



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ESTADO DE CONSERVACIÓN DE *ZAMIA PRASINA*

**W. BULL: FACTORES HISTÓRICOS QUE
INCIDIERON EN SU DIVERSIDAD GENÉTICA Y
DEMOGRAFIA.**

Tesis que presenta

GRECIA MONTALVO FERNÁNDEZ

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Opción recursos naturales

Mérida, Yucatán, México

2020

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Grecia Montalvo Fernández** titulado **Estado De Conservación De *Zamia Prasina* W. Bull: Factores Históricos Que Incidieron En Su Diversidad Genética Y Demografía**. Fue realizado en la Unidad De Recursos Naturales, Línea De Agrobiodiversidad, Laboratorio De Marcadores Moleculares del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Jaime Martínez Castillo, dentro de la opción de Recursos Naturales, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

Dra. Cecilia Hernández Zepeda

Directora de Docencia

Esta tesis tiene orientación a la conservación de los recursos fitogenéticos de la región.

Mérida, Yucatán, México, a 28 de Enero de 2020

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



GRECIA MONTALVO FERNÁNDEZ

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado Estado de Conservación de *Zamia prasina* en la Provincia Biótica Península de Yucatán bajo la dirección del Dr Jaime Martínez Castillo.

AGRADECIMIENTOS

A México por recibirme y permitirme ser estudiante otra vez

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar los estudios de Doctorado (CVU: 740033).

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por aceptarme en el posgrado y poner a mi disposición infraestructura y capital humano para mi formación.

Al Dr. Manuel Martínez Estévez por ser la primera persona que puso su empeño para que se iniciara esta aventura.

A mi director de Tesis el Dr. Jaime Martínez Castillo, gracias por aceptarme como su estudiante, por todo su apoyo, indicaciones, sugerencias. Gracias por su tiempo y por mantener en todo momento una excelente relación basada en el respeto mutuo. Muchas gracias por su confianza.

A los miembros de mi comité tutotal Dr. Germán Carnevali Fernández-Concha y Dr. Andrew P. Vovides por todas sus indicaciones, recomendaciones y sugerencias para mejorar el trabajo. Gracias por ayudarme a tener una visión más amplia de mi proyecto.

A los miembros de mi comité evaluador Dra. Mariana Chávez pesqueira, Dr. Rodrigo Duno de Stefano, Dr. Javier O. Mijangos y Dr. Rubén Andueza por ayudar con sus oportunas recomendaciones a que el documento quedara mejor elaborado.

A los técnicos Tec. Paulino Simá por su valiosa ayuda en las colectas botánicas, Lic. Jaime Muñoz López y QFB. Matilde Ortiz García por su ayuda incondicional en la estandarización de protocolos y desarrollo de técnicas moleculares.

A Dr. Eduardo Ruíz, Dra. Flor Rodríguez y Dr. Antonio González de la Escuela de Estudios Superiores de la UNAM (ENES-UNAM) y Dr. Diego angulo (UADY) por su extraordinaria contribución a mis conocimientos en el tema de filogeografía.

A Dr. Michel Calonje por su apoyo con las referencias de sitios de muestreo.

A mis compañeros de posgrado de la Unidad de Recursos Naturales.

DEDICATORIAS

A mis padres Isela Fernández Cabrera y Santiago Montalvo Secades por ser para mí un ejemplo de perseverancia, esfuerzo, disciplina, por inculcarme valores y por darme su apoyo incondicional. Por respetarme y amarme tanto como yo a ellos.

A mi hermana Gresin Montalvo Fernández por ser mi fiel compañera desde el vientre de nuestra madre. Por estar presente en cada momento de mi vida. Por ser mi abogada y defensora en momentos difíciles. Por siempre estar fuerte y disponible para mí.

A mi esposo Hernán Morffi Mestre por ser mi amor, mi compañero, mi amigo por ya más de 20 años, por tener siempre las palabras adecuadas en el momento adecuado y por ser siempre positivo ante las adversidades. Gracias por tu apoyo, por animarme cuando la vida se pone de color gris.

A mi Hijo Jonathan Morffi Montalvo y mi sobrino Erick Michel Chicoy Montalvo, los pequeños gigantes de mi vida. Por ser el motor impulsor para cada día esforzarme más para ofrecerles un mejor futuro y oportunidades en la vida.

“La prseverancia se define como el camino entre los objetivos y los resultados”.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	5
ANTECEDENTES.....	5
1.1 Características generales de las Cícadas.....	5
1.1.1 Taxonomía y distribución.....	6
1.1.2 Diversificación y efecto del paleoclima sobre la demografía.....	7
1.1.3 Biodiversidad de la familia <i>Zamiaceae</i> en México.....	10
1.2 El género <i>Zamia</i>	12
1.2.1 Morfología.....	12
1.2.2 Condiciones ecológicas.....	13
1.2.3 Distribución.....	13
1.2.4 Cariotipo.....	15
1.2.5 Polinización.....	18
1.3 Modelo de estudio: <i>Zamia prasina</i> W. Bull.....	20
1.3.1 Taxonomía.....	20
1.3.2 Distribución.....	21
1.3.3 Morfología.....	21
1.3.4 Contexto histórico y amenazas de <i>Zamia prasina</i>	23
1.3.5 Situación de conservación.....	24
1.3.6 Importancia.....	25
1.4 Categorización de especies: Criterios UICN y Método de Evaluación de Riesgo de Extinción (MER).....	25
1.5 Enfoques moleculares en la conservación de especies vegetales.....	27

1.6	Filogeografía y secuencias de cloroplastos.....	28
1.7	Estudios filogeográficos en Zamiaceae.....	29
1.8	Modelado de Nicho ecológico.....	30
	JUSTIFICACIÓN.....	32
	HIPÓTESIS 1.....	33
	HIPÓTESIS 2.....	33
	OBJETIVO GENERAL.....	34
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	35
	CAPÍTULO II.....	37
	EVALUACIÓN DEL RIESGO DE EXTINCIÓN DE <i>Zamia prasina</i> W. Bull, EN LA PROVINCIA BIÓTICA PENÍNSULA DE YUCATÁN.....	37
	RESUMEN.....	38
2.1	INTRODUCCIÓN.....	38
2.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
2.2.1	Área de estudio.....	40
2.2.2	Registros de presencia.....	41
2.2.3	Evaluación de riesgos.....	41
2.2.3.1	Criterios UICN.....	42
2.2.3.2	Método MER.....	42
2.2.3.2.1	A) Amplitud de la distribución del taxón en México.....	42
2.2.3.2.2	B) Estado del hábitat con respecto al desarrollo natural del taxón.....	42
2.2.3.2.3	C) Vulnerabilidad biológica intrínseca del taxón.....	43
2.2.3.2.4	D) Impacto de la actividad humana sobre el taxón en México.....	44
2.3	RESULTADOS.....	44

2.3.1	Criterios de la UICN.	44
2.3.2	Evaluación MER.....	45
2.3.2.1	A) Amplitud de la distribución del taxón en México.	45
2.3.2.2	B) Estado del hábitat con respecto al desarrollo natural del taxón.	46
2.3.2.3	C) Vulnerabilidad biológica intrínseca del taxón.....	48
2.3.2.4	D) Impacto de la actividad humana sobre el taxón.....	49
2.4	DISCUSIÓN.....	51
	AGRADECIMIENTOS.....	55
	CAPÍTULO III.....	57
	IMPACT OF LATE PLEISTOCENE-HOLOCENE CLIMATIC FLUCTUATIONS ON THE PHYLOGEOGRAPHIC STRUCTURE AND HISTORICAL DEMOGRAPHY OF <i>Zamia</i> <i>prasina</i> (CYCADALES: ZAMIACEAE).....	57
	ABSTRACT.	58
3.1	INTRODUCCTION.	59
3.2	MATERIALS AND METHODS.....	62
3.2.1	Study area, populations and samples.....	62
3.2.2	DNA extraction, amplification and sequencing.....	64
3.2.3	Genetic diversity and phylogeographic structure.	65
3.2.4	Estimate of divergence times.	66
3.2.5	Historical demography.....	67
3.2.6	Potential distribution.....	68
3.3	RESULTS.	69
3.3.1	Genetic diversity.....	69
3.3.2	Phylogeographic structure.....	71
3.3.3	Divergence time.	75
3.3.4	Historical demography.....	77

ÍNDICE

3.3.5	Potential distribution.....	79
3.4	DISCUSSION.....	80
3.4.1	Phylogeography.....	80
3.4.2	Current and palaeodistribution modelling.....	85
	ACKNOWLEDGMENTS.....	88
	CAPÍTULO IV.....	89
4.1	DISCUSIÓN GENERAL.....	89
4.2	CONCLUSIONES.....	94
4.3	PERSPECTIVAS.....	96
	BIBLIOGRAFÍA.....	97
	ANEXOS.....	115

ABREVIATURAS

PBPY	Provincia Biótica Península de Yucatán
YPBP	Yucatan Peninsula Biotic Province
UICN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
BIGU	Herbario de la Universidad de San Carlos de Guatemala
NOM	Norma Oficial Mexicana
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
ENM	Modelado de nicho ecológico
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
MER	Método de Evaluación de Riesgo
GeoCat	Geospatial Conservation Assessment Tool
GBIF	Global Biodiversity Information Facility
ACP	Análisis de componentes principales
GRH	Glacial Refugium Hypothesis
IRH	Interglacial Refugium Hypothesis
LGM	Ultimate Glacial Maximum
LIG	Last Interglacial
MH	Middle Holocene
CCSM	Community Climate System Model

ABREVIATURAS

MIROC Model of Interdisciplinary Research on Climate

AMOVA Molecular Analysis of Variance

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Histograma que muestra el número de especies de cícadras por género que se originaron desde el Mioceno Tardío hasta el Pleistoceno (Rull, 2012).

Figura 1.2 Distribución de: A) *Zamia cremnophila*, *Z. katzeriana*, *Z. lacandona*, *Z. purpurea*, *Z. spartea*, *Z. splendens*; B) *Z. monticola*, *Z. onareyesii*, *Z. oreillyi*, *Z. sando-vallii*, *Z. standleyi*, *Z. tuerckheimii*, *Z. variegata*; C) *Z. paucijuga*; D) *Z. loddigesii*; E) *Z. polymorpha*; F) *Z. herrerae*; G) *Z. soconuscensis*; H) Área inexplorada para *Zamia*. Tomado de Nicolalde-Morejón et al., 2011.

Figura 1.3 Estructura de las categorías de riesgo propuestas por la UICN ver 3.1 (2001).

Figura 2.1 Polígono de distribución de *Zamia prasina*. El área al interior del polígono representa la extensión de la especie en toda su área de distribución. El área de ocupación corresponde a la sumatoria del área de las localidades representadas en puntos grises.

Figura 2.2 Polígono de distribución de *Zamia prasina*. El área al interior del polígono representa la extensión de la especie en la parte mexicana de la Península de Yucatán. El área de ocupación corresponde a la sumatoria del área de las poblaciones representadas en puntos grises.

Figura 2.3 Distribución potencial de *Zamia prasina* en el presente (1950-2000) en la Península de Yucatán. Modelado en MAXENT.

Figura 2.4 Porcentaje de localidades *Z. prasina* presentes en los diferentes tipos de vegetación según el INEGI (2009 y 2015). SMSP= selva mediana subperennifolia, VSA= vegetación secundaria arbórea, VSar= vegetación secundaria arbustiva, PCP= pastizal cultivado permanente, AA= plantaciones de agricultura anual, ZU= zona urbana. Letras diferentes difieren estadísticamente según la prueba T de students con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Figure 3.1 Location of the 23 populations of *Zamia prasina* sampled in the Yucatan Peninsula Biotic Province (YPBP). 1: Valladolid, 2: Peto, 3: Becanchén, 4: Rancho Duarte,

5: Kaxil Kiuic, 6: Champotón, 7: Calakmul, 8: Escárcega, 9: Hormiguero, 10: Virgensita, 11: Tenosique, 12: Palenque, 13: Puerto Morelos, 14: Cobá, 15: Carrillo Puerto, 16: Xhazil, 17: José María Morelos, 18: Pedro A Santos, 19: Bacalar, 20: Pantoha, 21: Nachicocom, 22: Belize-Belize 23: Belize-Cayo.

Figure 3.2 (A) Haplotype network obtained with chloroplast sequence *atpF-atpH*. Circle size is proportional to the frequency of each haplotype; lines between the haplotypes represent the mutational steps. (B) Geographic distribution of haplotypes in the 23 populations of *Zamia prasina* sampled in the YBPB. Pie charts represent the haplotypes found for each population; section size is proportional to the number of individuals with that haplotype. Gray dotted lines represent the location of the most probable barriers obtained with BARRIER. Numbers in the pie are population codes (see Figure 3.1 for locations).

Figure 3.3 (A) Haplotype network obtained with nuclear sequence ITS2. Circle size is proportional to the frequency of each haplotype; lines between the haplotypes represent the mutational steps. (B) Geographic distribution of haplotypes in 22 populations of *Zamia prasina* in YBPB. Pie charts represent the haplotypes found for each population; section size is proportional to the number of individuals with that haplotype. Gray dotted lines represent the location of the most probable barriers obtained with BARRIER. Numbers in the pie are population codes (see Figure 3.1 for locations).

Figure 3.4 (A) Plant of *Zamia prasina* in its natural habitat. (B) Bayesian chronogram for chloroplast sequence *atpF-atpH*. The divergence time of *Zamia prasina* haplotypes in the YBPB and other cycad species is shown. The 95 % confidence intervals are shown with purple bars; the numbers at the nodes indicate the estimated age, the numbers below the branches indicate the posterior probability (Appendix 6). (C) Extract from the complete chronogram corresponding to the *Zamia prasina* haplotypes (marked with the red line), the colors of the squares correspond to the haplotypes shown in Figure 3.2-A.

Figure 3.5 (A) Bayesian chronogram for nuclear sequence ITS2. The divergence time of *Zamia prasina* haplotypes in the YBPB and other cycad species is shown. The 95 % confidence intervals are shown with purple bars; the numbers at the nodes indicate the estimated age, the numbers below the branches indicate the posterior probability

(Appendix 7). (B) Female cone of *Zamia prasina*. (C) Extract from the complete chronogram corresponding to the *Zamia prasina* haplotypes (marked with the red line), the colors of the squares correspond to the haplotypes shown in Figure 3.3-A.

Figure 3.6 Demography history of *Zamia prasina* in YBPB based on Bayesian skyline plot. Substitution rates reported by Nolasco-Soto *et al.* (2015) were used. The vertical axis corresponds to the effective size of the population (N_e), the black line indicates the trend for the median N_e over time; purple lines are the 95% confidence intervals. The horizontal axis represents time in thousands of years. Graphs on left *atpF-atpH* (A: All populations, B: populations of the east group of YBPB, C: populations of the west group). Graphs on right ITS2 (D: All populations, E: populations of the east group of the YBPB, F: populations of the west group).

Figure 3.7 Ecological niche modelling for *Zamia prasina*. Current potential distribution. (LIG) Predicted distribution during the interglacial period ($\approx 140-120$ ka). (LMG-CCSM) Predicted distribution during the Last Glacial Maximum, CCSM model ($\approx 21-18$ ka). (LMG-MIROC) Predicted distribution during the Last Glacial Maximum, MIROC model. (HM-CCSM) Predicted distribution during the Middle Holocene, CCSM model (≈ 6 ka). (HM-MIROC) Predicted distribution during the Middle Holocene, MIROC model. Green: high suitability, light brown: low suitability.

LISTADO DE CUADROS

Tabla 2.1 Fuentes de información y número de referencias geográficas de *Zamia prasina* utilizadas para determinar su estado de conservación.

Table 3.1 Population, Number of individuals for population (N), latitude, longitude and respective haplotypes for populations of *Zamia prasina* studied.

Table 3.2 Non-hierarchical Molecular variance analysis (AMOVA) of 23 populations of *Zamia prasina* using the chloroplast region *atpF-atpH* and the nuclear region ITS2.

Table 3.3 Average genetic diversity in the eastern and western groups using the chloroplast region *atpF-atpH* and nuclear region ITS2.

Table 3.4 Average values of the neutrality indexes Tajima's D and Fu's FS, for the population groups in the eastern and western parts of the peninsula and for all populations.

RESUMEN

Zamia prasina es endémica del área biogeográfica Provincia Biótica Península de Yucatán. Los tipos de vegetación donde predomina son: bosque tropical perennifolio, bosque tropical caducifolio y subcaducifolio. Su hábitat natural ha sido impactado por los humanos. Por su estado de conservación, ésta se ubicó en la categoría Protección Especial (Pr), de acuerdo con la NOM-059 mexicana de 2010. También, se clasificó como En Peligro Crítico (CR), de acuerdo con los criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). Sin embargo, considerando el alto número de poblaciones naturales reportadas en bases de datos y observadas en este estudio, así como su presencia en sitios perturbados, consideramos que su estado de conservación no debe ser tan crítico. Para entender el estado de conservación de una especie, es necesario conocer los factores históricos que influyeron en su distribución. Para el caso particular de las cícadas, se ha reportado que las fluctuaciones climáticas en el pleistoceno jugaron un papel importante en este sentido. Tomando lo arriba señalado, los objetivos de este estudio fueron: 1) realizar una reevaluación del riesgo de extinción de *Z. prasina* utilizando los criterios de la UICN y el Método de Evaluación del Riesgo de Extinción de Especies Silvestres en México (MER) y, 2) conocer qué factores históricos influyeron en la diversidad genética y demografía de esta especie. Nuestros resultados empleando los criterios de la UICN indican que según la distribución y el elevado número de localidades encontrados en nuestro estudio, *Z. prasina* debe ser incluida en una categoría de menor riesgo. La evaluación con el método MER confirmó la categoría Protección Especial (Pr) basado en un número elevado de localidades, la presencia de áreas ecológica y ambientalmente favorables para la especie. Nuestros resultados basados en secuencias de cloroplasto (*atpF-atpH*) y núcleo (ITS2) mostraron además una diversidad genética moderadamente alta y una estructura filogeográfica baja, pero significativa. Se identificaron dos grupos de poblaciones diferenciados genéticamente: uno ubicado en el sureste y el otro al noroeste de la Península de Yucatán, estando su presencia asociada con el gradiente de precipitación de la región. Los cambios en la demografía histórica sugieren que *Z. prasina* experimentó una contracción en su área de distribución y del tamaño efectivo de las poblaciones durante las glaciaciones y una expansión poblacional

RESUMEN

en las condiciones cálidas del Holoceno medio, por lo que, su dinámica poblacional se ajusta a la Hipótesis de Refugio Glacial.

ABSTRACT

Zamia prasina is endemic to the biogeographical area of the Biotic Province of the Yucatan Peninsula. The predominating types of vegetation are: tropical evergreen forest, tropical deciduous forest and sub-deciduous forest. Its natural habitat has been impacted by humans. Due to its conservation status, it was listed as Special Protection (Pr) category according to the Mexican NOM-059 of 2010. Also, it was also listed as Critically Endangered (CR) according to the International Union for the Conservation of Nature (IUCN) standards. However, considering the high number of natural populations recently found, as well as its presence in disturbed sites, we consider that their conservation status should not be so critical. To understand the conservation status of a species, it is necessary to know the historical factors that influenced its distribution. For the particular case of cycads, it has been reported that climatic fluctuations in the Pleistocene played an important role in this regard. Taking the above mentioned the objective of this study was: 1) To perform a re-assessment of the risk of extinction of *Z. prasina* using the IUCN criteria and the Method of Evaluation of the Risk of Extinction of Wild Species in Mexico (MER) and, 2) To know what historical factors influenced the genetic diversity and demography of this species. Our results using the IUCN criteria indicate that according to the distribution and the high number of locations found in our study, *Z. prasina* should be included in a lower risk category. The evaluation with the MER method confirmed the Special Protection (Pr) category based on a high number of locations, the presence of ecologically and environmentally favorable areas for the specie. Our results based on chloroplast (*atpF-atpH*) and nucleo (ITS2) sequences, further showed a moderately high genetic diversity and a low but significant phylogeographic structure. Two groups of genetically differentiated populations were identified: one located in the southeast and the other in the northwest of the Yucatan Peninsula, its presence being associated with the precipitation gradient of the region. Changes in historical demography suggest that *Z. prasina* experienced a contraction in its area of distribution and decrease in the effective size of populations during glaciations and a population expansion in the warm conditions of the Middle Holocene so that their population dynamics adjust to the Glacial Refugium Hypothesis.

INTRODUCCIÓN

El declive continuo en la biodiversidad en la tierra sigue siendo uno de los desafíos más críticos en el siglo XXI (Butchart *et al.*, 2010; Thonsem y Willerslev, 2015). El deterioro generalizado del medio ambiente y sus recursos naturales, como consecuencia de la acción directa o indirecta de los seres humanos sobre los ecosistemas, está acercándose peligrosamente a los límites biofísicos del planeta (Folke, 2013). La última actualización de la Lista Roja de la UICN en el año 2019 revela que, de 112,432 especies de flora y fauna evaluadas, 30,178 se encuentran amenazadas (6,413 “En Peligro Crítico”; 10,629 “En Peligro” y 13,136 “Vulnerable” (<https://www.iucn.org/es/news/especies/201912/>). Estos datos apoyan el señalamiento de que los disturbios antropogénicos han dejado una huella en las poblaciones silvestres de flora y fauna a nivel mundial (Barnosky *et al.*, 2011; Dirzo *et al.*, 2014). Ante este escenario tan alarmante se hace necesario adoptar medidas que contribuyan a salvaguardar la biodiversidad (Duarte, 2007) y protejan, en particular, los hábitats y las diferentes especies de fauna y flora (Normander, 2012).

México figura entre los cinco países con mayor número de ecosistemas, segundo lugar en cuanto a número de reptiles y cícadas, tercer lugar referido al número de mamíferos, quinto lugar en cuanto al número de anfibios y plantas vasculares, y el octavo lugar en términos de diversidad de aves (CONABIO, 2012). México tiene además una extraordinaria riqueza florística con un total de 23,314 especies de plantas vasculares nativas y entre los países continentales ocupa el segundo lugar por el número de especies endémicas (alrededor del 50%) (Ruiñeñor, 2016). Esta gran biodiversidad implica un compromiso en términos de conservación.

El instrumento legal que protege a las especies silvestres en México, se conoce como norma NOM-059-SEMARNAT. Para incluir a las especies en esta Norma, primero deben categorizarse y para esto en México se aplica el Método de Evaluación de Riesgo de Especies Silvestres (MER). Este método incluye en su análisis los parámetros de distribución, abundancia, rareza y régimen de explotación (entre otros) y plantea cuatro categorías de acuerdo al estado de conservación de las especies: 1) Probablemente extinta en el medio silvestre (E), 2) En peligro de extinción (P), 3) Amenazadas (A) y 4) Sujetas a protección especial (Pr).

En México, como a nivel mundial, uno de los grupos de plantas más amenazados son las cícadras. El declive de sus poblaciones está asociado a pérdida de hábitat y en algunos casos a la sobreexplotación. La historia evolutiva de las cícadras es muy antigua remontándose al periodo Jurásico; sin embargo, las cícadras actuales tienen un origen mucho más reciente (Nagalingum *et al.*, 2011). Se conoce que el factor preponderante en la diversificación y distribución de las cícadras fueron los cambios climáticos, específicamente los ciclos glaciales e interglaciales del Mioceno, Plioceno y Pleistoceno (Rull, 2012). En torno a esto, se plantea que las especies que habitaban en bosques lluviosos de Mesoamérica, durante las glaciaciones, donde el clima era muy frío y seco, experimentaron una disminución de sus poblaciones y su distribución se contrajo hacia el sur del continente, quedando algunos relictos en zonas húmedas. Mientras que, durante los interglaciales, donde el clima se volvió más cálido y húmedo, las poblaciones de estas especies se expandieron recolonizando hábitats más al norte. A esta dinámica demográfica se le conoce como Hipótesis de Refugio Glacial (GRH, por sus siglas en inglés).

Zamia prasina W. Bull. (Zamiaceae), es una especie de cícada que solo habita en la Provincia Biótica Península de Yucatán (PBPY), que incluye los estados mexicanos de Yucatán, Campeche, Quintana Roo, una parte de Tabasco y Chiapas, los distritos del norte de Belice (Orange Walk, Corozal y Belice) y el departamento de Petén en Guatemala (Carnevali *et al.*, 2010). Los tipos de vegetación donde habita son: bosque tropical perennifolio, bosque tropical subcaducifolio, y bosque tropical caducifolio según Rzedowskii (2006). Entender los procesos históricos que han moldeado la diversidad genética y distribución de las especies es de gran importancia para su conservación y para aportar conocimiento al entendimiento de los patrones de distribución a nivel de género. Como *Z. prasina* es una especie que habita en bosques húmedos y con cierto grado de estacionalidad, posiblemente su distribución se vió afectada por los ciclos glaciales e interglaciales del pleistoceno, respondiendo con una dinámica demográfica que se ajusta a la GRH.

Zamia prasina fue categorizada con el método MER y ubicada en la categoría Sujeta a Protección Especial (Pr) e incluida en la norma NOM 059. Se considera que la deforestación y el avance de la frontera agrícola son las actividades más preponderantes

en el declive de las poblaciones de *Z. prasina*. Su hábitat es perturbado debido a la actividad agrícola histórica de la Península yucateca. Por esta razón, parte de vegetación boscosa ha sido alterada; sin embargo, aún quedan extensiones grandes de bosque tropical caducifolio, en donde se puede encontrar esta especie sin dificultad (Vovides y Nicolalde-Morejón, 2010). Además esta especie se ha categorizado utilizando los criterios de la UICN, que es un método de evaluación con un alcance global, siendo ubicada en la categoría Peligro Crítico de Extinción (CR), que es la máxima categoría de amenaza. Aunque las categorías de la UICN y las del método MER no son iguales, hay cierta equivalencia entre estas, por lo que, es poco probable que *Z. prasina* se encuentre fuera de riesgo según el MER y en la máxima categoría de amenaza según la UICN. La información sobre estudios poblacionales de esta especie con fines de conservación son prácticamente nulos, pero nuestras observaciones en campo acerca del número de localidades sugieren que la categoría otorgada por el MER es correcta (Sujeta a Protección Especial) y que esta especie debe estar incluida en una categoría de menor riesgo según los criterios de la UICN. Es por esto que se hace necesario generar información que nos permita conocer el verdadero estado de conservación de esta especie.

Los antecedentes señalados sirven como punto de partida para plantearse las siguientes preguntas: 1) ¿Realmente *Zamia prasina* se encuentra en Peligro Crítico o debe estar incluida en una categoría de menor riesgo según los criterios de la UICN?, y 2) ¿Qué factores históricos influyeron en la diversidad genética y demografía de *Z. prasina* en la PBPY? Para responder estas preguntas, en el presente trabajo se evaluó el estado de conservación de *Z. prasina* empleando dos herramientas: los criterios de la UICN y el Método de Evaluación de Riesgo (MER). Además, se empleó un enfoque filogeográfico para determinar los factores que influyeron en su la diversidad genética, estructura filogeográfica y demografía histórica. Los resultados generados aportaron elementos para conocer más acerca del estado de conservación de esta especie y así proponer un posible cambio de categoría y, además, aportaron elementos para conocer la historia evolutiva de *Z. prasina*.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

Características generales de las Cícadas

Existen 35144 especies de cícadas catalogadas a nivel mundial (Calonje *et al.*, 2019). En México se distribuyen 60 especies, por lo que, ocupa el segundo lugar a nivel mundial en cuanto a diversidad de este grupo, solo después de Australia (Vovides, 2000). Las cícadas se encuentran amenazadas a escala mundial y muchas de sus especies están citadas en los Apéndices I y II de CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres) (Lazcano, 2005). Las cícadas son plantas gimnospermas caracterizadas por presentar semillas desnudas. Crecen con relativa lentitud, son estrictamente dioicas, es decir, existen plantas masculinas y femeninas, y no presentan cromosomas sexuales distinguibles (homocromía). Las raíces de las cícadas, pueden formar sistemas secundarios que, además de captar agua y nutrientes, anclan y dan soporte al tronco. Un tipo especial de la raíz en las cícadas es apogeotrófica creciendo arriba hasta alcanzar el nivel de suelo y forma masas coraloides, que funcionan como sitio físico de la simbiosis con cianobacterias fijadoras de nitrógeno, lo que les permite sobrevivir en suelos pobres en nutrientes (Grove *et al.*, 1980). Todas las especies de cícadas son altamente tóxicas ya que contienen toxinas como las macroaminas, cicasinas y la neurotoxina, de las cuales se ha reportado hepatotoxicidad y actividad carcinogénica causada por el rompimiento de cromosomas. Las cícadas también tienen ácido 2-amino-3-metilamino propanoico (BMAA), el cual se ha asociado con una alta incidencia de esclerosis amiotrófica lateral y la enfermedad de Parkinson (Rivadeneira y Rodríguez, 2014).

Las cícadas presentan tallos arborescentes o subterráneos con una gran diversidad morfológica que va desde algunas especies arborescentes en el género *Lepidozamia*, que pueden alcanzar los 15 m de alto; hasta las especies de talla pequeña y tallos de hábito subterráneo, como es el caso de algunas especies de *Zamia*. En las cícadas, los caracteres vegetativos, particularmente los foliares, son altamente variables, aunque las partes de cada hoja son distinguibles con relativa facilidad. Las hojas son pinnadas y cada

una se compone de un pecíolo y un raquis que sustenta un número variable de foliolos dispuestos en pares y configurados de manera subalterna. En contraste con los caracteres foliares, la morfología de los estróbilos o conos de las cícadas es poco variable (Norstog y Nicholls, 1997).

Las cícadas se encuentran severamente amenazadas por cambios en el uso del suelo, por incendios y pastoreo derivados de las actividades humanas, y por prácticas de extracción inadecuadas de partes o individuos completos (Challenger, 1998; Pérez-Farrera *et al.*, 2006; Naranjo *et al.*, 2009).

1.1.1 Taxonomía y distribución

En el orden Cycadales se han realizado varias clasificaciones taxonómicas (Stevenson, 1981; Stevenson, 1990, 1992; Chaw *et al.*, 2005; Christenhusz *et al.*, 2011). En las clasificaciones más antiguas todos los géneros vivientes del orden Cycadales se agrupaban en una sola familia Cycadae (sic) (Cycadaceae) (Persoon, 1807). Johnson (1959), reconoció dos familias más, Zamiaceae y la familia monotípica Stangeriaceae, representada únicamente por el género *Stangeria*. Posteriormente, Stevenson (1981) reconoció una cuarta familia (*Boweniaceae*) que contenía solo al género *Bowenia*. Después, Stevenson (1990, 1992), en dos estudios empleando 30 y 52 caracteres morfológicos respectivamente, asignó este último género como una subfamilia dentro de Stangeriaceae. A partir del 2003, se realizan las primeras clasificaciones basadas en datos moleculares, las principales controversias en estas topologías fueron la ubicación de los géneros *Stangeria*, *Bowenia* y *Dioon* (Chaw *et al.*, 2005).

Recientemente, Christenhusz *et al.* (2011) agruparon a las Cycadales en dos familias: Cycadaceae y Zamiaceae. Cycadaceae es una familia monotípica representada solo por el género *Cycas*, con especies nativas de Asia, África y Oceanía, desde el archipiélago de Japón hasta Australia, y representa el género más divergente del Orden Cycadales (Norstog y Nicholls, 1997). La familia Zamiaceae es la más grande y está representada por nueve géneros: *Ceratozamia* Brongn., *Dioon* (Lindl.) (ambos casi endémicos de México) *Microcycas* (Miq.) A.DC (endémico de Cuba), *Zamia* L. (distribuido desde Georgia, EUA hasta Brasil y Bolivia), *Encephalartos* Lehm., *Stangeria* Moore (ambos endémicos de Africa), *Bowenia* Hook, *Lepidozamia* Regel y *Macrozamia* Miq (estos tres

últimos endémicos de Australia). Las especies de la familia Zamiaceae se restringen a ecosistemas tropicales y subtropicales, incluyendo algunas islas. Los países con mayor riqueza en especies de cícadas son Australia con 77, México con 60 y Sudáfrica con 38 (<http://www.cycadlist.org>). Las especies de la familia Zamiaceae se pueden encontrar en bosques tropicales perennifolios, en bosques tropicales caducifolios, así como en bosque de pino, encino, pastizales, sabanas y comunidades rivereñas (Vovides y Nicolalde-Morejón, 2010).

Las especies de la familia Zamiaceae difieren de Cycadaceae en tener tanto conos masculinos como femeninos compactos, también llamados estróbilos (Christenhusz *et al.*, 2011). Las especies de la familia Cycadaceae se distinguen porque no forman conos femeninos típicamente compactos, sino abiertos. En este caso, las semillas son producidas por el margen inferior de numerosos esporofilos femeninos (también llamados megasporofilos) que se congregan en el ápice del tronco en densas masas.

1.1.2 Diversificación y efecto del paleoclima sobre la demografía

La mayor distribución y desarrollo de las Cycadales en la tierra fue durante el periodo Jurásico (era Mesozoica), durante el cual fueron abundantes junto con las Cycadeoidales (Eckenwalder, 1980). Es bastante frecuente escuchar que las cícadas son consideradas fósiles vivientes, dado que, desde su aparición antes de la era Mesozoica se han mantenido hasta nuestros días (Norstog y Nicholls, 1997). Este mito evolutivo se ha puesto en entredicho con el desarrollo de la datación molecular. Nagalingum *et al.* (2011) realizaron un estudio sobre la radiación en las cícadas, con aproximadamente 200 taxa de cícadas (de las aproximadamente 300 reconocidas) empleando filogenias moleculares calibradas con fósiles, el gen nuclear fitocromo P (PHYP) y matrices de datos provenientes de secuencias publicadas de los genes de cloroplasto (*matK* y *rbcL*). Los autores concluyeron que las especies de cícadas existentes, se originaron durante los últimos 12 Ma y demostraron que la diversificación dentro de los géneros de cícadas existentes (o diversificación del grupo corona) ocurrió durante el Mioceno hace aproximadamente entre 10 y 5 Ma, con la excepción de *Ceratozamia*, cuya diversificación comenzó en el Plioceno. Un año más tarde, en otro estudio sobre la diversificación de las cícadas, Rull (2012) planteó que 26 (13.2%) de las especies de cícadas existentes incluidas en su estudio se originaron en el Mioceno, 98 (49,8%) en el Plioceno y 67

(34,0%) en el Pleistoceno. En otras palabras, más de una décima parte de las especies de cícadras vivas se originaron hace aproximadamente 12 Ma, casi la mitad se originó después de 5 Ma, y más de un tercio se originaron hace menos de 2.6 Ma (Rull, 2012).

