

**Informe final\* del Proyecto GE004**  
**Códigos de barras moleculares (DNA barcoding) en especies mexicanas del género *Zamia***

**Responsable:** Dr. Andrew Peter Vovides Papalouka  
**Institución:** Instituto de Ecología A.C.  
**Dirección:** Km 2.5 Antigua Carretera a Coatepec # 351, Congregación El Haya, Xalapa, Ver, 91070 , México  
**Correo electrónico:** [andrew.vovides@inecol.edu.mx](mailto:andrew.vovides@inecol.edu.mx)  
**Teléfono/Fax:** 01 (228) 842 1800 ext 3007; fax (228) 818 6009  
**Fecha de inicio:** Enero 31, 2008  
**Fecha de término:** Diciembre 8, 2011  
**Principales resultados:** Códigos de barras, informe final  
**Forma de citar\*\* el informe final y otros resultados:** Vovides-Papalouka, A., González-Astorga, J, Vergara-Silva, F., Sosa Ortega, V., Stevenson, D., Pérez-Farrera, M. A., Nicolalde-Morejón, F. y C. Iglesias Delfín. 2010. Códigos de barras moleculares (DNA barcoding) en especies mexicanas del género *Zamia*. Instituto de Ecología, A.C. **Informe final SNIB-CONABIO**, GE004, México D. F.

**Resumen:**

Las cycadas se encuentran entre las especies de plantas tropicales más carismáticas. México es particularmente rico en especies pertenecientes a los géneros *Dioon*, *Ceratozamia* y *Zamia* (Zamiaceae), con un total de 50 especies descritas. Los altos niveles de endemismo presentes (más del 90%) ubican a nuestro país como el segundo de los tres centros de diversidad del grupo a nivel mundial. En el presente proyecto se propone un estudio taxonómico-sistemático de las especies mexicanas del género *Zamia*, conforme a la aproximación molecular denominada 'códigos de barras de DNA' ('DNA barcoding'). En este momento, el DNA barcoding se está convirtiendo en un proyecto científico de escala internacional que pretende establecer criterios objetivos para la identificación de especies, tarea que no sólo tiene el potencial de hacer avanzar enormemente la taxonomía y sistemática básica de los organismos, descritos y aún por describirse, sino también las tareas propias de la biología de la conservación en grupos amenazados.

La base fundamental del estudio propuesto en el presente proyecto es el conjunto de ejemplares vivos de especies mexicanas que componen la Colección Nacional de Cycadas del Jardín Botánico "Francisco Javier Clavijero" del Instituto de Ecología, A. C. (Xalapa, Veracruz). A partir del trabajo de biología molecular con muestras de dichos ejemplares, se construirá una base exhaustiva de secuencias de nucleótidos -los 'DNA barcodes'- para el género *Zamia*. Esta base de datos servirá de referencia para (a) la circunscripción y delimitación finas de especies ya descritas en el género y (b) la identificación de entidades que pudieran representar especies aún no caracterizadas. Posteriormente, la base de datos podrá ser usada por usuarios externos en un contexto de biología de la conservación -por ejemplo, en situaciones de recuperación de información de ejemplares de decomiso por la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA) e instancias internacionales como el CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora), a partir de saqueos ilegales. En función de la simultaneidad de intereses taxonómico-sistemáticos y de biología de la conservación, así como de la posible colaboración con grupos de investigación en otros países, también interesados en cycadas, el estudio aquí propuesto se enmarca de modo natural en el esfuerzo de comprensión exhaustiva y uso racional de la biodiversidad del planeta que anima a los proyectos de códigos de barras de DNA a escala internacional

- 
- \* El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en [www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx)
  - \*\* El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

**Códigos de barras moleculares ('DNA barcoding')  
de las cycadas mexicanas**

**Informe final  
31 de mayo de 2010**

**Institución**

Laboratorio de Biología Evolutiva de Cycadales, Departamento de Biología Evolutiva,  
Instituto de Ecología, A. C.

Carretera Antigua a Coatepec No. 351, Km 2.5, Congregación el Haya,

Xalapa 91070, Veracruz, México

Teléfono: 01-228-8421856, Fax 01-228-8 18 60 09

www.ecologia.edu.mx

**Responsable del proyecto**

Dr. Andrew Peter Vovides Papalouka

Investigador Titular C, SNI 2

andrew.vovides@inecol.edu.mx

Domicilio: "Motmot" cerca Mesa de Gómez,

San Andrés Tlalnahuayocan 91230, Veracruz, México

Teléfono casa: (228) 814-40-87

**Grupo taxonómico**

*Ceratozamia* Brongn.

*Dioon* Lindl.

*Zamia* L.

(**Zamiaceae, Cycadales**)

**Región geográfica**

México

**Clave CONABIO: GE004**

**Monto de financiamiento \$1,000, 000,00**

**Duración del proyecto**

Un año: enero 2008-enero 2009

## Otros participantes del proyecto

Co-responsable del proyecto

**Dr. Jorge González-Astorga**

Investigador Titular A, SNI 1

Responsable del Laboratorio de Genética de Poblaciones

Departamento de Biología Evolutiva, Instituto de Ecología, A. C.

[jorge.gonzalez@inecol.edu.mx](mailto:jorge.gonzalez@inecol.edu.mx)

**Dr. Francisco Vergara-Silva**

Investigador Asociado C, SNI 1

Laboratorio de Sistemática Molecular

Instituto de Biología (Jardín Botánico), UNAM

[fvs@ibiologia.unam.mx](mailto:fvs@ibiologia.unam.mx)

**Dr. Fernando Nicolalde-Morejón**

Doctorado en Ciencias, Instituto de Ecología, A. C.

[f\\_nicolalde@yahoo.com](mailto:f_nicolalde@yahoo.com)

**Dra. Victoria Sosa Ortega**

Investigadora Titular B, SNI 2

Laboratorio Molecular de Plantas Mexicanas

Departamento de Biología Evolutiva, Instituto de Ecología, A. C.

[victoria.sosa@inecol.edu.mx](mailto:victoria.sosa@inecol.edu.mx)

**Dr. Dennis Wm. Stevenson**

Vice President and Rupert Barneby Curator for Botanical Science, New York Botanical Garden

Editor, *Cladistics* y *The Botanical Review*

[dws@nybg.org](mailto:dws@nybg.org)

**Dr. Miguel Ángel Pérez-Farrera**

Profesor Investigador, SNI 1

Escuela de Biología, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas

[perezfarreram@yahoo.com.mx](mailto:perezfarreram@yahoo.com.mx)

**M. en C. Carlos Iglesias Delfín**

Técnico Académico Titular C.

Jardín Botánico “Francisco Javier Clavijero”

Secretaría Técnica, Instituto de Ecología, A. C.

[carlos.iglesias@inecol.edu.mx](mailto:carlos.iglesias@inecol.edu.mx)

## ***Resumen***

México tiene índices muy altos de diversidad de especies en Cycadales, uno de los cuatro grupos de gimnospermas no extintas al nivel de Orden. La sistemática del grupo ha avanzado mucho recientemente, especialmente gracias al uso de secuencias nucleotídicas que han generado gran cantidad de caracteres que se añaden a un relativamente reducido número de atributos morfológicos, utilizados tradicionalmente para la clasificación intergenérica y/o interespecífica. En fechas recientes, el uso de caracteres de DNA, no sólo en cycadas sino de manera general, se ha extendido de la sistemática molecular a la taxonomía *per se*, a partir de la observación de que algunas regiones del genoma podrían comportarse de manera prácticamente invariante al interior de las poblaciones, al tiempo que podrían variar entre especies. La investigación básica sobre los patrones de variación en estas regiones genómicas, que en la literatura científica se han dado en llamar “códigos de barras de DNA” (“DNA barcodes”; Hebert et al. 2003), ha tenido un gran impulso en la presente década. Se piensa que el establecimiento de códigos de barras ‘universales’ sería un avance extraordinario para la taxonomía, pues podría automatizar la identificación de especies tanto en el campo como en colecciones biológicas, al tiempo que tendría aplicaciones en una multitud de ámbitos donde la sociedad sería la usuaria del conocimiento taxonómico especializado (por ejemplo, las industrias forestal y pesquera, las aduanas e instituciones médicas interesadas en diagnosticar especies de manera rápida y confiable, etc.). Sin embargo, la construcción de bibliotecas de referencia de códigos de barras universales en especies vegetales, que permitan la generalización de esta aproximación, ha representado el mayor reto entre todos los grupos taxonómicos donde se han hecho pruebas empíricas de laboratorio. Aunque ya se tienen propuestas robustas, hasta la fecha no ha sido posible dilucidar, y por lo tanto llegar a un consenso internacional, acerca de qué regiones genómicas serían óptimas para una identificación correcta de un alto porcentaje de las especies biológicas reconocidas en múltiples grupos taxonómicos de plantas. El presente proyecto es el primer esfuerzo sistemático por construir una biblioteca de referencia de códigos de barras moleculares para las cycadas mexicanas (Zamiaceae, Cycadales). Los resultados presentados, además, contribuyen a la discusión general sobre la posibilidad de establecer regiones que se comporten como códigos de barras universales confiables en plantas, o la necesidad de proponer

alternativas –por ejemplo, el uso de regiones adicionales *ad hoc*– para lograr altos porcentajes de identificación molecular exitosa en base a bibliotecas de referencia robustas.

