and Shao-Lin P. 2008. Identification and characterization of EST-SSRs and cpSSRs in endangered *Cycas hainanensis*. *Conservation Genetics* 9:1079-1081.
- Zhifeng G., and Thomas B.A. 1989. A review of fossil cycad megasporophylls, with new evidence of *Crossozamia* Pomel and its associated leaves from the lower Permian of Taiyuan, China. *Review of Palaeobotany and Palynology* **60**:205-223.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

Conclusiones

La estructura poblacional, los parámetros dendrométricos, la heterogeneidad de estadios y los patrones de dispersión espacial de *Dioon holmgrenii* son modificados cuando las perturbaciones humanas son intensas, disminuyendo la calidad del hábitat en las poblaciones. La frecuencia alta de los incendios forestales en los sitios sin cambio aparente de uso de suelo y las prácticas inadecuadas relacionadas con la agricultura de temporal, así como la ganadería intensiva en los sitios con cambio de uso de suelo, afectan negativamente a las poblaciones de *D. holmgrenii*, siendo los estadios de plántula y juvenil los más afectados. Las poblaciones de *D. holmgrenii* evaluadas, aunque se encuentran fragmentadas, aisladas y con grado alto de perturbación, poseen diversidad genética alta en su conjunto, por lo que la especie puede seguir evolucionando; sin embargo, las poblaciones pequeñas con niveles altos de perturbación tuvieron una disminución de la diversidad genética. El aparente flujo genético bajo entre poblaciones de *D. holmgrenii*, como producto del aislamiento de éstas por distancia y barreras físicas como el Río Verde, aumentó la diferenciación entre las poblaciones.

Recomendaciones

Debido a que en la mayoría de las poblaciones de *Dioon holmgrenii* existen problemas de perturbación, fragmentación y aislamiento, los resultados de esta investigación sugieren diseñar urgentemente planes de manejo para su conservación *in situ*, donde la participación activa de los dueños y poseedores de los terrenos en el diseño y ejecución de estos planes es necesaria. Los planes de manejo deben considerar estrategias para reducir la actividad agrícola y la ganadería intensiva en los sitios con cambio de uso de suelo. Las estrategias para conservar la

diversidad genética de esta especie deben considerar a todas las poblaciones. Estudios detallados sobre estructura poblacional y de demografía en cada población aún son necesarios. Asimismo, estudios para conocer el efecto de las perturbaciones sobre la diversidad y la estructura genética de los estadios de desarrollo son importantes.