



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**Variación y estructura genética en la lagartija de cola
rayada *Aspidoscelis hyperythra* (Sauria: Teiidae)
mediante en el uso de marcadores microsatélites**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los recursos Naturales
(Orientación en Ecología de Zonas Áridas)

P r e s e n t a

Yareli Sugey Esquer Garrigós

La Paz, B.C.S. Octubre de 2008

Conformación del Comité

Comité Tutorial y Comité Revisor de Tesis

Dra. María del Carmen Blázquez Moreno-Director de tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. José Antonio Godoy López- Cotutor
Consejo Superior de Investigaciones Científicas CSIC
Estación Biológica de Doñana, Sevilla-España

Dr. Ricardo Rodríguez Estrella-Cotutor
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Jurado de Examen

Dra. María del Carmen Blázquez Moreno

Dr. José Antonio Godoy López

Dr. Pedro Cruz Hernández-Suplente

Suplente

Dr. Ricardo Pérez Enriquez

Resumen

La lagartija de cola rayada *Aspidoscelis hyperythra* es una especie endémica de la península de Baja California con una amplia distribución y variación morfológica a lo largo de la península. Pese a que existen algunos estudios sobre la ecología y biología aún se sabe relativamente poco sobre parámetros como la variación, estructuración genética y flujo génico entre poblaciones, aspectos que son de importancia básica para conocer el estado de actual de la especie y fundamentales para proponer medidas que aseguren su conservación. Así, con el propósito de abordar un estudio sobre la diversidad genética de la especie y estructura genética de sus poblaciones se consideró como herramienta el desarrollo de marcadores microsatélite. Se construyó una librería genómica enriquecida con fragmentos microsatélite. De esta librería se secuenciaron 187 clonas, de las cuales 94 contuvieron microsatélites. De acuerdo al tipo de repetición y el tamaño del fragmento se sintetizaron 31 pares de cebadores, de los cuales se seleccionaron 10 pares de cebadores en base a la amplificación de productos específicos y polimorfismo observado. Estos cebadores mostraron ser funcionales en varias localidades peninsulares de *A. hyperythra*, además de presentar amplificación cruzada y polimorfismo en cinco taxa insulares pertenecientes al grupo *A. deppii*. Para estudiar la variación genética de la especie a nivel intra e interpoblacional se seleccionaron dos localidades peninsulares, separadas unos 100 km entre sí, y una insular (Espíritu Santo) y se incluyó con fines comparativos a *A. ceralbensis* (Isla Cerralvo), especie cercanamente relacionada. Se encontraron niveles de diversidad genética de moderados a altos en *A. hyperythra* y consistentemente menores en *A. ceralbensis*. Se detectaron desviaciones al equilibrio de Hardy Weinberg generadas por un déficit de heterocigotos. Distintas pruebas sugirieron que factores como la endogamia poblacional, variación espacio-temporal e incidencia de alelos nulos pueden ser responsables del déficit observado. Contrariamente a lo esperado, las estimaciones de diferenciación genética (F_{ST}) y distancias genéticas (D_{CE}) mostraron que las poblaciones de Comitán y Espíritu Santo se encuentran genéticamente menos diferenciadas que Comitán respecto a la otra población peninsular. Por su parte *A. ceralbensis* mostró niveles altos de diferenciación respecto a cualquiera de las poblaciones de *A. hyperythra*. La inferencia de estructura y flujo génico empleando pruebas de asignación corroboró esta estructura e identificó algunos individuos en Comitán y Espíritu Santo como migrantes recientes. Los resultados aquí generados sugieren un posible efecto de aislamiento por distancia entre localidades peninsulares de *A. hyperythra*. Así mismo estas evidencias sugieren que la clasificación de *A. h. spiritensis* al rango de especie propuesta por Grismer (1999) no debería ser mantenida. La existencia de flujo génico reciente entre Espíritu Santo y Comitán podría ser explicado a través del traslado de organismos por actividades humanas ó por dispersión a través del agua durante eventos climatológicos como tormentas ó huracanes, un fenómeno también documentado en otros reptiles que habitan sistemas insulares.

Palabras clave

Aspidoscelis hyperythra, diversidad genética, estructura genética, flujo génico, microsatélites.

Abstract

The whiptail lizard *Aspidoscelis hyperythra* is an endemic species from the Baja California peninsula, broadly distributed and with morphological variation along its distribution. Some studies about the ecology and biology of the species has been done, however little information exist about population parameters as genetic variation, genetic structure and gene flow between populations, issues that are of central concern in conservation purposes. With the aim of addressing a study of the genetic diversity of the species and genetic structure of their populations, microsatellite markers were developed. An enriched genomic library was constructed. One hundred and eighty-seven clones were sequenced; ninety four of whose contain microsatellites. Thirty one pairs of primers were designed, selecting a final set of 10 pairs of primers depending on the specific amplified products and the observed polymorphism. These primers successfully amplified in several samples coming from different localities, and also cross-amplified on five insular taxa of the *A. deppii* group. Two peninsular localities and the island of Espiritu Santo were sampled for genetic variation purposes in *A. hyperythra*. We also included *A. ceralbensis* (Cerralvo island), a species closely related to *A. hyperythra*, in order to compare their genetic diversities. Levels of genetic variation were moderate to high in *A. hyperythra* and lower in *A. ceralbensis*. The four populations showed deviation from HWE due to a heterozygote deficit. Several test suggest than inbreeding, spatial-temporal variation and null alleles incidence could all of them responsible of the observed heterozygote deficit. Opposite to ours expectations, estimates of genetic differentiation (F_{ST}) and genetic distances (D_{CE}) showed that populations of Comitan and Espiritu Santo are less differentiated than Comitan respect to Km128 (both of them are peninsular populations). On the other hand, higher levels of differentiation of *A. ceralbensis* compared to others populations of *A. hyperythra* are reported in this study. Likewise assignment tests and gene flow rates supported the inferred structure and identified potentially recent migrants between Comitan and Espiritu Santo. Our results suggest the effect of isolation by geographic distance on peninsular populations of *A. hyperythra*. The maintenance of recent gene flow between Espiritu Santo and Comitan suggests accidental translocations of animals due to human activities. Over-water dispersion during storms or hurricanes is also proposed, a phenomenon well-documented in other reptiles inhabiting island systems.

Key words

Aspidoscelis hyperythra, gene diversity, gene flow, genetic structure, microsatellites.

Dedicatoria

*A mis tres grandes guías y mas preciado tesoro: Angelina, Héctor y Zere
Mi familia*

Tu risa me hace libre,/ me pone alas./ Soledades me quita,/ cárcel me arranca.
(Miguel Hernández)

Agradecimientos

Quiero agradecer al personal del CIBNOR por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y el apoyo brindado durante la realización de dos estancias en el extranjero. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de Maestría No. 206579 otorgada y el apoyo brindado a través del programa de becas para estancias en el extranjero para becarios nacionales.

Al personal de la Estación Biológica de Doñana (Sevilla-España) especialmente a los miembros del Laboratorio de Ecología Molecular y principalmente a Alex, Laura, Ana, Carlos, María, Néstor, Moni, Paula, Juan, Miguel Delibes, Sofía y Eva, con quienes compartí muchos bellos momentos y a quienes atesoro por la sincera amistad y el apoyo brindado.

Un especial reconocimiento a Adrián Munguía Vega quien me brindó su apoyo y conocimiento durante la primera fase de este trabajo de tesis y con quien he tenido el gusto de colaborar desde hace ya algunos años.

Al grupo de Genética Acuícola, principalmente al grupo encabezado por el Dr. Pedro Cruz y Dr. Ricardo Pérez. De ellos y mis compañeros aprendí mucho durante los seminarios del grupo de Genética, gracias a todos por sus comentarios y enseñanzas.

A mi director de tesis a quien le guardo un gran cariño, Carmen. Por el apoyo incondicional y la buena disposición que mostraste siempre para ayudarme a sacar este trabajo adelante y por permitirme llegar hasta donde por tiempo me fue posible, por todos los momentos buenos y difíciles, gracias.

A Ricardo Estrella, por su apoyo y buena disposición en todo momento y por su invaluable ayuda para que este trabajo de tesis llegara a buen termino, mil gracias.

Godoy, cotutor y orientador de mi trabajo de investigación. Gracias por tu dedicación y enseñanzas, por centrarme, inspirar y apoyar en todo momento mi deseo de aprender mas, de ti aprendí y maduré cosas que tendré siempre muy presentes.

Al técnico Abelino Cota por su ayuda durante los muestreos en campo y por enseñarme como ser toda una “*cazador de huicos*”.

A mis queridos amigos paceños a quienes nunca voy a olvidar: Sergio, Rosy, Masso, Rob, Bonjii, Cholito, Lucy, Brito, Erendida, Getza, Adán, Ange, Arlet, Vero, Yssel y para quienes siempre desearé lo mejor de la vida. Y finalmente a mi querido amigo Hever Latisnere.

Contenido

Introducción general	1
Aspectos Biológicos y Ecológicos de la lagartija de cola rayada <i>Aspidoscelis hyperythra</i>	1
Antecedentes	5
Aspectos de filogeografía de <i>A. hyperythra</i>	5
Justificación	6
Objetivo General	8
Estructura de la Tesis	8
CAPÍTULO I: Aislamiento y caracterización de marcadores microsatélite en la lagartija de cola rayada <i>Aspidoscelis hyperythra</i>	
I.1 Introducción	9
I.1.2 Microsatélites: Características.....	9
I.1.2.1 Microsatélites Aplicación.....	11
I.1.2.2 Microsatélites: Análisis.....	12
I.1.2.3 Metodologías para el aislamiento de microsatélites.....	14
I.1.2.4 Amplificación cruzada de microsatélites.....	14
I.2 Antecedentes	9
I.2.1 Microsatélites reportados para el género <i>Cnemidophorus</i> y <i>Aspidoscelis</i>	16
I.3 Objetivos específicos	17
I.4 Materiales y Métodos	17
I.4.1 Área de muestreo y colecta de muestras.....	17
I.4.2 Extracción de ADN genómico.....	19
I.4.3 Aislamiento y Caracterización de microsatélites.....	19
I.4.3.1 Digestión del ADN empleando enzimas de restricción.....	20
I.4.3.2 Unión de los fragmentos de ADN a adaptadores SuperSNX.....	20
I.4.3.3 Enriquecimiento empleando perlas magnéticas.....	22
I.4.3.4 Aumento en la cantidad de ADN enriquecido mediante PCR.....	24
I.4.3.5 Unión de fragmentos de ADN a un vector de clonación.....	25
I.4.3.6 Secuenciación.....	26
I.4.3.7 Análisis de clonas.....	26
I.4.3.8 Diseño de cebadores.....	27
I.4.3.9 Pruebas de amplificación mediante PCR y estandarización.....	27
I.4.3.10 Análisis automático de microsatélites.....	29
I.5 Resultados	32
I.5.1 Análisis de clonas y secuencias.....	32
I.5.2 Diseño de cebadores y pruebas de amplificación.....	36
I.5.3 Análisis de microsatélites.....	40
I.6 Discusión	41

Capítulo II: Variación y estructura genética en <i>A. hyperythra</i>.	
II.1 Introducción	45
II.1.1 Diversidad genética en poblaciones	45
II.1.2 Estructura y Flujo génico	47
II.2.1.1 Índices de fijación F_{ST} y R_{ST}	49
II.2 Antecedentes	51
II.2.1 Variación geográfica de <i>A. hyperythra</i>	51
II.2.2 Capacidad de movimiento	52
II.3 Objetivos específicos	54
II.4 Hipótesis	54
II.5 Materiales y Métodos	55
II.5.1 Colecta de muestras	55
II.5.2 Amplificación de microsatélites y asignación de genotipos	56
II.5.3 Variación intrapoblacional en <i>A. hyperythra</i> y <i>A. ceralbensis</i>	57
II.5.3.1 Estimaciones de Diversidad Genética	57
II.5.3.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) y endogamia poblacional (F_{IS})	58
II.5.3.3 Análisis del desequilibrio de ligamiento	59
II.5.3.4 Incidencia de alelos nulos y otros errores durante la asignación de genotipos	59
II.5.3.5 Efecto del tipo de muestreo en el nivel de heterocigosidad observada	60
II.5.3.6 Variación espacio-temporal en muestras del Comitán	61
II.5.4 Diferenciación y estructura genética interpoblacional en <i>A. hyperythra</i>	62
II.5.4.1 Análisis de estructura genética entre poblaciones	62
II.5.4.2 Análisis Factorial de Correspondencia (AFC)	63
II.5.4.3 Estimaciones de diferenciación genética (F_{ST}) y número de migrantes (Nm)	63
II.5.4.4 Construcción de dendogramas a partir del cálculo de distancias genéticas	65
II.5.4.5 Estructura genética e inferencia de flujo génico empleando pruebas de asignación de individuos	66
II.6 Resultados	68
II.6.1 Asignación de genotipos en <i>A. hyperythra</i> y <i>A. ceralbensis</i>	68
II.6.2 Variación intrapoblacional	70
II.6.2.1 Estimaciones de Diversidad Genética	70
II.6.2.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) y endogamia poblacional (F_{IS})	74
II.6.2.3 Análisis al Desequilibrio de Ligamiento (LD)	76
II.6.2.4 Incidencia de alelos nulos y otros errores durante la asignación de genotipos	76

II.6.2.5 Efecto del tipo de muestreo en el nivel de heterocigosidad observada	78
II.6.2.6 Variación espacio-temporal en muestras del Comitán.	80
II.7 Análisis interpoblacional en <i>A. hyperythra</i>	81
II.7.1 Análisis de estructura genética entre poblaciones.	81
II.7.2 Análisis Factorial de Correspondencia (AFC).	81
II.7.3 Estimaciones de diferenciación genética (F_{ST}) y numero de migrantes (Nm).	82
II.7.4 Construcción de dendogramas a partir del cálculo de distancias genéticas.	85
II.7.5 Estructura genética e inferencia de flujo genética empleando pruebas de asignación de individuos.	88
II.8 Discusión	90
II.8.1 Rangos alélicas observados entre miembros del complejo <i>A. deppii</i> e incidencia de homoplasia.	90
II.8.2 Variación genética intrapoblacional.	91
II.8.3 Déficit de heterocigotos, ¿artefacto ó característica biológica?	93
II.8.4 Diferenciación y distancia genética entre poblaciones de <i>A. hyperythra</i> .	96
II.8.5 Efecto de la incidencia de alelos nulos sobre el nivel de diferenciación y distancias genéticas.	97
II.8.6 Inferencia de flujo génico entre poblaciones de <i>A. hyperythra</i> .	98
II.8.7 Flujo génico entre Espíritu Santo y Comitán, ¿Efecto reciente a causa de actividades humanas y climatológicas?	100
II.8.8 Implicaciones taxonómicas y de Conservación.	101
Conclusiones Generales	103
Referencias	105
Anexo 1	112
Anexo 2	113

Lista de Figuras

Figura 1. Vista superior y lateral de la lagartija de cola rayada <i>Aspidoscelis hyperythra</i>	4
Figura 2. Distribución de <i>Aspidoscelis hyperythra</i> en la península de Baja California.	4
Figura 3. Electroferograma mostrando el patrón de bandeo para individuos heterocigotos y homocigotos.	12
Figura 4. Área de estudio y puntos de colecta.	18
Figura 5. Sistema de marcaje con fluorescencia empleando el primer M13 para análisis automático de microsátélites.	30
Figura 6. Tamaño en pares de bases (pb) de las clonas amplificadas por cada sonda empleada durante el enriquecimiento.	33
Figura 7. Distribución de los tamaños alélicos observados para los marcadores <i>Ashy8</i> y <i>Ashy9</i> en individuos del Comitán.	69
Figura 8. Valores promedio en las estimaciones del número de alelos (N_A) y riqueza alélica (AR).	72
Figura 9. Valores promedio en las estimaciones de heterocigosidad esperada (H_E) y heterocigosidad observada (H_O).	72
Figura 10. Distribución observada del coeficiente de parentesco r_{xy} entre pares de individuos por población.	79
Figura 11. Análisis Factorial de Correspondencia.	82
Figura 12. Dendograma UPGMA poblacional.	86
Figura 13. Dendograma NJ incluyendo a cada individuo por población.	87
Figura 14. Poblaciones inferidas mediante el análisis en STRUCTURE.	89

Lista de Tablas

Tabla I. Relación del número de clonas analizadas, secuenciadas y con 32 microsatélites, por cada sonda empleada durante el enriquecimiento.....	32
Tabla II. Motivos de repetición aislados a partir de la sonda CT ₁₅ , GT ₁₅ y GATA ₁₀	35
Tabla III. Tipo de repetición y tamaño del fragmento esperado para 31 pares de cebadores diseñados.....	36
Tabla IV. Cebadores y condiciones de PCR para diez loci microsatélites analizados de <i>A. hyperythra</i> y en especies y subespecies insulares del grupo <i>A. deppii</i>	38
Tabla V. Número de alelos y rango alélico observado en especies y subespecies insulares del grupo <i>A. deppii</i>	39
Tabla VI. Interpretación de los valores de F _{ST}	50
Tabla VII. Localidad de muestreo, número de individuos colectados por año.	55
Tabla VIII. Rango alélico amplificado por marcador y población.	70
Tabla IX. Variabilidad genética en <i>A. hyperythra</i> y <i>A. ceralbensis</i>	71
Tabla X. Significancia de las diferencias observadas en los valores de diversidad genética por pares de poblaciones.....	73
Tabla XI. Análisis del HWE y estimación del coeficiente de endogamia (F _{IS}).....	75
Tabla XII. Variación en la estimación del F _{IS} global.....	76
Tabla XIII. Frecuencia de alelos nulos por locus y población.....	77
Tabla XIV. Valores del coeficiente de coancestría y endogamia F _{IS} en submuestras provenientes de distintos años y puntos de colecta para la población del Comitán..	80
Tabla XV. Variación en la estimación del F _{IS} global..	83
Tabla XVI. Diferenciación genética entre pares de poblaciones (θ_{ST}).	84
Tabla XVII. Número de migrantes por generación entre pares de poblaciones.	84
Tabla XVIII. Distancias genéticas D _{CE} por par de poblaciones.	85
Tabla XIX. Probabilidad de pertenencia en base a pruebas de asignación de individuos.	89

INTRODUCCIÓN GENERAL.

Aspectos Biológicos y Ecológicos y de lagartija de cola rayada *Aspidoscelis hyperythra*

Dentro de los reptiles del Orden Sauria, la Familia Teiidae la constituyen un grupo de lacértidos conocidos comúnmente como lagartijas colas de látigo (por *whiptail lizards*). Este grupo presenta una amplia distribución en el continente Americano, la cual abarca parte de Estados Unidos, México, América Central, gran parte de las islas del Caribe y la mayor parte del Sur de América, a excepción de los Andes y los climas mas extremosos del sur (Grismer 2002, Pianka y Vitt 2003).

Los miembros de esta familia tienen cuatro patas, con las patas traseras más largas, cuerpos aerodinámicos, colas largas, hocicos relativamente puntiagudos y párpados. Son forrajeadores activos y ponen huevos (Pianka y Vitt 2003). Dependiendo de la especie alcanzan de 7 a 50 cm de longitud Cabeza-Cloaca LCC. La mayoría de los Teidos son bisexuales y presentan reproducción sexual, aunque varios se reproducen por partenogénesis (Grismer 2002, Pianka y Vitt 2003).

A. hyperythra es una especie endémica de la región de Baja California y su distribución abarca de San Bernardino California a los Cabos en Baja California Sur, incluyendo las islas San Marcos y Coronados en el Golfo de California y las islas Magdalena y Santa Margarita en el Pacífico (Fig.2, Grismer 1999).

Es una lagartija pequeña, con una longitud corporal no mayor a los 72 mm de SVL y presenta un patrón de coloración corporal gris, café rojizo ó café oscuro con cinco o siete líneas verticales de color amarillo pálido en la parte dorsal. En recién nacidos y juveniles la cola y patas son de color azul brillante (Fig.1) Presentan párpados móviles, escamas dorsales granulares y largas escamas ventrales imbricadas (Jennings y Hayes 1994, Grismer 2002). A diferencia del resto de las especies del género *Aspidoscelis* en la región, *A. hyperythra* presenta una única escama fronto-parietal al igual que *A. ceralebensis* (Grismer 2002).

Una de las principales características que distingue a ambos sexos en el estadio adulto es la presencia de una coloración anaranjada en el mentón y la parte ventral del cuerpo de los machos durante la época de reproducción (Pianka y Vitt 2003). Aunque en ocasiones las hembras grávidas también pueden presentar esta coloración especialmente delineando la mandíbula inferior (Fig.1)

A. hyperythra alcanza la madurez sexual antes de cumplir el primer año de edad. El periodo de reproducción es de tres meses y comprende desde mediados del mes de Abril a mediados del mes de Julio. El número de puestas en un mismo ciclo reproductivo parece estar relacionado con la edad, y suele ser de dos para las hembras mayores a dos años y de una puesta para las hembras más jóvenes. El número de huevos por puesta varía de 2 a 3 con un periodo de incubación de 50 a 60 días (Bostic 1966).

La especie habita una alta diversidad de ambientes incluyendo el chaparral, las praderas, zonas costeras con maleza y zonas desérticas. Esta especie se encuentra presumiblemente relacionada con áreas de vegetaciones perennes, en donde encuentra su principal fuente de alimentación. De acuerdo con Vázquez (2006) las características del hábitat óptimo para la presencia de la especie en B.C.S. incluyen: plantas vivas, altas y leñosas, ausencia de pendiente, presencia de hojarasca y de suelo desnudo entre la vegetación. Respecto a su alimentación, es una especie diurna que se alimenta en un 90% de termitas (Familia: Isopterae) y en menor proporción de arácnidos (Galina 1994, Jennings y Hayes 1994).



Figura 1. Vista superior y lateral de la lagartija de cola rayada *Aspidoscelis hyperythra*

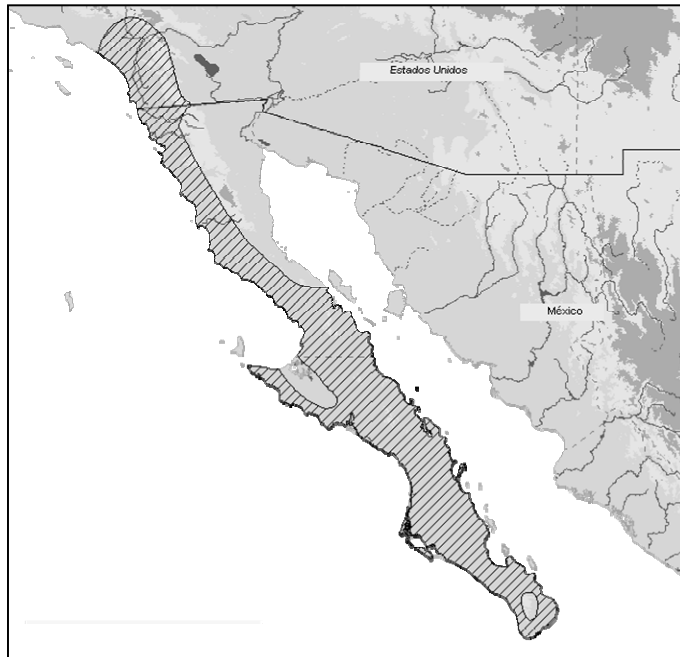


Figura 2. Distribución de *Aspidoscelis hyperythra* en la península de Baja California (tomado de Hollingsworth y Hammerson 2007).

ANTECEDENTES.

Aspectos de filogeografía de *A. hyperythra*.

Hasta hace poco dentro de la familia Teiidae se reconocían nueve géneros, entre ellos *Cnemidophorus* que ocupaba desde Norte América a Argentina. Reeder *et al.* (2002) en una revisión filogenética del género demostraron parafilia entre el clado de América del Norte y del Sur y propusieron sustituir el nombre del género *Cnemidophorus* por el de *Aspidoscelis* (Fitzinger 1843) para las especies cuya distribución tiene como límite Sur el Norte de Costa Rica y dejando como *Cnemidophorus* los que se distribuyen al Sur de este punto. Así actualmente se reconocen 10 géneros contenidos en dos subfamilias: Teiinae (*Ameiva*, *Aspidoscelis*, *Cnemidophorus*, *Dicrodon*, *Kentropyx*, y *Teius*) y Tupinambinae (*Callopistes*, *Crocodylurus*, *Dracaena* y *Tupinambis*). El género *Aspidoscelis* contiene al menos 87 taxa divididos en cinco grupos: *A. deppii*, *A. tigris*, *A. sexlineata*, *A. cozumela* y *A. tessellata* (Reeder *et al.* 2002).

