

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Estructuración genética de Poecilia orri y Gambusia yucatanana  
en cenotes y humedales en Sian Ka'an,  
Quintana Roo, México.

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

ANGÉLICA HERNÁNDEZ VALDÉS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ELLA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Datos del Jurado

### 1. Datos de la alumna

Hernández

Valdés

Angélica

56 32 42 14

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

### 2. Datos de la tutora

Doctora

Ella Gloria

Vázquez

Domínguez

### 3. Datos del sinodal 1

Doctor

Daniel Ignacio

Piñero

Dalmau

### 4. Datos del sinodal 2

Doctor

Luis

Zambrano

González

### 5. Datos del sinodal 3

Maestro en ciencias

Daniel

García

Bedoya

### 6. Datos del sinodal 4

Maestro en ciencias

Rodrigo Rafael

Vega

Bernal

### 7. Datos del trabajo escrito

Estructuración genética de Poecilia orri y Gambusia yucatanana en cenotes y humedales de Sian Ka'an, Quintana Roo, México.

63

2006

## **Agradecimientos**

A la Dra. Ella Vázquez por su apoyo y guía constante, por creer en mí, por todo el esfuerzo y tiempo que requirió de su parte este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por que no entendería mi vida sin su existencia.

Al Instituto de Ecología, en particular al laboratorio de Macroecología, por proporcionar el espacio y las instalaciones adecuadas para la realización de mi trabajo de Tesis.

Al Dr. Daniel Piñero Dalmau, por aceptarme en su taller de filogeografía y por revisar mi tesis.

A el Dr. Luis Zambrano y al M. en C. Daniel García Bedoya por los consejos y recomendaciones que hicieron al respecto de este trabajo.

Al Biol. Gerardo Rodríguez Tapia por su ayuda y consejos a lo largo del tiempo que compartimos espacios en el laboratorio de Macroecología.

Al M. en C. Rodrigo Vega Bernal por ser paciente al enseñarme las técnicas de laboratorio y por revisar concienzudamente la tesis.

A la Dra. Maria del Carmen Mandujano así como a las personas del laboratorio de Dinámica de Poblaciones y Evolución de Historias de vida, las cuales hicieron más ameno el trabajo en laboratorio.

## **Agradecimientos Personales**

A mi hermana por enseñarme que la vida es lo que uno decide que sea.

A mi mamá por su amor, apoyo y comprensión constantes.

A mi hermano por el pitazo de que -no hay fondo-.

A mi tía Esthela por siempre apoyar a mi familia.

A Karina, por creer en mí y acompañarme a lo largo de este camino.

A Bety por darme perspectiva.

A Tania por devolverme la esperanza, la fe.

A Héctor, César, Paulina, Enrique, Germán y Julio, mis amigos, por estar siempre a mi lado, por darle sentido al paso de los años.

A José y a Ernesto por hacer de la facultad un lugar habitable.

## Índice

|  |    |
|--|----|
| <b>Resumen</b>   | 1  |
| <b>1. Introducción</b>   | 2  |
| 1.1. Estructura Poblacional y Genética de poblaciones                          | 2  |
| 1.2. Marcadores moleculares  | 2  |
| 1.3. Biología y taxonomía de <i>Poecilia orri</i> y <i>Gambusia yucatanana</i> | 3  |
| 1.4. Quintana Roo y reserva de la Biosfera de Sian Ka'an                       | 4  |
| 1.5. Cenotes y humedales   | 6  |
| <b>2. Antecedentes y objetivos.</b>  | 6  |
| 2.1. Antecedentes  | 6  |
| 2.2. Objetivo general  | 7  |
| 2.3. Objetivos particulares  | 7  |
| <b>3. Material y Métodos</b>   | 8  |
| 3.1. Sitio de estudio y colecta  | 8  |
| 3.2. Procesamiento de muestras para microsatélites                             | 11 |
| 3.2.1 Extracción de ADN  | 11 |
| 3.2.2 Estandarización de PCR   | 11 |
| 3.2.3 Geles de Poliacrilamida  | 12 |
| 3.2.4 Tinción de Plata   | 13 |
| 3.2.5 Análisis de geles  | 13 |
| <b>4. Análisis Genéticos</b>   | 14 |
| 4.1. Diversidad genética   | 14 |
| 4.2. Estructura genética y diferenciación de las poblaciones                   | 16 |
| <b>5. Resultados</b>   | 18 |
| <i>Poecilia orri</i>   |    |
| 5.1 Diversidad genética  | 18 |
| 5.2 Frecuencias alélicas   | 20 |
| 5.3 Frecuencias genotípicas  | 26 |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.4 Heterocigosidad  | 27        |
| 5.5 Estructura genética y diferenciación de poblaciones  | 29        |
| <i>Gambusia yucatanana</i>   |           |
| 5.6 Diversidad genética  | 32        |
| 5.7 Frecuencias alélicas   | 33        |
| 5.8 Frecuencias genotípicas  | 39        |
| 5.9 Heterocigosidad  | 39        |
| 5.10 Estructura genética y diferenciación de poblaciones   | 42        |
| <b>6. Discusión y Conclusiones</b>   | <b>45</b> |
| <b>8. Literatura Citada</b>  | <b>48</b> |
| <b>9. Anexos</b>   | <b>51</b> |
| I. Extracción de ADN   | 51        |
| II. Cuantificación mediante biofotometro   | 52        |
| III. Prueba de integridad mediante gel de agarosa teñido con bromuro de etidio   | 53        |
| IV. Condiciones de PCR utilizadas para <i>G. yucatanana</i> y <i>P. orri</i>   | 54        |
| V. Preparación de geles de poliacrilamida y tinción de plata   | 55        |
| VI a. Diferenciación alélica por locus para <i>Poecilia orri</i>   | 57        |
| VI b. Diferenciación alélica con tres loci por par de población en <i>Poecilia orri</i>  | 58        |
| VII. Diferenciación genotípica para <i>Poecilia orri</i> entre pares de localidades (A) para cada locus, (B) para el total de las muestras | 59        |
| VIII a. Diferenciación alélica por locus para <i>Gambusia yucatanana</i>   | 61        |
| VIII b. Diferenciación alélica con los tres loci por par de población en <i>G. yucatanana</i>  | 61        |
| IX. Diferenciación genotípica para <i>G. yucatanana</i> entre pares de localidades (A) para cada locus, (B) para el total de las muestras  | 62        |

## RESUMEN

El objetivo de este estudio es conocer la estructuración genética de las poblaciones de *Gambusia yucatanana* y *Poecilia orri* en el sistema de cuerpos de agua permanentes (cenotes) y temporales (humedales) en la reserva de la Biosfera de Sian Ka'an, Quintana Roo. Ambas especies pertenecen a la familia Poeciliidae, son peces colonizadores, secundarios (tolerantes a la salinidad) y vivíparos. Para tal propósito se estandarizaron tres marcadores moleculares de microsatélites para cada especie y se estimaron diferentes parámetros: diversidad genética, la diferenciación intra e inter poblacional y la estructura genética de las poblaciones en los diferentes cuerpos de agua.

En cuanto a diversidad, se encontró que ambas especies tienen niveles altos de polimorfismo y número de alelos, sin embargo, la heterocigosidad (que también es un referente de variabilidad genética) fue relativamente baja en ambos casos (*P. orri* 0.125 y *G. yucatanana* 0.25). Aunado a la baja heterocigosidad, se obtuvieron valores altos de los índices de endogamia, lo que puede estar asociado a la reducción en el tamaño efectivo de la población que se da durante el periodo de secas. De acuerdo con el análisis molecular de varianza (AMOVA), la variación genética total está explicada en su mayoría por la variación dentro de los cuerpos de agua (las poblaciones). Los valores de diferenciación genética entre las poblaciones ( $R_{st}$ ) fueron más altos y significativos para *Poecilia orri*, donde sí se encontró estructuración genética acompañada de un menor número de migrantes; asimismo, se observó una correlación significativa entre la distancia genética y la distancia geográfica (prueba de Mantel). Sin embargo en el caso de *Gambusia yucatanana*, las poblaciones de los diferentes cuerpos de agua estuvieron muy poco diferenciadas, no hubo correlación entre la distancia genética y geográfica, la población no presentó estructuración y el número estimado de migrantes fue muy alto. Estos resultados pueden explicarse por diferencias en las características ecológicas de cada especie, siendo *G. yucatanana* la especie más eurihalina del género, lo que puede contribuir a aumentar la sobrevivencia de los individuos en la temporada de secas cuando el nivel del agua de los humedales disminuye drásticamente y aumenta la salinidad. Los individuos que sobreviven a esta temporada son los que alcanzan a madurar y reproducirse. En el caso de *G. yucatanana* tienen además la ventaja de ser de menor talla, haciéndolos menos propensos a la depredación, lo cual puede influir en la conservación de los niveles de variación genética, haciendo que las poblaciones de esta especie resulten con una menor diferenciación entre los cuerpos de agua.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Estructura poblacional y genética de poblaciones

Las poblaciones naturales son dinámicas, con el tiempo cambian de tamaño, densidad y ubicación, y en particular se pueden fragmentar en varias subpoblaciones o demos y unirse a otras, de este modo, pueden en un momento dado estar formadas por una sola unidad panmítica (el modelo panmítico -de apareamiento al azar); estar constituídas por una serie de subpoblaciones aisladas entre sí (el modelo de “stepping stone” o el modelo de islas); o constar de una población continua donde los individuos dentro de ésta intercambian genes sólo con otros individuos geográficamente cercanos (modelo de aislamiento por distancia). Y no sólo se mueven los individuos, también poblaciones o demos enteros pueden formarse y desaparecer con el tiempo, a través de procesos de extinción y colonización (modelo metapoblacional).

Una de las tareas de la genética de poblaciones es conocer cuál modelo se ajusta mejor a la estructura de una especie, lo cual es generalmente el primer paso hacia el entendimiento de su biología poblacional y del impacto que la distribución de la especie y flujo génico pueden tener sobre su variación genética. Los modelos de estructura poblacional resultan, de este modo, en diferentes patrones de diferenciación genética dentro y entre las localidades donde se distribuye la especie. Esta variación genética provee la materia prima para los cambios evolutivos. Asimismo, diferentes niveles de variación en diferentes poblaciones pueden evidenciar distintos eventos evolutivos en el pasado (Hillis y Moritz, 1990).

Muchos procesos pueden ser develados a través de la genética de poblaciones: por medio del análisis de las frecuencias alélicas se infiere qué procesos se están llevando a cabo en las poblaciones o han tenido un efecto sobre las mismas. Por ejemplo, se puede conocer si se trata de poblaciones aisladas e incluso estimar de qué magnitud es el aislamiento, definir si se están diferenciando unas de otras, y conocer los niveles de endogamia o de flujo génico.

Así pues, la estructura genética puede ser resultado de barreras actuales o pasadas que impiden la dispersión y flujo génico, de fluctuaciones en la densidad de la población; puede además estar relacionada con los patrones de dispersión y los sistemas de apareamiento. Para describir la estructura de una población, es necesario evaluar cuál factor o combinación de éstos se ajusta mejor a nuestras observaciones (Hey y Machado, 2004).

## 1.2 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares pueden describirse, de manera muy general, como componentes del genoma de las especies que deben poseer más de un estado y pueden ser identificados, aislados, amplificados y manejados con técnicas diversas para su visualización e interpretación. A

través de estos marcadores tenemos un referente confiable de la variación genética existente entre los individuos de una población, entre poblaciones y entre especies.

Los microsatélites o SSTR (*Single Sequence Tandem Repeat*, por sus siglas en inglés), son marcadores moleculares de ADN codominantes, heredados de manera mendeliana. Cada locus de microsatélite está caracterizado por una secuencia de ADN conocida (oligonucleotido o primer) que define al locus y precede a una serie de motivos repetitivos de ADN, los cuales varían en número y son altamente polimórficos. De este modo, aportan información acerca de los procesos mutacionales acontecidos en las poblaciones, a partir de los cuales se pueden estimar las tasas efectivas de migración y los tiempos de divergencia de la población, entre otros procesos (Sunnucks, 2000). Los microsatélites son una poderosa herramienta para detectar estructuración dentro de una población a escalas microgeográficas (O'Connell y Slatkin, 1993).

De acuerdo con la revisión de literatura realizada por DeWoody y Avise en 2000 respecto a la variación microsatelital reportada en poblaciones animales, se tiene que las muestras de poblaciones locales de peces marinos tienden a presentar, en promedio, niveles de heterocigosidad más significativos y mayor número de alelos por locus que los peces de agua dulce. Esto puede deberse a que una población local en el mar se distribuye sobre un área mucho mayor y comprende muchos más individuos que una población de peces de agua dulce típica, la cual está confinada a un cuerpo de agua en particular. Una posibilidad relacionada es que a lo largo de siglos o incluso milenios, el mar puede resultar un medio menos hostil que los lagos y ríos, lo que significa que su población en general puede ser menos susceptible a reducciones dramáticas en su tamaño (como aquellas ocasionadas por los efectos de los periodos glaciales durante el pleistoceno) u otras formas de selección que reducen la variación. En otras palabras, las poblaciones de peces de agua dulce en general se encuentran más diferenciadas que las poblaciones de peces marinos, lo que subraya el papel de las barreras físicas en el desarrollo de linajes genéticos. En el caso de los peces anádromos, como el salmón que habita ambos ambientes, de agua dulce y salada, se reportan valores de variabilidad genética intermedios, lo que nos hace pensar en la posible relación entre el medio y el nivel de variación genética entre los peces que lo habitan.

### **1.3 Biología y taxonomía de *Poecilia orri* y *Gambusia yucatanana***

Una de las familias de peces de agua dulce más abundantes en Sian Ka'an es Poeciliidae, a la cual pertenecen las dos especies del presente estudio: *Poecilia orri* y *Gambusia yucatanana*, conocidas comúnmente como mollys.

Una característica particular de los miembros de la familia Poeciliidae es que la aleta anal se encuentra modificada en un gonopodio para fines de fecundación interna, las hembras tienen la capacidad de almacenar esperma y de llevar a cabo en su interior la gestación de embriones fecundados a distintos tiempos de manera simultánea; a este proceso se le conoce como

superfetación (Meffe y Snelson, 1989). Al término de la gestación son liberados peces juveniles. Comúnmente las hembras se aparean con múltiples machos y, con evaluaciones genéticas, se ha probado que la mayoría de los pececillos en un “desove” o freza son de origen paterno múltiple (Chesser *et al.* 1984, DeWoody & Avise 2001 y Zane *et al.* 1999). Otra característica común a todos los miembros de la familia Poeciliidae es que son peces secundarios (con tolerancia a la salinidad) y que son excelentes colonizadores en ambientes extremos.

*G. yucatanana* fue descrita por Regan en 1914; sus nombres comunes son: Guayacán yucateco, pez mosquito, topote y gupi. Los miembros de esta especie son de talla pequeña (4 cm en promedio), los machos son de menor tamaño que las hembras. La especie se distribuye desde el norte de Belice, el distrito de Lago Petén en Guatemala, y al sureste de México en la Península de Yucatán y Coatzacoahuac Veracruz. Nada justo bajo la película superficial de cardúmenes y es raro verlo por debajo de los 20 cm de profundidad. Habita los márgenes del cuerpo de agua, donde puede refugiarse en el mangle o los juncos. Es un pez larvívoro, útil para el control de mosquitos, sin embargo, su alimento principal está constituido por algas filamentosas, diatomeas, plantas vasculares y pequeños crustáceos (copépodos, gamáridos, ostrácodos). *G. yucatanana* es la especie más eurihalina del género: existen poblaciones marinas, se le ha capturado a concentraciones del 0 a 37% de salinidad (Schmitter-Soto, 1998). Como especie eurihalina, prefiere aguas someras con fondos fangosos o arenosos. Su origen zoogeográfico es neotropical y es también la especie mejor distribuida en el estado de Quintana Roo. A pesar de su tamaño pequeño, el número de individuos de esta especie constituye un importante elemento en las poblaciones ícticas. Presenta además características morfológicas y conductuales que le permiten colonizar favorablemente ambientes extremos, como son charcas temporales que se desecan estacionalmente.

*Poecilia orri*, descrita por Fowler en 1943, es también conocida como topote yucateco y molly de manglar. Son peces pequeños (9 cm en promedio), secundarios (capturado a concentraciones entre el 0 y 23% de salinidad), vivíparos y de origen zoogeográfico neotropical. Se distribuye de Honduras a Yucatán. Se observa la modificación de la aleta anal en un gonopodio, con la diferencia de que este pez lleva una prominencia membranosa a manera de prepucio. Tiene hábitos alimenticios omnívoros, y consume desde algas microscópicas hasta pequeños crustáceos e insectos. *P. orri*, además de *G. yucatanana*, es una de las especies mejor distribuidas en el estado y de igual modo es capaz de colonizar ambientes extremos (Navarro y Suárez, 1992).

#### **1.4 Quintana Roo y la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an**

Quintana Roo se encuentra dentro de la provincia ictio-limnológica del Usumacinta, la cual está ubicada en su totalidad en la vertiente atlántica; tiene su límite noroccidental en la cuenca del río Papaloapan en México y su límite meridional está entre las cuencas del Río Cococ y Prinzapolka

en el norte de Nicaragua. Esta provincia alberga 145 especies de peces de agua dulce, pertenecientes a 34 géneros y 10 familias y se caracteriza por contener un gran número de especies endémicas y muchos derivados marinos que penetran a las aguas continentales (Millar, 1982).

El clima de Quintana Roo es en general cálido sub-húmedo. La temperatura media anual es de 26°C y la media mensual es siempre superior a 22°C; la precipitación media es de 1,300 mm anuales. La oscilación térmica anual es de 4.8°C, los meses más calientes son julio y agosto y el más frío es enero. Se distingue una época de sequía de diciembre a abril. Respecto a los suelos, en el estado predominan las redzinas rojas, con manchones aislados de litosoles y regosoles (Navarro y Robinson, 1990).

La Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an se localiza en el estado de Quintana Roo, Municipio de Felipe Carrillo Puerto, entre los 20°07'48" y 18°54'00" de latitud norte y entre los 88°12'12" y 87°24'36" de longitud oeste (Cabrera *et al.*, 1998). El clima de Sian Ka'an se clasifica como cálido sub-húmedo con lluvias en verano (Aw). El 75% de las precipitaciones se presentan en los meses de mayo a octubre; el mes más lluvioso es septiembre con 208.1 mm de promedio y el más seco es marzo con 29.4 mm. La precipitación anual media, según datos de cinco estaciones, es de 1,128 mm (INE, 1996).

Los suelos en Sian Ka'an son generalmente más pobres que los del resto de la península de Yucatán; son también más jóvenes y poco evolucionados, pedregosos, someros, fácilmente degradables. El subsuelo está íntegramente formado por calizas blancas y arenosas, llamadas *saskab*, no mineralizadas, que por intemperismo se endurecen y forman placas en la superficie conocidas como lajas. Entre las lajas la vegetación ha abierto oquedades y aportado capas delgadas de materia orgánica. Así, el área presenta las oquedades y desniveles característicos del sustrato calcáreo que dan lugar a la formación de cuerpos de agua como cenotes, petenes, lagunas, cayos y ojos de agua característicos de la zona. Todo ello conforma un complicado sistema hidrológico con una notable diversidad de ambientes y de vida silvestre (INE, 1996).

Desde el punto de vista biogeográfico, Sian Ka'an forma parte de la provincia de la península de Yucatán, en la región Caribeña y dentro de la región Neotropical (Rzedowski, 1978). Las subdivisiones de esta provincia son inciertas, aunque sobre la base de la distribución de la vegetación se pueden distinguir dos porciones: una más seca con bosque tropical caducifolio y bosque espinoso en el noroeste de la península, y otra más húmeda en el resto de la península. En esta última se ubica Sian Ka'an (INE, 1996). La Reserva comprende 528,000 hectáreas, de las cuales aproximadamente 120,000 son marinas. Ocupa una planicie calcárea parcialmente emergida que desciende gradualmente hacia el mar, formando un gradiente que va de sitios secos hasta inundables. En este gradiente se desarrollan las selvas medianas, selvas bajas, selvas inundables, marismas y manglares. También existen lagunas salobres, zonas oceánicas someras y arrecifes coralinos. En cuanto al paisaje del sistema acuático de la reserva tenemos

cuerpos de agua permanentes (cenotes y lagunas) junto con hábitat estacionales compuestos por humedales y zonas pantanosas inundadas (Zambrano *et al.* en revisión).

### **1.5 Cenotes y humedales**

Los cenotes son cuerpos de agua dulce o salobre, dependiendo de su cercanía con la costa, aunque la mayoría son sistemas de agua dulce. Se forman al colapsarse el suelo por la erosión de algún río subterráneo, por lo general son profundos y de diámetros mayores a los 10 metros. Dichas características hacen que los cenotes mantengan condiciones limnéticas constantes entre la temporada de lluvias y de secas (Pearse *et al.*, 1936).

Los humedales son cuerpos de agua someros y sujetos a la temporalidad. La formación de estos sistemas (como hábitat) depende de factores tales como el sedimento, la temporalidad de la zona, la vegetación y las condiciones físico-químicas extremas del agua, por ejemplo: bajos niveles de oxígeno, baja conductividad, temperaturas extremas y desecación (Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2002).

Los humedales no tienen aporte de agua de alguna fuente permanente, por lo que su existencia y tiempo de desecación dependen totalmente del régimen de lluvias. Durante la temporada de lluvias, estos cuerpos de agua pueden llegar a desbordarse invadiendo otras pozas de agua y estableciendo así conexiones temporales entre los sistemas anteriormente aislados. Ello facilita la dispersión de las poblaciones de peces dentro y entre los humedales (Snodgrass *et al.*, 1996). En este estudio se hace la distinción entre humedales con vegetación tipo petén (arbórea) y tipo marisma (zonas inundables con vegetación baja).

## 2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

### 2.1 Antecedentes

García (2004) y Zambrano *et al.* (en revisión) han realizado diversos estudios sobre la comunidad de peces en Sian Ka'an y su relación con las características bióticas y abióticas de diferentes cuerpos de agua en la zona. Estos autores encontraron que los cuerpos de agua estudiados se pueden dividir de acuerdo con sus características fisicoquímicas (temperatura, pH, salinidad, turbidez y oxígeno disuelto), así como por la presencia de vegetación sumergida y por la estacionalidad determinada por la temporada de lluvias y secas.

Respecto a la riqueza y diversidad de peces reportan que los sistemas con una mayor diversidad y riqueza específica de peces fueron los humedales, mientras que las menos diversas y menos ricas fueron los cenotes con y sin vegetación, respectivamente. Asimismo, confirmaron que los cuerpos de agua someros (humedales) son los sistemas que más cambian sus condiciones limnéticas entre temporadas (secas y lluvias), mientras que los cuerpos de agua profundos, como los cenotes, mantienen sus condiciones más estables entre las mismas.

La información sobre estructura de las poblaciones de peces en la región y en Sian Ka'an en particular es limitada y no existe información sobre la diversidad genética de ninguna de las familias presentes. Como se ha explicado, la familia Poeciliidae es de las más abundantes en número de especies y de individuos en la zona, encontrándose especies tanto de distribución amplia como restringida. El sistema de humedales en Sian Ka'an es un sitio ideal para hacer estudios que permitan evaluar los efectos de las condiciones fisicoquímicas de los diferentes cuerpos de agua sobre la variabilidad y estructuración genética de las especies más abundantes. Además, el sitio de estudio presenta poca perturbación humana, lo que nos permite estudiar la estructura genética de las poblaciones sin el efecto de las alteraciones antropogénicas. La importancia de este estudio radica también en la obtención de información básica acerca de las especies y su variabilidad genética en los cuerpos de agua, lo que puede servir como fundamento en aspectos sobre la conservación de los recursos biológicos en la zona.

Dado que estas poblaciones dulceacuícolas generalmente presentan tamaños efectivos poblacionales pequeños y/o tasas bajas de migración inter-poblacional, comparadas con las especies marinas, están expuestas a un mayor riesgo de extinción o una pérdida de la variación más rápida. Ello debe de ser tomado en cuenta al pensar en prioridades de conservación (Primmer, 2005).