***Palabras clave:*** *Ceratozamia*, Código de barras de DNA, *Dioon*, México, *Zamia*.

### ***Objetivo general***

Generar una base exhaustiva de códigos de barras moleculares, representados por secuencias selectas de DNA de cloroplasto, para las especies de Cycadas Mexicanas, a partir de la Colección Nacional de Cycadas del Jardín Botánico “Francisco Javier Clavijero” del Instituto de Ecología, A. C.

### ***Objetivos particulares***

1. Examinar la variabilidad nucleotídica en loci empleados como códigos de barras de DNA, provenientes de DNA de cloroplasto y núcleo.
2. Determinar la utilidad de los códigos de barras moleculares para la identificación de especies en los géneros *Ceratozamia*, *Dioon* y *Zamia*.
3. Reanalizar la circunscripción de complejos de especies de *Zamia*, propuestos previamente con criterios tradicionales, principalmente morfológicos.
4. En su caso, delimitar entidades taxonómicas (‘especies’) aún no identificadas formalmente.
5. Colaborar y promover la recuperación de información de ejemplares provenientes de decomisos potenciales tanto por la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA) como de la CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora), a partir de saqueos ilegales. Asimismo, rescatar información de ejemplares antiguos del Jardín Botánico, de los cuales se han extraviado los datos originales de colecta.

### ***Antecedentes***

Formalmente, la aproximación de ‘códigos de barras de DNA’ o ‘DNA barcoding’ ha sido definida como “un nuevo sistema diseñado para proveer identificaciones rápidas de especies, precisas y automatizadas, mediante el uso de regiones génicas cortas y estandarizadas, usadas como etiquetas internas de especies” (Hebert y Gregory 2005: 852). Actualmente, el uso de dichos segmentos del genoma para hacer ‘taxonomía molecular’ se está convirtiendo en un proyecto científico de escala internacional, que pretende establecer criterios objetivos para la identificación de especies. Esta tarea no

sólo tiene el potencial de hacer avanzar enormemente la taxonomía y sistemática básica de los organismos, descritos y aún por describirse, sino también las tareas propias de la biología de la conservación en grupos amenazados. Además de la puesta al servicio de la información molecular para la delimitación objetiva de unidades taxonómicas ya reconocidas, el auxilio en el proceso científico de descubrimiento de nuevas especies ('species discovery' *sensu* DeSalle 2006) es probablemente el objetivo más llamativo del esfuerzo internacional por establecer y aplicar los códigos de barras moleculares.

Dada su clara orientación sistemático-taxonómica, muchos trabajos iniciales de DNA barcoding se han orientado hacia el estudio de grupos distribuidos en las regiones del planeta con mayores índices de diversidad biológica. Por esta razón, es de llamar la atención que algunos de los casos más visibles relacionados con la delimitación taxonómica molecular, y el posible descubrimiento de entidades biológicas no reconocidas previamente al nivel de especie (por ejemplo, las así llamadas especies 'crípticas' o 'criptoespecies'), correspondan a estudios en grupos taxonómicos de distribución tropical, como Lepidoptera (Hebert et al. 2004; Hajibabaei et al. 2006), Arachnida (Barrett y Hebert 2005) y algunos grupos de plantas, como las orquídeas (Lahaye et al. 2008). Desde el punto de vista de grupos de investigación sobre biodiversidad en países como México, esta situación es de especial interés. Entre las conclusiones preliminares de estudios como los citados anteriormente, se ha afirmado que "las especies crípticas son prevalecientes en las regiones tropicales, lo cual es, un asunto crítico en los esfuerzos por documentar la riqueza global de especies" (Hebert et al. 2004: 14812).

En este contexto, el presente proyecto es una contribución a la iniciativa internacional de códigos de barras de DNA, empleando como grupo de estudio a las cycadas que ocurren en México. A partir de un muestreo completo de material biológico, proveniente de colectas de campo y de la Colección Nacional de Cycadas (Jardín Botánico F. J. Clavijero, Xalapa, Veracruz, México), en este proyecto se realizaron ensayos exploratorios con varias regiones codificantes y no-codificantes del genoma del cloroplasto –a saber, *rpoCl*, *rpoB*, *trnH-psbA*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI*, *matK*– así como con los espaciadores internos transcritos (*ITS*) del genoma nuclear. Los resultados obtenidos mediante el análisis de las matrices moleculares con el "sistema de

organización de atributos característicos” (CAOS, implementado en el software del mismo nombre; Sarkar et al. 2008) muestran que, en general el éxito de identificación molecular de las especies de cycadas mexicanas, es del 78%.

### ***Grupos taxonómicos***

De acuerdo con Stevenson (1992), el orden Cycadales incluye tres familias: Cycadaceae, Stangeriaceae y Zamiaceae. La familia Zamiaceae contiene el mayor número de géneros descritos –en orden alfabético, estos géneros son *Ceratozamia*, *Chigua*, *Dioon*, *Encephalartos*, *Lepidozamia*, *Macrozamia*, *Microcycas* y *Zamia* (Norstog y Nicholls 1997). En México hay tres géneros con un total de 52 especies: *Ceratozamia* cuenta con 25 especies, de las cuales 24 son endémicas a México y una especie (*Ceratozamia hondurensis*) endémica a Honduras; el género *Dioon* actualmente tiene 14 especies, de las cuales 13 son endémicas a México, y una especie *D. mejiae* endémica a Honduras. El género *Zamia* incluye 61 especies (Hill et al. 2007; Taylor et al. 2009) y representa uno de los géneros del orden Cycadales más complejos y difíciles de caracterizar, dada su alta variación morfológica, ecológica y genética (Norstog & Nicholls 1997; González-Astorga et al. 2006, Nicolalde-Morejón et al. 2009a). Varios tratamientos taxonómicos regionales han sido propuestos; sin embargo, la insuficiente colecta de material botánico, en particular de áreas de difícil acceso, ha representado una limitante para los avances taxonómicos que el género requiere. En el presente estudio se estudiaron las especies del género *Zamia* que se distribuyen en el territorio nacional (15), según el último tratamiento taxonómico presentado por Nicolalde-Morejón et al. (2009a), el cual incluye 12 especies endémicas para México (Los nombres de la especies pueden ser consultados en la Tabla 1).

### ***Área Geográfica***

La distribución de las cycadas mexicanas está asociada a las principales cadenas montañosas como la Sierra Madre Occidental (SMO), Sierra Madre Oriental (SMO), Sierra Madre del Sur (SMS), Sierra Madre de Chiapas (SMCH) y la Sierra de Juárez (SJ); además, algunas especies están distribuidas ampliamente sobre la planicie costera del Golfo de México y la Península de Yucatán. En lo que respecta, a la distribución y los

tipos de vegetación que cada género ocupa en México, es necesario presentar una descripción particularizada para cada género; *Ceratozamia* se distribuye principalmente asociado al Bosque Mesófilo de Montaña, a la Selva Alta Perennifolia y algunas especies asociadas a bosque de Pino-Encino; el rango altitudinal que ocupan las especies de este género, fluctúa entre 0-1800 m. En contraste el género *Dioon*, se distribuye principalmente sobre ambientes xéricos, como por ejemplo el Valle de Tehuacan-Cuicatlán, sin embargo, especies como *D. rzedowskii* y *D. spinulosum* se distribuyen sobre ambientes húmedos como la Selva Alta Perennifolia sobre la Cuenca Alta del Río Papaloapan. El rango altitudinal que este género ocupa va desde el nivel del mar (*Dioon edule*, El Farallón, Veracruz), hasta los 2,100 m aproximadamente. *Zamia* se distribuye en toda la región Neotropical, desde el sur de los estados de Georgia y Florida (Estados Unidos) y las Antillas Mayores, hasta Bolivia en el subcontinente sudamericano (Norstog y Nicholls 1997). En México, su distribución incluye la planicie costera del Golfo, desde el estado de Tamaulipas hasta la península de Yucatán. Del lado occidental, el género se distribuye sobre la planicie costera del Océano Pacífico, desde Nayarit hasta Chiapas. Su distribución altitudinal fluctúa entre 0-1000 m (Nicolalde-Morejón et al. 2009) y generalmente está asociada al Bosque Tropical Perennifolio, al Bosque de Encinos, Bosque de Coníferas y acahuales en el caso particular de *Z. loddigesii*.