Los géneros que dominaron en el Plioceno fueron *Encephalartos* (32 sp., 60.4%), *Cycas* (38 sp., 59.4%) y *Macrozamia* (14 sp., 56%); mientras que en el Pleistoceno los géneros dominantes fueron *Zamia* (24 sp., 68.6%) y *Ceratozamia* (67 sp., 40%). En el Mioceno tardío la especiación no es dominante, pero es significativa: *Encephalartos* (11 sp., 20.8%) y *Cycas* (10 sp., 15.6%); mientras que la especiación pleistocénica es también importante en estos dos géneros (10 sp., 18.9% y 14 sp., 21.9%, respectivamente), en *Macrozamia* (9%, 36%) y *Zamia* (Fig. 1.1). Desde una perspectiva biogeográfica, la especiación del Plioceno ocurrió predominantemente en África y Australasia, mientras que la especiación pleistocénica prevalece en el Neotrópico, siendo los ciclos glacial-interglaciares la fuerza ambiental dominante (Rull, 2012).

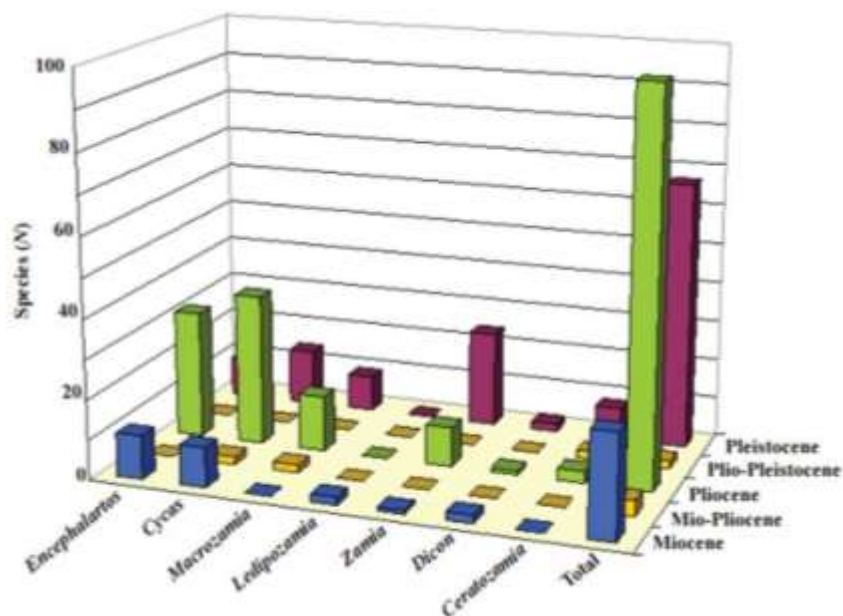


Figura 1.1 Histograma que muestra el número de especies de cícadras por género que se originaron desde el Mioceno tardío hasta el Pleistoceno (Rull, 2012).

La alta tasa de diversificación en las cícadas durante el Plioceno y el Pleistoceno se ha explicado en términos del clima, como consecuencia de: (1) cambios en los patrones de circulación general como resultado de una configuración paleogeográfica similar al presente, lo que provocó climas más estacionales, y (2) un enfriamiento global significativo que inició alrededor del Mio-Plioceno (~ 5 Ma) y condujo a las glaciaciones del Pleistoceno (Nagalingum *et al.*, 2011). El inicio casi simultáneo de la diversificación de seis de los géneros vivos de las cícadas (en Australia, África, el sudeste de Asia, y Central a la Sudamérica tropical) indica que solo pudo haber un único evento responsable. Durante el Mioceno tardío, el clima global cambió, las masas terrestres del mundo asumieron en gran medida sus posiciones actuales (Dalrymple, 1991). Esto eliminó la última de las vías marítimas ecuatoriales que había permitido la circulación de agua tropical por el mundo, llevando a una transición desde el calentamiento global, hasta climas más fríos y estacionales. La mayoría de las especies de Cícadas viven en climas tropicales o subtropicales, en regiones de precipitaciones predominantemente estivales. Por lo tanto, es posible que la diversificación haya sido impulsada por el cambio climático global y la extensión geográfica de las zonas subtropicales y tropicales que se caracterizaron por la estacionalidad (Nagalingum *et al.*, 2011).

De forma general, el patrón de diversificación en cícadas se caracteriza por una llamativa sincronía en la diversificación desde el Mioceno tardío (con los géneros *Encephalartos* y *Cycas*) hasta el Pleistoceno (con los géneros *Zamia* y *Cerotozamia*), con una considerable desaceleración de la diversificación en todos los géneros, en los últimos 2 Ma (Nagalingum *et al.*, 2011).

Durante los periodos del Mioceno, Plioceno, Pleistoceno y Holoceno el clima fue muy fluctuante y se alternaron periodos glaciales e interglaciales los cuales provocaron cambios históricos en la distribución de diferentes biomas y cambios demográficos en las biotas asociadas. Durante el Último Interglacial (120 Ka), era más cálido y húmedo (Metcalf *et al.*, 2000), sin embargo, durante el LMG (80 Ka) el clima se hizo más seco y frío. La aridez en el trópico durante las glaciaciones fue cuestionada, sin embargo, los registros existentes indican bajos niveles de lagos en regiones como África tropical (Caballero *et al.* 1999). Estos registros han sido interpretados como indicativo de que, durante el LMG (80 Ka), el clima era más seco. De igual manera durante el Holoceno

medio (6 Ka) (que también es un periodo interglacial) mediante análisis de fósil de polen se reconstruyó la vegetación y el registro de precipitación durante los últimos 7900 años, y se demostró un aumento gradual de la precipitación y la expansión del bosque tropical.

En la península de Yucatán, mediante un estudio de análisis geoespacial de registros de polen encontraron que los cambios en la vegetación durante el Holoceno fueron causados por cambios en el clima (Carrillo-Bastos *et al.*, 2012). Los porcentajes más altos de registro de polen de taxones de bosques semiperennes se encuentran en las partes sureste y central de la península (85-92%) y los más bajos en la parte norte. Esta distribución es similar a la distribución moderna de las isoyetas de precipitación en la península, donde las precipitaciones aumentan hacia la costa este y son más escasas en la costa norte (Carrillo-Bastos *et al.* (2012).

Los cambios demográficos de las especies provocados por las fluctuaciones del paleoclima podrían ser consistentes con la hipótesis del refugio glacial (GRH), que propone que las poblaciones se contrajeron en algunos refugios al sur del continente durante el glacial frío y seco y se expandieron en periodos interglaciales donde había más calor y humedad. Esta hipótesis es ampliamente aceptada para especies templadas en las latitudes medias del hemisferio norte (Soltis *et al.*, 2006). Por el contrario, la hipótesis del refugio interglacial (IRH) sugiere que en la vegetación seca intertropical de América del Sur (biomas de Caatinga, Cerrado y Chaco), las poblaciones de algunas especies disminuyeron su distribución durante los interglaciales y se expandieron durante el clima seco y frío del Último Máximo Glacial (LGM) (≈ 80 Ka) (Cornejo-Romero *et al.*, 2017). Varios autores han propuesto la teoría de refugio como modelo subyacente para la dinámica poblacional glacial y posglacial de especies tropicales durante el LGM.

1.1.3 Biodiversidad de la familia *Zamiaceae* en México

La familia *Zamiaceae* en México está representada por 60 especies y tres géneros: *Dioon*, *Ceratozamia* y *Zamia*, presentando un 88.9% de endemismo (Vovides, 1983). Del total de especies, 29 corresponden al género *Ceratozamia*, 14 a *Dioon* y 17 a *Zamia* (<http://www.cycadlist.org>). Las especies del género *Dioon* presentan el tallo cilíndrico, en ocasiones pueden distinguirse dos grupos con diferente morfología. Uno conformado por *Dioon mejiae* Standl., *D. rzedowskii* De Luca, A. Moretti, Sabato & Vázq. Torres. y *D.*

spinulosum Dyer ex Eichler, caracterizados por presentar hojas grandes, troncos bien desarrollados y conos masivos. El segundo grupo contiene a: *D. califanoi* De Luca & Sabato., *D. caputoi* De Luca, Sabato & Vázq. Torres, *D. edule* Lindl., *D. holmgrenii* De Luca, Sabato & Vázq. Torres, *D. merolae* De Luca, Sabato & Vázq. Torres, *D. purpusii* Rose, *D. sonorensis* De Luca, Sabato & Vázq. Torres) Chemnick, T.J. Greg. & Salas-Mor, *D. vovidesii* Gut-Ortega & Pérez-Farr y *D. tomasellii* De Luca, Sabato & Vázq. Torres. Estas especies generalmente tienen troncos, hojas y conos más pequeños (Norstog & Nicholls, 1997). Las especies del género *Cerotozamia* se caracterizan por presentar poblaciones disjuntas que no se diseminan ampliamente, es por esto que la mayoría de estas poblaciones se encuentran restringidas a montañas o cañones. El flujo genético escaso entre estas especies ha provocado que hayan evolucionado de manera tal que son perfectamente diferenciables. Su hábitat natural son los bosques húmedos de tierras bajas tropicales o subtropicales y montanos húmedos tropicales o subtropicales. Como muchas cícadas, las especies de *Cerotozamia* están amenazadas por la pérdida de hábitat (Nicolalde-Morejón *et al.*, 2014).

En la mayoría de las especies de la familia Zamiaceae el movimiento de polen está mediado por insectos (Norstog & Fawcett 1989; Tang, 1987). La polinización y la fertilización están bien separadas en las cícadas, pudiendo transcurrir entre tres y siete meses entre los dos eventos (Norstog & Nicholls, 1997). Las estructuras reproductoras están caracterizadas por una diferenciación morfológica ligada al dioicismo. Los estróbilos masculinos están formados por microesporófilas productoras de gametofitos masculinos y estróbilos femeninos compuestos con megasporófilas formadoras de óvulos. Las diferencias de los estróbilos en diferentes especies de *Zamia* se basan fundamentalmente en el color del endumento, el porte y la forma de las porciones apicales de los esporofilos. El color va desde negro como es *Zamia angustifolia* Jacq., hasta marrón rojizo en *Z. manicata* Linden ex Regel o amarillento como en *Z. obliqua* A. Braun. Por lo general, los estróbilos masculinos y femeninos son del mismo color en la misma especie (Stevenson, 2001).

1.1 El género *Zamia*

1.2.1 Morfología

Las especies del género *Zamia* son plantas con tallos aéreos o subterráneos. El género también incluye especies con tallos arbóreos; por ejemplo, *Zamia obliqua* (Colombia y Panamá) que llega a medir hasta 5 m de alto (Stevenson, 2004); en contraste, *Z. paucijuga* Wieland endémica de México (de Nayarit a Oaxaca) y *Z. amazonum* D. W. Stev. proveniente de la Amazonía de Colombia, Ecuador, Perú y Brasil, poseen tallos subterráneos (Norstog & Nicholls, 1997). Los caracteres diagnósticos para identificar las especies de *Zamia* se basan fundamentalmente en los atributos foliares los cuales son muy variables (Nicolalde-Morejón *et al.*, 2009). Las especies del género *Zamia* presentan la mayor variación morfológica y cariotípica dentro del orden *Cycadales* (Vovides *et al.*, 1983; Moretti y Sabato, 1984; Moretti *et al.*, 1991; Caputo *et al.*, 1996; Vovides and Olivares, 1996; Nicolalde-Morejón *et al.*, 2008, 2009), así como niveles de variación genética relativamente altos (González Astorga *et al.*, 2006, 2008).

Tomando en cuenta la morfología, especialmente hábito, hojas y foliolos, de múltiples ejemplares del género *Zamia* hay varias especies de difícil identificación, por lo que se han determinado varios complejos de especies (Nicolalde-Morejón *et al.*, 2011).

Complejo *Zamia fischeri*: Compuesto por las especies *Z. fischeri* Miq. y *Z. vazquezii* D. W. Stev., Sabato, A. Moretti y De Luca. Las cuales habitan en el noreste de México (Tamaulipas, San Luís Potosí, Querétaro, Hidalgo y norte de Veracruz). Son plantas generalmente pequeñas con foliolos papiráceos, dentaciones sobre los bordes de los foliolos y tallos subterráneos. Otros caracteres diagnósticos son atributos asociados a estructuras reproductivas femeninas (Nicolalde-Morejón *et al.*, 2009).

Complejo *Zamia katzeriana*: Este complejo incluye las especies *Z. katzeriana* (Regel) Retting, *Z. cremnophila* Vovides, Schutzman et Dehgan, *Z. splnedens* Schutzman, *Zamia lacandona* Schutzman et Vovides y *Z. purpurea* Vovides, J. D. Rees et Vázq. Torres, las cuales se caracterizan por sus foliolos anchos (3 - 11 cm) y coriáceos, y tallos subterráneos (Nicolalde-Morejón *et al.*, 2008; Pérez-Farrera *et al.*, 2016).

Complejo *Zamia loddigesii*: Formado por las especies *Z. loddigesii* Miq., *Z. paucijuga* y *Z. polymorpha* D. W. Stev., A. Moretti y Vázq. Torres. Estas son las especies de mayor distribución en Megaméxico (Fig. 1.1), son también las que tienen los números cromosómicos más altos (Moretti, 1990), y morfológicamente son los taxa que presentan más dificultad para identificarse. Entre los atributos fenotípicos de este complejo están los foliolos coriáceos, linear-lanceolados a oblanceolados y con tallos subterráneos. La especie *Z. prasina* también debe estar incluida en este complejo (Moretti, 1990). Es válido aclarar que según lo reportado por Calonje y Meerman, (2009) *Z. polymorpha* y *Z. prasina* son la misma especie y por prioridad nomenclatural *Z. prasina* es el binomio correcto siendo *Z. polymorpha* sinónima.

1.2.2 Condiciones ecológicas

La distribución de las distintas especies de *Zamia* en México coincide en gran medida con las principales cadenas montañosas que cruzan el territorio nacional, como son las Sierras Madre Oriental, Madre occidental y Madre del sur. Se les puede encontrar desde el nivel del mar hasta cerca de los 1000 m.s.n.m (Vovides e Iglesias, 1994). Son especies que aunque la mayoría se encuentran en zonas de bosques húmedos se pueden encontrar en ambientes bastante contrastantes. Por citar algunos ejemplos, *Zamia encephalartoides* D. W. Stev es una especie endémica de Colombia y crece en hábitats secos (Stevenson, 2004). Por otro lado, *Z. gentryi* Dodson, endémica de Ecuador (Nicolalde-Morejón, 2007) y *Z. pseudoparasitica* son las únicas zamias epífitas y habitan en bosques húmedos de Panamá. *Zamia roezlii* Linden, se distribuye en zonas de manglares del área biogeográfica Chocó (Ecuador y Colombia) y *Z. loddigesii* endémica de México, habita en Selvas Bajas Caducifolias, vegetación secundaria (Rzedowski, 2006), en las zonas de transición con bosques de encinos, así como regiones de cultivo de cítricos y pastizales abandonados (Vovides *et al*, 1983).

1.2.3 Distribución

El género *Zamia* tiene una distribución restringida a los trópicos. Su patrón de distribución en Megaméxico está caracterizado por presentar dos centros de mayor diversidad (Fig. 1.2). El primero está ubicado en el sureste de México (sur de Veracruz, Tabasco, sureste de Oaxaca y norte de Chiapas), donde se distribuyen siete especies, todas ellas

simpátricas (i.e., *Z. cremnophila* Vovides, Schutzman & Dehgan, *Z. katzeriana* (Regel) E. Rettig, *Z. lacandona* Schutzman & Vovides, *Z. loddigesii*, *Z. purpurea* Vovides, J.D. Rees & Vázq. Torres, *Z. polymorpha* D.W. Stev., A. Moretti & Vázq. Torres y *Z. spartea* A. DC. Y *Z. splendens*, mientras que el segundo centro se ubica entre Guatemala (Alta Verapaz e Izabal) y Honduras (Atlántida, Cortés y Santa Bárbara), en el cual ocurren siete especies (i.e. *Z. monticola*, Chamb. *Z. onanreyesii* C. Nelson & Sandoval, *Z. oreillyi* C. Nelson, *Z. sandovalii*, *Z. standleyi* Schutzman, *Z. tuerckheimii* Donn. Sm. y *Z. variegata* Warsz.). Estos sitios coinciden en tener un clima cálido y húmedo y ambos comparten tipos similares de vegetación, particularmente bosque tropical perennifolio según Rzedowski (2006). En contraste con esto hay áreas como la planicie costera del Pacífico, donde se registran únicamente tres especies (*Zamia herrerae* Calderon y Standl., *Z. paucijuga* y *Z. soconuscensis*) a lo largo de aproximadamente 2,000 km desde Nayarit, México hasta El Salvador. Esta amplia zona está asociada a diferentes tipos de vegetación, como bosque tropical perennifolio, bosque tropical subcaducifolio, bosque de coníferas y de *Quercus* (Rzedowski, 2006). Algo similar pasa en la Provincia Biótica Península de Yucatán (PBPY) (Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Chiapas, el Petén en Guatemala y parte de belice) donde se distribuye únicamente *Zamia prasina* siguiendo lo planteado por Calonje y Meerman (2009).

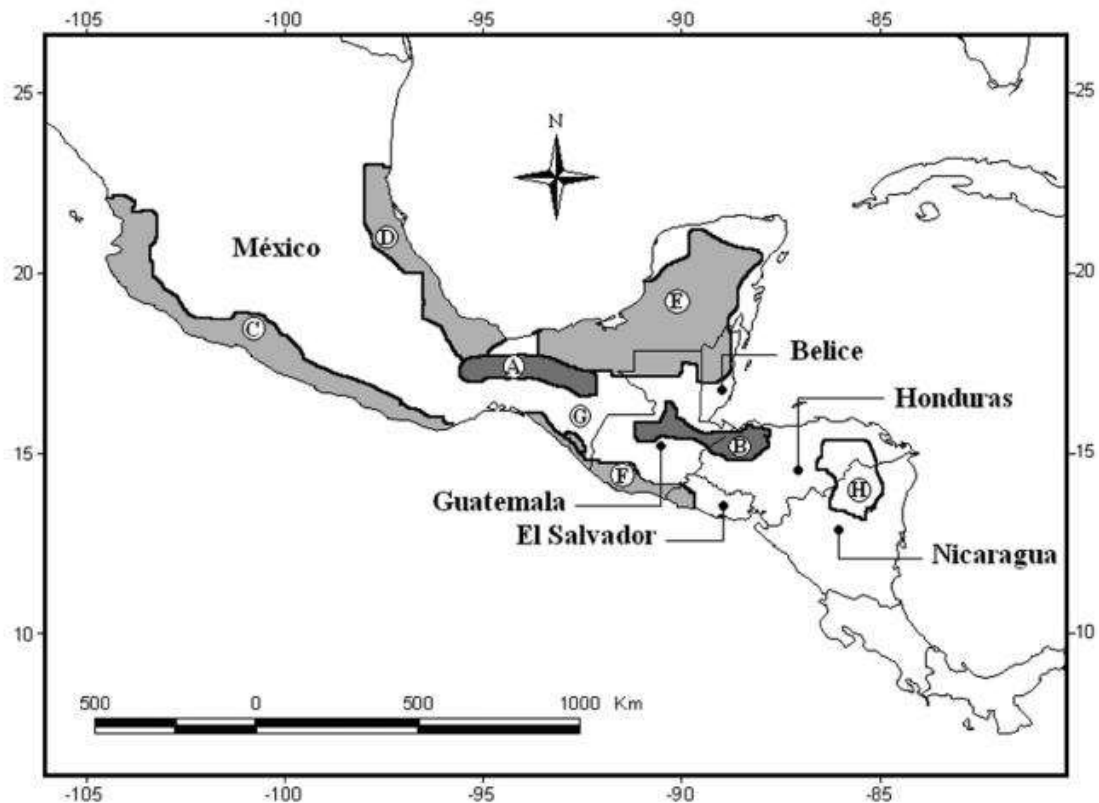


Figura 1.2. Distribución de: A) *Zamia cremnophila*, *Z. katzeriana*, *Z. lacandona*, *Z. purpurea*, *Z. spartea*, *Z. splendens*; B) *Z. monticola*, *Z. onareyesii*, *Z. oreillyi*, *Z. sandovallii*, *Z. standleyi*, *Z. tuerckheimii*, *Z. variegata*; C) *Z. paucijuga*; D) *Z. loddigesii*; E) *Z. prasina*; F) *Z. herrerae*; G) *Z. soconuscensis*; H) Área inexplorada para *Zamia*. Tomado de Nicolalde-Morejón et al., 2011.

1.2.4 Cariotipo

Las transformaciones robertsonianas (fusiones y fisiones cromosómicas) son dos de los mecanismos citados con mayor frecuencia de cambios del cariotipo en la familia *Zamiaceae* (Norstog, 1980). La pérdida de un cromosoma metacéntrico indica la ganancia de un cromosoma telocéntrico y viceversa. En un estudio sobre la diversidad cariotípica en el género *Zamia* (Caputo et al., 1996) se examinaron 83 cariotipos publicados y se pudo determinar que los números cromosómicos más comunes entre las especies de *Zamia* son 16 (presente en 20 de las 38 especies estudiadas) y 18 (presente en nueve de las 38 especies estudiadas). Los números cromosómicos altos fueron menos comunes. Algunas especies tienen un rango alto de variación de cromosómica (Ej *Z. prasina*, *Z.*

paucijuga, *Z. roezlii* Regel) (Vovides & Olivares, 1996; Olson y Gorelick, 2011). En términos evolutivos, Marchant (1968), planteaba que en estas especies predominaba un cariotipo asimétrico representado por cromosomas telocéntricos como una característica primitiva, evolucionando hacia una estabilidad cromosómica y números cromosómicos más pequeños a través de la fusión cromosómica. Esta hipótesis fue soportada por estudios realizados por Norstog (1986), con la especie *Z. roezlii*. Esta especie presenta características morfológicas arbóreas consideradas primitivas, por lo que se catalogaba como la más basal del género, con altos números cromosómicos ($2n = 22, 24 - 26$) como una plesiomorfía. Los autores consideraron que la fusión cromosómica y la correspondiente disminución del número de cromosomas aparecen como una apomorfía en el género sin embargo puede haber ciclos de simetría y asimetría durante la evolución (Jones, 1970). En una re-evaluación de *Z. roezlii* realizada a partir de un análisis cladístico con datos morfológicos y cariotípicos (Caputo *et al.*, 1996), *Zamia* quedó dividida en dos clados: El clado *inermis* y el clado *pseudoparasítica*. Opuesto a lo planteado por Norstog (1980), *Z. roezlii* fue ubicada entre las especies más derivadas del clado *pseudoparasítica*. Este resultado fue consistente en un análisis cladístico reciente realizado con datos moleculares (Caputo *et al.*, 2004) lo cual se opone a la hipótesis de fusión de Norstog de la evolución del cariotipo hacia la simetría como característica derivada (1980).

Hay una suposición general de que el centrómero en posición central es una condición ancestral a partir de la cual todas las demás ubicaciones son derivadas (Jones, 1970), sin embargo otros autores consideran que el centrómero terminal ocupa una posición previa en la gran escala de la evolución del centrómero (Vaarama, 1954). Se conoce que los cromosomas telocéntricos se pueden derivar por división errónea de cromosomas meta o acrocéntricos, pero esto no implica que necesariamente todos los cromosomas telocéntricos son derivados. Según Jones (1970) los cambios en el cariotipo dependerán de la ubicación de los puntos de ruptura y unión, pero como los cambios simétricos exigen ubicaciones más precisas, se podría pensar que las alteraciones asimétricas serían más frecuentes. Puede haber un ciclo o varios ciclos de simetría asimetría que podrían confundir las relaciones secuenciales entre los cariotipos (Jones, 1970).

Según Olson y Gorelick (2011), cuando se superpone un árbol filogenético basado en datos moleculares y otro con datos de cariotipo, se puede ver que las especies de *Zamia* que divergieron tempranamente tienen números cromosómicos $2n = 16$ o $2n = 18$ y mayormente con cromosomas metacéntricos y submetacéntricos. Esto sugiere que una característica plesiomórfica en el género era la presencia de un cariotipo simétrico con bajo número cromosómico y los congéneres derivados presentaban un cariotipo asimétrico con números cromosómicos más altos. Los números cromosómicos altos en *Zamia* han sido relacionados con diversidad morfológica y hábitat ampliamente variables (Moretti & Sabato, 1984; Moretti *et al.*, 1991; Caputo *et al.*, 1996; Vovides & Olivares, 1996; Napolitano *et al.*, 2004). Moretti & Sabato (1984) y Vovides & Olivares (1996) especulan que, aunque desconocen los posibles mecanismos, los ambientes estresantes pueden resultar en la fisión cromosómica. Esto aumenta el número cromosómico, permitiéndole a las especies tener más potencial genético para invadir y sobrevivir en un amplio rango de ambientes estresantes comparado con sus parientes de menores números cromosómicos.

Moretti *et al.* (1991) haciendo un análisis de las condiciones ecológicas donde habitan algunas zamias del Caribe y las continentales, distinguen dos grupos: condiciones ecológicas estables y uniformes que caracteriza generalmente el hábitat de las especies caribeñas, mientras que las especies mexicanas viven en un amplio rango de condiciones ecológicas pasando de lugares húmedos, a secos y semi-xéricos. Teniendo en cuenta el análisis de la vegetación y el ambiente en algunas de estas zonas, los autores comentan que las condiciones climáticas en el Caribe han estado sometidas a pocos cambios desde el Eoceno, cuando las islas ocuparon su posición actual (Balduzzi *et al.*, 1982). En contraste, los hábitats xéricos han reemplazado a los bosques lluviosos del Mioceno tardío en Veracruz (Graham, 1976). Como ya había señalado Schutzman *et al.* (1988), estos ambientes con condiciones ecológicas estresantes pueden desencadenar cambios cromosómicos.

En un estudio realizado por Vovides y Olivares (1996), con la especie *Zamia loddigesii* (ahora *Z. prasina*) en la Península de Yucatán, los autores encontraron diferentes números cromosómicos en individuos de la misma población y encontraron, además, grandes diferencias entre el número de cromosomas metacéntricos y telocéntricos. Los

autores proponen la fisión centromérica, las inversiones pericéntricas y las traslocaciones desiguales como los principales mecanismos que generan dicha variación. Estos autores encontraron también, una correlación entre los altos números cromosómicos y los hábitats secos. A pesar de la alta variación morfológica de los foliolos de esta especie, los autores no encontraron correlación entre la morfología externa de los foliolos y el cariotipo diferente en individuos de la misma población. Teniendo en cuenta el cariotipo asimétrico encontrado en esta especie los autores sugieren una reciente evolución del cariotipo en *Zamia loddigesii* (*Z. prasina*).

Las opiniones divergentes sobre la evolución del cariotipo en *Zamia* demuestran que es muy difícil hacer una aproximación cariotípica en este género (Olson y Gorelick, 2011). El estudio de la meiosis podría ayudar a esclarecer los rearrreglos cromosómicos en *Zamia*, pero una de las dificultades para lograr esto es la poca y lenta producción de conos en estas especies (Vovides y Olivares, 1996).

1.2.5 Polinización

Las especies de zamias y los insectos están relacionados por interacciones de polinización y herbivoría. Por algún tiempo se pensó que su polinización se realizaba por el viento (Chamberlain, 1919); no obstante, los estudios de su biología reproductiva sugieren un papel más importante de los escarabajos curculiónidos (Norstog, 1987; Tang, 1987; Norstog & Fawcett, 1989; Vovides, 1991a, b; Vovides *et al.*, 1993). En un estudio realizado por Vovides (1991b) se examinaron los esporofitos del estróbilo de 16 especies pertenecientes a 11 géneros de cícadas. En la mayoría de los taxones se encontraron idioblastos de tipo secretor, de paredes delgadas, y en la minoría se encontraron idioblastos del tipo escleroide de paredes gruesas. Con la excepción de *Cycas rumphii* y *Stangeria eriopus*, donde los idioblastos secretores se encontraban en la epidermis y/o hipodermis, ninguno se encontraba en el parénquima de estas especies. Los idioblastos de los esporofilos parecen estar relacionados con interacciones con insectos depredadores y/o co-simbiontes y pueden formar parte de un complejo síndrome de polinización. La falta de idioblastos en el tejido del tallo y baja concentración en el tejido foliar de *Zamia furfuracea*, en comparación con el tejido esporofílico, es un apoyo significativo a esta hipótesis. Sobre la base de la ocurrencia casi universal de estos

idioblastos en las esporofilas, sugerimos que los insectos y la simbiosis relacionada con la polinización pueden ser comunes a la mayoría de los géneros de cícadas.

La polinización ocurre cuando los insectos, probablemente del género *Rhopalotria* sp. son atraídos por el olor del cono masculino, donde se reproducen y se alimentan del parénquima de los conos masculinos, rico en almidón, por eso se le llama insecto mutualista. Las larvas del insecto también se alimentan del parénquima. En un estudio realizado con la especie *Macrozamia lucida* y su insecto polinizador *Cycadothrips chadwicki* Mound, se reporta que durante la etapa de polinización la temperatura de los conos asciende considerablemente hasta 12 °C por encima de la temperatura ambiental y a la hora del mediodía en los machos, aumentan las emisiones volátiles, un millón de veces más y en las hembras solo la quinta parte. Después de estudiar las conductas de estos insectos a diferentes horas del día, el autor plantea que los insectos son atraídos a los conos masculinos, temprano en la mañana y repelidos al mediodía cuando las emisiones volátiles son más intensas. Posteriormente vuelven a ser atraídos en la tarde Terry (2007). En otro estudio realizado sobre la polinización de *Zamia pumila* se determinó que *Rhopalotria slossoni* Schaeffer y *Pharaxonotha zamiae* Blake son los responsables de su polinización (Tang, 1987). El autor además hipotetiza sobre la atracción de los insectos hacia los conos masculinos y femeninos y plantea cuatro hipótesis: i) las estructuras reproductoras femeninas frecuentemente no ofrecen recompensas pero si reciben el beneficio de la polinización, ya que mimetizan sus estructuras reproductoras similares a las masculinas y volátiles atraentes, pues estas si dan recompensas. En *Zamia pumila* esta hipótesis es soportada por la similitud morfológica entre los conos masculinos y femeninos. La carencia de recompensa en los conos femeninos puede ser un mecanismo de adaptación para evitar las visitas dañinas y prolongadas de los polinizadores; ii) los insectos pueden visitar los conos femeninos atraídos por un exudado líquido nutritivo del micrópilo del óvulo que contiene fructosa, glucosa y sacarosa; iii) los conos masculinos son refugios para los insectos para alimentarse, aparear y reproducirse, esta hipótesis es consistente con la observación de insectos dentro de los conos masculinos por largos tiempos incluso en periodos de inactividad reproductiva. Un mecanismo de polinización similar se pone de manifiesto en *Dioon edule* (Niklas and Norstog, 1984); iv) los conos masculinos también son un lugar disponible para las larvas de los insectos, por lo que los insectos ovopositan en los conos

masculinos y posteriormente los insectos que nacen polinizan el cono femenino. Estas hipótesis no son excluyentes. Según lo reportado por Tang (1987), las hipótesis i y iii son las más consistentes con la información disponible para *Zamia pumila*.

1.2 Modelo de estudio: *Zamia prasina* W. Bull

1.3.1 Taxonomía

Zamia prasina es una especie que fue descrita por el horticultor William Bull en el año 1881, basado en ejemplares colectados en Belice. Bull donó una hoja de un ejemplar al Kew Gardens donde fue preparada como un espécimen de herbario con la correspondiente descripción morfológica. Este espécimen fue seleccionado como lectotipo de la especie por Calonje y Meerman (2009). Este nombre ha recibido poca atención en la literatura pero en años pasados fue incorrectamente aplicado en la industria hortícola y en la literatura de sistemática referido a una especie anteriormente desconocida de las montañas Mayas de Belice (Calonje y Meerman, 2009) y recientemente descrita como *Zamia decumbens* Calonje, Meerman, M.P.Griff & Hoese (Calonje *et al.*, 2009). Existe una sinonimia para *Z. prasina*. El nombre de *Zamia polymorpha* D.W. Stev., A Moretti & Vázquez-Torres fue asignado en 1998 a una especie colectada en Belice con un rango de distribución hasta la Península de Yucatán. Durante una expedición de investigación en el año 2008, investigadores del Montgomery Botanical Center observaron en las poblaciones ejemplares con una extensa coincidencia con la descripción morfológica realizada por Stevenson para *Z. polymorpha*, con foliolos fuertemente aserrados. Algunas poblaciones tenían una morfología bien consistente y otras extremadamente variable. Las poblaciones con una morfología consistente se caracterizaban por tener individuos con foliolos estrechos y creciendo en sabanas y otras poblaciones en el bosque tropical perennifolio cuyos individuos presentaban hojas grandes y foliolos anchos. En las poblaciones con morfología variada se podían observar las dos formas mencionadas y además plantas con morfología intermedia. Los autores plantean que esta variabilidad en las poblaciones “mixtas” debe estar, al menos parcialmente controlada genéticamente, porque algunas plantas con foliolos estrechos colectadas en las sabanas, conservaban esa característica después de haber pasado varios años creciendo en condiciones de sombra. Tomando en cuenta estas convergencias morfológicas encontradas en Belice con la descripción de *Z. polymorpha* y

un análisis de los dibujos de *Z. prasina* que se encontraban en el Kew Gardens, los autores plantean que ambas son la misma especie, por tanto *Z. prasina* tiene prioridad nomenclatural (Calonje y Meerman, 2009), lo cual coincide con el nombre aceptado para esta especie en la Lista Mundial de Cicadas (www.cycadlist.org).

1.3.2 Distribución

Zamia prasina se distribuye en la área biogeográfica Provincia Biótica Península de Yucatán (PBPY) que incluye los estados mexicanos de Yucatán, Campeche, Quintana Roo, una parte de Tabasco y Chiapas, los distritos del norte de Belice (Orange Walk, Corozal y Belice) y el departamento de Petén en Guatemala (Carnevali *et al.*, 2010). Los tipos de vegetación donde predomina son: bosques tropicales perennifolios, bosque tropical caducifolio y subcaducifolio según la clasificación de Rzedowski (2006) (Vovides y Nicolalde, 2010)

1.3.3 Morfología

Zamia prasina presenta un tallo subterráneo y sub-globoso que le permite sobrevivir en lugares sometidos a fuegos periódicos. Es una especie dióica, probablemente polinizada por insectos del género *Rhopalotria* sp., como se ha visto en otras especies de *Zamia*. También, se ha observado que la regeneración natural por semilla y la producción de conos femeninos es escasa (Vovides y Nicolalde-Morejón, 2010) y pueden tardar en madurar hasta 12 meses. Todo esto hace que el ciclo reproductivo de *Z. prasina* sea lento. A esta especie se le atribuye una alta variación morfológica observada en todo su rango de distribución, siendo una de las especies que presentan mayor variación morfológica para el género en México (Vovides y Nicolalde, 2010; Nicolalde-Morejón *et al.*, 2014).