En particular, el sistema de cenotes y humedales presentes en la zona de estudio resulta interesante debido a que se desconoce si existe o no conexión entre los cuerpos y el efecto que el aislamiento o flujo entre los mismos pueda tener sobre la variación genética de los peces que los habitan. Otro aspecto interesante era saber de que modo la estacionalidad de los humedales influye sobre la genética de poblaciones en dos especies filogenéticamente cercanas.

## **2.2 Objetivo general**

- Estudiar la diversidad y estructura genética poblacional de poecílicos en cenotes y humedales tropicales.

## **2.3 Objetivos particulares**

- Conocer la diversidad genética de las poblaciones de *Poecilia orri* y *Gambusia yucatana* dentro de diferentes cuerpos de agua, en la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an.
- Estimar la diferenciación genética, flujo génico y grado de aislamiento de las poblaciones de *Poecilia orri* y *Gambusia yucatana* en cuerpos de agua permanentes (cenotes) y temporales (humedales).

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Sitio de estudio y colecta

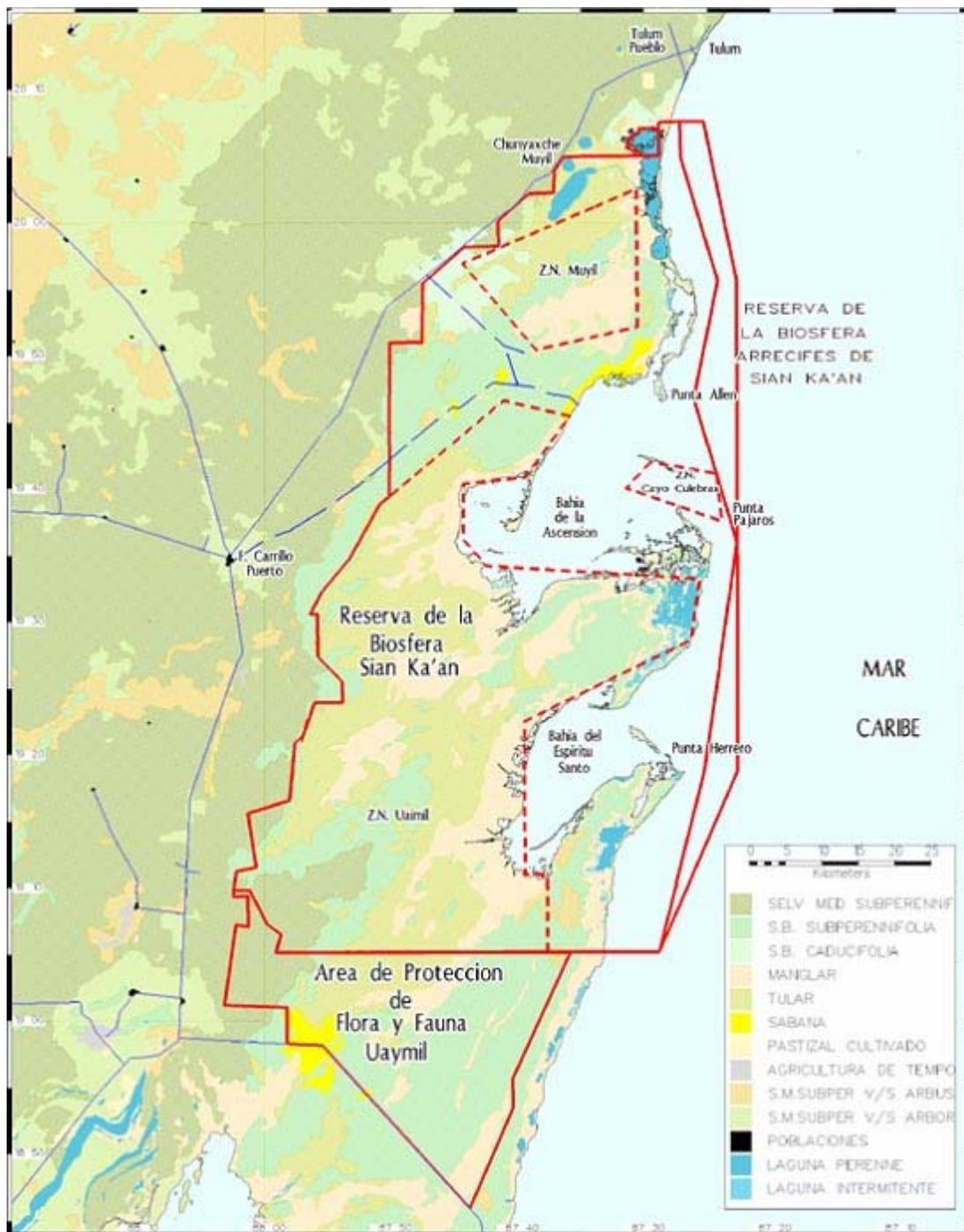
Los individuos de *P. orri* y *G. yucatanana* del presente estudio se colectaron en la zona central de la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an (Fig. 1a), como parte de un estudio más amplio donde se evaluó la comunidad de peces de la zona (García, 2004; Zambrano *et al.*, en revisión). De esta forma, el trabajo de campo del estudio completo comprendió la realización de cuatro colectas, entre octubre del 2001 y abril del 2003 en un total de 10 cuerpos de agua, cinco temporales y seis perennes. Los sitios de colecta se ubicaron a lo largo del camino que va del ejido de Felipe Carrillo Puerto a Vigía Chico y de la bifurcación de este último a Punta Allen (Fig. 1b). Siete de los cuerpos de agua estuvieron dentro de la Reserva, dos se localizaron en los límites entre el Ejido de Felipe Carrillo Puerto (zona de amortiguamiento) y la Reserva y uno (Plan de la Noria), se encuentra en el Ejido José María Morelos aproximadamente a 90 kilómetros de la reserva. Dos colectas se realizaron en la temporada de lluvias (octubre-noviembre) y dos en la temporada de secas (abril-mayo).

Las colectas se hicieron con nasas, trampas de alambre o nylon con dos orificios a los lados por los cuales entra el pez pero le es prácticamente imposible salir. Se dejaron estas trampas durante 24 horas en cada cuerpo de agua. Las trampas se colocaron en lugares someros, puesto que son ideales para colectar peces en cuerpos de agua con vegetación (García, 2004).

Los peces colectados fueron identificados en campo y en laboratorio siguiendo las claves taxonómicas especializadas para peces del sureste mexicano y de Centroamérica (Schmitter-Soto, 1998; Greenfield y Thomerson, 1997). Por último, los peces se fijaron en etanol al 90% para su traslado al laboratorio.

En el total de las colectas se registró la presencia de 30 especies, agrupadas en siete familias. La familia mejor representada fue Poeciliidae y dentro de ésta las especies más abundantes fueron *P. orri* y *G. yucatanana* (García, 2004; Zambrano *et al.*, en revisión). Con base en lo anterior, el presente estudio comprendió diez cuerpos de agua: tres cenotes con vegetación y dos sin vegetación (cuerpos permanentes) y cinco humedales temporales –dos petenes y tres marismas (Cuadro 1).

Todos los individuos de las dos especies que fueron capturados durante estas 4 colectas fueron analizados. Para *P. orri* se analizaron un total de 56 individuos provenientes de ocho cuerpos de agua: Cenote Santa Teresa (CST, 13 individuos), Marisma (MAR, 14), Cenote Petén (CP, 5), Lago Exterior Sur (LES, 2), Lago Límite (LL, 3), Lirios (LIR, 7), Plan de la Noria (PLN, 3) y Premarisma (PM, 9). En el caso de *G. yucatanana* se analizaron 68 individuos en siete localidades: MAR (9), CP (23), Lago Exterior Norte (LEN, 13), LES (3), LIR (5), PM (9) y Selva Manglar Norte (SMN, 6) (Fig. 1b).

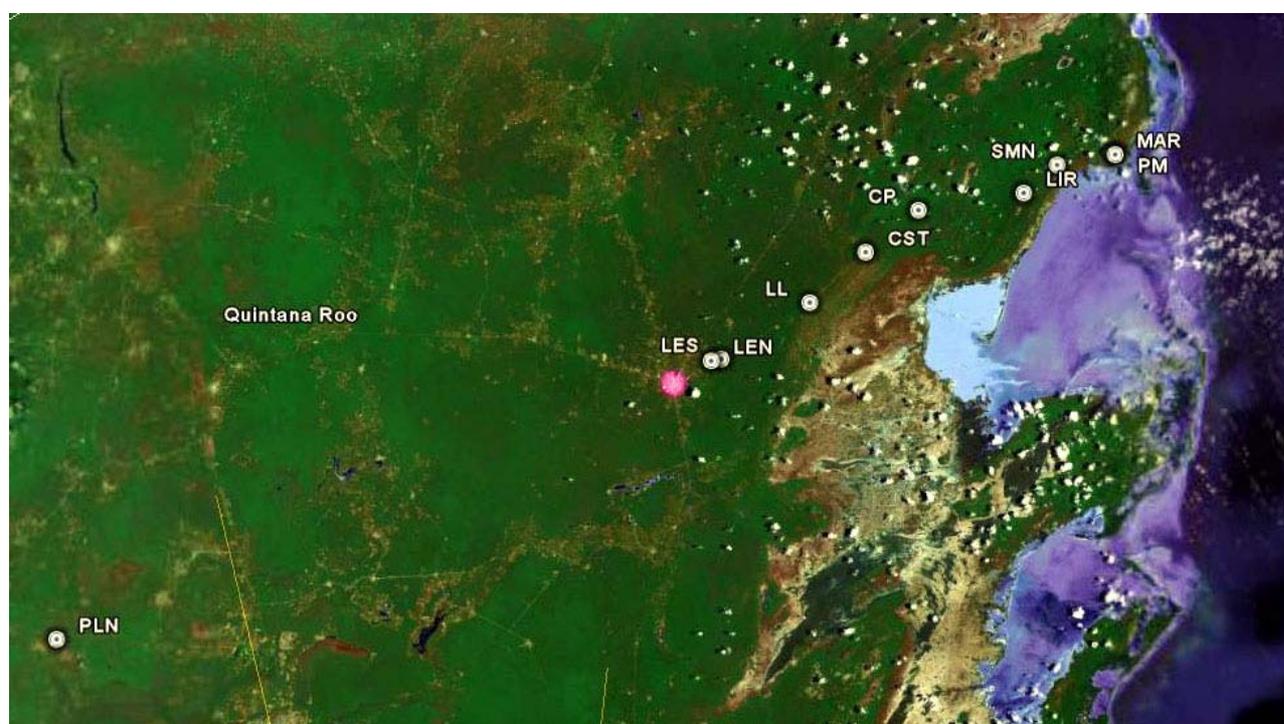


**Figura 1a.** Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an, Quintana Roo, México. Ubicada entre los 20°07'48" y 18°54'00" de latitud norte y entre los 88°12'12" y 87°24'36" de longitud oeste. Tomado de <http://effectivempa.noaa.gov/sites/siankaan.html>

**Cuadro 1.** Localidades muestreadas.

| Clave | Cuerpo de agua        | Coordenadas    |                | Especie (N) |     |
|-------|-----------------------|----------------|----------------|-------------|-----|
|       |                       | Oeste          | Norte          | G           | P   |
| PLN   | Cenote sin vegetación | 88° 47' 18.67" | 19° 18' 19.06" |             | 3   |
| LEN   | Cenote con vegetación | 87° 60' 00.40" | 19°36' 17.20"  | 13          |     |
| LES   | Cenote con vegetación | 87° 59' 17.20" | 19°36' 23.30"  | 3           | 2   |
| LL    | Cenote con vegetación | 87°52' 51.47"  | 19°40' 04.30"  |             | 3   |
| CST   | Cenote sin vegetación | 87°48' 46.00"  | 19°43' 23.77"  |             | 13* |
| CP    | Humedal (Petén)       | 87°44' 54.30"  | 19°46' 09.70"  | 23          | 5   |
| LIR   | Humedal (Petén)       | 87°37' 19.33"  | 19°47' 08.95"  | 5           | 7   |
| SMN   | Humedal (Marisma)     | 87°34' 52.09"  | 19°48' 59.89"  | 7           |     |
| PM    | Humedal (Marisma)     | 87°30' 39.90"  | 19°49' 38.40"  | 9           | 9   |
| MAR   | Humedal (Marisma)     | 87°30' 40.36"  | 19°49' 36.36"  | 9           | 14  |

Claves: PLN= Plan de la Noria, LEN= Lago Exterior Norte, LES= Lago Exterior Sur, LL=Lago Límite, CST= Cenote Santa Teresa, CP= Cenote Peten, LIR= Lirios, SMN= Selva Manglar Norte, MAR= Marisma y PM= Premarisma. G= *Gambusia yucatanana* P= *Poecilia orri*. N= Tamaño de muestra en el sitio (# individuos). (\*) Única especie en el sitio.



**Figura 1b.** Localidades de colecta en la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an, Quintana Roo, México. Claves en el Cuadro 1. Punto rosa: Municipio de Felipe Carrillo Puerto. Escala: 1 cm es aproximadamente igual a 11.5 km.

## 3.2 Procesamiento de muestras para microsatélites

### 3.2.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el kit AquaPure Genomic DNA (BIO-RAD), siguiendo el protocolo indicado en el manual para la extracción de ADN a partir de tejido. El procedimiento consta de cinco pasos: lisis celular, tratamiento con enzimas de digestión del ARN, precipitación de proteínas, precipitación de ADN y finalmente hidratación de la muestra de ADN extraída. No hay necesidad de preparar ningún reactivo, todos están incluidos en el kit y es cuestión de seguir la serie de incubaciones y centrifugados para precipitar y obtener los productos deseados. Para conocer el procedimiento paso a paso, ver el Anexo I.

Para confirmar que el producto se encontraba en buena cantidad y sin contaminación por proteínas u otros elementos, se realizó la cuantificación de los mismos con un biofotómetro Eppendorf (BioPhotometer 6131), el cual nos proporciona la cantidad de ADN extraído en nanogramos por microlitro, una medida de densidad óptica (A260/280) y otra de pureza (A320); estas dos últimas medidas deben encontrarse dentro de ciertos límites que nos indican la calidad del producto de extracción (Anexo II). Cuando la lectura de las muestras se alejaba del promedio óptimo, las muestras se visualizaron y cuantificaron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio usando una referencia de pesos moleculares específicos (Anexo III). Aunque este último método carece de la precisión de una cuantificación con biofotómetro, confirma la presencia de material genético y nos da un aproximado visual de su cantidad y pureza; de este modo se decidió si el producto era viable para ser utilizado o se repetía la extracción.

### 3.2.2 Estandarización de PCR

Para la selección de oligonucleótidos (“*primers*”) adecuados para el trabajo, se hizo una revisión bibliográfica. Para *P. orri* se probaron cinco loci de microsatélites reportados polimórficos para la especie *G. affinis* por Spencer *et al.* (1999), y elaborados por laboratorios Invitrogen para este estudio: Gafu2, Gafu3, Gafu4, Gafu6 y Gafu7 (Cuadro 2), de los cuales tres resultaron polimórficos: Gafu3, Gafu4 y Gafu6. Gafu2 fue monomórfico y con Gafu7, aunque encontramos variación, no obtuvimos una definición clara de las bandas por lo que no se obtuvieron datos con este primer.

Para *G. yucatan*a se probaron los mismos cinco loci, resultando ser polimórficos para esta especie Gafu3, Gafu4 y Gafu7. Gafu2 fue monomórfico y en Gafu6 encontramos poca variación pero no obtuvimos la definición necesaria en las bandas para su análisis. Las características generales y temperatura de alineamiento de los primers utilizados se muestran en el Cuadro 2.

También se probaron otros dos primers, Mf-6 y Mf-13 reportados polimórficos para *Gambusia holbrooki* por Zane et al. (1999), sin embargo, ambos resultaron monomórficos para *G. yucatanana*; para *P. orri* tampoco encontramos variación, aunque por limitantes de tiempo se hicieron pocas pruebas (con 8 individuos), probablemente insuficientes para determinar si el locus es también monomórfico para esta especie.

Las condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los primers varió para cada especie (Anexo IV); se llevo a cabo para un volumen final de 15 µl por muestra, con una concentración del primer de 0.8 o 1 µM, 0.45 U de Taq ADN polimerasa Platinum (laboratorios invitrogen 10966-026), concentraciones de MgCl<sub>2</sub> entre 2.5 y 3.7, 1.5µl de dNTPs 2mM, buffer y 1µl de ADN con 60 ng/µl en promedio.

Los pasos en el termociclador fueron los siguientes: 1' 30" a 94°C para desnaturalizar, 30 ciclos de 40" a 94°C, 40" a 65 o 66°C para alineación (según el primer) y 1' a 72°C para extensión; 72°C por 3' como tiempo extra de extensión y por ultimo a 4°C por tiempo indefinido para reposo.

**Cuadro 2.** Primers de microsatélites y condiciones para PCR utilizadas para *P. orri* y *G. yucatanana*.

|                      | <b>Primer repetido</b> | <b>Motivo alineación</b> | <b>Temperatura (°C)</b> | <b>No. Acceso GeneBank</b> | <b>Tamaño alelos (pb)</b> | <b>No. alelos</b> |
|----------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------|
| <i>P. orri</i>       |                        |                          |                         |                            |                           |                   |
|                      | Gafu3                  | [GT] <sub>33</sub>       | 66°C                    | AF060915                   | 210-254                   | 13                |
|                      | Gafu4                  | [CT] <sub>27</sub>       | 66°C                    | AF060914                   | 172-190                   | 9                 |
|                      | Gafu6                  | [GA] <sub>10</sub>       | 67°C                    | AF060917                   | 162-192                   | 11                |
| <i>G. yucatanana</i> |                        |                          |                         |                            |                           |                   |
|                      | Gafu3                  |                          | 66°C                    |                            | 190-246                   | 14                |
|                      | Gafu4                  |                          | 66°C                    |                            | 176-204                   | 11                |
|                      | Gafu7                  | [AG] <sub>22</sub>       | 67°C                    | AF060918                   | 158-164                   | 5                 |

### 3.2.3 Geles de poliacrilamida

La preparación de vidrios y montaje de muestras en los geles de poliacrilamida es un proceso conocido y reportado en libros de herramientas y técnicas de genética molecular, los cuales llegan a tener pequeñas variaciones, sin embargo en el Anexo V se encuentran los procedimientos para la preparación de buffers y reactivos empleados en este estudio.

Todos los geles fueron corridos a 500 volts por aproximadamente 3 horas; el tiempo de corrido de los geles puede variar, esto depende del número de repeticiones del microsatélite, lo que determina la separación entre sus bandas, ya que mientras más pares de bases repetidas presente, las bandas se diferencian más pronto y disminuye el tiempo de corrido necesario,

mientras que con un menor número de repeticiones se requiere de más tiempo para poder observar la separación de las bandas.

#### 3.2.4 Tinción con plata

Para la tinción de los geles de poliacrilamida se siguió el método de tinción con plata, cuyos pasos primordiales son los siguientes: 1) equilibrar el gel con nitrato de plata, 2) lavado con agua, 3) la plata iónica es reducida a plata metálica la cual reacciona con los sitios con ácidos nucleicos en el gel, y 4) los núcleos coloidales de plata crecen por el depósito de plata adicional durante la primer hora del paso de estabilización del gel. Los detalles técnicos de preparación de soluciones y tiempos de reacción para cada paso, los cuales fueron afinados por medio de ensayo y error a lo largo del trabajo de laboratorio, se reportan en el Anexo V.

#### 3.2.5 Lectura de geles

Para la obtención de los genotipos de los microsatélites se utilizó el programa Labworks Image Acquisition and Analysis Software Versión 4.5 (UVP BioImaging Systems). Con este programa, por medio de una foto digital del gel (la cual es descargada a la computadora, para ser abierta y procesada por el programa), se obtiene el tamaño de los productos en pares de bases, con base en la lectura que hace el programa y usando como referencia la escalera de ADN de 10 pares de bases que es colocada junto con las muestras al correr el gel. El programa elimina los errores que se podrían tener al ajustar la curvatura que comúnmente se presenta en los geles y nos da una medida objetiva y constante del tamaño de los alelos.

## 4. ANÁLISIS GENÉTICOS

### 4.1 Diversidad genética

Se estimaron las frecuencias alélicas y frecuencias genotípicas para tres loci en los cuerpos de agua muestreados para cada especie (*P. orri* y *G. yucatanana*). Se realizaron pruebas de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg y los valores de significancia se estimaron con base en el método de cadenas de Markov (método de Fisher; Guo y Thompson, 1992) con 1000 iteraciones, y aplicando la corrección de Bonferroni, la cual se utiliza para corregir los valores de probabilidad cuando se tienen comparaciones múltiples. Esto se hizo para cada locus por localidad, para los tres loci por localidad y para todos los loci y todas las localidades. Se calculó también el coeficiente de endogamia,  $F_{IS}$ , que es una medida de la desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg, donde los valores positivos indican una deficiencia de heterocigos y valores negativos indican un exceso (Hedrick, 2000). Estos índices se estimaron con base en Weir y Cockerham (1984) y Robertson y Hill (1984), considerando cada locus por localidad. Todos estos análisis se realizaron con el programa GenePop (Raymond y Rousset, 2003).

La fórmula utilizada para la estimación del coeficiente de endogamia con tamaños de muestra desiguales implica los siguientes cálculos:

$F_{ST}$ : que es la varianza en frecuencias alélicas entre poblaciones ( $\sigma_p^2$ ) estandarizada por la media de las frecuencias alélicas ( $p$ ).

$$F_{ST} = \frac{\sigma_p^2}{p(1-p)} \quad (\text{Whitlock y McCauley, 1999})$$

En un caso extremo, con una población conformada por  $n$  subpoblaciones separadas, cada una con apareamiento al azar, resulta  $F_{ST} \neq 0$  y  $F_{IS} = 0$

$F_{IS}$ : es la probabilidad de que dos alelos en un individuo sean idénticos por descendencia dentro la subpoblación a la que pertenecen. También llamado coeficiente de endogamia  $f$ . El grado de divergencia de las frecuencias alélicas entre las subpoblaciones difiere entre alelos en loci multialélicos y entre loci, por lo que el valor de  $f$  ( $F_{IS}$ ) no es el mismo para cada locus y su valor esperado se calcula como:

$$f = (n-1)F_{ST}/n, \quad (\text{Weir y Cockerham, 1984; Robertson y Hill, 1984})$$

Existen varios estimadores de la diferenciación en la población ( $F_{ST}$ ). El programa GenePop calcula dos de éstos:  $\theta_{WC}$  (Weir y Cockerham, 1984) y  $\theta_{RH}$  (Robertson y Hill, 1984):

$$\theta_{WC} = \frac{\sum_{u=1}^k a_u}{\sum_{u=1}^k (a_u + b_u + c_u)} \quad \text{Goudet et al. (1996)}$$

$$\theta_{RH} = 1/(k-1) \sum_{u=1}^k \frac{(1-p_u^*) a_u}{a_u + b_u + c_u} \quad \text{Goudet et al. (1996)}$$

donde  $k$  es el número de alelos en un locus, y  $a_u$ ,  $b_u$  y  $c_u$  son los estimados de componentes de variación: entre muestras, entre individuos dentro de las muestras y dentro de los individuos, de un análisis anidado de varianzas en las frecuencias alélicas;  $p_u^*$  es la frecuencia observada del alelo  $u$ . En ambos casos, cuando el resultado es un valor positivo indica una deficiencia de heterocigos y los valores negativos un exceso de los mismos.

Se estimó también el desequilibrio de ligamiento (*linkage disequilibrium*), en donde la hipótesis nula implica que los genotipos de un locus son independientes de los genotipos de otro locus. Para cada par de locus y para la muestra total se estimó con GenePop el valor de significancia por el método de Fisher (1000 iteraciones) y aplicando la corrección de Bonferroni.