Aspidoscelis hyperythra pertenece al complejo *A. deppii*. Dentro de este complejo además se encuentran comprendidas varias subespecies de las islas del Golfo de California que viven en Isla Carmen, Isla San José, Isla San Francisco, Isla Monserrat y la especie *A. ceralbensis* en Isla Cerralvo (Walker y Taylor 1968, Radtkey *et al.* 1997). Sin embargo Grismer (1999) por medio de un análisis cladístico aplicado a caracteres morfológicos y del cariotipo elevó a rango de especies a las cinco subespecies isleñas previamente reconocidas

y concluyó que *A. hyperythra* y las cinco especies insulares forman un clado monofilético y a su vez *A. hyperythra* y *A. espiritensis* (Isla Espiritu Santo) forman un subgrupo muy próximo entre sí. En este estudio consideraremos la clasificación previa a Grismer (1999) de los taxa insulares, es decir *A. h. espiritensis* (Espíritu Santo), *A. h. carmenensis* (Carmen), *A. h. danheimae* (San José) *A. h. franciscensis* (San Francisco), *A. pictus* (Montserrat) y *A. ceralbensis* (Cerralvo).

JUSTIFICACION.

Dentro de biología de la conservación el estudio de parámetros como la estructura genética de las especies y la elucidación de patrones de conectividad genética entre diferentes grupos de individuos o poblaciones ha tomado una fuerte importancia en vista de la rápida pérdida de biodiversidad, ya que el desarrollo de estrategias efectivas para el manejo y conservación de especies en peligro ó amenazadas depende precisamente del conocimiento de este tipo de relaciones (Whitlock y McCauley 1999).

Diversos estudios en distintos taxa, incluyendo reptiles, mamíferos, aves y arañas (Zink *et al.* 1997, Riddle *et al.* 2000, Lawlor *et al.* 2002, Murphy y Aguirre-León 2002 y Crews y Hedin 2006, Lindell *et al.* 2005), a lo largo de la península han demostrado, en base al análisis de ADN mitocondrial principalmente, que existen patrones fuertes de diferenciación genética en especies de amplia distribución en la península y que algunos taxa insulares presentes en el Golfo de California presentan un nivel muy bajo de diferenciación genética con respecto a las poblaciones peninsulares de las que se

originaron, rechazando su estatus taxonómico como especies distintas (Álvarez-Castañeda 2007). Sin embargo existen pocos estudios enfocados en establecer el nivel de flujo génico y diferenciación genética actual empleando marcadores con tasas de mutación más elevadas en taxa peninsulares con una amplia distribución geográfica.

Por su carácter de endémica de la península de Baja California y debido al escaso conocimiento que se tiene acerca del estado actual de sus poblaciones la especie ha sido incluida en la Norma Oficial Mexicana NOM-059 (2001) con categoría de “Amenazada y Endémica”. Pese a que existen algunos estudios sobre la ecología y biología en *A. hyperythra* aún se sabe relativamente poco sobre parámetros relacionados con estructuración genética, capacidad de dispersión y flujo génico actual a lo largo de su distribución, aspectos que son de importancia básica para conocer el estado de actual de la especie y fundamentales para proponer medidas que aseguren su conservación a largo plazo en el ecosistema. Así, con el propósito de abordar un estudio sobre la diversidad genética de la especie y estructura genética de sus poblaciones se consideró como herramienta el desarrollo de marcadores moleculares tipo microsatélite.

OBJETIVO GENERAL.

- Desarrollar marcadores moleculares de tipo microsatélites para la lagartija de cola rayada *A. hyperythra* y aplicarlos al estudio de los niveles de diversidad y de estructura genética poblacional.

ESTRUCTURA DE LA TESIS.

Este trabajo de tesis se divide en dos capítulos. En el Capítulo I se abordan los aspectos relacionados con el aislamiento y caracterización de microsatélites en *A. hyperythra* y pruebas de amplificación cruzada en especies del complejo *A. deppii*. En el Capítulo II se presenta la aplicación de los marcadores microsatélites aislados para el análisis de la diversidad genética, la endogamia poblacional y la estructura genética y estimaciones de flujo génico, en dos localidades peninsulares y una insular de *A. hyperythra* y una de la especie insular *A. ceralbensis* a efectos comparativos.

CAPÍTULO I

Aislamiento y caracterización de marcadores microsatélites en la lagartija de cola rayada *Aspidoscelis hyperythra*.

I.1 INTRODUCCIÓN.

I.1.2 Microsatélites: Características.

En la actualidad muchos estudios en biología de la conservación incluyen el análisis de algún componente genético a través del análisis de marcadores moleculares de ADN para el estudio y conservación de especies amenazadas ó en peligro de extinción. Un marcador molecular hace referencia a un gen, proteína ó fragmentos de ADN polimórficos que permiten distinguir entre individuos, familias, poblaciones o especies (Frankham 2005). Entre estos marcadores cada vez se cita más el uso de los microsatélites.

Los microsatélites ó secuencias de repetición simple SSRs (por *Simple Sequence Repeats*) son regiones de ADN con secuencias cortas de una a seis pares de bases (pb) repetidas en tándem, es decir la misma secuencia una tras otra, llegando a mediar toda la

región hasta 100 pb (Schlötterer 2000). Estas regiones fueron inicialmente identificadas en el genoma humano como repeticiones del dinucleótido CA/GT (Lift y Luty 1989, Weber y May 1989) y posteriormente se encontraron en el genoma de organismos procariotas y eucariotas. Se les considera actualmente marcadores genéticos neutrales (Jarne y Lagoda 1996, Li *et al.* 2002 y Tóth *et al.* 2008). Los microsatélites presentan herencia mendeliana y son marcadores codominantes lo que permite definir loci y diferenciar individuos homocigotos y heterocigotos, estimar su porcentaje y las frecuencias alélicas de las diferentes variantes en una población. En general, los loci microsatélite en las poblaciones naturales presentan una heterocigosidad promedio esperada por encima del 50% y alcanzando casi el 100% dependiendo del tipo de microsatélite (Jarne y Lagoda 1996).

Los microsatélites se clasifican según el motivo y pureza de la repetición (Jarne y Lagoda 1996), pudiendo ser de di-, tri-, tetra-, penta- ó hexanucleótidos. En base a la pureza se habla de microsatélites: a) puros: cuando presentan un único tipo de repetición (ej. cacacacacaca), b) compuestos: cuando de forma adyacente existen dos o más regiones microsatélite con un patrón de repetición diferente (ej. cacacacagagaga) ó 3) imperfectos: la región de repetición presenta interrupciones que no se ajustan al patrón de repetición (ej. cacattcacacattcattca).

Una de las características más sobresalientes de los microsatélites es su alto nivel de polimorfismo que se genera por la pérdida/ganancia de unidades de repetición debido a eventos de mutación (Ellegren 2000, Zane *et al.* 2002). El proceso de mutación predominante se presenta durante la duplicación del ADN y ha sido denominado

“deslizamiento de hebras” (por *slippage process*). La tasa de mutación para microsatélites se calcula entre 10^{-6} a 10^{-2} por generación y varía no solo entre organismos sino también entre loci (Schlötterer 2000). La variación en la tasa de mutación entre loci se explica por varios factores entre ellos la longitud del microsatélite (ej. alelos con un alto número de repeticiones son menos estables), el motivo de repetición (ej. dinucleótidos mas susceptibles), variación en la secuencia flanqueante (ej. alto contenido de poliA ó poliT), pureza de la repetición (ej. loci puros resultan mas susceptibles a eventos de mutación) y a la tasa de recombinación (Schlötterer 2000, Dieringer y Schlötterer 2007).

I.1.2.1 Microsatélites: Aplicación.

La elevada tasa de mutación de los microsatélites los ha convertido en una herramienta molecular con una amplia variedad de aplicaciones biológicas y ecológicas, entre las que se destacan: estimaciones de variabilidad genética dentro y entre poblaciones de una especie, estimaciones de consanguinidad, en el estudio de sistemas de apareamiento, paternidad, parentesco y éxito reproductivo, flujo génico y dispersión de individuos, diferenciación de poblaciones y metapoblaciones e hibridación por mencionar algunos (Schlötterer y Pemberton 1998; en DeSalle y Schierwater 1998). Los problemas de homoplasia limitan, por el contrario, su aplicación para el estudio de relaciones filogenéticas entre especies a casos que implican divergencias recientes y tasas de mutación no muy elevadas, y exigiendo siempre el uso de un número suficiente de loci (Garza *et al.* 1995).

I.1.2.2 Microsatélites: Análisis.

La variación en microsatélites se puede determinar empleando la función de análisis de fragmentos en un secuenciador automático de geles o capilar y sistemas de marcaje con fluorescencia. Las ventajas de este método sobre el análisis de microsatélites en geles de poliacrilamida incluyen: reproducibilidad, precisión, sensibilidad en la determinación de alelos y el análisis de varios loci en la misma inyección capilar (ej. electroforesis múltiplex) (Munguía Vega *et al.* 2007). Los resultados de la corrida son analizados en un electroferograma en el que se detecta el genotipo de cada individuo en el que dos picos (alelos) representan a un heterocigoto y un pico (alelo) a un homocigoto (Fig. 3).

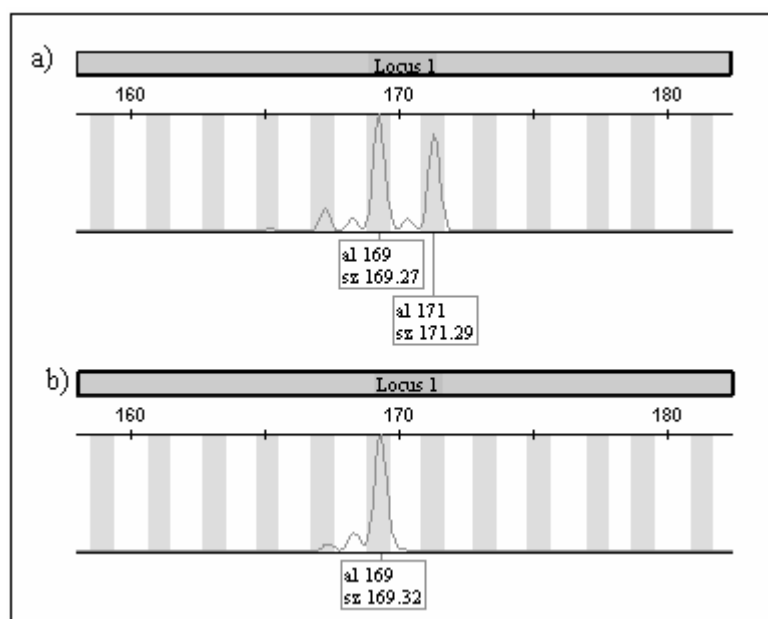


Figura 3. Electroferograma mostrando el patrón de bandeo para individuos a) heterocigotos (dos picos) y b) homocigotos (un pico).

Pese a las ventajas que representa el análisis automático de microsátélites, existen algunos artefactos que pueden surgir durante el proceso de amplificación por PCR ó inespecificidades propias del fluorocromo empleado y que pueden complicar la correcta asignación de alelos (Schraml y Lion 2003). Entre los artefactos más comunes se encuentran:

a) Picos superiores: Estos artefactos son comunes en reacciones multiplex y se generan por un traslape en la emisión espectral de los marcadores fluorescentes empleados y aparecen en la posición de picos específicos en todos los canales de color. Pueden ser eliminados al disminuir la cantidad de producto de PCR introducido al capilar.

b) Bandas fantasma (por *stutters*): Estos artefactos se forman durante la reacción de PCR cuando la extensión de la cadena que esta siendo sintetizada es interrumpida por la disociación de la enzima. Cuando otra molécula de polimerasa continúa con la extensión una protuberancia en la hebra molde puede generar la disminución en una unidad de repetición. Este tipo de artefactos resultan comunes cuando se trabaja con microsátélites conteniendo repeticiones de dinucleótidos.

I.1.2.3 Metodologías para el aislamiento de microsatélites

Uno de los principales retos en la aplicación de marcadores microsatélites es que estos deben ser aislados *de novo* en la mayoría de las especies con las que se trabaja por primera vez. Debido a la acumulación de divergencias nucleotídicas en las zonas flanqueantes, la tarea de diseñar “cebadores universales” que reconozcan secuencias conservadas y que permitan la amplificación de regiones microsatélites entre especies puede resultar más complicado que en el caso de marcadores moleculares más conservados (ej. región control del ADNmt).

La metodología mas empleada actualmente para aislar microsatélites se basa en la elaboración de una librería genómica enriquecida, lo que permite obtener una alta proporción de clonas con fragmentos microsatélite. El porcentaje de éxito de enriquecimiento con este método, es decir el numero de clonas conteniendo fragmentos microsatélites, suele variar entre un 20% y 90% (Zane *et al.* 2002).

I.1.2.4 Amplificación cruzada de microsatélites

Una vez que han sido caracterizados loci microsatélite en la especie de interés es posible evaluar el éxito en la amplificación cruzada y el porcentaje de loci polimórficos con otras especies cercanas. La transferencia de marcadores puede facilitar por ejemplo el estudio del nivel de variación genética entre taxa y los mecanismos involucrados en la

divergencia de poblaciones y especiación (Noor y Feder 2006). Los estudios sobre el porcentaje de microsatélites exitosos en la amplificación cruzada y porcentaje de microsatélites polimórficos en grupos de plantas y animales a distintos niveles en la jerarquía taxonómica han demostrado que el porcentaje de éxito es mayor cuando se trabaja con especies del mismo género, incluso aún entre géneros dentro de la misma familia, y disminuye notablemente entre familias dentro de un orden y entre órdenes dentro de una clase. En el caso de reptiles por ejemplo, y de acuerdo con una revisión de los trabajos reportados entre el periodo de 1997 a 2006, el porcentaje de marcadores que han resultado exitosos en la amplificación y aún polimórficos entre especies del mismo género en estos trabajos es aproximadamente del 95% y 85% respectivamente (Barbará *et al.* 2007). Así, el elevado éxito en la amplificación cruzada de microsatélites entre especies demuestra un gran potencial en la aplicación de este tipo de marcadores en estudios comparativos de genética de poblaciones y ecología molecular.

I.2 ANTECEDENTES.

I.2.1 Microsatélites reportados para el género *Cnemidophorus* y *Aspidoscelis*.

Rowe *et al.* (2002) aislaron ocho microsatélites polimórficos para la lagartija *Cnemidophorus vanzoi* (Sauria: Teiidae), una especie endémica de los islotes María Mayor y María Menor en la costa de Santa Lucía en las Antillas y en peligro crítico de extinción, empleando las sondas de dinucleótidos CA/TG_n y CT/AG_n. El número de alelos para 42 individuos del islote María Mayor varió de dos a cinco. La heterocigosidad observada de 0.34 a 0.58 con un promedio de 0.39 y la heterocigosidad esperada de 0.31 a 0.63 con un promedio de 0.49. No se detectó desequilibrio de Hardy Weinberg ó de ligamiento. No se encontró evidencia de alelos nulos.

Crawford *et al.* (2008) reportaron 13 microsatélites polimórficos aislados a partir de *A. costata* y *A. inornata* de acuerdo con la metodología sugerida por Glenn y Schable (2005) y utilizando un total de 25 sondas para di-, tri- y tetranucleótidos. En las poblaciones evaluadas se encontró un número moderado de alelos (de tres a 19 por locus). El nivel de heterocigosidad esperada fue de 0.47 a 0.94. Se encontró un déficit de heterocigotos en dos loci para *A. costata* y cinco loci para *A. inornata*. Este déficit fue atribuido a que las poblaciones muestreadas pudieran no ser panmícticas y representar zonas de hibridación entre subespecies. No se reportó un análisis sobre la posible incidencia de alelos nulos para

los loci en desequilibrio de HW. Las pruebas de amplificación cruzada mostraron la amplificación de productos específicos para 9 de 10 loci en un individuo de *A. hyperythra*.

I.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Construir una librería genómica enriquecida con fragmentos microsatélites para *A. hyperythra* e identificar y caracterizar las regiones microsatélite de acuerdo a su composición y número de repeticiones.
- Diseñar cebadores específicos para la amplificación de loci microsatélites en *A. hyperythra* y optimizar su amplificación.
- Evaluar la amplificación cruzada de los microsatélites aislados a partir de *A. hyperythra* en otros miembros del complejo *A. deppii*.

I.4 MATERIALES Y MÉTODOS.

I.4.1 Área de muestreo y Colecta de muestreras.

La colecta de muestras se realizó en el período 2004-2006 durante la temporada de primavera (Febrero-Marzo) y en otoño, después de las lluvias (Septiembre-Octubre). Para *A. hyperythra* se muestrearon varias localidades de B.C.S, desde Loreto hasta Los Cabos (Fig.4). Con fines comparativos se incluyeron muestreos de *A. h. espirintesis* (Isla Espíritu Santo), *A. h. carmenensis* (Isla Carmen), *A. pictus* (Isla Montserrat), *A. h. danheimae* (Isla San José), *A. h. franciscensis* (Isla San Francisco) y de *A. ceralbensis* (Isla Cerralvo)

En cada punto de muestreo se capturaron lagartijas empleando una caña con lazo (permisos colecta SEMARNAT-No 11311). De cada individuo se registraron medidas corporales (longitud cabeza-cloaca, LCC, y longitud de la cola, LC), peso, edad (juvenil, adulto), sexo (macho, hembra) y se tomó un fragmento de cola para la extracción de ADN. El tejido fue preservado en alcohol absoluto. Una vez que se tomaron los datos y muestras de cola se liberó a cada individuo en el sitio donde fue observado.

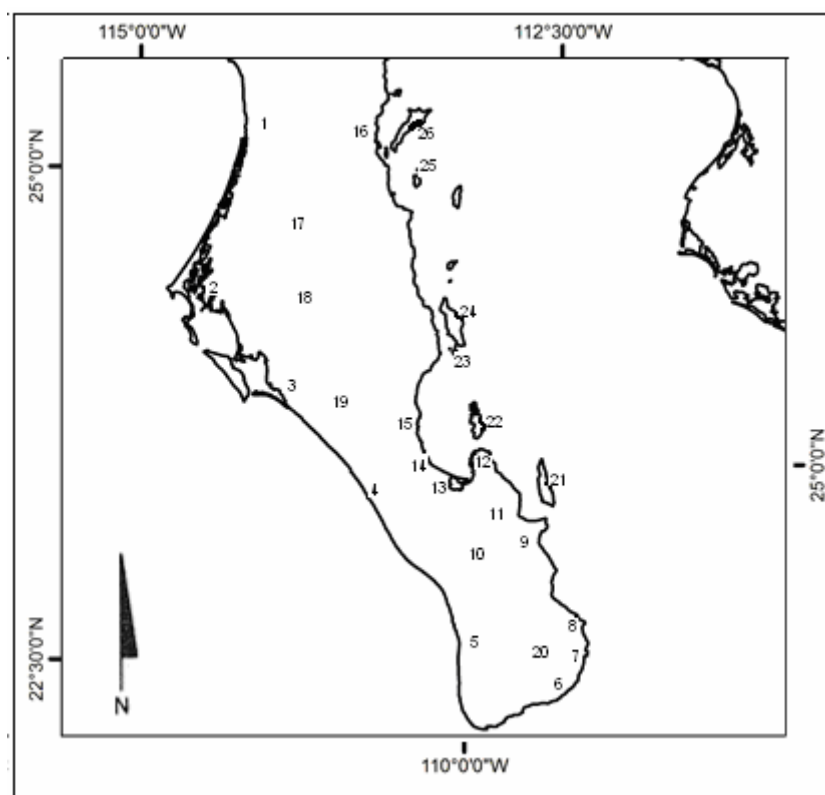


Figura 4. Área de estudio y puntos de colecta. Península: ¹La Purísima, ² San Carlos, ³Loma Amarilla, ⁴ El Conejo, ⁵Todos Santos, ⁶San José del Cabo, ⁷Cabo Pulmo, ⁸Buena Vista, ⁹Los Planes, ¹⁰El Triunfo, ¹¹El Ancón, ¹² El Tecolote, ¹³ Comitán, ¹⁴ Km23 carretera San Juan de la Costa, ¹⁵Km46 carretera San Juan de la Costa, ¹⁶ Rancho Don Enrique, ¹⁷ carretera Cd. Insurgentes, ¹⁸Presa del Ihuazil, ¹⁹Km128, ²⁰Los Naranjos. Islas de Sur a Norte: ²¹Cerralvo, ²²Espíritu Santo, ²³San Francisco, ²⁴ San José, ²⁵Montserrat y ²⁶Carmen.

I.4.2 Extracción de ADN genómico.

Se obtuvo ADN total mediante un protocolo estándar de extracción con fenol-cloroformo (Sambrook *et al.* 1989). El ADN de cada muestra fue resuspendido en 50 μ l de agua Milli-Q. La concentración del ADN obtenido fue determinada en un gel de agarosa (1.2%) teñido con bromuro de etidio y empleando una escalera de baja masa molecular (20 ng/ μ l, Invitrogen) como estándar. De acuerdo a la concentración de ADN en cada muestra, se calculó el volumen que era necesario tomar de cada muestra para obtener una mezcla de ADN que contuviera de 2 a 3 μ g de ADN para iniciar con el proceso de digestión (ver paso I.4.3.1). La mezcla de ADN fue precipitada con etanol 100%, centrifugada y sometida a un lavado con etanol 70%. El ADN obtenido fue resuspendido en 50 μ l de agua mQ y visualizado en un gel de agarosa (1.2 %), empleando un marcador de masa molecular (20 ng/ μ l) como estándar.

I.4.3 Aislamiento y Caracterización de microsatélites.

Para el desarrollo de marcadores microsatélites en *A. hyperythra* se partió de la construcción de una librería genómica parcial enriquecida empleando la metodología propuesta por Gleen y Schable (2005) y siguiendo las modificaciones de los trabajos realizador por Blázquez *et al.* (2006), Estrella *et al.* (2007) y Munguía Vega *et al.* (2007).

I.4.3.1 Digestión del ADN empleando enzimas de restricción.

Del total de la muestra se seleccionó el ADN de 25 individuos de *A. hyperythra* colectados en los distintos puntos de la península (Anexo 1). Se mezcló el ADN genómico y aproximadamente 200 ng/ μ l fueron digeridos empleando una solución conteniendo: 2.50 μ l tampón de ligasa [10x] (Invitrogen) y 2.50 μ l de la enzima RsaI [1 μ M] (NEBL). Esta mezcla se incubó a 37 ° C durante 24 horas. La calidad y el tamaño de los productos de la digestión se analizaron en un gel de agarosa 1.2% utilizando como estándar una escalera de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

I.4.3.2 Unión de los fragmentos de ADN a adaptadores SuperSNX.

Los fragmentos de ADN obtenidos de la digestión se unieron a los adaptadores SuperSNX24 Fw (5'gtttaaggcctagctagcagaatc) y SuperSNX24+4P Rv (5'*p*gattctgctagctaggccttaacaaaa); este segundo cebador fosforilado en el extremo 5'. Estos adaptadores permiten la posterior amplificación por PCR de los fragmentos que contienen fragmentos de repetición y contienen además sitios de restricción que facilitan la unión de los fragmentos de ADN al vector durante el proceso de clonación.

Como paso inicial se formaron adaptadores SuperSNX de doble cadena. Para lo cual se mezclaron volúmenes iguales de cantidades equimolares (ej. 100 μ l de 10Mm de c/u) de los adaptadores y a este volumen se le añadió NaCl [100Mm concentración final]. La

mezcla fue calentada en un bloque térmico a 95 °C durante 5 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. De esta mezcla se tomaron 14.0 µl y se añadió:

Compuesto	[inicial]	Volumen
XmnI		3.0 µl
Tampón de Ligasa	10 x	7.0 µl
Ligasa de ADN	400 U/µl	6.0 µl

De este volumen se tomaron 15 µl y se añadieron al tubo conteniendo los 20 µl del ADN previamente digerido. Esta mezcla se dejó en incubación a 16 °C durante 12 horas. Para confirmar que el proceso de ligación resultó eficiente se realizó una PCR bajo las siguientes condiciones:

Compuesto	[inicial]	Volumen
Tampón PCR	10 x	2.5 µl
MgCl ₂	25 Mm	2.0 µl
DNTPs	2.5Mm	1.5 µl
SuperSNX-24	10 Mm	1.3 µl
Taq ADN pol.	5U/ µl	0.2 µl
Dh ₂ O		13.0 µl
ADN unido a adaptadores		2.0 µl

El ciclo de PCR incluyó un periodo inicial de desnaturalización a 95 °C por 2 min, seguido de 20 ciclos a 95 °C por 20 s, 60 °C a 20 s, 72 °C durante 1.5 minutos y un periodo a 15 °C durante 10 minutos. El producto de PCR se analizó en un gel de agarosa (1.5%) empleando una escalera de peso molecular de 100 pb como estándar.