En un estudio realizado por Limón *et al.* (2016), se analizó la variación fenotípica de *Zamia prasina* basada en 17 variables morfológicas y esta variabilidad fue correlacionada con condiciones ambientales a través de las poblaciones. Su muestreo incluyó diez poblaciones y 187 individuos, en cada una se realizaron mediciones en individuos adultos con hojas completamente desarrolladas, tomando solo una hoja por individuo, teniendo en cuenta la baja variación morfológica intra-individual en hojas completamente

desarrolladas. Entre las variables que se midieron se encuentran el largo y ancho del foliolo en el ápice, zona media y base de la hoja, así como la distancia entre foliolos en las tres partes de hoja mencionadas anteriormente, longitud total de la hoja, longitud del peciolo, longitud del raquis, número de pares de foliolos y número de hojas por plantas. Estos caracteres fueron empleados en una reciente revisión taxonómica del género *Zamia* e incluso en algunos casos fueron utilizados como caracteres diagnóstico a nivel de especie (Stevenson *et al.*, 1996; Nicolalde-Morejon *et al.* 2008, 2009). Los resultados indicaron que las diferencias morfométricas fueron mayores entre poblaciones que entre individuos de la misma población. Las variables con mayor variación fueron el ancho del foliolo tanto en el ápice (60.1%), la zona media (58.9%) como en la base de la hoja (49.4%) y la distancia entre los foliolos en la parte media de la hoja (34.6%). La población de Macuspana en Tabasco tenía los foliolos más estrechos y la menor distancia entre foliolos en la parte media de la hoja separando así esta población de las restantes. Las poblaciones El Tormento y Xbacab en Campeche fueron separadas del resto de las poblaciones por presentar los foliolos más estrechos en el ápice de la hoja y con una pequeña separación entre los foliolos en el medio de la hoja. A su vez, los foliolos en estas poblaciones fueron casi el doble de ancho en la parte media de la hoja comparado con la población de Macuspana similar comportamiento se obtuvo para la distancia entre foliolos en esa parte de la hoja. Las poblaciones de Alfonso Caso (Yucatán), Tenosique (Tabasco) y Carrillo Puerto (Quintana Roo) presentaron los foliolos más anchos en el ápice de la hoja separándolas del resto de las poblaciones.

En el estudio de Limón *et al.* (2016), el análisis entre la variación morfológica y las condiciones ambientales mostró una significativa relación en todas las poblaciones de *Zamia prasina*. El ancho del foliolo incrementó con el aumento del potencial de evapotranspiración y en menor grado los foliolos fueron más ancho en altas temperaturas y más estrechos en sitios con mucha precipitación. Por el contrario, el número de hojas disminuyó con el incremento del potencial de evapotranspiración y la temperatura. Los autores plantean que *Z. prasina* es una especie que habita bajo el dosel denso en el bosque tropical lluvioso y bosque semideciduo por lo que los foliolos anchos pueden ser una adaptación para facilitar la evapotranspiración y la captación de luz bajo condiciones de sombra. De acuerdo a las observaciones de Stevenson *et al.* (1996), individuos de *Z. prasina* viviendo en condiciones ambientales intermedias muestran formas morfológicas

intermedias. Moretti and Sabato (1984), plantean que las diferencias en el hábitat pueden provocar fisiones cromosómicas permitiendo a la especie invadir y sobrevivir un mayor rango de ambiente que sus parientes con menor número cromosómico. *Zamia prasina* tiene una gran variación cariotípica como ya se ha planteado ($2n = 17$, $2n = 22-28$) (Stevenson *et al.*, 1996; Vovides and Olivares 1996; Napolitano *et al.*, 2004) y se ha propuesto que este fenómeno puede generar radiación adaptativa a pequeña escala en esta especie (Olson y Gorelick, 2011). De modo general, este estudio corrobora una relación entre la variación morfológica y el ambiente. Es válido aclarar que, aunque los fenómenos de variación y fisión cromosómica han sido relacionados con la heterogeneidad ambiental, los mecanismos que gobiernan esta relación no han sido probados (Limón *et al.*, 2016).

1.3.4 Contexto histórico y amenazas de *Zamia prasina*

En la Península de Yucatán, los mayas fueron quienes establecieron las primeras ciudades, ellos tenían métodos variados y sofisticados para la producción de alimentos, bancales, la jardinería/horticultura intensiva, los jardines forestales, los barbechos y la agricultura itinerante, también llamada de “Roza, tumba y quema” o simplemente milpa (Demarest, 2004; Sharer y Traxler, 2006; Ross, 2011). La milpa es el sistema de cultivo más arcaico en Mesoamérica. Esta es una agricultura de subsistencia practicada en regiones de vegetación densa como las selvas y bosques tropicales. Desde tiempos precolombinos, los agricultores Mayas abrían claros en la vegetación y quemaban los árboles para que las cenizas aportaran fertilidad al suelo. Como los suelos de las zonas cálidas (como los presentes en gran parte de la Península de Yucatán) son extremadamente frágiles, en pocos años quedaban agotados y los agricultores abrían nuevos claros en otro sector de la selva o el bosque, abarcando así grandes extensiones y contribuyendo notablemente a la deforestación de la península (Sánchez *et al.*, 1999). Más recientemente, una actividad agrícola que contribuyó a la deforestación de la región, particularmente en la parte noreste de la Península, fue el monocultivo del henequén, planta originaria de la región, y que desde mediados del siglo XIX dio origen a una agroindustria que por muchos años fue la principal actividad económica de la península (Chamberlain, 1982). Por último, otra actividad que ha afectado seriamente la vegetación original de la región es la actividad ganadera (Quesada, 2001). La ganadería ha sido una

actividad económica arraigada en la cultura yucateca. Desde las viejas haciendas ganaderas que se desarrollaron a partir de los siglos XVI y XVII, inmediatamente después de la conquista española, hasta las explotaciones más modernas instaladas en la región ganadera del oriente del estado, particularmente el municipio de Tizimín, la ganadería bovina ha sido una actividad de gran importancia económica y para la sociedad yucateca (INEGI, 2011).

Como *Zamia prasina* es una especie que habita en bosques y selvas medianas, es muy posible que su hábitat se viera afectado por las prácticas agrícolas mencionadas anteriormente. Otras amenazas relacionadas con la especie son los incendios forestales (Vovides y Nicolalde, 2010). Los incendios inducidos forman parte del sistema milpa; pero también se ve favorecido por la alta incidencia de huracanes en la región, los cuales tras su paso dejan las condiciones idóneas (vegetación muerta) para que el fuego se genere y expanda de manera natural (Greenpeace, 2013). Estos factores afectan la supervivencia de *Z. prasina*, porque aunque esta especie tiene un tallo subterráneo que soporta los incendios, sí limitan el reclutamiento de nuevas plántulas. Hay otras características referentes a la biología reproductiva de la especie que también atentan contra su supervivencia a) poca producción y lenta maduración de los conos femeninos, b) baja producción de semillas y poca polinización. Además, el polinizador de *Z. prasina* posiblemente sea un insecto especialista y sensible a los incendios porque afectan a las larvas diapáusicas del polinizador que hibernan en el suelo (Vovides *et al.*, 1997). Todo este escenario hace que las poblaciones de *Z. prasina* tengan una gran vulnerabilidad.

1.3.5 Situación de conservación

Zamia prasina fue categorizada En Peligro de Extinción (P) según la Norma Mexicana NOM-059 del 2001. Luego de la actualización de la ley en el 2010, esta especie se ubicó en la categoría Bajo Protección Especial (Pr), según la Norma Mexicana MOM-059 del 2010. Aunque no hay datos publicados sobre este cambio de categoría los expertos lo relacionan a un incremento en el área de distribución de la especie (Vovides *com pers*) Esta especie también fue categorizada según las normas de la UICN y según los datos reportados por el grupo de especialistas de Cycadas (UICN/SSC) (Vovides y Nicolalde, 2010) se encuentra en la categoría de En Peligro Crítico (CR).

1.3.6 Importancia

A *Zamia prasina* se le atribuye una importancia ecológica como formadora y retenedora de suelo. Además, la mayoría de las cícadadas tiene un tipo de raíz llamada “coraloide” que sirve como soporte físico para la simbiosis con cianobacterias fijadoras de nitrógeno, por lo que aportan este elemento al suelo (Grove *et al.*, 1980). También, esta especie tiene valor de uso indirecto, pues es utilizada como planta ornamental y para realizar rituales religiosos. Aunque no hay reportes publicados sobre el tráfico ilícito de esta especie, el Centro Mundial de Vigilancia de la Conservación (WCMC) en el periodo de 1975-2008 registró movimiento lícito de plantas vivas y semillas de *Z. prasina* desde Yucatán hacia España, Marruecos, Turquía y Australia. Además, debido a su estatus de conservación y distribución solo en la Provincia Biótica Península de Yucatán tiene una importancia desde el punto de vista de conservación, pues forma parte del patrimonio natural de México.

1.3 Categorización de especies: Criterios UICN y Método de Evaluación de Riesgo de Extinción (MER)

La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) es una organización compuesta por estados soberanos, agencias gubernamentales y organizaciones de la sociedad civil. Es la red ambiental más grande y diversa del mundo. Fue creada en 1948, cuenta con la experiencia, los recursos y el alcance de sus más de 1300 organizaciones miembro y los aportes de 15 000 expertos. La UICN es la autoridad mundial en cuanto al estado de la naturaleza y los recursos naturales, así como quien propone las medidas necesarias para protegerlos. Su misión es influir, alentar y ayudar a las sociedades de todo el mundo a conservar la integridad y biodiversidad de la naturaleza y asegurar que todo uso de los recursos naturales sea equitativo y ecológicamente sostenible (UICN ver 3.1, 2001). La UICN generó los criterios y categorías para evaluar el grado de amenaza de la flora y la fauna a nivel regional. Se ha comprobado que estos criterios son aplicables para la mayoría de los organismos. Sin embargo, se debe tener presente que, aunque el sistema sitúa a especies en las categorías de amenaza con un grado alto de fiabilidad, los criterios no tienen en cuenta la historia natural de cada especie. Por lo tanto, en ciertos casos concretos el riesgo de extinción puede estar subestimado y en otros sobreestimado.

La UICN propone varias categorías y dentro de ellas, tres categorías de amenaza: En Peligro Crítico (CR), En Peligro (P) y Amenazada (A) (UICN ver 3.1, 2001) (Fig. 1.3). Para ubicar a las especies en cada una de ellas tiene en cuenta varios criterios: extensión de presencia, área de ocupación, número de localidades, tamaño de la población, número de individuos maduros, fragmentación de las poblaciones, duración de las generaciones entre otras.

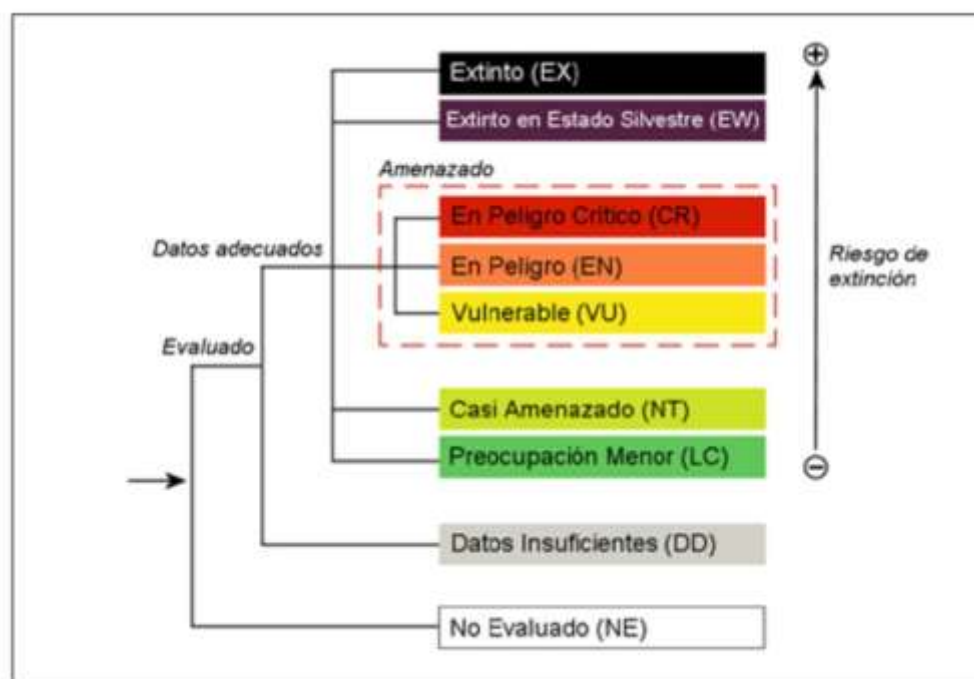


Figura 1.3. Estructura de las categorías de la UICN.

Algunos de los problemas detectados para poder aplicar el método de UICN fueron que se requiere cuantificar las reducciones poblacionales (más de 80, 50 o 20 %) en los diez años más recientes o en tres generaciones. Es claro que, para la mayoría de las especies, incluso de grupos tan conocidos como las aves o los mamíferos, no se tienen datos para dicha estimación, ni se conoce el lapso que abarcan tres generaciones; además, falta información de los tamaños de poblaciones, otro requisito del método de la UICN. Un ejemplo más de la dificultad de la aplicación de dicho método es que se requiere que se aplique un análisis de viabilidad de la población y el hábitat (PHVA, en el sentido de la UICN) para calcular la probabilidad de extinción en el medio silvestre. Para aplicar este análisis se necesita una serie de variables e información demográfica de la

especie que está siendo evaluada que rara vez está disponible. El único criterio de la UICN que es relativamente fácil de aplicar es la amplitud de la distribución. Esto ha determinado que muchos expertos, a pesar de tener información de varios criterios sobre la especie que están evaluando, sólo basan su recomendación de clasificación en el resultado del criterio de distribución (UICN ver 3.1, 2001).

Por su parte, el Método de Evaluación de Riesgo de especies silvestres (MER) fue desarrollado para categorizar las especies silvestres en México. Dado el carácter megadiverso de México, el poco conocimiento de su biodiversidad y los requerimientos de información demográfica y biológica detallada para aplicar el método de la UICN, se consideró que lo óptimo sería desarrollar una iniciativa propia. El MER considera cuatro categorías: Probablemente extinta en el medio silvestre (E), En peligro de extinción (P), Amenazadas (A), Sujeta a protección especial (Pr), esta última indica que la especie está fuera de peligro. Para incluir a las especies en cada una de las categorías este método se basa en la sumatoria de cuatro criterios: Criterio A) Amplitud de la distribución del taxón en México, Criterio B) Estado del hábitat con respecto al desarrollo natural del taxón, Criterio C) Vulnerabilidad biológica intrínseca del taxón, Criterio D) Impacto de la actividad humana sobre el taxón. Mientras más alta sea la sumatoria de estos criterios mayor será el grado de amenaza (Sánchez *et al.*, 2007).

1.4 Enfoques moleculares en la conservación de especies vegetales

Los métodos de caracterización genética de los individuos, poblaciones y especies han proporcionado poderosas herramientas para hacer frente a las innumerables preguntas sobre la historia natural de las especies. Dentro de esto, los métodos moleculares han facilitado enormemente el análisis de los patrones de variación genética en las poblaciones naturales y proporcionan una oportunidad sin precedentes para el estudio empírico de la evolución y los procesos demográficos que la forman. Existen varias ramas de estudio que se apoyan en herramientas moleculares para poner a pruebas sus hipótesis, como por ejemplo la ecología molecular, la filogeografía, genética de la conservación, mejoramiento genético, etc. (Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009).

Cuando se trabaja con especies amenazadas es muy importante el enfoque filogeográfico y el de genética de la conservación, pues a través de ellos se pueden inferir cuáles son los factores históricos y procesos evolutivos que influyeron en la distribución espacial actual de las especies. También, estos enfoques permiten describir patrones genéticos en las poblaciones naturales, así como investigar los efectos del declive y la fragmentación de las poblaciones sobre la variación genética.

1.5 Filogeografía y secuencias de cloroplastos

La filogeografía es el campo de estudio relacionado con los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de linajes de genes, sobre todo aquellos entre y dentro de especies (Avice, 2000). Este enfoque trabaja con los componentes históricos, filogenéticos, de la distribución espacial de especies y considera como ejes el tiempo y el espacio, en los cuales (idealmente) se mapean las genealogías de estudio (Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009). La filogeografía trata de interpretar el modo y la extensión en que los procesos históricos en la demografía, pudieron dejar marcas evolutivas en la distribución geográfica actual de caracteres con base genética (Avice, 2000). El desarrollo de técnicas moleculares ha contribuido significativamente para la consolidación de los análisis filogeográficos. El ADN de cloroplasto (cpADN) ha sido la opción más exitosa para desarrollar estudios filogeográficos con plantas por ser marcadores conservados y de herencia materna (Soltis *et al.*, 2006); aunque con ciertos problemas como la posibilidad de tener herencia biparental en algunos taxa. Al poder utilizar datos de secuencias de cpADN y representarlos en una red de haplotipos, se tiene no sólo la escala geográfica, sino una dimensión más: el tiempo evolutivo. Por lo tanto, en filogeografía es necesario primero establecer las relaciones genealógicas entre haplotipos y posteriormente identificar qué factores históricos y geográficos pudo haber influido o determinado la distribución actual de estos haplotipos. Para ello, se utilizan básicamente dos métodos de análisis: el método gráfico, basado en árboles de genes o en coalescencia; y otro que considera estadísticos de resumen y parámetros demográficos (Emerson *et al.*, 2001; Posada & Crandall, 2001; Hey & Machado 2003). Los métodos gráficos basados en árboles de genes pueden ser: métodos filogenéticos tradicionales, redes de haplotipos o análisis de clados anidados.

En filogeografía, las unidades de comparación son los haplotipos, a partir de los cuales se obtiene un árbol de genes, el cual se define como un diagrama ramificante que describe el patrón de ancestría entre secuencias homólogas de ADN de diferentes individuos de una población o especie (Hey & Machado, 2003). Las ramas de diferentes longitudes expresan la cantidad de cambio evolutivo (en términos, de número de pasos mutacionales o número de sustituciones). Aunque los árboles de genes, que describen el patrón de ancestría del ADN de una población, son diferentes de los árboles filogenéticos, que se refieren al patrón de ancestría de un taxón, ambos pueden analizarse con los métodos filogenéticos tradicionales, como parsimonia, o aquellos que involucran distancias genéticas o modelos evolutivos específicos, como neighbor joining, máxima verosimilitud y métodos bayesianos (Vázquez- Domínguez *et al.*, 2009). A continuación, se muestran dos ejemplos de estudios filogeográficos en la familia Zamiaceae.

1.6 Estudios filogeográficos en Zamiaceae

Zamia paucijuga Weiland (Nolasco-Soto *et al.*, 2015).

La investigación se centró en determinar la estructura filogeográfica y la historia demográfica de *Zamia paucijuga*, basado en 120 secuencias de ITS2 y 117 de *psbK/I* en 13 poblaciones distribuidas a lo largo de todo el rango de distribución de la especie en la pendiente del pacífico desde Nayarit hasta Oaxaca. Se detectaron 15 haplotipos ITS2 y cuatro para *psbK/I*. Se estimó la diversidad genética de las poblaciones en términos de diversidad nucleotídica y haplotídica. Los resultados obtenidos con la región de cloroplasto *psbK/I* ($H_d = 0.669$, $\pi = 0.0013$) fueron relativamente más bajo que los obtenidos con la región ITS2 ($H_d = 0.843$, $\pi = 0.0063$). Los autores plantean que la diversidad genética promedio en *Z. paucijuga* es más baja en comparación con otras especies de cícadas. Los resultados de AMOVAs no jerárquicos y jerárquicos para ITS2 y *psbK/I* mostraron niveles altos y bajos de estructura genética respectivamente. Según los autores esta discrepancia probablemente refleja una disminución de la intensidad del flujo de genes a través de semillas, pero alto flujo de genes a través del polen, que se correlaciona con los procesos de herencia divergente en ADN nuclear y de organelos. Las pruebas de SAMOVA (análisis espacial de la varianza molecular) para ambos loci (ITS2 y *psbK/I*) mostraron una alta correspondencia con la estructura geográfica regional definida a priori, lo que indica que el uso de ambas regiones, nuclear y de cloroplasto permiten

hacer inferencias relativas a los procesos evolutivos que afectan la dinámica de población en *Z. paucijuga*. Además, los autores consideran que los resultados encontrados en esta investigación son consistentes con las conclusiones de otros estudios sobre el origen del género *Zamia*, que apoyan que la diversificación de *Z. paucijuga* ocurrió en el Pleistoceno.

Dioon sonorensis (De Luca, Sabato & Vázquez Torres) Chemnick, T.J.Greg. & S.Salas-Mor (Gutiérrez Ortega *et al.*, 2014)

Este estudio se centró en estimar los niveles de diversidad genética de las poblaciones de *Dioon sonorensis* y determinar posibles “unidades evolutivas significativas” y determinar las relaciones genealógicas entre las especies del género *Dioon*. Se utilizó el espaciador intergénico de cloroplasto *trnL-trnF* y 117 secuencias de nueve poblaciones en Sonora, México. Se obtuvieron tres haplotipos por lo que plantean que los niveles de variabilidad en las poblaciones son bajos. Teniendo en cuenta la distribución espacial de los haplotipos se identificaron al menos dos unidades evolutivas, una que incluye las poblaciones del norte-centro que tienen los haplotipos A y Ai y otra en las poblaciones del sur que presentan el haplotipo B. Sólo las poblaciones del sur se encuentran dentro de áreas protegidas, sin embargo, los autores plantean que es necesario aplicar planes de gestión más efectivos vinculando a la comunidad. Además consideran que la Sierra de Mazatlán, donde se encuentran las poblaciones del norte-centro, debe ser considerada área de conservación. Los autores determinaron además que el centro de diversificación de esta especie es en el sur de México y que las cadenas montañosas de Sierra Madre han jugado un papel importante en la migración de comunidades. Las relaciones entre las 14 especies de *Dioon* no quedaron claras debido a muy poca diferenciación entre ellas. Este trabajo representa un primer intento de reconciliar un enfoque genealógico con la identificación de centros importantes de diversidad genética en las cícadas mexicanas.

1.7 Modelado de Nicho ecológico

El modelado de nicho es una herramienta que se usa para identificar áreas de distribución potencial de una especie, teniendo como datos de partida: variables ambientales (basadas en temperatura y precipitación), información de presencia de las especies y algoritmos que estiman el nicho climático (Guisan y Zimmermann, 2000; Graham *et al.*, 2004). El término nicho ecológico muchas veces es cuestionado porque el modelado de

nicho solo tiene en cuenta variables ambientales y no analiza otros aspectos ecológicos como las interacciones bióticas y la capacidad de dispersión, que también influyen en la presencia de una especie. En este caso se modelan los ambientes, y la proyección de estas condiciones ambientales en la geografía es una distribución potencial. Es por eso que en ocasiones se usa el término modelado de nicho ambiental (Peterson *et al.*, 2015).

El modelado de nicho se realiza en el espacio ambiental que es multidimensional y existe una correlación entre éste y el espacio geográfico. Si bien a cada punto de la geografía le corresponde un único punto del espacio ambiental, lo contrario no es verdad necesariamente porque puede haber dos regiones del planeta con valores de las variables ambientales iguales o similares lo que se conoce como la “dualidad de Hutchinson” y esto permite determinar áreas potenciales de distribución. Es importante reconocer que puntos muy lejanos en el espacio geográfico pueden ser muy similares en el espacio ambiental y que puntos muy cercanos en el espacio geográfico pueden ser muy diferentes en el ambiental (Soberón *et al.*, 2017).

Entre los factores que determinan el área de distribución de una especie, se encuentran sus tolerancias ambientales (su nicho fundamental), la presencia o ausencia de otras especies (polinizadoras, dispersoras, competidoras, depredadoras, etc.) y las posibilidades de dispersión (Udvardy, 1969). De modo que una especie tiene altas probabilidades de ser observada en aquellas regiones del planeta donde: i) se encuentran las condiciones ambientales adecuadas, ii) existan las condiciones bióticas necesarias y iii) donde pueda llegar la especie según su capacidad de dispersión.

Existen varios algoritmos matemáticos para el modelado de nicho: Garp, Bioclim, Maxent; sin embargo; éste último es uno de los más empleados. Es un programa que modela la distribución geográfica de las especies, utilizando como datos sólo los sitios de presencia y las variables bioclimáticas asociadas a cada uno de esos puntos de presencia. Para modelar las distribuciones se basa en el principio de Máxima entropía (Elith *et al.*, 2011). Algunas ventajas de este modelo son: solo requiere datos de presencia, puede utilizar datos continuos y categóricos, el resultado es continuo, permitiendo distinguir sutiles cambios en las áreas ambientalmente favorables.

La abundancia de datos de presencias, la disponibilidad de datos de coberturas climáticas mundiales, y la variedad de programas de cómputo que correlacionan presencias con coberturas ambientales, han permitido una explosión en el número de aplicaciones: conservación y planificación de reservas, ecología, evolución, epidemiología, manejo de especies invasoras, así como la predicción del impacto potencial del cambio climático (Soberón *et al.*, 2017).

JUSTIFICACIÓN

Realizar una correcta categorización del estado de conservación de las especies es una actividad necesaria para optimizar los esfuerzos y recursos disponibles para la conservación. A nivel mundial, la herramienta más utilizada para categorizar especies son los criterios de la UICN; sin embargo, algunos países han diseñado sus propias herramientas. Este es el caso de México, en donde se desarrolló el Método de Evaluación de Riesgo para Especies Silvestres (MER). Aunque las categorías de amenaza consideradas por los criterios de la UICN y del MER no son iguales, tienen cierta equivalencia. *Zamia prasina* es la única cícada que habita en la Península de Yucatán, ésta se encuentra ubicada en la máxima categoría de amenaza según los criterios de la UICN (En Peligro crítico, CR) y en una categoría fuera de peligro según el método MER (Sujeta a Protección Especial, Pr). Es poco probable que esta incongruencia sea legítima, considerando las grandes diferencias que hay entre una categoría y otra. Aunque los estudios ecológicos y poblacionales de *Z. prasina* son escasos, información reciente de nuestro grupo de investigación sugiere que el estado de conservación de *Z. prasina* podría no ser tan frágil como ha sido considerado por la UICN, al menos no basándose en los criterios de distribución de la UICN ver 3.1, 2001. Esta inconsistencia entre ambos sistemas de evaluación hace necesario un estudio que nos permita conocer más sobre el estado de conservación real de esta especie. Por otro lado *Z. prasina* es una especie que habita en bosques tropicales húmedos cuyos ecosistemas sufrieron una contracción hacia el sur del continente debido a la disminución de las precipitaciones durante las glaciaciones. Es probable que durante los periodos fríos y secos del pleistoceno esta especie haya experimentado una reducción en sus poblaciones y un desplazamiento de su distribución hacia el sur quedando algunos remanentes en ciertas zonas que permanecieron húmedas. Posteriormente durante periodos interglaciales más cálidos y

húmedos es probable que *Z. prasina* haya vuelto a recolonizar áreas más al norte de la península. Para conocer sobre esto se necesita un estudio con un enfoque filogeográfico que nos revele cómo fue la diversidad genética y demografía histórica de esta especie durante el paleoclima

HIPÓTESIS 1

Premisa: Aun cuando los estudios ecológicos y poblacionales de *Z. prasina* son escasos, observaciones recientes de nuestro grupo de investigación indican que en la Península de Yucatán hay un elevado número de poblaciones de esta especie. Sumado a esto, a pesar del impacto que ha sufrido esta región de México por la agricultura itinerante practicada por los Mayas desde hace más de 3 mil años y el cambio de uso de suelo llevado a cabo por el hombre en los últimos 100 años, existen zonas de bosques tropicales conservadas donde se puede encontrar esta especie sin dificultad. Además, *Z. prasina* tiene una alta capacidad de resiliencia que le permite sobrevivir ante situaciones adversas en ambientes perturbados.

Predicción: Consideramos que *Zamia prasina* no tiene una situación de conservación tan crítica como lo indica su actual categoría de amenaza según los criterios de la UICN (En Peligro Crítico). Predecimos que, con base en colectas recientes, el área de ocupación, extensión de presencia y el número de localidades colocarán a esta especie en una categoría de menor riesgo según los criterios de la UICN. Además, la evaluación empleando el método MER corroborará que esta especie se encuentra fuera de peligro, ubicándose en la categoría Bajo Protección Especial (Pr).

Prueba: Para someter a prueba esta hipótesis realizamos una evaluación del estado de conservación de *Zamia prasina* empleando dos métodos de evaluación: los criterios de la UICN y el Método de Evaluación de Riesgo (MER).

HIPÓTESIS 2

Premisa: El principal factor que influyó en la diversificación y distribución de las cícadas fueron los cambios climáticos del Pleistoceno, provocando además el movimiento de especies a gran escala, alterando la distribución y diversidad de las mismas, así como el tamaño efectivo de sus poblaciones. En la península de Yucatán, los ecosistemas

tropicales húmedos, como las selvas medianas y altas, sufrieron una contracción hacia el sur del continente debido a la disminución de las precipitaciones y el clima se hizo mucho más seco. Las biotas asociadas a este tipo de ecosistemas también sufrieron cambios demográficos, siendo que en muchos casos quedaron relictos de sus poblaciones en refugios que permanecieron húmedos, a partir de los cuales se expandieron hacia el norte las poblaciones durante los periodos interglaciales más cálidos.

Predicción: Predecimos que *Zamia prasina*, un taxón asociado a las selvas medianas, sufrió una disminución en el área de distribución y en el tamaño efectivo de la población durante el Último Máximo Glacial, mientras que, la distribución y el tamaño efectivo de las poblaciones aumentaron durante uno de los periodos interglaciales, ajustándose su dinámica poblacional a lo que se conoce como Hipótesis de Refugio Glacial.

Prueba: Para someter a prueba esta hipótesis se utilizó una región de ADN del genoma de cloroplasto (un espaciador intergénico, *atpF-atpH*) y una región de ADN nuclear (ITS2), el análisis de los datos se hizo bajo un enfoque filogeográfico.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el estado de conservación de *Zamia prasina* en la Provincia Biótica Península de Yucatán y determinar los factores históricos que influyeron en su diversidad genética y demografía.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el estado de conservación de *Zamia prasina* empleando los criterios de la UICN y el método MER.
2. Estimar la diversidad genética y estructura filogeográfica de *Z. prasina* mediante ADN de cloroplasto (*atpF-atpH*) y nuclear (ITS2).
3. Determinar los cambios demográficos de *Z. prasina* durante el Pleistoceno tardío-Holoceno.
4. Determinar la distribución potencial de *Z. prasina* en el presente y durante el Último Interglacial, Último Máximo Glacial y el Holoceno Medio.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II

EVALUACIÓN DEL RIESGO DE EXTINCIÓN DE *Zamia prasina* W. Bull, EN LA PROVINCIA BIÓTICA PENÍNSULA DE YUCATÁN

ASSESSMENT OF THE EXTINCTION RISK OF *Zamia prasina* W. Bull, IN THE YUCATÁN PENINSULA BIOTIC PROVINCE

Grecia Montalvo-Fernández¹, Germán Carnevali Fernández-Concha^{1,2}, Andrew P. Vovides³, Jaime Muñoz-López¹, Jaime Martínez-Castillo^{1*}

¹ Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo C.P. 97205, Mérida, Yucatán, México.

² Orchid Herbarium of Oakes Ames, Harvard University Herbaria, 22 Divinity Avenue, Cambridge, Massachusetts 02138,

³Instituto de Ecología, A.C., Carretera Antigua a Coatepec 351, el Haya, Xalapa, Apdo Postal 63. Veracruz, México, 91070.

*correspondencia: jmartinez@cicy.mx

Este es un artículo aceptado en la Revista Mexicana de Biodiversidad

Vol. 90 (2019).

RESUMEN

Zamia prasina es una cícada nativa de la Provincia Biótica Península de Yucatán. Esta fue categorizada según la Norma Mexicana NOM-059 del 2010 en Protección Especial (Pr) y según las normas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) como En Peligro Crítico (CR). Sin embargo, el hallazgo reciente de un elevado número de localidades y su presencia en lugares perturbados, parecen contradecir el estado de conservación reportado para esta cícada por ambos métodos de análisis. El objetivo de este estudio fue realizar una re-evaluación del riesgo de extinción de *Z. prasina* utilizando criterios de la UICN y del Método de Evaluación del Riesgo de Extinción de las Especies Silvestres en México (MER) para redefinir o confirmar su estatus de conservación. De acuerdo a los criterios del MER, *Z. prasina* se mantiene en la categoría de Protección Especial (Pr); sin embargo, según los resultados de los criterios de la UICN, ésta debe ser incluida en una categoría de menor riesgo, como Preocupación Menor (LC).

Palabras clave: Amenaza, cícadas, conservación, hábitat perturbado, MER, UICN, vulnerabilidad.

2.1 INTRODUCCIÓN

En el mundo existen 35144 especies de cícadas (Calonje *et al.*, 2019). De éstas, 60 se distribuyen en México, lo que lo hace el país más diverso en el mundo en cícadas, solo superado por Australia (Vovides, 2000). Actualmente, las cícadas se encuentran amenazadas a escala mundial, por lo que muchas de sus especies están citadas en los Apéndices I y II de CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres) (Lazcano, 2005). Un ejemplo de esto es *Zamia prasina* W. Bull, de la familia Zamiaceae. Esta es una especie de tallos subterráneos, subglobosos, hasta de 10 cm de diámetro, con hojas con 3-12 pares de folíolos lanceolados a oblanceolados. Es una especie dioica, con un ciclo reproductivo largo, la producción de conos femeninos, en condiciones naturales, no es frecuente y pueden tardar en madurar hasta 12 meses. La polinización es probable que sea por insectos, como ocurre en otras zamias (Vovides y Nicolalde-Morejón, 2010). También, hay evidencia de que las plantas de *Z. prasina*, bajo condiciones de cultivo, son capaces de producir semillas en ausencia

de plantas masculinas, poniéndose así de manifiesto el fenómeno de la apomixis (Carnevali com pers).

Zamia prasina es endémica del área biogeográfica Provincia Biótica Península de Yucatán (PBPY) (Stevenson *et al.*, 1996).), la cual incluye los estados mexicanos de Yucatán, Campeche, Quintana Roo, una parte de Tabasco y Chiapas; los distritos del norte de Belice (Orange Walk, Corozal) y el departamento de Petén en Guatemala (Carnevali *et al.*, 2010). Los tipos de vegetación donde *Z. prasina* predomina son: bosque tropical perennifolio, bosque tropical caducifolio y subcaducifolio, según la clasificación de Rzedowski (2006) (Vovides y Nicolalde-Morejón, 2010). Desde hace aproximadamente 3,000 años, el hábitat natural de *Z. prasina* ha sido impactado como resultado del florecimiento de la cultura Maya, la cual estableció un gran número de ciudades y áreas extensas de cultivo a través del sistema itinerante de roza-tumba-quema, afectando con esto a la flora original de la Península de Yucatán (Sánchez y Rebollar, 1999). En las últimas décadas, el hábitat de *Z. prasina* se ha visto afectado también por diversas actividades humanas como el cultivo de grandes extensiones de variedades mejoradas de maíz (*Zea mays* L. subsp. *mays*) y de especies no nativas como el sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) y la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), la ganadería semi-intensiva y el manejo forestal (Vovides y Nicolalde-Morejón, 2010).