Para estimar la diversidad genética en las diferentes localidades de cada especie, se obtuvieron: el número efectivo de alelos ( $e^*$ ), el porcentaje de loci polimórficos ( $P$ ), la heterocigosidad observada ( $He_{obs}$ ), la heterocigosidad esperada ( $He_{esp}$ ) y la heterocigosidad esperada no sesgada de Nei ( $He^*$ ; Nei, 1973), con el programa PopGene (Yeh, 1997). Los valores de heterocigosidad se estimaron con base en Nei (1973):

Bajo el supuesto de tener  $n$  alelos en un locus y la frecuencia del  $k$ ésimo alelo ( $k$ th) es  $x_k$  en una población, las probabilidades de identidad y no identidad de dos alelos tomados al azar están dadas por:

$$J = \sum_k x_k^2 \quad \text{y} \quad H = 1 - J, \text{ respectivamente,}$$

donde  $H$  es la heterocigosidad, una medida de variación génica de la población, que en realidad sería diversidad de genes para poblaciones sin apareamiento al azar, y  $J$  es la identidad génica u homocigosidad.

La identidad génica u homocigosidad en una subpoblación esta dada por:

$$J_i = \sum_k x_{ik}^2$$

donde  $x_{ik}$  es la frecuencia del  $k$ ésimo alelo ( $k$ th) en la  $i$ ésima población ( $i$ th).

Y en el total de la población por:

$$J_T = \sum_k x_k^2$$

donde  $x_k = \sum_i w_i x_{ik}$ , en la cual  $w_i$  es el peso para la  $i$ ésima subpoblación ( $i$ th)  $\sum w_i = 1$ .

La diversidad génica entre dos poblaciones,  $i$  y  $j$ , se calcula como:

$$D_{ij} = H_{ij} - (H_i + H_j) / 2 \text{ que es igual que } (J_i + J_j) / 2 - J_{ij}$$

donde  $H_i = 1 - J_i$  y  $H_j = 1 - J_j$

Y la diversidad génica (heterocigosidad) en la población total  $H_T$  es:

$$H_T = 1 - J_T$$

Finalmente se evaluó la diferenciación alélica, que se refiere a la distribución de alelos en las diferentes localidades, y donde la hipótesis nula es: la distribución alélica es idéntica a lo largo de las localidades. La significancia de los resultados se estimó con una prueba de Fisher (estimador no sesgado de la probabilidad; Raymond y Rousset 1995). Se estimó también la diferenciación genotípica, que en este caso revisa la distribución de los genotipos en las localidades (hipótesis nula: la distribución genotípica es idéntica en las localidades), utilizando una prueba de  $G$  (Goudet et al. 1996). Se utilizó también el programa GenePop.

#### 4.2 Estructura genética y diferenciación de las poblaciones

La distancia genética mínima de Nei ( $D_m$ ; Nei, 1973) entre localidades se estimó con PopGene, como:

$$D_m = (J_x + J_y) / 2 - (J_{xy})$$

donde  $x_i$  y  $y_i$  son la frecuencia del  $i$ -ésimo alelo en un locus en las poblaciones  $X$  y  $Y$ , respectivamente, y  $J$  es la homocigosidad esperada de las dos poblaciones. A partir de los valores de  $D_m$  se obtuvo un árbol de neighbor-joining utilizando el programa MEGA 3.0, para representar gráficamente las diferencias entre localidades (Kumar et al., 2004).

Los análisis de estructura genética de las poblaciones se llevaron a cabo con el programa Arlequín v.2.0 (Schneider et al. 2000). Para evaluar la estructura genética dentro y entre localidades de ambas especies se calculó el índice  $R_{ST}$  (Slatkin, 1995):

$$R_{ST} = \frac{S' - S_w}{S'}$$

donde:  $S_w$  es dos veces la varianza promedio del tamaño del alelo en cada población y  $S'$  es dos veces la varianza estimada del tamaño del alelo en el total de las poblaciones (Slatkin, 1995 y Rousset, 1996).

Se utilizó este índice dado que bajo los supuestos del modelo de mutación paso a paso (Ohta y Kimura, 1973; Kimura y Ohta, 1978) para loci de microsatélites el estadístico  $R_{ST}$  es un estimador menos sesgado, dado que toma en cuenta el tamaño del alelo cuando en otros componentes de variación entre poblaciones sólo se considera la identidad o no identidad de estado de los alelos.

Se obtuvo una estimación del número de migrantes entre localidades ( $M_R$ ), calculado a partir de  $R_{ST}$  y con la transformación de Slatkin (1995) para linearizar la distancia con el tiempo de divergencia poblacional (para poblaciones diploides  $M = 2Nm$ ):

$$M_R = (1 - R_{ST}) / 2 R_{ST}$$

Asimismo, se evaluó la distribución de la variación genética entre localidades, dentro de las localidades y dentro de individuos, por medio de un análisis molecular de varianza (AMOVA; Michalakis, 1996), cuyos niveles de significancia fueron determinados con base en 1000 permutaciones.

Para conocer si existe relación entre la distancia genética de las localidades y la distancia geográfica, se midió el aislamiento por distancia por medio de una prueba de Mantel, utilizando las matrices de distancia genética de Nei ( $D_N$ ; Nei, 1978). Dicha prueba mide el número acumulado de diferencias alélicas por locus entre dos poblaciones y la distancia geográfica (medida en kilómetros lineales) entre localidades. Los valores de significancia fueron con base en 1000 permutaciones.

## 5. RESULTADOS

### *Poecilia orri*

Se analizaron un total de 56 individuos de *Poecilia orri* en ocho cuerpos de agua (Fig. 1b): Cenote Santa Teresa (CST, 13 individuos), Marisma (MAR, 14), Cenote Petén (CP, 5), Lago Exterior Sur (LES, 2), Lago Límite (LL, 3), Lirios (LIR, 7), Plan de la Noria (PLN, 3) y Premarisma (PM, 9).

#### 5.1 Diversidad genética

Con la prueba de desviación del equilibrio de H-W, en *Poecilia orri* se observó que para Gafu6 y Gafu3, PLN y CP se encontraron en equilibrio, mientras que para Gafu4 sólo LL. El resto de las localidades, considerando por separado cada uno de los tres marcadores, se encontraron fuera de equilibrio ( $P < 0.05$ ), por deficiencia de heterocigos. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que en ocho de 24 casos no fue posible el cálculo por la presencia de un solo alelo (Cuadro 3).

Asimismo, los valores de coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) según el cálculo de W&C variaron desde -0.2, en la mayoría de los casos, hasta 1; y con el índice R&H de -0.167 a 2 (ambos valores negativos presentes en PLN). El resto de los valores fueron positivos, lo que indica una deficiencia de heterocigos en todos los casos excepto en PLN (Cuadro 3).

Considerando los tres loci en conjunto y cada localidad de manera individual con una prueba de  $\chi^2$ , PLN se encontró en equilibrio, LIR, MAR, CST, CP y PM presentaron desviaciones significativas de H-W ( $P < 0.001$ ) por deficiencia de heterocigos y en LES y LL no se pudo calcular (Cuadro 4).

**Cuadro 3.** Equilibrio de Hardy-Weinberg y coeficientes de endogamia ( $F_{IS}$ ) con los Índices de W&C y R&H para cada locus por sitio para *P. orri*. Se marcan en negritas los valores no significativos ( $P \geq 0.05$ ) que indican equilibrio H-W.

| Sitio      | Locus | <i>P</i>      | W&C   | R&H   | Sitio      | Locus | <i>P</i>      | W&C   | R&H    |
|------------|-------|---------------|-------|-------|------------|-------|---------------|-------|--------|
| <b>CST</b> | Gafu3 | 0             | 1     | 1     | <b>LL</b>  | Gafu3 | ---           | ---   | ---    |
|            | Gafu4 | ---           | ---   | ---   |            | Gafu4 | <b>0.2016</b> | 1     | 2      |
|            | Gafu6 | 0             | 1     | 1     |            | Gafu6 | ---           | ---   | ---    |
| <b>MAR</b> | Gafu3 | 0             | 0.417 | 0.401 | <b>LIR</b> | Gafu3 | 0.0052        | 0.514 | 0.3    |
|            | Gafu4 | 0.0008        | 1     | 1     |            | Gafu4 | 0.001         | 1     | 1      |
|            | Gafu6 | 0             | 1     | 1     |            | Gafu6 | 0.0001        | 1     | 1      |
| <b>CP</b>  | Gafu3 | <b>0.0170</b> | 0.75  | 0.8   | <b>PLN</b> | Gafu3 | <b>0.1983</b> | 1     | 2      |
|            | Gafu4 | 0.0155        | 1     | 1     |            | Gafu4 | ---           | ---   | ---    |
|            | Gafu6 | <b>0.1108</b> | 1     | 1     |            | Gafu6 | <b>1.0</b>    | -0.2  | -0.167 |
| <b>LES</b> | Gafu3 | ---           | ---   | ---   | <b>PM</b>  | Gafu3 | 0.0024        | 0.238 | 0.169  |
|            | Gafu4 | ---           | ---   | ---   |            | Gafu4 | ---           | ---   | ---    |
|            | Gafu6 | ---           | ---   | ---   |            | Gafu6 | 0.0004        | 1     | 1      |

**Cuadro 4.** Prueba de chi-cuadrada ( $\chi^2$ ) del equilibrio de Hardy-Weinberg para todos los loci en las localidades estudiadas para *P. orri*.

| Localidad | $\chi^2$ | g.l. | <i>P</i>      |
|-----------|----------|------|---------------|
| CST       | $\infty$ | 4    | *             |
| MAR       | $\infty$ | 6    | *             |
| CP        | 20.92    | 6    | 0.0019        |
| LES       | -----    | -    | -----         |
| LL        | -----    | -    | -----         |
| LIR       | 38.28    | 6    | *             |
| PLN       | 3.2029   | 4    | <b>0.5245</b> |
| PM        | 26.415   | 4    | 0.0001        |

\*: altamente significativos ( $P < 0.00001$ );  $\infty$ : infinito

Respecto al análisis de desequilibrio de ligamiento, encontramos que del total de comparaciones posibles (13 de 24) ningún par de loci exhibió desequilibrio de ligamiento significativo, lo que indica que los genotipos en un locus son independientes de los genotipos en otro locus. Para LES, LL y PLN la comparación no fue posible entre ningún par de loci, ni para PM entre Gafu4-Gafu3 y Gafu4-Gafu6, debido a que presentaron un solo alelo. Al considerar todas las localidades con una prueba de  $\chi^2$ , ningún par de loci mostró desequilibrio ( $P < 0.05$ , Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Desequilibrio de ligamiento en *P. orri* para (A) cada locus y todas las localidades de estudio, y (B) el total de la muestra.

| <b>A)</b>        |                    |          |             |
|------------------|--------------------|----------|-------------|
| <b>Localidad</b> | <b>Par de loci</b> | <b>P</b> | <b>E.S.</b> |
| CST              | Gafu4/Gafu3        | 1        | 0           |
|                  | Gafu4/Gafu6        | 1        | 0           |
|                  | Gafu3/Gafu6        | 0.093    | 0.003       |
| CP               | Gafu4/Gafu3        | 0.304    | 0.007       |
|                  | Gafu4/Gafu6        | 0.397    | 0.004       |
|                  | Gafu3/Gafu6        | 0.597    | 0.004       |
| LL               | Gafu4/Gafu3        | NP       |             |
|                  | Gafu4/Gafu6        | NP       |             |
|                  | Gafu3/Gafu6        | NP       |             |
| PLN              | Gafu4/Gafu3        | NP       |             |
|                  | Gafu4/Gafu6        | NP       |             |
|                  | Gafu3/Gafu6        | NP       |             |
| MAR              | Gafu4/Gafu3        | 0.169    | 0.007       |
|                  | Gafu4/Gafu6        | 0.142    | 0.005       |
|                  | Gafu3/Gafu6        | 0.719    | 0.009       |
| LES              | Gafu4/Gafu3        | NP       |             |
|                  | Gafu4/Gafu6        | NP       |             |
|                  | Gafu3/Gafu6        | NP       |             |
| LIR              | Gafu4/Gafu3        | 0.071    | 0.004       |
|                  | Gafu4/Gafu6        | 1        | 0           |
|                  | Gafu3/Gafu6        | 1        | 0           |
| PM               | Gafu4/Gafu3        | NP       |             |
|                  | Gafu4/Gafu6        | NP       |             |
|                  | Gafu3/Gafu6        | 1        | 0           |

NP = no es posible calcular.

| <b>B)</b>          |          |             |          |
|--------------------|----------|-------------|----------|
| <b>Par de loci</b> | $\chi^2$ | <b>g.l.</b> | <b>P</b> |
| Gafu4/Gafu3        | 11.235   | 8           | 0.189    |
| Gafu4/Gafu6        | 7.55     | 8           | 0.675    |
| Gafu3/Gafu6        | 6.45     | 10          | 0.776    |

## 5.2 Frecuencias alélicas

Se observó un alto número de alelos por locus: 13 alelos en Gafu3, 9 en Gafu4 y 11 en Gafu6 (Cuadro 6). El mayor número de alelos por locus se observó con Gafu3 en la localidad MAR con 8 alelos, seguido por PM y LIR con 6 alelos cada uno, mientras que el número más bajo, con un alelo único, se observó en LES (para los tres loci), en LL para Gafu3 y Gafu6, y en PLN y PM para Gafu4.

Respecto a cada locus, en Gafu3 se observaron 2 alelos con alta frecuencia (presentes en 5 y 6 localidades) y 6 de los 13 alelos fueron exclusivos (presentes únicamente en una localidad), 3 en MAR, 2 en PLN y 1 en LIR (Fig. 2a, b). En cuanto a Gafu4, hubo un alelo frecuente (en 4 localidades) y 6 de los 10 alelos fueron exclusivos: 2 en CP, 1 en MAR, 1 en LIR, 1 LES y 1 CST

(Fig. 2c, d). Finalmente, para Gafu6, el alelo con distribución más amplia se encuentra en 6 de las 8 localidades y 5 de los 11 alelos fueron exclusivos de un sitio: 1 en LIR y 4 en PLN (Fig. 2e, f).

PLN y MAR fueron las localidades con el mayor número de alelos exclusivos (6 y 4, respectivamente). Por otro lado, MAR, LIR y PM fueron los que tuvieron un mayor número de alelos compartidos, es decir, presentes en otras localidades.

**Cuadro 6.** Frecuencias alélicas para tres loci en las ocho localidades estudiadas para *P. orri*.

| Locus        | Localidad |       |       |      |       |       |       |       |
|--------------|-----------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|
|              | CST       | MAR   | CP    | LES  | LL    | LIR   | PLN   | PM    |
| <b>Gafu3</b> |           |       |       |      |       |       |       |       |
| alelo        |           |       |       |      |       |       |       |       |
| 1            |           |       | 0.200 |      |       | 0.286 |       |       |
| 2            |           | 0.071 |       |      |       |       |       |       |
| 3            |           |       |       |      |       | 0.286 |       |       |
| 4            |           | 0.071 | 0.100 |      |       |       |       | 0.111 |
| 5            |           | 0.107 |       |      |       | 0.071 |       | 0.111 |
| 6            |           |       |       |      |       | 0.143 |       | 0.111 |
| 7            |           | 0.071 |       |      |       |       |       |       |
| 8            |           | 0.215 |       |      |       |       |       |       |
| 9            | 0.692     | 0.321 | 0.500 |      | 1.00  | 0.143 |       | 0.222 |
| 10           | 0.077     | 0.071 | 0.200 |      |       | 0.071 |       | 0.222 |
| 11           | 0.231     | 0.071 |       | 1.00 |       |       |       | 0.222 |
| 12           |           |       |       |      |       |       | 0.667 |       |
| 13           |           |       |       |      |       |       | 0.333 |       |
| <b>Gafu4</b> |           |       |       |      |       |       |       |       |
| alelo        |           |       |       |      |       |       |       |       |
| 1            |           | 0.071 | 0.600 |      | 0.333 |       |       |       |
| 2            |           |       | 0.200 |      |       |       |       |       |
| 3            |           | 0.857 |       |      |       | 0.286 | 1.00  | 1.00  |
| 4            |           |       | 0.200 |      |       |       |       |       |
| 5            | 0.962     |       |       |      | 0.666 | 0.428 |       |       |
| 6            |           |       |       | 1.00 |       |       |       |       |
| 7            |           | 0.071 |       |      |       |       |       |       |
| 8            |           |       |       |      |       | 0.286 |       |       |
| 9            | 0.038     |       |       |      |       |       |       |       |
| <b>Gafu6</b> |           |       |       |      |       |       |       |       |
| alelo        |           |       |       |      |       |       |       |       |
| 1            |           |       |       |      |       | 0.167 |       |       |
| 2            |           | 0.071 |       |      |       | 0.167 |       |       |
| 3            | 0.077     |       |       |      |       | 0.333 |       |       |
| 4            | 0.461     | 0.357 |       |      |       | 0.167 |       | 0.222 |
| 5            | 0.461     | 0.357 | 0.800 | 1.00 | 1.00  |       |       | 0.667 |
| 6            |           | 0.215 |       |      |       |       |       | 0.111 |
| 7            |           |       | 0.200 |      |       | 0.166 |       |       |
| 8            |           |       |       |      |       |       | 0.167 |       |
| 9            |           |       |       |      |       |       | 0.333 |       |
| 10           |           |       |       |      |       |       | 0.333 |       |
| 11           |           |       |       |      |       |       | 0.167 |       |

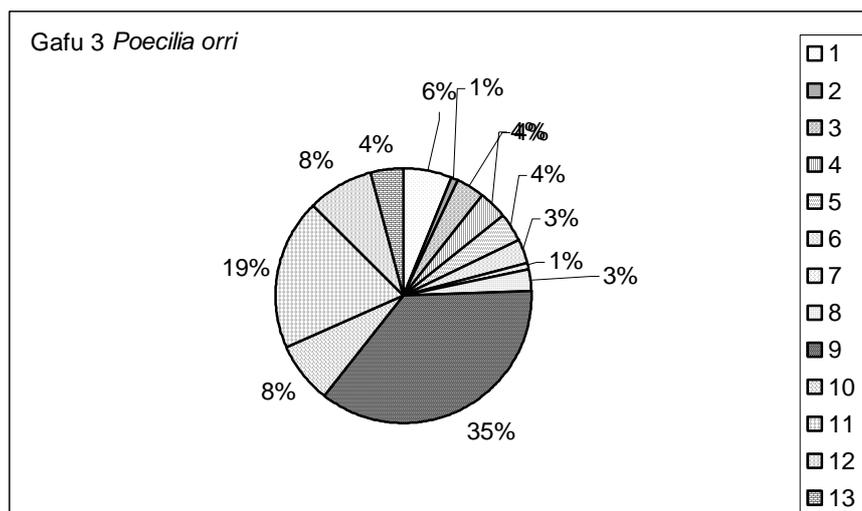


Figura 2a. Frecuencias alélicas en *Poecilia orri* para Gafu3 (13 alelos) en todas las localidades.

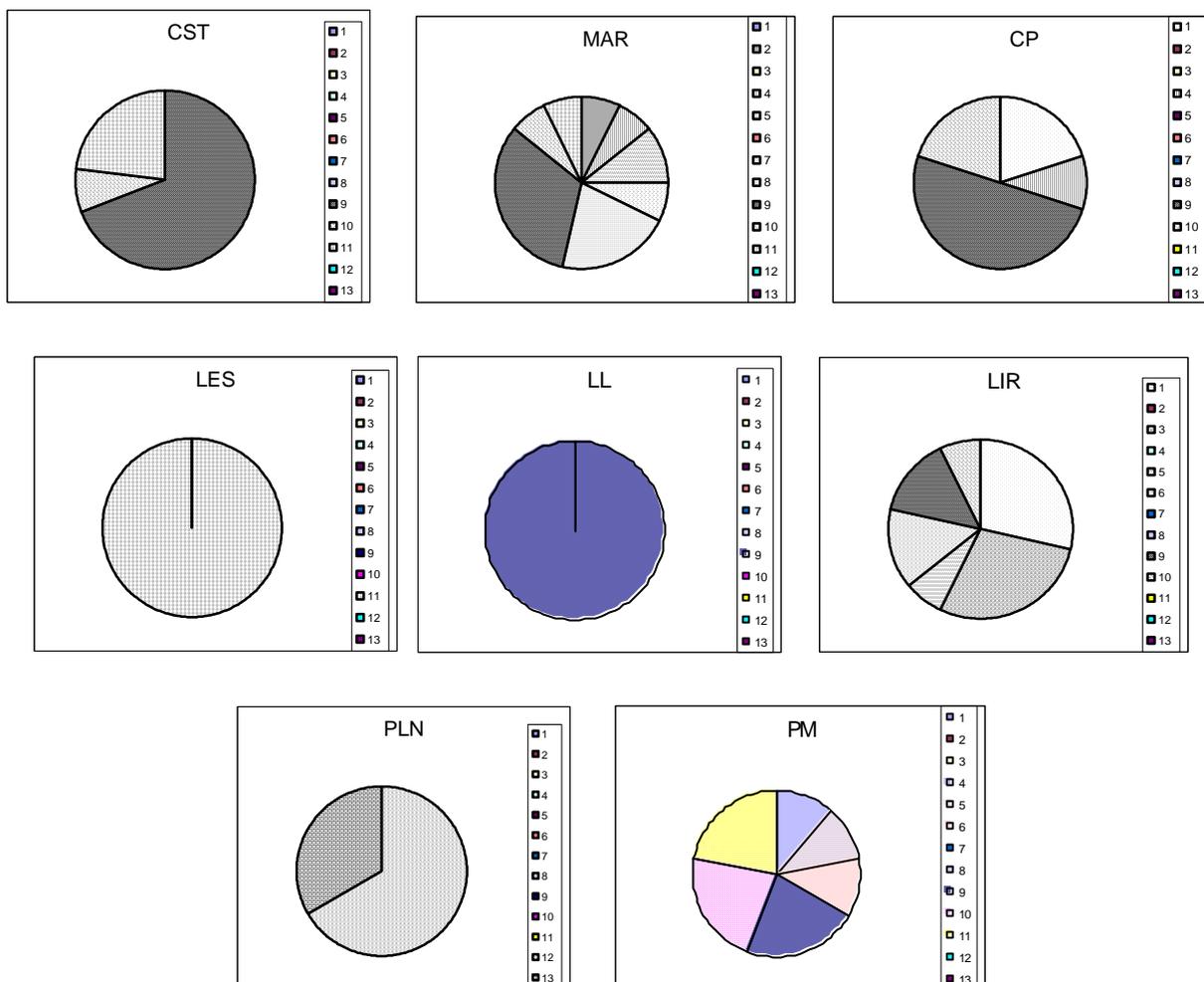
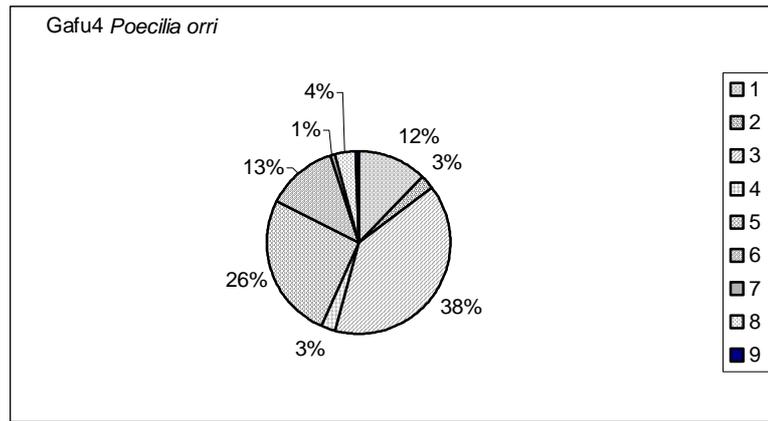
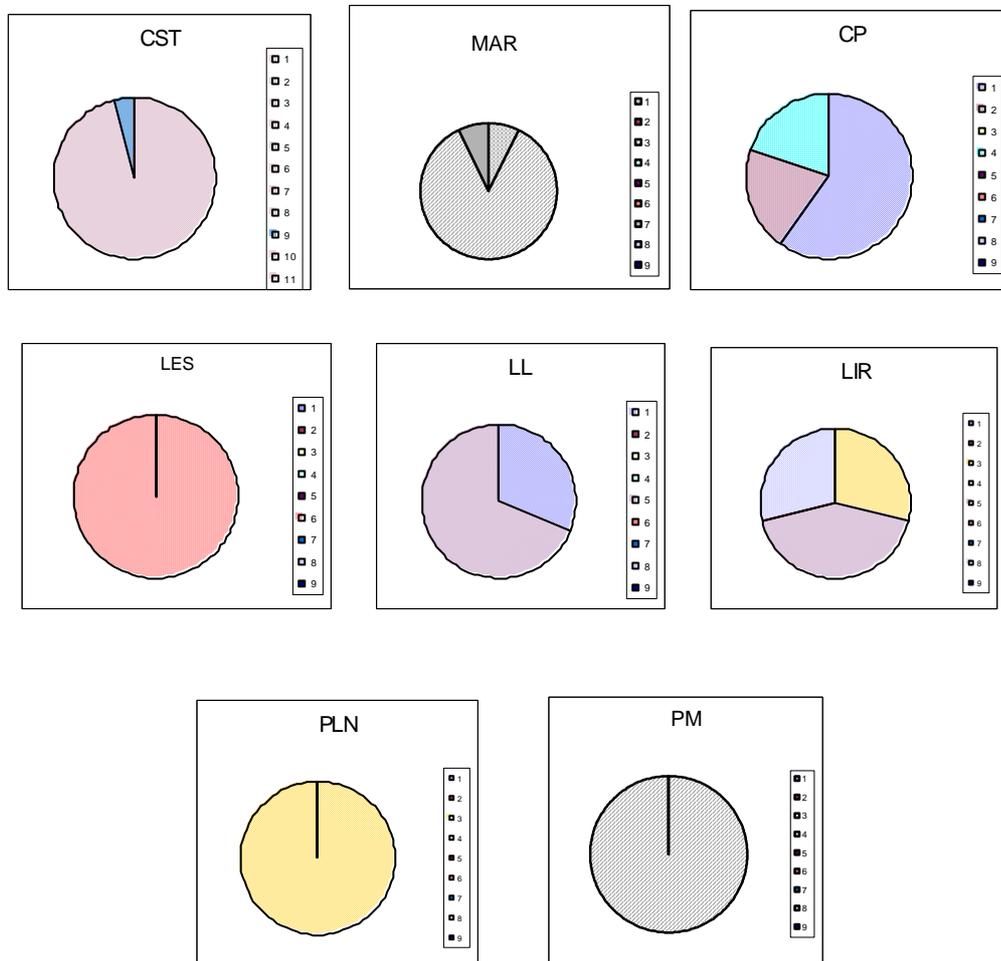