### ***Técnicas y métodos***

#### Colecta de material biológico y trabajo de campo

*Estandarización de protocolos.* La colecta de material biológico fue dividida en dos partes. La primera sirvió para estandarizar los protocolos de amplificación y para la evaluación de la variación de los loci propuestos como ‘códigos de barras universales’. Se emplearon tres individuos por cada especie de cycada mexicana conocida, y para contrastar la utilidad de los loci ensayados dentro del orden Cycadales, se incluyó un individuo del mayor número de especies de *Ceratozamia*, *Dioon* y *Zamia* que se distribuyen fuera del México, además se incluyó al menos un individuo por cada género de cycada no mexicana, para de este manera garantizar un muestreo a nivel del orden (ver Tabla 1). Conforme a la propuesta original, el material biológico (tejido foliar) correspondiente fue obtenido a partir de especímenes vivos albergados en la Colección

Nacional de Cycadas del Jardín Botánico F. J. Clavijero (JBC), del Instituto de Ecología, A. C., en Xalapa.

*Estimación de variabilidad nucleotídica en loci selectos, candidatos a ser ‘códigos de barras’ en las cycadas mexicanas.* En la segunda parte, la cual se desarrolló en paralelo al descubrimiento empírico de los niveles de variabilidad nucleotídica de los loci seleccionados del consenso de Taipei (Pennisi 2007) para las muestras de la Colección Nacional, se realizaron colectas en campo a nivel poblacional para las especies del género *Zamia*, cubriendo la totalidad del rango de distribución de la mayoría de las especies (Tabla 2). Específicamente, con una parte importante del aporte económico de este proyecto, se hicieron colectas a nivel poblacional de *Zamia fischeri*, en los municipios de Ciudad Valles y El Naranjo, San Luís Potosí. Asimismo, se realizó una colecta de materiales de *Z. loddigesii* en el municipio de Aldama, Tamaulipas, y en los municipios de Tuxtepec y San Bartolomé Ayautla, Oaxaca. El material utilizado para las especies *Z. polymorpha*, *Z. lawsoniana* y parte de *Z. loddigesii* fue colectado desde los especímenes vivos albergados en la Colección Nacional de Cycadas del Jardín Botánico F. J. Clavijero. Para el resto de las especies, se utilizó material colectado durante los últimos cuatro años por el equipo de trabajo de cycadas del INECOL, mismo que se encuentra resguardado en el Laboratorio de Genética de Poblaciones. Cabe mencionar que, para *Z. vazquezii*, no fue posible coleccionar material a nivel poblacional, debido a que la población tipo de esta especie ya no existe (Mario Vázquez-Torres, com. pers.) y no se conocen registros de otras poblaciones.

#### Trabajo de laboratorio

*Extracción de DNA genómico.* Se realizaron extracciones de DNA genómico de todas las especies de cycadas mexicanas. Este proceso fue dividido en dos partes, conforme a la propuesta de colecta de material biológico:

a) La primera parte consistió en extraer DNA de tres individuos por especie, para la cual se utilizó el material de plantas vivas depositadas en la Colección Nacional de Cycadas, del Jardín Botánico Francisco Javier Clavijero (JBC); para ello, se usó un diseño

experimental correspondiente para evaluar la variabilidad nucleotídica de todos los loci propuestos como potenciales códigos de barras de DNA en plantas (Pennisi 2007); b) la segunda parte consistió en muestreos poblacionales (los nombres de las especies, número de individuos colectados, poblaciones, y rango de distribución de las especies se presentan en la Tabla 2). Durante ésta fase, se extrajo DNA a nivel poblacional, con el objeto de construir la biblioteca de referencia de códigos de barras de *Zamia* para México.

La extracción del DNA se hizo con dos procedimientos de laboratorio: (1) un método de extracción basado en el protocolo propuesto por Doyle y Doyle (1987), modificado específicamente para cycadas, y (2) el método indicado por el fabricante del DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen). La inspección cualitativa de las muestras de DNA extraídas se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa.

*Amplificación de genes mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).* El procedimiento molecular empleado de manera central fue la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés; Mullis y Faloona 1987), usando las muestras del DNA correspondiente como templados de la reacción. Las reacciones de amplificación fueron realizadas con las combinaciones de primers adecuados para amplificar los loci propuestos como códigos de barras moleculares en plantas (Kress et al. 2005, Cowan et al. 2006, Pennisi 2007, Sass et al. 2007, Fazekas et al. 2008, Lahaye et al. 2008). Con base en las propuestas de loci que se podrían llegar a establecer como ‘códigos de barras universales’, se llevaron a cabo ensayos exploratorios con regiones del genoma del cloroplasto. Dichas regiones corresponden a las proteínas ribosomales *rpoCI* y *rpoB*, a las regiones intergénicas *trnH-psbA*, *atpF-atpH* y *psbI-psbK*, y a las regiones codificantes de la maturasa K (*matK*) y *rbcL*. Asimismo, se exploraron las regiones del genoma nuclear que corresponden a los espaciadores intergénicos transcritos *ITS*, *ITS1* y *ITS2* (para más detalles, sobre estas regiones, consultar la Tabla 3). Los protocolos de amplificación por PCR empleados corresponden a trabajos previos sobre código de barras moleculares en plantas (Tabla 4). Las amplificaciones de los genes antes mencionados fueron visualizadas a través de electroforesis en geles de agarosa.

*Purificaciones de reacciones de PCR.* Las amplificaciones se purificaron mediante el uso de kits comerciales (QIAquick® PCR Purification Kit, Qiagen). Para el caso exclusivo del locus *trnH-psbA*, fue necesario realizar la purificación desde las bandas de amplificación observadas en el gel de agarosa, debido a que siempre se obtuvieron dos moléculas de diferente peso (observables como dos bandas diferentes en los geles). Por otra parte, las amplificaciones obtenidas para el resto de loci donde la amplificación fue exitosa, y que dieron como resultado productos específicos (es decir, una sola banda) del peso molecular esperado, se limpiaron directamente desde la reacción de amplificación.

#### Secuenciación automatizada y análisis de los datos moleculares

*Secuenciación.* Las reacciones de secuenciación se realizaron a partir de productos purificados. Los primeros ensayos se realizaron en las instalaciones de secuenciación existentes en el Instituto de Ecología, A. C., Xalapa. Una vez analizadas estas muestras piloto y confirmada la identidad correcta de los amplificados, el mayor porcentaje de muestras secuenciadas se realizó a través de la empresa Macrogen, ubicada en Corea del Sur (<http://www.macrogen.com>) (Número de acceso al GenBank-National Center for Biotechnology Information-, pueden ser consultados en la Tabla 5).

*Análisis de datos.* El empalme o ensamblaje de las secuencias directamente obtenidas de los servicios de secuenciación automatizada se realizó con el programa Sequencher v. 4.8 (Gene Code Corp., Ann Arbor, Michigan, EUA). La alineación de las secuencias ensambladas de cada gen por cada individuo y/o especie se efectuó con el programa Clustal X (Thompson et al. 1997) bajo el modo de alineamiento múltiple, a través de la interfase BioEdit 7.0.9 (Hall 1999). Todos los archivos de secuencias alineadas fueron almacenados en formato NEXUS, y luego exportados al programa MacClade (Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, EUA) para los posteriores análisis de caracteres. Los análisis computacionales para la identificación de caracteres diagnósticos útiles para constituir los códigos de barras moleculares especie-específicos se realizaron con el programa P-GNOME, que implementa la estrategia de identificación de sitios diagnósticos del recientemente publicado “sistema de organización de atributos característicos” (“characteristic attribute organization system” o “CAOS”; Sarkar et al. 2008). Para llevar

a cabo dichos análisis, se siguió el instructivo de los programadores y la descripción del software en el artículo original.