Zamia prasina fue categorizada como en Peligro de Extinción (P) empleando el Método de Evaluación de Riesgo para Especies Silvestres en México (MER) e incluida en la Norma Mexicana NOM-059 del 2001 de SEMARNAT. Luego de la actualización de la ley en el 2010, ésta quedó ubicada en la categoría Bajo Protección Especial (Pr) (Vovides y Nicolalde-Morejón, 2010). Esta especie también fue categorizada En Peligro Crítico (CR) según las normas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), a partir de datos reportados por el grupo de especialistas de Cícadas (UICN/SSC) (Vovides y Nicolalde-Morejón, 2010). Cabe señalar que la evaluación de la UICN se realizó antes de la constatación de que *Z. prasina* era la misma especie identificada como *Z. polymorpha*, la cual había sido reportada previamente en la región. Aunque los estudios ecológicos y poblacionales de *Z. prasina* son escasos, información reciente de nuestro grupo de investigación, así como reportes de otros equipos de investigación que usaron los criterios de la IUCN y del MER (Sánchez *et al.*, 2013), sugieren que el estado de

conservación de *Z. prasina* podría no ser tan frágil como ha sido considerado por la SEMARNAT y la UICN, al menos no basándose en los criterios B de la UICN ver 3.1, 2001).

El método de la UICN ha sido ampliamente utilizado para la categorización del estado de conservación de diferentes taxones de flora y fauna, y para guiar las acciones de conservación a nivel mundial (Scott *et al.*, 1987). A escalas menores, este método es útil para ordenar las acciones en ciertas áreas protegidas (Grigera y Úbeda, 2002). La UICN propone tres categorías de amenaza: En Peligro Crítico (CR), En Peligro (P) y Amenazada (A) (UICN ver 3.1, 2001). Por otra parte, el Método MER es una herramienta implementada en México con un alcance local, mediante el cual se establecen los criterios para incluir, excluir o cambiar la categoría de riesgo de las especies silvestres o poblaciones. El instrumento jurídico legal que protege a estas especies categorizadas con el MER es la Norma NOM-059- SEMARNAT. El MER plantea tres categorías de riesgo: En peligro de extinción (P), Amenazadas (A) y Sujetas a protección especial (Pr) (Sánchez *et al.*, 2007).

Considerando los reportes contradictorios sobre el estado de conservación de *Z. prasina* y el riesgo de extinción que corren muchas de las especies de cícadras en el mundo, es muy importante determinar el estado de conservación real de esta especie. El objetivo de la investigación fue realizar una re-evaluación del riesgo de extinción de *Z. prasina* utilizando los criterios de la UICN y del MER.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Área de estudio

La investigación se realizó en la Provincia Biótica Península de Yucatán, la cual posee una extensión aproximada de 145 000 km². La Península de Yucatán alcanzó su configuración actual por movimientos tectónicos de levantamiento que ocurrieron en el Mioceno y Plio-Pleistoceno y, consta de una gran plataforma caliza de origen marino (Lugo-Hubp y Córdova, 1992). La mayor elevación se encuentra aproximadamente a 350 m. La Península de Yucatán tiene una hidrografía superficial y escasa, con temperatura media anual que oscila entre 25 – 28 °C. El clima es biestacional, con una marcada época

de sequía. Las principales formaciones vegetales son el bosque tropical caducifolio en el noroeste de la Península, bosque tropical subcaducifolio en el centro y bosque tropical perennifolio en el sureste. En esta región también hay humedales y vegetación costera (Rzedowski, 2006).

2.2.2 Registros de presencia

La Tabla 2.1 muestra las fuentes de información y número de referencias geográficas que se usaron para realizar la evaluación.

Tabla 2.1. Fuentes de información y número de referencias geográficas de *Zamia prasina* utilizadas para determinar su estado de conservación.

Fuente	Número de referencias
Velasco (2015)	6
Herbario CICY	12
Montgomery Botanical Center, Florida	54
Missourri Botanical Garden (TROPICOS ®)	7
Herbario BIGU	1
Referencias propias	23
Total	103

2.2.3 Evaluación de riesgos

Para la evaluación de los riesgos de extinción, primero empleamos dos enfoques por separado: Criterios de la UICN (UICN versión 3.1, 2001) y el Método MER (Sánchez *et al.*, 2007). Posteriormente, se realizó una valoración conjunta con los resultados de ambas aproximaciones.

2.2.3.1 Criterios UICN

Extensión de presencia (B1), área de ocupación (B2) y número de localidades tomando en cuenta toda el área de distribución de la especie. Usamos los 103 registros de presencia (Anexo 2.1) y la herramienta Geospatial Conservation Assessment Tool (GeoCat) (Bachman *et al.*, 2011) con un tamaño de celda de 2 km² para determinar el polígono de distribución de la especie.

2.2.3.2 Método MER

2.2.3.2.1 A) Amplitud de la distribución del taxón en México

Para este criterio solo usamos los 56 registros de presencia dentro del territorio mexicano (Anexo 2.1). Se empleó la herramienta *Geospatial Conservation Assessment Tool* (GeoCat) (Bachman *et al.*, 2011) para determinar el polígono de distribución de la especie.

2.2.3.2.2 B) Estado del hábitat con respecto al desarrollo natural del taxón

Nos enfocamos en determinar las características de los lugares donde encontrábamos plantas en buen estado de *Z. prasina* (entiéndase, folíolos bien desarrollados, color verde intenso, sin indicio de amarillamiento, sin indicio de herbivoría y, abundante presencia de plántulas). Estas características son indicativas de que el ambiente es “adecuado” para el desarrollo de la especie. En estos ambientes tuvimos en cuenta la elevación, una valoración cualitativa de la abundancia de hojarasca en el suelo, la pedregosidad y cobertura del dosel. El análisis de estas variables fue netamente cualitativo basado en observaciones.

Como parte de este criterio, también realizamos un análisis de distribución potencial en el presente (1950-2000), mediante el método de modelado de nicho ecológico (ENM), para identificar la ubicación geográfica de los ambientes climáticamente favorables en la Península de Yucatán para el desarrollo de *Z. prasina*. La calibración del modelo se realizó con registros de presencia de la especie del portal Global Biodiversity Information Facility (GBIF, <http://data.gbif.org/species/browse/taxon/>) y para la validación se emplearon las referencias tomadas por nuestro grupo de trabajo. Para evitar incluir

lugares sobre-muestreados a través del área de distribución de la especie, los 103 registros se editaron para separarse al menos 20 km entre sí, usando el paquete spThin Aiello en R (R Core Team 2014) (Lammens *et al.*, 2015) y el análisis final se realizó con 43 referencias geográficas. Para construir el ENM se empleó el programa MAXENT 3.3.3 (Phillips *et al.*, 2006) y las variables de temperatura y precipitación del WorldClim Global Climate Data V. 1.4 (<http://www.worldclim.org/version1>) (Hijmans *et al.*, 2005) con una resolución de 30 arcsec (1 km²). Para reducir la redundancia entre variables, se consideraron aquellas variables con la contribución parcial más alta a los dos primeros componentes principales (explicando mayor porcentaje de la variación total) a partir de un análisis de componentes principales (ACP) y con correlaciones de rango de Spearman en pares inferiores a 0,8. Estos análisis se realizaron con el software JMP v13. De las 19 variables de WorldClim, solo se usaron las 11 variables con menor correlación: rango diurno medio de la temperatura (BIO2), isoterminia (BIO3), estacionalidad de la temperatura (BIO4), temperatura máxima del mes más cálido (BIO5), rango anual de temperatura (BIO7), temperatura media del cuarteto más frío (BIO11), precipitación anual (BIO12), estacionalidad de precipitación (BIO15), precipitación del cuarteto más seco (BIO17), precipitación del cuarteto más cálido (BIO18) y precipitación del cuarteto más frío (BIO19). El gráfico se generó en el programa ArMap ver 10.5.

2.2.3.2.3 C) Vulnerabilidad biológica intrínseca del taxón

Los estudios sobre la biología reproductiva de esta especie son prácticamente nulos. Para tener conocimiento acerca del ciclo de vida, posibles polinizadores y sus amenazas se consultó la ficha técnica de *Zamia polymorpha* aportada por la CONABIO (Vovides y Nicolalde-Morejón, 2010). Para tener información sobre la estructura demográfica de *Z. prasina* consultamos un estudio realizado en poblaciones de Quintana Roo (Poot y Martínez, 2014). Por último, para conocer sobre la diversidad y estructura genética de esta especie como aspectos importantes para la conservación, nos basamos en el estudio genético sobre *Z. prasina*, realizado en poblaciones de Yucatán y empleando seis marcadores microsatélites (Velasco, 2015).

2.2.3.2.4 D) Impacto de la actividad humana sobre el taxón en México

A partir de las 56 localidades mexicanas empleadas para el método MER se determinó qué porcentaje de éstas se encuentran distribuidas en diferentes tipos de vegetación, basándonos en los mapas de vegetación del INEGI (1999, 2015). Se empleó el programa ArGis versión 9.2. Se calculó el porcentaje de registros en cada formación vegetal y se compararon los valores de ambos años empleando la prueba de Student's (SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Criterios de la UICN

En la figura 2.1 se muestra el polígono de distribución que corresponde a la extensión de presencia de *Z. prasina*, el cual abarcó 168,970 km². La sumatoria del área que ocupan las localidades (área de ocupación) fue de 300 km². Considerando únicamente el criterio de extensión de presencia, *Z. prasina* no puede ser ubicada en ninguna de las tres categorías de amenaza de la UICN, ya que excede los valores mínimos para estar incluida (UICN ver 3.1, 2001), por lo que esta especie estaría en la categoría Preocupación Menor (LC). Por otro lado, considerando que el valor del área de ocupación (300 km²) es inferior a 500 km², la especie se ubicaría en la categoría En Peligro (EN). Aunque cada criterio indica que la especie debe incluirse en una categoría diferente, si nos basamos en lo planteado por la UICN (versión 3.1, 2001) "...un taxón está En Peligro cuando la mejor evidencia disponible indica que cumple cualquiera de los criterios "A" a "E"...", entonces *Z. prasina* debería ubicarse en la categoría En Peligro (EN), teniendo en cuenta el área de ocupación.

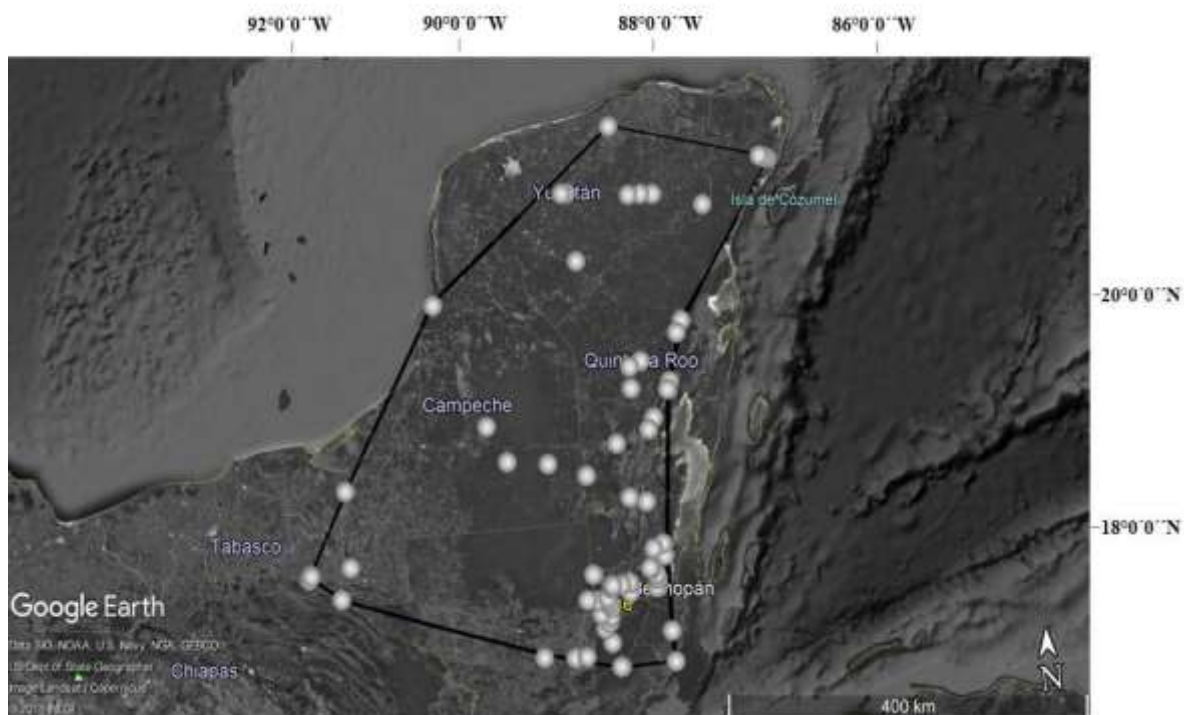


Figura 2.1 Polígono de distribución de *Zamia prasina*. El área al interior del polígono representa la extensión de la especie en toda su área de distribución. El área de ocupación corresponde a la sumatoria del área de las localidades representadas en puntos grises.

En cuanto al número de localidades, *Z. prasina* no se ubica en ninguna de las categorías de amenaza, ya que en nuestro estudio realizamos salidas de campo y visitamos 21 localidades en los estados de Yucatán, Campeche, Quintana Roo, Tabasco y Chiapas. Por tanto, tenemos la certeza de que al menos hay más de 10 localidades, lo cual hace que *Z. prasina* esté fuera de las 3 categorías de amenaza (UICN ver 3.1, 2001).

2.3.2 Evaluación MER

2.3.2.1 A) Amplitud de la distribución del taxón en México

De las 103 referencias compiladas de *Z. prasina*, 56 están ubicadas en México. El polígono de distribución que se forma con la unión de estas referencias geográficas abarca una extensión de presencia de 108, 655 km² (5.4% del territorio nacional) (Fig. 2.2). Como este valor se encuentra comprendido en el rango de 5 al 15 % del territorio

nacional (ca. 2 millones de km²), se le asignó un valor de riesgo = 3, que corresponde con la categoría Restringida.

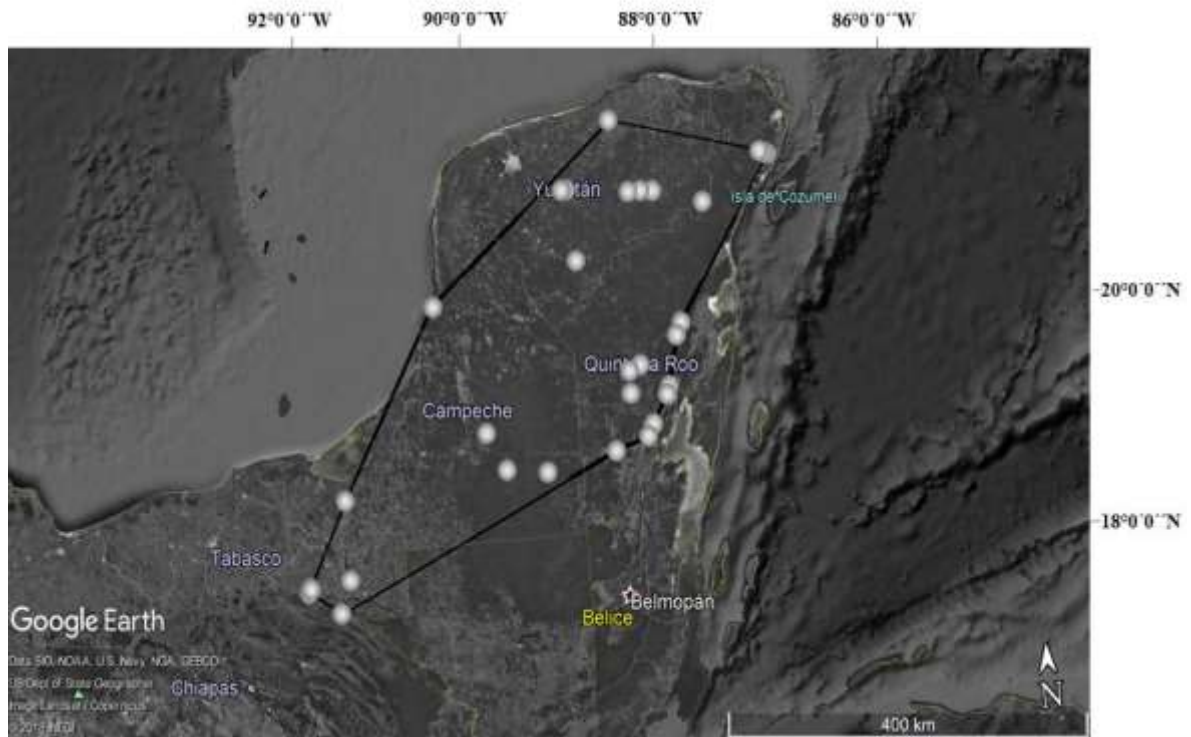


Figura 2.2 Polígono de distribución de *Zamia prasina*. El área al interior del polígono representa la extensión de la especie en la parte mexicana de la Península de Yucatán. El área de ocupación corresponde a la sumatoria del área de las poblaciones representadas en puntos grises.

2.3.2.2 B) Estado del hábitat con respecto al desarrollo natural del taxón

Debido al impacto humano histórico en la Península de Yucatán, parte de la vegetación natural ha sido alterada; sin embargo, aún quedan extensiones grandes de selvas medianas subcaducifolias y subperennifolias donde *Z. prasina* se puede encontrar sin dificultad (Vovides y Nicolalde- Morejón, 2010). Durante los recorridos de campo realizados, pudimos constatar que las áreas con ambientes adecuados para la especie (donde había mayor abundancia de plántulas, plantas con folíolos bien desarrollados, de color verde intenso, sin síntomas de amarillamiento) presentaban las siguientes características: suelo con alta pedregosidad, poca pendiente, dosel elevado con una

cobertura bastante densa. Los valores más bajos de elevación se registran en las localidades de Puerto Morelos y Bacalar (11 m) y los más elevados en las localidades de Oxkutzcab y Kaxil Kiuic (111 y 120 m, respectivamente). En las localidades de menor elevación, los individuos se encontraron más dispersos. En localidades de alto grado de antropización y, en donde prácticamente no había dosel, encontramos plantas de color amarillo y foliolos más estrechos. Ejemplo de esto son las localidades de Champotón y Palenque, en donde las plantas de *Z. prasina* se encontraron en una estación forestal y una finca de palma aceitera, respectivamente.

En cuanto a la distribución potencial de *Z. prasina*, las áreas climáticamente favorables concuerdan aproximadamente con la distribución geográfica actual de la especie. Con este resultado se corrobora la ausencia de *Z. prasina* en la costa oeste de la Península de Yucatán (en la selva baja caducifolia). El mapa de distribución potencial (Fig. 2.3) indica que en gran parte de la Península de Yucatán existen condiciones climáticas favorables para que se desarrolle la especie, lo cual explica el elevado número de localidades que hemos encontrado. En el centro y la costa este de la Península se ubican las áreas más favorables desde el punto de vista climático. Así, tomando en cuenta la alta presencia de áreas climáticamente favorables para el desarrollo de *Z. prasina*, la alta representatividad de áreas con condiciones adecuadas (pedregosidad, dosel, elevación, hojarasca) y el elevado número de localidades de *Z. prasina* encontradas en la península, consideramos que el hábitat no es limitante para su desarrollo, es por eso que a este criterio se le asignó un valor de riesgo = 1 (poco limitante).

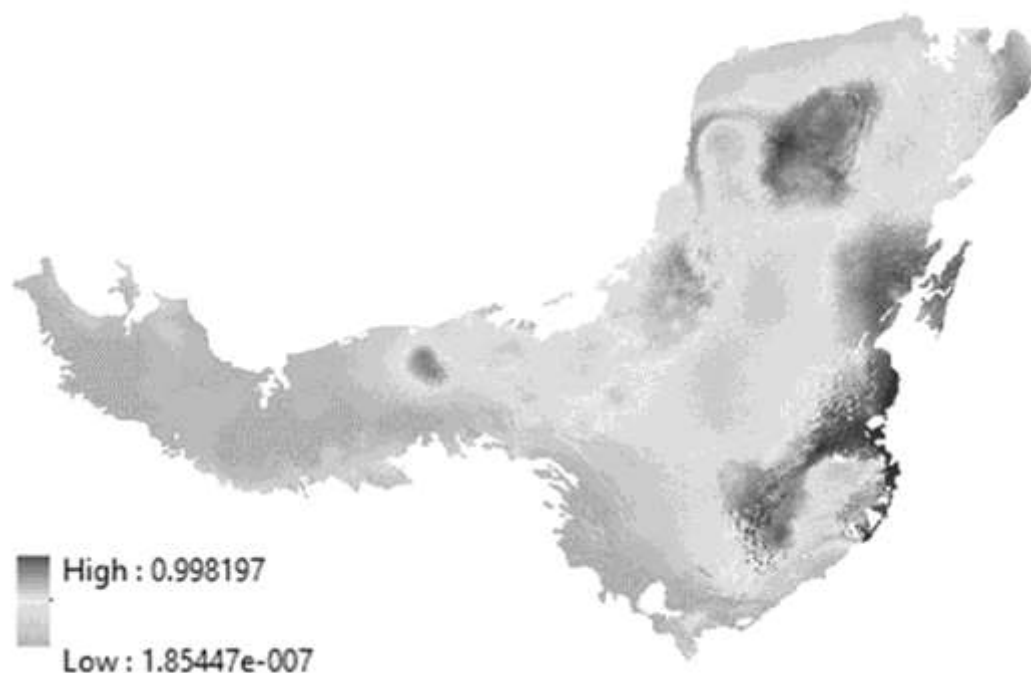


Figura 2.3 Distribución potencial de *Zamia prasina* en el presente (1950-2000) en la Península de Yucatán. Modelado en MAXENT.

2.3.2.3 C) Vulnerabilidad biológica intrínseca del taxón

Un hallazgo interesante fue que no se encontraron individuos adultos reproductores. De las 21 localidades que visitamos, solo vimos un individuo con conos (población Kaxil Kiuic). La mayoría de las plantas eran muy pequeñas (generalmente con un solo par de foliolos) o plantas de porte mediano sin indicios de haber tenido conos (Montalvo *et al.*, 2017). Según nuestras observaciones en campo, el tamaño de la planta no indica su madurez reproductiva, ya que en condiciones de crecimiento *ex situ* vimos plantas pequeñas con conos y semillas, mientras que otras de mayor talla no mostraron indicios de estructuras reproductivas. Esta ausencia de individuos reproductores podría deberse a que nuestros recorridos no coincidieron con la etapa reproductiva (no hay estudios fenológicos publicados de esta especie) y/o a que los conos maduros duran poco tiempo porque son devorados, posiblemente por aves y mamíferos pequeños. Es necesario llevar a cabo un muestreo mucho más periódico en varias localidades naturales de *Z. prasina* para conocer la verdadera situación de los individuos reproductores.

Aunque no existen estudios publicados sobre la biología reproductiva de *Z. prasina*, el grupo de especialistas de Cícadas (UICN/SSC) ha aportado información al respecto: a) la producción de conos en condiciones naturales es poca y se necesitan aproximadamente 12 meses para que los conos maduren y las semillas queden listas para ser dispersadas (Vovides y Nicolalde-Morejón, 2010); b) existe un desfase entre la polinización y la fecundación que puede tardar hasta cinco meses; c) al igual que otras especies de zamias, la polinización podría ser por insectos del orden *Rhopalotria*, cuyas larvas hibernan en el suelo y cuya sobrevivencia se ve afectada con los incendios (Vovides *et al.*, 1997), los cuales son bastante frecuentes en los lugares donde habita *Z. prasina*. Todas estas características hacen que *Z. prasina* sea una especie vulnerable; sin embargo, otras características de la planta le otorgan una alta capacidad de resiliencia que puede atenuar esta vulnerabilidad: a) un tallo subterráneo que facilita vivir en ambientes antropizados y que es capaz de regenerar después de incendios y prácticas intensas de ramoneo; b) hojas tóxicas, que limitan el daño causado por herbivoría; c) en condiciones de cultivo las plantas pueden producir conos y semillas sin la presencia de individuos machos, indicando con ello que, probablemente, muchas plantas sean agamospérmicas. Por todo lo anterior en el criterio de vulnerabilidad intrínseca se le asignó el valor 2 (vulnerabilidad media).

2.3.2.4 D) Impacto de la actividad humana sobre el taxón

El factor de riesgo que más afecta a las poblaciones de *Z. prasina* es el cambio de uso de suelo. Durante los recorridos de campo pudimos detectar varias incidencias que atentan contra la supervivencia de esta especie, como son la eliminación de malezas en fincas forestales, el monocultivo de maíz (*Zea mays* L. subsp. *mays*) y el establecimiento de fincas de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) (Montalvo *et al.*, 2017). Todas estas prácticas de manejo, implican la eliminación de la parte aérea de la planta, lo cual retrasa su ciclo de vida, pues le toma mucho más tiempo en ser adulta y producir frutos y semillas. Sin embargo, como se señaló previamente, la existencia de un tallo subterráneo le confiere a *Z. prasina* una alta capacidad de resiliencia, por lo que no se compromete mucho el número de individuos y poblaciones.

La figura 2.4 muestra el porcentaje de localidades de *Z. prasina* que se encuentran en los diferentes tipos de vegetación, según el INEGI. Para ambos años de registro (2009 y

2015) se encontró el menor número de localidades en la selva mediana subperennifolia (bosque tropical subperennifolio según Rzedowskii, 2006), hábitat que se considera es el más conservado. Al comparar los dos años de registro, no encontramos cambios en cuanto al número de localidades en la selva mediana subperennifolia, plantaciones de agricultura anual y en las localidades cercanas a zonas urbanas. Sin embargo, en el 2009, la vegetación secundaria arbustiva era mayor que la vegetación arbórea y en el 2015 hubo un incremento del número de localidades donde hay vegetación secundaria arbórea con respecto a la arbustiva, lo que sugiere un proceso de sucesión natural exitoso. Si a estos resultados le sumamos la alta presencia de áreas con clima favorable que existe en la Península de Yucatán para el desarrollo de *Z. prasina*, entonces el riesgo de extinción por el impacto de la actividad humana recibe un valor de riesgo =3 (impacto medio).

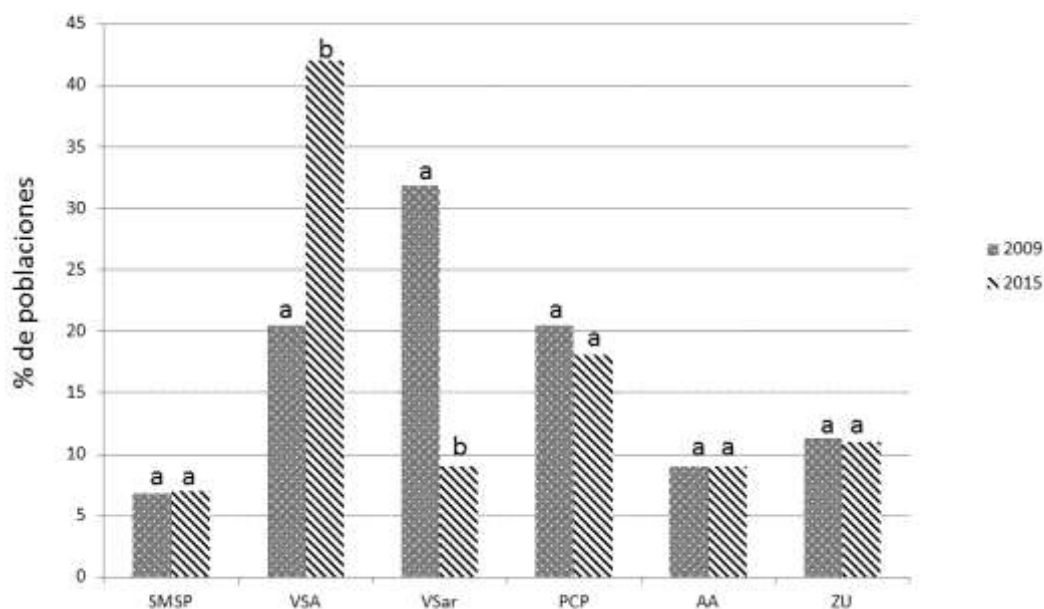


Figura 2.4 Porcentaje de localidades *Z. prasina* presentes en los diferentes tipos de vegetación según el INEGI (2009 y 2015). SMSP= selva mediana subperennifolia, VSA= vegetación secundaria arbórea, VSar= vegetación secundaria arbustiva, PCP= pastizal cultivado permanente, AA= plantaciones de agricultura anual, ZU= zona urbana. Letras diferentes difieren estadísticamente según la prueba T de students con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$

En resumen, de acuerdo a la evaluación de los cuatro criterios del MER, la sumatoria obtenida fue de 9 puntos (A=3, B= 2, C= 1, D=3), lo cual indica que *Z. prasina* debe estar en la categoría Protección Especial en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT.

2.4 DISCUSIÓN

Considerando que *Z. prasina* tiene una distribución natural que excede los límites del territorio mexicano, el método de evaluación basado en los criterios de la UICN aporta ventajas comparado con el método de evaluación MER. La principal ventaja radica en que para determinar la extensión de presencia y área de ocupación se toman en cuenta todas las localidades reportadas en el área de distribución natural de *Z. prasina*. Con ello, la

evaluación tiene una mayor robustez, mientras que usando el método MER solo se toma en cuenta las localidades en el territorio mexicano. Incluso, después de acciones de conservación para medir el grado de recuperación de una especie, la UICN plantea que para cuantificar la recuperación geográficamente, se debe considerar el área total del rango de distribución de la especie (Resik *et al.*, 2018).

Es importante señalar que del departamento del Petén (Guatemala) solo tenemos una referencia geográfica; sin embargo, expertos del Herbario BIGU de Guatemala aseguran que *Z. prasina* se distribuye más al sur del Petén, en los departamentos Izabal y Alta Verapaz (Veliz, com pers) de donde no tenemos referencias. Si se incrementa el número de localidades en Guatemala o en el resto de la distribución natural de la especie, aumentaría el área de ocupación de la especie y la extensión de presencia, aunque esto no necesariamente sería indicativo de menor categoría de amenaza.

Si tenemos en cuenta que, según la UICN ver 3.1 (2001) "...un taxón está En Peligro, y se considera que se está enfrentando a un riesgo de extinción muy alto en estado de vida silvestre, cuando la mejor evidencia disponible indica que cumple cualquiera de los criterios (A a E) para la categoría En Peligro...", *Z. prasina* estaría incluida en esta categoría.

Los resultados obtenidos sobre el hábitat donde se desarrolla *Z. prasina* concuerdan con lo reportado por Poot y Martínez (2014). Estos autores realizaron un estudio de poblaciones de *Z. prasina* en Quintana Roo, encontrando que la especie puede vivir en suelos con alta pedregosidad. En un estudio sobre la influencia del ambiente sobre la morfología de *Z. prasina*, Limón *et al.* (2016) plantean que esta especie habita bajo el dosel denso en el bosque tropical subcaducifolio y perennifolio, por lo que los folíolos anchos pueden ser una adaptación para facilitar la evapotranspiración y la captación de luz bajo condiciones de sombra. En el estudio determinamos que la presencia de lugares adecuados para el desarrollo de *Z. prasina* son frecuentes, por lo que la calidad del hábitat para los requerimientos del taxón no es una limitante.

Los resultados de distribución potencial muestran que las áreas climáticamente favorables para *Z. prasina* abarcan casi toda la Península de Yucatán, fundamentalmente en la franja centro-oeste donde predomina el bosque tropical subcaducifolio y en el este

de la Península donde abunda el bosque tropical subperennifolio. En algunas zonas, como la Meseta de Zho Laguna, en el centro de la Península de Yucatán, el modelado de nicho no arroja condiciones climáticas adecuadas para el desarrollo de la especie. Sin embargo, existen colectas de *Z. prasina* en esta zona (Carnevali com pers). Esto puede deberse a un insuficiente esfuerzo de muestreo en esa zona y que para realizar el modelado de nicho fue necesario añadir más registros para tener una distribución potencial más cercana a la distribución real de la especie.

Un aspecto que muchas veces no se toma en cuenta en las evaluaciones de riesgo de extinción de especies silvestres es su diversidad genética. Velasco (2015) estudiaron seis poblaciones de *Z. prasina* distribuidas en Campeche, Quintana Roo, Yucatán, Chiapas, Tabasco y Belice, usando 10 loci de microsatélites. Estos autores reportaron un 90% de loci polimórficos, niveles medios de diversidad genética ($H_E = 0.43$) y un déficit de heterocigotos para las seis poblaciones estudiadas. Este déficit de heterocigóticos puede deberse a factores antropogénicos como el cambio de uso de suelo que traen consigo efectos de fragmentación, o por cuestiones intrínsecas de la especie como un sistema de dispersión deficiente que limita el flujo genético entre las poblaciones. Otro factor que promueve el déficit de heterocigóticos es la endogamia debido a cruzamientos entre individuos emparentados y la posible agamospermia. Los resultados reportados por Velasco (2015) deben ser tomados con precaución ya que pueden estar sesgados por el tamaño pequeño de muestra (6 poblaciones, 10 loci), por lo que es recomendable confirmar esta diversidad genética baja de *Z. prasina* realizando un muestreo más exhaustivo, tanto poblacional como genómico, antes de señalar la existencia de una vulnerabilidad genética de la especie.

La gran cantidad de individuos de *Z. prasina* con tamaño pequeño que encontramos durante nuestros viajes de colecta concuerda con lo reportado por Poot y Martínez (2014). Estos autores determinaron la densidad poblacional por categoría de tamaño (0-25 cm, 26-50 cm, > 50 cm), encontrando que la mayor densidad de plantas de *Z. prasina* se obtuvo en la categoría 0- 25 cm (60 individuos /ha y 80 individuos por ha, para dos poblaciones). La menor densidad se encontró en la categoría > 50 cm (19 individuos /ha y 25 individuos/ha en las mismas dos poblaciones). Este resultado puede estar relacionado con los diferentes manejos que se realizan en las áreas donde se encuentra esta especie

(Montalvo *et al.*, 2017). Un estudio demográfico exhaustivo sería muy útil para dar más luz sobre el riesgo de extinción de la especie. Sin embargo, para *Z. prasina* es difícil establecer las diferentes categorías demográficas. En muchas especies, la talla del individuo permite saber si son juveniles o adultos, pero los individuos de *Z. prasina* de mayor altura no necesariamente son reproductores, esto solo podría saberse si se observan los conos. La edad de *Z. prasina* podría estar más relacionada con el tamaño del cormo, pero no hay ningún estudio que demuestre la correlación entre estas dos medidas.