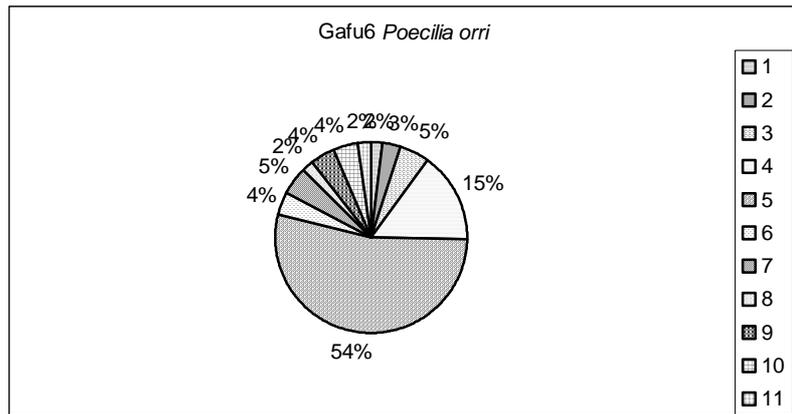
Figura 2b. Frecuencias alélicas en *Poecilia orri* para Gafu3 por localidad.



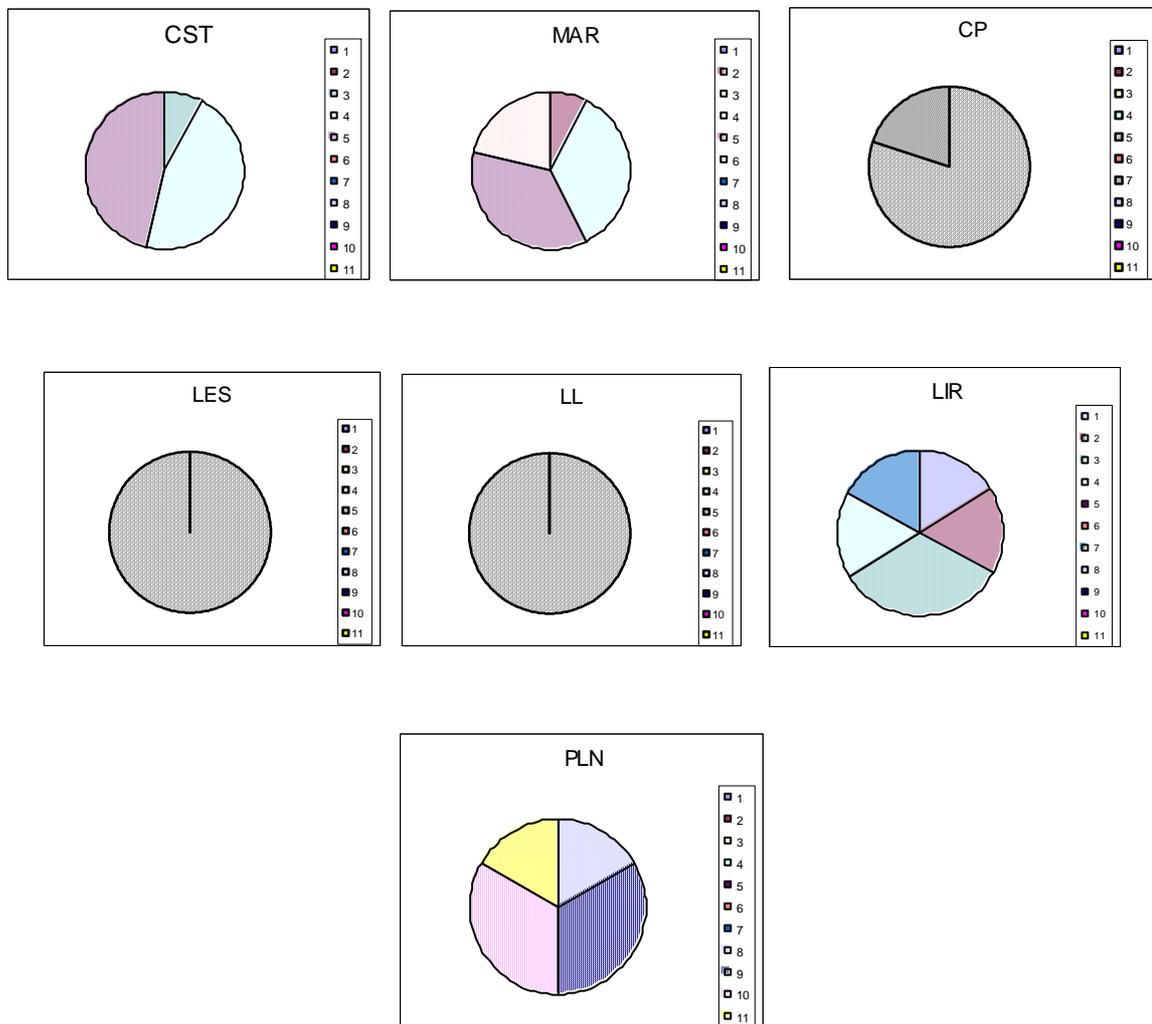
**Figura 2c.** Frecuencias alélicas en *Poecilia orri* para Gafu4 (9 alelos) en todas las localidades.



**Figura 2d.** Frecuencias alélicas en *Poecilia orri* para Gafu4 por localidad.



**Figura 2e.** Frecuencias alélicas en *Poecilia orri* para Gafu6 (11 alelos) en todas las localidades



**Figura 2f.** Frecuencias alélicas en *Poecilia orri* para Gafu6 por localidad.

Los resultados de la distribución de alelos en las diferentes localidades mostraron que dicha distribución es diferente a lo largo de las localidades. En Gafu3 se obtuvieron 19 comparaciones significativas ( $P < 0.05$ ), es decir, en el 68% de las comparaciones se rechaza la homogeneidad en la distribución alélica (Anexo VIa). Para Gafu4 en todos los casos menos en MAR-PM, los valores fueron significativos (96%,  $P < 0.05$ ), esto en las 27 comparaciones posibles ya que PLN y PM presentaron un único y mismo alelo. Finalmente, en Gafu6 el 63% de las comparaciones (17) tuvieron distribución alélica heterogénea (Anexo VIa).

Considerando todos los loci para cada par de localidades, sólo dos presentaron una distribución alélica homogénea: MAR-PM y CP-LL (Anexo VIb).

### 5.3 Frecuencias genotípicas

Para Gafu3 observamos 16 genotipos, siete de los cuales fueron heterocigos. El genotipo más abundante se encontró en cinco de las ocho localidades y en 30% de los 56 individuos analizados. En Gafu4 hubo nueve genotipos (solo uno heterocigo); dos genotipos se presentaron en el 46% y en 30% de los individuos, respectivamente. El más abundante de estos genotipos es el único genotipo en dos localidades (PLN y PM). Gafu6 presentó 10 genotipos (tres heterocigos), donde el más frecuente se encontró en seis localidades y en 47% de los individuos, siendo también el único en LES y LL (Cuadro 7).

En cuanto a la diferenciación genotípica para Gafu3, en 7 de las 28 comparaciones posibles, el 25% de los genotipos tuvieron una distribución heterogénea en los diferentes cuerpos de agua. En Gafu4, 16 pares de 27 (59%) y en Gafu6, 8 de 27 (29.6%) tuvieron una distribución heterogénea (Anexo VII). La prueba de  $\chi^2$  para los 3 loci en cada par de localidades mostró que 61% de las localidades tienen una distribución genotípica heterogénea. Las once comparaciones donde se acepta la hipótesis de homogeneidad fueron: LES-CP, LL-CST, LL-CP, LL-LES, LIR-LES, LIR-LL, PLN-LES, PM-MAR, PM-LES, PM-CST y MAR-CST.

**Cuadro 7.** Genotipos observados para *P. orri* con tres microsatélites.

|              |  | <b>Gafu3</b>     |          |          |          |          |          |          |          |           |          |          |          |          |          |          |          |           |
|--------------|--|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
|              |  | <b>Genotipos</b> |          |          |          |          |          |          |          |           |          |          |          |          |          |          |          |           |
|              |  | 210              | 212      | 218      | 230      | 220      | 222      | 224      | 226      | 232       | 224      | 234      | 220      | 224      | 236      | 250      | 254      | Total     |
| <b>Sitio</b> |  | 210              | 212      | 218      | 230      | 232      | 232      | 232      | 232      | 232       | 234      | 234      | 236      | 236      | 236      | 250      | 254      |           |
| CST          |  | 0                | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 9         | 0        | 1        | 0        | 0        | 3        | 0        | 0        | 13        |
| MAR          |  | 0                | 1        | 0        | 3        | 0        | 3        | 0        | 2        | 2         | 0        | 1        | 2        | 0        | 0        | 0        | 0        | 14        |
| CP           |  | 1                | 0        | 0        | 0        | 1        | 0        | 0        | 0        | 2         | 0        | 1        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 5         |
| LES          |  | 0                | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0         | 0        | 0        | 0        | 0        | 2        | 0        | 0        | 2         |
| LL           |  | 0                | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 3         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 3         |
| LIR          |  | 2                | 0        | 2        | 0        | 0        | 1        | 1        | 0        | 0         | 1        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 7         |
| PLN          |  | 0                | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 2        | 1        | 3         |
| PM           |  | 0                | 0        | 0        | 0        | 0        | 2        | 0        | 0        | 1         | 0        | 2        | 2        | 2        | 0        | 0        | 0        | 9         |
| <b>Total</b> |  | <b>3</b>         | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>1</b> | <b>6</b> | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>17</b> | <b>1</b> | <b>5</b> | <b>4</b> | <b>2</b> | <b>5</b> | <b>2</b> | <b>1</b> | <b>56</b> |

|              |  | <b>Gafu4</b>     |          |           |          |           |          |          |          |          |           |
|--------------|--|------------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
|              |  | <b>Genotipos</b> |          |           |          |           |          |          |          |          |           |
|              |  | 172              | 174      | 176       | 179      | 180       | 184      | 186      | 188      | 180      | Total     |
| <b>Sitio</b> |  | 172              | 174      | 176       | 179      | 180       | 184      | 186      | 188      | 190      |           |
| CST          |  | 0                | 0        | 0         | 0        | 12        | 0        | 0        | 0        | 1        | 13        |
| MAR          |  | 1                | 0        | 12        | 0        | 0         | 0        | 1        | 0        | 0        | 14        |
| CP           |  | 3                | 1        | 0         | 1        | 0         | 0        | 0        | 0        | 0        | 5         |
| LES          |  | 0                | 0        | 0         | 0        | 0         | 2        | 0        | 0        | 0        | 2         |
| LL           |  | 1                | 0        | 0         | 0        | 2         | 0        | 0        | 0        | 0        | 3         |
| LIR          |  | 0                | 0        | 2         | 0        | 3         | 0        | 0        | 2        | 0        | 7         |
| PLN          |  | 0                | 0        | 3         | 0        | 0         | 0        | 0        | 0        | 0        | 3         |
| PM           |  | 0                | 0        | 9         | 0        | 0         | 0        | 0        | 0        | 0        | 9         |
| <b>Total</b> |  | <b>5</b>         | <b>1</b> | <b>26</b> | <b>1</b> | <b>17</b> | <b>2</b> | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>1</b> | <b>56</b> |

|              |  | <b>Gafu6</b>     |          |          |           |           |          |          |          |          |          |           |
|--------------|--|------------------|----------|----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
|              |  | <b>Genotipos</b> |          |          |           |           |          |          |          |          |          |           |
|              |  | 162              | 164      | 166      | 168       | 170       | 172      | 174      | 184      | 186      | 186      | Total     |
| <b>Sitio</b> |  | 162              | 164      | 166      | 168       | 170       | 172      | 174      | 192      | 192      | 194      |           |
| CST          |  | 0                | 0        | 1        | 6         | 6         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 13        |
| MAR          |  | 0                | 1        | 0        | 5         | 5         | 3        | 0        | 0        | 0        | 0        | 14        |
| CP           |  | 0                | 0        | 0        | 0         | 4         | 0        | 1        | 0        | 0        | 0        | 5         |
| LES          |  | 0                | 0        | 0        | 0         | 2         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 2         |
| LL           |  | 0                | 0        | 0        | 0         | 3         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 3         |
| LIR          |  | 1                | 1        | 2        | 1         | 0         | 0        | 1        | 0        | 0        | 0        | 6         |
| PLN          |  | 0                | 0        | 0        | 0         | 0         | 0        | 0        | 1        | 1        | 1        | 3         |
| PM           |  | 0                | 0        | 0        | 2         | 6         | 1        | 0        | 0        | 0        | 0        | 9         |
| <b>Total</b> |  | <b>1</b>         | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>14</b> | <b>26</b> | <b>4</b> | <b>2</b> | <b>1</b> | <b>1</b> | <b>1</b> | <b>55</b> |

#### 5.4 Heterocigosidad

La heterocigosidad observada para cada locus por localidad varió de 0 en LL a 0.333 en PLN (Cuadro 8), mientras que la heterocigosidad promedio para todas las localidades fue de 0.125. En general, la heterocigosidad esperada fue marcadamente mayor a la observada, con excepción de PLN. El número efectivo de alelos por localidad varió de 1.0 a 4.14.

**Cuadro 8.** Valores de variabilidad genética para *P. orri* con el promedio de los tres loci por localidad.

| Sitio                  | N  | e*     | P (%) | Het es | Het obs | He*    |
|------------------------|----|--------|-------|--------|---------|--------|
| <b>CST</b>             |    |        |       |        |         |        |
|                        | 13 |        | 100   |        |         |        |
| Media                  |    | 1.7507 |       | 0.3826 | 0.0256  | 0.3679 |
| D.S.                   |    | 0.6244 |       | 0.2704 | 0.0444  | 0.2600 |
| <b>MAR</b>             |    |        |       |        |         |        |
|                        | 14 |        | 100   |        |         |        |
| Media                  |    | 3.3263 |       | 0.6093 | 0.1667  | 0.5876 |
| D.S.                   |    | 2.0144 |       | 0.3050 | 0.2887  | 0.2941 |
| <b>CP</b>              |    |        |       |        |         |        |
|                        | 5  |        | 100   |        |         |        |
| Media                  |    | 2.2282 |       | 0.5704 | 0.0667  | 0.5133 |
| D.S.                   |    | 0.7363 |       | 0.1942 | 0.1155  | 0.1747 |
| <b>LES<sup>1</sup></b> |    |        |       |        |         |        |
|                        | 2  |        | 0     |        |         |        |
| Media                  |    | 1.0    |       |        |         |        |
| <b>LL</b>              |    |        |       |        |         |        |
|                        | 3  |        | 33.3  |        |         |        |
| Media                  |    | 1.2667 |       | 0.1778 | 0.000   | 0.1481 |
| D.S.                   |    | 0.4619 |       | 0.3079 | 0.000   | 0.2566 |
| <b>LIR</b>             |    |        |       |        |         |        |
|                        | 7  |        | 100   |        |         |        |
| Media                  |    | 4.1444 |       | 0.8140 | 0.1429  | 0.7525 |
| D.S.                   |    | 0.7647 |       | 0.0578 | 0.2474  | 0.0509 |
| <b>PLN</b>             |    |        |       |        |         |        |
|                        | 3  |        | 66.7  |        |         |        |
| Media                  |    | 2.1333 |       | 0.4667 | 0.3333  | 0.3889 |
| D.S.                   |    | 1.3317 |       | 0.4372 | 0.5774  | 0.3643 |
| <b>PM</b>              |    |        |       |        |         |        |
|                        | 9  |        | 66.7  |        |         |        |
| Media                  |    | 2.7919 |       | 0.4619 | 0.2222  | 0.4362 |
| D.S.                   |    | 2.3108 |       | 0.4346 | 0.3849  | 0.4105 |
| <b>Total</b>           |    |        |       |        |         |        |
|                        | 56 |        | 66.7  |        |         |        |
| Media                  |    | 3.8048 |       | 0.7316 | 0.1253  | 0.7250 |
| D.S.                   |    | 1.0475 |       | 0.0668 | 0.1555  | 0.0662 |

<sup>1</sup> un solo alelo

N= tamaño de la muestra, e\*= número efectivo de alelos (Kimura y Crow, 1964), P=porcentaje de loci porlimórficos, *Hom ob* = homocigosidad observada, *Het obs* = heterocigosidad observada, *Hom es* = homocigosidad esperada, *Het es* = heterocigosidad esperada; *He\** = heterocigosidad esperada de Nei (Nei, 1973). D.S. = desviación estándar.

## 5.5 Estructura genética y diferenciación entre poblaciones

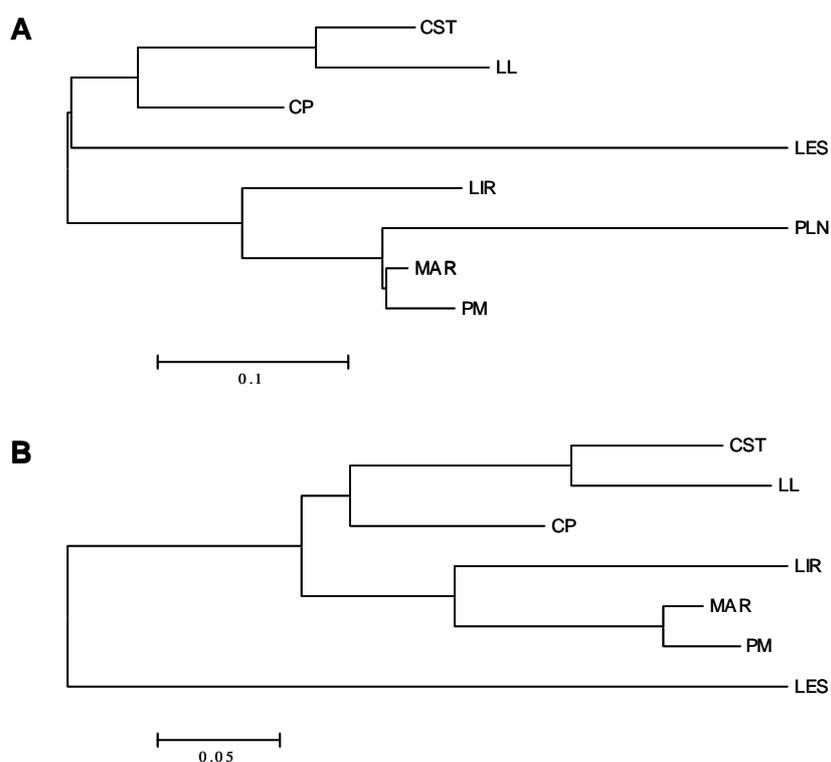
Los resultados de distancia genética de Nei mostraron que las poblaciones con valores más altos de distancia entre sí fueron en su mayoría comparaciones con PLN, así como LES-MAR y LES-LL (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Distancia genética mínima  $D_m$  (Nei, 1973) entre todas las localidades para *P. orri* (arriba de la diagonal). Distancia geográfica (km) (abajo de la diagonal).

|     | CST          | MAR          | CP           | LES          | LL           | LIR          | PLN    | PM    |
|-----|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------|-------|
| CST | 0            | 33.63        | 12.45        | 22.46        | 9.4          | 21.16        | 112.36 | 33.68 |
| MAR | <b>0.331</b> | 0            | 21.30        | 55.63        | 42.56        | 12.47        | 145.92 | 0.07  |
| CP  | <b>0.316</b> | <b>0.279</b> | 0            | 34.82        | 21.68        | 8.96         | 124.8  | 21.35 |
| LES | <b>0.585</b> | 0.563        | 0.477        | 0            | 13.14        | 43.21        | 90.4   | 55.68 |
| LL  | 0.144        | <b>0.398</b> | 0.169        | <b>0.593</b> | 0            | 30.11        | 103.38 | 42.61 |
| LIR | <b>0.240</b> | <b>0.212</b> | <b>0.315</b> | <b>0.631</b> | <b>0.414</b> | 0            | 133.45 | 12.52 |
| PLN | <b>0.622</b> | 0.226        | 0.549        | <b>0.806</b> | <b>0.731</b> | 0.341        | 0      | 146   |
| PM  | <b>0.387</b> | 0.048        | <b>0.292</b> | <b>0.486</b> | <b>0.412</b> | <b>0.281</b> | 0.254  | 0     |

Se resaltan en negritas los valores significativos ( $P < 0.05$ ).

En el árbol de neighbor-joining (Fig. 3 B) se observa la formación de dos grupos, uno con las tres localidades más cercanas a la costa (MAR, PM, LIR), otro con las tres localidades más adentradas en el continente (CP, CST y LL), y LES como una entidad totalmente distante del resto. En el segundo árbol se construyó sin PLN, dado que queríamos evaluar también cómo se agrupaban las localidades que están dentro de la reserva, y PLN se encuentra fuera de la misma.



**Figura 3.** Árbol construido con Neighbor-joining para *P. orri* A) para todas las localidades de estudio y B) sin Plan de la Noria.

Los valores de  $R_{ST}$  fueron en general muy altos (0.457 en promedio) y altamente significativos, lo cual implica una alta estructuración genética de las poblaciones, y que están genéticamente diferenciadas. La excepción la observamos entre las localidades de PM-LL y PM-MAR (Cuadro 10).