## **Resultados obtenidos**

### Identificación de variación nucleotídica en los diferentes loci

*Éxito en la amplificación en el grupo de estudio.* De los loci ensayados para el genoma del cloroplasto, *psbI-psbK*, *atpF-atpH*, *rpoC1* y *trnH-psbA* amplificaron satisfactoriamente con las especies de los tres géneros de cycadas mexicanas y en el resto de géneros del orden. La pareja de primers *matKKew* presentó problemas de amplificación para algunas especies de *Zamia*, pero amplificó de manera óptima únicamente en *Ceratozamia*, en contraste, la pareja de primers *matKKim*, no permitieron amplificaciones exitosas en ninguna especie del orden. Por otro lado, la amplificación de *rpoB* fue exitosa solamente con las especies del género *Dioon*. En cuanto a los loci nucleares, se tuvo éxito con la amplificación del fragmento completo de *ITS* (18S-26S) solamente en *Ceratozamia*, no obstante, ensayos posteriores confirmaron una buena amplificación del fragmento *ITS2* en *Zamia* (Tabla 1).

### *Estimación de niveles de variación nucleotídica.*

En general, de los cuatro loci que amplificaron con todas las especies de cycadas mexicanas, dos de ellos (*rpoC1*, *trnH-psbA*), no presentaron suficiente variación nucleotídica que permitiera la discriminación entre especies. Sin embargo, los dos espaciador intergénicos de cloroplasto *psbI-psbK* y *atpF-atpH* fueron las regiones que más aportaron con sitios variables para la identificación molecular entre las especies investigadas, bajo este escenario y considerando que no todos los loci amplificaron de manera homogénea, la combinación de loci óptimos para alcanzar el mayor porcentajes de especies identificables, es diferente para cada género.

De los seis loci que amplificaron en *Zamia*, tres de ellos (*rpoC1*, *trnH-psbA* y *matK*, éste último con los primers de Kew) no presentaron suficiente variación nucleotídica que permita la discriminación entre especies. Sin embargo, los espaciadores intergénicos de cloroplasto *psbI-psbK* y *atpF-atpH*, así como el espaciador interno transcrito *ITS2*, perteneciente a los complejos ribosomales nucleares, fueron regiones que

presentaron variación para la identificación entre las especies investigadas. Nuestros análisis de sitios diagnóstico según CAOS muestran que el uso conjunto de los loci *psbI-psbK*, *atpF-atpH* y *ITS2* permite que el porcentaje de éxito de identificación en *Zamia* se incremente, con relación al uso individual de cualquiera de estos loci, hasta llegar al 75% (18/24), esto último considerando todas las especies de *Zamia* analizadas. En contraste en *Ceratozamia*, la combinación de los loci *psbI-psbK*, *atpF-atpH*, *matK* e *ITS*, permiten obtener un éxito de identificación del 78% (18/23), para este género *rpoC1* no contribuye con sitios diagnósticos. Para el género *Dioon*, los espaciadores intergénicos *psbI-psbK* y *atpF-atpH* fueron los loci que mayor número de sitios diagnósticos aportaron al proceso de identificación de especies, con los cuales se obtuvo un 79% (11/14) de éxito, los loci *rpoC1* y *rpoB*, no aportan sitios diagnósticos para identificar entre especies del género *Dioon* (ver Tabla 6).

En el contexto global de la variación, observamos que el conjunto de loci ensayados presenta suficiente variación para discriminar entre los géneros de cycadas mexicanas; sin embargo, a nivel de todo el orden, los loci de mayor éxito de amplificación no son suficientes para identificar molecularmente los géneros *Chigua* y *Lepidozamia* (ver Tabla 7). Entre los loci ensayados, la región no-codificante *trnH-psbA* presenta cuatro ‘indeles’ que varían consistentemente entre géneros (*Ceratozamia*, *Dioon* y *Zamia*). Esta inesperada variación estructural podría ser de utilidad para propósitos de sistemática a nivel de género.

### Implicaciones taxonómicas

Complejo *Zamia loddigesii*. Este complejo de especies está conformado por *Z. loddigesii*, *Z. polymorpha* y *Z. paucijuga*, y se lo define en función de afinidades morfológicas, en especial, de naturaleza foliar (hojas y folíolos). La falta de atributos morfológicos diagnósticos es la razón por la cual estas especies son catalogadas como las de mayor dificultad para su identificación taxonómica, tanto en ejemplares de herbario como en colecciones vivas. Por lo anterior, su determinación siempre ha estado asociada convencionalmente a procedencias geográficas; lo anterior, aunado a la complejidad nomenclatural que representa *Z. loddigesii* –especie para la cual se han descrito un total de 12 nombres afines y que actualmente representan sinonimias (Nicolalde-Morejón et al.

2009a) – aumenta la complejidad y su identificación objetiva de estos tres taxa. Bajo este contexto, uno de los objetivos de este proyecto fue el investigar posibles sitios diagnósticos moleculares para estas especies, considerando en el universo de muestreo todas las localidades posibles que abarquen el rango de distribución de éstas, y también incluyendo en este análisis las localidades tipo de las especies (nombres) actualmente bajo el estatus de sinonimia de *Z. loddigesii*.

En el caso de *Zamia loddigesii*, especie que se distribuye a lo largo de Golfo de México, desde Tamaulipas hasta Tabasco, entre 0-800 m de altitud, no se detectó variación nucleotídica suficiente para reconsiderar la circunscripción de esta especie y sus 12 nombres afines. Sin embargo, es importante hacer notar que las especies *Z. lawsoniana* Dyer (Tabasco) y *Z. sylvatica* Cham. (Tuxtepec-Oaxaca) muestran ligeras variaciones morfológicas con respecto a las poblaciones que se distribuyen en Veracruz y Tamaulipas. En contraste, el análisis con CAOS a nivel poblacional mostró que para *Z. polymorpha*, especie que se distribuye en la Península de Yucatán y *Z. loddigesii* existen sitios diagnósticos característicos para cada una de las especies (ver Tabla 8). Con ayuda de la descripción de atributos morfológicos, particularmente reproductivos (Nicolalde-Morejón et al. 2009a), estas dos especies de *Zamia* pueden ser identificadas tanto morfológicamente como molecularmente.

Complejo *Zamia furfuracea*. Esta especie se distribuye sobre dunas costeras en la parte centro-sur de Veracruz, y su variación morfológica y molecular a lo largo de su distribución no había sido evaluada a detalle. Indicios preliminares de variación morfológica habían sugerido la posibilidad de la existencia de *Z. sp.* ‘jarocho’ (especie putativa, propuesta originalmente en este proyecto), la cual sería evaluada en función de los resultados que arrojara el análisis molecular realizado en el presente trabajo sobre códigos de barras moleculares para *Zamia* en México. Los resultados moleculares basados en dos de los loci más variables (*psbK-psbI* e *ITS2*) nos confirmaron la existencia de una sola entidad taxonómica, *Z. furfuracea*, a la misma conclusión se llegó con un estudio de genética de poblaciones con la misma especie con aloenzimas (Limón 2009).

## **Discusión y conclusiones**

Gracias a su cobertura poblacional detallada, la información molecular obtenida en el presente estudio es, probablemente, suficiente para elaborar una biblioteca de referencia de códigos de barras de DNA para el género *Zamia* en México. En virtud de lo anterior, consideramos que hemos cumplido el objetivo primario del proyecto. El estudio, a su vez, proporciona una buena pauta para una investigación posterior que se extendiese, con el mismo grado de detalle en el muestreo, a los géneros *Ceratozamia* y *Dioon*.

En términos de la taxonomía alfa, la biblioteca de referencia de códigos de barras moleculares para el género *Zamia* abre la puerta para revisiones críticas de la circunscripción de especies del género presentes en nuestro país, circunscripción para la cual recientemente se ha publicado un análisis exhaustivo que sirve de base (Nicolalde-Morejón et al. 2009a). Simultáneamente, dicha biblioteca molecular de referencia taxonómica constituye la base para el objetivo primario de los códigos de barras de DNA: la identificación automatizada, confiable, de *cualquier* ejemplar del género que se presente, aún sin ninguna información taxonómica asociada. Estas identificaciones, por supuesto, no sólo se restringirían al ámbito de investigación básica –por ejemplo, a la hora de ingresar un nuevo ejemplar en una colección viva– sino que podrían ampliarse a contextos aplicados, y así ser útiles para diagnosticar la identidad taxonómica de plantas decomisadas a saqueadores y/o traficantes. Del mismo modo, la biblioteca será de gran utilidad para la identificación de ejemplares vivos, ya existentes en las colecciones de los jardines botánicos, para los cuales sin embargo no se cuenta con datos de procedencia.