En conclusión, podemos decir que *Z. prasina* es una especie con una amplia distribución en toda la Provincia Biótica Península de Yucatán y, aunque esta región ha sido fuertemente impactada históricamente por el hombre, afectando sus áreas naturales, aún existen lugares idóneos para el desarrollo de esta especie, por lo que el número de localidades es elevado. *Zamia prasina* puede sobrevivir en zonas con cierto grado de perturbación, por su alta capacidad de resiliencia. Además, en la Península de Yucatán existen áreas climáticamente favorables para el desarrollo de esta especie, corroborado por el gran número de localidades reportadas. A pesar de todos estos aspectos favorables, los criterios de distribución de la especie, según la UICN, la ubican en la categoría En Peligro (EN), por tener un área de ocupación inferior a 500 km²; sin embargo aún falta por evaluar otros criterios referentes a los tamaños poblacionales, individuos reproductores y posibles reducciones poblaciones para poder proponer un cambio de categoría. Es importante además la actualización continua de las referencias geográficas y hacer uso de las de las colecciones botánicas ya que generan información útil a considerar en las categorías de conservación.

Las reglas para realizar transferencias de una categoría a otra (UICN ver 3.1, 2001) plantean que un taxón puede ser transferido de una categoría de amenaza mayor a una categoría de amenaza menor, si ninguno de los criterios de la categoría más alta se ha cumplido en 5 años o más. Es decir, que sería necesario realizar un estudio de evaluación por un periodo de tiempo mayor e incluir los demás criterios mencionados anteriormente. Nuestro estudio sería el punto de partida para realizar las posteriores evaluaciones y comparaciones. Es importante recordar que, un aspecto que debe ser atendido con especial atención, es el número de individuos reproductores; ya que, si en las futuras

evaluaciones se mantiene la ausencia de los mismos, esto sería una condición suficiente para mantener a *Z. prasina* en la categoría “En Peligro Crítico”.

Aunque la categoría de amenaza no es necesariamente suficiente para determinar prioridades para llevar a cabo acciones de conservación, es útil porque ofrece una evaluación de la probabilidad de extinción en las circunstancias actuales de un taxón en particular. La adecuada ubicación de una especie en dichas categorías nos permite gestionar de forma eficiente los esfuerzos y recursos para posibles acciones de conservación.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-México por la beca otorgada para sus estudios de posgrado. Los autores agradecen al Dr. Michael Calonje por su apoyo en la compilación de sitios de referencia de *Zamia prasina*, a la Dra. Celene Espadas por su colaboración en los resultados del criterio D del MER y a Paulino Simá Polanco por su apoyo técnico en el campo.

CAPÍTULO III

IMPACT OF LATE PLEISTOCENE-HOLOCENE CLIMATIC FLUCTUATIONS ON THE PHYLOGEOGRAPHIC STRUCTURE AND HISTORICAL DEMOGRAPHY OF *Zamia prasina* (CYCADALES: ZAMIACEAE).

IMPACTO DE LAS FLUCTUACIONES CLIMÁTICAS DEL PLEISTOCENO TARDÍO-HOLOCENO SOBRE LA ESTRUCTURA FILOGEOGRÁFICA Y DEMOGRAFÍA HISTÓRICA DE *Zamia prasina* (CYCADALES: ZAMIACEAE).

Grecia Montalvo-Fernández¹, Lorenzo Felipe Sánchez-Teyer¹, Germán Carnevali Fernández-Concha^{1, 2}, Andrew P. Vovides³, Ricardo Gaytán-Legaria⁴, Matilde Margarita Ortiz-García¹, Jaime Alejandro Muñoz-López¹, and Jaime Martínez-Castillo^{1*}

¹ Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C, Mérida, Yucatán, México.

² Orchid Herbarium of Oakes Ames, Harvard University Herbaria, Cambridge, Massachusetts, United States of America.

³ Instituto de Ecología, A.C., Xalapa, Veracruz, México.

⁴ Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad (UNAM), Morelia, Michoacán, México.

***Author for correspondence:** jmartinez@cicy.mx

Este artículo fue publicado en la revista Botanical Science

Vol 97 No 4 (2019): 588-608.

ABSTRACT

Glacial periods during the Pleistocene have been hypothesized to have greatly influenced geographical patterns of genetic structure and demography of many tropical species. The Glacial Refugium Hypothesis proposes that, during cold, dry glacial periods, populations of moisture-affinities tropical species were restricted to sheltered, humid areas and that, during warmer and more humid interglacial periods, these populations expanded. Some mountain regions in the tropics acted as refugia during the cold, dry periods of the Pleistocene for several temperate forest taxa, which recolonized the humid areas farther north during the interglacial periods. Our questions were (1) Did Late Pleistocene-Holocene climate changes affect the historical demography of *Zamia prasina*? (2) Does the historical distribution of *Z. prasina* agree with the Glacial Refugium Hypothesis? Five individuals were collected in 23 populations and characterized using two DNA regions: plastid *atpF-atpH*, and nuclear ITS2. Genetic diversity, phylogeographic structure, historical demography, and potential distributions were assessed. Our results showed moderately high genetic diversity and low, but significant, phylogeographic structure. Two genetic groups were identified, one in the eastern part of the peninsula, the other in the western. The changes in historical demography suggest that *Z. prasina* experienced a population expansion following the warm conditions of the Holocene. The population dynamics of *Zamia prasina* are in accordance with the Glacial Refugium Hypothesis.

Key words: Cycads, demography expansion, diversity and genetic differentiation, glacial refugium hypothesis, Yucatan Peninsula Biotic Province (YPBP).

3.1INTRODUCCTION

Throughout the Pleistocene (≈ 2.5 Ma), extended blankets of glacial ice covered the highest latitudinal zones of the planet, giving rise to glacial periods, which alternated with interglacial periods, when these areas were partially free of ice (Svensson *et al.* 2005). The glaciation period had a greater impact on the northern hemisphere biota than on the southern hemisphere given that the large land masses very close to the Arctic could channel the glaciers toward the south, whereas an ocean separated the Antarctic from the southern continents (Svensson *et al.* 2005). The glacial periods of the Pleistocene also greatly influenced the geographic distribution, the genetic structure and demography of tropical species (Stewart *et al.* 2010, Ramírez-Barahona & Eguiarte 2013). Some the mountain regions located in the tropics acted as areas of refugium during the cold, dry periods of the Pleistocene for several temperate forest taxa, which recolonized the humid areas farther north during the interglacial periods (Ramírez-Barahona & Eguiarte 2013). These Neotropical refugia might have remained continuously humid, while the savannahs and dry tropical forests expanded, leaving populations featuring high genetic structure in different areas of refugium (Haffer, 1969; Graham, 1973; Toledo 1982; Myers, 1982; Pennington *et al.*, 2000). The Holocene was also a period of climatic fluctuations. The Holocene Climate Optimum (9-5 Ka) was a warm period; the global climate was most likely between 0.5-3 °C warmer than it is today. Then the temperatures decreased progressively with cyclic heating / cooling periods until now (Walker *et al.*, 2012).

Tropical forests and their biota have a complex evolutionary history (Ornelas *et al.* 2013); for example, *Dioon edule* (Zamiaceae) (González-Astorga *et al.*, 2003) and *Zamia paucijuga* (Zamiaceae) (Nolasco-Soto *et al.*, 2015) experienced demography changes in their populations influenced by the Pleistocene glaciations. Historic demography changes in plant species could be consistent with either the Glacial Refugium Hypothesis (GRH), which propose that populations contracted to one or more southerly refugia during the cold-dry glacial and expanded out from them in warm-humidity interglacials. This hypothesis is widely accepted for temperate species such as subtropical columnar cacti in the mid latitudes of the Northern Hemisphere (Soltis *et al.*, 2006). In contrast, the Interglacial Refugium Hypothesis (IRH) suggests that in the intertropical open dry vegetation of South America (Caatinga, Cerrado and Chaco biomes), populations of some

species contracted to warm and humid refugia during the interglacials and expanded outward under the cold/dry climate of the Ultimate Glacial Maximum (LGM) (≈ 80 Ka) (Cornejo-Romero *et al.*, 2017). Several authors have proposed a refugium theory as the underlying model for glacial and postglacial population dynamics of tropical species during the LGM (Farrera *et al.*, 1999, Ramírez-Barahona & Eguiarte, 2013, Cornejo-Romero *et al.*, 2017).

The degree of aridity in the tropics generated by the reduced precipitation during the LGM and its influence on the distribution of the Neotropical forests have been controversial topics (Ramírez-Barahona & Eguiarte 2013). In one of the pioneer publications on the impact of the glaciations of the Pleistocene in the Neotropics, Van der Hammen (1961) postulated two opposing hypotheses: (1) During the glaciations, the lower temperatures generated a reduction in precipitation and, consequently, an increase in aridity in the Neotropics. (2) The cold phases of the glaciations were accompanied by an increase in precipitation, and the warm phases were much drier; therefore, the glaciations did not lead to a reduction in the precipitation and did not significantly affect the continuous and stable distribution of the tropical rainforests (Farrera *et al.*, 1999). However, the information available to date has been based largely on limited and conflicting paleoecological data (Ramírez-Barahona & Eguiarte, 2013). In general, the existing records indicate greater tropical aridity, with low lake levels in regions such as tropical Africa (Caballero *et al.*, 1999). These records have been interpreted as an indication that, during the LMG, climates were drier (Kutzbach *et al.* 1993). In the Trans-Mexican Volcanic Belt, several records of the internal basins suggest greater aridity (Lozano-García *et al.* 2005, Caballero *et al.*, 2010), while west-central Mexico have been proposed to have had relatively humid conditions (Bush *et al.*, 2009, Bradbury, 2000).

During the Last Interglacial periods (120 Ka), the climate of the YBPB became warmer and more humid (Metcalfe *et al.*, 2000). During most of the LGM, the climate of the YBPB was dry, and the temperature was approximately 6 °C colder than at present. Savannahs and scrublands covered most of the region up to the Early Holocene (10 Ka) (Orellana *et al.* 2003). In an analysis of Holocene fossil pollen samples from the YBPB, to reconstruct the vegetation and to develop a precipitation record for the last 7,900 years, a gradual

increase in precipitation and expansion of the tropical forest during the Middle Holocene was shown (Vela-Pelaez *et al.*, 2018).

Zamia prasina W. Bull. (Zamiaceae), distributed in the tropical rainforests of the central and southeast areas of the YBPB, is the only cycad native to this region. According to the International Union for the Conservation of Nature (IUCN), it is severely threatened (Vovides & Nicolalde-Morejón, 2010). The populations of *Z. prasina* almost certainly were affected by the climate changes of the Pleistocene, which have been proposed as the driving force of the diversification in cycads (Nagalingum *et al.*, 2011). The cycads are a species group with a long evolutionary history originating in the late Permian (Rull, 2012). However, molecular data indicate that current species had a more recent origin (Late Miocene, $\approx 10-5$ Ma) (Nagalingum *et al.*, 2011). The almost simultaneous initiation of the diversification of six of the living genera of the cycads (in Australia, Africa, South-east Asia and tropical South America) suggests a single promotor may have been responsible for their diversification and that event may have been global climate change (Nagalingum *et al.* 2011). The climate fluctuations during the Pleistocene significantly influenced the current distribution of the cycads (González & Vovides, 2002) and that, for the cycads of Mexico, the refugium areas of the LGM were fundamental in the definition of their phylogeographic dynamics (Contreras-Medina & Luna-Vega, 2002). Consequently, we sought to determine whether the Late Pleistocene-Holocene (80 Ka-10 Ka) climate changes affected the historical demography of *Zamia prasina* and whether the historical distribution of *Zamia prasina* fits with the scenario proposed by the glacial refugium hypothesis. Thus, if this species underwent a contraction during the glaciations (LGM), then we would expect a reduction in the environmentally suitable area and in the effective size of the population during the LGM. Conversely, the effective size of the population and suitable area would increase during an interglacial period. To answer these questions, we used a phylogeographic approach, Bayesian analysis, and niche model. This study represents one of the first phylogeographic studies in the YBPB. We addressed the following objectives: (1) to determine the genetic diversity and phylogeographic structure of *Z. prasina*, (2) to evaluate the influence of the climate changes during the Late Pleistocene-Holocene on the historical demography of *Z. prasina* and (3) to determine whether the climate changes of the Late Pleistocene-Holocene modified the potential distribution range of *Z. prasina*.

3.2 MATERIALS AND METHODS

3.2.1 Study area, populations and samples

This study was conducted in the Yucatan Peninsula Biotic Province (YPBP), which includes the Mexican states of Campeche, Quintana Roo, Yucatan and part of the states of Tabasco and Chiapas, northern districts of Belize (Orange Walk, Corozal, and Belize) and the department of Peten in Guatemala (Carnevali *et al.*, 2010). The selection of populations sampled was based on information obtained from Herbarium CICY and from previous studies, Velasco (2015). Herbarium vouchers for each population were deposited at Herbarium CICY. We collected samples from 21 natural populations of *Z. prasina* in the Mexican part of the YPBP and five samples from two populations in Belize (two in Cayo District and three in Belize District) that were donated by Michael Calonje (Montgomery Botanical Center) (Fig. 3.1, Table 3.1). It was not possible to obtain samples of *Z. prasina* from Guatemala; therefore, any reference to the YPBP here does not include Guatemala.

Table 3.1. Population, Number of individuals for population (N), latitude, longitude and respective haplotypes for populations of *Zamia prasina* studied.

	Population	N	N. Latitude	W. Longitude	Haplotype <i>atpF-atpH</i>	Haplotype ITS2
1	Valladolid	5	20.633342	-88.343722	A1	H1, H2
2	Peto	4	20.125567	-88.980083	A1, A2	H1
3	Becanchén	5	20.065992	-89.104694	A1, A2	H1, H3, H4, H5
4	Rancho Duarte	4	20.028056	-89.169531	A1, A2	H1, H3
5	Kaxil Kiuic	3	20.086944	-89.551528	A3	H1, H6
6	Champotón	5	19.04675	-90.405556	A1	H1, H3
7	Calakmul	5	18.409306	-89.899444	A1	H1, H10

8	Escárcega	5	18.617028	-90.850889	A1	H1, H3, H7
9	Hormiguero	3	18.359667	-89.491722	A1, A3, A7	H8
10	Virgensita	5	18.266389	-91.554	A3, A4, A5, A6	H6
11	Tenosique	5	17.591472	-91.554	A1	H1, H3, H9
12	Palenque	5	17.539278	-91.959889	A1	H1, H3, H7
13	Puerto Morelos	5	20.862083	-87.035139	A3	H1, H3
14	Cobá	5	20.499972	-87.711806	A1, A3	H1, H3
15	Carrillo Puerto	4	19.501583	-88.034056	A1, A3	H3, H12, H13, H14
16	Xhazil	5	19.400417	-88.092278	A1, A3	H3, H8
17	José María Morelos	5	19.140333	-88.594694	A1, A3	H3, H8, H15, H16, H17
18	Pedro A.Santos	5	18.950778	-88.178833	A3, A8	H3, H8
19	Bacalar	5	18.913278	-88.2325	A3	-----
20	Panto-Ha	5	18.578861	-88.454167	A1, A3	H8, H11, H12
21	Nachicocom	4	18.481778	-88.787833	A1, A3	H8, H12
22	Belize- Belize	2	16.998917	-89.071533	A1, A3	H12, H18
23	Belice-Cayo	3	17.302667	-88.488167	A1, A9	H12

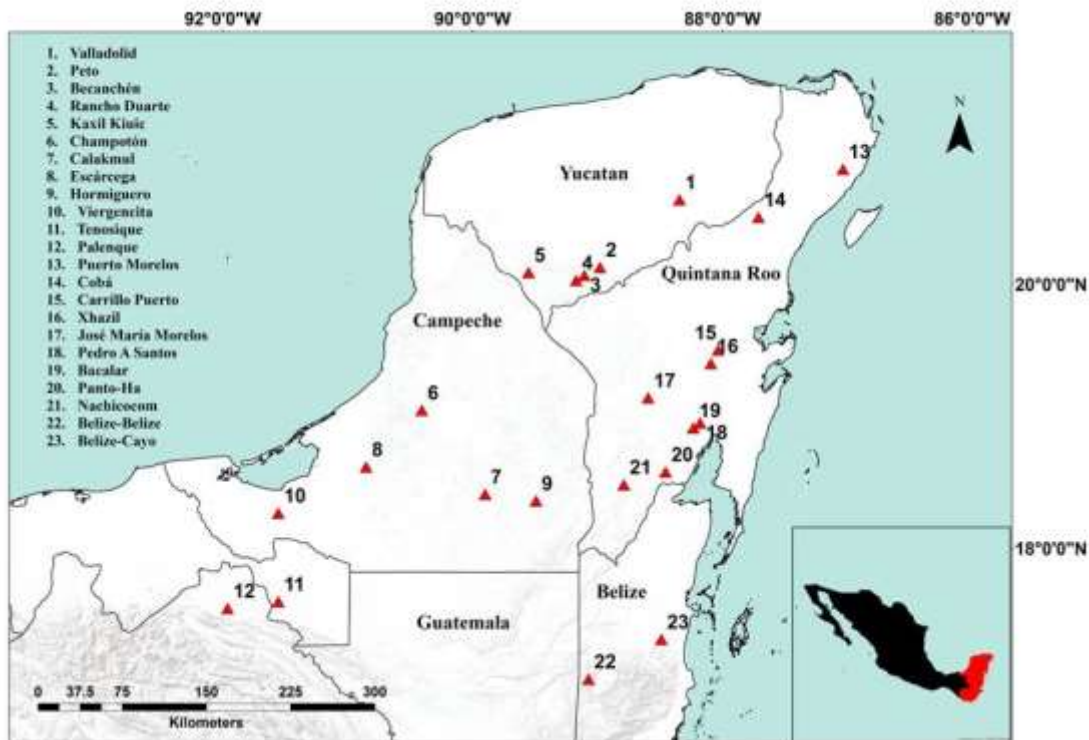


Figure 3.1 Location of the 23 populations of *Zamia prasina* sampled in the Yucatan Peninsula Biotic Province (YPBP). Biotic Province (YPBP). 1: Valladolid, 2: Peto, 3: Becanchén, 4: Rancho Duarte, 5: Kaxil Kiuc, 6: Champotón, 7: Calakmul, 8: Escárcega, 9: Hormiguero, 10: Virgensita, 11: Tenosique, 12: Palenque, 13: Puerto Morelos, 14: Cobá, 15: Carrillo Puerto, 16: Xhazil, 17: José María Morelos, 18: Pedro A Santos, 19: Bacalar, 20: Panto-Ha, 21: Nachicocom, 22: Belize-Belize, 23: Belize-Cayo.

3.2.2 DNA extraction, amplification and sequencing

DNA was extracted from individuals from each population, using the CTAB protocol (Doyle *et al.*, 1987). We amplified the chloroplast intergenic region *atpF-atpH* and nuclear region ITS2 selected by Nicolalde-Morejón *et al.* (2011) using the methods of Lahaye *et al.* (2008) and Baldwin (1992), respectively. These markers were previously used in genetic studies of the genus *Zamia*. The amplified products were visualized in 1 % agarose, and 110 samples for chloroplast and nuclear regions were sent to in Macrogen 2018 for unidirectional sequencing using the forward primer and Sanger sequencing. The sequences were edited in Sequencher v. 5 (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI, USA) and

aligned in the software PhyDE® (Müller *et al.*, 2010) with the multiple alignment tool Muscle, then they were examined manually. For our ITS2 data set, we confirmed that multiple copies were not present for the following reasons: (1) all sequences had a GC content > 65 %, (2) all BLAST results coincided with the number of base pairs for ITS2 sequences for *Zamia* in GenBank, (3) conserved regions were homologous to ITS2 sequences from *Zamia* in GenBank, and (4) a few nucleotides differed between our sequences and those in GenBank.

3.2.3 Genetic diversity and phylogeographic structure

The number of haplotypes (k) and nucleotide and haplotype diversities (π and h , respectively) were determined using the DnaSP v.5.10 (Librado y Rozas, 2009); indels were not considered. The genetic diversity was determined for each DNA region, population, population groups (based on genetic differences) and specie (all populations). The genetic structure was determined by means of a non-hierarchical molecular analysis of variance (AMOVA) with 1000 permutations, using paired genetic differences with the program Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005). To infer the phylogeographic structure, the relationship of N_{ST}/G_{ST} was calculated. Both are estimators of genetic structure; N_{ST} considers the nucleotide differences among the haplotypes, whereas G_{ST} is based on the number of haplotypes and their frequency. The statistical analysis was performed in the PERMUT 2.0 program (Pons & Petit 1996) with 1000 permutations where, if 5 % of the permuted values are lower than the N_{ST} observed, then $N_{ST} > G_{ST}$, thereby indicating phylogeographic structure. The relationships among the haplotypes were determined through haplotype networks using the TCS network algorithm in the PopArt 1.7 program (Clement *et al.* 2002). This network shows the relationship among the haplotypes and the number of mutational steps separating them. In addition, the geographic distribution of the haplotypes was represented on a map to graphically record the aggregation of the haplotypes.

To confirm the existence of population groups genetically differentiated, an analysis was conducted to detect the geographical location of genetic discontinuities among the populations using Monmonier's maximum difference algorithm implemented in the program BARRIER (Manni *et al.* 2004). From the pairwise genetic distances obtained in Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.* 2005), BARRIER identifies the edges where there are greater

genetic distances. For obtaining confidence levels for the barriers, 100 replicas of the genetic distance matrix were calculated using Program R ver 4.3.2.

To explore the influence of climatic variables on the genetic structure, a principal component analysis (PCA) was carried out using data for 19 environmental variables, derived from temperature and precipitation, obtained from WorldClim Global Climate Data V. 1.4 (<http://www.worldclim.org/version1>) (Hijmans *et al.* 2005) with a resolution of 1 km². Any environmental variables with a Spearman's rank correlation higher than 0.8 between them were not used. A final set of 11 environmental variables was extracted for the 23 populations of our study (Appendix 2.1): Mean Diurnal Range (Mean of monthly (max temp - min temp)) (BIO2), Isothermality (BIO3), Temperature Seasonality (BIO4), Max Temperature of Warmest Month (BIO5), Temperature Annual Range (BIO7), Mean Temperature of Coldest Quarter (BIO11), Annual Precipitation (BIO12), Precipitation Seasonality (BIO15), Precipitation of Driest Quarter (BIO17), Precipitation of Warmest Quarter (BIO18) and Precipitation of Coldest Quarter (BIO19). Past software version 3 was used (Hammer *et al.* 2001).

3.2.4 Estimate of divergence times

The time of divergence for intraspecific diversification of *Zamia prasina* and a possible relationship with pre-Pleistocene and Pleistocene events was estimated using Bayesian inference (BI) implemented by the program BEAST 2 (Bouckaert *et al.* 2014). The model of sequence evolution HKY+G was employed for both regions according to the results of the AIC model selection from jMODELTEST (Posada 2008). An uncorrelated relaxed clock Log Normal model (UCLD) and a coalescent model assuming constant size were used to model the tree prior. The tree was calibrated using the 95 % highest posterior density (HPD) age reported by Calonje *et al.* (2019). Prior distributions for all calibrated nodes were conservatively set to uniform using the minimum and maximum age bounds outlined below.

The age intervals for divergence between *Microcycas calocoma* and *Zamia* genus was used for the tree root node (33 to 84.5 Ma) (I), the crown node of *Zamia* (9 to 22.1 Ma) (II). Divergence between *Zamia prasina* and *Zamia variegata* Warsz. (0 to 0.82 Ma) (III) and the divergence between the clades formed by *Z. prasina* plus *Z. variegata* and the clade *Z.*

spartea Ac.DC. plus *Z. furfuracea* Aiton plus *Z. loddiguesii* Miq. (0.51 to 1.53 Ma) (III). Twelve species (i.e., *Microcycas calocoma*, *Zamia variegata*, *Z. furfuracea*, *Z. paucijuga*, *Z. loddigesii*, *Z. spartea*, *Z. lacandona*, *Z. pseudoparasitica*, *Z. manicata*, *Z. inermis*, *Z. soconuscensis*, *Z. fischeri*, were chosen as outgroups.

For divergence time estimations, Markov chain Monte Carlo (MCMC) were run for three independent 50 million generations, sampling every 5,000 generations. BI analyses were run using the CIPRES Science Gateway (Miller *et al.* 2010). We combined the log and trees files from each independent run using LOGCOMBINER 1.8.0 (Drummond & Rambaut 2007), then viewed the combined log file in TRACER 1.6 to ensure that effective sample sizes for all priors and the posterior distribution were > 200 , making sure that parameter values were fluctuating at stable levels. Based on these results, the first 5,000 trees were discarded as burn-in, and the remaining samples were summarized as a maximum clade credibility tree with mean divergence times and 95 % highest posterior density (HPD) intervals of age estimates in TREEANNOTATOR. Finally, these results were summarized in a single tree visualized in FIGTREE ver 1.3.1 (Rambaut 2009).

3.2.5 Historical demography

The demography processes were analyzed at two levels: (1) species and (2) population groups. Three types of analyses were carried out. (1) Tajima's D (Tajima 1989) and Fu's F_S (Fu 1997): neutrality tests were used to detect departures from a constant population size under the neutral model. Population growth was indicated by significant negative values ($p < 0.05$) using Arlequin with 10,000 permutations. (2) Mismatch distribution of pairwise nucleotide differences (Rogers & Harpending 1992) was calculated and compared with expected values for an expanding population using the Ramos-Onsins & Rozas (2010) R_2 statistic. This statistic considers the sample size, the number of singleton mutations in a sequence, the average number of nucleotide differences between two sequences, and the total number of segregating sites. Lower values of R_2 (< 0.05) are expected under a recent population growth event (Ramos-Onsins & Rozas 2010). A unimodal type graph shifted to the left indicates many comparisons where the differences between pairs of sequences are small, suggesting a recent expansion in the populations this was carried out in the program program DnaSP 5.10 (Librado y Rozas 2009) with 10,000 permutations. (3) Bayesian skyline plot (Drummond y Rambaut, 2007) to infer the

changes of the effective population size over time, allowing the use of mutation models and independent replacement rates for each region of DNA. The model HKY+G was used for both DNA regions, with a strict molecular clock model and coalescent model. This analysis was performed at three levels: 1) each DNA region, 2) species and, 3) populations groups. The number of substitutions per site per year (s/s/y) for *atpF-atpH* was 0.00056 and 0.00181 for ITS2 and were used to date the crown radiation of *Zamia paucijuga* (Nolasco-Soto *et al.* 2015), also published by Nagalingum *et al.* (2011) for the crown-age of *Zamia* spp. Thirty million permutations (MCMC) were carried out, and trees were collected every 3,000 generations, using the program BEAST ver 1.8.0. Outputs were visualized with TRACER ver 1.6 to assess stationarity of the MCMC (effective sample sizes > 200).

3.2.6 Potential distribution

The ecological niche of *Zamia prasina* was modeled based on 80 occurrences obtained from the Global Biodiversity Information Facility (GBIF, <http://data.gbif.org/species/browse/taxon/>) and 103 occurrences compiled from fieldwork. Duplicates occurrences and occurrences with a distance < 20 km among them were removed using the package spThin (Lammens *et al.*, 2015) to reduce overfitting promoted by spatial aggregation of the occurrence. A total of 43 records were used. The same 11 environmental variables that were used for the PCA were used for the Ecological Niche Modelling (ENM). The 11 bioclimatic variables were masked to extend of ecoregions (WWF 2006) where *Z. prasina* occurrences exist as hypothesis of the accessible area (M).

The niche of *Z. prasina* was modeled using the maximum entropy algorithm in MAXENT v. 3.3.3 (Phillips *et al.*, 2006) with 100 replicates using bootstrapping as a resampling method with no extrapolation and no clamping. For model evaluation 20 % of the total records were used. Logistic output was selected to obtain maps with suitability values. The ENM was projected in the YBPB and Central America, a center of diversity for the genera *Zamia*. The minimum training presence was used as threshold to obtain a binary map of presence-absence. Finally, the ENM obtained was transferred into three past climatic scenarios: the Last Interglacial (LIG $\approx$ 120 ka), the Last Glacial Maximum (LGM $\approx$ 21 ka) and the Middle Holocene (MH $\approx$ 6 ka). Two general models of global circulation (GCM, <http://www.worldclim.org/paleo-climate1>) were employed to transfer the ENM into the LGM

and MH scenarios: the Community Climate System Model (CCSM, Collins, 2004) and the Model of Interdisciplinary Research on Climate (MIROC, Hasumi y Emori, 2004). Both models simulate the climatic conditions in the LGM and MH, with a stronger reduction in the temperature assumed in the CCSM model in comparison with the MIROC model (Otto-Bliesner *et al.*, 2007).

3.3 RESULTS

We analyzed 102 sequences of the *atpF-atpH* region, with a length of 462 bp and 90 sequences of the ITS2 region, with a length of 301 bp. For *atpF-atpH*, 23 populations were analyzed. For ITS2 one population was excluded because its sequences coincided with an endophytic fungus.

3.3.1 Genetic diversity

The genealogical relationships indicated that, for *atpF-atpH*, the most frequent haplotypes were A1 and A3, which are thus candidates as ancestral haplotypes given their internal position in the network and their higher number of connections with the other less-frequent haplotypes. Most haplotypes were differentiated in a single mutational step, except for A6 and A7 (Fig. 3.2-A). For ITS2, haplotypes H1, H3 and H8 were the most frequent and thus possible ancestral haplotypes, given their internal position in the network. Most haplotypes were differentiated in only one mutational step. The exceptions were H13, H14, H16 and H17 (Fig. 3.3-A). For *atpF-atpH*, nine haplotypes were obtained (Table 3.1). The overall haplotype diversity (h) was moderate, with a mean value of $h = 0.564$; the nucleotide diversity (π) was low, with a mean value of $\pi = 0.00186$. The populations of Valladolid, Kaxil Kiuic, Champotón, Escarcega, Calakmul, Palenque, Tenosique, Puerto Morelos y Bacalar had only one haplotype; so, h and π were equal to zero (Annexed 2.2). Four populations had exclusive haplotypes: Virgencita (A4, A5 and A6), Hormiguero (A7), Belize-Cayo (A9) and Pedro A. Santos (A8) (Fig. 3.2-B). For ITS2, 18 haplotypes were obtained (Table 3.1). Haplotype diversity ($h = 0.827$) and nucleotide ($\pi = 0.00852$) values were higher than those obtained for *atpF-atpH*. The populations of Peto, Virgencita, Hormiguero and Belize-Cayo presented only one haplotype; therefore, h and π were equal to zero (Annexed 2.3). Five populations had exclusive haplotypes: Becanchén (H4 and

H5), Calakmul (H10), Carrillo Puerto (H13 and H14) and José María Morelos (H15 and H16) (Fig. 3.3-B). List of GenBank accession for haplotypes are in Annexed 2.4.

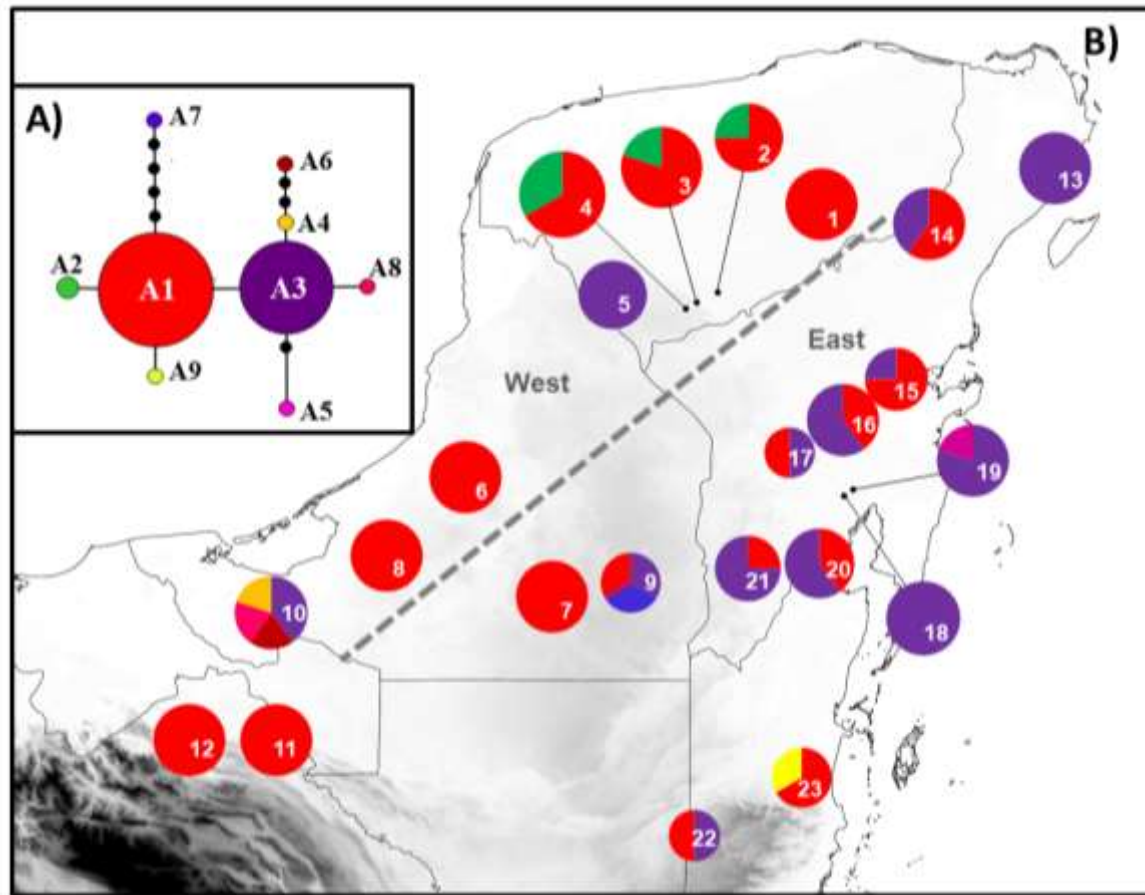


Figure 3.2 (A) Haplotype network obtained with chloroplast sequence *atpF-atpH*. Circle size is proportional to the frequency of each haplotype; lines between the haplotypes represent the mutational steps. (B) Geographic distribution of haplotypes in the 23 populations of *Zamia prasina* sampled in the YPBP. Pie charts represent the haplotypes found for each population; section size is proportional to the number of individuals with that haplotype. Gray dotted lines represent the location of the most probable barriers obtained with BARRIER. Numbers in the pie are population codes (see Figure 3.1 for locations).