I.4.3.3 Enriquecimiento empleando perlas magnéticas.

Para el proceso de enriquecimiento se emplearon sondas de dinucleótidos GT₁₅ y CT₁₅ y el tetranucleótido GATA₁₀ marcados con biotina en su extremo 5' para capturar los fragmentos de ADN que resultaron de la amplificación en el paso anterior y que contienen secuencias microsatélite complementarias a estas sondas mediante el siguiente procedimiento:

a) En tubos de PCR de 0.2 ml por cada sonda empleada se añadieron:

Compuesto	Volumen
Solución lavado 2X Hyb (12x SSC, 0.2% SDS)	25.0 µl
Sonda biotinilada (1 Mm)	10.0 µl
ADN unido a los adaptadores SuperSNX24	10.0 µl
Agua Mq	5.0 µl

b) El ciclo de PCR incluyó los siguientes pasos: periodo inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 minutos, bajando rápidamente a 70 °C y disminuyendo 0.2 °C cada 5 segundos durante 99 ciclos hasta quedar en 50 °C por 10 minutos y disminuyendo 0.5 °C cada 5 segundos durante 20 ciclos y finalmente bajando rápidamente a 15 °C.

c) Antes de que finalizara el ciclo de PCR, se realizó el lavado de las perlas magnéticas, para esto se tomaron 50 µl de perlas en solución (Dynabeads M-280, Invitrogen) y se les añadió 250 µl de TE (Tris 10 Mm y 1.0 Mm EDTA) y agitó. Las perlas se capturaron empelando una unidad magnética colectora ó MPC (por *Magnetic Partical Collecting*) y se les realizó un nuevo lavado con TE y dos lavados más con una solución 1x

Hyb (6x SSC, 0.1% SDS). Finalmente las perlas se resuspendieron en 150 μ l de la solución Hyb 1X.

d) A cada producto de PCR se le añadieron 150 μ l de las perlas magnéticas en solución y se resuspendió la mezcla. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente en un agitador orbital a baja velocidad durante 30 minutos. Finalmente el contenido de los tubos se capturó con la unidad MPC y el sobrenadante fue removido y almacenado. Las perlas capturadas se sometieron a los siguientes lavados:

- Dos lavados con 400 μ l de SSC 2x, 0.1% SDS, capturando las perlas con la unidad MPC y eliminado el sobrenadante.

- Dos lavados con 400 μ l SSC 1x, 0.1% SDS. En este paso, las soluciones de dinucleótidos fueron calentadas a 65 °C en un termoblock durante 3 minutos inmediatamente después del cebador lavado y a 68 °C durante 3 minutos inmediatamente después del segundo lavado. En el caso del tetranucleótido las temperaturas fueron de 55 °C y 58 °C.

e) A cada muestra se le añadieron 200 μ l de TLE, fueron mezcladas e incubadas a 95 °C durante 5 minutos e **inmediatamente** después el sobrenadante fue colocado en un tubo eppendorf. A esta solución se le añadieron 22 μ l de NaOAc [3M], posteriormente 444 μ l de EtOH (95%), Las soluciones fueron mezcladas y colocadas a -20 °C durante 12 horas.

f) Una vez transcurrido este tiempo las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue eliminado y a las muestras restantes se les añadieron 0.5 ml de etanol 70%. Posteriormente fueron centrifugadas a 13000 rpm durante un minuto. El sobrenadante en los tubos fue cuidadosamente removido con una pipeta y las muestras restantes en los tubos fueron introducidas en una centrifuga de vacío para eliminar cualquier residuo de etanol. Finalmente al precipitado de ADN se le añadieron 25 μ l de TLE y fue mantenido en hidratación durante 20 minutos antes de proceder con el siguiente paso. Este producto contiene los fragmentos enriquecidos con microsátélites.

I.4.3.4 Aumento en la cantidad de ADN enriquecido mediante PCR.

Para aumentar la cantidad de fragmentos enriquecidos se preparó la siguiente reacción de PCR por muestra:

Compuesto	[inicial]	[final]	Volumen
Tampón PCR	10 x	1 x	2.5 μ l
MgCl ₂	25 Mm	2.0 Mm	2.0 μ l
DNTPs	2.5Mm	150 Mm	1.5 μ l
SuperSNX-24	10 Mm	0.5 Mm	1.3 μ l
Taq ADN pol	5U/ μ l		0.2 μ l
Dh ₂ O			13.0 μ l
Fragmentos de ADN enriquecidos			2.0 μ l

El ciclo de PCR incluyó una fase inicial de desnaturalización a 95 °C por 2 minutos, seguido de 25 ciclos a 95 °C por 20 segundos, 60 °C por 20 segundos y a 72 °C por 30

minutos, finalmente quedando a 15 °C. Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa (1.2 %) empleando una escalera de peso molecular (100 pb) como estándar.

I.4.3.5 Unión de fragmentos de ADN enriquecido a un vector de clonación.

Los productos de PCR fueron clonados empleando un kit comercial (TOPO TA Cloning Kit for sequencing, Invitrogen) utilizando el vector Pcr 4-TOPO, transformando en células *E. coli* TOP 10 incluidas en el kit y siguiendo las especificaciones del proveedor. La detección de colonias recombinantes que contuvieron el plásmido con inserto se efectuó en placas de agar LB con ampicilina (50 mg/ml). La presencia del inserto de interés se verificó tomando una pequeña muestra de las colonias con un palillo estéril y sumergiéndolo en 5 µl de agua mQ en un tubo de PCR. De cada colonia se realizó un respaldo en cajas de petri nuevas con medio LB sólido y ampicilina (50mg/ml) para tenerlas como respaldo en caso de que la clona contuviera un inserto de interés. Las clonas obtenidas fueron reamplificadas con los cebadores universales M13 (Invitrogen). De acuerdo a la estimación del tamaño en geles de agarosa (1.2%) se seleccionaron para secuenciación aquellas clonas que contenían fragmentos de 400 a 1500 pb.

I.4.3.6 Secuenciación.

La concentración de ADN de las clonas seleccionadas para secuenciación se determinó en geles de agarosa (1.2%) junto con un marcador de baja masa molecular (20ng/μl), en donde una concentración alrededor de 50 ng/μl se consideró adecuada. Las clonas fueron secuenciadas con los cebadores universales M13 (Invitrogen) en ambos sentidos empleando un secuenciador automático ABI 3730 (*School of Natural Resources*, Universidad de Arizona).

I.4.3.7 Análisis de clonas.

Empleando los programas “Chromas” v.1.31 (Technelysium Pty Ltd) y Sequencher v. 4.1. (Gene Codes Corporation) se identificaron las clonas que contenían microsatélites, así como el tipo y longitud de la repetición. Se seleccionaron para el diseño de cebadores las secuencias en las que la zona de repetición se encontraba a una distancia considerable (> 50 pb) de la región que incluía parte de la secuencia del vector de clonación-adaptador SuperSNX24 y que presentaban zonas flanqueantes libres de un alto contenido de poli-A ó poli-T.

I.4.3.8 Diseño de cebadores.

El diseño de cebadores se realizó en el programa PRIMER 3 V.0.4.0 (Rozen y Skaletsky 2000) respetando los parámetros ya establecidos (ej. cebadores óptimos de 20 pb, temperatura óptima de alineamiento de 60 °C, contenido de GC 20-80%). Las propiedades físicas de la secuencia de oligonucleótidos diseñados como por ejemplo la formación de estructuras secundarias (ej. horquillas), homodímeros y heterodímeros fue analizada en el programa OligoAnalyzer 3.0 (Integrated DNA Technologies). Los cebadores diseñados fueron sintetizados añadiendo la secuencia M13 (CACGACGTTGTAAAACGAC) en el extremo 5' de cada cebador delantero (por *forward*) (SIGMA-GENOSYS Ltd). Esta secuencia M13 permite la incorporación de fluorescencia a los fragmentos microsatélite durante la fase del análisis automático.

I.4.3.9 Pruebas de amplificación mediante PCR y estandarización.

Las condiciones de PCR fueron probadas y optimizadas en ocho individuos pertenecientes a distintas localidades de colecta. Los ciclos de PCR incluyeron programas con disminución de la temperatura en cada ciclo de alineación (por *touch down*) con dos variantes:

a) *touch down* 66 °C – 50 °C: período inicial de desnaturalización por 5 minutos a 94 °C, seguido de 16 ciclos a 92 °C por 30 s, 66 °C por 30 s (disminuyendo 1 °C en cada ciclo), un período de extensión a 72 °C durante 30 s, seguido de 27 ciclos a 92 °C por 30 s, 30 s a 50 °C, 72 °C por 3 s y un período final de extensión a 72 °C durante 5 minutos.

b) *touch down* 55 °C – 40 °C: período inicial de desnaturalización por 5 minutos a 94 °C, seguido de 15 ciclos a 92 °C por 30 s, 55 °C por 30 s (disminuyendo 1 °C en cada ciclo), un período de extensión a 72 °C durante 30 s, seguido de 27 ciclos a 92 °C por 30 s, 30 s a 40 °C, 72 °C por 3 s y un periodo final de extensión a 72 °C durante 5 minutos.

Los pares de cebadores que mostraron producto de amplificación específico fueron amplificados en 16 individuos pertenecientes a diferentes localidades de muestreo, incluyendo los ocho en los que se estandarizó las condiciones de amplificación por PCR, para el posterior análisis de polimorfismo y descartar loci monomórficos (paso I.4.3.10)

El éxito en la amplificación cruzada se evaluó en dos a cuatro individuos pertenecientes a las especies insulares: *A. h. carmenensis* (Isla Carmen), *A. h. franciscensis* (Isla San Francisco), *A. pictus* (Isla Monserrat) y *A. danheimae* (Isla San José). Para *A. ceralbensis* (Isla Cerralvo) se analizó una muestra de 16 individuos que serán incluidos en análisis posteriores dentro del Capítulo II.

El rango en el tamaño de productos amplificados por cada microsatélite en las distintas localidades fue analizado en geles de agarosa (2.2%) empleando una escalera de peso molecular de 100 pb como estándar.

Se realizó una comparación en GeneBank de las secuencias microsatélite y sus flanqueantes exitosamente amplificadas por PCR, con las previamente reportadas en especies relacionadas con *A. hyperythra* empleando la herramienta BLAST (por *Basic Local Alignment Search Tool*). Las secuencias de las clonas y pares de cebadores diseñados fueron depositadas en este banco de datos (marzo del 2008-
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

I.4.3.10 Análisis automático de microsatélites.

El análisis de los productos amplificados se realizó de forma automatizada empleando un analizador de fragmentos (ABI PRISM 3130 Applied Biosystems) y sistemas de marcaje con fluorescencia de acuerdo con la metodología de Schuelke (2000). Se emplearon cuatro fluorocromos: VIC (visualizado en verde), PET (rojo), FAM (azul), NED (negro) y como escalera estándar se usó la LIZ-500 (anaranjado) (Applied Biosystems). El color para cada marcador se asignó en base al rango observado en el tamaño de los fragmentos amplificados y buscando que para un mismo color no se traslaparan marcadores de tamaño similar y poder así analizar de forma simultánea varios loci microsatélites en la misma inyección capilar (i.e. inyecciones multiplex).

Los loci microsatélites fueron marcados incluyendo en la amplificación el cebador M13 marcado con fluorescencia de acuerdo con la metodología propuesta por Schuelke (2000, Fig.5)

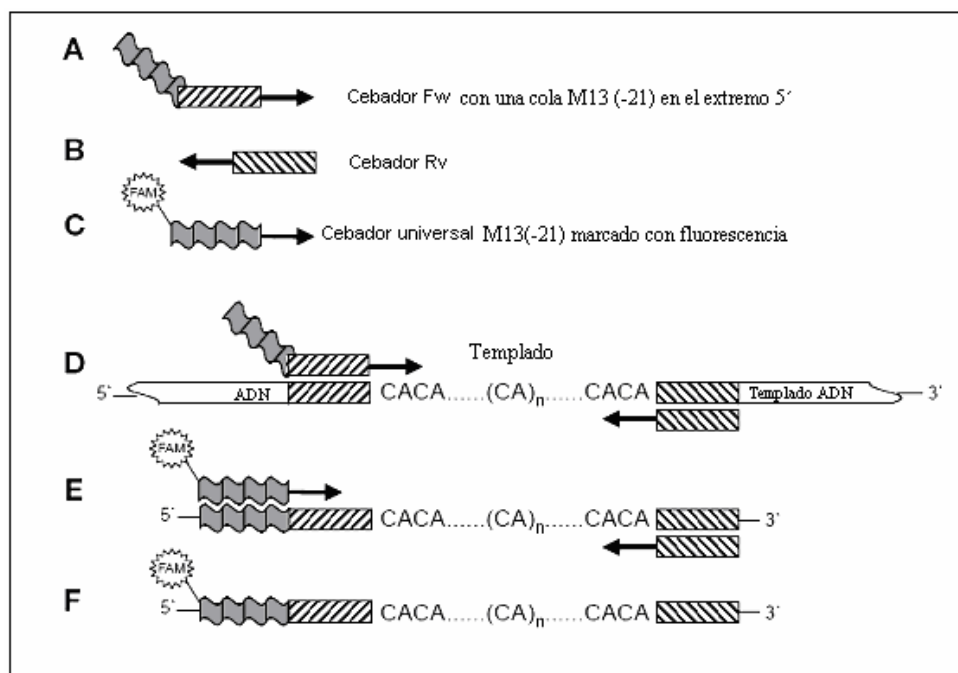


Figura 5. Sistema de marcaje con fluorescencia empleando el primer M13 para análisis automático de microsatélites. Esquema de amplificación para una reacción de amplificación por PCR (A,B) Cebadores específicos, (C) Cebador M13 universal marcado con fluorescencia, en este ejemplo FAM. (D) Durante los primeros ciclos de PCR el cebador Fw con la cola M13 es incorporado en los productos de PCR. (E) Estos productos son después el blanco para el cebador M13 marcado con fluorescencia (tomado de Schuelke 2000)

La proporción entre el cebador M13 marcado con fluorescencia y el cebador delantero-M13 específico inicialmente probado fue de 1:15, proporción estándar. En los cebadores que presentaron una amplificación débil durante la incorporación de la fluorescencia se modificó esta proporción a 1:11. Los productos de PCR fueron analizados

en geles de agarosa (2.2%) y en base a la concentración (ng/ μ l) observada se realizaron mezclas de los productos de PCR de forma tal que todos tuvieran una concentración similar y añadiendo agua Milli-Q hasta un volumen final de 50 μ l. Las especificaciones para ingresar las muestras al analizador de fragmentos fueron las siguientes: fragmentos-5 colores (matriz G5, 6-FAM, VIC, NED, PET, LIZ Dyes). Las mezclas para inyectar se prepararon con 3.5 μ l de la mezcla ecualizada de productos de PCR y 0.8 μ l de LIZ-500.

Para probar la variación en el tamaño de los alelos en un mismo individuo entre corridas distintas en el analizador de fragmentos se utilizaron 3 individuos como control positivo.

La variación y patrón alélico de los microsatélites amplificados fue caracterizado en el programa GeneMapper v.4.1 (Applied Biosystems).

I.5 RESULTADOS.

I.5.1 Análisis de clonas y secuencias.

Mediante el procedimiento de enriquecimiento anteriormente descrito se elaboró una librería genómica parcial enriquecida con fragmentos microsatélites. De esta librería se amplificaron 250 fragmentos clonados con un tamaño que varió de 250 a 2500 pares de bases. En base al tamaño observado se seleccionaron para secuenciación 187 clonas con un rango entre 400 y 1500 pb (Tabla I y Fig.6).

Tabla I. Relación del número de clonas analizadas, secuenciadas y con microsatélites, por cada sonda empleada durante el enriquecimiento.

Sonda	Clonas amplificadas	Clonas secuenciadas	Clonas con microsatélite	Tasa de éxito del enriquecimiento (%)
CT ₁₅	100	94	22	23.40
GT ₁₅	100	84	66	78.57
GATA ₁₀	50	9	6	66.66
Total	250	187	94	50.26

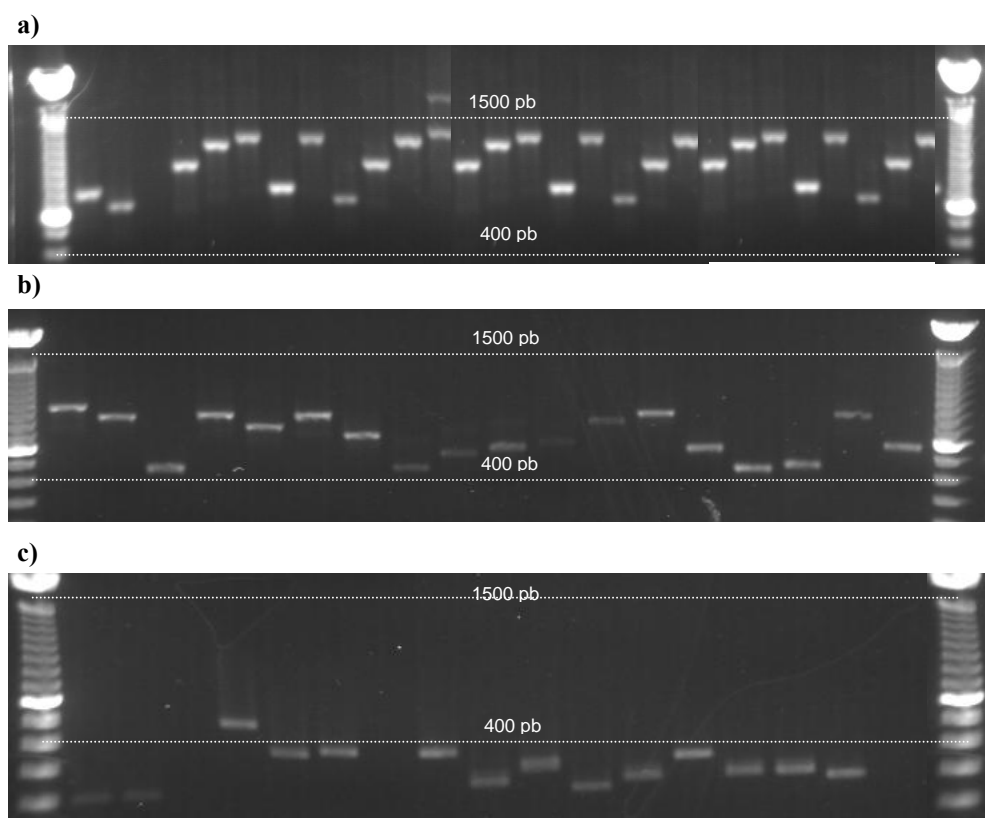


Figura 6. Tamaño en pares de bases (pb) de las clonas amplificadas por cada sonda empleada durante el enriquecimiento. CT_{15} (a), GT_{15} (b) y $GATA_{10}$ (c). Se señalan los fragmentos de 300 y 1500 pb del marcador de peso molecular

El número de secuencias que contenían microsatélites varió de acuerdo al tipo de sonda empleada. En el caso del enriquecimiento con CT_{15} se identificaron 22 secuencias con motivo de repetición microsatélite, para GT_{15} 66 secuencias y para el enriquecimiento con $GATA_{10}$ seis secuencias. Así el porcentaje total de clonas con microsatélites en relación al número de clonas secuenciadas resultó del 50.20% (Tabla I).

El análisis de secuencias mostró una amplia variedad en el tipo o pureza de microsatélites aislados. La mayor proporción de microsatélites estuvo conformada por

dinucleótidos puros (57.44 %), seguido de dinucleótidos compuestos (18.08 %), dinucleótidos interrumpidos (8.5 %) y en menor proporción por tri-, tetra- y pentanucleótidos (2.12 %, 7.44 % y 1.0 % respectivamente). Se identificaron también secuencias conteniendo mas de una región microsatélite conformadas principalmente por repeticiones de di- y tetranucleótidos. Este tipo de secuencias representó el 4.25 % del total de fragmentos microsatélites aislados (Tabla II).

El tipo de repetición más abundante aislado a partir de la sonda CT₁₅ fue el dinucleótido compuesto GT_nGA_n, seguido por los dinucleótidos puros CT_n y GT_n. En el caso de los motivos de repetición aislados a partir de la sonda GT₁₅ se aisló en mayor proporción el dinucleótido puro GT_n seguido por el dinucleótido imperfecto GT_nGC₁GT_n y el dinucleótido compuesto GT_nCT_n. Los motivos de repetición aislados a partir de la sonda GATA₁₀ incluyeron los tetranucleótidos GATA_n y TATC_n (Tabla II).

Tabla II. Motivos de repetición aislados a partir de la sonda CT₁₅, GT₁₅ y GATA₁₀.

Repetición	CT ₁₅	GT ₁₅	GATA ₁₀	Porcentaje total
Dinucleótidos				
Puros				57.44 %
CT	6	-	-	
GT	2	46	-	
Compuestos				18.08 %
GT _n GC _n	1	-	-	
GT _n GA _n	8	3	-	
GT _n CT _n	-	5	-	
Interrumpidos				8.5 %
CA _n CAA ₁ CA _n	-	1	-	
GT _n GC1GT _n	-	7	-	
CA _n CCCAA ₁ CA _n	-	1	-	
Trinucleótidos				2.12 %
GAG	1	-	-	
CTT	1	-	-	
Tetranucleótidos				7.44 %
TGTA	-	1	-	
TATC	-	-	2	
GATA	-	-	4	
Pentanucleótidos				1.00 %
GCCAA	1	-	-	
Mas de un micro (di y tetranucleótidos)				4.25 %
GA y GAAA	1	-	-	
GA y GATA	1	-	-	
GATA y CA	-	1	-	
CA _n , GA _n , CT _n y GT _n	-	1	-	

En relación al número de repeticiones por microsatélite, los dinucleótidos presentaron un rango amplio de variación con fragmentos que contenían de seis a más de 51 repeticiones. Los trinucleótidos presentaron de 7 a 15 repeticiones y los tetranucleótidos presentaron mayormente de 16 a 25 repeticiones. El único pentanucleótido identificado presentó 6 repeticiones.

I.5.2 Diseño de cebadores y pruebas de amplificación.

De las secuencias que contenían microsatélites se descartaron 39 para el diseño de cebadores debido a: a) el motivo de repetición se encontraba muy cerca de la región que incluye parte de la secuencia del vector de clonación+adaptador SuperSNX24, b) las zonas flanqueantes a la zona de repetición contenían largas secuencias de poli-A ó Poli-T y c) no se logró un empate óptimo entre la secuencia hacia adelante (por *forward*) y hacia atrás (por *reverse*). De las secuencias restantes se diseñaron 37 pares de cebadores de los cuales 31 fueron seleccionados para ser sintetizados en base al tipo de microsatélite y tamaño del fragmento esperado (Tabla III).

Tabla III. Tipo de repetición y tamaño del fragmento esperado para 31 pares de cebadores diseñados. Se muestra en negritas los 13 pares de cebadores que amplificaron productos específicos.