En cuanto a la significancia de los valores de  $R_{ST}$ , el programa Arlequín obtiene la distribución nula de valores de  $R_{ST}$  pareados bajo el supuesto de no diferenciación entre las poblaciones, al permutar haplotipos entre las mismas. El valor de  $P$  de la prueba es la proporción de permutaciones que conducen a un valor de  $R_{ST}$  mayor o igual al observado. De este modo se determina qué valores son significativos.

**Cuadro 10.** Estimación de la diferenciación ( $R_{ST}$ ) entre todos los pares de localidades.

| A)  | CST           | MAR           | CP            | LES           | LL      | LIR           | PLN           |
|-----|---------------|---------------|---------------|---------------|---------|---------------|---------------|
| CST |               |               |               |               |         |               |               |
| MAR | <b>0.3662</b> |               |               |               |         |               |               |
| CP  | <b>0.5480</b> | 0.0152        |               |               |         |               |               |
| LES | <b>0.5974</b> | 0.5157        | 0.5055        |               |         |               |               |
| LL  | <b>0.3412</b> | 0.0564        | 0.1217        | 0.7241        |         |               |               |
| LIR | <b>0.2132</b> | <b>0.2011</b> | 0.0930        | 0.0030        | 0.0404  |               |               |
| PLN | <b>0.9739</b> | <b>0.9025</b> | <b>0.8588</b> | 0.9606        | 0.9498  | 0.3098        |               |
| PM  | <b>0.4069</b> | -0.0082       | 0.0508        | <b>0.5822</b> | -0.0242 | <b>0.1581</b> | <b>0.9225</b> |

Se resaltan en negritas los valores significativos ( $P < 0.05$ ).

Se observó que el número de migrantes entre poblaciones varió entre valores extremos (0.01 y 166), siendo la media 9.6 y en la mayoría de los casos valores menores que 1 (Cuadro 11).

**Cuadro 11.** Número de migrantes  $M_R$  ( $M=2Nm$  para organismos diploides) entre las localidades de *P. orri*.

|     | CST    | MAR    | CP     | LES    | LL     | LIR    | PLN    |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| CST |        |        |        |        |        |        |        |
| MAR | 0.8653 |        |        |        |        |        |        |
| CP  | 0.4125 | 32.330 |        |        |        |        |        |
| LES | 0.3370 | 0.4695 | 0.4891 |        |        |        |        |
| LL  | 0.9655 | 8.3642 | 3.6091 | 0.1904 |        |        |        |
| LIR | 1.8450 | 1.9860 | 4.8733 | 166.01 | 11.862 |        |        |
| PLN | 0.0134 | 0.0540 | 0.0822 | 0.0205 | 0.0264 | 1.1137 |        |
| PM  | 0.7289 | NP     | 9.3330 | 0.3588 | NP     | 2.6824 | 0.0420 |

NP= no se puede calcular; los valores que no pudieron calcularse resultan al estimar al número de migrantes a partir de un valor de  $R_{ST}$  negativo

El análisis de varianza molecular (AMOVA) reveló que el mayor porcentaje (77%) del total de la diversidad es explicada por la variación dentro de las localidades (poblaciones), mientras que la diversidad entre las localidades sólo explica el 23% de la variación. Así, el índice de diferenciación entre localidades no fue significativo ( $F_{ST} = 0.226$ ,  $P = 0.129$ ; Cuadro 12).

**Cuadro 12.** Análisis molecular de varianza con base en la estimación de  $R_{ST}$ , para las ocho localidades estudiadas con *P. orri*.

| <b>Fuente de Variación</b> | <b>g.l.</b> | <b>Suma de cuadrados</b> | <b>Componentes de varianza</b> | <b>Porcentaje de variación</b> |
|----------------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| ENTRE localidades          | 7           | 17179.9                  | 147.31 Va                      | 22.60                          |
| DENTRO de localidades      | 104         | 52483.14                 | 504.64 Vb                      | 77.40                          |
| Total                      | 111         | 69633.07                 | 651.95                         |                                |
| Índice de fijación         |             | $F_{ST}$<br>0.2260       | $P$<br>0.129                   |                                |

La evaluación del aislamiento por distancia a través de la prueba de Mantel no fue significativa cuando se consideraron todas las localidades ( $r = 0.327$ ,  $P = 0.201$ ), pero sí lo fue cuando se evaluó sin considerar la localidad de PLN ( $r = 0.642$ ,  $P = 0.001$ ), es decir, en las localidades dentro de la reserva sí hubo correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica.

## *Gambusia yucatanana*

Para *Gambusia yucatanana* se analizaron 68 individuos en siete localidades (Fig. 1b): MAR (9), CP (23), Lago Exterior Norte (LEN, 13), LES (3), LIR (5), PM (9) y Selva Manglar Norte (SMN, 6)

### 5.6 Diversidad genética

Con la prueba de desviación del equilibrio de H-W se observó que para Gafu3, tres localidades (MAR, CP y LEN) mostraron desviaciones del equilibrio ( $P < 0.05$ ), para Gafu4 fueron cuatro (MAR, CP, LEN y PM) y respecto a Gafu7 sólo CP estuvo fuera del equilibrio. No fue posible calcularla en LES (Gafu3) y LEN (Gafu7), ya que presentaron un solo alelo (Cuadro 13).

Los valores de coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) con base en W&C variaron desde -0.333 hasta 1.0, mientras que con R&H de -0.375 a 1.0. Las localidades que presentaron valores negativos fueron LES, LIR y SMN (exceso de heterócigos para ambos índices); mientras que el resto de los valores fueron positivos, lo que indica una deficiencia de heterócigos.

Considerando los tres loci en conjunto y cada localidad de manera individual, con la prueba de  $\chi^2$ , LES y LIR estuvieron en equilibrio (la segunda después de la corrección de Bonferroni), y las demás localidades presentaron desviaciones significativas de H-W ( $P < 0.001$ ), por deficiencia de heterócigos (Cuadro 14).

**Cuadro 13.** Equilibrio de Hardy-Weinberg y coeficientes de endogamia ( $F_{IS}$ ) con los índices de W&C y R&H para cada locus por localidad para *G. yucatanana*. Se marcan en negritas los valores no significativos ( $P \geq 0.05$ ).

| Sitio      | Locus | P             | W&C    | R&H    | Sitio      | Locus | P             | W&C    | R&H   |
|------------|-------|---------------|--------|--------|------------|-------|---------------|--------|-------|
| <b>MAR</b> | Gafu3 | 0             | 0.714  | 0.574  | <b>LIR</b> | Gafu3 | <b>0.0396</b> | 0.556  | 0.5   |
|            | Gafu4 | 0.0013        | 0.698  | 0.653  |            | Gafu4 | <b>0.0226</b> | 0.294  | 0.125 |
|            | Gafu7 | <b>0.0843</b> | 0.245  | 0.116  |            | Gafu7 | <b>0.7392</b> | -0.103 | -0.1  |
| <b>CP</b>  | Gafu3 | 0             | 1      | 1      | <b>PM</b>  | Gafu3 | 0.0001        | 0.738  | 0.727 |
|            | Gafu4 | 0             | 0.839  | 0.654  |            | Gafu4 | 0.0002        | 0.833  | 0.7   |
|            | Gafu7 | 0.0038        | 0.401  | 0.401  |            | Gafu7 | <b>0.5446</b> | 0.086  | 0.001 |
| <b>LEN</b> | Gafu3 | 0             | 0.817  | 0.810  | <b>SMN</b> | Gafu3 | 0.0052        | 0.738  | 0.711 |
|            | Gafu4 | 0             | 0.567  | 0.453  |            | Gafu4 | <b>0.304</b>  | 0.429  | 0.1   |
|            | Gafu7 | ---           | ---    | ---    |            | Gafu7 | <b>1.0</b>    | -0.111 | -0.12 |
| <b>LES</b> | Gafu3 | ---           | ---    | ---    |            |       |               |        |       |
|            | Gafu4 | <b>0.2022</b> | 0.6    | 0.667  |            |       |               |        |       |
|            | Gafu7 | <b>1.0</b>    | -0.333 | -0.375 |            |       |               |        |       |

**Cuadro 14.** Prueba de chi-cuadrada ( $\chi^2$ ) del equilibrio de Hardy-Weinberg para todos los loci en las localidades estudiadas para *G. yucatanensis*.

| Localidad | $\chi^2$ | g.l. | P             |
|-----------|----------|------|---------------|
| MAR       | $\infty$ | 6    | *             |
| CP        | $\infty$ | 6    | *             |
| LEN       | $\infty$ | 4    | *             |
| LES       | 3.1974   | 4    | <b>0.5254</b> |
| LIR       | 14.645   | 6    | 0.0232        |
| PM        | 35.495   | 6    | 0.0001        |
| SMN       | 17.520   | 6    | 0.0075        |

\*= Altamente significativos ( $P < 0.0001$ );  $\infty$ : infinito

Respecto al análisis de desequilibrio de ligamiento, encontramos que del total de comparaciones posibles (21), sólo un par exhibió desequilibrio de ligamiento significativo ( $P = 0.026$ ): Gafu3 y Gafu4 en la localidad CP. Para LES la comparación no fue posible entre ningún par de loci, ni para LEN entre Gafu7-Gafu4 y Gafu7-Gafu3, ni para LIR Gafu7-Gafu3 y Gafu4-Gafu3 debido a que presentaron un solo alelo. Al considerar todas las localidades con una prueba de  $\chi^2$ , ningún par de loci mostró desequilibrio (Cuadro 15).

## 5.7 Frecuencias alélicas

Se observó un alto número de alelos por locus: 14 en Gafu3, 11 en Gafu4 y 5 en Gafu7 (Cuadro 16). El mayor número de alelos por locus para las diferentes localidades se observó en Gafu4 en CP y LEN con 8 alelos, mientras que LES (Gafu3) y LEN (Gafu7) presentaron un único alelo.

Respecto a cada locus, en Gafu3 los dos alelos más frecuentes (12% ambos) se presentaron en 6 y 5 localidades, uno de éstos como alelo único en LES. En cuanto a alelos exclusivos tenemos 1 en CP, 2 en LIR y 1 en PM (Fig. 4a, b). En Gafu4 se observaron 2 alelos con alta frecuencia presentes en las 7 localidades y 3 alelos exclusivos, 2 en CP y uno en LEN (Fig. 4c, d). Finalmente, para Gafu7 hubo un alelo que se distribuyó en las 7 localidades además de ser el único en LEN, y un alelo exclusivo presente en PM. De los alelos exclusivos observados para todos los loci, tenemos: 3 en CP, 2 en LIR, 1 en LEN y 1 en PM (Fig. 4e, f).

**Cuadro 15.** Desequilibrio de ligamiento en *G.yucatanana* para (A) cada locus y todas las localidades y (B) el total de la muestra.

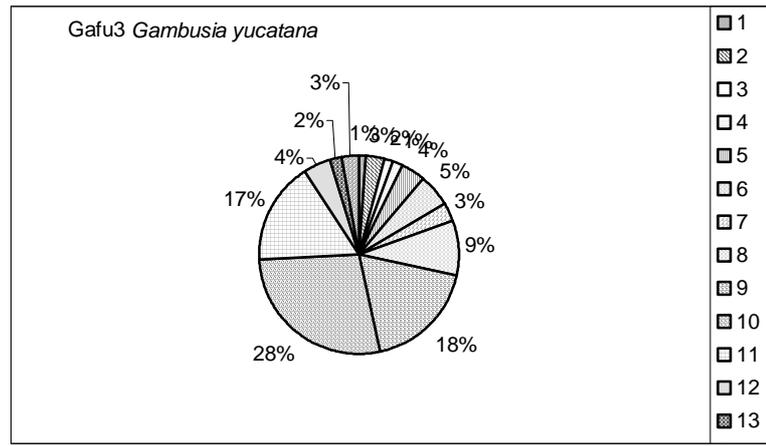
| <b>A)</b>          |                    |              |             |
|--------------------|--------------------|--------------|-------------|
| <b>Localidad</b>   | <b>Par de loci</b> | <b>P</b>     | <b>E.S.</b> |
| <b>MAR</b>         | Gafu7/Gafu4        | 0.780        | 0.006       |
|                    | Gafu7/Gafu3        | 0.701        | 0.014       |
|                    | Gafu4/Gafu3        | 0.157        | 0.012       |
| <b>LEN</b>         | Gafu7/Gafu4        | NP           |             |
|                    | Gafu7/Gafu3        | NP           |             |
|                    | Gafu4/Gafu3        | 1            | 0           |
| <b>LIR</b>         | Gafu7/Gafu4        | 0.200        | 0.004       |
|                    | Gafu7/Gafu3        | NP           |             |
|                    | Gafu4/Gafu3        | NP           |             |
| <b>SMN</b>         | Gafu7/Gafu4        | 0.065        | 0.001       |
|                    | Gafu7/Gafu3        | 0.201        | 0.003       |
|                    | Gafu4/Gafu3        | 0.206        | 0.006       |
| <b>CP</b>          | Gafu7/Gafu4        | 0.847        | 0.013       |
|                    | Gafu7/Gafu3        | 0.357        | 0.018       |
|                    | Gafu4/Gafu3        | <b>0.026</b> | 0.006       |
| <b>LES</b>         | Gafu7/Gafu4        | NP           |             |
|                    | Gafu7/Gafu3        | NP           |             |
|                    | Gafu4/Gafu3        | NP           |             |
| <b>PM</b>          | Gafu7/Gafu4        | 0.794        | 0.01        |
|                    | Gafu7/Gafu3        | 0.903        | 0.006       |
|                    | Gafu4/Gafu3        | 0.923        | 0.004       |
| <b>B)</b>          |                    |              |             |
| <b>Par de loci</b> | $\chi^2$           | <b>g.l.</b>  | <b>P</b>    |
| Gafu7/Gafu4        | 9.944              | 10           | 0.445       |
| Gafu7/Gafu3        | 6.169              | 8            | 0.628       |
| Gafu4/Gafu3        | 14.263             | 10           | 0.161       |

NP= No es posible calcularse

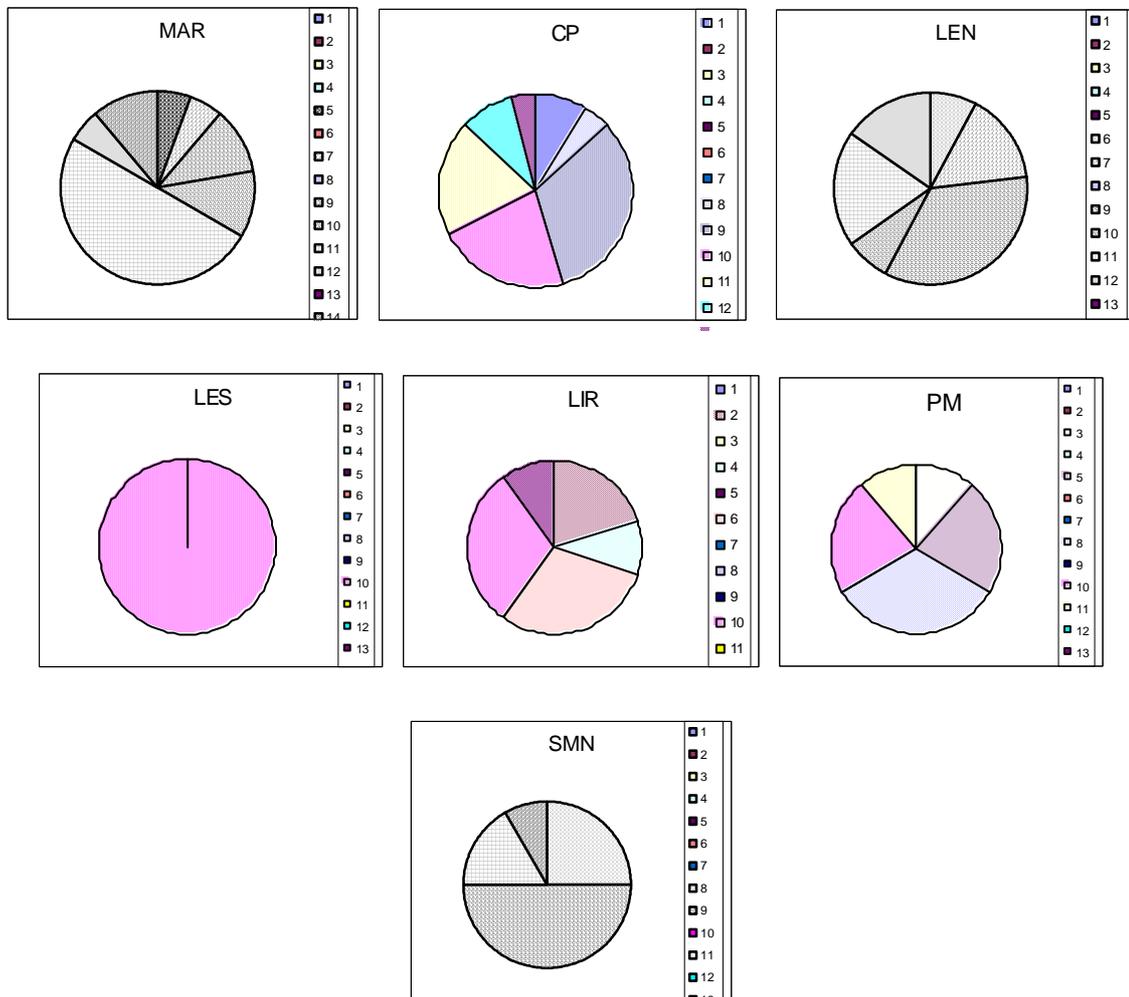
En negritas valores significativos ( $P < 0.05$ ).

**Cuadro 16.** Frecuencias alélicas para tres loci en las siete localidades estudiadas para *G. yucatanana*.

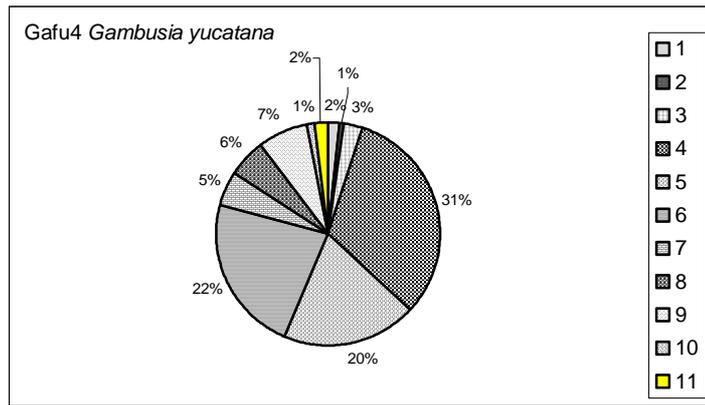
| Locus        | Localidad |       |       |       |       |       |       |
|--------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|              | MAR       | CP    | LEN   | LES   | LIR   | PM    | SMN   |
| <b>Gafu3</b> |           |       |       |       |       |       |       |
| alelo        |           |       |       |       |       |       |       |
| 1            |           | 0.087 |       |       |       |       |       |
| 2            |           |       |       |       | 0.200 |       |       |
| 3            |           |       |       |       |       | 0.111 |       |
| 4            |           |       |       |       | 0.100 |       |       |
| 5            | 0.056     |       |       |       |       | 0.222 |       |
| 6            |           |       | 0.076 |       | 0.300 |       |       |
| 7            | 0.056     |       | 0.153 |       |       |       |       |
| 8            |           |       | 0.043 |       |       | 0.333 | 0.250 |
| 9            | 0.111     | 0.326 | 0.346 |       |       |       | 0.500 |
| 10           | 0.111     | 0.217 | 0.076 | 1.00  |       | 0.222 |       |
| 11           | 0.500     | 0.195 | 0.192 |       | 0.300 | 0.111 | 0.166 |
| 12           | 0.056     | 0.087 | 0.153 |       |       |       |       |
| 13           |           | 0.043 |       |       | 0.100 |       |       |
| 14           | 0.111     |       |       |       |       |       | 0.083 |
| <b>Gafu4</b> |           |       |       |       |       |       |       |
| alelo        |           |       |       |       |       |       |       |
| 1            |           | 0.108 |       |       |       |       |       |
| 2            |           | 0.043 |       |       |       |       |       |
| 3            |           | 0.021 | 0.076 |       | 0.100 |       |       |
| 4            | 0.333     | 0.065 | 0.192 | 0.5   | 0.200 | 0.277 | 0.666 |
| 5            | 0.444     | 0.282 |       |       |       | 0.555 | 0.083 |
| 6            | 0.111     | 0.326 | 0.230 | 0.333 | 0.400 | 0.111 | 0.083 |
| 7            |           | 0.130 | 0.153 |       |       | 0.055 |       |
| 8            |           |       | 0.192 |       | 0.200 |       |       |
| 9            | 0.111     | 0.021 | 0.038 | 0.166 |       |       | 0.166 |
| 10           |           |       | 0.076 |       |       |       |       |
| 11           |           |       | 0.038 |       | 0.100 |       |       |
| <b>Gafu7</b> |           |       |       |       |       |       |       |
| alelo        |           |       |       |       |       |       |       |
| 1            | 0.111     | 0.087 |       |       | 0.100 | 0.055 |       |
| 2            | 0.444     | 0.739 | 1.00  | 0.666 | 0.500 | 0.722 | 0.833 |
| 3            | 0.277     | 0.152 |       |       | 0.200 | 0.111 |       |
| 4            | 0.166     | 0.021 |       | 0.333 | 0.200 | 0.055 | 0.166 |
| 5            |           |       |       |       |       | 0.055 |       |



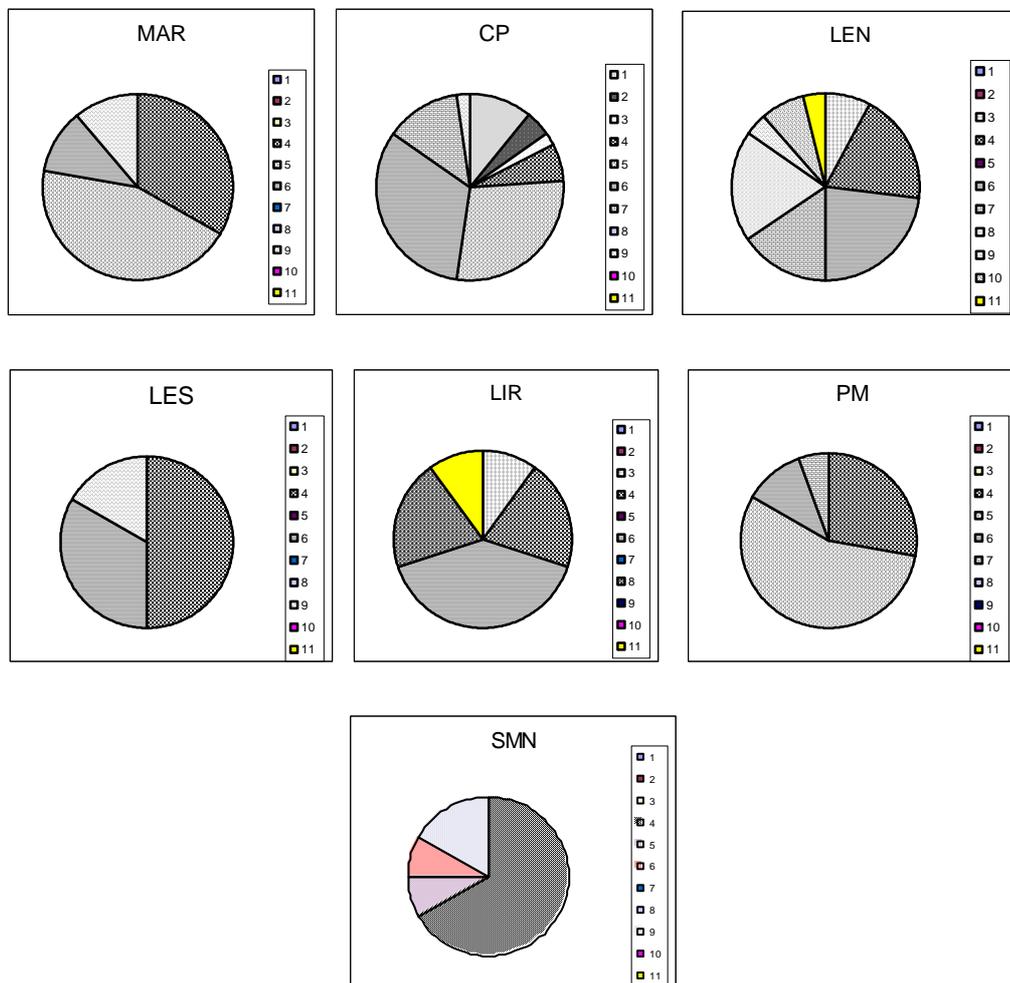
**Figura 4a.** Frecuencias alélicas en *Gambusia yucatanana* con Gafu3 (13 alelos) en todas las localidades.