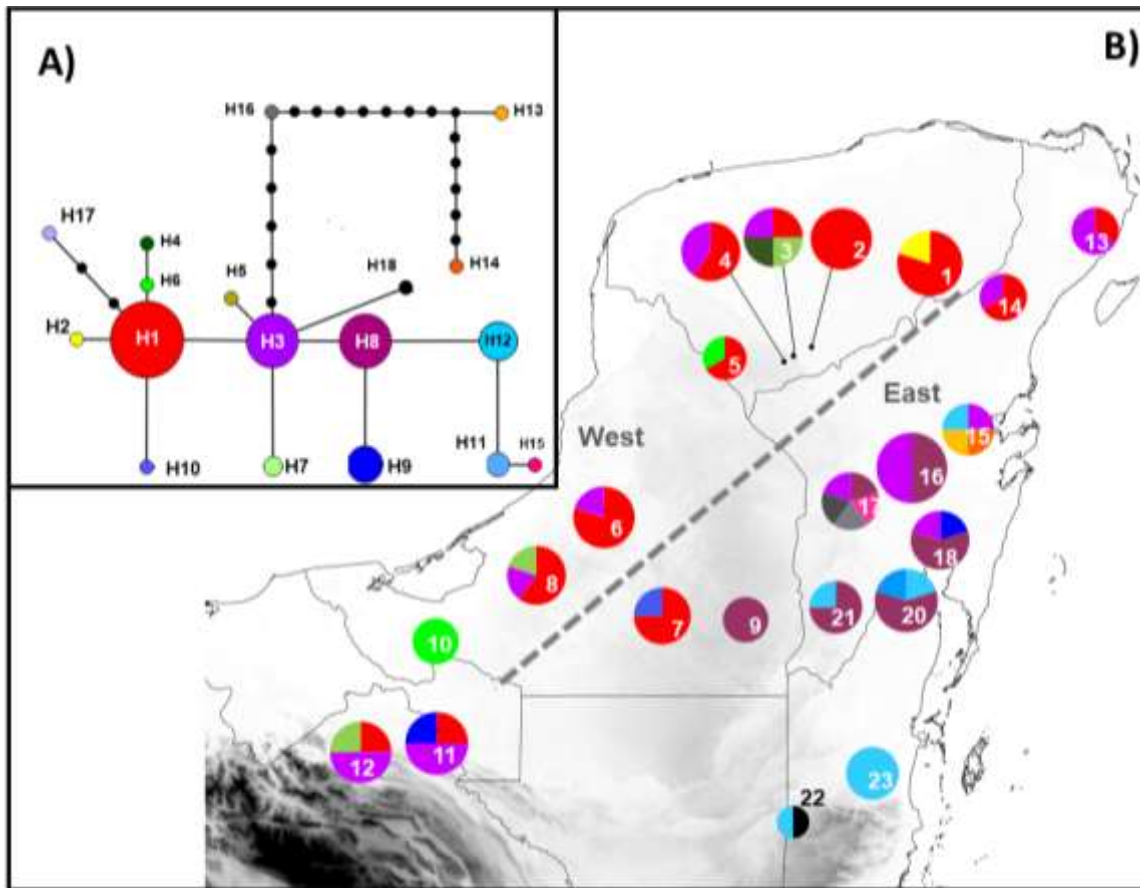


Figure 3.3 (A) Haplotype network obtained with nuclear sequence ITS2. Circle size is proportional to the frequency of each haplotype; lines between the haplotypes represent the mutational steps. (B) Geographic distribution of haplotypes in 22 populations of *Zamia prasina* in YBPB. Pie charts represent the haplotypes found for each population; section size is proportional to the number of individuals with that haplotype. Gray dotted lines represent the location of the most probable barriers obtained with BARRIER. Numbers in the pie are populations codes (see Figure 3.1 for locations).

3.3.2 Phylogeographic structure

The non-hierarchical AMOVA showed similar results for *atpF-atpH* and ITS2 regions: 33.85 and 37.23 %, respectively, of the total variation found among populations. For chloroplast and nuclear regions, the values of F_{ST} were statistically significant ($F_{ST} = 0.338$, $p < 0.001$; $F_{ST} = 0.372$, $p < 0.001$; respectively), indicating genetic differentiation

among the populations studied (Table 3.2). For both regions, the greatest diversity is found within the populations, 66.15 % for *atpF-atpH* and 62.77 % for ITS2. For *atpF-atpH*, the NST value observed was statistically higher in comparison with the value of GST (0.433 and 0.370, respectively; 96.1 % of permuted values of NST were lower than observed NST). For ITS2, the observed value of NST was significantly higher than the value of GST (0.362 and 0.257, respectively; 86.8 % of permuted values of NST were less than the observed NST). Both results indicate signatures of phylogeographic structure.

Table 3.2. Non-hierarchical Molecular variance analysis (AMOVA) of 23 populations of *Zamia prasina* using the chloroplast region *atpF-atpH* and the nuclear region ITS2.

<i>atfF-atpH</i>						ITS2			
Source of variation	Sum of squares	Variance components	Percent variation	Fixation index		Sum of squares	Variance components	Percent variation	Fixation index
Among populations	23.989	0.17088	33.85	$F_{ST} = 0.338^*$		64.778	0.53492	37.23	$F_{ST} = 0.372^{**}$
Within populations	26.383	0.33397	66.15			61.333	0.90196	62.77	
Total	50.373	0.50484				126.111	1.43688		

The chloroplast and nuclear regions of DNA analyzed, the geographical distribution of the haplotypes suggested the existence of two groups, one in the eastern part of YBPB and the other in the western part (Figure 3.2-B and 3.3-B). For *atpF-atpH*, haplotype A1 was the most represented in the western region of the YBPB. On the other hand, haplotype A3 was more abundant in the populations of the eastern section of the YBPB. For ITS2, the haplotype H1 was the most represented in the populations of western YBPB, and haplotypes H3, H8 were much more frequent in eastern YBPB. BARRIER analysis showed, for both regions (*atpF-atpH* and ITS2), that the most probable genetic discontinuities among populations correspond to the east and west regions of the PBYP: the group in the east includes Puerto Morelos, Carrillo Puerto, Bacalar, José María Morelos, Cobá, Panto-Ha, X-Hazil, Pedro A. Santos, Nachi Cocom, Calakmul, Hormiguero and Virgencita; the group in the west includes Valladolid, Peto, Becanchén, Rancho Duarte, Kaxil Kiuic, Escarcega, Champotón, Palenque and Tenosique (Figure 3.2-B and 3.3-B). This analysis supported the geographic distribution of haplotypes mentioned before.

Considering the evidence obtained regarding the population groups in the eastern and western YBPB, we then determined their genetic diversity (Table 3.3). For *atpF-atpH*, the mean haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π) were low for both groups: $h = 0.373$ and $\pi = 0.00080$ for the group in the east; $h = 0.406$ and $\pi = 0.00210$ for the group in the west. For ITS2 in both groups, diversity values were moderate than for *atpF-atpH* ($h = 0.566$ and $\pi = 0.00701$ for the group in the east; $h = 0.600$ and $\pi = 0.00281$ for the group in the west).

Table 3.3. Average genetic diversity in the eastern and western groups using the chloroplast region *atpF-atpH* and nuclear region ITS2.

Statistic	<i>atpF-atpH</i>	
	Eastern group	Western group
h	0.373 ± 0.0075	0.406 ± 0.1290 ($p = 0.002$)
π	0.0008 ± 0.0001	0.0021 ± 0.0010 ($p < 0.0001$)

	ITS2	
h	0.566 ± 0.100	0.600 ± 0.106 ($p = 0.822$)
π	0.007 ± 0.0039	0.002 ± 0.0005 ($p < 0.0001$)

The principal component analysis (PCA) shows two groups of populations, where the populations in the east of the YPBP are located and another group where most of the western populations of the YPBP are found (Annexed 3.5). Most of the variation was obtained in two components: PCA1 contributed 55.03 % of the variation and PCA2 contributed 21.22 % explaining in total 76.25 % of the variation. For PCA1, six variables were associated, with two temperature variables (BIO2 and BIO7) contributing the most; however, four of the variables in this component corresponded to variables related to precipitation (BIO15, BIO17, BIO18 and BIO19). Two variables were associated with PCA2, one related to temperature (BIO3) and another to precipitation (BIO12), which contributed the most to the component.

3.3.3 Divergence time

The comparison of all the coalescence analyses revealed high convergence between the inferred parameters, and the effective sample sizes were always greater than 200. The trees obtained for *atpF-atpH* and ITS2 (Fig. 3.4 and 3.5, respectively) were congruent in the principal nodes and with the phylogeny of *Zamia* (Calonje *et al.* 2019): *Microcycas* A. DC. as sister group of *Zamia*; the clade formed by *Z. furfuracea*, *Z. paucijuga* Wieland, *Z. loddigesii* and *Z. spartea* as a sister group of the clade formed by *Z. variegata* and *Z. prasina*; and *Z. variegata* as sister species of *Z. prasina*. The genealogy for *atpF-atpH* showed that the haplotypes of *Z. prasina* grouped into two clades: (1) haplotypes A1, A2, A7 and A9 and (2) A3, A4, A5, A6 and A8. The greatest divergence age between these two haplotypes groups was 1.37 (95 % HPD, 2.3-0.46 Ma), and the ancestral haplotype is A7 (Fig. 3.4, Annexed 3.6), which was found exclusively in the Hormiguero population (Campeche) (Table 3.1).

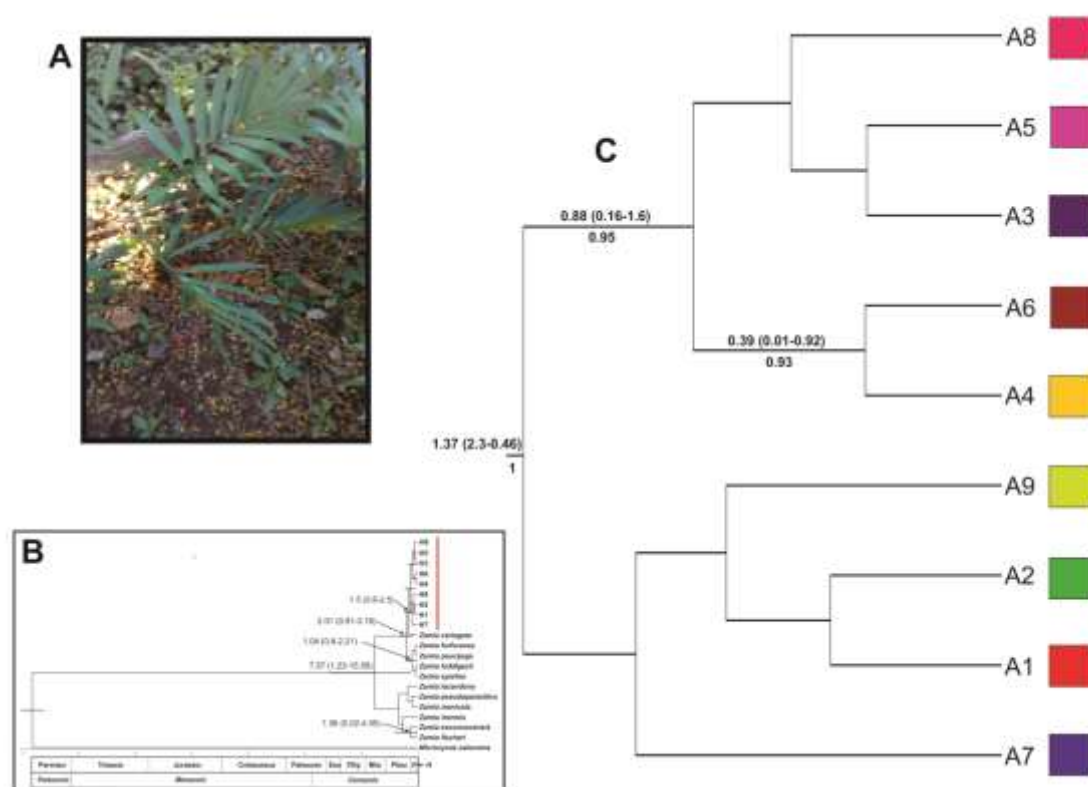
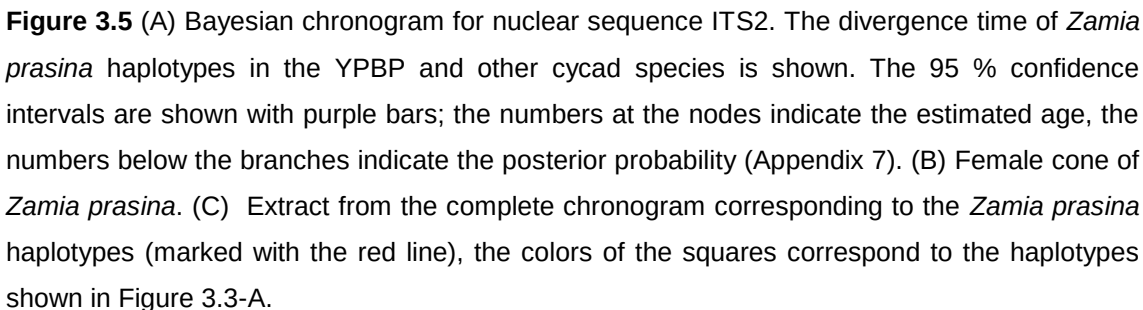


Figure 3.4 (A) Plant of *Zamia prasina* in its natural habit. (B) Bayesian chronogram for chloroplast sequence *atpF-atpH*. The divergence time of *Zamia prasina* haplotypes in the YPBP and other cycad species is shown. The 95 % confidence intervals are shown with purple bars; the numbers at the nodes indicate the estimated age, the numbers below the branches indicate the posterior probability (Appendix 6). (C) Extract from the complete chronogram corresponding to the *Zamia prasina* haplotypes (marked with the red line), the colors of the squares correspond to the haplotypes shown in Figure 3.2-A.

The topology obtained with ITS2 had several clades with short branches, indicating low differentiation between the haplotypes and that, based on molecular clock theory, the times of divergence must be recent. The haplotypes of *Z. prasina* grouped into six clades: (1) haplotypes H13, H14 and H16; (2) H17, 2, 6, 4, 1 and H10; (3) H3, H5, H7; (4) H18; (5) H8 and H9; and (6) H15, H11, H12. The greatest divergence age among group of haplotypes was 1.36 (95 % HPD, 2.23-0.48 Ma). The ancestral haplotype was H12 with a divergence time of 69,000 years (Fig. 3.5, Annexed 3.7). This haplotype was present in individuals from Panto-Ha, Nachi Cocom, Carrillo Puerto and was the only haplotype present in the population Belize-Cayo (Table 3.1).



Tajima's D and Fu's F_S were negative values at the species and population levels; however, these values were not significant ($p > 0.05$). This result was similar for *atpF-atpH* and for ITS2 (Table 3.4). The mismatch distribution analysis showed a distinctive unimodal pattern, indicating recent demography expansion ($R_2 = 0.0477$ and $R_2 = 0.0455$ for *atpF-atpH* and ITS2 respectively). The skyline plot for the species level indicated that the effective size of the population decreased, and much more so for ITS2, then increased recently, in the last 10,000 years approximately, which can be interpreted as population growth, which we expect would be followed by an expansion (Figs. 3.6-A and 3.6-D). At the population group level, the skyline plot showed one

pattern of demography expansion only for the population groups in the east for ITS2 (Figure 3.6-F).

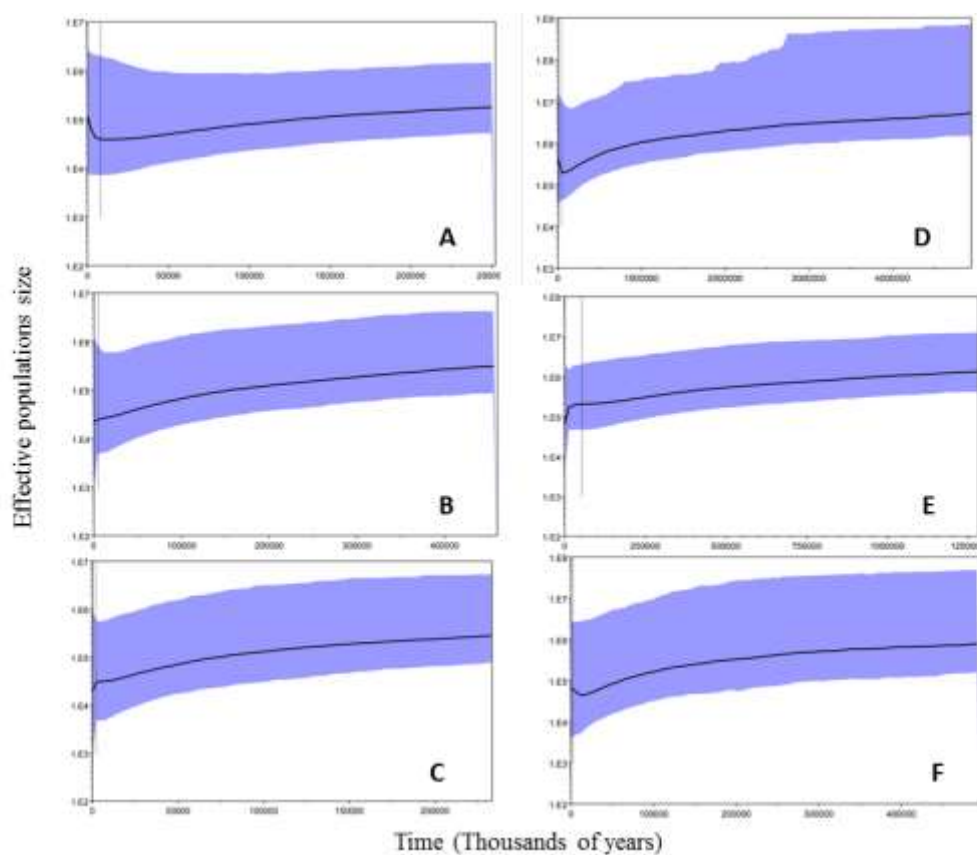


Figure 3.6 Demography history of *Zamia prasina* in YBPB based on Bayesian skyline plot. Substitution rates reported by Nolasco-Soto *et al.* (2015) were used. The vertical axis corresponds to the effective size of the population (N_e), the black line indicates the trend for the median N_e over time; purple lines are the 95% confidence intervals. The horizontal axis represents time in thousands of years. Graphs on left *atpF-atpH* (A: All populations, B: populations of the east group of YBPB, C: populations of the west group). Graphs on right ITS2 (D: All populations, E: populations of the east group of the YBPB, F: populations of the west group).

Table 3.4. Average values of the neutrality indexes Tajima's D and Fu's F_S , for the population groups in the eastern and western parts of the peninsula and for all populations.

Statistic	<i>atpF-atpH</i>		
	Eastern	Western	Total
Tajima's D	0.01856 ($p = 0.68700$)	-0.17476 ($p = 0.83408$)	= -0.05336 ($p = 0.80242$)
Fu's F_S	0.31829 (NA)	0.09316 (NA)	0.24214 (NA)
	ITS2		
	Eastern	Western	Total
Tajima's D	0.0397 ($p = 0.71136$)	-0.006129 ($p = 0.68373$)	= -0.03263 ($p = 0.69850$)
Fu's F_S	-0.05500 (NA)	0.05405 (NA)	0.11408 (NA)

Positive values for D and F_S are indicative of mutation-drift equilibrium, typical of stable populations; negative and significant values ($p < 0.05$) resulting from an excess of rare haplotypes indicate that populations have experienced recent expansions, often preceded by a bottleneck.

3.3.5 Potential distribution

The ENM performed well ($AUC = 0.907 \pm 0.018$) and the predicted distribution (Fig. 3.7) matched the actual known range of *Z. prasina* (Vovides & Nicolalde-Morejón 2010) associated with tropical evergreen and tropical deciduous forests in the YBPB and north of Nicaragua where other *Zamia* species are distributed. The ENM transferred into a past climatic scenarios shows drastic range shift since the LIG from present. During the last interglacial period (LIG ≈ 140 -120 ka), only the northern area of Guatemala and Chiapas were suitable for *Z. prasina*. The suitable area during the Last Glacial Maximum (LGM ≈ 21 -18 ka) for the two GCM were highly contracted. According to the CCSM model, during the LGM the species was possibly distributed on the eastern coast of the YBPB and in some areas of Central America. The MIROC model, on the other hand, indicated that conditions were suitable in a small area in the eastern part of the YBPB and western part of the Yucatan Peninsula. During the Middle Holocene

(MH) for both models, the suitable area for *Z. prasina* increased, and expanded more to the northwest, so that it inhabited a large part of the YBPB and the southern coast of the Gulf of Mexico.

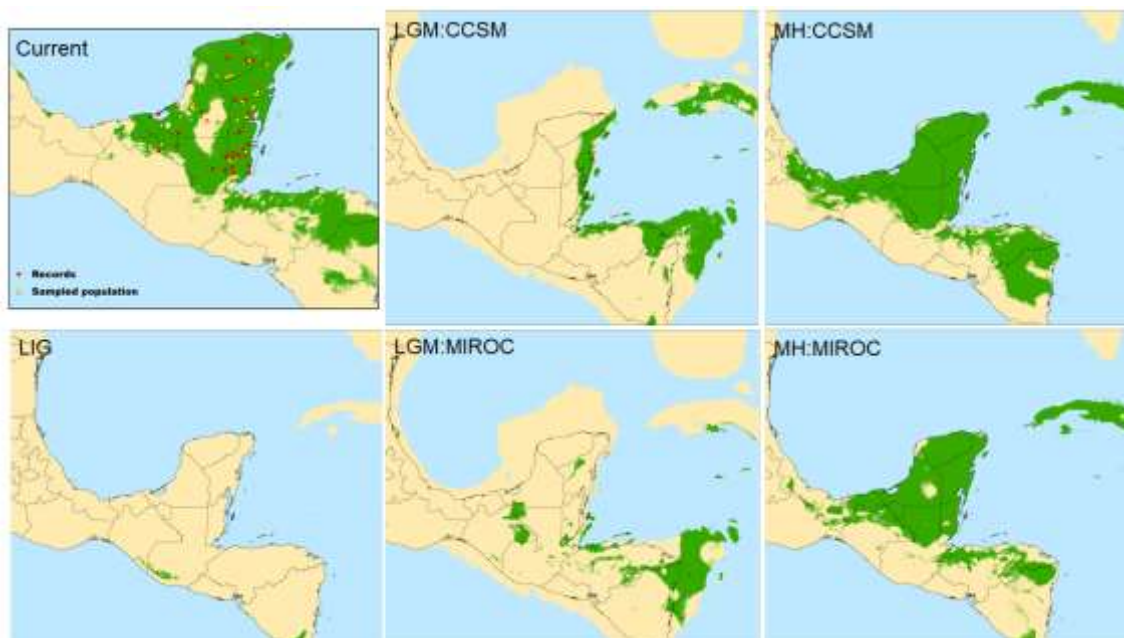


Figure 3.7 Ecological niche modelling for *Zamia prasina*. Current potential distribution. (LIG) Predicted distribution during the interglacial period ($\approx 140\text{-}120$ ka). (LGM-CCSM) Predicted distribution during the Last Glacial Maximum, CCSM model ($\approx 21\text{-}18$ ka). (LGM-MIROC) Predicted distribution during the Last Glacial Maximum, MIROC model. (HM-CCSM) Predicted distribution during the Middle Holocene, CCSM model (≈ 6 ka). (HM-MIROC) Predicted distribution during the Middle Holocene, MIROC model. Green: high suitability, light brown: low suitability.

3.4 DISCUSSION

3.4.1 Phylogeography

The moderate and high haplotype diversity for *atpF-atpH* and ITS2, respectively, and their low nucleotide diversity indicate the presence of many haplotypes at high frequency but with few nucleotide differences among them; thus, the diversification of these haplotypes is recent. Similar results have been reported by Nolasco-Soto *et al.* (2015) for *Z. paucijuga*, with $h = 0.669$ and $\pi = 0.0013$ for the chloroplast region *psbK-psbI* and $h = 0.843$ and $\pi = 0.0063$ for ITS2. For *Dioon sonorensis*, Gutiérrez-Ortega *et al.* (2014) reported $h = 0.629$ and $\pi = 0.0004$ for the chloroplast region *trnL-trnF*. For the cycads in Mexico, there are reports of high genetic diversity in some species, with

few populations and restricted habitats, as in the case of *Zamia loddigesii* Miq. (González-Astorga *et al.*, 2006), *Dioon caputoi* De Luca, Sabato & Vázq. Torres, *D. merolae* De Luca, Sabato & Vázq. Torres (Cabrera-Toledo *et al.*, 2010) and *D. sonorensis* (De Luca, Sabato & Vázq. Torres) Chemnick, T. J. Greg. & Salas-Mor (González-Astorga *et al.*, 2008).

Disagreements in the estimated genetic diversity values for *atpF-atpH* and ITS2 in *Zamia prasina* may be due to the differences between these two DNA types. cpDNA is inherited maternally in cycads (Cafasso *et al.*, 2001) so there is no genetic recombination, whereas it is reasonable to assume that nDNA is inherited bipaternally. In plants, cpDNA markers display average evolutionary rates in the range of 10^{-9} substitutions/site/year, relatively slower than nDNA rates (Wolf *et al.*, 1987); our results are consistent with this difference.

The moderately-high genetic diversity found in *Z. prasina* may be due to three factors. (1) Although its geographical distribution is restricted and its habitat perturbed by anthropogenic activities, this species is abundant, and there are still large extension of vegetation where the species is common (Vovides y Nicolalde-Morejón, 2010). The Global Biodiversity Information Facility (GBIF, <http://data.gbif.org/species/browse/taxon/>) reports more than 100 records of *Z. prasina*. The majority of them are in Mexico and Belize, but there are still areas that have been little explored to the south of Peten in Guatemala (Districts of Izabal and Alta Verapaz), where the species can be found (M. Veliz, curator of the BIGO herbarium pers. comm). (2) The species is dioecious with a cross-mating system that is mediated by pollinators, which implies that genetic material is exchanged between individuals, thus generating greater genetic diversity (Vovides y Nicolalde-Morejón, 2010). (3) Most likely, a recent population expansion increased the haplotype diversity with low values of nucleotide diversity; this pattern was reported for other zamias (*i.e.*, *Z. paucijuga*) (Nolasco-Soto *et al.* 2015). As a population expands, it may come in contact with populations that had been isolated during the glaciation and subjected to different selection pressures. This contact between divergent populations can increase the diversity due to genetic flow between them.

The number of samples analysed also can influence the amount of genetic diversity detected. In cycads, a range of sample sizes have been used for phylogeographic studies, for example, one individual was used per population for *Dioon sonorensis*

(Zamiaceae), and moderate values of nucleotide diversity ($h = 0.629$) were obtained using the chloroplast region *trnL-trnF* (Gutiérrez-Ortega *et al.*, 2014). For *Zamia paucijuga* (Zamiaceae) with 8-10 individuals per population, high haplotid diversity was found using ITS2 ($h = 0.843$) and moderate diversity for the chloroplast region *psbK-psbI* ($h = 0.669$) (Nolasco-Soto *et al.*, 2015). Here we used a sample size between these two examples among these reported (five individuals per population) and still managed to detect a moderate to-high genetic diversity (*atpF-atpH*, $h = 0.564$; ITS2, $h = 0.827$) in agreement with the previous studies. Since we are working with non-coding regions that have low mutation rates, small sample sizes might not detected, the actual diversity.

According to our chronogram (Figs. 3.4 and 3.5), the diversification within *Z. prasina* happened during the Pleistocene. During this period, neotropical montane forests experienced extremely complex glacial-interglacial dynamics and the effect of climatic fluctuations on the genetic structure and population history of species distributed in these habitats led to different outcomes, such as rapid radiation or local extinction (Ramírez-Barahona y Eguiarte, 2013). (4) The moderate genetic diversity detected for *Z. prasina* might also be the result of a still unfinished process of habitat fragmentation, in which subsequent isolation has not yet affected the distribution of its molecular variants.

The greatest variation is within the populations and not between them may be because not enough time has elapsed for a significant divergence between them. The comparison of genetic diversity between the eastern and western population groups on peninsula indicates that there are no differences between these two. We found populations that stand out due to their high genetic diversity, for *atpF-atpH* in the Virgencita and Hormiguero populations and for ITS2 in the Jose Maria Morelos, Carrillo Puerto and Bekanche populations.

The east-west phylogeographic structure in the populations of *Z. prasina* (suggested by the geographic distribution of the haplotypes and BARRIER analysis) can be explained by climatic factors. The PCA supports the east - west divergence and indicates that the variables related to precipitation contributed greatly to PCA1 and PCA2; thus, the genetic differentiation between the group of populations from the eastern and western parts of the peninsula may be due to the precipitation gradient in the YBPB. There is a humid region in the southeast and a dry region in the north-

northeast (Carnevali *et al.*, 2010). The eastern part of the YBPB is humid with 1,200-1,500 mm of annual rainfall, and the basin of Laguna de Terminos in southeastern YBPB receives up to 1,400 mm, compared with 500-1,000 mm in the northwest part of the YBPB (Orellana & Espada 2009). This gradient of precipitation determines the type of vegetation; in the northeast, low-elevation deciduous forest predominates, in the middle is low-elevation deciduous forest, in the east is predominantly medium-elevation semideciduous forest, and in the southeast, high-elevation evergreen forest predominates (Carnevali *et al.*, 2012). Thus, the geographic distribution of *Zamia prasina* in the YBPB could be determined by precipitation. Although no published studies have focused on the influence of precipitation, the drier northeastern strip constitutes a barrier to the distribution of this species, as indicated by the absence of historical records in this area (GBIF, <http://data.gbif.org/species/browse/taxon/>). The populations group in the west is found in the medium subdeciduous forest, bordering the dry northeast portion of the YBPB, while, the eastern population group is in a medium evergreen forest in a more humid area and thus more suitable for *Z. prasina*. Differences in geography, forest and climate may thus also contribute to the differentiation (Vovides y Nicolalde-Morejón, 2010). To test this hypothesis, a more comprehensive study with a landscape genomics approach should be carried out.

Regarding the influence of the precipitation gradient of the YBPB on *Zamia prasina*, Vovides y Olivares (1996) analyzed the caryotypical variation in 11 individuals of *Z. prasina* in the Mexican part of the YBPB. They found that the plants collected in the northeastern part of this region, where habitats are drier, have higher chromosome numbers ($2n = 24-27$) than in plants collected in the southeastern region ($2n = 17$), where the habitats are more humid. Vovides y Olivares (1996) concluded that the stressful drought conditions present in the northeast generate chromosomal changes. The chromosomal changes in *Zamia* are attributed to chromosomal fusion or fission. The fusion occurs between two acrocentric chromosomes (chromosomes whose centromere is closer to one of the ends), giving rise to a metacentric chromosome (with the centromere in the center of the chromosome) and thus reducing the number of chromosomes. During fission, a metacentric chromosome arises by fission or rupture of a metacentric chromosome into two acrocentric chromosomes, in this case increasing the number of chromosomes. Chromosomal fissions might confer adaptive advantages to survive in dry environments. Similar results were reported for other *Zamia* species of the Caribbean, which live in more stable conditions than do the continental *Zamia*

species, which are exposed to a wide range of ecological conditions, from humid to dry and semi-xeric (Balduzzi *et al.*, 1982).

In a study of the influence of environmental conditions on phenotypic diversity of *Z. prasina*, Limón *et al.* (2016) found that in populations with low precipitation and high temperature, the plants have fewer but wider leaflets; in contrast, in areas with greater precipitation, the plants have more but thinner leaflets. These authors proposed that *Z. prasina* inhabits areas under the dense canopy of tropical rainforests and semi-deciduous forests; therefore, the leaflets may be an adaptation to facilitate evapotranspiration and light capture in the shade. According to Stevenson *et al.* (1996), individuals of *Z. prasina* in intermediate environments have intermediate morphological forms. Thus, evidence of phylogeographic structure, in karyotype and morphology indicate that the precipitation gradient in the YBP greatly influences the populations of *Z. prasina*. A study on the influence of precipitation on the genetic diversity of this species is necessary.

The present study shows that the estimated time of divergence among the most ancestral haplotypes of *Zamia prasina* was approximately 1.37 Ma based on *atpF-atpH* and 1.36 Ma based on ITS2; although most of the haplotypes have a more recent origin, indicating a recent population expansion that coincides with the Pleistocene (1.8-0.10 Ma), a period of events relevant to the evolution of the cycads. During the climatic changes of the Pleistocene, the tropical forests were subjected to a complex dynamic, an aspect that favored the presentation of rapid radiations and local extinctions (Ramírez-Barahona y Eguiarte, 2013), and in the case of *Z. prasina*, there was an increase in genetic diversification.

Based on molecular phylogeny, Nagalingum *et al.* (2011) pointed out that, diversification increased in the genus *Zamia* during the Pleistocene and that it was one of the most speciose rich genera of cycads at that time. Pleistocene speciation prevailed in the neotropics, mainly for *Zamia* and *Cerotozamia* with the glacial-interglacial cycles being the predominant environmental force. The climate during that period also became more seasonal. Nolasco-Soto *et al.* (2015), employing nuclear and chloroplast markers determined the origin of *Z. paucijuga* between 6.4-1.6 Ma. Nolasco-Soto *et al.* (2015) suggested that the historical factors that affected *Z. paucijuga* at the population level during the Late Pleistocene similar affected other *Zamia* species, as our results showed for *Z. prasina*.

The values of the Tajima's D and the Fu's F_s were negative but not significant, indicating that there was no population expansion. Because *Z. prasina* is a perennial with a long generational cycle the mutation rate is very low (Loveless y Hamrick, 1984), thus, the significance of these two statistics is difficult to assess. However, the present work generated several lines of evidence that suggest that populations of *Z. prasina* underwent a recent demography expansion. (1) In the populations sampled, haplotype diversity is high, and nucleotide diversity is low. The low genetic divergence between the haplotypes can be explained because not enough time has elapsed for a significant divergence between the haplotypes (Lavery *et al.*, 1996). (2) The star-shaped network of haplotypes found for *Z. prasina* in *atpF-atpH* and ITS2 regions also indicate a population expansion and one or a few haplotypes were more frequent, from which many differing haplotypes were derived in one or a few mutational steps; moreover, these haplotypes are found in low frequency. (3) The skyline plot showed a recent population expansion at species level, the effective size of the populations underwent a recent increase in the late Pleistocene-Holocene. (4) The diversification of haplotypes increased in the Late Pleistocene -Holocene.

3.4.2 Current and palaeodistribution modelling

As mentioned earlier, the palaeoecological studies of fossil pollen in the YBPB that reconstructed past of vegetation distribution and climate (Carrillo-Bastos *et al.*, 2010, Sánchez-Sánchez y Islebe, 2002) showed that the distribution in the YBPB was governed mainly by precipitation levels. A clear example is given by the certain ones semi-evergreen forest species, which grow in areas with a precipitation between 1,000 and 1,500 mm/year (Sánchez-Sánchez y Islebe, 2002). The mosaic of current vegetation formed during the early Holocene, which implies that the modern pattern of isohyets was also established then (Leyden, 2002). In the present, the climate is more seasonal, with rainier summers and less-intense winters, which encourages the regeneration and survival of seedlings. *Z. prasina* is actually more widely distributed in the YBPB, in ecosystems with seasonal climates (evergreen, deciduous and subdeciduous tropical forest).

In a geospatial analysis study of pollen records from the YBPB, Carrillo-Bastos *et al.*, (2012) found that changes in vegetation during the Holocene in the peninsula were caused by changes in climate. In addition to climate influences during the Classic period (2,500-1,200 BC), the activities carried out by the Mayan people placed

pressure on the forest coverage. In spite of this pressure, the vegetation coverage was not severely diminished; thus, the use of forest resources did not result in total deforestation. Eventually, vegetation recovered in relation to an increase of precipitation that coincided with the Medieval warm period during the Holocene. The highest pollen percentages taxa of semi-evergreen forests (85-92 %) were predicted to be in the southern and central parts of the peninsula and the lowest in the northern part. This distribution is similar to the modern distribution according to the isohyets, with precipitation increasing toward the eastern coast (Carrillo-Bastos *et al.* (2012) and consistent with our results that, during the Middle Holocene (MH), the environmentally suitable area for *Z. prasina* increased and expanded from the southeast to the center, covering a large part of the YBPB.