Cebador	Repetición	Tamaño Esperado	Cebador	Repetición	Tamaño Esperado
<i>Ashy</i> 1	GT ₁₉	102	<i>Ashy</i> 17	CA ₃₈	385
<i>Ashy</i> 2	CT₁₀	147	<i>Ashy</i> 18	GAG₆	391
<i>Ashy</i> 3	CA ₂₂	152	<i>Ashy</i> 19	GT₉GA₂₅	389
<i>Ashy</i> 4	GT _{36...}	175	<i>Ashy</i> 20	CA ₂₂	102
<i>Ashy</i> 5	TCTA ₁₇	150	<i>Ashy</i> 21	GT ₃₁	105
<i>Ashy</i> 6	GT ₂₇	190	<i>Ashy</i> 22	CTT₁₄	112
<i>Ashy</i> 7	CT ₁₃	201	<i>Ashy</i> 23	GT _{21..}	116
<i>Ashy</i> 8	CT_{25...}	203	<i>Ashy</i> 24	GT ₃₈	151
<i>Ashy</i> 9	GT₁₃GA₃₆	217	<i>Ashy</i> 25	CA ₁₄ CATA ₄	153
<i>Ashy</i> 10	GT ₁₇ GA ₂₇	228	<i>Ashy</i> 26	CA ₁₀	171
<i>Ashy</i> 11	CA ₁₄	243	<i>Ashy</i> 27	GT ₄₈	208
<i>Ashy</i> 12	TGTA₁₂	243	<i>Ashy</i> 28	GA₂₈	256
<i>Ashy</i> 13	GT ₃₈	257	<i>Ashy</i> 29	GT ₁₉	289
<i>Ashy</i> 14	TCTA ₃₁	296	<i>Ashy</i> 30	GA₁₁	297
<i>Ashy</i> 15	GT₁₄	300	<i>Ashy</i> 31	GT ₅₆	366
<i>Ashy</i> 16	GT ₂₅	352			

De los 31 cebadores analizados en ocho individuos, 18 fueron eliminados debido a: a) no se observó amplificación bajo ninguno de los ciclos y condiciones de PCR empleados, b) los productos amplificados no correspondían con el tamaño esperado ó c) amplificaban varias bandas inespecíficas. Los restantes 13 pares de cebadores mostraron la amplificación de productos específicos, es decir productos que correspondían con el tamaño esperado (Tabla III), sin embargo tres de ellos fueron posteriormente eliminados del análisis debido a que en una muestra de 16 individuos resultaron monomórficos ó presentaban patrones alélicos difíciles de interpretar. Con lo que finalmente se seleccionaron solo 10 pares de cebadores que en estos 16 individuos resultaron polimórficos (Tabla IV).

Las condiciones finales para la amplificación de estos 10 pares de cebadores se llevaron a cabo en volúmenes de 20 μ l en los que se pusieron 4 μ l de ADN (12.5 ng/ μ l), tampón de PCR 1X, MgCl₂ 2mM, 0.25 mM de cada dNTP, Albumina Serosa de Bovino BSA 0.01%, 0.5 U de Taq DNA polimerasa y 0.4 μ M de cada cebador. La proporción entre el cebador M13 marcado con fluorescencia y el cebador delantero-M13 para los marcadores *Ashy2*, *Ashy9*, *Ashy15*, *Ashy19*, *Ashy28* y *Ashy30* fue de 1:15 y para *Ashy8*, *Ashy12*, *Ashy18* y *Ashy22* de 1:11. El ciclo de PCR seleccionado para la amplificación de cada locus se especifica en la tabla IV.

Tabla IV. Cebadores y condiciones de PCR para diez loci microsatélites analizados de *A. hyperythra* y en especies y subespecies insulares del grupo *A. deppii*. Nombre del locus, número de acceso a GenBank, secuencia de los cebadores y marcaje con fluorescencia, motivo de repetición, tamaño clona (pb), ciclo de PCR (°C).

Locus	GenBank	Secuencia cebadores 5' - 3' y marcaje	Motivo de Repetición	Tamaño clona (pb)	TD (°C)
<i>Ashy2</i>	EU480676	F ^{^VIC} : GATACATACGTGGAACCTGAGAGC R: GTAACCTCACCTGAGACCTTTGAG	CT ₁₀	147	66-50
<i>Ashy8</i>	EU480678	F ^{^NED} : TTGCCACGGTATTTGCATTA R: TGACCAAACAGCACAGTTCC	CT ₂₈	203	66-50
<i>Ashy9</i>	EU480679	F ^{^PET} : GGTTCTGAATGGGGGAAAAT R: ATACCAAACCACGGAAGGAC	GT ₁₃ GA ₃₆	217	55-40
<i>Ashy12</i>	EU480680	F ^{^FAM} : TGCAGAAACATCAGATGCAA R: ACCCTTCAGGTATGGAGAGG	TGTA ₁₂	243	66-50
<i>Ashy15</i>	EU480681	F ^{^NED} : TGATCCACAAACCAGTGG R: TTCAATATAGCCGTAGTACGAG	GT ₁₄	300	66-50
<i>Ashy18</i>	EU480682	F ^{^FAM} : GACCAACATTTGCCTTTGTG R: GGCTCAACATGGCTCTCTTC	GAG ₆	391	55-40
<i>Ashy19</i>	EU480686	F ^{^PET} : GCTGCTAAGCTCTTGACTGTGA R: TGGGCACATATGAATGTGGT	GT ₉ GA ₂₅	389	66-50
<i>Ashy22</i>	EU480683	F ^{^FAM} : GTGGGGTAGAAAAGCCAAC R: CAAGCAAATGACAGGATAAGACT	CTT ₁₄	112	66-50
<i>Ashy28</i>	EU480684	F ^{^VIC} : TCCAAGTCATAATTGCCACAAG R: GATTGCCTGTGACCTACCAGA	GA ₂₈	256	66-50
<i>Ashy30</i>	EU480685	F ^{^VIC} : CTTTAATGAGTGGGGGTTG R: TCTGCCATAAATCTGAACCTG	GA ₁₀	297	60-45

[^] indica el cebador marcado con fluorescencia.

La amplificación cruzada en las cinco especies insulares evaluadas mostró en todos los casos la amplificación de productos específicos (Tabla V).

Tabla V. Número de alelos y rango alélico observado en especies y subespecies insulares del grupo *A. deppii*. Se muestra el número de individuos analizados (*n*), el número de alelos observado y entre paréntesis el rango alélico por locus.

Locus	<i>A. ceralbensis</i> Cerralvo <i>n</i> = 16	<i>A. h. carmenensis</i> Carmen <i>n</i> = 3	<i>A. pictus</i> Montserrat <i>N</i> = 2	<i>A. h. danheimae</i> San José <i>n</i> = 4	<i>A. h. franciscensis</i> San Francisco <i>n</i> = 3
<i>Ashy2</i>	6 (165-177)	1 (169)	1 (169)	2 (169-173)	1 (173)
<i>Ashy8</i>	4 (180-194)	3 (203-213)	1 (189)	5 (195-211)	2 (199-201)
<i>Ashy9</i>	11 (192-221)	5 (192-208)	2 (213-224)	6 (196-214)	2 (188-208)
<i>Ashy12</i>	12 (238-275)	5 (247-271)	3 (243-267)	7 (243-292)	2 (260-280)
<i>Ashy15</i>	11 (305-338)	3 (317-333)	-	6 (317-411)	3 (323-327)
<i>Ashy18</i>	2 (453-456)	1 (412)	2 (460-462)	1 (455)	1 (455)
<i>Ashy19</i>	5 (373-382)	3 (390-403)	3 (411-417)	4 (377-397)	4 (385-393)
<i>Ashy22</i>	1 (108)	5 (120-160)	4 (120-152)	7 (122-176)	3 (149-169)
<i>Ashy28</i>	3 (239-249)	2 (255-262)	2 (239-254)	4 (244-261)	2 (248-250)
<i>Ashy30</i>	7 (314-356)	2 (320-322)	2 (318-320)	4 (316-326)	1 (320)

La búsqueda en GeneBank no generó resultados significativos con microsatélites previamente aislados a partir de especies cercanamente relacionadas, específicamente con los reportados por Crawford *et al.* (2008) a partir de *A. costata* y *A. inornata*.

I.5.3 Análisis de microsatélites.

Los patrones de bandeo para 10 loci microsatélite resultaron consistentes con la amplificación de un único locus por marcador (ej. cada locus presentaban un máximo de dos bandas por individuo) entre las distintas muestras analizadas.

La inclusión de controles positivos entre corridas distintas en el analizador de fragmentos para detectar variaciones en el tamaño de los alelos no mostró cambios importantes, la variación máxima detectada en un individuo para uno de los fragmentos fue de ± 0.03 pb.

En las especies y subespecies insulares la mayoría de los loci presentaron variación aunque se encontraron loci fijos para un único alelo. Es el caso del locus *Ashy22* en *A. ceralbensis*, *Ashy2* y *Ashy18* en *A. h. carmenensis*, *Ashy2* y *Ashy8* en *A. pictus*, *Ashy18* en *A. h. danheimae* y *Ashy2* y *Ashy15* en *A. h. franciscensis* (Tabla V).

I.6 DISCUSIÓN.

El éxito en la estrategia de enriquecimiento empleada en este trabajo para la obtención de microsatélites en *A. hyperythra* resultó moderado, con un porcentaje del 50.20% (Tabla I). Este valor concuerda con la tasa de éxito que generalmente ha sido reportada en trabajos similares, la cual varía entre un 20% y un 90% (Zane *et al.* 2002). De forma particular la tasa de éxito por sonda empleada resultó variable y fue mayor para la sonda del dinucleótido GT₁₅, seguido de CT₁₅ y en menor grado para GATA₁₀. El análisis de secuencias mostró que los motivos de repetición más abundantes fueron los dinucleótidos, seguidos de tetranucleótidos y solo algunos trinucleótidos (aislados a partir de las sondas de dinucleótidos). Específicamente en el caso de los dinucleótidos se identificó un mayor número de microsatélites conteniendo la repetición pura de GT/CA y en menor proporción CT/GA, pese a que un número muy similar de clonas fue secuenciado para ambas sondas (Tabla I y II). Esta variación puede ser explicada a través de la frecuencia esperada en los motivos de repetición en el genoma de vertebrados, incluyendo reptiles. Según Tóth *et al.* (2008) y Zane *et al.* (2002) el motivo de repetición mas abundante en vertebrados es el dinucleótido GT/CA y en menor proporción CT/GA. Por otra parte en general los tetranucleótidos son menos abundantes en comparación con los dinucleótidos en el genoma de vertebrados, lo que podría explicar el menor éxito en la obtención de este tipo de microsatélites. Se debe remarcar que aunque el porcentaje de éxito en el enriquecimiento con GATA₁₀ es del 66.66%, en realidad este porcentaje es mucho menor al resto si consideramos el bajo número de clonas que lograron ser

amplificadas (clonas con inserto positivo) y el número de clonas que contuvieron microsatélite (Tabla I).

En relación a la pureza del tipo de repetición, se aisló un mayor número de microsatélites puros y un menor número de imperfectos (Tabla II). Por otra parte el mayor rango de variación en las unidades de repetición se observó entre los dinucleótidos. Por esta razón para la caracterización de microsatélites en *A. hyperythra* seleccionamos principalmente microsatélites perfectos y con un número de repeticiones de moderado a alto, en este caso principalmente dinucleótidos, ya que tienden a ser mas polimórficos que los microsatélites interrumpidos ó con un número bajo de repeticiones. Al respecto varios trabajos han demostrado la correlación positiva entre la longitud de la repetición, el tipo y la variabilidad del microsatélite (Weber 1990, Ellegren 2000, Brandström y Ellegren 2008).

Las condiciones finales para la amplificación de 10 loci microsatélite aislados de *A. hyperythra* fueron evaluadas y estandarizadas en ocho individuos colectados en distintas localidades peninsulares y además se logró la amplificación cruzada de estos marcadores en cinco especies o subespecies de islas. Estos resultados sugieren que los microsatélites caracterizados en este trabajo pueden resultar funcionales no solo en distintas poblaciones a lo largo de la distribución de la especie en estudios futuros sino también entre otros miembros del complejo *A. deppii* (*sensu* Grimer 1999 y Reeder 2002). Sin embargo hay que remarcar que en las especies insulares cercanamente relacionadas a *A. hyperythra* no sería raro observar un nivel de variación menor que en la especie blanco. Al respecto en esta parte del trabajo se detectaron varios loci fijos para un único alelo en las cinco especies

insulares. La incidencia de loci fijos en estas especies podría ser explicada por un efecto del bajo número de individuos analizados. Sin embargo cabe resaltar que en isla Cerralvo se analizaron 16 individuos y aún así se encontró fijo el locus *Ashy22*. Descartando un efecto del tamaño de muestra, varios estudios han demostrado que pese a que el éxito en la amplificación cruzada sea elevado a menudo el nivel de variación detectado es menor debido al sesgo predeterminado por *ascertainment bias* (Vowles y Amos 2006, Brandström y Ellegren 2008); ver discusión Capítulo II.

La búsqueda de fragmentos microsatélites homólogos en BLAST no generó resultados significativos entre los loci aislados en *A. hyperythra* en este trabajo y los reportados a partir de *A. costata* y *A. inornata* por Crawford *et al.* (2008) por lo que los 10 marcadores reportados en este trabajo representan un juego de marcadores nuevo y único. Por otra parte, la prueba de amplificación cruzada en un individuo de *A. hyperythra* mostró el éxito en la amplificación de nueve loci aislados por Crawford *et al.* (2008). Así, los cebadores diseñados por estos autores podrían ser posteriormente evaluados en un mayor número de individuos y localidades de *A. hyperythra* y ser aplicados en estudios posteriores. Aunado a este punto se debe mencionar que del total de microsatélites aislados en este trabajo aún restan por evaluar seis pares de cebadores y varias secuencias en las que se pueden diseñar y probar nuevos pares de cebadores, por lo que el número de marcadores microsatélites para *A. hyperythra* puede ser posteriormente incrementado con una inversión de tiempo y recursos relativamente bajo.

En resumen, los microsatélites aislados y estandarizados en *A. hyperythra* y transferidos en cinco taxa insulares pertenecientes al complejo *A. deppii* mostraron la amplificación de productos específicos. El polimorfismo detectado aún en un tamaño de muestra reducido sugiere su funcionalidad en el posterior análisis de la variación y diferenciación genética.

CAPÍTULO II

Variación y estructura genética en *A. hyperythra*

II.1 INTRODUCCIÓN

II.1.1 Diversidad genética en poblaciones.

La diversidad genética es uno de los atributos más importantes de las poblaciones y resulta particularmente importante en aspectos de conservación (Frankham 2005). Niveles altos de variación genética aumentan el potencial de las poblaciones para responder ante los cambios ambientales y mantener el éxito de los individuos. Por otra parte se predice que niveles bajos de diversidad genética aumentan la endogamia lo que reduce el éxito reproductivo y de supervivencia de los individuos y por tanto de las probabilidades de persistencia de las poblaciones (Freeland 2005).

Una de las medidas más comunes de diversidad genética es el cálculo de la heterocigosidad esperada. Este estimador se basa en el análisis de las frecuencias alélicas por locus y población y representa la frecuencia de heterocigotos que se esperarían en una población bajo el modelo de Hardy-Weinberg (Freeland 2005).

La variación genética surge a través de eventos de mutación y está influenciada por fuerzas como la migración, deriva genética y selección. En la mayoría de las poblaciones estas fuerzas actúan de forma simultánea pero la deriva genética juega un papel predominante en el nivel de variación genética neutral en poblaciones pequeñas y aisladas (Freeland 2005), como las poblaciones de islas.

La elevada tasa de mutación presente en loci microsatélite los ha convertido en una de las herramientas más utilizadas para el estudio de la diversidad genética. En general se espera que los loci microsatélite en las poblaciones naturales presenten niveles de heterocigosidad esperada por encima del 50% y hasta casi el 100% dependiendo del tipo y composición del microsatélite (Jarne y Lagoda 1996). Sin embargo, en diversos estudios de genética de poblaciones ha sido común observar niveles de heterocigosidad observada significativamente menores a lo esperado. Este déficit de heterocigotos puede resultar consistente con factores como el efecto Wahlund ó la endogamia poblacional, sin embargo también puede ser el resultado de la presencia de alelos nulos (Chapuis *et al.* 2005, Carlsson *et al.* 2006).

Debido que los alelos nulos crean falsos homocigotos, es decir individuos homocigotos aparentes que en realidad son individuos heterocigotos entre un alelo visible y un alelo nulo (Chakraborty *et al.* 1992, Pemberton *et al.* 1995) su aplicación en distintos estudios de genética principalmente en análisis de parentesco puede resultar problemática (Carlsson 2008). Además dado que pueden disminuir el nivel aparente de variabilidad genética, los niveles de diferenciación genética pueden ser subestimados (Chapuis y Estoup

2007). Sin embargo existen distintas aproximaciones que permiten lidiar con el problema de los alelos nulos y trabajar con el análisis de datos. Entre estas aproximaciones se encuentra: a) eliminar el locus afectado, b) tratar cada alelo como un marcador dominante, c) rediseñar cebadores ó d) realizar un ajuste en las frecuencias alélicas y genotípicas en base a la estimación de la frecuencia de alelos nulos (Chapuis *et al.* 2007). De estas opciones el ajuste de frecuencias alélicas es la opción más recurrente.

Los alelos nulos se presentan en la mayoría de los taxa pero parecen ser particularmente comunes en insectos (Chapuis *et al.* 2005) y moluscos (Carlsson *et al.* 2006). De acuerdo con un análisis realizado por Dakin y Avise (2004) sobre microsatélites aislados para estudios de parentesco y estructura poblacional la frecuencia de alelos nulos varió de un 5% a un 75% por locus y se situó principalmente en un 20% entre distintos taxa, incluyendo moluscos y vertebrados.

II.1.2 Estructura y Flujo génico.

La mayoría de las especies muestran algún nivel de estructura genética ó diferenciación genética. La estructura genética hace referencia a la adquisición de frecuencias alélicas que difieren entre subpoblaciones de una especie, y puede ser el resultado de la interacción entre factores ambientales, historias de vida (ej. sistemas de apareamiento), fuerzas azarosas (ej. deriva genética, mutación) y deterministas (ej. selección) (Hartl y Clark 1997 y Freeland 2005). Otro factor que contribuye a la estructuración genética de las poblaciones es el aislamiento por distancia ya que la

distribución geográfica de las especies a menudo es mayor que la capacidad de dispersión de los individuos. Bajo este modelo poblaciones cercanas son genéticamente más similares que poblaciones geográficamente más distantes (Balloux y Lugon-Moulin 2002).

Uno de los retos en el análisis de la estructura de las poblaciones es determinar la cantidad de flujo génico entre poblaciones. El flujo génico es un componente principal de la estructura poblacional porque determina hasta qué punto cada población local (subpoblación) de una especie es una unidad evolutiva independiente (Slatkin 1993). Cuanto flujo se requiere para impedir la evolución independiente en poblaciones locales diferentes depende de que otras fuerzas evolutivas se encuentren actuando. Uno de los modelos más simplistas para el estudio del flujo génico y estructura de poblaciones es el modelo isla de Wright. En este modelo cada población local (subpoblación) es lo suficientemente grande como para que el efecto de la deriva genética sea mínimo, y asume que la migración entre cada subpoblación se da de tal forma que las frecuencias alélicas entre los migrantes igualan al promedio de las frecuencias alélicas entre subpoblaciones. Así, el resultado de Wright para el modelo de isla habla del equilibrio alcanzado entre el flujo génico y la deriva genética. Si el número de migrantes (Nm) es mucho mayor que 1 entonces el flujo génico sobrepasa los efectos de la deriva e impide la diferenciación local (Slatkin 1993).

II.1.2.1 Índices de fijación F_{ST} y R_{ST} .

El entendimiento del modelo de mutación que subyace a la evolución de los microsatélites ha resultado de gran importancia para el desarrollo de estadísticos apropiados para el estudio de la diferenciación poblacional y flujo génico (Balloux y Lugon-Moulin 2002). Se han propuesto dos modelos principales para explicarla:

a) El modelo de mutación de alelos infinitos IAM (por *Infinite Alleles Model*). Según el cual cada mutación genera un alelo nuevo, previamente no existente en la población, e involucra la pérdida o ganancia de cualquier número de repeticiones. Ya que cada mutación genera un alelo único se asume ancestría común entre alelos idénticos en tamaño y por lo tanto son considerados como alelos idénticos por descendencia IBD.

b) El modelo de mutación por pasos SMM (por *Stepwise Mutation Model*) propone que cada mutación añade o elimina con la misma probabilidad unidades de repetición en cada alelo. Bajo este modelo dos alelos idénticos en tamaño no necesariamente resultan idénticos por descendencia.

En general el modelo de SMM se emplea más frecuentemente para describir el proceso mutacional de microsatélites. Bajo este modelo se espera la incidencia de homoplasia, es decir de alelos idénticos en estado (ej. mismo tamaño) pero no idénticos por descendencia (Jarne y Lagoda 1996 y Estoup *et al.* 2002).

Para estimar la conectividad ó flujo génico entre poblaciones empleando microsatélites muchos estudios se basan en los estadísticos F_{ST} de Wright (1951) y/ó R_{ST} de Slatkin (1995).

El índice F_{ST} se deriva de la varianza en las frecuencias alélicas y se define como la correlación entre dos alelos seleccionados al azar al interior de las subpoblaciones en relación a los alelos muestreados al azar en la población total. F_{ST} alcanza un valor de uno cuando las dos subpoblaciones son totalmente homocigotas y fijadas para alelos alternativos y un valor de cero cuando las frecuencias alélicas en ambas subpoblaciones son idénticas (Balloux y Lugon-Molin 2002, Tabla VI).

Tabla VI. Interpretación de los valores de F_{ST} .

Valor de F_{ST}	Nivel de diferenciación genética
0-0.05	Bajo
0.05-0.15	Moderado
0.15-0.25	Elevado
>0.25	Muy elevado

El índice R_{ST} se calcula a partir de la varianza en el tamaño de los alelos y representa un análogo a F_{ST} pero asumiendo un modelo SMM (Balloux y Lugon-Moulin 2002).

En una población ideal (modelo de isla) y asumiendo que la mutación sigue un modelo IAM, F_{ST} representa una función decreciente de $N(m+\mu)$, el producto del tamaño poblacional local (N) y la suma de la migración (m) y mutación (μ). F_{ST} puede ser convertido en una simple función del número de migrantes (Nm) cuando la mutación es mínima. Sin embargo ese no suele ser el caso de los microsatélites. Además bajo modelos de mutación que generan homoplasia como SMM la relación entre F_{ST} , el número de migrantes y la mutación no se mantiene. De forma contraria R_{ST} es independiente de la tasa de mutación pero bajo un estricto modelo SMM. La desventaja de R_{ST} es la alta varianza que genera. Incluso bajo un estricto modelo SMM, las estimaciones basadas en F_{ST} a menudo pueden funcionar mejor que su contraparte R_{ST} (Balloux y Lugon-Moulin 2002).

II.2 ANTECEDENTES.

II.2.1 Variación geográfica de *A. hyperythra*.

A lo largo de su distribución *A. hyperythra* presenta variación geográfica. Dicha variación se ha estudiado en base a características morfológicas y caracteres de folidosis, y aunque en principio se sugirió la presencia de tres subespecies de *A. hyperythra* en la península: *C. h. beldingi* en el norte, *C. h. schmidti* en el centro de Baja California y *C. h. hyperythrus* en el sur de Baja California (Walter y Taylor 1968), en estudios más recientes estas subespecies no son reconocidas (Grismer 1999).

II.2.2 Capacidad de Movimiento.

Algunos estudios han sugerido que *A. hyperythra* puede moverse distancias relativamente moderadas pero mayores a otras especies de reptiles con tamaños corporales similares (ej. Juveniles de *Dipsosaurus dorsalis*, *Eremias lineoocellata*, *Eremias lugubris* y *Uta stansburiana*) (Garland 1993, en Wright y Vitt 1993). Por otro lado, en un estudio realizado en las cercanías de Cabo San Lucas , B.C.S., Karasov y Anderson (1984) sugirieron que *A. hyperythra* puede presentar variaciones en la distancia diaria recorrida, dependiendo del tipo de hábitat y debido principalmente a diferencias en el tiempo de actividad total, también reportan que existen diferencias entre sexos, siendo los machos quienes presentan una mayor capacidad de dispersión. Por ejemplo con un 56 a 78% del tiempo en locomoción, los machos pueden desplazarse de 371 a 832 m/día mientras que las hembras con un 76 a 73% del tiempo en locomoción pueden desplazarse de 187 a 404 m/día.

Por otra parte, la relación entre taxa de islas adyacentes o entre la península e islas del Golfo de California ha sugerido que miembros del género *Aspidoscelis* podrían presentar movimientos a través del agua durante eventos climatológicos como tormentas y huracanes. Por ejemplo Grismer (1999) sugirió que esto podría haber sucedido entre *A. carmenensis* y *A. pictus* que son especies hermanas que habitan en isla Carmen e isla Monserrat respectivamente. Isla Carmen es una isla conectada a continente con una

profundidad del canal baja mientras que Monserrat es una isla oceánica; ambas islas nunca han estado conectadas.