El análisis crítico de la contribución científica potencial de nuestros datos, nos permite afirmar que hemos detectado que las regiones del genoma que hasta el momento han sido propuestas como los candidatos más fuertes para ser ‘códigos de barras universales’ en las plantas vasculares (ver, por ejemplo, Lahaye et al. 2008, Ford et al. 2009) y en especial, el artículo publicado por el grupo de investigadores del Consorcio para los Códigos de Barras de la Vida (CBOL Plan Working Group 2009) en el cual plantean que *matK* y *rbcL* deben ser los loci elegidos de manera universal como códigos de barras de DNA en plantas, en este contexto y contrario a nuestros resultados, dicho planteamiento no necesariamente funciona de manera óptima para un importante subgrupo de gimnospermas neotropicales como son las cycadas mexicanas. En los artículos de investigación original derivados del presente proyecto (Ver Nicolalde-

Morejón 2009c; Nicolalde-Morejón et al. 2010), éste es uno de los puntos fuertes que discutimos, argumentando que debe dejarse abierta la opción de desarrollar o emplear códigos de barras moleculares *ad hoc* para grupos en los cuales se tenga información empírica detallada que apunta al uso de regiones alternativas, como es el caso de nuestros taxa de estudio.

Asimismo, nuestros datos indican que las sugerencias recientes acerca de un ‘límite intrínseco’ de aproximadamente 70% para los porcentajes de especies que es posible discriminar exitosamente con códigos de barras moleculares (ver, por ejemplo, Seberg y Petersen 2009) deben ser consideradas con detenimiento. Creemos que un trabajo que está por hacerse a este respecto (una especie de ‘meta-análisis de DNA barcoding’) debería incluir la evaluación del uso conjunto de *matK* y *rbcL* más algunos loci *ad hoc* en una amplia variedad de grupos taxonómicos, para corroborar qué tan generalizable puede ser el ‘límite del 70%’ en estudios de códigos de barras moleculares en plantas. También, sin embargo, consideramos que con un muestreo igualmente diverso, debe evaluarse la posible sobreestimación de la diversidad de especies en aquellos grupos donde claramente no se alcance un 100% de identificación inequívoca, como es nuestro caso. Para este efecto, recomendamos enfáticamente el uso de la estrategia que nuestro grupo de investigación recientemente puso en práctica para la descripción de *Dioon stevensonii* (Nicolalde-Morejón et al. 2009b), en la cual se evalúan diferentes fuentes de evidencia siguiendo el concepto cladístico de ‘iluminación recíproca’. En última instancia, estrategias de ‘taxonomía integrativa’ como la ejemplificada en la propuesta de dicha nueva especie de *Dioon* serán útiles también para contribuir a la discusión sobre las diferencias entre ‘DNA barcoding’ y ‘DNA taxonomy’, recientemente discutidas en la literatura sobre aspectos conceptuales del ‘renacimiento taxonómico’ (ver, por ejemplo, DeSalle 2005) que la iniciativa internacional de códigos de barras de DNA promete hacer realidad en el siglo XXI.

## Referencias

- Barrett RDH, Hebert PDN (2005) Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology* **83**: 481-491.
- CBOL Plan Working Group (2009) A DNA Barcode for land plants. *Proceedings of the*

*National Academy of Sciences USA* **106**: 12794-12797

- Cowan RS, Chase MW, Kress WJ, Savolainen V (2006) 300,000 species to identity: problems, progress, and prospects in DNA barcoding of land plants. *Taxon* **55**: 611-616.
- DeSalle R, Egan MG, Siddall M (2005) The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **360**: 1905-1916.
- DeSalle R (2006) Species discovery versus Species identification in DNA barcoding efforts: Response to Rubinoff. *Conservation Biology* **20**: 1545-1547.
- DeSalle R (2007) Phenetic and DNA Taxonomy; a comment on Waugh. *BioEssays* **29**: 1289-1290.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11-15.
- Fazekas AJ, Burgess KS, Kesanakurti PR, Graham SW, Newmaster SG, Husband BC, Percy DM, Hahibabaei M, Barret SCH (2008) Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *Public Library of Science ONE* **3**: 7-e2802.
- Ford CS, Ayres KL, Toomey N, Haider N, van Alphen Stahl J, Kelly LJ, Wikström N, Hollingsworth PM, Duff RJ, Hoot SB, Cowman RS, Chase MW, Wilkinson MJ (2009) Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* **159**: 1-11.
- González-Astorga J, Vovides AP, Octavio-Aguilar P, Aguirre-Fey D, Nicolalde-Morejón F. y Iglesias C (2006) Genetic diversity and structure of the cycad *Zamia loddigesii* Miq. (Zamiaceae): implications for evolution and conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society* **152**: 533-544.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hill KD, Stevenson DW y Osborne R (2007) The world list of cycads/La lista mundial de Cícadas. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **97**: 454-483.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society London B Biological*

- Sciences* **270**: 313-321.
- Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN (2006) DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**: 968-971.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society London B Biological Sciences* **270**: 313-321.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **101**: 14812-14817.
- Hebert PDN, Gregory TR (2005) The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology* **54**: 852-859.
- Hillis DM, Moritz C, Mable BK (eds) (1996) *Molecular Systematics*, 2nd edition. Sunderland Mass, USA, Sinauer Associates, Inc.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **102**: 8369-8374.
- Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, Warner J, Pupulin F, Gigot G, Maurin O, Duthoit S, Barraclough TG, Savolainen V (2008) DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **105**: 2923-2928.
- Limón SF (2009) Genética de poblaciones de *Zamia furfuraceae* L. f. (Zamiaceae): una cícada endémica al estado de Veracruz, México”. Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Biología de la Universidad Veracruzana, México.
- Mullis K, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**: 35-40.
- Nicolalde-Morejón F, Vovides AP, Stevenson DW (2009a) Taxonomic revision of *Zamia* in Mega-Mexico. *Brittonia* **61**: 301-335.
- Nicolalde-Morejón F, Vergara Silva F, González Astorga J, Vovides AP y Espinosa de los Monteros A (2009b) Reciprocal illumination of morphological characters

- upon a molecular hypothesis support the proposal of a new species of cycad from Mexico. *Systematics and Biodiversity* **7**: 73-79.
- Nicolalde-Morejón F (2009c) Revisión taxonómica y código de barras de DNA para *Zamia* en Megaméxico. Tesis Doctoral, Instituto de Ecología, A. C. Xalapa, Veracruz, México.
- Nicolalde-Morejón F, Vergara-Silva F, González-Astorga J, Stevenson DW, Vovides AP y Sosa V. (2010) A character-based approach in the Mexican cycads supports diverse multigene combinations for DNA barcoding. *Cladistics* doi: 10.1111/j.1096-0031-2010.00321.x
- Norstog K y Nicholls TJ (1997) *The Biology of the Cycads*. Cornell University Press, Ithaca.
- Pennisi E (2007) Wanted: A barcode for plants. *Science* **318**: 190-191.
- Rach J, DeSalle R, Sarkar IN, Schierwater B, Hadrys H (2008) Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. *Proceedings of the Royal Society London B Biological Sciences* **275**: 237-247.
- Rzedowski J (1978) Vegetación de México. Limusa, S. A. México, D.F.
- Sarkar IN, Planet PJ, Desalle R (2008) CAOS software for use in character-based DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* **8**: 1256-1259.
- Sass Ch, Little DP, Stevenson DW, Specht ChD (2007) DNA barcoding in the Cycadales: testing the potential of proposed barcoding markers for species identification of cycads. *Public Library of Science Biology*. **11**: e1154.
- Seberg O, Petersen G (2009) How many loci does it take to DNA Barcode a Crocus? *Public Library of Science Biology*. **4**: e4598.
- Stevenson DW (1992) A formal classification of the extant cycads. *Brittonia* **44**: 220-223.
- Taylor AS, Haynes JL y Holzman G (2009) Taxonomical, nomenclatural and biogeographical revelations in the *Zamia skinneri* complex of Central America (Cycadales: Zamiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **158**: 399-429.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F y Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acids Research* **24**: 5875-5882.