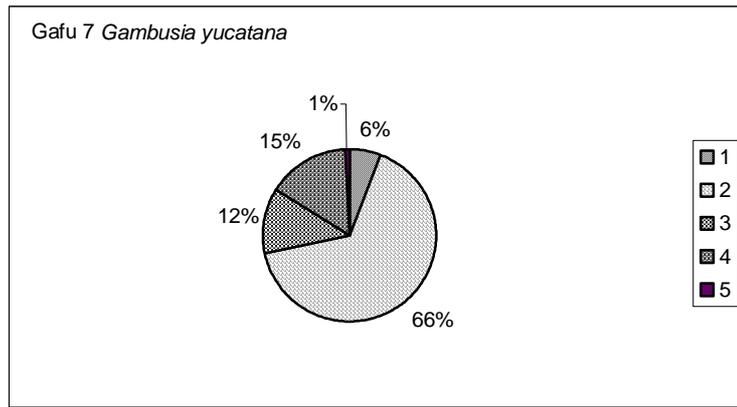
**Figura 4b.** Frecuencias alélicas en *Gambusia yucatanana* para Gafu3 por localidad.



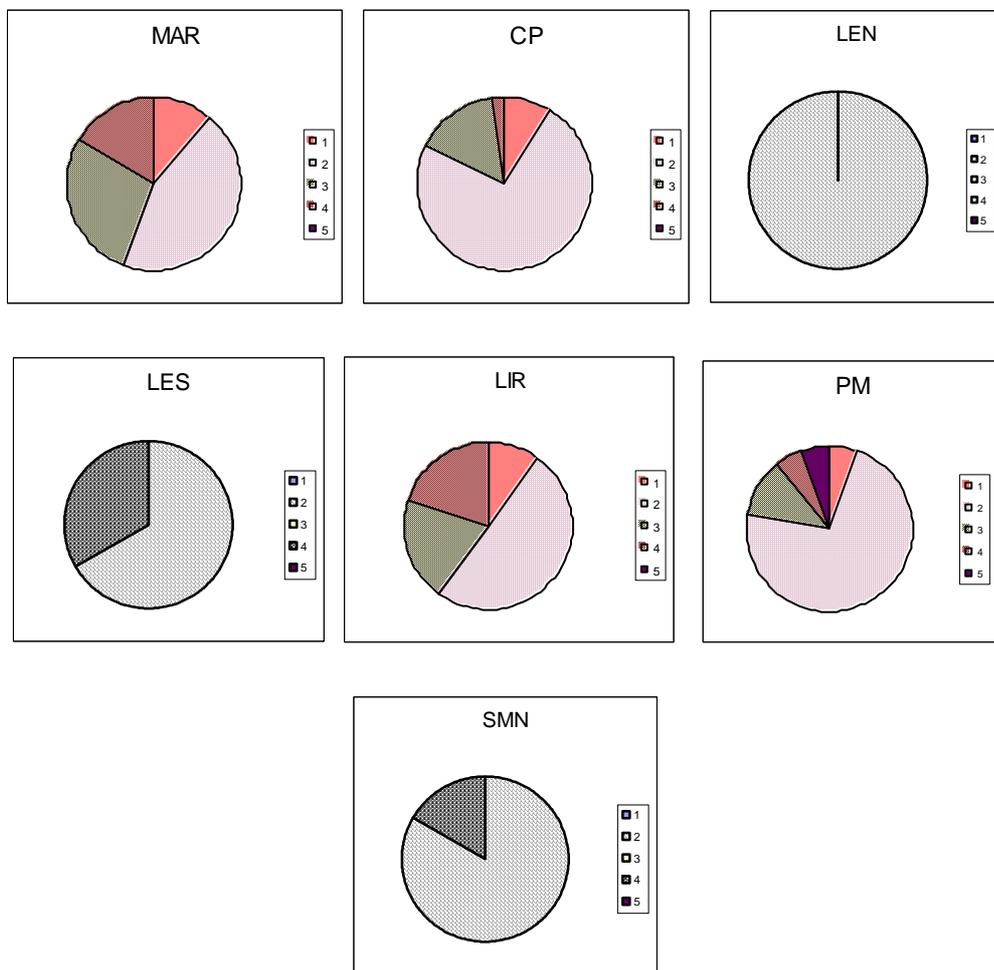
**Figura 4c.** Frecuencias alélicas en *Gambusia yucatanana* para Gafu4 (11 alelos) en todas las localidades.



**Figura 4d.** Frecuencias alélicas en *Gambusia yucatanana* para Gafu4 por localidad.



**Figura 4e.** Frecuencias alélicas en *Gambusia yucatanana* con Gafu7 (5 alelos) en todas las localidades.



**Figura 4f.** Frecuencias alélicas en *Gambusia yucatanana* para Gafu7 por localidad.

Los resultados de la diferenciación alélica mostraron que para Gafu3 (en las 21 comparaciones posibles), en todos los casos los valores fueron significativos ( $P < 0.05$ ), excepto en CP-SMN, por lo que se rechaza la hipótesis de homogeneidad de la distribución alélica (Anexo VIIIa). En Gafu4 se obtuvieron 13 comparaciones significativas ( $P < 0.05$ ), es decir, en el 62% se rechaza la homogeneidad en la distribución. Finalmente, en Gafu7 el 23.8% de las comparaciones tuvieron una distribución alélica heterogénea (Anexo VIIIa). Considerando todos los loci para cada par de localidades, se observó que ninguna comparación presenta una distribución alélica homogénea (Anexo VIIIb).

## 5.8 Frecuencias genotípicas

Gafu3 presentó 20 genotipos, nueve de los cuales fueron heterocigos y donde el más frecuente se encontró en cuatro de las siete localidades, y en el 22% de los individuos analizados. En Gafu4 hubo 19 genotipos, 11 de los cuales fueron heterocigos, el más abundante representado en el 22% de los individuos; el segundo más abundante (20.5%) se encontró en seis localidades. Para Gafu7 observamos ocho genotipos, el más abundante presente en las siete localidades y en 60.3 % de los 68 individuos analizados siendo también el único en LEN (Cuadro 17).

En cuanto a la diferenciación genotípica se obtuvieron valores altamente significativos (Anexo IX). Para Gafu3 y Gafu 7, en 20 de las 21 comparaciones posibles, los genotipos tuvieron una distribución heterogénea en las diferentes localidades. En Gafu4, 13 pares de localidades (61.9%) tuvieron una distribución heterogénea. La prueba de  $\chi^2$  para los 3 loci en cada par de localidades mostró que existe heterogeneidad en el total de las comparaciones (Anexo IX).

## 5.9 Heterocigosidad

La heterocigosidad observada para cada locus por localidad (donde se pudo medir por la existencia de más de un alelo) varió entre 0.6 (LIR) a 0.15 (CP). En general, la heterocigosidad esperada fue marcadamente mayor a la observada. El número efectivo de alelos por localidad varió de 3.8 a 1.7 (Cuadro 18).

**Cuadro 17.** Genotipos observados para *G. yucatanana* con tres microsatélites.

|              |   | <b>Gafu3</b>     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |              |     |   |  |  |
|--------------|---|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------------|-----|---|--|--|
|              |   | <b>Genotipos</b> |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |              |     |   |  |  |
|              |   | 210              | 216 | 218 | 228 | 230 | 232 | 234 | 230 | 236 | 238 | 228 | 230 | 240 | 232 | 242          | 226 |   |  |  |
|              |   | 210              | 216 | 228 | 228 | 230 | 232 | 234 | 236 | 236 | 238 | 240 | 240 | 240 | 242 | 242          | 244 |   |  |  |
|              |   | 236              | 240 | 234 | 246 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |              |     |   |  |  |
|              |   | 244              | 244 | 246 | 246 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |              |     |   |  |  |
| <b>Sitio</b> |   |                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | <b>Total</b> |     |   |  |  |
| MAR          | 0 | 0                | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 4   | 1   | 0            | 0   | 9 |  |  |
| 0            | 0 | 0                | 1   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |              |     |   |  |  |
| CP           | 2 | 0                | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 7   | 5   | 0   | 0   | 4   | 0   | 2   | 0            | 23  |   |  |  |
| 1            | 1 | 0                | 0   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |              |     |   |  |  |
| LEN          | 0 | 0                | 0   | 0   | 0   | 2   | 0   | 1   | 4   | 1   | 0   | 1   | 2   | 0   | 2   | 0            | 13  |   |  |  |
| 0            | 0 | 0                | 0   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |              |     |   |  |  |
| LES          | 0 | 0                | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 3   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0            | 3   |   |  |  |
| 0            | 0 | 0                | 0   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |              |     |   |  |  |
| LIR          | 0 | 1                | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1            | 5   |   |  |  |
| 0            | 0 | 0                | 0   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |              |     |   |  |  |
| PM           | 0 | 0                | 2   | 1   | 0   | 0   | 3   | 0   | 0   | 2   | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0            | 9   |   |  |  |
| 0            | 0 | 0                | 0   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |              |     |   |  |  |
| SMN          | 0 | 0                | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 3   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0            | 6   |   |  |  |
| 0            | 0 | 1                | 0   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |              |     |   |  |  |
| Total        | 2 | 1                | 2   | 1   | 1   | 2   | 5   | 1   | 15  | 12  | 1   | 2   | 13  | 1   | 4   | 1            | 68  |   |  |  |
| 1            | 1 | 1                | 1   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |              |     |   |  |  |

|              |   | <b>Gafu4</b>     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--------------|---|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|              |   | <b>Genotipos</b> |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|              |   | 176              | 180 | 188 | 176 | 190 | 192 | 188 | 194 | 190 | 196 | 190 | 198 | 190 | 192 | 194 | 194 | 196 | 188 | 196 | Tot |
|              |   | 176              | 180 | 188 | 190 | 190 | 192 | 194 | 194 | 196 | 196 | 198 | 198 | 200 | 200 | 200 | 202 | 202 | 204 | 204 |     |
| <b>Sitio</b> |   |                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| MAR          | 0 | 0                | 0   | 0   | 2   | 4   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 2   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 9   |
| CP           | 2 | 1                | 0   | 1   | 1   | 6   | 1   | 7   | 0   | 3   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 23  |
| LEN          | 0 | 0                | 1   | 0   | 2   | 0   | 0   | 2   | 0   | 1   | 1   | 2   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 13  |     |
| LES          | 0 | 0                | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 3   |     |
| LIR          | 0 | 0                | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 2   | 0   | 0   | 2   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 5   |     |
| PM           | 0 | 0                | 0   | 0   | 2   | 5   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 9   |     |
| SMN          | 0 | 0                | 0   | 0   | 4   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 6   |     |
| Total        | 2 | 1                | 1   | 1   | 12  | 15  | 1   | 14  | 1   | 4   | 3   | 2   | 3   | 2   | 2   | 1   | 1   | 1   | 1   | 68  |     |

|              |   | <b>Gafu7</b>     |     |     |     |     |     |     |     |       |
|--------------|---|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
|              |   | <b>Genotipos</b> |     |     |     |     |     |     |     |       |
|              |   | 158              | 160 | 158 | 160 | 162 | 160 | 162 | 160 | Total |
| <b>Sitio</b> |   | 158              | 160 | 162 | 162 | 162 | 164 | 164 | 166 |       |
| MAR          | 0 | 3                | 2   | 0   | 1   | 2   | 1   | 0   |     | 9     |
| CP           | 2 | 14               | 0   | 5   | 1   | 1   | 0   | 0   |     | 23    |
| LEN          | 0 | 13               | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |     | 13    |
| LES          | 0 | 1                | 0   | 0   | 0   | 2   | 0   | 0   |     | 3     |
| LIR          | 0 | 1                | 1   | 1   | 0   | 2   | 0   | 0   |     | 5     |
| PM           | 0 | 5                | 1   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   |     | 9     |
| SMN          | 0 | 4                | 0   | 0   | 0   | 2   | 0   | 0   |     | 6     |
| Total        | 2 | 41               | 4   | 7   | 2   | 10  | 1   | 1   |     | 68    |

**Cuadro 18.** Valores de variabilidad genética con el promedio de los tres loci por localidad para *G. yucatanana*.

| Sitio        | N  | e*     | P (%) | Het es | Het obs | He*    |
|--------------|----|--------|-------|--------|---------|--------|
| <b>MAR</b>   |    |        |       |        |         |        |
|              | 9  |        | 100   |        |         |        |
| Media        |    | 3.183  |       | 0.7255 | 0.3333  | 0.6852 |
| D.S.         |    | 0.187  |       | 0.0196 | 0.1925  | 0.0185 |
| <b>CP</b>    |    |        |       |        |         |        |
|              | 23 |        | 100   |        |         |        |
| Media        |    | 3.659  |       | 0.6779 | 0.1594  | 0.6632 |
| D.S.         |    | 1.673  |       | 0.2132 | 0.0905  | 0.2085 |
| <b>LEN</b>   |    |        |       |        |         |        |
|              | 13 |        | 66.67 |        |         |        |
| Media        |    | 3.888  |       | 0.5610 | 0.1795  | 0.5394 |
| D.S.         |    | 2.598  |       | 0.4866 | 0.1936  | 0.4679 |
| <b>LES</b>   |    |        |       |        |         |        |
|              | 3  |        | 66.67 |        |         |        |
| Media        |    | 1.790  |       | 0.4222 | 0.3333  | 0.3519 |
| D.S.         |    | 0.785  |       | 0.3791 | 0.3333  | 0.3159 |
| <b>LIR</b>   |    |        |       |        |         |        |
|              | 5  |        | 100   |        |         |        |
| Media        |    | 3.651  |       | 0.8000 | 0.6000  | 0.7200 |
| D.S.         |    | 0.635  |       | 0.0588 | 0.2000  | 0.0529 |
| <b>PM</b>    |    |        |       |        |         |        |
|              | 9  |        | 100   |        |         |        |
| Media        |    | 2.865  |       | 0.6427 | 0.2593  | 0.6070 |
| D.S.         |    | 1.253  |       | 0.1636 | 0.1697  | 0.1545 |
| <b>SMN</b>   |    |        |       |        |         |        |
|              | 6  |        | 100   |        |         |        |
| Media        |    | 2.107  |       | 0.5253 | 0.2778  | 0.4815 |
| D.S.         |    | 0.749  |       | 0.2068 | 0.0962  | 0.1896 |
| <b>Total</b> |    |        |       |        |         |        |
|              | 68 |        | 100   |        |         |        |
| Media        |    | 4.6204 |       | 0.7059 | 0.2500  | 0.7007 |
| D.S.         |    | 2.2504 |       | 0.2319 | 0.0882  | 0.2302 |

N= tamaño de la muestra, e\*= número efectivo de alelos (Kimura y Crow, 1964), P = porcentaje de loci porlímórficos, Hom es = Homocigosidad esperada, Hom obs = Homocigosidad observada, Het es = Heterocigosidad esperada, Het obs = Heterocigosidad observada, He\* = Heterocigosidad esperada de Nei (Nei, 1973). D.S. = desviación estándar.

## 5.10 Estructura genética y diferenciación entre poblaciones

Los resultados de distancia genética de Nei mostraron que las poblaciones con valores mayores de distancia entre sí fueron SMN-LES (0.250) y LES-MAR (0.253), mientras que las menos distantes fueron LEN-SMN (0.092), a pesar de ser éstas geográficamente muy distantes (Cuadro 19).

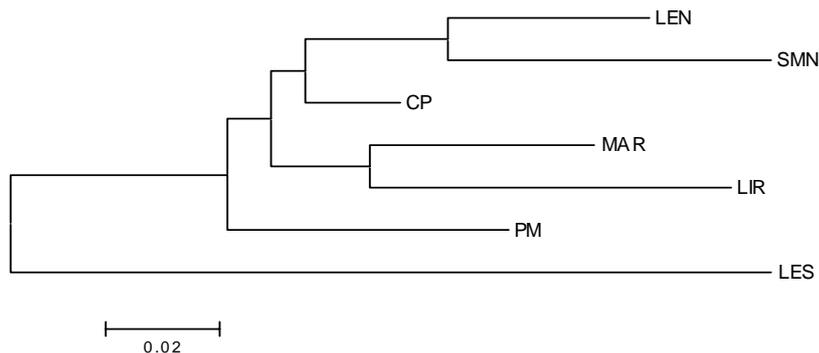
**Cuadro 19.** Distancia genética mínima  $D_m$  (Nei, 1973) entre todas las localidades para *G. yucatanana* (abajo de la diagonal).

Distancias geográficas (en km) (arriba de la diagonal).

|     | MAR          | CP           | LEN          | LES          | LIR          | PM    | SMN   |
|-----|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|-------|
| MAR | 0            | 34.82        | 56.54        | 55.68        | 12.52        | 0.1   | 7.45  |
| CP  | 0.081        | 0            | 35.98        | 34.82        | 8.96         | 21.35 | 13.97 |
| LEN | <b>0.155</b> | 0.055        | 0            | 1.26         | 44.40        | 56.54 | 49.77 |
| LES | 0.253        | <b>0.205</b> | <b>0.247</b> | 0            | 43.21        | 55.68 | 48.58 |
| LIR | 0.103        | 0.101        | 0.116        | 0.253        | 0            | 12.52 | 5.47  |
| PM  | 0.083        | 0.078        | <b>0.144</b> | 0.221        | <b>0.159</b> | 0     | 7.45  |
| SMN | 0.139        | 0.120        | 0.092        | <b>0.250</b> | 0.177        | 0.138 | 0     |

Se resaltan en negritas los valores significativos ( $P < 0.05$ )

Esto puede verse más claro en el árbol de Neighbor-joining, donde observamos que no hay relación entre las distancias genéticas y geográficas (Fig. 5).



**Figura 5.** Árbol construido con Neighbor-joining para *G. yucatanana* para todas las localidades de estudio.

Los valores de  $R_{ST}$  fueron en general bajos (0.12 en promedio) y sólo tres altamente significativos, lo cual implica que hay poca estructuración genética de las poblaciones (Cuadro 20).

**Cuadro 20.** Estimación de diferenciación ( $R_{ST}$ ) para *G. yucatanana* entre todos los pares de localidades. Se resaltan en negritas los valores significativos ( $P < 0.05$ ).

|     | MAR           | CP      | LEN           | LES     | LIR     | PM     |
|-----|---------------|---------|---------------|---------|---------|--------|
| MAR |               |         |               |         |         |        |
| CP  | 0.0373        |         |               |         |         |        |
| LEN | 0.1327        | 0.0767  |               |         |         |        |
| LES | -0.0940       | -0.0423 | 0.0192        |         |         |        |
| LIR | <b>0.3027</b> | 0.0810  | 0.1756        | 0.1255  |         |        |
| PM  | <b>0.3259</b> | 0.0250  | <b>0.2417</b> | 0.2105  | -0.0259 |        |
| SMN | 0.0001        | -0.0354 | 0.0729        | -0.0922 | 0.1500  | 0.1523 |

Se observó que el número de migrantes entre localidades osciló entre valores extremos (3845 y 1), sin embargo, todos fueron mayores que 1, lo que indica flujo génico para esta especie entre localidades (Cuadro 21).

**Cuadro 21.** Número de migrantes  $M_R$  ( $M=2Nm$  para organismo diploides) entre localidades para *G. yucatanana*.

|     | MAR    | CP    | LEN    | LES   | LIR   | PM    |
|-----|--------|-------|--------|-------|-------|-------|
| MAR |        |       |        |       |       |       |
| CP  | 12.91  |       |        |       |       |       |
| LEN | 3.26   | 6.014 |        |       |       |       |
| LES | NP     | NP    | 25.487 |       |       |       |
| LIR | 1.151  | 5.671 | 2.348  | 3.482 |       |       |
| PM  | 1.034  | 19.46 | 1.568  | 1.874 | NP    |       |
| SMN | 3845.9 | NP    | 6.538  | NP    | 2.832 | 2.782 |

NP: no se puede calcular; los valores que no pudieron calcularse resultan al estimar el número de migrantes a partir de un valor de  $R_{ST}$  negativo.

El AMOVA mostró que casi el 100% de la diversidad está explicada por la variación dentro de las localidades (92%). El índice de diferenciación entre localidades no fue significativo ( $F_{ST} = 0.078$ ,  $P = 0.156$ ; Cuadro 22).

**Cuadro 22.** Análisis molecular de varianza con base en la estimación de  $R_{ST}$  para las siete localidades estudiadas con *G. yucatanana*.

| <b>Fuente de Variación</b> | <b>g.l.</b> | <b>Suma de cuadrados</b> | <b>Componentes de varianza</b> | <b>Porcentaje de variación</b> |
|----------------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| ENTRE localidades          | 6           | 1032.26                  | 5.76 Va                        | 7.85 $F_{ST}$                  |
| DENTRO de localidades      | 129         | 8726.71                  | 67.65 Vb                       | 92.15                          |
| Total                      | 135         | 9758.97                  | 73.41                          |                                |
| Indíces de fijación        |             | $F_{ST}$<br>0.0785       | $P$<br>0.156                   |                                |

Los resultados de la prueba de Mantel no fueron significativos, por lo tanto no hay correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica ( $r = 0.027$ ,  $P = 0.187$ ) para las poblaciones de *G. yucatanana*.

## 6. Discusión y conclusiones

Para *Poecilia orri*, sólo la población de una localidad mostró equilibrio de H-W, mientras que el resto presentó desviaciones con deficiencia de heterócigos. Esto puede estar relacionado con la marcada estacionalidad de los cuerpos de agua, lo que implica la intermitente reducción de las poblaciones durante la estación seca, cuando el nivel de agua baja considerablemente (o en su totalidad en algunos humedales como SMN), así como una rápida expansión en la época de lluvias. Además, es importante considerar que el estudio se realizó con individuos que provenían de cuatro colectas que se hicieron a lo largo de dos años (Zambrano *et al.*, en revisión); dado que el tiempo de vida de estas especies es de alrededor de un año, lo más probable es que tuviéramos individuos de al menos dos generaciones diferentes, lo cual tiene como efecto aumentar los índices de endogamia y que se reporte deficiencia de heterócigos al mezclar individuos de diferentes subgrupos (efecto Walhund). Cabe mencionar, por otro lado, que ninguno de los loci presentó ligamiento.

En términos de diversidad genética, todas las localidades presentaron valores considerables en cuanto a número de alelos y porcentaje de polimorfismo ( $A = 11.3$  y  $P = 70\%$  en promedio). El sitio con mayor número de alelos raros (6 de los 17 encontrados en todas las localidades) fue PLN, que también es la localidad más alejada geográficamente. Además de estos alelos raros, PLN tiene un alelo fijo que comparte con LIR y MAR, lo que puede ser indicio de un alelo ancestral compartido por la población que dio origen a los demos que actualmente se encuentran totalmente separados geográficamente o, en su defecto, a una adquisición paralela de este alelo (por mutación). Las localidades LES y LL presentaron alelos fijos (presencia de un único alelo). Curiosamente estas son las localidades de mayores dimensiones y, probablemente, con mayor aislamiento geográfico, aunque tampoco podemos afirmarlo dado que el tamaño de muestra en esas localidades es muy pequeña.