En base a estos antecedentes se propuso estudiar la diferenciación genética entre dos poblaciones peninsulares de *A. hyperythra* y en ausencia de datos acerca de la capacidad de dispersión de la especie inferir el nivel de flujo génico empleando marcadores microsatélites, así como comparar el nivel de diferenciación de poblaciones peninsulares (una que llamaremos población del Km128, situada cerca del km 128 de la carretera transpeninsular y otra en El Comitán, la reserva ecológica del CIBNOR), respecto a *A. h. espiritensis*, habitante de isla Espíritu Santo, cercana al continente y que ha estado conectada con el mismo hasta tiempos recientes. Así consideramos a *A. espiritensis* (*sensu* Grismer 1999) como una subespecie de *A. hyperythra*, es decir teniendo en cuenta la clasificación previa (Walker y Taylor 1968). Con fines comparativos se incluyó muestras de *A. ceralbensis* (que habita solamente en Isla Cerralvo).

II.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Obtención de estimas de diversidad genética para 10 loci microsatélite en *A. hyperythra* y *A. ceralbensis*.
- Probar equilibrio de Hardy-Weinberg y de ligamiento en *A. hyperythra* y *A. ceralbensis*.
- Probar la incidencia de estructura genética y nivel de diferenciación genética entre dos localidades peninsulares y una insular de *A. hyperythra* y una población insular de *A. ceralbensis*.
- Estimaciones de flujo génico entre localidades de *A. hyperythra*

II.4 HIPÓTESIS.

HO1:

Las poblaciones, tanto insular como peninsular, de *A. hyperythra* mostrarán niveles más elevados de variación genética para 10 loci microsatélites que la población de *A. ceralbensis* debido a que esta última es una especie confinada solamente a isla Cerralvo.

HO2:

Las localidades peninsulares de *A. hyperythra* muestreadas estarán genéticamente más relacionadas entre sí (mayor flujo génico) que con respecto a la localidad insular de Espiritu Santo (*A. h. espiritensis*), y *A. ceralbensis* mostrará un alto nivel de diferenciación con respecto a *A. hyperythra* tanto insular como peninsular.

II.5 MATERIALES Y MÉTODOS.

II.5.1 Colecta de muestras.

Para el análisis de la variación intra e interpoblacional se aumentaron los tamaños de muestra que se tenían hasta 2006, durante el mes de Febrero de 2008 en las localidades de Comitán, el Km128, Isla Espiritu Santo e isla Cerralvo (Tabla VII). Los métodos de colecta de individuos y obtención de tejido fueron los ya descritos (Capítulo I). En la población de El Comitán, la ubicación del sitio donde la lagartija era observada por vez primera fue registrado empleando un sistema de posicionamiento global GPS (por *Global Positioning System*).

Tabla VII. Localidad de muestreo, número de individuos colectados por año.

Localidad	<i>n</i> por año	<i>N</i> total
Km128	17 (2004)	20
	3 (2008)	
Comitán	8 (2004)	31
	23 (2008)	
Espiritu Santo	11 (2004)	21
	10 (2008)	
Cerralvo	12 (2004)	16
	4 (2008)	

II.5.2 Amplificación de microsatélites mediante PCR y asignación de genotipos.

Los 10 loci microsatélites previamente caracterizados fueron amplificados en el total de las capturas realizadas en las localidades de Km128, Comitán, Espiritu Santo y Cerralvo bajo las condiciones y ciclos de PCR ya descritos en el Capítulo I.

El polimorfismo y patrón alélico de los microsatélites amplificados fue caracterizado en el programa GeneMapper v.4.1 (Applied Biosystems). La asignación de genotipos se apoyó también en el programa Flexibin v.2 (Amos 2007). En ocasiones el cambio entre las distintas clases de tamaño en un locus no es exactamente de dos pares de bases, como se espera en el caso de dinucleótidos por ejemplo, sino que puede ser ligeramente menor o mayor. En consecuencia el forzar los alelos a una periodicidad de dos pb puede generar problemas en el nombramiento de los alelos. A partir de los datos de tamaño exacto observado para cada alelo, este programa genera un gráfico de la distribución en el tamaño de los alelos, determina el cambio exacto entre cada clase y asigna con un color diferente cada clase de tamaño lo que permite distinguir con mayor claridad y precisión los distintos alelos en cada población de estudio.

II.5.3 Variación intrapoblacional en *A. hyperythra* y *A. ceralbensis*.

II.5.3.1 Estimaciones de Diversidad Genética.

Para *A. hyperythra* (Comitán, Km128 y Espíritu Santo) y *A. ceralbensis* (Isla Cerralvo) se estimaron los parámetros de diversidad genética en términos del número de alelos por locus (NA), heterocigosidad observada (H_O) y esperada (H_E) en el programa GENETIX 4.05.2 (Belkhir 2004). La estimación de la riqueza alélica (AR) por población se realizó mediante el método de rarefacción incorporado en el programa HP-RARE ponderando para el tamaño mínimo de muestra detectado en las cuatro poblaciones (Kalinowski 2006).

La normalidad de los datos de riqueza alélica (AR), heterocigosidad observada (H_O) y esperada (H_E) fue evaluada mediante un test de Kolmogorov-Smirnof de una cola empleando el programa STATISTICA v.6 (StatSoft Inc). Finalmente, se probó la significancia de las diferencias observadas entre pares de poblaciones para estos índices mediante una prueba no paramétrica de Wilcoxon.

II.5.3.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) y endogamia poblacional (F_{IS}).

El análisis al equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) se realizó mediante una prueba exacta de Fisher empleando el método de cadenas de Markov y siguiendo los parámetros propuestos en el programa GENEPOP 3.4 (Raymond & Rousset 1995) bajo la hipótesis nula de asociación al azar de los gametos. El criterio de significancia de esta prueba ($\alpha = 0.05$) fue ajustado empleando una prueba secuencial de Bonferroni (Rice 1989).

La relación entre el número de individuos heterocigotos observados (ej. el déficit o exceso) y el esperado fue evaluada a partir del coeficiente de endogamia (f) según el estimador F_{IS} de Weir y Cockerham (1984). Este coeficiente fue calculado a nivel global, por población (para el total de las muestras en cada localidad) y por locus. La variación en la estimación global de este parámetro fue estimada mediante una prueba de *jackknife* por locus. La significación en la estimación por población fue calculada mediante pruebas de permutación (ej. 1000). Los intervalos de confianza al 95% fueron calculados mediante 1000 remuestreos en el programa GENETIX 4.05.2 (Belkhir 2004).

II.5.3.3 Análisis del Desequilibrio de Ligamiento (LD).

El desequilibrio de ligamiento (LD) por pares de loci fue determinado aplicando una prueba exacta de Fisher empleando el método de cadenas de Markov y siguiendo los parámetros propuestos en el programa GENEPOP 3.4 (Raymond & Rousset 1995) bajo la hipótesis nula de independencia entre los genotipos de loci distintos en cada localidad. El criterio de significancia ($\alpha = 0.05$) de esta prueba fue ajustado empleando una prueba secuencial de Bonferroni.

II.5.3.4 Incidencia de alelos nulos y otros errores durante la asignación de genotipos.

Mediante el análisis de la distribución esperada de homocigotos por clase de tamaño observada en cada loci microsatélite se evaluó si las desviaciones al equilibrio de Hardy-Weinberg pudieran estar relacionadas con errores en la asignación de genotipos debido a la incidencia de alelos nulos, amplificación preferencial del alelo pequeño (ej. *short allele dominance*) o cambios en el tamaño del producto amplificado durante la PCR (ej. *stuttering* ó bandas fantasmas). La frecuencia de alelos nulos por locus y población se estimó a partir del índice de Brookfield 1 (Brookfield 1996) en Microchecker v.2.2.3 (Oosterhout *et al.* 2003) y empleando el algoritmo de Maximización de la Expectativa EM (por *Expectation Maximization*) de Dempster *et al.* (1997) en el programa FreeNA (Chapuis y Estoup 2007).

II.5.3.5 Efecto del tipo de muestreo en el nivel de heterocigosidad observada.

Para probar si el nivel de heterocigosidad observada por población pudiera estar relacionado con la captura de grupos independientes de individuos altamente relacionados entre sí (ej. grupos familiares), se estimó el coeficiente de parentesco de Queller y Goodnight (1989) por par de individuos en cada localidad a partir del cálculo de r_{xy} = dos veces la probabilidad de que un gen tomado al azar de un individuo x sea idéntico por descendencia en relación a otro gen tomado al azar de un individuo y para un locus diploide autosomal (ej. $r_{xy}=0.5$ hermanos de los mismos padres, $r_{xy}=0.25$ hermanos con solo un padre en común y $r_{xy}=0$ no relación). Se probó la hipótesis nula de no relación de parentesco (genotipos multilocus son muestras independientes de una población panmictica) empleando métodos de permutación que comparan la distribución observada, en este caso de la varianza, de los coeficientes de parentesco pareados con la distribución esperada en poblaciones no estructuradas. La significación se obtuvo mediante 1000 permutaciones de acuerdo al procedimiento incorporado en el programa IDENTIX (Belkhir *et al.* 2002).

II.5.3.6 Variación espacio-temporal en muestras del Comitán.

Para el análisis de la variación temporal el total de la muestra en Comitán, por ser la población con mayor número de muestras, se dividió en dos submuestras: una conteniendo las capturas realizadas en 2004 y otra conteniendo las capturas en 2008, pero incluyendo solo individuos colectados en un mismo lado de la carretera. Se calculó el parámetro de coancestría θ_{ST} y el coeficiente de endogamia F_{IS} en las submuestras y se probó si estos resultaban ó no significativamente diferentes de cero.

En el caso del análisis para detectar variación espacial a menor escala en Comitán, se siguió el mismo procedimiento ya descrito pero dividiendo el total de las colectas en submuestras que contenían individuos capturados en un mismo año de muestreo pero a distintos lados de la carretera.

La significancia de estas estimaciones fue calculada mediante 1000 permutaciones en el programa GENETIX 4.05.2 (Belkhir 2004)

II.5.4 Diferenciación y estructura genética interpoblacional en *A. hyperythra*.

Los análisis detallados en los siguientes apartados fueron realizados en algunos casos a partir de correcciones para la incidencia de alelos nulos siguiendo las aproximaciones de ENA (por *Excluding Null Alleles*) ó INA (por *Including Null Alleles*) incluidas en el programa FreeNA (Chapuis y Estoup 2007). Los resultados obtenidos para cada estimación fueron contrastados con los calculados a partir del conjunto de datos original (sin corrección para alelos nulos).

II.5.4.1 Análisis de estructura genética entre poblaciones.

La significancia de las diferencias observadas entre pares de poblaciones en sus distribuciones alélicas fue analizada mediante una prueba exacta de Fisher (1000 demorizaciones, 100 batches y 1000 repeticiones) en el programa GENEPOP ver 3.4 (Raymond & Rousset 1995) bajo la hipótesis nula de distribución alélica idéntica entre poblaciones y empleando el conjunto de datos original, es decir sin corrección para alelos nulos.

II.5.4.2 Análisis Factorial de Correspondencia (AFC).

Como un primer método exploratorio para el estudio de la diferenciación genética entre localidades se realizó un análisis factorial de correspondencia AFC a partir de los genotipos con corrección para alelos nulos según el método INA. El AFC es un análisis canónico multivariado y que ha sido adaptado para describir la asociación entre dos variables cualitativas. Las variables cualitativas se representan por las frecuencias alélicas de las poblaciones. Con este análisis es posible ubicar la posición de cada individuo en el hiperespacio formado por tantas dimensiones como modalidades, de acuerdo al método implementado en el programa GENETIX 4.05.2 (Belkhir 2004).

II.5.4.3 Estimaciones de diferenciación genética (F_{ST}) y número de migrantes (Nm).

El grado de diferenciación genética entre subpoblaciones de *A. hyperythra* fue estimado a partir del índice de fijación F_{ST} de Wright siguiendo el método ENA en el programa FreeNA (Chapuis y Estoup 2007). El método ENA estima las frecuencias de alelos nulos y alelos visibles para cada par de locus y población, posteriormente asigna un único alelo no presente en el conjunto de datos original para los alelos nulos, ajusta las frecuencias genotípicas de homocigotos y calcula el índice de fijación F_{ST} global y el coeficiente de coancestría θ_{ST} por pares de poblaciones en base a Weir (1996) limitando el cálculo a los estados visibles. El estado del alelo nulo es ignorado en el cálculo y la suma de las frecuencias alélicas y genotípicas no son ajustadas a 1. Esto es factible debido a que

el valor estimado de F_{ST} para un locus dado es la combinación apropiada de estimaciones de F_{ST} para alelos individuales.

El intervalo de confianza al 95% fue determinado mediante 1000 remuestreos (por *bootstrap*). La diferenciación genética entre pares de poblaciones fue determinada a partir del cálculo del coeficiente de coancestría θ_{ST} permutando individuos al azar entre cada par de poblaciones. Con fines comparativos se calculó θ_{ST} entre cada población de *A. hyperythra* (incluyéndose la población de E. santo) respecto a *A. ceralbensis*.

Los valores de F_{ST} global y θ_{ST} por pares fueron calculados también a partir del conjunto de datos original de acuerdo con la variación de Weir y Cockerham (1984) en el programa GENETIX 4.05.2 (Belkhir 2004). La variación en la estimación global fue calculada mediante una prueba de *jacknife* por loci y la significación en la estimación pareada fue obtenida mediante 1000 permutaciones. Los valores de F_{ST} global y θ_{ST} fueron contrastados con los obtenidos a partir del método ENA.

A partir del cálculo del parámetro θ_{ST} se estimó y comparó el número de migrantes (Nm) entre pares de poblaciones de *A. hyperythra* para ambos conjuntos de datos, corrección ENA y sin corrección, de acuerdo con $Nm = 1 - F_{ST} / 4 * F_{ST}$ asumiendo un modelo de islas en equilibrio migración-deriva.

II.5.4.4 Construcción de dendogramas a partir del cálculo de distancias genéticas.

La divergencia genética por pares de poblaciones fue determinada utilizando las distancias D_{CE} de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) a partir de los datos de genotipos originales y corregidos según la aproximación INA (Chapuis y Estoup 2007). La significancia de las estimaciones fue obtenida mediante 1000 permutaciones en el programa GENETIX 4.05.2 (Belkhir 2004). A partir de las distancias calculadas para los datos con corrección INA se construyó un dendograma poblacional mediante el método de agrupamiento pareado no ponderado usando las medias aritméticas UPGMA (por *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*). Se obtuvo una estima del soporte para cada nodo mediante 1000 *bootstrap*. Para incluir a los individuos de cada localidad en un mismo dendograma se calcularon las distancias de alelos compartidos D_{AS} (por *Shared Allele Distance*, Chakraborty y Jin 1993) a partir del conjunto original de datos. La construcción del dendograma se realizó con el método del vecino mas cercano NJ (por *Neighbor-Joining*) empleando los programas Populations 1.2.30 (Langella 1999) y MEGA 4 (Tamura *et al* 2007).

II.5.4.5 Estructura genética e inferencia de flujo génico empleando pruebas de asignación de individuos.

Para comprobar la estructura previamente detectada e inferir flujo génico entre poblaciones, se realizó un análisis bayesiano de asignación de individuos en el programa STRUCTURE 2.1 (Pritchard *et al.* 2000). Este programa asume un modelo en el que cada grupo ó población es modelado por un conjunto característico de frecuencias alélicas en cada locus. Los genotipos de los individuos colectados se denotan por X , Z denota la población de origen (puede o no ser desconocida), y P denota las frecuencias alélicas (pueden o no ser desconocidas) en el total de las poblaciones. Los caracteres X , Z y P denotan vectores multidimensionales. Así bajo el supuesto de equilibrio de Hardy Weinberg y equilibrio de ligamiento cada alelo por locus en cada genotipo representa una muestra independiente de la apropiada distribución de frecuencias, lo que especifica la distribución de probabilidad $\Pr(X|Z,P) \propto \Pr(Z) \Pr(P) \Pr(X/Z,P)$. La distribución *a posteriori* es calculada empleando el método de Monte Carlo de Cadenas de Markov, infiriendo los valores de Z y P dado los genotipos observados, X .

En resumen, los individuos en la muestra son asignados por probabilidad a una población ó a dos o más poblaciones si sus genotipos indican que son mezclados y buscando maximizar el equilibrio de Hardy Weinberg al interior de cada población.

Se realizó una primera inspección para estimar el periodo de calentamiento (por *burn-in*) y el número de replicas que eran necesarios para que los parámetros de verosimilitud (*likelihood*) y F_{ST} se estabilizaran. Los parámetros finales consistieron en 250,000 réplicas durante el periodo de calentamiento, los valores de probabilidad fueron calculados mediante 1,000,000 replicas subsiguientes. Se simularon hasta 8 *K* (poblaciones) con 3 réplicas por cada una para comprobar que no existieran variaciones en las estimaciones de los parámetros. En las simulaciones se incluyó a las cuatro poblaciones de muestreo asumiendo dos modelos: a) modelo de mezcla y frecuencias alélicas correlacionadas y b) modelo de no mezcla y frecuencias alélicas no correlacionadas. Lo anterior para probar como variaban los resultados al incluir las muestras de *A. ceralbensis* en las simulaciones.

Carlsson (2008) demostró que aun en poblaciones en desequilibrio de Hardy-Weinberg, generado por la incidencia de alelos nulos, este tipo de pruebas pueden ser aplicadas ya que estos artefactos generan una menor capacidad en el poder de asignación individual, sin embargo en conjunto el número de loci y el nivel de diferenciación genética tienen un mayor efecto en la precisión de este tipo de análisis. Así, se emplearon los datos sin corrección para alelos nulos de acuerdo con lo propuesto por este autor.

II.6 RESULTADOS.

II.6.1 Asignación de genotipos en *A. hyperythra* y *A. ceralbensis*.

La inspección visual de los alelos asignados automáticamente mostró la incorrecta asignación de algunos de ellos e inconsistencia en su detección cuando presentaban patrones de cúspides dobles ó bandas fantasma (caso de los loci *Ashy2*, *Ashy18* y *Ashy30*); también se detectó inconsistencia en el caso de individuos heterocigotos para alelos entre los que había una diferencia grande en pares de bases entre el alelo de menor y mayor tamaño debido a que la señal del segundo alelo era muy débil y el programa no siempre lo reconocía como un alelo (caso de los loci *Ashy22* y *Ashy12*). Por lo que se realizó un ajuste manual de los alelos.

Además se detectaron en varios loci alelos intermedios que no se ajustaron al modelo esperado de cambios en el número de repeticiones, principalmente en El Comitán. En el programa Flexibin se logró visualizar mejor la distribución de los tamaños alélicos y distinguir mejor entre cada clase de tamaño y el cambio exacto en pares de bases. En la figura 6 se muestran dos ejemplos de la fase gráfica generada por Flexibin, indicando un locus con clases de tamaño bien definidas y fáciles de interpretar en cualquiera de los dos programas empleados y un locus con incidencia de alelos intermedios y con clases de tamaño difíciles de asignar en GeneMapper pero que en Flexibin pudieron ser más fácilmente identificadas.

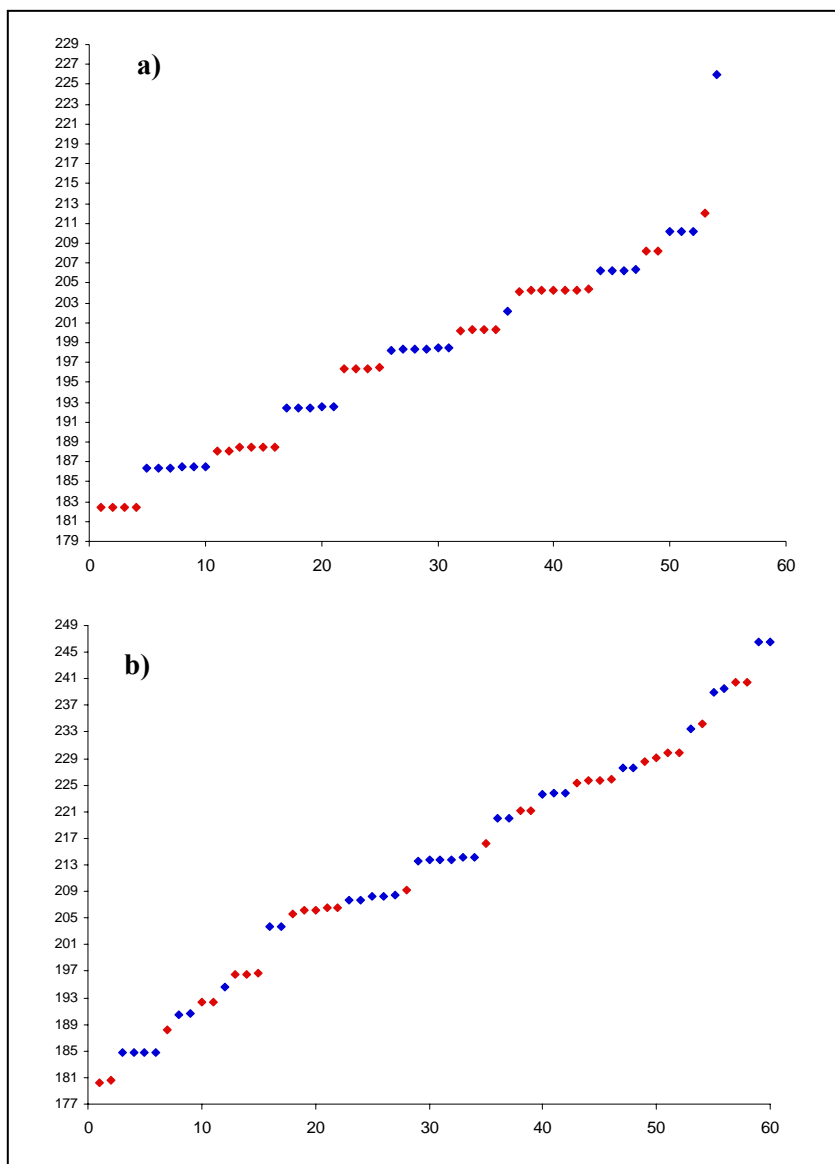


Figura 7. Distribución de los tamaños alélicos observados para los marcadores Ashy8 (a) y Ashy9 (b) en individuos del Comitán. Se muestran en rojo y azul las distintas clases de tamaño sugeridas por Flexibin. Los tamaños corresponden a los observados, incluyendo la extensión 5' de la secuencia M13 utilizada para el marcaje indirecto.

El rango alélico observado por locus resultó mayor para las localidades de *A. hyperythra* y en todos los caso *A. ceralbensis* mostró un rango mas estrecho de tamaños alélicos (Tabla VIII).

Tabla VIII. Rango alélico amplificado por marcador y población.

	Km128	Comitán	E. Santo	Cerralvo
<i>Ashy2</i>	161-173	155-179	159-187	165-177
<i>Ashy8</i>	186-234	182-212	182-212	180-194
<i>Ashy9</i>	126-225	180-246	186-246	192-221
<i>Ashy12</i>	237-307	227-312	225-295	238-275
<i>Ashy15</i>	369-391	301-391	202-387	305-338
<i>Ashy18</i>	408-453	408-456	408-455	453-456
<i>Ashy19</i>	370-391	368-414	370-403	373-382
<i>Ashy22</i>	110-179	108-179	108-205	108
<i>Ashy28</i>	233-284	233-273	233-265	239-249
<i>Ashy30</i>	316-330	308-332	312-339	314-356

II.6. 2 Variación Intrapoblacional

II.6.2.1 Estimaciones de Diversidad Genética.

Para cada población de muestreo de *A. hyperythra* se realizaron estimaciones de la variabilidad genética en términos de número de alelos (N_A), riqueza alélica (AR), heterocigosidad observada (H_O) y heterocigosidad esperada (H_E), para 10 loci microsatélite. Se encontró un promedio de 9.9m alelos en la población de Km128, 17.7 en Comitán y de 10.8 en Espíritu Santo. En el caso de *A. ceralbensis* se observó el menor promedio en esta estimación. Los valores de riqueza alélica empleando el método de rarefacción en las cuatro poblaciones mostraron valores muy similares a los obtenidos a partir de la estimación del

número de alelos. La heterocigosidad esperada en las cuatro poblaciones mostró valores de moderados a altos. El mayor valor promedio en esta estimación se detectó en el Comitán y el menor en Isla Cerralvo. Por su parte la heterocigosidad observada fue baja en las cuatro poblaciones, con un promedio de 0.59 en Comitán a 0.55 en Espíritu Santo. En *A. ceralbensis* se encontró fijo *Ashy22* (Tabla IX).