**Tabla 1.** Especies, distribución y éxito de amplificación.

No	Taxa	Distribución	Genes							
			<i>psbI/K</i>	<i>atpF/H</i>	<i>rpoC1</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>matK</i>	<i>rpoB</i>	<i>ITS</i>	<i>ITS2</i>
1	<i>Cycas couttsiana</i>	Australia								
2	<i>Bowenia serrulata</i>	Australia								
3	<i>Chigua restrepoi</i>	Colombia								
4	<i>Encephalartos natalensis</i>	Sur Africa								
5	<i>Lepidozamia peroffskyana</i>	Australia								
6	<i>Macrozamia fawcettii</i>	Australia								
7	<i>Microcycas calocoma</i>	Cuba								
8	<i>Stangeria eriopus</i>	Sur Africa								
9	<i>Dioon angustifolium</i>	México								
10	<i>Dioon argenteum</i>	México								
11	<i>Dioon califanoi</i>	México								
12	<i>Dioon caputoi</i>	México								
13	<i>Dioon edule</i>	México								
14	<i>Dioon holmgrenii</i>	México								
15	<i>Dioon mejiae</i>	Honduras								
16	<i>Dioon merolae</i>	México								
17	<i>Dioon purpusii</i>	México								
18	<i>Dioon rzedowskii</i>	México								
19	<i>Dioon sonorensis</i>	México								
20	<i>Dioon spinulosum</i>	México								
21	<i>Dioon tomasellii</i>	México								
22	<i>Dioon stevensonii</i>	México								

23	<i>Ceratozamia alvarezii</i>	México								
24	<i>Ceratozamia becerrae</i>	México								
25	<i>Ceratozamia chimalapensis</i>	México								
26	<i>Ceratozamia decumbens</i>	México								
27	<i>Ceratozamia euryphyllidia</i>	México								
28	<i>Ceratozamia hildae</i>	México								
29	<i>Ceratozamia huastecorum</i>	México								
30	<i>Ceratozamia kuesteriana</i>	México								
31	<i>Ceratozamia latifolia</i>	México								
32	<i>Ceratozamia matudae</i>	México								
33	<i>Ceratozamia mexicana</i>	México								
34	<i>Ceratozamia microstrobila</i>	México								
35	<i>Ceratozamia miqueliana</i>	México								
36	<i>Ceratozamia mirandae</i>	México								
37	<i>Ceratozamia mixeorum</i>	México								
38	<i>Ceratozamia morettii</i>	México								
39	<i>Ceratozamia norstogii</i>	México								
40	<i>Ceratozamia robusta</i>	México								
41	<i>Ceratozamia sabatoi</i>	México								
42	<i>Ceratozamia vovidesii</i>	México								
43	<i>Ceratozamia whitelockiana</i>	México								
44	<i>Ceratozamia zaragozae</i>	México								
45	<i>Ceratozamia zoquorum</i>	México								
46	<i>Zamia cremnophila</i>	México								
47	<i>Zamia cunaria</i>	Panamá								
48	<i>Zamia elegantissima</i>	Panamá								

49	<i>Zamia fischeri</i>	México								
50	<i>Zamia furfuracea</i>	México								
51	<i>Zamia herrerae</i>	México								
52	<i>Zamia inermis</i>	México								
53	<i>Zamia integrifolia</i>	USA								
54	<i>Zamia katzeriana</i>	México								
55	<i>Zamia lacandona</i>	México								
56	<i>Zamia loddigesii</i>	México								
57	<i>Zamia manicata</i>	Colombia								
58	<i>Zamia paucijuga</i>	México								
59	<i>Zamia polymorpha</i>	México								
60	<i>Zamia prasina</i>	Belice								
61	<i>Zamia pseudoparasitica</i>	Panamá								
62	<i>Zamia purpurea</i>	México								
63	<i>Zamia pygmaea</i>	Cuba								
64	<i>Zamia soconuscensis</i>	México								
65	<i>Zamia spartea</i>	México								
66	<i>Zamia standleyi</i>	Honduras								
67	<i>Zamia tuerckheimii</i>	Guatemala								
68	<i>Zamia variegata</i>	México								
69	<i>Zamia vazquezii</i>	México								

**Tabla 2.** Relación de individuos por población por especie estudiados en el presente trabajo, en relación con su distribución geográfica del género *Zamia* en México

<b>Especie</b>	<b>No. individuos colectados</b>	<b>No. poblaciones</b>	<b>Distribución (# pob)</b>
<i>Z. paucijuga</i>	127	13	Nayarit (1)
			Jalisco (4)
			Michoacán (1)
			Guerrero (4)
			Oaxaca (3)
<i>Z. herrerae</i>	20	2	Chiapas Localidad 1 Localidad 2
<i>Z. soconuscensis</i>	20	2	Chiapas Localidad 1 Localidad 2
<i>Z. loddigesii</i>	60	11	Veracruz Localidad 1 Localidad 2
			Tamaulipas
			Oaxaca
			Tabasco
<i>Z. fischeri</i>	20	2	San Luis Potosí Localidad 1 Localidad 2
<i>Z. vazquezii</i>	1	1	Veracruz
<i>Z. inermis</i>	10	1	Veracruz
<i>Z. furfuracea</i>	27	3	Veracruz Localidad 1 Localidad 2 Localidad 3
<i>Z. katzeriana</i>	20	3	Chiapas Localidad 1 Localidad 2
			Veracruz
<i>Z. spartea</i>	20	2	Oaxaca Localidad 1 Localidad 1
<i>Z. purpurea</i>	20	2	Veracruz
			Oaxaca
<i>Z. cremnophila</i>	10	1	Tabasco
<i>Z. lacandona</i>	20	3	Chiapas Localidad 1 Localidad 2

			Localidad 3
<i>Z. polymorpha</i>	50	11	Yucatán
			Campeche
			Quintana Roo
			Chiapas
			Tabasco
			Chiapas
<i>Z. variegata</i>	10	1	Chiapas

**Tabla 3.** Resumen de loci y primers utilizados

<b>GEN</b>	<b>PRIMER</b>	<b>DIRECCIÓN</b>	<b>SECUENCIA 5'-3'</b>
<i>rpoB</i>	2	f	ATGCAACGTCAAGCAGTTCC
	3	r	CCGTATGTGAAAAGAAGTATA
<i>rpoC1</i>	1	f	GTGGATACACTTCTTGATAATGG
	4	r	CCATAAGCATATCTTGAGTTGG
<i>matKKew</i>	F <i>Equisetum</i>	f	ATACCCCATTTTTATTCATCC
	R <i>Equisetum</i>	r	GTACTTTTTATGTTTACGAGC
<i>matKKim</i>	3F	f	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG
	1F	r	AATATCCAAATACCAAATCC
<i>trnH-psbA</i>	H	f	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC
	F	r	GTTATGCATGAACGTAATGCTC
<i>atpF-atpH</i>	F	f	ACTCGCACACACTCCCTTTCC
	H	r	GCTTTTTATGGAAGCTTTAACAAT
<i>psbI-psbK</i>	K	f	TTAGCCTTTGTTTGGCAA G
	I	r	AGA GTTTGAGAGTAAGCAT
<b>ITS*</b>	5a	f	CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG
	4 rev	r	TCCTCCGCTTATTGATATGC
<i>ITS1</i>	1	f	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	2	r	GCTGCGTTCTTCATGGATGC
<i>ITS2</i>	3	f	GCATCGATGAAGAACGCAGC
	4 rev	r	TCCTCCGCTTATTGATATGC

**Tabla 4.** Genes y protocolos

Gene	Protocolos
<i>rpoB</i>	<a href="http://www.kew.org/barcoding">www.kew.org/barcoding</a>
<i>rpoC1</i>	<a href="http://www.kew.org/barcoding">www.kew.org/barcoding</a>
<i>matK</i>	<a href="http://www.kew.org/barcoding">www.kew.org/barcoding</a>
<i>matK</i>	<a href="http://www.kew.org/barcoding">www.kew.org/barcoding</a>
<i>trnH-psbA</i>	Shaw et al. 2005
<i>atpF-atpH</i>	Lahaye et al. 2008
<i>psbK-psbI</i>	Lahaye et al. 2008
<i>nrITS</i>	Sass et al. 2007