Although the LGM was a very dry period, some places have been proposed to be relatively wet, *e.g.*, center-west of Mexico (Bradbury, 2000) and south of the YBPB (Hodell *et al.*, 2008, Bush *et al.*, 2009). Drill cores obtained from Lake Petén Itzá, Petén, Guatemala, contain a ~ 85-kyr record of terrestrial climate from lowland Central America that was used to reconstruct hydrologic changes in the northern Neotropics during the last glaciation.

Sediments are composed of clay, reflecting a relatively wet climate, and pollen from the same period indicates vegetation consisted of a temperate pine-oak forest. This finding contradicts previous inferences that the climate was arid during the Last Glacial Maximum (LGM) at least in the south of the YBPB (Hodell *et al.*, 2008). This result coincides with ours that, during the LGM, the environment was suitable for the establishment of *Z. prasina* was concentrated in the eastern YBPB where the species may have found refuge during the cold, dry periods of the glaciation.

We propose that the absence of environmental suitability in the YBPB for the establishment of *Z. prasina* in the Last Interglacial (≈ 120 ka) could be due to some *Zamia* species needing a seasonal climate, while others have a tree habit and are adapted to very humid, woodland habitats (Nicolalde-Morejón *et al.*, 2011). It is possible that the last interglacial was warmer, humid and without seasonality, in comparison with the Holocene (Walker *et al.*, 2012, Cornejo-Romero *et al.*, 2017), and thus was not propitious for the growth of *Z. prasina*.

The predictions by theMIROC and the CCSM models for the paleodistribution of *Z. prasina* in the LGM are different. The CCSM model predicts environmental suitability

areas on the eastern coast of the YBPB, by the MIROC model does not predict any favorable areas on the peninsula (Figure 3.7). This difference may be due to these models basing their simulations on different initial experimental conditions using in different algorithms (Harrison *et al.*, 2016). CCSM model estimates a lower temperature and greater precipitation than the MIROC model does (Otto-Bliesner *et al.*, 2007) although the differences vary depending on the area of study (Taylor *et al.*, 2012, Harrison *et al.*, 2016).

The genetic data (phylogeographic structure and historical demography) suggest that the populations of *Z. prasina* expanded during the warmest periods of the Mid-Holocene, a pattern consistent with the glacial refugium hypothesis and validated by its paleodistribution. Post-Pleistocene expansion has been proposed for other species of the genus *Zamia*, such as *Z. paucijuga* (Nolasco-Soto *et al.*, 2015); after the glaciations, its populations that originated in central Mexico became established to the south in the Pacific watershed.

In our study, the presence of ancestral haplotypes on the southeastern peninsula (based on ITS2 evidence) indicates possible center of origin, although based on *atpF-atpH* the center could be in Campeche. This difference may be due to the differing type of inheritance between the two markers. However, these results are only preliminary because they are based on information from two short genome regions. Future studies should address this incongruity by using sampling more populations and genomic regions.

In general, our results indicate that climatic fluctuations during the Pleistocene-Holocene influenced the evolutionary history of *Z. prasina*. The ecological niche modelling suggests that this species prevail during glacial events in restricted populations on the eastern coast of the peninsula, and expanded post-glacially into the northwest to occupy almost the entire territory of the YBPB. This result are congruent with the phylogeographic pattern of other *Zamia* species (Nolasco-Soto *et al.*, 2015) and helps us understand the historical phylogeographic patterns of the Zamiaceae in the Neotropics. An analysis of the comparative phylogeography at the genus level for *Zamia* with greater genomic sampling will allow us to make inferences about the temporal congruence of species and about the influence of climate on the composition of the genus.

ACKNOWLEDGMENTS

This paper is part of the research for the first author's Ph. D. thesis at the Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., postgraduate studies in Biological Sciences Option Natural Resources. The first author thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Mexico for the scholarship awarded for her postgraduate studies. Authors thank to four anonymous reviewers for their critical review of a previous version of this manuscript. To Dr. Diego Angulo for his help with the edition of the figures. Dr. Michael Calonje for Belize samples, we thanks too MSc. Iván Tamayo and Dr. Michael Calonje for theirs help in the diversification timing analysis and Paulino Simá for his assistance in the field.

CAPÍTULO IV

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

La conservación de los recursos genéticos en general, y de las plantas en particular, es un tema que ha ganado interés en los últimos años debido al gran impacto antrópico que ha ocurrido en los ecosistemas, el cual ha afectado su funcionamiento, estructura y distribución (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). Esto ha ocasionado la pérdida de hábitat, lo cual se reconoce como una de las principales causas de extinción de especies terrestres en todo el planeta (Fahrig, 2003).

La velocidad a la que se están afectando los ecosistemas obligan a diseñar y aplicar estrategias para medir el estado de conservación de la biodiversidad y hacer lo necesario para plantear soluciones a corto plazo (Butchart *et al.*, 2006; Isasi-Catalá, 2010). Establecer prioridades de conservación es un aspecto relevante ya que cada día hay más evidencia de especies que requieren atención para su conservación. Sin embargo, los recursos económicos para emprender este tipo de proyectos son limitados, por lo que es importante saber cuáles son las especies prioritarias, lo cual se logra con una correcta categorización de los objetos focales de conservación (UICN, 2001).

Los criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) son una potente herramienta que ha sido ampliamente utilizada para categorizar el estado de conservación de un número creciente y variado de taxones que viven en una gran variedad de hábitats a nivel local, regional y mundial; sin embargo, hay países, como México, que han desarrollado sus propias herramientas para categorizar el estado de conservación de especies al interior de su territorio (Sánchez *et al.*, 2007). Dado el poco conocimiento de su biodiversidad y los requerimientos de información demográfica y biológica detallada para aplicar el método de la UICN, se consideró que lo óptimo sería desarrollar una iniciativa propia para evaluar el estado de conservación de las especies en México, que es justamente lo que se conoce como el Método de Evaluación de Riesgo de Extinción (MER) (Sánchez *et al.*, 2007). Este método busca ponderar, por medio de una escala numérica jerárquica, los factores que afectan a una especie a la escala de país y trata de mantener la mayor independencia posible entre sus cuatro criterios de evaluación (Sánchez *et al.*, 2007).

El número de especies evaluadas tanto por los criterios de la UICN como por el método MER va en aumento, así como la cantidad de especies que se encuentran bajo riesgo e incluidas en la llamada Lista Roja (UICN, 2001). Debido a la falta de una revisión exhaustiva y bien fundamentada, es posible tener dos escenarios: 1) especies cuyas poblaciones se encuentran en un grado alto de deterioro y bajo presiones fuertes de tipo ambientales, intrínsecas y antrópicas; sin embargo, no han sido evaluadas o solo se cuenta con muy poca información, por lo que no están incluidas en la Lista Roja. 2) especies que se encuentran incluidas en un grupo taxonómico superior (género o familia) donde, por lo general, hay muchas especies en diferentes categorías de amenaza y por lo tanto son incluidas en ese mismo status sin tener una valoración real del estado de sus poblaciones, situación muy común en especies de cactus, orquídeas y cícadadas. En los casos del escenario 2, sería oportuno realizar una revisión exhaustiva para tener los elementos necesarios para re-evaluar el estado de conservación de la especie en cuestión.

De forma general, el criterio más empleado para la categorización de especies, tanto por el método de la UICN como por el método MER, es el referido a la distribución del taxón debido a que, para muchas especies, es relativamente fácil de evaluar; sin embargo, éste sería solo un aspecto y se estarían desestimando todas las cuestiones ambientales y ecológicas que también son importantes a considerar cuando se habla del estado de conservación de una especie (UICN, 2001; Sánchez *et al.*, 2007).

Otro aspecto que muchas veces se desestima a la hora de categorizar el estado de conservación de una especie es la información genética de sus poblaciones. En ocasiones, cuando se tiene información genética, suelen confundirse los resultados que arrojan los genes o alelos con la historia de la especie; sin embargo, hay que tener en cuenta que los resultados genéticos muestran la historia de uno o los pocos genes con los cuáles se trabaja. Incluso, muchas veces son regiones de ADN no codificantes utilizadas para estimar la diversidad genética, lo que se vuelve realmente interesante es tratar de explicar esos resultados con base en la historia de vida de la especie. Mientras más evidencia genética exista que apoye cierto patrón genético, se podrá decir con mayor robustez que ese patrón corresponde a la historia de vida de la especie. Los estudios genéticos no sólo son útiles para conocer la diversidad de las poblaciones, sino que cada día son más empleados para conocer acerca de aspectos evolutivos de la especie como posibles centros de origen, tiempo de diversificación,

cambios demográficos y los factores que afectan o explican la distribución actual de las especies.

La especie aquí estudiada, *Zamia prasina* W. Bull, fue categorizada como en Peligro de Extinción (P) empleando el método MER e incluida en la Norma Mexicana NOM-059 del 2001 de SEMARNAT. Luego de la actualización de la ley en el 2010, ésta quedó ubicada en la categoría Bajo Protección Especial (Pr) (Vovides y Nicolalde-Morejón, 2010). Aunque no está publicado el estudio detallado que condujo a este cambio de categoría, si se conoce que está basado en aspectos de distribución y presencia de la especie (Vovides, Com pers). *Z. prasina* también fue categorizada En Peligro Crítico (CR), según las normas de la UICN, a partir de datos reportados por el grupo de especialistas de Cycadas (UICN/SSC) (Vovides y Nicolalde-Morejón, 2010). Aunque las categorías de cada método no son iguales, existe cierta equivalencia entre estas, por lo que, es difícil considerar que una especie evaluada por la UICN en la máxima categoría de amenaza (En peligro Crítico) esté, según el método MER, fuera de las categorías de riesgo (Bajo Protección Especial). Por esto, los resultados del presente estudio representan un aporte importante para acercarnos a redefinir el verdadero estado de conservación de esta especie.

Según nuestros resultados, el estado de conservación de *Zamia prasina*, como especie, no es tan crítico como está reportado según la UICN por lo que consideramos que debe estar incluida en una categoría de menor riesgo ya que:

- Aunque se encuentra restringida geográficamente a la Provincia Biótica Península de Yucatán, tiene una amplia distribución y un elevado número de poblaciones.
- Los valores de área de ocupación se encuentran en el rango definido, según la UICN, para especies en la categoría En Peligro (EN) y no en Peligro crítico (CR) donde está incluida *Z. prasina* actualmente.
- A pesar del impacto histórico que ha sufrido la Península de Yucatán debido al sistema de agricultura itinerante de roza-tumba-quema implementada por los mayas y la deforestación generada por el hombre moderno en los últimos 1000 años por el cambio de uso de suelo, aún quedan parches de bosque bastante conservados donde la especie se puede encontrar sin dificultad.

- Existe una gran cantidad de áreas ambientalmente favorables en término de temperatura y precipitación donde puede desarrollarse esta especie.
- La especie tiene una alta capacidad de resiliencia que le permite vivir en hábitats perturbados y bajo manejo.

Además de generar información sobre el estado de conservación actual de *Zamia prasina*, otra importante aportación del presente trabajo fue conocer parte de su historia evolutiva y los factores históricos que afectaron su distribución:

El enfoque filogeográfico empleado en este trabajo permitió conocer que el patrón de diversidad genética encontrado en las poblaciones de *Z. prasina* podría ser resultado del gradiente de precipitación que existe en la Península de Yucatán: en la zona noroeste hay menos precipitación (500-600 mm/año) pero ésta va aumentando hacia el sureste en donde hay zonas muy húmedas con registros de hasta 1500 mm/año de lluvia (Carnevali *et al.*, 2012). Las poblaciones de *Z. prasina* más cercanas a las zonas secas tuvieron mayormente los haplotipos A1 y A2 de cloroplasto, y H1 y H3 de núcleo; mientras que, en las poblaciones que se encuentran en las zonas más húmedas prevalecieron los haplotipos A3 de cloroplasto, y H3 y H8 de núcleo, resultado que sugiere una distribución estructurada de la diversidad genética relacionada con la precipitación. Un análisis de componentes principales permitió determinar la asociación geográfica de las poblaciones en dependencia de 15 variables basadas en temperatura y precipitación, corroborando esta correlación y mostrando la presencia de dos grupos de poblaciones: un grupo al este de la península en donde hay mayor precipitación; y otro grupo al oeste, más cercano a las zonas de menor precipitación (Anexo 3.5).

Encontramos valores de diversidad genética moderado-alta, tanto en las poblaciones del grupo este como en las poblaciones del grupo oeste, así como a nivel de especie. Esto puede deberse a que *Zamia prasina* es una especie dioica, por lo cual tiene reproducción cruzada, y hay un elevado número de poblaciones e individuos, lo cual facilita el intercambio de material genético. Además, los cambios en la demografía histórica que ha sufrido *Z. prasina*, caracterizado por contracciones y expansiones de las poblaciones pudieron generar cuellos de botella ya que, durante las contracciones se disminuían el número de poblaciones y probablemente el número de individuos en las poblaciones y durante las expansiones pudieron ocurrir dos cosas: 1) que también

se generaran cuellos de botella debido al establecimiento de nuevas poblaciones a partir de pocos individuos que fueron colonizando nuevas áreas más hacia el centro y noroeste de la península (efecto fundador) y, 2) que se incrementara la diversidad genética de la especie al ponerse en contacto poblaciones de dos refugios diferentes que estuvieron disyuntos durante la glaciación. También, es posible que, en algún momento de la historia evolutiva de esta especie, sus poblaciones se comportaran como una metapoblación, existiendo alto grado de flujo genético lo cual incrementó la diversidad genética de las poblaciones.

La ubicación geográfica del centro de origen de esta especie no quedó clara en este estudio, pues según la información generada a partir de la región nuclear ITS2 se encuentra en el este de la península (Quintana Roo y Belice), mientras que la evidencia de cloroplasto (*atpF-atpH*) indica que pudiera estar en Campeche. Si analizamos la distribución de su especie hermana, *Zamia variegata*, podemos ver que la mayoría de sus poblaciones se encuentran distribuida en Guatemala, muy cerca del posible centro de origen de Quintana Roo y Belice. Además, esto es más congruente con la historia evolutiva del género *Zamia*, cuya diversificación ocurrió en Centroamérica y se fue expandiendo al norte a través del Istmo de Panamá (Nagalingum *et al.*, 2011). Esto hace más probable que el centro de origen de *Z. prasina* se encuentre en el este de la Península de Yucatán (Quintana Roo y Belice). Para lograr esclarecer este tema, es necesario realizar un muestreo más amplio y tal vez un análisis de reconstrucción de áreas ancestrales tomando muestras que abarquen toda la distribución de la especie.

Nuestro estudio reveló que *Zamia prasina* tuvo su origen hace aproximadamente 1.5 Ma, cuando se separó de su grupo hermano *Zamia variegata*. Posteriormente (≈ 1.37 Ma), la especie experimentó un aumento en su diversidad genética, reflejada en nuestro estudio por el surgimiento de varios haplotipos, coincidiendo este evento con el pleistoceno. *Z. prasina*, como muchas otras especies que habitan en bosques tropicales, sufrieron los embates de las fluctuaciones climáticas del pleistoceno donde se sucedieron varios ciclos de periodos glaciales e interglaciales. Ante las condiciones frías y secas de la glaciación, esta especie fue capaz de sobrevivir en ciertos refugios en la costa este de la Península de Yucatán a partir de donde las poblaciones se expandieron hacia el noroeste de la península durante los periodos interglaciales más cálidos, para luego volver a refugiarse en la próxima glaciación.

4.2 CONCLUSIONES

Nuestro estudio llevó a cabo una valoración del estado de conservación de *Zamia prasina*, teniendo en cuenta varios elementos de análisis: distribución de las poblaciones, factores antrópicos que afectan a las poblaciones, aspectos genéticos, filogeográfico, demografía histórica y aspectos evolutivos. Además, se utilizaron dos métodos de evaluación con diferentes alcances, los criterios de la UICN con un alcance más regional y el método MER con alcance local. Todo esto le confiere robustez al análisis final, lo cual permitió llegar a las siguientes conclusiones:

1. Los valores de área de ocupación de *Z. prasina* indican que debe estar incluida en la categoría En Peligro (EN) y proponemos que, de continuar estas condiciones en futuras evaluaciones se realice una transferencia de categoría de En peligro Crítico (CR) a En Peligro (EN) según los criterios de la UICN cumpliéndose la hipótesis 1 planteada en este estudio: el estado de conservación de *Z. prasina* no es tan crítico y debe ser incluida en una categoría de menor riesgo.
 - Consideramos que, como esta especie tiene poblaciones fuera México, es más factible evaluarla con los criterios de la UICN. En caso de aplicar el método MER, esto debe hacerse con la salvedad de que, para el análisis de la distribución, se deben tener en cuenta todas las poblaciones y regirse por los valores críticos que propone la UICN para cada categoría.
 - Aunque el hombre incide sobre el desarrollo de *Z. prasina* mediante el cambio de uso de suelo (monocultivo de Maíz y palma aceitera), eliminación de malezas en fincas forestales y zonas arqueológicas, al parecer estas prácticas no están repercutiendo en la supervivencia de la especie a corto y mediano plazo. Considero que a largo plazo pudiera afectarse el reemplazo de plantas adultas reproductoras debido a que con las prácticas antes mencionadas se retarda el tiempo para que las plantas alcancen su etapa reproductiva.
2. La historia evolutiva de *Zamia prasina* indica que la especie tuvo una distribución inestable durante el Pleistoceno tardío-Holoceno. Durante las condiciones secas y frías de la glaciación hubo una reducción en el tamaño efectivo de la población y una reducción de las áreas con condiciones climáticas adecuadas para su establecimiento limitándose a la costa este de la Península de Yucatán. Durante los periodos interglaciales más cálidos y lluviosos la especie experimentó un incremento en el tamaño efectivo de la población y un incremento de las áreas climáticamente favorables distribuyéndose en casi toda la península. Por todo lo anterior, planteamos que se cumple la hipótesis 2 propuesta en este estudio: *Z.*

prasina tiene una dinámica poblacional que se ajusta a la hipótesis de refugio glacial.

- El gradiente de precipitación que existe en la península de Yucatán ha influido en la estructuración genética de *Z. prasina*, existiendo dos grupos de poblaciones: al este y oeste de la península, lo cual coincide con las franjas de vegetación de selva mediana subcaducifolia hacia el centro-oeste de la península y selva mediana subperennifolia hacia el centro-este de la península.
- La historia evolutiva de *Zamia prasina* es congruente con lo planteado en la literatura para las especies del género *Zamia* en cuanto a los tiempos de diversificación y la influencia de las glaciaciones del pleistoceno sobre su demografía histórica.

4.3 PERSPECTIVAS

Aunque consideramos que este estudio tiene la robustez necesaria para llegar a las conclusiones planteadas, hay ciertas cuestiones que pueden ser atendidas en aras de aumentar el grado de certeza para determinar el estado de conservación de *Zamia prasina*.

1. Sería oportuno repetir el estudio de estado de conservación de *Z. prasina*, mínimo durante los próximos cuatro años para sustentar la propuesta de transferencia de categoría.
2. Evaluar otros criterios de la UICN referentes a los tamaños poblacionales, individuos reproductores y posibles reducciones poblacionales para poder proponer un cambio de categoría.
3. Incluir en el estudio las poblaciones de *Z. prasina* presentes en Guatemala y aumentar las poblaciones en Belice, con esto se tendría en cuenta todo el rango de distribución de la especie.
4. Hacer estudios de biología reproductiva (polinizadores, dispersores, fenología), los cuales son básicos para entender patrones de diversidad genética.
5. Realizar un estudio de genética poblacional empleando un marcador molecular codominante, como los microsatélites, para poder determinar cómo es el flujo genético entre las poblaciones, conocer si se comporta como metapoblación y así poder delimitar áreas de conservación.
6. Esclarecer la ubicación geográfica del posible centro de origen incrementando el número de loci y poblaciones empleadas y realizando un análisis bayesiano de áreas ancestrales (DIVA)

BIBLIOGRAFÍA

Avice, JC. (2000). *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, United Kingdom. pp 447.

Bachman, S., J., Moat, A. Hill, J. De la Torre y B.Scott (2011). Supporting Red List threat assessments with GeoCAT: geospatial conservation assessment tool. *ZooKeys*, 150, 117–126.

Balduzzi, A., P. De Luca y S. Sabato (1982). A phytogeographical approach to the New World cycads. *Delpinoa*, 23, 185-202.

Baldwin, B,G (1992). Phylogenetic Utility of the internal Transcribed Spacet of Nuclear Ribosomal DNA in Plants: An Example from the Compositae. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 1, 3-16.

Barnosky, A.D., N. Matzke., S.Tomiya, G.O.U.Wogan, B.Swartz, T.B.Quental, C.Marshall, J.L.McGuire, E.L.Lindsey, K.C.Maguire, B. Mersey y E.A. Ferrer (2011). Has the Earth/'s sixth mass extinction already arrived? *Nature*, 471, 51–57.

Bouckaert, R., J. Heled, D. Kühnert, T. Vaughan, C. Wu, D. Xie, M.A. Suchard, A. Rambaut y A.J Drummond (2014). BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLOS Computational Biology*, 10.

Bradbury, J.P (2000). Limnologic history of Lago de Pátzcuaro, Michoacán, Mexico for the past 48000 years: impacts of climate and man. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 163, 65-95.

Bush, M.B., A.Y. Correa Metrio, D.A Hodell, M. Brenner, F.S Anselmetti, D. Ariztegui, A.D Mueller, J.H Curtis, D.A Grzesik, C. Burton y A. Gilli (2009). Re-evaluation of climate change in lowland Central America during the Last Glacial Maximum using new sediment cores from lake Petén Itzá, Guatemala. *In* Vimeux F, Sylvestre F, Khodri M, eds. *Past Climate Cariability in South America and Surrounding Regions: Developments in Paleoenviromental Research*, 14, 113-128.

Butchart, S., R. Akcakaya, E. Kennedy y C. Milton Tylor (2006). Biodiversity Indicators Based on Trends in Conservation Status: Strengths of the IUCN Red List Index. *Conservation Biology*, 20, 579-581.

Butchart, S.H.M., M. Walpole, B.Collen, A. Van Strien, J.P.W.Scharlemann, R.E.A. Almond, J.E.M. Baillie, B. Bomhard, C. Brown, J. Bruno, K.E. Carpenter, G.M. Carr, J. Chanson, A.M. Chenery, J. Csirke, N.C. Davidson, F. Dentener, M.Foster, A. Galli, J.N. Galloway, P. Genovesi, R.D. Gregory, M. Hockings, V. Kapos, J.F Lamarque., F. Leverington, J. Loh, M.A. McGeoch, L. McRae, A. Minasyan, M.H. Morcillo, T.E.E. Oldfield, D. Pauly, S. Quader, C. Revenga, J.R. Sauer, B. Skolnik, D. Spear, D. Stanwell-Smith, S.N. Stuart, A. Symes, M.Tierney, T.D.Tyrrell, J.C. Vié y R. Watson (2010). Global biodiversity: indicators of recent declines. *Science*, 328, 1164–1168.

Caballero, M., G.S. Lozano, B. Ortega, J. Urrutia y J.L Macías (1999). Environmental characteristics of lake Tecocomulco, northern basin of Mexico, for the last 50,000 years. *Journal of Paleolimnology*, 22, 399-411.

Caballero, M., S. Lozano-García, L. Vázquez-Selem y B. Ortega (2010). Evidencias de cambio climático y ambiental en registros glaciales y en cuencas lacustres del centro de México durante el último máximo glacial. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 62, 359-377.

Cabrera-Toledo, D., J. González-Astorga, F. Nicolalde-Morejón, F. Vergara-Silva y A.P. Vovides (2010). Allozyme diversity levels on two congeneric *Dioon* spp (Zamiaceae, Cycadales) with contrasting rarities. *Plant Systematics and Evolution*, 290, 115-125.

Cafasso, D., S. Cozzolino, P. Caputo y P. De Luca (2001). Maternal inheritance of plastids in *Encephalartos* Lehm. (Zamiaceae, Cycadales). *Genome*, 44, 239-241.

Calonje, M., A.W. Meerow, M. Patrick-Griffith, D. Salas-Leiva, A.P. Vovides, M. Coiro, J y Francisco-Ortega (2019). A time-calibrated species tree phylogeny of the New World cycad genus *Zamia* L. (Zamiaceae, Cycadales). *International Journal of Plant Sciences* 180, 286-314.

Calonje, M y J. Meerman (2009). What is *Zamia Prasina* (Zamiaceae: Cycadales)? *Journal of the Botanical Research Institute Texas*, 3(1), 43 – 49.

Calonje, M., J. Meerman, M.P, Griffith y G. Hoese (2009). A new species of *Zamia* (Zamiaceae) from the Maya Mountains of Belize. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 3(1), 31– 41.

Caputo, P., S. Cozzolino, L. Gaudio, A. Moretti, D.W Stevenson (1996). Karyology and phylogeny of some Mesoamerican species of *Zamia* (*Zamiaceae*). *American Journal of Botany*, 83,1513–1520.

Caputo, P., S. Cozzolino, P. De Luca, A. Moretti y DW. Stevenson (2004). Molecular phylogeny of *Zamia* (*Zamiaceae*). In: *Cycad classification: concepts and recommendations*, Walters T, Osborne R, eds. Wallingford, Oxfordshire: CABI Publishing. pp. 149–159.

Carnevali F.C., G., J.L. Tapia–Muñoz, R. Duno de Stefano y I. Ramírez Morillo. (2010). *Flora Ilustrada de la Península de Yucatán: Listado Florístico*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., Mérida, México. 328 pp.

Carnevali F.C.G., J.L Tapia-Muñoz, R. Duno de Stefano, I. Ramírez-Morillo, L. Cantzà, S. Hernández-Aguilar y A.Castillo (2012). La Flora de la Península de Yucatán Mexicana: 250 años de conocimiento florístico. *Biodiversitas*, 101, 6-10.

Carrillo-Bastos, A., G.A. Islebe y N.Torrescano-Valle (2012). Geospatial analysis of pollen records from the Yucatan peninsula, Mexico. *Vegetation History Archaeobotany*, 21, 429-437.

Carrillo-Bastos, A., G.A. Islebe, N. Torrescano –Valle y N.E. Gonzalez (2010). Holocene vegetation and climate history of central Quintana Roo, Yucatan Peninsula, Mexico. *Review of Palaeobotanic and Palynology*, 160, 189-196.

Challenger, A. (1998). *Utilización y Conservación de los Ecosistemas Terrestres de México: Pasado, Presente y Futuro*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México. pp 141-158.

Chamberlain R.S. (1982). *Conquista y Colonización de Yucatán (1517-1550)*, editorial Porrúa, México. pp 72-95.

Chamberlain, C.J. (1919). *The living cycads*. New York, Hafner. pp 1863-1943.

Chaw Shu, M., W. Terrence, Walters C, C. Chien-Chang, H. Shu-Hsuan y C. Shin-Hsiao (2005). A phylogeny of cycads (*Cycadales*) inferred from chloroplast *matK* gene, *trnK* intron, and nuclear rDNA ITS región. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37, 214–234.

Christenhusz J.M., J. L. Reveal, A. Farjon, F. Martin, R. R. Gardner y M. M. W. Chase (2011). A new classification and linear sequence of extant gymnosperms. *Phytotaxa*, 19, 55–70.

Clement, M., Q. Snell, P. Walker, D. Posada y K. Crandall (2002). TCS: Estimating gene genealogies. *Parallel and Distributed Processing Symposium, International Proceedings*, 2, 184.

Collins, W.D., C.M. Bitz, M.L. Blackmon, G.B. Bonan, C.S. Bretherton, J.A. Carton, P. Chang, C.D. Scott, J.H. James, T.B. Henderson, J.T. Kiehl, W.G. Large, D.S. McKenna, B.D. Santer y R.D. Smith (2004). The community climate system model: CCSM3. *Journal of Climate*, 19, 2122-2143.

Contreras-Medina, R y I. Luna-Vega (2002). On the distribution of gymnosperm genera, their areas of endemism and cladistic biogeography. *Australian Systematic Botany*, 15, 193-203.

Cornejo-Romero, A., C.F. Vargas-Mendoza, G.F. Aguilar-Martínez, J. Medina-Sánchez, B. Rendón-Aguilar, P.L. Valverde, J.A. Zavala-Hurtado, A. Serrato, S. Rivas-Arancibia, M.A. Pérez-Hernández, G. López-Ortega y C. Jiménez-Sierra (2017). Alternative glacial-interglacial refugia demography hypotheses tested on *Cephalocereus columna-trajani* (Cactaceae) in the intertropical Mexican drylands. *PLOS ONE*, 12.

Dalrymple, G.B. (1991). *The Age of the Earth*. California: Stanford University Press. pp 136-149.

Demarest Arthur. (2004). *Ancient Maya: The Rise and Fall of a Forest Civilization* (en inglés). Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press. pp 120-128.

Domínguez-Domínguez, O y E. Vázquez-Domínguez (2009). Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32(1), 59-70.

Doyle, J.J., J.L. Doyle, J.A. Doyle y F.J. Doyle (1987). A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.

Drummond, A.J y A. Rambaut (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology*, 7, 214.

- Duarte-Santos, F. (2007). ¿Qué Futuro? Ciência, Tecnologia, Desenvolvimento e Ambiente. Lisboa: Gradiva, pp 98-112.
- Eckenwalder, J (1980). Taxonomy of the West Indian cycads. Journal Arnold Arboretum, 61, 701–722.
- Elith, J., J.P. H. Steven, D. Trevor, E.C. Mirosla, E. C. Yung y J.Y. Colin (2011). A statistical explanation of Maxent for ecologists. Diversity and Distributions, 17, 43–57.
- Emerson B.C., E. Paradis y Thébaud C (2001). Revealing the demographic histories of species using DNA sequences. Trends in Ecology & Evolution, 16, 707-716.
- Excoffier, L., G. Laval y S. Schneider (2005). Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online, 1, 47-50.
- Fahrig, L (2003). Effects of habitat fragmentation on biodiversity. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics, 34, 487-515.
- Farrera, I., S.P. Harrison, I.C. Prentice, G. Ramstein, J. Guiot, P.J. Bartlein, R. Bonnefille, M. Bush, W. Cramer, U. Von Grafenstein, K. Holmgren, H. Hooghiemstra, G. Hope, D. Jolly, S.E. Lauritzen, Y. Ono, S. Pinot, M. Stute y G. Yu (1999). Tropical climates at the Last Glacial Maximum: a new synthesis of terrestrial palaeoclimate data. I. Vegetation, lake-levels and geochemistry. Climate Dynamics, 15, 823-856.
- Folke, C. (2013). Respetar los límites del planeta y recuperar la conexión con la biosfera. En Worldwatch Institute, The State of the World 2013: Is Sustainability Still Possible? New York: W.W. Norton. pp.132-138.
- Fu, X.Y (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics, 147, 915-925.
- González D y Vovides A.P (2002). Low intralineage divergence in *Ceratozamia* (*Zamiaceae*) detected with nuclear ribosomal DNA *ITS* and chloroplast DNA *trnL-F* non-coding region. Systematic Botany, 27, 654-661.
- González-Astorga, J., A.P. Vovides, P. Octavio-Aguilar, L. Aguirre-Fey, F. Nicolalde-Morejón y C. Iglesias (2006). Genetic diversity and structure of the Cycad *Zamia*

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

González-Astorga, J., F. Vergara-Silva, A.P. Vovides, F. Nicolalde-Morejón, D. Cabrera-Toledo y M. A. Pérez-Farrera (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(4), 765–776.

González-Astorga, J., A.P. Vovides, D. Cabrera –Toledo y F. Nicolalde-Morejón (2008). Diversity and genetic structure of the endangered Cycad *Dioon sonorensis* (Zamiaceae) from Sonora, Mexico: evolutionary and conservation implications. Biochemical Systematics and Ecology, 36: 891-899.

González-Astorga, J., A.P. Vovides, M. M. Ferrer y C. Iglesias (2003). Population genetics of *Dioon edule* Lindl. (Zamiaceae, Cycadales): biogeographical and evolutionary implications. Biological Journal of the Linnean Society, 80, 457-467.

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

Graham A. (1973). History of the arborescent temperate element in the northern Latin American biota. In: Graham A, ed. Vegetation and vegetational history of northern Latin America. New York: Elsevier Scientific Publishing Co., pp. 301-314.

Graham, A (1976). Late Cenozoic evolution of tropical lowland vegetation in Veracruz, Mexico. Evolution, 29, 723-735.

Graham, C.H., S. Ferrier, F. Huettman, C. Moritz y A. T. Peterson (2004). New developments in museum-based informatics and applications in biodiversity analysis. Trends in Ecology & Evolution, 19, 497-503.

Greenpeace. (2013). Doce aspectos destacados de la temporada de incendio forestal. [Online] (actualizado 5 mayo 2012) Disponible en: www.greenpeace.org/espana/Global/espana/report/bosques/gp_12asp. [Acceso 19 abril 2017].

Grigera, D y C. Úbeda (2002). Una revisión de los trabajos sobre categorizaciones y prioridades de conservación de los vertebrados de Argentina. *Ecología Austral*, 12,163–174.

Grove T.S, A. M. O'Connell y N. Malajezuk (1980). Effects of Fire of the Growth, Nutrient Content, and Rate of Nitrogen Fixation of the Cycad *Macrozamia Riedlei*. *Australian Journal of Botany*, 28 (3) 271.

Guisan, A., y N. E. Zimmermann (2000). Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecology Model*, 135, 147-186.

Gutiérrez-Ortega J.S., K.T. Molina y F.E. Freaner (2014). Conservation genetic of endangered Cycad, *Dioon sonorense* (Zamiaceae): Implication for variation of chloroplast DNA. *Botanical Sciences*, 92, 441-451.

Haffer J. (1969). Speciation in Amazonian Forest Birds. *Science*, 165, 131-136.

Hammer, D., D.A.T. Harper y P.D. Ryan (2001). Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4, 1-9.

Harrison, S.P., P.J. Bartlein y I.C. Prentice (2016). What have we learnt from palaeoclimate simulations? *Journal of Quaternary Science*, 31, 363-385.

Hasumi, H y S. Emori (2004). K-1 coupled GCM (MIROC) description. Center for Climate System Japan, Tokyo: Research, University of Tokyo.

Hey, J y C.A Machado (2003). The study of structured populations new hope for a difficult and divided science. *Genetics*, 4, 535-543.

Hijmans, R.J., S.E. Cameron, J. L. Parra, P.G. Jones y A. Jarvis (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 25, 1965–1978.

Hodell, D.A., F.S. Anselmetti, D. Ariztegui, M. Brenner, J.H. Curtis, A. Gilli, D.A. Grzesik, T.J. Guilderson, A.D. Müller, M.B. Bush, Y.A. Correa-Metrio y J. Escobar, S. Kutterolf (2008). An 85-ka Record of Climate Change in Lowland Central America. *Quaternary Science Reviews*, 27, 1152-1165.