Tabla IX. Variabilidad genética en *A. hyperythra* y *A. ceralbensis*. Se muestra el tamaño de muestra (N) por población, el número de individuos analizados por locus (n), número de alelos (N_A), la riqueza alélica (AR), heterocigosidad esperada (H_E), heterocigosidad observada (H_O) y los valores promedio.

		<i>Ashy2</i>	<i>Ashy8</i>	<i>Ashy9</i>	<i>Ashy12</i>	<i>Ashy15</i>	<i>Ashy18</i>	<i>Ashy19</i>	<i>Ashy22</i>	<i>Ashy28</i>	<i>Ashy30</i>	Promedio
Km128 N (20)	n	20	20	20	20	20	20	20	20	20	17	19.7
	N_A	5	13	11	13	8	3	4	19	16	7	9.9
	AR	4.89	11.45	9.84	11.9	6.68	2.91	3.97	16.04	13.60	6.79	8.8
	H_E	0.609	0.846	0.846	0.915	0.537	0.432	0.491	0.951	0.926	0.811	0.73
	H_O	0.500	0.742	0.600	0.850	0.400	0.400	0.350	0.900	0.650	0.176	0.55
Comitán N (31)	n	31	27	30	26	31	28	29	31	31	31	29.5
	N_A	12	13	24	20	25	10	13	29	18	13	17.7
	AR	9.58	11.41	17.84	15.66	17.75	8.13	11.1	18.1	13.46	11.36	13.4
	H_E	0.846	0.920	0.965	0.948	0.961	0.78	0.907	0.962	0.933	0.905	0.91
	H_O	0.742	0.593	0.4	0.577	0.677	0.357	0.414	0.806	0.677	0.742	0.59
E. santo N (21)	n	21	19	20	18	18	20	17	21	21	21	19.6
	N_A	11	10	11	10	7	9	8	19	10	13	10.8
	AR	10.4	9.12	9.79	9.44	6.73	7.9	7.71	15.55	8.92	12.10	9.7
	H_E	0.893	0.865	0.853	0.868	0.819	0.758	0.775	0.937	0.872	0.928	0.85
	H_O	0.905	0.684	0.3	0.278	0.278	0.65	0.294	0.81	0.619	0.762	0.55
Cerralvo N (16)	n	16	14	15	15	14	15	15	16	15	16	15.1
	N_A	6	4	11	12	11	2	5	1	3	7	6.16
	AR	5.98	4	10.78	11.46	11	2	4.93	1	2.93	6.6	5.19
	H_E	0.821	0.378	0.887	0.717	0.894	0.46	0.761	0	0.246	0.694	0.58
	H_O	0.938	0.286	0.533	0.267	0.786	0.267	0.200	0	0.267	0.500	0.40

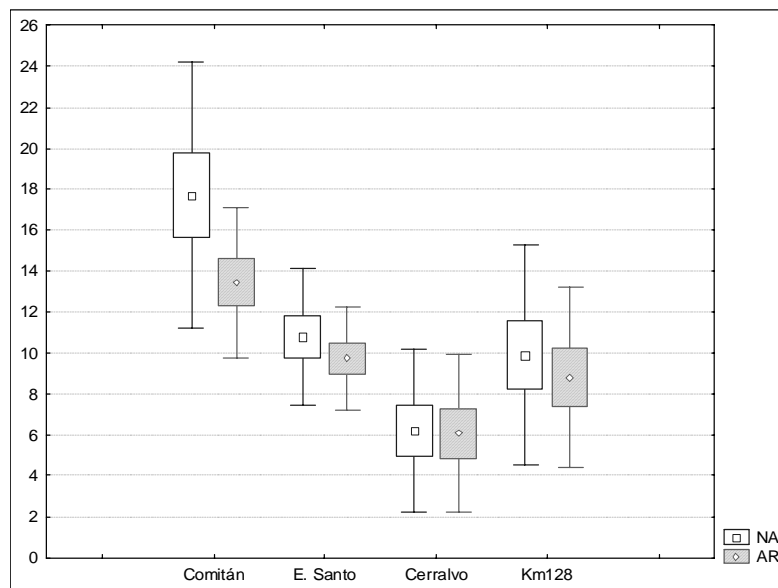


Figura 8. Valores promedio en las estimaciones del número de alelos (N_A) y riqueza alélica (AR). Se muestra el error estándar de la media (rectángulo) y la desviación estándar (línea vertical).

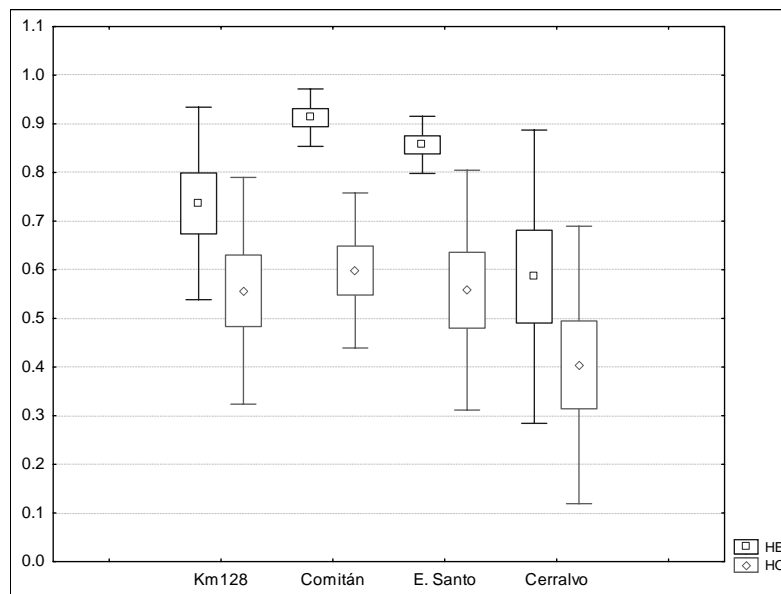


Figura 9. Valores promedio en las estimaciones de heterocigosidad esperada (H_E) y heterocigosidad observada (H_O). Se muestra el error estándar de la media (rectángulo) y la desviación estándar (línea vertical).

De acuerdo con el test de Kolmogorov-Smirnof las datos de Heterocigosidad observada y riqueza alélica resultaron normales ($D=0.110$ y $P>0.20$ y $D=0.801$ y $P>0.20$) y los datos de heterocigosidad esperada no normales ($D=0.222$ y $P<0.05$) por lo que se aplicó una prueba no paramétrica de Wilcoxon para evaluar si existían diferencias significativas en estas estimaciones entre pares de poblaciones.

Se encontraron diferencias significativas en los valores de heterocigosidad esperada y riqueza alélica entre la mayoría de las poblaciones, excepto entre los pares Km128-Espíritu Santo y Km128-Cerralvo. Los valores más altos de H_E , R_A y N_A correspondieron a las poblaciones de Comitán y Espíritu Santo, siendo Cerralvo la población que consistentemente mostró valores más bajos en los tres estimadores (Tabla IX, Fig. 7 y 8). No se detectaron diferencias significativas en valores de heterocigosidad observada para ninguna de las comparaciones pareadas (Tabla X).

Tabla X. Significancia de las diferencias observadas en los valores de diversidad genética por pares de poblaciones. Se muestra la heterocigosidad esperada (H_E), heterocigosidad observada (H_O) y riqueza alélica (AR).

Poblaciones	H_E	H_O	AR
Km128 vs. Comitán	0.00506*	0.7896	0.0207*
Km128 vs. Espíritu Santo	0.0926	0.4235	0.6566
Km128 vs. Cerralvo	0.5076	0.1548	0.3739
Comitán vs. Espíritu Santo	0.0284*	0.5750	0.0218*
Comitán vs. Cerralvo	0.0050*	0.0593	0.0050*
Cerralvo vs. Espíritu Santo	0.0284*	0.2026	0.0468*

* Valores significativos ($P<0.050$)

II.6.2.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) y endogamia poblacional (F_{IS}).

Para la mayoría de los loci analizados se detectó un déficit de heterocigotos en las cuatro poblaciones de estudio. El análisis del HWE mostró desviaciones altamente significativas, incluso después de realizar un ajuste en los niveles de significancia ($\alpha= 0.05$) para comparaciones múltiples mediante la prueba secuencial de Bonferroni. El número de loci en desequilibrio de HW dentro de cada población resultó variable (Tabla XI). En la población del km128 se detectaron tres loci en desequilibrio ($P<0.007$), en la de Comitán ocho loci ($P<0.025$), en la de Espíritu Santo cuatro loci ($P<0.008$) y en la de Cerralvo tres loci ($P<0.008$).

El parámetro de endogamia (f) global para las cuatro poblaciones calculado a partir del estadístico F_{IS} resultó elevado, con un valor de 0.33240 ($IC_{95\%}= 0.24264-0.41846$). Mediante una prueba de *Jackknife* se comprobó que no existen grandes variaciones en la estimación de este parámetro al eliminar la información de un locus en cada paso (Tabla XII). Por población este parámetro F_{IS} mostró valores altos de endogamia. En la población del Km128 mostró un valor de 0.300, en Comitán el valor fue de 0.3482, en Espíritu Santo de 0.355 y en la de Cerralvo el valor fue de 0.31754. Todos los valores fueron mayores ó iguales que todos los obtenidos de las permutaciones al azar de alelos en individuos de la misma población, por lo que resultan altamente significativos ($P<0.001$).

Tabla XI. Análisis del HWE y estimación del coeficiente de endogamia (F_{IS}). Se muestra por población la heterocigosidad observada (H_O) y esperada (H_E), el valor de P exacto así como el coeficiente de endogamia F_{IS} por locus y población.

Localidad	Estima	Locus										Promedio
		Ashy2	Ashy8	Ashy9	Ashy12	Ashy15	Ashy18	Ashy19	Ashy22	Ashy28	Ashy30	
Km128	H_O	0.500	0.742	0.600	0.850	0.400	0.400	0.350	0.900	0.650	0.176	0.550
	H_E	0.609	0.846	0.846	0.915	0.537	0.432	0.491	0.951	0.926	0.811	0.730
	P	0.291	0.000*	0.030	0.594	0.069	0.733	0.027	0.197	0.001*	0.000*	-
	F_{IS}	0.183	0.556	0.296	0.073	0.260	0.076	0.293	0.055	0.303	0.788	0.300
Comitán	H_O	0.742	0.593	0.400	0.577	0.677	0.357	0.414	0.806	0.677	0.742	0.590
	H_E	0.846	0.920	0.965	0.948	0.961	0.780	0.907	0.962	0.933	0.905	0.910
	P	0.259	0.000*	0.000*	0.000*	0.010*	0.000*	0.000*	0.029	0.000*	0.008*	-
	F_{IS}	-	0.360	0.590	0.396	0.299	0.547	0.548	0.164	0.278	0.182	0.348
E. Santo	H_O	0.905	0.684	0.300	0.278	0.278	0.650	0.294	0.810	0.619	0.762	0.550
	H_E	0.893	0.865	0.853	0.868	0.819	0.758	0.775	0.937	0.872	0.928	0.850
	P	0.951	0.303	0.000*	0.000*	0.000*	0.052	0.000*	0.057	0.209	0.010	-
	F_{IS}	-	0.213	0.654	0.686	0.667	0.145	0.628	0.139	0.295	0.183	0.355
Cerralvo	H_O	0.938	0.286	0.533	0.267	0.786	0.267	0.200	0	0.267	0.500	0.400
	H_E	0.821	0.378	0.887	0.717	0.894	0.460	0.761	0	0.246	0.694	0.580
	P	0.099	0.086	0.000*	0.000*	0.064	0.231	0.000*	-	1	0.036	-
	F_{IS}	-	0.252	0.407	0.636	0.125	0.429	0.744	-	-0.087	0.286	0.3175

* Desviación significativa al equilibrio Hardy-Weinberg después de realizar un ajuste secuencial de Bonferroni (Rice, 1989); km128 ($P < 0.007$), Comitán ($P < 0.025$), Espíritu Santo ($P < 0.008$) y Cerralvo ($P < 0.008$).

Tabla XII. Variación en la estimación del F_{IS} global. Se muestra el valor de la media y la desviación estándar.

<i>Jacknife</i>	F_{IS}
Sin <i>Ashy</i> 28	0.33914
sin <i>Ashy</i> 30	0.33445
sin <i>Ashy</i> 2	0.36366
sin <i>Ashy</i> 22	0.35423
sin <i>Ashy</i> 18	0.33176
sin <i>Ashy</i> 8	0.32826
sin <i>Ashy</i> 15	0.33129
sin <i>Ashy</i> 9	0.31020
sin <i>Ashy</i> 19	0.30855
Sin <i>Ashy</i> 12	0.32216
Media :	0.33272
Desviación estándar	0.04919

II.6.2.3 Análisis al Desequilibrio de Ligamiento (LD).

No se encontró desequilibrio de ligamiento (LD) en ningún par de loci en ninguna de las cuatro poblaciones, tras realizar un ajuste en los valores de significancia ($\alpha=0.05$) empleando una prueba secuencial de Bonferroni ($P<0.001$). Es decir, este análisis mostró un número efectivo de 10 marcadores microsatélite por población y la no asociación entre genotipos de loci distintos, por lo que la variación en cada locus resulta independiente del resto.

II.6.2.4 Incidencia de alelos nulos y otros errores durante la asignación de genotipos.

El análisis de la distribución esperada de homocigotos por clase de tamaño observada en cada loci microsatélite sugirió la incidencia de alelos nulos dentro de las

cuatro localidades. En las poblaciones de Km128 y Comitán este tipo de artefactos podrían estar presentes en cuatro y siete loci respectivamente, en la de Espíritu Santo en cinco loci y en dos en la de Cerralvo.

La frecuencia de alelos nulos de acuerdo al estimador de Brookfield 1 mostró que los loci con la mayor frecuencia en cada población son: *Ashy8* y *Ashy30* en la población del Km128; *Ashy9* y *Ashy19* en la población de Comitán; *Ashy9* y *Ashy12* en la población de Espíritu Santo; y *Ashy19* en la población de Cerralvo. El cálculo en las frecuencias de alelos nulos a partir del estimador de Maximización de la Expectativa (EM) mostró valores similares (Tabla XIII).

Tabla XIII. Frecuencia de alelos nulos por locus y población. Estimación según el estimador de Brookfield 1 y el algoritmo EM. Para el estimador de Brookfield se muestra entre paréntesis el valor de *P* exacto.

Localidad	Estimador	<i>Ashy2</i>	<i>Ashy8</i>	<i>Ashy9</i>	<i>Ashy12</i>	<i>Ashy15</i>	<i>Ashy18</i>	<i>Ashy19</i>	<i>Ashy22</i>	<i>Ashy28</i>	<i>Ashy30</i>
Km128	Brookfield	-	0.2493 (0.001)	0.1233 (0.05)	-	-	-	-	-	0.1327 (0.025)	0.3417 (0.001)
	EM	0.0584	0.2504	0.1047	0.0000	0.0991	0.0000	0.1295	0.0094	0.1342	0.4631
Comitán	Brookfield	-	0.1632 (0.001)	0.2816 (0.001)	0.1828 (0.001)	0.138 (0.01)	0.2315 (0.001)	0.2524 (0.001)	0.0784 (#)	0.1256 (0.01)	0.0784 (#)
	EM	0.0500	0.2014	0.2501	0.1819	0.1379	0.2658	0.3082	0.0652	0.1262	0.0825
E. santo	Brookfield	-	-	0.2901 (0.001)	0.3071 (0.001)	0.2887 (0.001)	-	0.2616 (0.001)	-	0.1255 (0.05)	0.075 (#)
	EM	0.0000	0.0795	0.3234	0.3073	0.3413	0.0613	0.2888	0.0480	0.1254	0.0867
Cerralvo	Brookfield	-	-	0.1746 (0.025)	0.252 (#)	-	-	0.3086 (0.001)	-	-	-
	EM	0.0000	0.0992	0.3089	0.2415	0.0684	0.1291	0.1701	0.0010	0.0000	0.0556

valores de *P* no significativos.

- Incidencia de alelos nulos no detectada.

La incidencia de errores en la asignación de genotipos debido a otros factores como amplificación preferencial del alelo pequeño (*short allele dominance*) y bandas fantasma (*stutter*) fue descartada para todos los loci en las cuatro poblaciones de acuerdo al análisis de la distribución de homocigotos por clase de tamaño en Microchecker.

II.6.2.5 Efecto del tipo de muestreo en el nivel de heterocigosidad observada.

Se observó una amplia variación en los valores de parentesco (r_{xy}) entre pares de individuos por población (Fig. 10). El análisis de la distribución de los datos observados respecto a lo esperado por azar mostró en las cuatro poblaciones una distribución relativamente unimodal y una media no significativamente mayor a lo esperado bajo la hipótesis nula de no parentesco ($P > 0.05$). La media del coeficiente de parentesco (r_{xy}) en Km128 resultó de -0.05, en el Comitán de -0.03, en Espíritu Santo de -0.05 y en Cerralvo de -0.06.

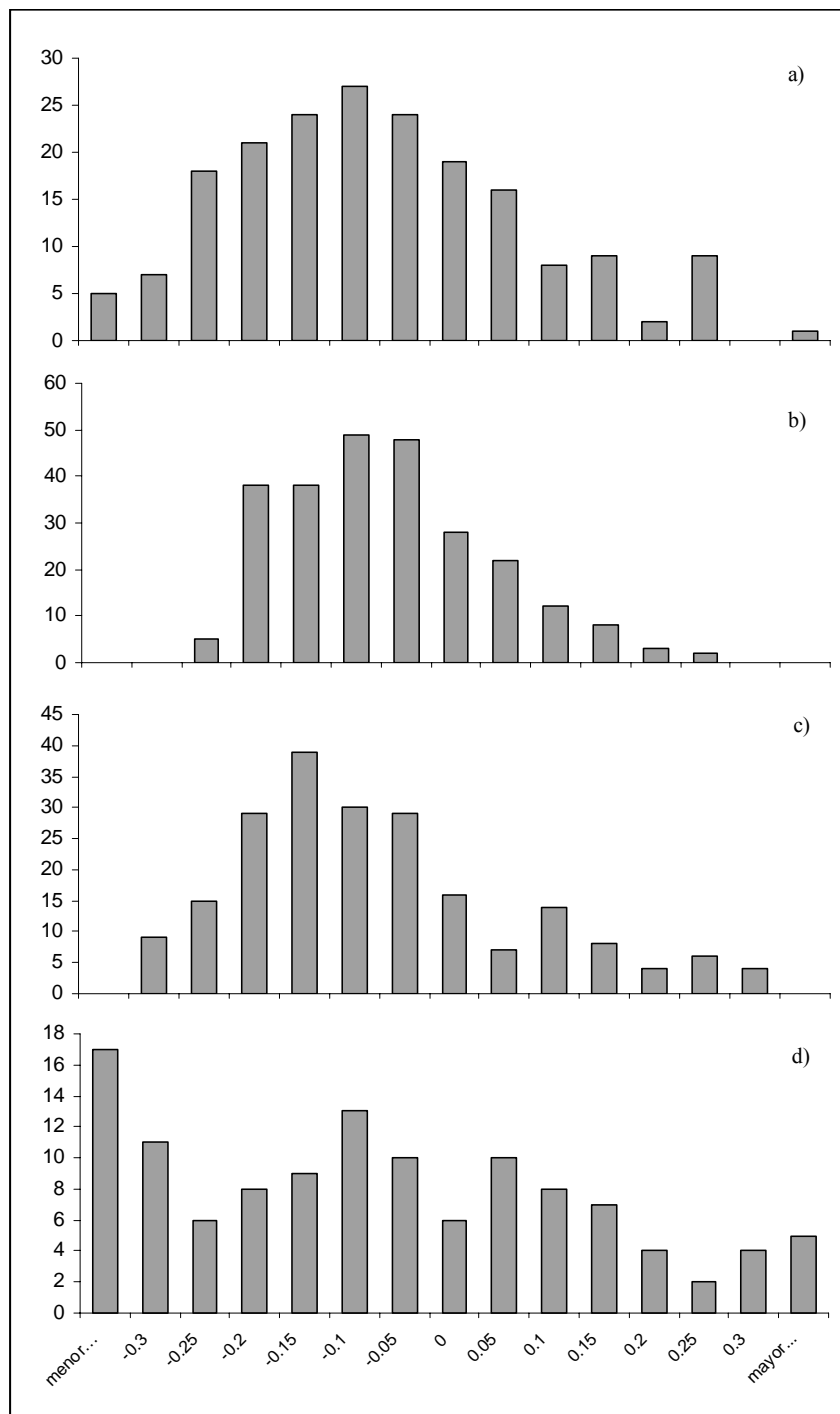


Figura 10. Distribución observada del coeficiente de parentesco r_{xy} entre pares de individuos. Se muestra las clases (eje x) y el número de observaciones en cada clase (eje y) por población. a) Km128, b) Comitán, c) Espíritu Santo y d) Cerralvo.

II.6.2.6 Variación espacio-temporal en muestras del Comitán.

El análisis sobre la variación espacio-temporal en Comitán mostró valores θ_{ST} moderados y significativamente distintos de cero entre submuestras pertenecientes a años distintos ó que fueron colectadas en un mismo año pero a uno y otro lado de la carretera. Por su parte el coeficiente de endogamia F_{IS} en las submuestras mostró valores aún elevados y significativamente distintos de cero (Tabla XVI).

Tabla XIV. Valores del coeficiente de coancestría y endogamia F_{IS} en submuestras provenientes de distintos años y puntos de colecta para la población del Comitán

	Submuestras	θ_{ST}	F_{IS}
Espacio	a) 10 individuos, lado 1 de la carretera, año 2008		0.263 ($P=0.000$)
	b) 12 individuos, lado 2 de la carretera, año 2008		0.38366 ($P=0.000$)
		0.0097 ($P=0.014$)	
Tiempo	a) 8 individuos lado 1 de la carretera, 2004		0.34671 ($P=0.000$)
	b) 10 individuos lado 1 de la carretera, 2008		0.26391 ($P=0.000$)
		0.0252 ($P=0.0023$)	

II.7 Análisis interpoblacional en *A. hyperythra*.

II.7.1 Análisis de estructura genética entre poblaciones.

El análisis de la distribución de frecuencias alélicas (Anexo 2) entre pares de poblaciones mostró que aunque hay alelos idénticos en estado compartidos entre localidades existen diferencias altamente significativas en sus frecuencias alélicas ($P < 0.001$).

II.7.2 Análisis Factorial de Correspondencia (AFC).

El AFC mostró para los dos conjuntos de datos, corrección INA y datos originales, que existen centros de gravedad independientes, es decir que existen diferencias genéticas entre poblaciones. Se observan en la Figura 11 para la corrección INA, dos grupos principales separados a lo largo del primer eje: un grupo conformado por la población Cerralvo y otro formado por las poblaciones de Km128, Comitán y Espíritu Santo. Dentro de este segundo grupo el segundo eje permite separar los individuos de Espíritu Santo del resto, manteniéndose un alto traslape entre Comitán y Espíritu Santo. El porcentaje de la varianza total explicada por los tres primeros ejes resultó del 10 %. El eje 1 representó el mayor porcentaje de la varianza explicada con un 3.57

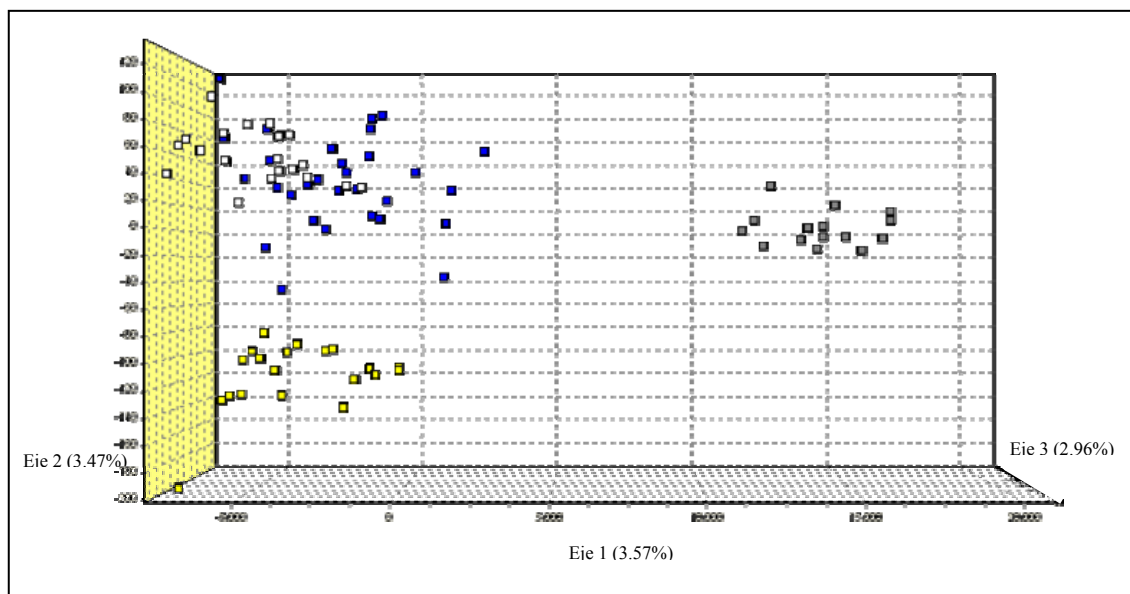


Figura 11. Análisis Factorial de Correspondencia. Datos corregidos de acuerdo al método INA. Entre paréntesis se muestra el porcentaje de la varianza explicada por cada eje. Cerralvo (gris), Km128 (amarillo), Comitán (azul) y Espíritu Santo (blanco).