En relación con la diferenciación alélica en *P. orri* encontramos que, en conjunto, sólo dos pares de poblaciones tienen una distribución alélica homogénea y son MAR-PM (sitios muy cercanos geográficamente) y CP-LL. Asimismo, la diferenciación genotípica no es muy marcada, lo cual parece indicar que a pesar de existir variación, ésta está distribuída de manera más o menos homogénea a lo largo de las diferentes localidades muestreadas. La heterocigosidad observada promedio fue de 0.125, la cual es significativamente menor que la esperada y baja en comparación con el promedio reportado para peces de agua dulce ( $H = 0.54$ ) (DeWoody y Avise, 2001). Esto sugiere nuevamente, considerando el número de alelos y los niveles de polimorfismo encontrados, que las poblaciones en los cuerpos de agua mantienen cierto grado de diversidad genética, así como diferenciación, aunque con un nivel alto de endogamia (exceso de homócigos), lo que se refleja en los bajos niveles de heterocigosidad, lo cual puede estar relacionado con la dinámica de reducción-expansión de las poblaciones (Zambrano *et al.*, en revisión). Por otro lado, el sistema de apareamiento de estas especies (paternidad múltiple,

superfetación; Meffe y Snelson, 1989) seguramente permite mantener ciertos niveles de variación, pero al estar sometidas las poblaciones a constantes cuellos de botella durante la temporada seca, los niveles de variación disminuyen y los individuos pueden estar cada vez más emparentados.

Se observaron valores altos y significativos de distancia genética entre localidades en la mayoría de los casos, principalmente en LES, LL, PLN y CST, que son los cuatro cenotes (cuerpos de agua permanentes). LES, LL y PLN son también las localidades más separadas geográficamente; mientras que en CST, *P. orri* es la única especie presente. Estos resultados sugieren que efectivamente los cenotes estudiados en Sian Ka'an están aislados, sin comunicación subterránea como sucede frecuentemente en los cenotes de la península de Yucatán (Schimmetter-Soto et al., 2002).

Los valores de diferenciación ( $R_{ST}$ ) para las poblaciones de *P. orri* fueron altos (0.457 en promedio), lo mismo que el número de migrantes donde el intervalo observado es muy amplio. Sin embargo, encontramos valores mucho menores que en el caso de *G. yucatanana*. Se observó también que en todos los casos el número de migrantes entre LIR y las demás localidades fueron valores mayores que 1. Esto es interesante ya que LIR es un humedal temporal, además el de mayores dimensiones (Zambrano et al., en revisión), que al inundarse puede comunicarse con los otros humedales cercanos (MAR, PM, SMN y CP), por lo que se entendería el movimiento de individuos entre localidades; sin embargo, el contacto de LIR con los cenotes permanentes (LL, LES), se explicaría si (1) hubiera comunicación subterránea entre estos cuerpos de agua, o (2) que la poca diferenciación ( $R_{ST}$ ) y consecuente estimación alta de migrantes, esté asociado a la extrema baja variación genética (100% y 67% de alelos fijos, LES y LL respectivamente).

De acuerdo con el análisis molecular de varianza, las localidades (poblaciones) albergan mucha de la variación, esto es, el 77% de la diversidad general fue explicada por la variación dentro de las localidades y sólo el 23% está dada por la variación entre localidades. Esto apoya los resultados de estructuración, ya que las localidades son mayormente diferentes unas de otras con valores altos dentro de cada localidad. La correlación entre la distancia geográfica y la genética fue significativa para las seis localidades que se encuentran dentro de la Reserva de Sian Ka'an (es decir, sin PLN), para *P. orri*.

Respecto a *Gambusia yucatanana*, dos poblaciones presentaron equilibrio de H-W (LIR y LES), sin embargo, las desviaciones fueron menos marcadas que en *P. orri*, mostrando tanto exceso de homocigos como de heterocigos. Asimismo, se observó un número promedio de alelos un poco menor ( $A = 10$ ) que en *P. orri*. Se observaron sólo ocho alelos raros, y los resultados de diferenciación (distribución) alélica y genotípica mostraron distribución heterogénea en todas las localidades. La heterocigosidad observada promedio fue de 0.25, el doble que en *P. orri*, pero también baja comparada con otros estudios (DeWoody y Avise, 2001). También se encontraron valores de distancia genética bajos y pocos fueron significativos.

Los valores de diferenciación ( $R_{ST}$ ) fueron también más bajos, en la mayoría negativos y sólo tres significativos (promedio = 0.12). El número de migrantes estimado fue, en todos los casos, mayor que uno. Esto concuerda con lo que se sabe sobre la biología de esta especie, ya que además de ser muy vágil, es la más eurihalina del género, lo que le permite soportar altos niveles de salinidad durante el periodo de secas (Navarro y Suárez, 1992). Es por ello que los individuos de esta especie pueden permanecer por más tiempo en las localidades durante la época seca, y pueden moverse más entre localidades, cuando al inundarse éstas quedan comunicadas entre sí, presentando así una menor estructuración y diferenciación. De acuerdo con el análisis molecular de varianza, la variación intra-localidad es muy alta (92%) y sólo el 8% está dada por la variación entre localidades, contrario a lo encontrado en *P. orri*, donde se observó la mayor variación entre localidades. Además, no hubo correlación entre la distancia genética y geográfica.

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos apreciar que más allá del tipo de cuerpo de agua (e.g., cenote, humedal) que habita la especie y a la distancia geográfica entre dichos cuerpos, la estructura genética y la distribución de la variación genética están íntimamente relacionadas con la biología de la especie. Por ejemplo, aunque se podría esperar una disminución en la variabilidad en las localidades sujetas a cambios drásticos del nivel de agua y en las cuales el tamaño poblacional se ve afectado, en *P. orri* los valores de variación genética no lo reflejan, probablemente por su sistema de apareamiento. La paternidad múltiple puede relacionarse con mayor flujo génico y variabilidad intrapoblacional, disminuyendo la diferenciación. El número de padres por puesta tiene una injerencia directa sobre la distribución de la variación genética dentro de las poblaciones. Al aumentar el número de progenitores también aumenta el flujo y se mantiene una mayor variación genética, lo que es muy importante en especies colonizadoras o expuestas a fuertes fluctuaciones en abundancia (Zane, 1999).

También cabe resaltar el hecho de que hubo estructuración sólo en *P. orri*, lo que concuerda con su menor tolerancia a la salinidad y al probable menor movimiento de individuos entre cuerpos de agua; ello también se refleja en la correlación significativa entre distancia genética y geográfica observada, ya que no existe el suficiente flujo génico para homogeneizar la variación entre cuerpos de agua como se da en el caso de *G. yucatana*.

Es importante resaltar que con los resultados del presente estudio se pudo describir cómo dos especies cercanamente emparentadas y que habitan el mismo sistema de cenotes y humedales en Sian Ka'an, pueden presentar una estructuración genética contrastante; así, es evidente que la biología e historia de vida de cada una, evaluada a través de su genética, responde de manera distinta a la dinámica de estos cuerpos de agua.

## 8. LITERATURA CITADA

- Cabrera, L.R., Sierra, V.A., Durán J.A., Rosenberg, J.R. Lopez E.M. y Vazquez-Dominguez, E., 1998. *Regiones hidrológicas prioritarias para la conservación*. CONABIO, México.
- Chesser, R.K., Smith, M.W. y Smith M.H. 1984. Biochemical genetics of mosquitofish III. Incidence and significance of multiple insemination. *Genética* **64**: 77-81.
- DeWoody, J.A. y Avise, J.C. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology* **56**: 461-473.
- De Woody, J.A. y Avise, J.C. 2001. Genetic perspectives on the natural history of fish mating systems. *The American Genetic Association* **92**: 167-172.
- Greenfield, D.M. y Thomerson, J.E. 1997. *Fishes of the continental waters of Belize*. University Press of Florida, Gransville, Florida. 311 pp.
- García, B.D. 2004. *Distribución de la familia Poeciliidae a nivel regional en la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an*. Tesis Maestro en Ciencias Biológicas (Ambiental) Instituto de Biología, UNAM.
- Goudet, J., Raymond, M., de Meeüs, T. y Rousset, F. 1996. Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* **144**: 1933-1940.
- Guo, S.W. y Thompson, E.A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, **48**: 361-372.
- Hedrick, P.W. 2000, *Genetics of populations*. Jones and Barlett, Boston. 553p.
- Hey, J. & Machado, C.A. 2003. The study of structured populations-new hope for a difficult and divided science. *Nature* **4**: 535-543.
- Hillis, D.M., Moritz, C. y Mable, B.K. 1990. *Molecular systematics*. Segunda Edición. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- INE. 1996. Programas de Manejo. Programa de manejo áreas naturales protegidas #3. Reserva de la Biosfera Sian Ka'an. INE-Semarnap, México.
- Kelly, C.D., Jean-Guy, J. y Wright J.M. 1999. Geographical variation in multiple paternity within natural populations of the guppy (*Poecilia reticulata*). *Proceedings: Biological Sciences*, **266**: 2403-2408.
- Kimura, M. & Crow, J.F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* **49**: 725-38.
- Kimura, M. & Otha, T. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in finite populations. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA* **75**: 2868-2872.
- Kumar, S., Tamura, K., y Nei, M. 2004. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111-120.
- Michalakis, Y. y Excoffier, L. 1996. A genetic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics* **142**: 1061-1064.

- Meffe, G.K. y Snelson, F.F. Jr. 1989. *Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliidae)*. Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, 453 p.
- Navarro, D.L. y Robinson, G.J. (editores). 1990. *Diversidad biológica en la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an, Quintana Roo, México*. Centro de Investigaciones de Quintana Roo /Universidad de Florida. 471 pp.
- Navarro, D.L. y Suárez, E.M. (editores). 1992. *Diversidad biológica en la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an, Quintana Roo, México*. Volumen 2. Centro de Investigaciones de Quintana Roo, 295 pp.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist* **106**: 283-292.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA*, **70**: 3321-3323.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**: 583-590.
- O'Connel, N. y Slatkin, M. 1993. High mutation rate loci in a subdivided population. *Theoretical Population Biology* **44**: 110-127.
- Otha, T. y Kimura, M. 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetic Research* **22**: 201-204.
- Ortega-Mayagoitia, E., Rojo, E.C. y Rodrigo, M.A. 2002. Factors masking the trophic cascade in shallow eutrophic wetlands: evidence from a microcosm study. *Archiv für Hydrobiologie*. **155**: 43-63.
- Pearse, A.S., Creaser, E.P. y Hall, F.G. 1936. The cenotes of Yucatan. A zoological and hydrographic survey. *Carnegie Institution of Washington Publication* **457**: 1-304.
- Primmer, C.R. 2005. Genetic characterisation of populations and its use in conservation decision making in fish. *The Role of Biotechnology International Workshop*, 5-7 March 2005, Turin, Italy: 137-142.
- Raymond, M. y Rousset, F. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics software for Exact tests and ecumenicism. *The Journal of Heredity*. **86**: 248-249.
- Raymond, M. y Rousset, F. 2003. GENEPOP (Versión 3.4): Population genetics software for exact test and ecumenicism (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/index.html>).
- Robertson, A. y Hill, W. 1984. Deviations from Hardy-Weinberg proportions: sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. *Genetics* **107**: 703 – 718
- Rousset, F. 1996. Equilibrium values of measures of population subdivision for stepwise mutation processes. *Genetics* **142**: 1357-1362.
- Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Ed. Limusa, México, 423 pp.
- Sambroock, J., Fritswich, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 512pp.

- Schmitter-Soto, J.J. 1998. *Catálogo de los peces continentales de Quintana Roo*. Colegio de la Frontera Sur. México.
- Schmitter-Soto, J.J., Comin, F.A., Escobar, E., Jerrera-Silveira, J., Alcocer, J., Suárez-Morales, E., Elías-Gutierrez, M., Díaz-Arce, V., Marín, L.E. y Steinich, B. 2002. Hydrogeochemical and biological characteristics of cenotes in the Yucatan Peninsula (SE Mexico). *Hydrobiologia* **467**: 215-228.
- Schneider, S., Roessli, D. & Excoffier, L. 2000. Arlequin ver.2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Snodgrass, J.W., Bryan, A. L., Lide, R.F. y Smith, G.L. 1996. Factors affecting the occurrence and structure of fish assemblages in isolated wetlands of the upper coastal plain. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **53**: 443-454.
- Spencer, C. C., Chlan, C. A., Neigel, J. E., Scribner, K. T., Wooten, M. C., Leberg, P. L. 1999. Polymorphic microsatellite markers in the western mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Molecular Ecology* **8**: 157-168.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* **139**: 457-462.
- Smith, P.J. 1994. Genetic diversity in marine fisheries resources, possible impacts of fishing. FAO, *Fisheries Technical Paper*. No. 344. Rome, 53 pp.
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* **5**: 199-202.
- Weir, B.S. y Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358-1370.
- Weir, B.S. 1996. *Genetic data analysis II*. Sinauer Associates, Inc. Canada 445 pp.
- Whitlock, M.C. y McCauley, D.E. 1999. Indirect measures of gene flow and migration:  $F_{st} \approx 1/(4Nm+1)$ . *Heredity* **82**:117-125.
- Yeh, F.C. 1997. PopGene v 1.32 (<http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm>).
- Zambrano, L., E. Vázquez-Domínguez, D. García-Bedoya, W.F. Loftus, J.C. Trexler. Fish community structure in freshwater karstic water bodies of the Sian Ka'an Reserve in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* (en revisión).
- Zane L., Nelson, W.S., Jones, A.G. y Avise, J C. 1999. Microsatellite assessment of multiple paternity in natural populations of live-bearing fish, *Gambusia holbrooki*. *Journal of Evolutionary Biology* **12**: 61-69.

## 9. ANEXOS

### Anexo I. Extracción de ADN.

#### *Componentes del kit:*

Genomic DNA Lysis solution 35 ml, Protein precipitation solution 12 ml, DNA Hydration solution 10 ml, Rnase A solution 250 ul y Proteinasa K.

#### *Pasos a seguir :*

#### **1. Lisis celular**

- Cortar un pedazo (5-10 mg) de tejido (que está en etanol 95%), colocarlo sobre papel absorbente, y dejarlo secar en un tubo de 1.5 ml.
- Añadir 300 µl de Genomic DNA Lysis solution y agitar en el vortex.
- Agregar 1.5 µl de Proteinasa K (20mg/ml) a la solución de lisis y mezclar invirtiendo el tubo 25 veces. Incubar a 55 °C por 3 horas (con opción a dejarlo durante la noche). Mientras están en incubación, invertir los tubos periódicamente. Si el pedazo de tejido estuviera intacto después de incubación, se puede añadir un poco más de Proteinasa K (1-1.5 µl). Dejar enfriar a temperatura ambiente.

#### **2. Tratamiento con RNAsa**

- Añadir 1.5 µl de RNase A (4mg/ml) a la solución de lisis.
- Mezclar la muestra invirtiendo el tubo 25 veces e incubar por 45 min. a 65° C.

#### **3. Precipitación de proteínas**

- Dejar que la muestra se enfríe a temperatura ambiente. Una vez frías añadir 100 µl de Protein Precipitation Solution.
- Mezclar muestras en Vortex a alta velocidad durante 20 segundos.
- Centrifugar a 14,000 rpm durante 4 min. Las proteínas precipitadas deberán formar un pellet. Si el pellet no se ve compacto, volver a mezclar en vortex para después incubar en hielo por 5 minutos y llevar de nuevo a la centrifuga por el mismo tiempo y rpm.

#### **4. Precipitación de ADN**

- Vaciar el sobrenadante en un tubo de 1.5 nuevo; agregar 300 µl de isopropanol (2-propanol 100%), cuidando que el pellet se quede en el tubo viejo.
- Mezclar la muestra invirtiéndola gentilmente 50 veces
- Centrifugar a 14,000 rpm durante 3 min, el ADN será visible en forma de un pellet blanco pequeño
- Quitar el sobrenadante y secar brevemente el tubo en un papel absorbente. Añadir 300 µl de etanol 70%, invirtiendo el tubo varias veces para lavar el pellet.
- Centrifugar a 14,000 rpm por 1 min.
- Cuidadosamente quitar el etanol, lentamente para que no arrastre el pellet. Poner el tubo inclinado boca abajo sobre un papel absorbente y dejar secar durante 15 min, o hasta que el etanol se evapore.

#### **5. Hidratación del ADN**

- Añadir 80 µl de DNA Hydration buffer
- Incubar la muestra a 65°C por 1 hr o se puede dejar a temperatura ambiente durante toda la noche.
- Agitar en vortex a velocidad media por 5 seg. para llevar el pellet al fondo del tubo.
- Almacenar el ADN a 4°C, o a -20 ó -80 ° C si estará almacenado por un periodo largo de tiempo.

## **Anexo II.** Cuantificación mediante biofotómetro.

Para la medición se hace una dilución de la muestra en agua destilada. Se utilizaron cubetas de 60 $\mu$ l de la marca eppendorf. Por lo tanto la cantidad mínima para medir es de 60 $\mu$ l. Se hicieron diluciones de 10 $\mu$ l de muestra en 50 $\mu$ l de agua destilada.

Primero debe calibrarse el biofotómetro con un blanco, el cual se prepara con la solución de hidratación de ADN del kit de extracción y agua destilada con la misma dilución (10:50). Una vez que se introduce la cubeta con el blanco en el biofotómetro sólo se aprieta el botón de –blank-blanco y el aparato queda calibrado.

También es necesario introducir la dilución a la que están las muestras para esto, se presiona el botón de dilución y se indican los valores de la misma (10:50).

Para medir una muestra se hace la dilución en la cubeta, esta se introduce en el biofotómetro y se aprieta el botón de muestra, el aparato nos da varios valores: el valor central es la cantidad de ADN en ng/ $\mu$ l, además de este valor debemos considerar el valor de la corrección hecha de 260/280, este valor nos indica que tan limpio se encuentra el ADN, con respecto a proteínas o RNA. El intervalo de valores ideales esta entre 1.7 a 2.0, los valores por debajo de 1.7 nos indican contaminación por proteínas, sin embargo aun con valores hasta por debajo de 1.4 el DNA puede funcionar en un PCR; los valores por encima de 2.0 nos indican contaminación por RNA y el DNA debe ser tratado con RNAsa (ver protocolo de extracción). El otro valor que debe considerarse es el de A320.que es una valor de corrección con esa longitud de onda.

### **Anexo III.** Prueba de integridad mediante gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

#### *Materiales:*

Cámara de Electroforesis, camas y peines de 22 pozos, micropipetas de 0.5 a 10  $\mu$ L y puntas estériles.

#### **Reactivos:**

TBE 0.5X, Agarosa al 1.5 %, Loading Buffer, Lambdas de ADN, muestras.

#### **Preparación de Reactivos:**

##### \* TBE 10X

108 g de Tris Base, en 40 ml de EDTA 0.5M (pH 8), 55 grs, de Ácido Bórico.

Diluir a 0.5X el TBE con agua destilada (50ml de TBE 10X + 950 ml de agua destilada).

##### \* EDTA pH 8

18.61 grs. de EDTA disueltos en 70 ml de agua destilada ajustando pH con sosa y aforar a 100 ml.

#### *Preparación del gel de agarosa al 1.5 % para visualización de bandas:*

- Pesar 0.60 grs. de agarosa y añadir 40 ml de TBE 0.5 X
- Calentar por 1 min. en el horno de microondas.

#### *Carga de geles:*

- Para las muestras, cargar en cada pozo 5  $\mu$ L de ADN y 3  $\mu$ L de Loading Buffer.
- Para los pesos moleculares estándar (lambdas de 5, 15 y 25 nanogramos por microlitro en este caso) colocar 8  $\mu$ L por pozo.

#### *Corrida del gel:*

- El gel se corre a 120 volts por aproximadamente 35 minutos.

#### *Bromuro de Etidio:*

- El gel se deja reposar en una solución con bromuro de etidio por 20 min. para que este se adhiera a las bandas y después se coloca en otra charola con agua destilada para eliminar el exceso de esta sustancia.

#### *Cuantificación:*

- Para estimar la cantidad de ADN presente en las bandas de las muestras se comparan la intensidad y grosor de las bandas de las lambdas.

**Anexo IV.** Condiciones de PCR utilizadas para *Gambusia yucatanana* (Gafu 3, 4 y 6) y para *Poecilia orri* (Gafu3, 4 y 7) Para un volumen final de 15  $\mu$ l.

| <i>G. yucatanana</i> | Gafu3                        | Gafu4                        | Gafu6                        |
|----------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Concentración Mg     | <b>2.5 <math>\mu</math>l</b> | <b>2.5 <math>\mu</math>l</b> | <b>3.7 <math>\mu</math>l</b> |
| H <sub>2</sub> O     | 7.7 $\mu$ l                  | 8.3 $\mu$ l                  | 7.35 $\mu$ l                 |
| MgCl <sub>2</sub>    | 0.75 $\mu$ l                 | 0.75 $\mu$ l                 | 1.1 $\mu$ l                  |
| Buffer               | 1.5 $\mu$ l                  | 1.5 $\mu$ l                  | 1.5 $\mu$ l                  |
| dNTP's (2 mM)        | 1.5 $\mu$ l                  | 1.5 $\mu$ l                  | 1.5 $\mu$ l                  |
| primerR (10uM)       | 1.2 $\mu$ l                  | 0.9 $\mu$ l                  | 1.2 $\mu$ l                  |
| primerF (10uM)       | 1.2 $\mu$ l                  | 0.9 $\mu$ l                  | 1.2 $\mu$ l                  |
| Taq (2,5U)           | 0.15 $\mu$ l                 | 0.15 $\mu$ l                 | 0.15 $\mu$ l                 |
| ADN                  | 1 $\mu$ l                    | 1 $\mu$ l                    | 1 $\mu$ l                    |

| <i>P. orri</i>    | Gafu3                        | Gafu4                        | Gafu7                        |
|-------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Concentración Mg  | <b>2.5 <math>\mu</math>l</b> | <b>2.5 <math>\mu</math>l</b> | <b>3.5 <math>\mu</math>l</b> |
| H <sub>2</sub> O  | 8.3 $\mu$ l                  | 8.3 $\mu$ l                  | 7.4 $\mu$ l                  |
| MgCl <sub>2</sub> | 0.75 $\mu$ l                 | 0.75 $\mu$ l                 | 1.05 $\mu$ l                 |
| Buffer            | 1.5 $\mu$ l                  | 1.5 $\mu$ l                  | 1.5 $\mu$ l                  |
| dNTP's (2 mM)     | 1.5 $\mu$ l                  | 1.5 $\mu$ l                  | 1.5 $\mu$ l                  |
| primerR (10uM)    | 0.9 $\mu$ l                  | 0.9 $\mu$ l                  | 1.2 $\mu$ l                  |
| primerF (10uM)    | 0.9 $\mu$ l                  | 0.9 $\mu$ l                  | 1.2 $\mu$ l                  |
| Taq (2,5U)        | 0.15 $\mu$ l                 | 0.15 $\mu$ l                 | 0.15 $\mu$ l                 |
| ADN               | 1 $\mu$ l                    | 1 $\mu$ l                    | 1 $\mu$ l                    |

## **Anexo V.** Preparación de geles de poliacrilamida y tinción con plata.

### **Acrilamida en forma líquida:**

En un vaso de precipitados (1000ml) sobre agitador magnético agregar:

105 g UREA 7M

37.5 ml acrilamida 40%

25 ml TBE 10X

Y aforar a 250ml con H<sub>2</sub>O dd.

El gel debe prepararse momentos antes de ser vaciado, se agregan a la acrilamida líquida:

3 ul de persulfato 10% por cada ml de acrilamida que se requiera y

0.83 ul de TEMED por cada ml de acrilamida.

Estas 2 sustancias son las que hacen que se polimerice la acrilamida.

Las proporciones utilizadas para nuestros geles en vidrios chicos son:

Acrilamida 6% 15 ml; APS 45 ul; TEMED 12.5 ul.

### **Preparación de vidrios**

Lavar ambos vidrios con agua tibia y jabón, limpiar con papel absorbente y un poco de etanol al 70% para acelerar el secado de los vidrios, una vez secos se añade una mezcla para pegado y otra para repeler el gel en los vidrios correspondientes.