**Tabla 5.** Especies y números de accesoión al GenBank.

<i>Taxa</i>	<i>psbI/K</i>	<i>atpF/H</i>	<i>rpoC1</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>matK</i>	<i>rpoB</i>	<i>ITS</i>	<i>ITS2</i>
<i>Cycas couttsiana</i>	GU807180	GU807114	GU807251					
<i>Bowenia serrulata</i>	GU807181	GU807115	GU807252					
<i>Chigua restrepoi</i>	GU807182	GU807116	GU807253	GU807394				
<i>Encephalartos natalensis</i>	GU807183	GU807117	GU807254		GU807320			
<i>Lepidozamia peroffskyana</i>	GU807184	GU807118	GU807255					
<i>Macrozamia fawcettii</i>	GU807185	GU807119	GU807256					
<i>Microcycas calocoma</i>	GU807186	GU807120	GU807257					
<i>Stangeria eriopus</i>	GU807187		GU807258					
<i>Dioon angustifolium</i>	GU807188	GU807121	GU807259	GU807405		GU807240		
<i>Dioon argenteum</i>		GU807122	GU807260	GU807406		GU807241		
<i>Dioon califanoi</i>	GU807189	GU807123	GU807261			GU807242		
<i>Dioon caputoi</i>	GU807190	GU807124	GU807262	GU807407		GU807243		
<i>Dioon edule</i>		GU807125	GU807263	GU807408		GU807244		
<i>Dioon holmgrenii</i>		GU807126	GU807264	GU807409		GU807245		
<i>Dioon mejiae</i>		GU807127	GU807265	GU807410				
<i>Dioon merolae</i>	GU807191	GU807128	GU807266	GU807411		GU807246		
<i>Dioon purpusii</i>		GU807129	GU807267	GU807412		GU807247		
<i>Dioon rzedowskii</i>		GU807130	GU807268					
<i>Dioon sonorese</i>	GU807192	GU807131	GU807269	GU807413				
<i>Dioon spinulosum</i>	GU807193	GU807132	GU807270	GU807414		GU807248		
<i>Dioon tomasellii</i>	GU807194	GU807133	GU807271	GU807416		GU807250		
<i>Dioon stevensonii</i>	GU807195	GU807134	GU807272	GU807415		GU807249		
<i>Ceratozamia alvarezii</i>	GU807196	GU807135	GU807273	GU807395	GU807321		GU807372	
<i>Ceratozamia becerrae</i>		GU807136	GU807274	GU807396	GU807322		GU807373	
<i>Ceratozamia chimalapensis</i>	GU807197	GU807137	GU807275		GU807323		GU807374	

<i>Ceratozamia decumbens</i>	GU807198	GU807138	GU807276		GU807324		GU807375	
<i>Ceratozamia euryphyllidia</i>		GU807139	GU807277	GU807397	GU807325		GU807376	
<i>Ceratozamia hildae</i>	GU807199	GU807140	GU807278	GU807398	GU807326		GU807377	
<i>Ceratozamia huastecorum</i>	GU807200	GU807141	GU807279	GU807399	GU807327		GU807378	
<i>Ceratozamia kuesteriana</i>	GU807201	GU807142	GU807280		GU807328		GU807379	
<i>Ceratozamia latifolia</i>	GU807202	GU807143	GU807281	GU807400	GU807329		GU807380	
<i>Ceratozamia matudae</i>	GU807203	GU807144	GU807282	GU807401	GU807330		GU807381	
<i>Ceratozamia mexicana</i>	GU807204	GU807145	GU807283	GU807402	GU807331		GU807382	
<i>Ceratozamia microstrobila</i>	GU807205	GU807146	GU807284		GU807332		GU807383	
<i>Ceratozamia miqueliana</i>	GU807206	GU807147	GU807285		GU807333		GU807384	
<i>Ceratozamia mirandae</i>	GU807207	GU807148	GU807286		GU807334		GU807385	
<i>Ceratozamia mixeorum</i>	GU807208	GU807149	GU807287		GU807335		GU807386	
<i>Ceratozamia morettii</i>	GU807209	GU807150	GU807288	GU807403	GU807336		GU807387	
<i>Ceratozamia norstogii</i>	GU807210	GU807151	GU807289		GU807337		GU807388	
<i>Ceratozamia robusta</i>	GU807211	GU807152	GU807290		GU807338		GU807389	
<i>Ceratozamia sabatoi</i>	GU807212	GU807153	GU807291		GU807339		GU807390	
<i>Ceratozamia vovidesii</i>	GU807213	GU807154	GU807292	GU807404	GU807340		GU807391	
<i>Ceratozamia whitelockiana</i>	GU807214	GU807155	GU807293		GU807341			
<i>Ceratozamia zaragozae</i>	GU807215	GU807156	GU807294		GU807342		GU807392	
<i>Ceratozamia zoquorum</i>	GU807216	GU807157	GU807295		GU807343		GU807393	
<i>Zamia cremnophila</i>	GU807217	GU807158	GU807296		GU807344			GU807352
<i>Zamia cunaria</i>	GU807235	GU807159	GU807297					GU807353
<i>Zamia elegantissima</i>			GU807298					
<i>Zamia fischeri</i>	GU807218	GU807160	GU807299	GU807417				GU807354
<i>Zamia furfuracea</i>	GU807219	GU807161	GU807300	GU807418	GU807345			GU807355
<i>Zamia herrerae</i>	GU807220	GU807162	GU807301	GU807419	GU807346			GU807356
<i>Zamia inermis</i>	GU807221	GU807163	GU807302		GU807347			

<i>Zamia integrifolia</i>	GU807239	GU807164	GU807303					GU807357
<i>Zamia katzeriana</i>	GU807222	GU807165	GU807304	GU807420				GU807358
<i>Zamia lacandona</i>	GU807223	GU807166	GU807305	GU807421				GU807359
<i>Zamia loddigesii</i>	GU807224	GU807167	GU807306	GU807422				GU807360
<i>Zamia manicata</i>	GU807236	GU807168	GU807307					GU807361
<i>Zamia paucijuga</i>	GU807225	GU807169	GU807308	GU807423	GU807348			GU807362
<i>Zamia polymorpha</i>	GU807226	GU807170	GU807309		GU807349			GU807363
<i>Zamia prasina</i>	GU807227	GU807171	GU807310					GU807364
<i>Zamia pseudoparasitica</i>	GU807237	GU807172	GU807311					
<i>Zamia purpurea</i>	GU807228	GU807173	GU807312	GU807424	GU807350			GU807365
<i>Zamia pygmaea</i>	GU807238		GU807313					
<i>Zamia soconuscensis</i>	GU807229	GU807174	GU807314	GU807425				GU807366
<i>Zamia spartea</i>	GU807231	GU807175	GU807315	GU807426	GU807351			GU807367
<i>Zamia standleyi</i>	GU807232	GU807176	GU807316					GU807368
<i>Zamia tuerckheimii</i>	GU807230	GU807177	GU807317					GU807369
<i>Zamia variegata</i>	GU807233	GU807178	GU807318	GU807427				GU807370
<i>Zamia vazquezii</i>	GU807234	GU807179	GU807319	GU807428				GU807371

**Tabla 6.** Resumen de todos los sitios diagnósticos encontrados para los diferentes loci utilizados con las cycadas mexicanas

Combinación de Loci	<i>Ceratozamia</i> Brongn.	<i>Dioon</i> Lindl.	<i>Zamia</i> L.
<i>psbK-psbI</i>	4/23	8/14	12/24
<i>psbK-psbI + atpF-atpH</i>	9/23	11/14	15/24
<i>psbK-psbI + atpF-atpH + rpoC1</i>	9/23	11/14	16/24
<i>psbK-psbI + atpF-atpH + rpoC1+ rpoB</i>	-	11/14	-
<i>psbK-psbI + atpF-atpH + rpoC1+ matK</i>	12/23	-	-
<i>psbK-psbI + atpF-atpH + rpoC1+ matK+ITS</i>	18/23	-	-
<i>psbK-psbI + atpF-atpH + rpoC1+ ITS2</i>	-	-	18/24

Nota: Tomado de Nicolalde-Morejón et al. 2010 (*Cladistics*)