II.7.3 Estimaciones de diferenciación genética (F_{ST}) y número de migrantes (Nm).

El nivel de diferenciación genética global, es decir incluyendo las poblaciones de Km128, Comitán y Espíritu Santo, de acuerdo a la estimación del índice de fijación F_{ST} resultó moderado y similar para ambos conjuntos de datos (corrección ENA y datos originales). La estimación del parámetro F_{ST} global según el método ENA, es decir eliminando los alelos nulos resultó de 0.073715 ($IC_{95\%} = 0.041236$ a 0.112133). Para los datos sin corrección para alelos nulos mostró un valor de 0.0803 ($IC_{95\%} = 0.0502$ a 0.1176). Mediante una prueba de *jackknife* se comprobó que no existen grandes variaciones en la estimación global al eliminar la información de un locus en cada paso (Tabla XV).

Tabla XV. Variación en la estimación del F_{IS} global. Se muestra el valor de la media y la desviación estándar.

Jacknife	F_{ST}
Sin loc <i>Ashy28</i>	0.0858
sin loc <i>Ashy30</i>	0.0838
sin loc <i>Ashy2</i>	0.08180
sin loc <i>Ashy22</i>	0.08606
sin loc <i>Ashy18</i>	0.06925
sin loc <i>Ashy8</i>	0.08411
sin loc <i>Ashy15</i>	0.07016
sin loc <i>Ashy9</i>	0.08239
sin loc <i>Ashy19</i>	0.07518
Sin loc <i>Ashy12</i>	0.08496
Media :	0.08018
Desviación estándar	0.01827

La diferenciación genética entre pares de poblaciones a partir del cálculo del coeficiente de coancestría θ_{ST} tanto para datos con corrección ENA como datos sin corrección, coincidió en asignar una mayor similitud entre las poblaciones de Espiritu Santo y Comitán (valores de 0.03817 y 0.02878) que entre las de Comitán y Km128 (valores de 0.09715 y 0.09369). La diferenciación genética entre Cerralvo y cualquiera de las poblaciones de *A. hyperythra* resultó elevada (Tabla XVI).

La prueba de significancia en los valores pareados de θ_{ST} de esta prueba mostró en todos los casos valores altamente significativos ($P < 0.001$).

Tabla XVI. Diferenciación genética entre pares (θ_{ST}). (a) Conjunto de datos original y (b) corrección ENA (excluyendo alelos nulos).

a)

θ_{ST}	Comitán	Espíritu Santo	Cerralvo
Km128	0.0971	0.1165	0.2586
Comitán	---	0.0381	0.1657
Espíritu Santo	---	---	0.2104

b)

θ_{ST}	Comitán	Espíritu Santo	Cerralvo
Km128	0.0936	0.1086	0.2548
Comitán	---	0.0287	0.1693
Espíritu Santo	---	---	0.2058

La estimaciones del número de migrantes Nm por generación entre pares de poblaciones asumiendo equilibrio migración-deriva, resultó en valores mayores entre las poblaciones de Comitán y Espíritu Santo que entre las de Comitán y Km128 tanto en datos con la corrección ENA como con los datos originales sin corrección, aunque ligeramente mayores en el caso de los datos con corrección ENA (Tabla XVII).

Tabla XVII. Número de migrantes por generación entre pares de poblaciones.(a) Conjunto de datos original y (b) corrección ENA.

a)

Nm	Comitán	Espíritu Santo
Km128	2.32	1.89
Comitán	---	6.3

b)

Nm	Comitán	Espíritu Santo
Km128	2.41	2.05
Comitán	---	8.43

II.7.4 Construcción de dendogramas a partir del cálculo de distancias genéticas.

El cálculo de las distancias genéticas D_{CE} (Cavalli-Sforza y Edwards 1967) por pares de poblaciones a partir de datos originales y con corrección INA mostró valores muy similares (Tabla XVIII) e indicó que Km128 y Comitán mantienen una mayor diferenciación genética que Comitán con respecto a Espíritu Santo. Los valores estimados resultaron altamente significativos ($P < 0.001$). El dendograma UPGMA agrupó a Km128, Comitán y Espíritu Santo en un mismo *cluster* con soporte de *bootstrap* del 99 %. A su vez Comitán y Espíritu Santo se mantuvieron más cercanos entre sí que respecto a Km128 (Fig. 12).

Tabla XVIII. Distancias genéticas D_{CE} por par de poblaciones. (a) Corrección INA y (b) datos originales.

a)			
D_{CE}	Comitán	Espíritu Santo	Cerralvo
Km128	0.072	0.078	0.090
Comitán	---	0.051	0.079
Espíritu Santo	---	---	0.090

b)			
D_{CE}	Comitán	Espíritu Santo	Cerralvo
Km128	0.081	0.088	0.097
Comitán	---	0.065	0.094
Espíritu Santo	---	---	0.106

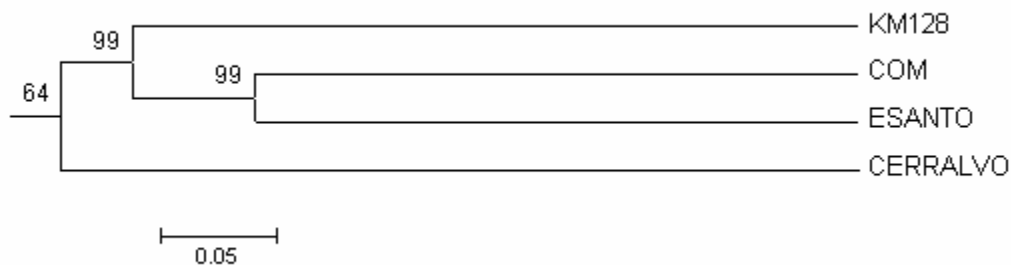


Figura 12. Dendrograma UPGMA poblacional. Se muestran los valores de *bootstrap* para cada nodo y la escala de la distancia genética.

El dendrograma a nivel individual construido a partir del cálculo de las distancias de alelos compartidos D_{AS} (Chakraborty y Jin 1993) mostró cuatro grupos principales (Fig. 13). Todos los individuos de la población de Cerralvo se mantuvieron en un solo *cluster* bien definido y separado del resto por una longitud de la rama mayor (en azul). El segundo grupo está formado casi exclusivamente por individuos del Km128 (en verde). Los dos grupos restantes contienen una mezcla formada principalmente por individuos de Espíritu Santo y el Comitán.

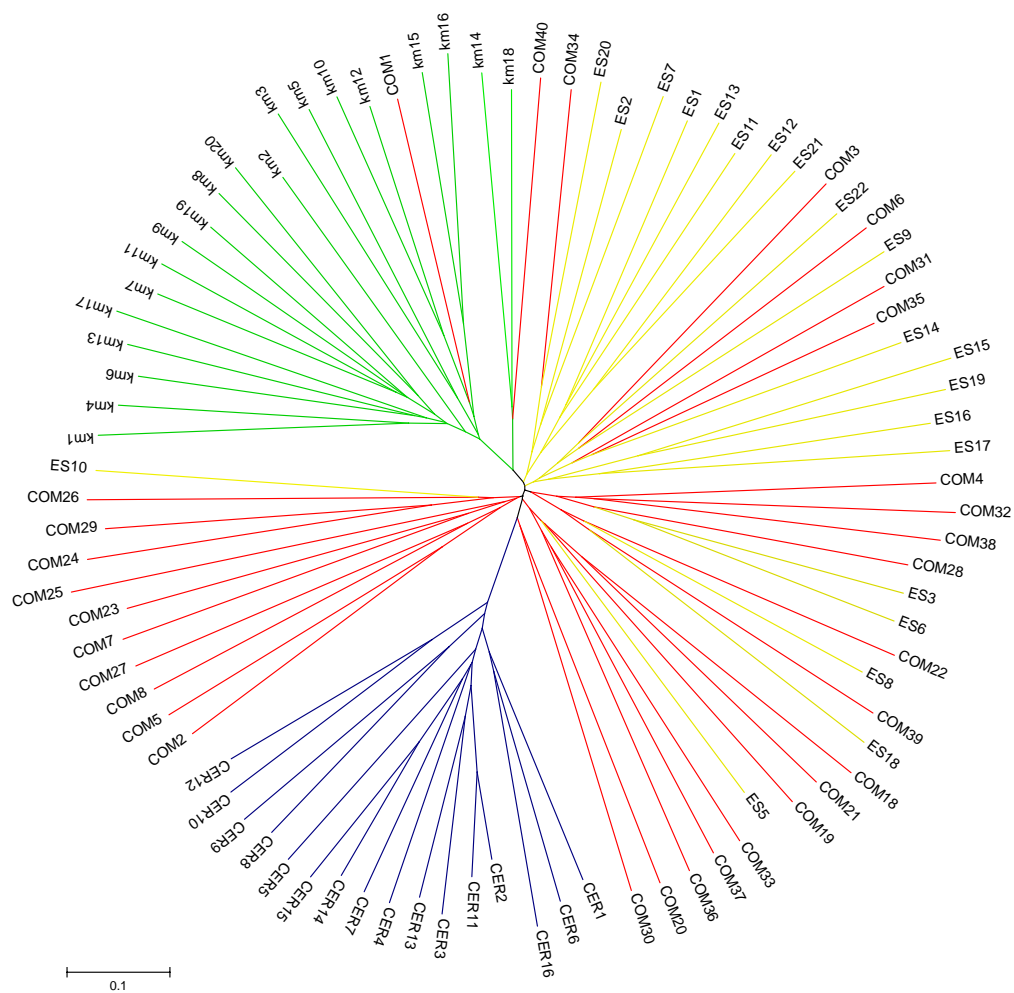


Figura 13. Dendrograma NJ incluyendo a cada individuo por población. Se muestra la escala de la distancia genética.

II.7.5 Estructura genética e inferencia de flujo génico empleando pruebas de asignación de individuos.

El análisis sobre la agrupación de individuos empleando el método Bayesiano de asignación en STRUCTURE corroboró la existencia de cuatro grupos ó poblaciones ($K=4$). Todos los individuos colectados en Isla Cerralvo fueron asignados con una alta probabilidad a su población de origen. En el caso de *A. hyperythra* los individuos del Km128 fueron asignados a un único grupo. En el caso de las poblaciones de Comitán e isla Espíritu Santo la mayoría de los individuos fueron asignados con una alta probabilidad a su población de origen. Sin embargo entre estos dos grupos se detectaron individuos que fueron clasificados con mayor probabilidad a una población distinta de la que fueron colectados ó con la misma probabilidad a dos poblaciones (Fig. 14 y Tabla XIX). Estos individuos pueden corresponder con migrantes recientes ó hijos de migrantes entre las poblaciones de Comitán y Espíritu Santo.

Se debe mencionar que los resultados no mostraron variaciones importantes en la probabilidad de asignación individual según el modelo asumido entre poblaciones.

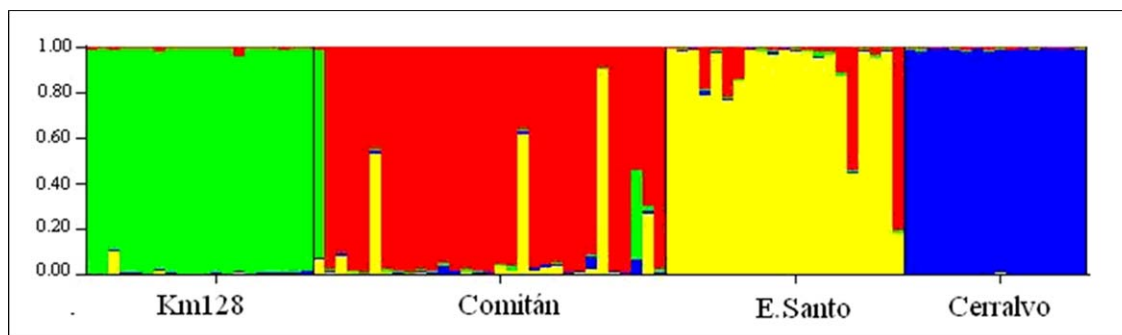


Figura 14. Poblaciones inferidas mediante el análisis en STRUCTURE. Las barras de color distinto al que corresponde por grupo señalan a individuos asignados a una población diferente de la que fueron muestreados.

Tabla XIX. Probabilidad de pertenencia en base a pruebas de asignación de individuos. Se muestran los individuos que fueron asignados a una población de origen distinta a la de colecta ó con una probabilidad similar de pertenecer a dos poblaciones.

Población	Individuo	Probabilidad de pertenencia
Comitán		
	1	0.08 a Comitán y 0.91 a Km128
	6	0.44 a Comitán y 0.54 a E. Santo
	19	0.36 a Comitán y 0.61 a E. Santo
	29	0.53 a Comitán y 0.30 a E. Santo
	30	0.67 a Comitán y 0.30 a E. Santo
Espíritu Santo		
	4	0.78 a E. Santo y 0.20 a Comitán
	6	0.76 a E. Santo y 0.22 a Comitán
	17	0.48 a E. Santo y 0.50 a Comitán
	21	0.22 a E. Santo y 0.76 a Comitán

II.8 DISCUSIÓN.

II.8.1 Rangos alélicos observados entre miembros del complejo *A. deppii* e incidencia de Homoplasia.

En las especies y subespecies del complejo *A. deppii* analizadas en este estudio se identificaron alelos idénticos en estado. Dada la alta tasa de mutación en loci microsatélites y bajo un modelo de mutación por pasos, SMM, es posible la incidencia de homoplasia. Estudios sobre la incidencia y nivel de homoplasia dentro y entre especies en varios taxa han concluido que: a) La homoplasia generalmente resulta mayor entre especies que entre las poblaciones de una misma especie y es muy rara entre individuos de una misma población y b) existe una variación en la cantidad de homoplasia entre loci microsatélites, lo que puede ser explicado por la variación en las tasas de mutación y modelos entre microsatélites (Jarne y Lagoda 1996 y Estoup 2002). Sería importante analizar en estudios posteriores la incidencia y grado de homoplasia para estos marcadores a través de secuenciación directa de microsatélites compuestos ó interrumpidos (Estoup *et al.* 1995). Sin embargo considerando que algunas de las islas del Golfo de California, en las que habitan los miembros del grupo *A. deppii* considerados en este estudio, estuvieron recientemente conectadas con la península (<10, 000 a 15, 000 años. Carreño y Belenes 2004) se esperarían niveles muy bajos de homoplasia entre estos taxa, excepto quizá en *A. ceralbensis* y *A. pictus*, habitantes de isla Cerralvo e isla Monserrat respectivamente, pues

se trata de especies mas divergentes. Así se predice que los niveles de diferenciación genética no serían fuertemente afectados por este factor.

II.8.2 Variación genética intrapoblacional.

El nivel de diversidad genética en términos de la heterocigosidad esperada y número de alelos en las tres localidades de *A. hyperythra* y *A. ceralbensis* mostró valores de medios a altos. En general el mayor nivel de diversidad se detectó en Comitán, seguido de Espiritu Santo, Km128 y Cerralvo. Es interesante resaltar que aún bajo el método de rarefacción empleado para la estimación de riqueza alélica, la población de el Comitán mostró valores significativamente mayores que el resto de las poblaciones (Tabla IX y Tabla X). Este resultado es llamativo ya que refleja el elevado nivel de variación que existe en esta población. Se debe recordar además que fue en esta población en la que se detectó un alto número de alelos intermedios, es decir de alelos que no cumplían con el cambio esperado en pares de bases según el tipo de repetición y que aumentaron el nivel de diversidad genética.

El nivel mas bajo de variación genética en *A. ceralbensis* con respecto al detectado en las poblaciones de *A. hyperythra* puede deberse a un fenómeno conocido como “sesgo predeterminado” (por *ascertainment bias*) (Vowles y Amos 2006, Brandström y Ellegren 2008). Durante la fase de caracterización de microsatélites en una especie generalmente se seleccionan los fragmentos más largos y que muestran mayor evidencia de polimorfismo. Sin embargo parece que este criterio de selección genera un sesgo, ya que no

necesariamente estos fragmentos resultarán igualmente variables al ser evaluados en una especie distinta. De acuerdo con Vowles y Amos (2006) este tipo de sesgo resulta muy común y opera en relación a la longitud, pureza y polimorfismo del microsatélite. Aunado a este factor, los niveles más bajos de variación en *A. ceralbensis* podrían ser atribuidos a que se trata de una especie que habita una isla oceánica y en teoría con un tamaño efectivo poblacional reducido y en la cual la deriva genética podría estar jugando un papel predominante en la pérdida y fijación de alelos. De hecho aún en un tamaño de muestra pequeño analizado de *A. ceralbensis* se encontró fijo el locus *Ashy22*, altamente polimórfico en el resto de las poblaciones de *A. hyperythra* analizadas (Tabla IX). Aunado a este punto se debe mencionar que en otras especies y subespecies del complejo *A. deppii* se encontraron varios loci fijos (Tabla V). Rowe *et al.* (2002) en base a la caracterización y análisis de ocho microsatélites en 42 individuos de la lagartija *Cnemidophorus vanzoi* (Sauria: Teiidae), especie endémica de los islotes María Mayor y María Menor en las Antillas, un nivel bajo de heterocigosidad esperada y observada así como muy pocos alelos por locus, de dos a cinco. Este punto apoya la predicción teórica de que en general poblaciones insulares mantienen niveles de variación genética más bajos dado que mantienen tamaños efectivos más reducidos y que fueron originadas a partir de unos pocos individuos.

II.8.3 Déficit de heterocigotos, ¿ artefacto ó característica biológica?

En las cuatro poblaciones de estudio se detectó desviaciones al equilibrio de Hardy Weinberg debido a un déficit de heterocigotos. Los valores de heterocigosidad observada entre pares de poblaciones no mostraron diferencias significativas. Sin embargo de acuerdo a la magnitud en la relación de la heterocigosidad observada respecto a la esperada el déficit de heterocigotos resultó más pronunciado en el Comitán e isla Espíritu Santo (Tabla XI y Fig. 9)

El déficit de heterocigotos en poblaciones naturales a menudo se asocia con la incidencia de endogamia poblacional (Freeland 2005). En este estudio se detectaron valores altos y significativos de endogamia F_{IS} para *A. hyperythra* y *A. ceralbensis* (Tabla XI). Sin embargo varios estudios han demostrado que se debe ser especialmente cauteloso con la interpretación biológica en los valores de F_{IS} en poblaciones silvestres cuando se trabaja con marcadores altamente variables como lo son los microsatélites, ya que una causa probable del déficit es la incidencia de alelos nulos. El principal problema de alelos nulos es que pueden generar valores muy elevados de F_{IS} y que raramente resultan compatibles con el nivel de endogamia esperado en poblaciones silvestres (David *et al.* 2007) En *A. hyperythra* y *A. ceralbensis* se detectaron no solo niveles muy elevados de endogamia (F_{IS}) sino también valores altamente variables entre loci al interior de cada población (ej. -0.124 a 0.590 en Comitán y de -0.013 a 0.686 en Espíritu Santo). De acuerdo con Gaffney *et al.* (1990) valores de F_{IS} variables entre loci no deberían ser considerados como una estricta señal de endogamia ya que en teoría, y tratándose de loci neutrales, se espera que este

proceso afecte el nivel de heterocigosidad observada en todos los loci, por lo que entonces se esperaría observar niveles de F_{IS} igualmente distribuidos entre loci. Así con estas evidencias se apoyó la hipótesis sobre un déficit de heterocigotos exacerbado quizá por la incidencia de alelos nulos. En un estudio posterior, durante el cual se mantendrá en cautividad parejas de *A. hyperythra* para su reproducción, se constatará de forma directa la incidencia de este tipo de artefactos a partir del análisis de herencia mendeliana de estos marcadores en familias, evaluando los genotipos parentales y las posibles distorsiones en la progenie.

Sin embargo, el entrecruzamiento entre parientes cercanos e incidencia de endogamia en *A. hyperythra* no sería un evento raro. Al respecto Karasov y Anderson (1984) sugirieron que *A. hyperythra* es una especie que se mueve poco y que tiende a mantener cierta fidelidad a un territorio pequeño. En un análisis preliminar (datos no mostrados) se analizó un efecto de aislamiento por distancia a pequeña escala y considerando solo los individuos colectados en el Comitán con el objetivo de determinar si individuos geográficamente más próximos entre sí resultan genéticamente más similares que respecto a individuos geográficamente más distantes. Este estudio mostró en 31 individuos analizados un patrón de aislamiento por distancia casi significativo ($P=0.056$). Bajo el supuesto de que la información sobre movimiento de la especie, y ya que no existen estimaciones directas sobre dispersión, pudiera ser considerada como una señal de que la especie dispersa poco y mantiene fidelidad a un territorio pequeño y con la información preliminar de un efecto de aislamiento por distancia aún en escala pequeña, se podría plantear la hipótesis sobre la incidencia de cierto nivel de endogamia.

Por otra parte, el análisis sobre la variación espacial y temporal en muestras colectadas en el Comitán mostró que aún al fraccionar el total de la muestra en submuestras que contienen individuos pertenecientes a un mismo año de colecta ó zona de captura, existen valores elevados y altamente significativos de endogamia F_{IS} . Por otra parte el valor de F_{ST} entre submuestras colectadas en años distintos ó a uno y otro lado de la carretera en el Comitán mostró valores significativamente distintos de cero (Tabla XIV). En conjunto estos resultados sugieren que el déficit de heterocigotos en Comitán podría además estar relacionado con un Wahlund.

Otro factor a considerar y que podría exacerbar la diferencia entre el nivel de heterocigosidad esperado y observado en las poblaciones analizadas de *A. hyperythra* y *A. ceralbensis* es la posible captura de individuos altamente emparentados. Otros trabajos han relacionado la incidencia de valores altos y variables de endogamia F_{IS} entre loci como un efecto de la captura de grupos familiares (ej. Castric *et al.* 2002). En este estudio el cálculo del coeficiente de parentesco, r_{xy} , entre par de individuos al interior de cada población mostró en cada caso una media y una varianza no significativamente mayor a lo esperado bajo la hipótesis nula de no parentesco ($P > 0.05$) por lo que con la información obtenida en este estudio no existe evidencia que pueda relacionar el déficit de heterocigotos como una consecuencia de la captura de unos pocos grupos familiares. Sin embargo dado el tamaño de muestra se podría carecer del poder estadístico suficiente como para detectar este efecto.

II.8.4 Diferenciación y distancia genética entre poblaciones de *A. hyperythra*.

El valor en la estimación de diferenciación F_{ST} global para *A. hyperythra* resulto de 0.080. Este valor coincide con un nivel de diferenciación genética de bajo a moderado según la interpretación típica para los valores de F_{ST} y que se basan en estimaciones para alozimas (Tabla VI). Sin embargo este valor podría corresponder con un nivel de diferenciación genética mayor debido a que se la variación genética en microsatélites es mucho mayor a los niveles comúnmente detectados para alozimas (Hedrick 1999).

Contrario a lo esperado las poblaciones del Comitán e isla Espiritu Santo resultaron significativamente menos diferenciadas que por ejemplo el Comitán con respecto a la población del Km128 (tabla XVI). La mayor similitud genética entre las poblaciones de Comitán y Espiritu Santo fue apoyada también por los valores en las distancias genéticas D_{CE} (Tabla XVIII y Fig.12).