Isasi-Catalá, E (2010). Los conceptos de especies Indicadoras, paraguas, banderas y claves: su uso y abuso en ecología de la conservación. *Interciencia*, 36, 31-38.

Johnson, L.A.S (1959). The families of cycads and the Zamiaceae of Australia. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, 85, 64–117.

Jones. K (1970). Chromosome Changes in Plant Evolution. *Taxon*, 19 (2), 172-179.

Kutzbach JE, P.J. Guetter, P.J. Behling y R. Selin. (1993). Simulated climatic changes: results of the COHMAP climate-model experiments. *In*: Wright HE, Kutzbeach J.E., Webb T., Ruddiman W.F., StreetPerrott F.A., Bartlein P.J., eds. *Global Climates Since the Last Glacial Maximum*. Minneapolis, Minnesota, EUA: University of Minnesota Press, pp. 24-93.

Lahaye R, V. Savolainen, S. Duthoit, O. Maurin y M.Van der Bank (2008). A test of *psbK-psbI* and *atpF-atpH* as potential plant DNA barcodes using the flora of the Kruger National Park as a model system (South Africa). *Nature Precedings*, DOI: <https://doi.org/10.1038/npre.2008.1896.1>

Lammens, M.E.A., R.A. Boria, A. Radosavljevic, B. Vilela y R.P. Anderson (2015). spThin: An R package for spatial thinning of species occurrence records for use in ecological niche models. *Ecography*, 38(5), 541-545.

Lavery, S., C. Moritz y D. Fielder (1996). Genetic patterns suggest exponential population growth in a declining species. *Molecular Biology and Evolution*, 13, 1106-1113.

Lazcano-Lara, J (2005). The reproductive biology of *Zamia* (Cycadales: Zamiaceae) in Puerto Rico. Implications for patterns of genetic structure and species conservation. Doctoral thesis. Department of Biology, Faculty of Natural Science. University of Puerto Rico.

Leyden, B.W (2002). Pollen evidence for climatic variability and cultural disturbance in the Maya lowlands. *Ancient Mesoamerica*, 13, 85-101.

Librado, P y J. Rozas (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.

- Limón, F., J. González-Astorga, F. Nicolalde-Morejón y R. Guevara (2016). Phenotypic variation of *Zamia loddigesii* Miq. and *Zamia prasina* W.Bull. (Zamiaceae, Cycadales): the effect of environmental heterogeneity. *Plant Systematic and Evolution*, 302, 1395-1404.
- Loveless, M.D y J.L. Hamrick, (1984). Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 15, 65-95.
- Lozano-García M.S y L. Vázquez-Selem (2005). A High Elevation Holocene Pollen Record from Iztaccihuatl volcano, Central México. *The Holocene*, 15, 329-338.
- Lugo-Hubp, J y C. Córdova (1992). Regionalización Geomorfológica de la República Mexicana. *Investigaciones Geográficas*, 25, 25-63.
- Manni, F., E. Guérard y E. Heyer (2004). Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Human Biology*, 76, 173-190.
- Marchant, C.J (1968). Chromosome patterns and nuclear phenomena in the cycad families Stangeriaceae and Zamiaceae. *Chromosoma*, 24, 100-134.
- Metcalfe S.E., S.L. O'Hara, M. Caballero y S.J. Davies (2000). Records of late Pleistocene-Holocene climatic change in Mexico a review. *Quaternary Science Reviews*, 19, 699-721.
- Millennium Ecosystem assessment (2005). *Ecosystem and human well-being: Biodiversity Synthesis*. World Resources Institute, Washington D.C
- Miller M.A., W. Pfeiffer y T. Schwartz (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop*, 1-8.
- Montalvo, G., J. Muñoz y J. Martínez (2017). El Cha'ac Hua (*Zamia prasina*). Una especie "de pocas madres". Desde el Herbario CICY. [Online], (Actualizado 17 enero 2018). Disponible en http://www.cicy.mx/sitios/desde_herbario/ ISSN: 2395-8790. [Acceso 5 de diciembre de 2018].
- Moretti A., P. Caputo, L. Gaudio y D.W Stevenson (1991). Intraspecific chromosome variation in *Zamia* (Zamiaceae, Cycadales). *Caryologia*, 44: 1-10.

Moretti, A (1990). Karyotypic data on North and Central American Zamiaceae (Cycadales) and their phylogenetic implications. *American Journal of Botany*, 77, 1016-1029.

Moretti, A y S. Sabato (1984). Karyotype evolution by centromeric fission in *Zamia* (Cycadales). *Plant Systematics and Evolution*, 146, 215–223.

Müller, J., K. Müller, C. Neinhuis, D. Quandt (2010). PhyDE- Phylogenetic data editor. Version 0.9971. Program distributed by the author. [Online] (Actualizado 10 de marzo de 2017) Disponible en: <http://www.phyde.de> [Acceso 15 Septiembre 2017].

Myers, N (1982). Biological Diversification in the Tropics. *Environmental Conservation*, 10, 277-278.

Nagalingum N.S., C.R. Marshall, T.B. Quental, H.S. Rai, D.P. Little y S. Mathews (2011). Recent synchronous radiation of a living fossil. *Science*, 334, 796-799.

Napolitano, A., P. Caputo y A. Moretti (2004). Karyology, phytogeography, and the origin of intraspecific karyotypic variation in *Zamia paucijuga* and *Z. polymorpha* (Zamiaceae). *Delpinoa*, 46, 71–83.

Naranjo E.J., R. Dirzo, J.C. López Acosta, J. Rendón-von Osten, A. Reuter y O. Sosa-Nishizak (2009). Impacto de los factores antropogénicos de afectación directa a las poblaciones silvestres de flora y fauna, en *Capital natural de México: Estado de conservación y tendencias de cambio*. Conabio, 2, 247-276.

Nicolalde-Morejón F., J. González-Astorga, F. Vergara-Silva, D. W. Stevenson, O. Rojas-Soto y A. Medina-Villarreal (2014). Biodiversidad de Zamiaceae en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 114-125.

Nicolalde-Morejón, F (2007). Taxonomía, distribución y estado de conservación de *Zamia* en Ecuador. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 97, 45-63.

Nicolalde-Morejón, F., A.P. Vovides y D.W. Stevenson (2009) Taxonomic revision of *Zamia* in Mega-Mexico. *Brittonia*, 61, 301–335.

Nicolalde-Morejón, F., A.P. Vovides, D.W. Stevenson y V. Sosa (2008). The identity of *Zamia katzeriana* and *Zamia verschaffeltii* (Zamiaceae). *Brittonia*, 60, 38–48.

- Nicolalde-Morejón, F., F. Vergara-Silva, J. González-Astorga, D.W. Stevenson, A. P. Vovides y V. Sosa (2011). A characterbased approach in the Mexican cycads supports diverse multigene combination for DNA barcoding. *Cladistics*, 27,150-164.
- Niklas, K.J.y K. Norstog (1984). Aerodynamics and pollen grain depositional patterns on cycad mega strobili: implications on the reproduction of three cycad genera (*Cycas*, *Dioon*, and *Zamia*). *Botanical Gazette*, 145, 92-104.
- Nolasco-Soto, J., J. González-Astorga, F. Nicolalde-Morejón, F. Vergara-Silva, A. Espinosa de los Monteros y A. Medina-Villarreal (2015). Phylogeography and demography history of *Zamia paucijuga* Wieland (Zamiaceae), a cycad species from the Mexican Pacific slope. *Plant Systematics and Evolution*, 301(2), 623-637.
- Normande, B. (2012). Biodiversidad: combatir la sexta extinción masiva. En Worldwatch Institute. La situación del mundo 2012. Hacia una prosperidad sostenible. Barcelona: Icaria. pp 121-129.
- Norstog, K (1986). *Zamia chigua*, a case of mistaken identity? Fairchild Tropical Garden Bulletin, 41, 6–13.
- Norstog, K. 1980. Chromosome numbers in *Zamia* (Cycadales). *Caryologia*, 33: 419–428.
- Norstog, K. J y P.K.S, Fawcett (1989). Insect-cycad simbiosis and its relations to the pollination od *Zamia furfuraceae* (Zamiaceae) by *Rhopalotria mollis* (Curculionidae). *American Journal of Botany* 76(9), 1380-1394.
- Norstog, K.J (1987). Cycads and the origin of insect pollination. *American Scientist*, 75(3), 270-279.
- Norstog, K.J y T.J. Nichols. (1997). The biology of the cycads. Ithaca, New York: Cornell University Press. 122-145.
- Olson, K y R. Gorelick (2011) Chromosomal fission accounts for small scale radiations in *Zamia* (Zamiaceae; Cycadales). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 165,168–185.

Orellana, R y Espada C. 2009. [Online] (Actualizado 5 de enero de 2017) Disponible en: http://www.ccpy.gob.mx/pdf/Regional/escenarios-cambio-climatico/precipitacion_total.pdf. [Acceso 24 Abril 2018].

Orellana, R., G. Islebe y C. Espadas. (2003). Presente, pasado y futuro de los climas de la Península de Yucatán. In: Colunga García Marín P, Larqué-Saavedra A, eds. Naturaleza y sociedad en el área maya, pasado, presente y futuro. Mexico City: Academia Mexicana de Ciencias, CICY 37-52.

Ornelas, J.F., V. Sosa, D.E. Soltis, J.M. Daza, C. González, P.S. Soltis, C. Gutiérrez-Rodríguez, A. Espinosa de los Monteros, T.A. Castoe, C. Bell y E. Ruiz-Sánchez (2013). Comparative phylogeographic analyses illustrate the complex evolutionary history of threatened cloud forests of northern Mesoamerica. PLOS ONE, 8.

Otto-Bliesner, B.L., C.D. Hewitt, T.M. Marchitto, E. Brady, A. Abe-Ouchi, M. Crucifix, S. Murakami y S.L. Weber (2007). Last Glacial Maximum ocean thermohaline circulation: PMIP2 model intercomparisons and data constraints. Geophysical Research Letters, 34, L12706.

Pennington, R.T., D.E. Prado y C.A. Pendry (2000). Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. Journal of Biogeography, 27, 261-273.

Pérez-Farrera M.A., A.P. Vovides, P. Octavio-Aguilar, J. González Astorga, J. de la Cruz-Rodríguez, R. Hernández-Jonapá y S. Maza-Villalobos-Méndez (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., A.P. Vovides, C. Castillejos Ruiz, S. GALICIA, A. Cibrián Jaramillo y S. López (2016). Anatomy and morphology suggest a hybrid origin of *Zamia katzeriana* (Zamiaceae). Phytotaxa, 270(3), 161–181.

Persoon, C.H (1807). Cycadae. Synopsis Plantarum, 2, 630.

Peterson, A.T., M. Papes y J. Soberón (2015). Mechanistic and correlative models of ecological niches. European Journal of Ecology, 1, 28–38.

Phillips, S.J., R.P. Anderson y R.E.Schapire (2006). Maximum Entropy Modeling of Species Geographic Distributions. Ecological Modelling, 190, 231–259.

Pons, O y R.J. Petit (1996). Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics*, 144, 1237-1245.

Poot, J.G. y N.J. Martínez Moreno (2014). Estudio poblacional de *Zamia polymorpha* D.W. Stev., A. Moretti & vázq. Torres (Zamiaceae) en Quintana Roo. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de la Zona Maya. pp. 11-15.

Posada, D y K.A Crandall (2001). Intraspecific gene genealogies: tress grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution*, 16, 37-45.

Posada, D., 2008. jModel Test: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1253-1256.

Quesada, S. (2001). Breve historia de Yucatán. Serie breves historias de los estados de la República Mexicana.EFE, Colegio de México, México. pp 288

Rambaut A. (2009). [Online] (Actalizado 13 de julio de 2017) Disponible en: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> [acceso Octubre 12, 2017]

Ramírez-Barahona, S y L.E. Eguiarte (2013). The role of glacial cycles in promoting genetic diversity in the Neotropics: the case of cloud forests during the Last Glacial Maximum. *Ecology Evolution*, 3, 725-738.

Ramos-Onsins S.E y Rozas, J (2010). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 12, 2092-2100.

Resik, A.H., E.L.Bennett, M.B. Thomas, K.G. Molly, A. Heath, S. Hedges, C. Hilton-Taylor, M. Hoffmann, D.A. Keith, B. Long, D.P. Mallon, E. Meijaard, E.J. Milner-Gulland, A.S.L. Rodrigues, J.P. Rodriguez, P.J.Stephenson, S.N. Stuart y R.P. Young (2018). Quantifying species recovery and conservation success to develop an IUCN Green List of Species. *Conservation Biology*, 32 (5),1128–1138.

Rivadeneyra-Domínguez, E. y J.F Rodríguez-Landa (2014). Las cícadás y su relación con algunas enfermedades neurodegenerativas. *Neurología*, 29(9), 517-522.

Rogers, A.R y H. Harpending (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 552-569.

Ross, N.J (2011). Modern tree species composition reflects ancient Maya forest gardens in northwest Belize. *Ecological Applications*, 21 (1), 75-84.

Rull, V (2012). Cycad diversification and tropical biodiversity. *Collectanea Botanica*, 31, 103-106.

Rzedowskii, J. (2006). Vegetación de México. 1ra. Edición digital. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. México. pp 504.

Sánchez R. L y S. Rebollar (1999). Deforestación en la Península de Yucatán, los retos que enfrentar. *Madera y Bosques*, 5(2), 3–17.

Sánchez, J., G. Muro, E. Estrada y J.A. Alba (2013). El MER: Un Instrumento para evaluar el riesgo de extinción de especies en México. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 12(1), 30–35.

Sánchez, O., R. Medellín, A. Aldama, B. Goettsch, J. Soberón y M. Tambutti (2007). Método de evaluación del riesgo de extinción de las especies silvestres en México (MER). México. pp 22-61.

Sánchez-Sánchez, O y G.A. Islebe (2002). Tropical forest communities in southeastern México. *Plant Ecology*, 158, 183-200.

Schutzman, B., A.P Vovides y B. Dehgan. (1988). Two new species of *Zamia* (Zamiaceae, Cycadales) from Southern Mexico. *Botanical Gazette*, 149, 347-360.

Scott, J.M., B. Csuti, J.E. Estes y H. Anderson (1987). Status Assessment of Biodiversity Protection. *Conservation Biology*, 3(1), 85–87.

Sharer, R. J., L.P. Traxler (2006). *The Ancient Maya* (en inglés). Stanford, California, EE. UU, Stanford University Press. pp 201-212.

Soberón, J., L. Osorio-Olvera y P. Townsend (2017). Diferencias conceptuales entre modelación de nichos y modelación de áreas de distribución. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 88, 437–441.

Soltis, D.E., A.B. Morris, J.S. McLachlan, P.S. Manos y P. S. Soltis (2006). Comparative phylogeography of unglaciated eastern North America. *Molecular Ecology*, 15, 4261–4293.

Stevenson D W. (2001). Flora de Colombia. Monografía N0 21. Orden Cycadales. En Bernal R, Forero E (Eds). Editorial UNIBIBLOS.12pp.

Stevenson D. W. (2004). Zamiaceae of Bolivia, Ecuador, and Peru. In Cycad classification: concepts and recommendations, Walters, T. y Osborne, R. (eds). CABI, Wallingford, pp. 173-194.

Stevenson, D. W, A. Moretti y I. Gaudio (1996). A new species of *Zamia* (Zamiaceae) from Belize and the Yucatan Peninsula of Mexico. *Delpinoa*, 37, 38:3–8.

Stevenson, D. W., A. P. Vovides y V. Sosa (2011). A characterbased approach in the Mexican cycads supports diverse multigene combination for DNA barcoding. *Cladistics*, 27,150-164.

Stevenson, D.W (1981). Observations on ptyxis, phenology, and trichomes in the Cycadales and their systematic implications. *American Journal of Botany*, 68, 1104–1114.

Stevenson, D.W (1990). Morphology and systematics of the Cycadales. *Mem. NY Botanical Garden*, 57, 8–55.

Stevenson, D.W (1992). A formal classification of the extant cycads. *Brittonia*, 44, 220–223.

Stevenson, D.W., A. Moretti, I y Gaudio (1996). A new species of *Zamia* (Zamiaceae) from Belize and the Yucatan Peninsula of Mexico. *Delpinoa*, 37-38, 3-8.

Stewart, J.R., A.M. Lister, I. Barnes, L. Dalén (2010). Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277, 661-671.

Svensson, A., S.W. Nielsen, S. Kipfstuhl, S.J. Johnsen, J.P. Steffensen, M. Bigler, U. Ruth, R.Röthlisberger (2005). Visual stratigraphy of the North Greenland Ice Core Project (NorthGRIP) ice core during the last glacial period. *Journal of Geophysical Research*, 110.

Tajima, F (1989). The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 597-601.

Tang, W (1987). Insect pollination in the cycad *Zamia pumila* (Zamiaceae). American Journal of Botany, 74, 90-99.

Taylor, K.E., R.J. Stouffer y G.A. Meehl (2012). An overview of CMIP5 and the experiment design. Bulletin of the American Meteorological Society, 93, 485-498.

Tellería J.L (1999). Biología de la Conservación: Balance y Perspectiva, Ardeola, 46(2), 239-248.

Terry, I., H.W. Gimme, C. Moore, R. Roemer y H. Craig (2007). Odor-Mediated Push-Pull Pollination in Cycads. Science, 318, 70-71.

Thomsen, P.F y E. Willerslev (2015). Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. Biological Conservation, 183, 4–18.

Toledo V.M. (1982). Pleistocene changes of vegetation in tropical Mexico. In: Prance G.T, ed. Biological Diversification in the Tropics: Proceedings of the Fifth International Symposium of the Association for Tropical Biology, New York: Columbia University Press. 93-111.

TRACER 1.6. [Online] (Actualizado 4 Agosto 2017) Disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/> [acceso Diciembre, 12, 2017].

Udvardy, M. (1969). Dynamic zoogeography, with special reference to land animals. New York: van Nostrand Reinhold. pp 251.

UICN. (2001). Categorías y criterios de la Lista Roja de la UICN. Versión 3.1, segunda edición. Comisión de Supervivencia de Especies de la UICN. Gland, Suiza. pp 6-23.

Vaarama, A (1954) Cytological observations on *Pleurozium schreberi*, with special reference to centromere evolution. Annales Botanici Societatis Zoologicae Botanicae Fennicae "Vanamo", 28, 1-59.

Van der Hammen T.H (1961). The Quaternary climatic changes of northern South America. Annals of the New York Academy of Sciences, 95, 676-683.

Vázquez-Domínguez, E., S. Castañeda-Rico, T. Garrido-Garduño y T. Gutiérrez-García (2009). Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información

genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista Chilena de Historia Natural*, 82, 277-297.

Vela-Pelaez, A.A., N. Torrescano-Valle, G.A. Islebe, J.F. Mas y H. Weissenberger (2018). Holocene precipitation changes in the Maya forest, Yucatán peninsula, Mexico. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 505, 42-52.

Velasco-Martínez, Y. (2015). Variación Genética de *Zamia prasina* W. BULL 1881 (Zamiaceae). Tesis de licenciatura, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Instituto de Ciencias Biológicas. pp. 21-41.

Villaseñor, J.L (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87, 559–902.

Vovides A.P (1983) Systematic studies on the Mexican *Zamiaceae*. I. Chromosome numbers and karyotypes. *American Journal of Botany*, 70, 1002-1006.

Vovides A.P., y M. Olivares (1996). Karyotype polymorphism in the cycad *Zamia loddigesii* (Zamiaceae) of the Yucatán Peninsula, Mexico. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 120. 77-83.

Vovides, A.P (1991a). Insect symbionts of some Mexican cycads in their natural habitat. *Biotropica*, 23(1), 102-104.

Vovides, A.P (1991b). Cone idioblasts of eleven cycad genera: morphology, distribution, and significance. *Botanical Gazette*, 152(1), 91-99.

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

Vovides, A.P y C. Iglesias (1994). An integrated conservation strategy for the cycad *Dioon edule* Lindl. *Biodiversity and Conservation*, 3(2), 137-141.

Vovides, A.P y Nicolalde-Morejón, F (2010). Ficha técnica de *Zamia polymorpha*. In: Vovides AP. (comp.) [Online] <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/ise/fichasnom/Zamia%20polymorpha.pdf> [acceso Marzo, 10, 2018].

Vovides, A.P. y F. Nicolalde-Morejón (2010). Ficha técnica de *Zamia polymorpha*. En: Vovides, A. P. (compilador). Base de datos de la cícadas mexicanas. Instituto de Ecología A.C., INECOL. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. DK008. México, D.F.

Vovides, A.P., K.J. Norstog, P.K.S. Fawcett, M.W. Duncan, R.J. Nash y D.V. Molsen (1993). Histological changes during maturation in male and female cones of the cycad *Zamia furfuracea* and their significance in relation to pollination biology. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 111, 241-252.

Vovides, A.P., N. Ogata, V. Sosa y E. Peña-García (1997). Pollination of the endangered Cuban cycad *Microcycas calocoma* (Miq.) A.DC. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 125, 201-210.

Walker M.J. C, M. Berkelhammer, S. Bjorck, L.C. Cwynar, D.A. Fisher, A.Jj Long, J.J. Lowe, R.M. Newnham, S.O y Rasmussen y H. Weiss (2012). Formal subdivision of the Holocene Series/EPOCH: a Discussion Paper by a Working Group of Intimate (Integration of ice-core, marine and terrestrial records) and the Subcommittee on Quaternary Stratigraphy (International Commission on Stratigraphy). *Journal of Quaternary Science*, 27, 649-659.

Wolf K.H., W.H. Li y P.M. Sharp (1987). Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 9054-9058.

ANEXOS

Anexo 2.1. Coordenadas geográficas de las poblaciones de <i>Zamia prasina</i> empleadas para la evaluación del riesgo de extinción.		
localidad	latitud	longitud
Valladolid	20.633342	-88.343722
Peto	20.125567	-88.980083
Becanché	20.065992	-89.104694
Rancho D.	20.028056	-89.169531
Kaxil Kiuic	20.086944	-89.551528
Champotón	19.04675	-90.405556
Escárcega	18.617028	-90.850889
Palenque	17.539278	-91.959889
Tenosique	17.591472	-91.554000
Virgensita	18.266389	-91.554000
Calakmul	18.409306	-89.899444
Hormiguero	18.359667	-89.491722
Puerto M.	20.862083	-87.035139
Cobá	20.499972	-87.711806
Carrillo P.	19.501583	-88.034056
Bacalar	18.913278	-88.2325
JMM	19.140333	-88.594694
Xhazil	19.400417	-88.092278
Pedro A.S.	18.950778	-88.178833
Panto-Ha	18.578861	-88.454167
Nachicom	18.481778	-88.787833
belice-belice	16.998917	-89.071533
belice-cayo	17.302667	-88.488167
Belize	17.366660	-88.550000
Toledo	16.518056	-88.903056
Toledo	16.550000	-88.775000

Stann Creek	16.51666	-88.36666
Petén	16.66138	-89.67555
Cayo	16.916667	-89.00000
Cayo	16.966667	-88.983333
Cayo	17.050000	-88.966667
Cayo	17.166667	-88.766667
Cayo	17.216660	-88.950000
Belize	17.461380	-88.393880
Belize	17.567770	-88.401940
Quintana Roo	20.850000	-87.000000
Yucatan	21.265556	-88.607222
Stann Creek	16.792222	-88.380556
Cayo	17.118611	-89.103056
Cayo	17.251389	-88.767222
Orange Walk	17.950000	-88.533333
Orange Walk	18.000000	-88.700000
Toledo	16.518056	-88.915000
Cayo	16.868611	-89.045833
Cayo	17.241985	-88.939127
Cayo	16.738141	-88.984855
Belize	17.355973	-88.543223
Belize	17.356006	-88.543037
Belize	17.356107	-88.542438
Belize	17.356111	-88.54244
Belize	17.356206	-88.541651
Belize	17.356173	-88.541353
Belize	17.357165	-88.538967
Cayo	17.240872	-88.942059
Cayo	17.240805	-88.942265
Cayo	17.241268	-88.942883
Cayo	17.241249	-88.942481
Cayo	17.241185	-88.942834
Belize	17.264365	-88.480833
Belize	17.264404	-88.48079

Belize	17.264322	-88.481083
Belize	17.264291	-88.481172
Belize	17.264279	-88.481185
Quintana Roo	20.880000	-87.082000
Chiapas	17.550000	-91.966660
Chiapas	17.316660	-91.666660
Chiapas	17.316660	-91.666660
Yucatan	20.633330	-88.216660
Cayo	16.998910	-89.071530
Belice	17.356940	-88.538880
Belice	17.097220	-88.976940
Quintana Roo	20.500000	-87.750000
Campeche	18.666660	-91.666660
Cayo District	17.133333	-89.200000
Cayo District	17.133333	-89.000000
Stann Creek District	17.533333	-88.500000
Toledo District	16.633333	-89.366666
Toledo District	16.633333	-89.250000
Chiapas	17.510203	-90.983056
Tabasco	17.990000	-90.928869
Quintana Roo	19.181739	-88.879139
Campeche	19.830125	-90.534908
Yucatán	20.709878	-89.144339
Belice	17.189878	-88.480983
Yucatán	20.645833	-88.465278
Yucatán	20.644444	-88.341111
Campeche	18.732500	-90.079722
Quintana Roo	18.676944	-88.391944
Quintana Roo	18.980833	-88.202778
Yucatán	20.105833	-89.048611
Toledo Bz	16.518055	-88.915000
Cayo	17.083330	-89.000000
Cayo	17.118611	-89.103055

Cayo	17.251380	-88.767222
Orange Walk	17.950000	-88.533330
Stann Creek	16.792220	-88.380500
Chiapas	17.510000	-91.980800
Quintara Roo	19.181666	-88.478888
Campeche	19.830000	-90.534700
Yucatán	20.709700	-89.094100
Belice	17.189700	-88.497500
Quintana Roo	18.480820	-88.201889

Annexed 3.1 Environmental variables for 23 *Zamia prasina* populations of our study

Localidades	bio02	bio03	bio04	bio05	bio07	bio11	bio12	bio15	bio17	bio18	bio19
Valladolid	130	68	1899	347	190	227	1220	65	103	452	103
Peto	135	68	1914	356	196	231	1109	62	95	296	111
Becanchén	134	67	1988	356	198	228	1071	62	92	283	103
Rancho Duarte	133	67	2011	353	197	226	1070	61	91	286	101
Kaxil Kiuic	135	66	2196	360	204	227	1029	65	81	277	89
Champotón	132	65	2222	357	203	226	1223	75	66	280	99
Calakmul	117	61	2198	344	189	221	1171	63	89	294	127
Escárcega	127	65	2111	357	194	231	1410	73	81	320	114
Hormiguero	112	61	2179	334	182	215	1171	57	98	322	142
Viergencita	107	62	1986	350	170	237	1624	68	104	352	169
Tenosique	110	63	2009	353	174	236	2169	54	206	473	328
Palenque	109	60	1981	357	181	238	2443	54	246	649	468
Puerto Morelos	100	67	1734	327	149	231	1152	50	129	354	185
Cobá	117	69	1755	336	169	229	1151	53	132	404	139
Carrillo Puerto	114	69	1787	336	165	232	1290	53	137	481	167
Xhazil	111	68	1733	334	161	233	1255	52	135	434	167
José María Morelos	110	66	1786	337	166	232	1087	51	118	351	146
Pedro A Santos	93	68	1552	321	136	235	1467	52	144	457	226
Bacalar	92	68	1528	320	135	236	1445	53	138	530	215
Panto-Ha	95	66	1593	324	142	234	1243	54	112	458	167
Nachicom	104	65	1763	329	160	227	1338	59	113	512	166
Belize-Belize	85	59	1842	306	142	214	1510	47	155	318	241
Belize-Cayo	80	63	1553	310	126	230	2207	51	197	773	364

Annexed 3.2. Genetic diversity of the populations of *Zamia prasina* in the Yucatan Peninsula Biotic Province (YPBP) using the chloroplast DNA region *atpF-atpH*. Number of individuals (N), number of haplotypes (k), haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π).

Population/state	N	k	h	π
Valladolid/Yucatán	5	1	0.00000	0.00000
Peto/Yucatán	4	2	0.50000	0.00110
Becanchén/Yucatán	5	2	0.40000	0.00088
Rancho duarte/Yucatán	4	2	0.50000	0.00110
Kaxil Kiuic/Yucatán	3	1	0.00000	0.00000
Chamotón/Campeche	5	1	0.00000	0.00000
Escarcega/Campeche	5	1	0.00000	0.00000
Virgencita/Campeche	5	4	0.90000	0.00574
Calakmul/Campeche	5	1	0.00000	0.00000
Hormiguero/Campeche	3	3	1.00000	0.01177
Palenque/Chiapa	5	1	0.00000	0.00000
Tenosique/Tabasco	5	1	0.00000	0.00000
Khazil/Quintana Roo	5	2	0.60000	0.00132
Pedro A.Santos/Quintana Roo	5	2	0.40000	0.00088
Panto Ha/Quintana Roo	5	2	0.60000	0.00132
Nachi cocom/Quintana Roo	4	2	0.50000	0.00110
Puerto Morelos/Quintana Roo	5	1	0.00000	0.00000

Cobá/Quintana Roo	5	2	0.60000	0.00132
Carrillo Puerto/Quintana Roo	4	2	0.50000	0.00110
Bacalar/Quintana Roo	5	1	0.00000	0.00000
José María Morelos/Quintana Roo	5	2	0.40000	0.00088
Belize/Belize	2	2	1.00000	0.00221
Belize/Cayo	3	2	0.66667	0.00147
Total	102	9	0.564	0.00186

Annexed 3.3. Genetic diversity of populations of *Zamia prasina* in the Yucatan Peninsula Biotic Province (YPBP) using the nuclear DNA region ITS2. Number of individuals (N), number of haplotypes (k), haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π).

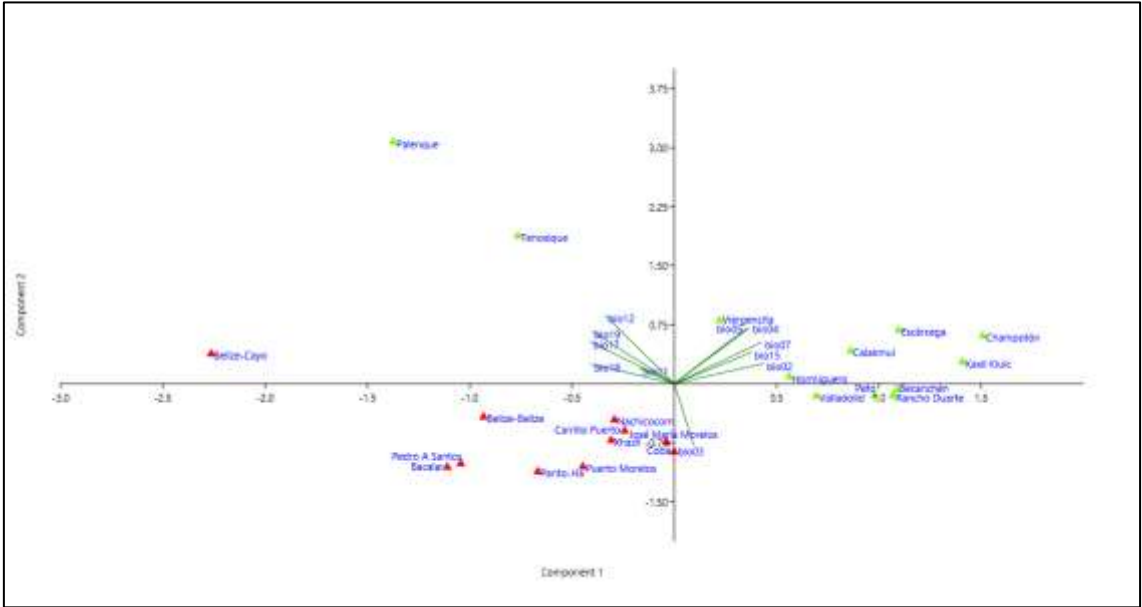
Population/state	N	k	h	π
Valladolid/Yucatán	5	2	0.40000	0.00135
Peto/Yucatán	5	1	0.00000	0.00000
Becanchén/Yucatán	4	4	1.00000	0.00617
Rancho duarte/Yucatán	5	2	0.60000	0.00202
Kaxil Kiuic/Yucatán	3	2	0.66667	0.00224
Champotón/Campeche	5	2	0.40000	0.00135
Escárcega/Campeche	5	3	0.70000	0.00337
Virgencita/Campeche	3	1	0.00000	0.00000
Calakmul/Campeche	4	2	0.50000	0.00168

Hormiguero/Campeche	3	1	0.00000	0.00000
Palenque/Chiapa	5	4	0.90000	0.00404
Tenosique/Tabasco	4	3	0.83333	0.00505
Xhazil/Quintana Roo	5	2	0.60000	0.00202
Pedro A.Santos/Quintana Roo	5	3	0.70000	0.00269
Panto Ha/Quintana Roo	5	3	0.70000	0.00337
Nachi co com/Quintana Roo	4	2	0.50000	0.00168
Puerto Morelos/Quintana Roo	3	2	0.66667	0.00224
Cobá/Quintana Roo	3	2	0.66667	0.00224
Carrillo Puerto/Quintana Roo	4	4	1.00000	0.04433
José M Morelos/Quintana Roo	5	5	1.00000	0.01751
Belice/Belice	2	2	1.00000	0.00337
Belice/Cayo	3	1	0.00000	0.00000
Total	90	18	0.82747	0.00852

Annexed 3.4. List of GenBank accession for haplotypes.		
Genome	Code	GenBank accession
Chloroplast (<i>atpF-atpH</i>)	ZP-A1	MK513628
	ZP-A2	MK513629
	ZP-A3	MK513630
	ZP-A4	MK513631
	ZP-A5	MK513632
	ZP-A6	MK513633
	ZP-A7	MK513634

	ZP-A8	MK513635
	ZP-A9	MK513636
Nuclear (ITS2)	ZP-H1	MK513637
	ZP-H2	MK513638
	ZP-H3	MK513639
	ZP-H4	MK513640
	ZP-H5	MK513641
	ZP-H6	MK513642
	ZP-H7	MK513643
	ZP-H8	MK513644
	ZP-H9	MK513645
	ZP-H10	MK513646
	ZP-H11	MK513647
	ZP-H12	MK513648
	ZP-H13	MK513649
	ZP-H14	MK513650
	ZP-H15	MK513651
	ZP-H16	MK513652
	ZP-H17	MK513653
	ZP-H18	MK513654

Annexed 3.5. Principal Component Analysis (PCA) carried out using data for 19 environmental variables, derived from temperature and precipitation from 23 *Zamia prasina* populations.



Annexed 3.6. Bayesian chronogram for chloroplast sequence *atpF-atpH*. The divergence time of *Zamia prasina* haplotypes in the YPBP and other cycad species is shown. The 95% confidence intervals are shown with purple bars; the numbers at the nodes indicate the estimated age, the numbers below the branches indicate the posterior probability.