**Tabla 7.** Sitios diagnósticos a nivel del orden Cycadales

No.	Especies representativas de cada género del orden Cycadales	<i>psbK-psbI</i>	<i>atpF-atpH</i>	<i>rpoC1</i>
1	<i>Bowenia serrulata</i> (W. Bull) Chamb.	19	0	1
2	<i>Ceratozamia latifolia</i> Miq.	7	0	0
3	<i>Chigua restrepoi</i> D. W. Stev.	0	0	0
4	<i>Cycas couttsiana</i> K. D. Hill	46	43	9
5	<i>Dioon caputoi</i> De Luca, Sabato & Vázq. Torres	7	0	1
6	<i>Encephalartos natalensis</i> R.A. Dyer & I. Verd.	16	3	1
7	<i>Lepidozamia peroffskyana</i> Regel	0	0	0
8	<i>Macrozamia fawcettii</i> C. Moore	28	12	1
9	<i>Microcycas calocoma</i> (Miq.) A. DC.	0	19	0
10	<i>Stangeria eriopus</i> (Kunze) Baill	54	—	10
11	<i>Zamia soconuscensis</i> Schutzman, Vovides & Deghan	1	3	1

Nota: Tomada de Nicolalde-Morejón et al. 2010 (*Cladistics*)

**Tabla 8.** Sitios diagnósticos con *psbK-psbI*, *rpoC1* y *atpF-atpH*, para *Zamia* en México

Taxa	<i>psbI-psbK</i>										<i>rpoC1</i>		<i>atpF-atpH</i>					
	44	53	123	208	232	331	420	448	521	577	74	458	54	186	270	353	456	472
<i>Zamia cremnophila</i>	T	T	A	A	C	T	T	T	T	C	T	T	—	C	C	G	T	G
<i>Zamia fischeri</i>	T	T	A	A	C	T	T	T	T	C	T	T	<b>A</b>	C	<b>T</b>	G	T	G
<i>Zamia furfuracea</i>	T	T	A	A	C	T	T	T	T	C	T	T	—	C	C	G	T	G
<i>Zamia herrerae</i>	T	T	A	A	C	T	T	T	T	C	T	T	—	C	C	G	<b>G</b>	G
<i>Zamia inermis</i>	T	T	A	A	C	T	T	T	T	<b>T</b>	T	T	—	C	C	G	T	G
<i>Zamia katzeriana</i>	T	T	A	A	C	T	T	T	T	C	T	T	—	C	C	G	T	G
<i>Zamia lacandona</i>	T	T	A	A	C	T	T	<b>C</b>	T	C	<b>C</b>	T	—	<b>A</b>	C	G	T	G
<i>Zamia loddigesii</i>	T	T	A	<b>G</b>	C	T	<b>G</b>	T	T	C	T	T	—	C	C	G	T	G
<i>Zamia paucijuga</i>	T	T	A	A	C	T	T	T	T	C	T	T	—	C	C	G	T	G
<i>Zamia polymorpha</i>	<b>C</b>	T	<b>G</b>	A	C	<b>C</b>	T	T	T	C	T	T	—	C	C	G	T	G
<i>Zamia prasina</i>	T	<b>C</b>	A	A	C	T	T	T	T	C	T	T	—	C	C	<b>A</b>	T	G
<i>Zamia purpurea</i>	T	T	A	A	C	T	T	T	T	C	T	T	—	C	C	G	T	G
<i>Zamia soconuscensis</i>	T	T	A	A	C	T	T	T	T	C	T	<b>C</b>	—	C	C	G	T	<b>T</b>
<i>Zamia sparteae</i>	T	T	A	A	C	T	T	T	T	C	T	T	—	C	C	G	T	G
<i>Zamia standleyi</i>	T	T	A	A	<b>A</b>	T	T	T	<b>G</b>	C	T	T	—	C	C	G	T	G
<i>Zamia tuerckheimii</i>	T	T	A	A	C	T	T	T	T	C	T	T	—	C	C	G	T	G
<i>Zamia variegata</i>	T	T	A	A	C	T	T	T	T	C	T	T	—	C	C	G	T	G
<i>Zamia vazquezii</i>	T	T	A	A	C	T	T	T	T	C	T	T	—	C	C	G	T	G

**Tabla 9.** Sitios diagn3sticos con *ITS2* y *matK*, para *Zamia* en M3xico

Taxa	<i>ITS 2</i>							<i>matK</i>		
	8	33	248	383	387	398	403	4	316	495
<i>Zamia cremnophila</i>	C	C	T	C	C	T	G	C	C	G
<i>Zamia fischeri</i>	C	C	T	C	C	T	G	C	T	G
<i>Zamia furfuracea</i>	A	C	T	C	A	A	A	C	T	G
<i>Zamia herrerae</i>	C	C	T	C	C	T	G	C	T	G
<i>Zamia inermis</i>	C	C	T	C	C	T	G	G	T	T
<i>Zamia katzeriana</i>	C	C	T	C	C	T	G	C	T	G
<i>Zamia lacandona</i>	C	C	T	C	C	T	G	C	T	G
<i>Zamia loddigesii</i>	C	C	T	C	C	T	G	C	T	G
<i>Zamia paucijuga</i>	C	C	T	C	C	T	G	C	T	G
<i>Zamia polymorpha</i>	C	C	T	C	C	T	G	C	T	G
<i>Zamia prasina</i>	C	C	T	C	C	T	G	C	T	G
<i>Zamia purpurea</i>	C	C	T	C	C	T	G	C	T	G
<i>Zamia soconuscensis</i>	C	C	T	C	C	T	G	C	T	G
<i>Zamia spartea</i>	C	C	T	C	C	T	G	C	T	G
<i>Zamia standleyi</i>	C	C	T	A	C	T	G	C	T	G
<i>Zamia tuerckheimii</i>	C	A	C	C	C	T	G	C	T	G
<i>Zamia variegata</i>	C	C	T	C	C	T	G	C	T	G
<i>Zamia vazquezii</i>	C	C	T	C	C	T	G	C	T	G

**Table 10.** Especies, número de poblaciones, distribución y número de secuencias obtenidas para este estudio

No.	Species	No. of populations	Distribution Estados/Departamento	No. de secuencias por población	
				<i>ITS2</i>	<i>psbK-psbI</i>
1	<i>Z. paucijuga</i>	13	1_Nayarit-México	3	9
			2_Jalisco-México	3	9
			3_Jalisco-México	3	10
			4_Jalisco-México	3	9
			5_Jalisco-México	3	10
			6_Michoacán-México	3	10
			7_Guerrero-México	3	5
			8_Guerrero-México	3	10
			9_Guerrero-México	3	9
			10_Guerrero-México	3	8
			11_Oaxaca-México	3	8
			12_Oaxaca-México	3	10
			13_Oaxaca-México	3	10
2	<i>Z. soconuscensis</i>	1	1_Chiapas-México	3	10
3	<i>Z. loddigesii</i>	7	1_Tabasco-México		10
			2_Tamaulipas-México	3	10
			3_Veracruz-México		4
			4_Veracruz-México		3
			5_Veracruz-México		3
			6_Veracruz-México		2
			7_Oaxaca-México		4
4	<i>Z. fischeri</i>	2	1_San Luís Potosi-México	3	10
			2_San Luís Potosi-México		8
5	<i>Z. vazquezii</i>	1	1_Veracruz-México	1	9

6	<i>Z. inermis</i>	1	1_Veracruz-México	3	8
7	<i>Z. furfuracea</i>	6	1_Veracruz-México	3	10
			2_Veracruz-México		10
			3_Veracruz-México		8
			4_Veracruz-México		7
			5_Veracruz-México		9
			6_Veracruz-México		10
8	<i>Z. katzeriana</i>	4	1_Chiapas-México	3	7
			2_Chiapas-México		7
			3_Chiapas-México		2
			4_Veracruz-México		4
9	<i>Z. spartea</i>	3	1_Oaxaca-México	3	9
			2_Oaxaca-México		9
			3_Oaxaca-México		3
10	<i>Z. purpurea</i>	2	1_Veracruz-México	3	8
			2_Oaxaca-México		10
11	<i>Z. cremnophila</i>	1	1_Tabasco-México	3	10
12	<i>Z. lacandona</i>	3	1_Chiapas-México	3	5
			2_Chiapas-México		1
13	<i>Z. polymorpha</i>	11	1_Yucatán-México	3	3
			2_Yucatán-México		4
			3_Yucatán-México		4
			4_Campeche-México		3
			5_Campeche-México		4
			6_Quintana Roo-México		2
			7_Quintana Roo-México		1
			8_Quintana Roo-México		1
			9_Quintana Roo-México		1

			10_Chiapas-México		3
			11_Tabasco-México		4
14	<i>Z. variegata</i>	1	1_Chiapas-México	3	9