La mayor diferenciación genética entre Comitán y la población del Km128 en relación al nivel de diferenciación detectado entre Comitán e isla Espiritu Santo podría sugerir un efecto del aislamiento por distancia entre poblaciones peninsulares de *A. hyperythra*, en el que poblaciones geográficamente mas lejanas resultarían genéticamente mas distintas que poblaciones geográficamente mas cercanas entre sí. Este punto puede ser apoyado por la distancia geográfica que separada ambas poblaciones, aproximadamente 100 km, y quizá una baja dispersión en la especie.

Por otro lado, el nivel de diferenciación genética entre cualquiera de las subpoblaciones de *A. hyperythra* con respecto a *A. ceralbensis* resultó elevada y corresponde con el grado de diferenciación genética que podría ser esperado observar al tratarse de dos especies históricamente aisladas (Radtkey *et al.* 1997 y Reeder *et al.* 2002).

II.8.5 Efecto de la incidencia de alelos nulos sobre el nivel de diferenciación y distancias genéticas.

En el presente trabajo los valores de F_{ST} global en *A. hyperythra* y θ_{ST} entre pares de poblaciones incluyendo a *A. ceralbensis* a partir de los datos originales sin corrección para alelos nulos resultaron solo ligeramente mayor al valor calculado a partir del método ENA (excluyendo a los alelos nulos). Ej el índice F_{ST} aumentó 0.006 y θ_{ST} aumentó 0.009, entre las poblaciones de Comitán y E. Santo). A su vez las distancias genéticas D_{CE} calculadas con los datos originales mostraron un valor sólo ligeramente mayor al valor obtenido con la corrección INA (incluyendo los alelos nulos), por ejemplo entre las poblaciones de Comitán y Espíritu Santo D_{CE} aumentó 0.01. Así los loci analizados sin corrección para alelos nulos generaron sólo un pequeño sesgo en comparación con los resultados generados a partir de los métodos de corrección.

Varios estudios han sugerido que la incidencia de alelos nulos en loci microsatélite puede afectar las estimaciones de diferenciación poblacional mediante la reducción de la diversidad genética intrapoblacional, ya que los valores de F_{ST} y distancias genéticas

generalmente aumentan conforme disminuye la diversidad genética (Paetkau y Atrobeck 1995, Slatkin 1995, Paetkau *et al.* 1997). Sin embargo recientemente Chapuis y Estoup (2007) y Carlsson (2008) mostraron que F_{ST} presenta solo una sobreestimación moderada por la incidencia de alelos nulos (F_{ST} aumentó entre 0.003 y 0.004) en presencia de niveles elevados de diferenciación genética. Nuestros resultados confirman este punto y argumentamos un bajo efecto de los alelos nulos en los microsatélites caracterizados en *A. hyperythra* en este tipo de estimaciones.

II.8.6 Inferencia de flujo génico entre poblaciones de *A. hyperythra*.

El moderado nivel de diferenciación genética entre Comitán y Espíritu Santo se vio reflejado también por un mayor número de migrantes por generación ($Nm = 8.43$) entre ambas poblaciones en comparación con el número de migrantes detectados por ejemplo entre Comitán y Km128 ($Nm = 2.41$). En teoría se espera que cuando $Nm > 4$ el efecto del flujo génico sobrepasa el efecto de la deriva genética y las poblaciones resultan efectivamente panmicticas. En contraste cuando $Nm < 1$, el efecto de la deriva genética sobrepasa el efecto del flujo génico y se desarrolla una fuerte diferenciación entre poblaciones (Kimura y Weiss 1964). Sin embargo dado el continuo debate acerca de los problemas asociados con la estimación del nivel de flujo génico a partir de esta aproximación ya que en poblaciones silvestres muchos de los supuestos a este modelo no se cumplen (Hutchison y Templeton 1999, Whitlock y McCauley 1999), estos valores deben ser tomados con cierta precaución y se considerados quizá solo como señal de que en

general podría existir un mayor número de migrantes por cada generación entre la población de Espíritu Santo y el Comitán, que entre el Comitán y la población del Km128.

El análisis de asignación de individuos en STRUCTURE corroboró la estructura poblacional previamente inferida, es decir los individuos de *A. ceralbensis* bien diferenciados del resto y agrupados en una única población. En *A. hyperythra* se observó un patrón de agrupación muy similar al detectado por ejemplo en el dendograma de distancias individuales D_{AS} . Los individuos de la población del Km128 se mantuvieron como un grupo bien diferenciado respecto a las de Comitán y Espíritu Santo. Por otra parte, la mayoría de los individuos colectados en El Comitán y Espíritu Santo fueron asignados con una alta probabilidad a su población de origen, sin embargo también se detectaron algunos individuos cuyo genoma se asocia con mayor probabilidad a otra población distinta a la de origen de colecta. Estos individuos pueden representar migrantes recientes entre las poblaciones de Comitán y Espíritu Santo. Así, pese a los inconvenientes en la estimación de migración entre poblaciones a partir del cálculo del número de migrantes (Nm) e inferencia a partir de distancias individuales D_{AS} , queda claro en cualquier caso la baja diferenciación entre ambas poblaciones (Comitán y Espíritu Santo) y que ambas mantienen actualmente o han mantenido hasta recientemente, cierto nivel de flujo génico. Por otro lado el flujo génico es claramente menor entre las poblaciones de Comitán y Km128, quizá como un efecto de asilamiento por distancia entre poblaciones peninsulares de *A. hyperythra*. El nivel de flujo génico entre poblaciones depende de la capacidad en la distancia de dispersión de la especie y de las densidades de población. Al respecto *A. hyperythra* parece ser una especie que se mueve relativamente poco (Anderson y Karasov 1981), lo que podría

explicar el patrón de diferenciación y flujo entre las poblaciones de Comitán y Km128 al ser dos localidades separadas por una distancia geográfica considerable, aproximadamente 100 km.

II.8.7 Flujo génico entre Espíritu Santo y Comitán, ¿Efecto reciente a causa de actividades humanas y climatológicas?

La incidencia de flujo génico reciente entre las poblaciones el Comitán e isla Espíritu Santo podría ser una consecuencia de factores climatológicos ó actividades humanas.

En reptiles que habitan sistemas insulares cercanamente conectados a continente o con una distancia de separación baja entre islas ha sido demostrada la dispersión de individuos a través del agua durante huracanes ó tormentas tropicales. Varios trabajos con *Anolis sagrei*, habitante endémico de las Islas Bahamas, han demostrado que este tipo de eventos climatológicos han jugado un papel muy importante en la demografía de esta especie a través del transporte de huevos ó individuos entre islas cercanas (Spiller *et al.* 1998 y Schoener *et al.* 2000). Este tipo de dispersión ha sido sugerido también entre miembros del complejo *A. deppii* que habitan en islas del Golfo de California (Grismer 2002).

La ubicación geográfica de la Isla Espiritu Santo y su cercanía con el del Comitán sugiere una mayor probabilidad de dispersión de individuos entre estas dos poblaciones que por ejemplo entre las localidades de Espiritu Santo y Km128, ambas separadas por una distancia mucho mayor y por la Sierra de la Giganta como una barrera adicional.

Por otro lado se debe considerar la incidencia de flujo génico entre puntos cercanos en la península a esta isla (en este caso el Comitán por ejemplo) e isla Espiritu Santo como una consecuencia de actividades humanas. Espiritu Santo es un Parque Nacional en el que se da un continuo flujo de visitantes y actividades turísticas. El traslado de lagartijas entre ambos puntos en las embarcaciones utilizadas para estas actividades no sería un evento raro.

II.8.8 Implicaciones taxonómicas y de Conservación

En resumen los resultados generados en este trabajo demuestran la cercana relación entre la población de isla Espiritu Santo y el Comitán y la incidencia de flujo genético actual entre ambas localidades. Otros estudios genéticos empleando citocromo *b* y morfológicos en *A. hyperythra* han sugerido la cercana relación entre Espiritu Santo y poblaciones peninsulares cercanas a esta isla (Radkey *et al.* 1997). Así, con este estudio se podría confirmar que el taxón en Espiritu Santo representa en realidad una misma especie que *A. hyperythra* peninsular por lo que se sugiere sostener la clasificación previa a Grimer (1999), es decir mantener al taxón de isla Espiritu Santo como una subespecie de *A. hyperythra* peninsular (*A. h. spiritensis*). En otros grupos de organismos que habitan isla

Espíritu Santo ha sido demostrada también la escasa o prácticamente nula diferenciación genética con respecto a poblaciones peninsulares cercanas a esta isla (ej. Álvarez-Catañeda 2007).

Finalmente, el desarrollo de marcadores microsatélite para *A. hyperythra* en este trabajo de tesis ha demostrado ser una herramienta muy útil para el estudio de parámetros poblacionales básicos como lo son la variación y diferenciación genética poblacional y que resultan de vital importancia en aspectos de conservación. Aunado a la estimación de estos parámetros se generó una primera aproximación sobre la incidencia de flujo génico actual entre dos localidades peninsulares y una insular. El patrón detectado sugiere por una parte que factores como la distancia geográfica podría jugar un papel importante en la diferenciación de poblaciones en la península por lo que estudios complementarios serían requeridos para identificar la incidencia de Unidades Evolutivas Significativas. Por otra parte la evidencia de flujo genético actual entre poblaciones peninsulares e insulares entre lo que se creía especies distintas demuestra la necesidad de realizar estudios que esclarezcan las relaciones genéticas y patrones de diferenciación entre los taxa insulares del complejo *A. deppii* con respecto a *A. hyperythra* peninsular e identificar si el resto de las especies insulares *sensu* Grismer (1999) deben ser sostenidas en el rango taxonómico de especie.

CONCLUSIONES GENERALES.

1. El éxito global en el enriquecimiento generado durante la construcción de la librería genómica para *A. hyperythra* resultó moderado y similar al reportado en trabajos que emplean metodologías similares.
2. El éxito en el enriquecimiento por sonda empleada resultó variable y mayor para la sonda de GT, lo que puede ser explicado a partir de la mayor abundancia de este tipo de repeticiones en el genoma de vertebrados en comparación con CT.
3. Los 10 pares de cebadores aislados y caracterizados en *A. hyperythra* mostraron ser funcionales en un amplio rango de distribución de la especie en Baja California Sur y además resultaron funcionales y polimórficos en taxa insulares del complejo *A. deppii*, lo que apoya su funcionalidad en estudios futuros.
4. El nivel de diversidad genética en términos del número de alelos, riqueza alélica y heterocigosidad esperada en *A. hyperythra* resultó consistentemente mayor que el detectado en *A. ceralbensis* y en la península fue mayor para la población del Comitán.
5. En las cuatro localidades de estudio se detectaron desviaciones al equilibrio de Hardy-Weinberg debido a un déficit de heterocigotos.
6. Se detectaron valores de endogamia elevados y altamente variables entre loci para las cuatro poblaciones. El posterior análisis sobre la distribución observada de homocigotos por clase de tamaño en cada loci sugirió que este déficit debe estar principalmente relacionados con la incidencia de alelos nulos y no una elevada consanguinidad.

7. Contrario a lo esperado se encontró una menor diferenciación y distancia genética entre las poblaciones de El Comitán e isla Espíritu Santo, que entre las poblaciones peninsulares de El Comitán y Km128.
8. El nivel de diferenciación genética entre *A. ceralbensis* y cualquiera de las poblaciones de *A. hyperythra* resultó elevado y acorde con lo esperado.
9. Las pruebas de asignación de individuos y el cálculo del número de migrantes sugirieron una mayor incidencia de flujo génico entre las poblaciones de El Comitán y Espíritu Santo.
10. El grado de diferenciación y la evidencia de posible flujo reciente entre estas dos localidades apoya la hipótesis de un tiempo de separación reciente aunado a la dispersión de individuos a través del agua durante eventos climatológicos ó como consecuencia de actividades humanas.
11. Finalmente la moderada diferenciación entre las poblaciones de Espíritu Santo y Comitán detectada en este estudio podría no sostener la inclusión del taxa insular en Espíritu Santo en un rango de especie como lo proponía Grismer (1999).

REFERENCIAS.

- Álvarez-Castañeda ST. 2007. Systematics of the antelope ground squirrel (*Ammospermophilus*) from islands adjacent to the Baja California Peninsula. *Journal of Mammology*, 88, 1160-1169.
- Amos W. 1999. A comparative approach to the study of microsatellite evolution. In: *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds Goldstein DB, Schlötterer C), pp 66-79. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Amos W, Hoffman JI, Frodsham A, Zhang L, Best A, Hill AVS. 2007. Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Molecular Ecology Notes*, 7, 10-14.
- Balloux F, Lugon-Moulin N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11, 155-165.
- Barbará T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF, Lexer C. 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potencial and limitations. *Molecular Ecology*, 16, 3759-3767.
- Belkhir K, Borsa P, Goudet J, Chikhi L, Bonhomme F (*GENETIX*) *Genetix Logiciel sous WindowsTM pour la Génétique des Populations*. URL <http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/intro.htm>
- Belkhir K, Castric V, Bonhomme F. 2002. IDENTIX, a software to test for relatedness in a population using permutation methods. *Molecular Ecology Notes*, 2, 611-614.
- Blázquez MC, Rodríguez Estrella R, Munguía Vega A. 2006. Characterization of 10 microsatellite loci in the spiny-tailed iguana *Ctenosaura hemilopha*. *Molecular Ecology Notes*, 6, 753-755.
- Bostic DL. 1966. A Preliminary Report of Reproduction in the Teiid Lizard, *Cnemidophorus hyperythrus beldingi*. *Hertetologica*, 22, 81-90.
- Brandström M, Ellegren H. 2008. A genome-wide analysis of microsatellite polymorphism circumventing the ascertainment bias. *Genome Research*, 18, 881-887.
- Brookfield JF. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5, 453-455.

- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF. 1967. Phylogenetic analysis models and estimation procedures. *Evolution*, 32, 550-570.
- Carlsson J, Morrison CL, Reece KS. 2006. Wild and aquaculture populations of the eastern oyster compared using microsatellites. *Journal of Heredity*, 97, 595-598.
- Carreño AL, Helenes J. 2004. Geology and ages of the islands. Pp.14-40 in A new island biogeography of the Sea of Cortéz (TJ Case, ML Cody and E. Ezcurra, eds.). 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Chakraborty R, De Andrade M, Daiger SP, Budowle B. 1992. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Ann. Hum. Genet*, 56, 45-57.
- Chakraborty JR y Jin L. 1993. A unified approach to study hipervariable polymorphism: statistical considerations of determining relatedness and population distances. En: Pena D, Chakraborty R, Epplen TJ y JAJ. DNA fingerprinting: state of the science Alemania. Ed. Birkhäuser Verlag Basel, 153-175.
- Chapuis MP, Loiseau A, Michalakis Y, Leqoc M, Estoup A. 2005. Characterization and PCR multiplexing of polymorphic microsatellite loci for the locust *Locusta migratoria*. *Molecular Ecology Notes*, 5, 554-557.
- Chapuis MP, Estoup A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol.* 24, 621-631.
- Crawford NG, Zaldívar-Rae J, Hagen C, Schable A, Rosenblum EB, Graves JA, Reeder TW, Ritchie M y Glenn CT. 2008. Thirteen polymorphic microsatellite DNA loci from whiptails of the genus *Aspidoscelis* (Teiidae:Squamata) and related cnemidophorine lizards. *Molecular Ecology Resources*, 8, 219-223.
- Dakin EE, Avise JC. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93, 504-509.
- David P, Pujol B, Viard F, Castella V y Goudet J. 2007. Reliable selfing rate estimates from imperfect population genetic data. *Molecular Ecology*, 16, 2474-2487.
- Dempster AP, Laird NM, Rubin DB. 1977. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *J Roy. Stat. Soc. B* 39:1-38.
- Dieringer D, Schlötterer C. 2007. Two distinct modes of microsatellite mutation processes: evidence from the complete genomic sequences of nine species. *Genome Research*, 13, 2242-2251.

- Ellegren H. 2000. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite ADN sequences. *Nature Genetics*, 24, 400-402.
- Estrella RR, Blázquez MC, Munguía Vega A. 2006. Characterization of seven polymorphic microsatellite loci in the Baja California endemic black-tailed brush lizard *Urosaurus nigrocaudus*. *Molecular Ecology Notes*, 6, 465-467.
- Estoup A, Jarne P, Cournet JM. 2002. Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetic analysis. *Molecular Ecology*, 11, 1591-1604.
- Fitzinger L. 1843. *Sistema reptilium*. Viena: Vindobonae, 106.
- Freeland JR. 2005. *Molecular Ecology*. Ed. John Wiley and Sons, Ltd. England. 388 pp.
- Gaffney PM, Scott TM, Koehn RK, Diehl WJ. 1990. Interrelationships of heterozygosity, growth rate and heterozygote deficiencies in the coot clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics*, 124, 687-699.
- Galina P. 1994. Estudio comparativo de tres especies de lacertilios en un matorral desértico de la Región del Cabo, B.C.S., México. Tesis de Maestría.
- Garza JC, Slatkin M, Freimer NB. 1995. Microsatellite allele frequencies in humans and chimpanzés, with implications for constraints on allele size. *Molecular Biology and Evolution*, 12, 594-603.
- Glenn TC, Schable NA. 2005. Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology*, 395, 202-222.
- Grismer LL. 1999. Phylogeny, Taxonomy and Biogeography of *Cnemidophorus hyperythrus* and *C. cerebensis* (Squamata: Teiidae) in Baja California, México. *Herpetologica*, 55, 28-42.
- Grismer LL. 2002. *Amphibians and reptiles of Baja California: including its Pacific islands and the islands in the Sea of Cortes*. University of California Press.
- Hartl DL, Clark AG. 1997. *Principles of Population Genetics*. Third Edition. Ed. Sinauer Associates, Inc. United States. 551 pp.
- Hedrick PW. 1999. Perspective: Highly variable loci and their interpretation in Evolution and Conservation. *Evolution*, 53, 313-318.
- Hollingsworth B, Hammerson GA. 2007. *Aspidoscelis hyperythra*. In: UICN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org. Download on 20 August 2008.

- Hutchison DW y Templeton AR. 1999. Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: Inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution*, 53, 1898-1914.
- Jarne P, Lagoda P. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, 11, 424-429.
- Jennings MR, Hayes MP. 1994. Amphibian and reptile species of special concern in California. California Department of Fish and Game. Final Report.
- Kalinowski ST. 2005. HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes*, 5, 187-189.
- Karasov WH y Anderson RA. 1984. Interhabitat differences in energy acquisition and expenditure in a lizard. *Ecology*, 1, 235-247.
- Kimura M y Weiss GH. 1964. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics*, 49, 561-576.
- Langella O. 2002. Populations, 1.2.30. Copyright © 1999, Olivier Langella, CNRS UPR9034. Available at <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>
- Li, YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A y Nevo E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11, 2453-2465.
- Lift M, Luty JA. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44, 397-401.
- Munguía Vega A, Cruz Hernández P, Galindo Sánchez CE y Culver M. 2007. Tercer Curso Teórico Práctico: Aplicación de marcadores moleculares en genética de poblaciones y filogenia. La Paz, Baja California Sur.
- Munguía Vega A, Rodríguez-Estrella R, Blázquez MC. 2007. Characterization of nine microsatellite loci on endemic kangaroo rats *Dipodomys simulans peninsulares* from southern Baja California Peninsula. *Molecular Ecology Notes*, 7, 127-129.
- Norma Oficial Mexicana, NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental- Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.
- Noor MAF, Feder JL. 2006. Speciation genetics: evolving approaches. *Nature Reviews Genetics*, 7, 851-861.

- Oosterhout CV, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. 2004. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535-538.
- Pemberton JM, Slate J, Bancroft DR, Barrett JA. 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology*, 4, 249-252.
- Pianka ER, Vitt LJ. 2003. Lizards, window to evolution of diversity. Capítulo 10. University of California Press, 193-201.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155, 945-959.
- Queller DC, Goodnight KF. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, 43, 258-275.
- Radtkey RR, Fallon SM, Case TJ. 1997. Character displacement in some *Cnemidophorus* lizards revisited: A phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, 9740-9745.
- Reeder TW, Cole CJ, Dessauer HC. 2002. Phylogenetic relationships of whiptail lizard of the genus *Cnemidophorus* (Squamata: Teiidae). A test of Monophyly, Reevaluation of Karyotypic Evolution. And Review of Hybrid Origins. *American Museum of Natural History*, 61 pp.
- Raymond M, Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86, 248-249.
- Rice WR. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43, 223-225.
- Rowe G, Dickinson HC, Gibson R, Funk SM, FA JE. 2002. St Lucia Whiptail Lizard *Cnemidophorus vanzoi* (Sauria:Teiidae) microsatellite primers. *Molecular Ecology Notes*, 2, 124-126.
- Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
- Sambrook J, Fritch EF, Maniatus T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schlötterer C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite ADN. *Chromosoma*, 109, 365-371.

- Schötterer C y Pemberton J. 1998. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations-a critical review. 71-87 p. En: De Salle R y Chierwater B (1998) *Molecular Approaches to Ecology and Evolution*.
- Schraml E, Lion T. 2003. Inference of dye-associated fluorescence signals with quantitative analysis of chimerism by capillary electrophoresis. *Leukemia*, 17, 221-223.
- Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18, 233-234.
- Schoener TW, Spiller D, Losos JB. 2000. Natural restoration of the species-area relation for a lizard after a hurricane, *Science*, 294, 1525-1528.
- Slatkin M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*, 47, 264-279.
- Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139, 457-462.
- Spiller DA, Losos JB, Schoener TW. 1998. Impact of a catastrophic hurricane on island populations. *Science*, 281, 695-697.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599.
- Tóth G, Gáspári Z y Jorka J. 2008. Microsatellites in different Eukaryotic genomes: Survey and Analysis. *Genome Research*, 10, 967-981.
- Vázquez-Reyes CJ. 2006. Patrones de uso de microhabitat de *Aspidoscelis hyperythra* en Baja California Sur. Implicaciones para su distribución y conservación. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, México. 75pp.
- Vowles EJ y Amos W. 2006. Quantifying Ascertainment Bias and Species-Specific Length Differences in Human and Chimpanzee Microsatellite Using Genome Sequences.
- Walker JM, Taylor HL. 1968. Geographic variation in the teiid lizard *Cnemidophorus hyperythrus*. The *caeruleus*-like subspecies. *American Midland Naturalist*, 80, 1-27.
- Weber JL, May PE. 1989. Abundant class of human ADN polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44, 388-396.
- Weber JL. 1990. Informativeness of human (dC-dA)_n(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics*, 7, 53-61.

- Weir BS, Cockerham C. 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*, 38, 1358-1370.
- Weir BS. 1996. Genetic data analysis II. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Whitlock MC, MacCauley DE. 1999. Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \neq 1/(4Nm+1)$. *Heredity*, 82, 117-125.
- Wright S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15, 323-354.
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11, 1-16.

ANEXO I

Datos de colecta de los individuos de *A. hyperythra* empleados en la construcción de la librería genómica enriquecida.

Clave interna	Sexo	Longitud (LCC)	Localidad muestreo
ANC-2	macho	60	El ancón
ANC-3	macho	62	El ancón
ANC-4	macho	60	El ancón
CON-2	hembra	45	El conejo
CON-4	macho	50	El conejo
CON-3	macho	48	El conejo
ET-2	macho	65	El triunfo
IHU-1	juvenil	45	Presa Ihuazil
IHU-2	hembra	47	Presa Ihuazil
IHU-3	macho	60	Presa Ihuazil
INS-3	hembra	56	Km 20 carr Insurgentes-Loreto
K23-1	macho	66	K23 carretera Sanjuán d la Costa
K23-2	macho	64	K23 carretera Sanjuán d la Costa
K23-3	hembra	60	K23 carretera Sanjuán d la Costa
K23-4	macho	60	K23 carretera Sanjuán d la Costa
K23-5	macho	65	K23 carretera Sanjuán d la Costa
K46-3	juvenil	43	K46 carretera Sanjuán d la Costa
LOM-1	hembra	53	Loma amarilla
PSM-3	macho	55	Planes Santa Marta
PUR-1	hembra	49	La purísima
PUR-2	macho	58	La purísima
SCA-5	macho	56	San Carlos
TECO-1	juvenil	44	El tecolote
TECO-2	hembra	55	El tecolote
TECO-3	hembra	60	El tecolote

ANEXO 2

Frecuencias alélicas por locus y población: *Ashy2* (A), *Ashy8* (B), *Ashy9* (C), *Ashy12* (D), *Ashy15* (E), *Ashy18* (F), *Ashy19* (G), *Ashy22* (H), *Ashy28* (I), *Ashy30* (J).