En el vidrio "pequeño" donde se pega el gel se agrega una solución que contiene:

333 ul etanol (96%) frío

1.25 ul Bind Silene (Pharmacia biotech No. 17-1330-01)

83 ul ácido acético 10%

Con una toalla de papel humedecido con la mezcla, se aplica sobre el vidrio de manera uniforme formando carriles longitudinales sobre la superficie del vidrio y se deja secar.

El vidrio "grande", donde no se pega el gel, se trata con una capa homogénea de Rain-X anti fog (super pinauto); se aplica directamente sobre la superficie del vidrio para evitar que se pegue y se deja secar por 5 min.

Los vidrios se empalman por los lados que han sido frotados, colocando entre ellos los separadores. Los vidrios son asegurados con clips a los lados para después vaciar la acrilamida entre ellos. Una vez vertida la sustancia se coloca el peine invertido y un par de clips apretando la zona del peine.

### **Carga del gel**

El Buffer de carga utilizado en el laboratorio es el de 2 frentes, desnaturalizante reportado en el Manual de técnicas Moleculares (Maniatis, 1989).

Se mezclan de 4-6 ul de la mezcla de PCR (microsatélites) con 2-3 ul de buffer de carga y se desnaturalizan durante 5 a 7 min. a 95°C.

Una vez que se ha montado el gel en la cámara de electroforesis (verticales) se quita el peine y limpiar la zona con agua y buffer de corrida (TBE1X), para eliminar la acrilamida que podría obstruir los carriles. Es conveniente que el gel corra unos 5-10 min antes de cargar las muestras.

Se limpia cada pozo varias veces con jeringa para colocar aproximadamente 6 ul de la muestra desnaturalizada en cada carril. Colocando siempre una escalera al inicio, en medio y al final del gel (referentes de lectura).

### Corrida del gel

El gel Corre por aproximadamente por 3 hrs. a 500 volts.

Una vez que termina de correr, se separan los vidrios, ayudándose con una espátula. Se pone el vidrio con el gel pegado en ácido acético al 10%, en el que se puede quedar hasta 12 hrs.

### Tinción de Geles con Plata

El protocolo se puede resumir en 7 pasos como sigue:

| <i>paso</i>            | <i>solución</i>          | <i>Tiempo de tratamiento</i> |                                 |
|------------------------|--------------------------|------------------------------|---------------------------------|
|                        |                          | <i>sugerido</i>              | <i>intervalo</i>                |
| 1. <i>Fijación</i>     | <i>solución fijadora</i> | <i>30 min</i>                | <i>de 30 min. hasta 12 hrs.</i> |
| 2. <i>Lavado</i>       | <i>H2O</i>               | <i>10 min</i>                | <i>sin opción (agua fría)</i>   |
| 3. <i>Impregnación</i> | <i>solución de plata</i> | <i>35 min</i>                | <i>25-40 min (agua fría)</i>    |
| 4. <i>Enjuague</i>     | <i>H2O</i>               | <i>una pasada en charola</i> | <i>sin opción</i>               |
| 5. <i>Revelado</i>     | <i>sol. reveladora</i>   | <i>aprox. 15 min.</i>        | <i>Hasta ver bandas</i>         |
| 6. <i>Paro</i>         | <i>sol. de paro</i>      | <i>10 min</i>                | <i>5-20 min</i>                 |
| 7. <i>Enjuague</i>     | <i>H2O</i>               | <i>10 min</i>                | <i>5-15 min</i>                 |

1. Solución fijadora y de "paro". La solución consiste en una mezcla 1:10 de ác. Acético glacial: agua destilada fría.

2. Solución de plata. Se prepara fresca en cada ocasión y por cada 100 ml de solución se requiere:

0.1 g de nitrato de plata (Silver nitrate, 100g, ACS Reagent, Cat # 09205 Research Org) y  
150 ul de Formaldehído al 37% (Formal sol al 37%, 1 litro, 2106-02 JT Baker)

La solución se mezcla en un frasco con tapa o en un vaso de precipitados sobre agitador magnético. Como es tóxica, debe manejarse y desecharla con mucho cuidado.

3. Solución reveladora. También se prepara fresca en cada ocasión y por cada 100 ml de agua destilada fría se agregan:

3 g de carbonato de sodio (Sodium carbonate monohydrate, 1kg, ACS Reagent, Cat # 09425)  
150 ul de Formaldehído al 37% (idem)  
150 ul de Tiosulfato de Sodio (T de Na 0.1N sol volumétrica, 5637-02, JT Baker)

La solución se mezcla en un vaso de precipitados sobre agitador magnético. **IMPORTANTE**, el carbonato se agrega poco a poco, de lo contrario el carbonato se solidifica.

**Anexo VIa.** Diferenciación alélica por locus en *P. orri* resaltando las combinaciones donde se presenta una distribución alélica homogénea (en negritas).

| <i>P. orri</i> | Gafu3        |       | Gafu4        |       | Gafu6        |       |
|----------------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|
|                | <i>P</i>     | E.S.  | <i>P</i>     | E.S.  | <i>P</i>     | E.S.  |
| CST-MAR        | 0.001        | 0     | 0            | 0     | 0.025        | 0.002 |
| CST-CP         | 0.012        | 0.001 | 0            | 0     | 0.003        | 0     |
| CST-LES        | 0.026        | 0.001 | 0            | 0     | <b>0.156</b> | 0.003 |
| CST-LL         | <b>0.547</b> | 0.003 | 0.032        | 0.001 | <b>0.105</b> | 0.003 |
| CST-LIR        | 0            | 0     | 0            | 0     | 0            | 0     |
| CST-PLN        | 0            | 0     | 0            | 0     | 0            | 0     |
| CST-PM         | 0.003        | 0     | 0            | 0     | <b>0.071</b> | 0.003 |
| MAR-CP         | <b>0.152</b> | 0.005 | 0            | 0     | 0.002        | 0     |
| MAR-LES        | 0.021        | 0.002 | 0            | 0     | <b>0.161</b> | 0.003 |
| MAR-LL         | <b>0.342</b> | 0.008 | 0            | 0     | <b>0.068</b> | 0.002 |
| MAR-LIR        | 0            | 0     | 0            | 0     | 0            | 0     |
| MAR-PLN        | 0            | 0     | 1            | 0     | 0            | 0     |
| MAR-PM         | <b>0.071</b> | 0.003 | <b>0.405</b> | 0.003 | <b>0.230</b> | 0.004 |
| CP-LES         | 0.002        | 0     | 0.002        | 0     | <b>1</b>     | 0     |
| CP-LL          | <b>0.356</b> | 0.004 | 0.017        | 0.001 | <b>0.500</b> | 0.001 |
| CP-LIR         | <b>0.105</b> | 0.003 | 0            | 0     | 0            | 0     |
| CP-PLN         | 0            | 0     | 0            | 0     | 0            | 0     |
| CP-PM          | <b>0.170</b> | 0.004 | 0            | 0     | <b>0.055</b> | 0.001 |
| LES-LL         | 0.005        | 0     | 0.008        | 0     | ---          | ---   |
| LES-LIR        | 0.002        | 0     | 0            | 0     | 0.005        | 0     |
| LES-PLN        | 0.010        | 0     | 0.004        | 0     | 0.018        | 0.001 |
| LES-PM         | <b>0.222</b> | 0.005 | 0            | 0     | <b>0.700</b> | 0.002 |
| LL-LIR         | 0.014        | 0.001 | 0.022        | 0.001 | 0            | 0     |
| LL-PLN         | 0.002        | 0     | 0.002        | 0     | 0.002        | 0     |
| LL-PM          | <b>0.067</b> | 0.003 | 0            | 0     | <b>0.564</b> | 0.002 |
| LIR-PLN        | 0            | 0     | 0.015        | 0     | 0.001        | 0     |
| LIR-PM         | 0.008        | 0.001 | 0            | 0     | 0            | 0     |
| PLN-PM         | 0            | 0     | ---          | ---   | 0            | 0     |

**Anexo VIb.** Diferenciación alélica con los tres loci por par de poblaciones en *P. orri*. \*

|         | $\chi^2$ | g.l. | <i>P</i>     |
|---------|----------|------|--------------|
| CST-MAR | $\infty$ | 6    | *            |
| CST-CP  | $\infty$ | 6    | *            |
| CST-LES | 30.78    | 6    | 0            |
| CST-LL  | 12.57    | 6    | 0.050        |
| CST-LIR | $\infty$ | 6    | *            |
| CST-PLN | $\infty$ | 6    | *            |
| CST-PM  | $\infty$ | 6    | *            |
| MAR-CP  | $\infty$ | 6    | *            |
| MAR-LES | *        | 6    | *            |
| MAR-LL  | $\infty$ | 6    | *            |
| MAR-LIR | $\infty$ | 6    | *            |
| MAR-PLN | $\infty$ | 6    | *            |
| MAR-PM  | 10.02    | 6    | <b>0.124</b> |
| CP-LES  | 24.27    | 6    | 0            |
| CP-LL   | 11.52    | 6    | <b>0.073</b> |
| CP-LIR  | $\infty$ | 6    | *            |
| CP-PLN  | 47.29    | 6    | 0            |
| CP-PM   | $\infty$ | 6    | *            |
| LES-LL  | 20.28    | 4    | 0            |
| LES-LIR | 37.44    | 6    | 0            |
| LES-PLN | 27.98    | 6    | 0            |
| LES-PM  | 21.47    | 6    | 0.001        |
| LL-LIR  | 30.90    | 6    | 0            |
| LL-PLN  | 37.22    | 6    | 0            |
| LL-PM   | $\infty$ | 6    | *            |
| LIR-PLN | 35.41    | 6    | 0            |
| LIR-PM  | $\infty$ | 6    | *            |
| PLN-PM  | 38.58    | 4    | 0            |

\*= altamente significativos ( $P < 0.00001$ );  $\infty$ = infinito.

**Anexo VII.** Diferenciación genotípica para *P. orri* entre pares de localidades para (A) cada locus y (B) el total de la muestra. En negritas donde se rechaza la  $H_0$ : distribución genotípica idéntica entre poblaciones.

**A)**

| Localidades | Gafu3        |       | Gafu4           |       | Gafu6           |       |
|-------------|--------------|-------|-----------------|-------|-----------------|-------|
|             | <i>P</i>     | E.S.  | <i>P</i>        | E.S.  | <i>P</i>        | E.S.  |
| MAR-CST     | <b>0.038</b> | 0.002 | <b>0</b>        | 0     | 0.267           | 0.004 |
| CP-CST      | 0.139        | 0.004 | <b>0</b>        | 0     | 0.068           | 0.002 |
| CP-MAR      | 0.345        | 0.005 | <b>0.001</b>    | 0     | 0.074           | 0.003 |
| LES-CST     | 0.233        | 0.003 | <b>0.0081</b>   | 0.001 | 0.542           | 0.003 |
| LES-MAR     | 0.132        | 0.004 | <b>0.016</b>    | 0.001 | 0.405           | 0.003 |
| LES-CP      | 0.098        | 0.002 | 0.097           | 0.002 | 1               | 0     |
| LL-CST      | 0.649        | 0.003 | 0.188           | 0.003 | 0.276           | 0.003 |
| LL-MAR      | 0.449        | 0.006 | <b>0.008</b>    | 0     | 0.323           | 0.004 |
| LL-CP       | 1            | 0     | 0.283           | 0.004 | 1               | 0     |
| LL-LES      | 0.100        | 0.002 | 0.200           | 0.002 | Solo 1 genotipo |       |
| LIR-CST     | <b>0.001</b> | 0     | <b>0.008</b>    | 0     | <b>0.020</b>    | 0.001 |
| LIR-MAR     | <b>0.015</b> | 0.001 | <b>0.002</b>    | 0     | <b>0.015</b>    | 0.001 |
| LIR-CP      | 0.380        | 0.004 | <b>0.011</b>    | 0.001 | <b>0.049</b>    | 0.002 |
| LIR-LES     | 0.082        | 0.003 | 0.082           | 0.002 | 0.284           | 0.005 |
| LIR-LL      | 0.151        | 0.004 | 0.334           | 0.003 | 0.116           | 0.003 |
| PLN-CST     | <b>0.005</b> | 0     | <b>0.002</b>    | 0     | <b>0.001</b>    | 0     |
| PLN-MAR     | <b>0.011</b> | 0.001 | 1               | 0     | <b>0.003</b>    | 0     |
| PLN-CP      | 0.088        | 0.002 | <b>0.036</b>    | 0.002 | <b>0.019</b>    | 0.001 |
| PLN-LES     | 0.205        | 0.002 | 0.098           | 0.001 | 0.102           | 0.003 |
| PLN-LL      | 0.097        | 0.002 | 0.098           | 0.002 | 0.101           | 0.002 |
| PLN-LIR     | <b>0.033</b> | 0.001 | 0.208           | 0.003 | 0.108           | 0.003 |
| PM-CST      | 0.056        | 0.002 | <b>0</b>        | 0     | 0.353           | 0.005 |
| PM-MAR      | 0.235        | 0.005 | 1               | 0     | 0.598           | 0.004 |
| PM-CP       | 0.312        | 0.004 | <b>0</b>        | 0     | 0.422           | 0.003 |
| PM-LES      | 0.161        | 0.003 | <b>0.017</b>    | 0     | 1               | 0     |
| PM-LL       | 0.120        | 0.003 | <b>0.004</b>    | 0     | 0.668           | 0.003 |
| PM-LIR      | 0.081        | 0.003 | <b>0.004</b>    | 0     | <b>0.009</b>    | 0.001 |
| PM-PLN      | <b>0.013</b> | 0.001 | Solo 1 genotipo |       | <b>0.009</b>    | 0     |

**B**

| Localidad | $\chi^2$ | g.l. | <i>P</i>     |
|-----------|----------|------|--------------|
| MAR-CST   | $\infty$ | 6    | *            |
| CP-CST    | 30.14    | 6    | *            |
| CP-MAR    | 20.19    | 6    | <b>0.002</b> |
| LES-CST   | 13.76    | 6    | <b>0.032</b> |
| LES-MAR   | 14.16    | 6    | <b>0.028</b> |
| LES-CP    | 9.27     | 6    | 0.159        |
| LL-CST    | 6.78     | 6    | 0.342        |
| LL-M      | 13.33    | 6    | <b>0.038</b> |
| LL-CP     | 2.52     | 6    | 0.866        |
| LL-LES    | 7.81     | 4    | 0.099        |
| LIR-CST   | 31.40    | 6    | <b>0</b>     |
| LIR-MAR   | 29.25    | 6    | <b>0</b>     |
| LIR-CP    | 17.02    | 6    | <b>0.009</b> |
| LIR-LES   | 12.51    | 6    | 0.052        |
| LIR-LL    | 10.28    | 6    | 0.113        |
| PLN-CST   | 36.09    | 6    | <b>0</b>     |
| PLN-MAR   | 21.05    | 6    | <b>0.002</b> |
| PLN-CP    | 19.33    | 6    | <b>0.004</b> |

|         |          |   |              |
|---------|----------|---|--------------|
| PLN-LES | 12.38    | 6 | 0.054        |
| PLN-LL  | 13.86    | 6 | <b>0.031</b> |
| PLN-LIR | 14.37    | 6 | <b>0.026</b> |
| PM-CST  | $\infty$ | 6 | *            |
| PM-MAR  | 3.93     | 6 | 0.686        |
| PM-CP   | 21.52    | 6 | <b>0.001</b> |
| PM-LES  | 11.72    | 6 | 0.068        |
| PM-LL   | 15.97    | 6 | <b>0.014</b> |
| PM-LIR  | 25.18    | 6 | <b>0</b>     |
| PM-PLN  | 18.03    | 4 | <b>0.001</b> |

---

Resaltados en negritas donde se rechaza la  $H_0$ : distribución genotípica idéntica a lo largo de las poblaciones.

**Anexo VIIIa.** Diferenciación alélica por locus en *G. yucatanana*, resaltadas las combinaciones donde se presenta una distribución alélica homogénea (en negritas).

|         | Gafu3        |       | Gafu4        |       | Gafu7        |       |
|---------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|
|         | P            | E.S   | P            | E.S   | P            | E.S   |
| MAR-CP  | 0.014        | 0.001 | 0.008        | 0.001 | <b>0.053</b> | 0.002 |
| MAR-LEN | 0.049        | 0.002 | 0            | 0     | 0            | 0     |
| MAR-LES | 0.003        | 0     | <b>0.157</b> | 0.003 | <b>0.518</b> | 0.004 |
| MAR-LIR | 0.016        | 0.002 | 0.002        | 0     | <b>1</b>     | 0     |
| MAR-PM  | 0            | 0     | <b>0.653</b> | 0.004 | <b>0.352</b> | 0.004 |
| MAR-SMN | 0.019        | 0.001 | <b>0.126</b> | 0.003 | <b>0.108</b> | 0.002 |
| CP-LEN  | 0.027        | 0.002 | 0            | 0     | 0.025        | 0.001 |
| CP-LES  | 0.040        | 0.002 | <b>0.051</b> | 0.003 | <b>0.068</b> | 0.002 |
| CP-LIR  | 0            | 0     | 0.006        | 0.001 | <b>0.102</b> | 0.002 |
| CP-PM   | 0            | 0     | 0.050        | 0.003 | <b>0.501</b> | 0.006 |
| CP-SMN  | <b>0.055</b> | 0.003 | 0            | 0     | <b>0.096</b> | 0.003 |
| LEN-LES | 0            | 0     | <b>0.568</b> | 0.006 | 0.030        | 0     |
| LEN-LIR | 0.002        | 0     | <b>0.852</b> | 0.003 | 0            | 0     |
| LEN-PM  | 0            | 0     | 0            | 0     | 0.006        | 0     |
| LEN-SMN | 0.043        | 0.002 | 0.019        | 0.001 | <b>0.097</b> | 0.001 |
| LES-LIR | 0            | 0     | <b>0.630</b> | 0.004 | <b>0.749</b> | 0.003 |
| LES-PM  | 0.024        | 0.001 | 0.041        | 0.002 | <b>0.559</b> | 0.005 |
| LES-SMN | 0            | 0     | <b>0.840</b> | 0.002 | <b>0.556</b> | 0.001 |
| LIR-PM  | 0            | 0     | 0.002        | 0     | <b>0.564</b> | 0.004 |
| LIR-SMN | 0.002        | 0     | 0.018        | 0.001 | <b>0.153</b> | 0.003 |
| PM-SMN  | 0.002        | 0     | 0.011        | 0.001 | <b>0.708</b> | 0.004 |

**Anexo VIIIb.** Diferenciación alélica con los tres loci por par de poblaciones en *G. yucatanana*. \*: altamente significativo ( $P < 0.00001$ );  $\infty$  : infinito.

|         | $\chi^2$ | g.l. | P     |
|---------|----------|------|-------|
| MAR-CP  | 23.83    | 6    | 0     |
| MAR-LEN | $\infty$ | 6    | *     |
| MAR-LES | 16.39    | 6    | 0.011 |
| MAR-LIR | 20.55    | 6    | 0.002 |
| MAR-PM  | 17.64    | 6    | 0.007 |
| MAR-SMN | 16.44    | 6    | 0.011 |
| CP-LEN  | 32.75    | 6    | 0     |
| CP-LES  | 17.68    | 6    | 0.007 |
| CP-LIR  | 32.81    | 6    | 0     |
| CP-PM   | $\infty$ | 6    | *     |
| CP-SMN  | 29.10    | 6    | 0     |
| LEN-LES | 23.16    | 6    | 0     |
| LEN-LIR | 27.27    | 6    | 0     |
| LEN-PM  | $\infty$ | 6    | *     |
| LEN-SMN | 18.79    | 6    | 0.004 |
| LES-LIR | 15.62    | 6    | 0.015 |
| LES-PM  | 14.90    | 6    | 0.021 |
| LES-SMN | 19.23    | 6    | 0.003 |
| LIR-PM  | 33.69    | 6    | 0     |
| LIR-SMN | 23.52    | 6    | 0     |
| PM-SMN  | 21.94    | 6    | 0.001 |

**Anexo IX.** Diferenciación genotípica para *G. yucatanana* entre pares de localidades para (A) cada locus y (B) el total de la muestra. Resaltados en negritas donde se acepta la Ho: distribución genotípica idéntica a lo largo de las poblaciones.

**A**

| Localidades | Gafu3        |       | Gafu4        |       | Gafu7        |       |
|-------------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|
|             | <i>P</i>     | E.S.  | <i>P</i>     | E.S.  | <i>P</i>     | E.S.  |
| MAR-CP      | 0.014        | 0.001 | 0.008        | 0.001 | 0.014        | 0.001 |
| MAR-LES     | 0.0493       | 0.002 | 0            | 0     | 0.049        | 0.002 |
| MAR-LES     | 0.003        | 0     | <b>0.157</b> | 0.003 | 0.003        | 0     |
| MAR-LIR     | 0.016        | 0.002 | 0.002        | 0     | 0.016        | 0.002 |
| MAR-PM      | 0            | 0     | <b>0.653</b> | 0.004 | 0            | 0     |
| MAR-SMN     | 0.019        | 0.001 | 0.126        | 0.003 | 0.019        | 0.001 |
| CP-LEN      | 0.027        | 0.002 | 0            | 0     | 0.027        | 0     |
| CP-LES      | 0.04         | 0.002 | <b>0.051</b> | 0.003 | 0.04         | 0.002 |
| CP-LIR      | 0            | 0     | 0.006        | 0.001 | 0            | 0     |
| CP-PM       | 0            | 0     | <b>0.05</b>  | 0.003 | 0            | 0     |
| CP-SMN      | <b>0.055</b> | 0.003 | 0            | 0     | <b>0.055</b> | 0     |
| LEN-LES     | 0            | 0     | <b>0.568</b> | 0.006 | 0            | 0     |
| LEN-LIR     | 0.002        | 0     | <b>0.852</b> | 0.003 | 0.002        | 0     |
| LEN-PM      | 0            | 0     | 0            | 0     | 0            | 0     |
| LEN-SMN     | 0.043        | 0.002 | 0.019        | 0.001 | 0.043        | 0.002 |
| LES-LIR     | 0            | 0     | <b>0.63</b>  | 0.004 | 0            | 0     |
| LES-PM      | 0.024        | 0.001 | 0.041        | 0.002 | 0.024        | 0.001 |
| LES-SMN     | 0            | 0     | <b>0.84</b>  | 0.002 | 0            | 0     |
| LIR-PM      | 0            | 0     | 0.002        | 0     | 0            | 0     |
| LIR-SMN     | 0.002        | 0     | 0.018        | 0.001 | 0.002        | 0     |
| PM-SMN      | 0.002        | 0     | 0.011        | 0.001 | 0.002        | 0     |

**B**

| Localidad | $\chi^2$ | g.l. | <i>P</i> |
|-----------|----------|------|----------|
| MAR-CP    | 23.68    | 6    | 0        |
| MAR-LES   | $\infty$ | 6    | *        |
| MAR-LES   | 16.38    | 6    | 0.01     |
| MAR-LIR   | 20.54    | 6    | 0.002    |
| MAR-PM    | 17.67    | 6    | 0.007    |
| MAR-SMN   | 16.44    | 6    | 0.011    |
| CP-LEN    | 32.79    | 6    | 0        |
| CP-LES    | 17.67    | 6    | 0.007    |
| CP-LIR    | 32.81    | 6    | 0        |
| CP-PM     | $\infty$ | 6    | *        |
| CP-SMN    | 29.09    | 6    | 0        |
| LEN-LES   | 23.16    | 6    | 0        |
| LEN-LIR   | 27.27    | 6    | 0        |
| LEN-PM    | $\infty$ | 6    | *        |
| LEN-SMN   | 18.79    | 6    | 0.004    |
| LES-LIR   | 15.61    | 6    | 0.015    |
| LES-PM    | 14.90    | 6    | 0.021    |
| LES-SMN   | 19.23    | 6    | 0.003    |
| LIR-PM    | 33.69    | 6    | 0        |
| LIR-SMN   | 23.52    | 6    | 0        |
| PM-SMN    | 21.94    | 6    | 0.001    |