



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

“ESTRUCTURA GENÉTICA Y
CONSERVACIÓN DE POBLACIONES DE
Ambystoma taylori y *Ambystoma velasci* QUE
HABITAN EN LOS LAGOS CRÁTER DE
PUEBLA: ANÁLISIS CON
MICROSATÉLITES”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(SISTEMÁTICA)**

P R E S E N T A

BIOL. RUTH PERCINO DANIEL

DIRECTORA DE TESIS: DRA. GABRIELA PARRA OLEA

MÉXICO, D. F.

Abril, 2008



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.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada en mis estudios de maestría no. de registro 18888. A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM por la beca parcial otorgada durante mis estudios de maestría no. de registro 293848. Al apoyo financiero y beca parcial del proyecto SEMARNAT –2002-C01-0015 a cargo de la Dra. Gabriela Parra Olea. A la Red de Análisis para los Anfibios Neotropicales Amenazados (RANA NFS-DEB-0130273) por la beca otorgada para mi estancia en la Universidad de Cornell.

Comité tutorial

Dra. Gabriela Parra Olea

Dra. Blanca Estela Hernández Baños

Dr. Luis Zambrano González

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora la Dra. Gabriela Parra Olea y a los miembros de mi comité tutorial la Dra. Blanca Estela Hernández y el Dr. Luis Zambrano por sus valiosas observaciones y recomendaciones realizadas al proyecto de tesis.

De forma también muy especial agradezco a mis revisores externos: Dr. Luis Eguiarte Fruns, Dr. Daniel Piñero Dalmau y Dr. Javier Alcocer Durand, por invertir un tiempo para revisar cuidadosamente todo el documento de tesis, hacer observaciones y recomendaciones importantes que enriquecieron esta tesis.

Al equipo de buceo de la Facultad de Ciencias, UNAM por toda su ayuda y disponibilidad en la captura de organismos y en el préstamo de equipo de buceo. De forma muy especial a Brian Urbano Alonso por toda su ayuda, tiempo y paciencia en todos los buceos para la búsqueda y captura de ajolotes. A Omar Hernández también por su ayuda y tiempo en los distintos buceos realizados. A Rodolfo Pérez por darme algunas muestras de Quechulac y su ayuda en los diferentes buceos. A Gabi Parra que también colaboró en distintos buceos y préstamo de su equipo; a Cecilia Calderón y Martha De Anda que participaron en algunos otros buceos.

A la M. en C. Laura Márquez por toda su ayuda y confianza dada durante mi trabajo de laboratorio. Mil gracias Lau por tu amistad y por permitirme usar la termo y el seq *chiquito*.

A la Dra. Kelly Zamudio de la Universidad de Cornell, por su ayuda, tiempo y enseñanza de los diferentes métodos de análisis empleados en este proyecto. Al CBU de la Universidad de Cornell por usar su centro de computo para correr el programa IM.

A Gabriel Barrios por su ayuda en campo en las distintas salidas realizadas al inicio de este proyecto y también a Rodrigo Macip por su ayuda en campo. Gracias a ustedes por su participación en la captura de organismos en el Lago Tecuítlapa, por su paciencia en llevar una ¡pequeña lanchita!

A la Dirección General de SuperComputo de la UNAM, por facilitar el uso de la supercomputadora *Kam Balam* para correr el programa MIGRATE. De manera muy especial a Leobardo Itehua por la compilación del programa y por su enorme ayuda y tiempo, mil gracias.

A Mario García Paris, por su revisiones, correcciones e ideas hechas al documento, que hicieron una mejora substancial. A Julieta y Mark por sus revisiones y comentarios hechas al documento. A Alison Acosta por su ayuda en la fase final del trabajo de laboratorio. A Gerardo Salazar y Lidia por su atención cuando caía la noche durante el trabajo de lab!

A mis amigos Edna, JC Windfield (*reinin*), Cristina, Julieta, Mark y Rodolfo, por su amistad y ayuda siempre. También a mis compañeros y amigos del cubículo de estudiantes Pati, Nors, Noemí, Rafita, Cinti, por toda su ayuda y hacer más amena la vida en el cubil de estudiantes.

A mi amiga Judith por su amistad y ayuda siempre durante mi vida citadina defeña y aún ahora de regreso a la vida en el sureste.

A mi familia, mi mami y hermanos Cati, Mimi, Omar y también a mi papá, por su apoyo, ayuda y confianza. De manera muy especial a mi hermana Nohemi por permitirme invadir su espacio y facilitar mi vida en defe. Mil gracias.

A Adrián por todo lo que se ha compartido a lo largo de este viaje, la lista es interminable.

A Toñita por su compañía

Para

Sarabia

Por todo

“mind your p's and q's”

Dicho popular inglés (Hedrick 2005)

...su resistencia a metamorfosearse en salamandras los obliga a una maravillosa revolución: a reproducir infinitamente su larvario primitivismo.

...los delfines civilizados jamás deben darle ventaja alguna a los primitivos axolotes, pues es sabido que su presencia produce extrañas distorsiones en el desarrollo normal de la cinta del tiempo

R. Bartra (1987)

CONTENIDO

RESUMEN	IX
ABSTRACT	XIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. 1 ESPECIES DE ESTUDIO: <i>Ambystoma taylori</i> Y <i>Ambystoma velasci</i>	3
1. 2 MICROSATÉLITES COMO HERRAMIENTA EN LA GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN.....	5
1. 3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	8
II. OBJETIVO GENERAL.....	10
2.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	10
III. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3. 1 ÁREA DE ESTUDIO Y SITIOS DE MUESTREOS.	11
3.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	16
3.3 TRABAJO DE LABORATORIO	16
3.3. 1 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO.....	16
3.3.2 OBTENCIÓN DE MICROSATÉLITES.	16
3.3.3 AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	19
3.3.4 GENOTIPIFICACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES.....	19
3. 4. ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	19
3.4.1 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA	20
3.4.2 ANÁLISIS DE ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA POBLACIÓN.....	21
3.4.3. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL MEDIANTE ESTIMACIONES BAYESIANAS.....	22
3.4.4 TAMAÑO EFECTIVO DE LAS POBLACIONES Y FLUJO GÉNICO.	23
IV. RESULTADOS	25
4.1 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA	25
4.2 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA POBLACIÓN.	31

4.3 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL MEDIANTE AGRUPAMIENTO BAYESIANO	35
4.4 TAMAÑO EFECTIVO POBLACIONAL HISTÓRICO.....	37
4. 5 PATRONES DE FLUJO GÉNICO HISTÓRICO.	40
V. DISCUSIÓN.....	45
5. 1 DIVERSIDAD GENÉTICA.....	45
5.2 ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL.....	50
5.3 EVOLUCIÓN DE LA PEDOMORFOSIS	52
5.4 TAMAÑO EFECTIVO POBLACIONAL HISTÓRICO Y PATRONES DE MIGRACIÓN HISTÓRICA	53
5. 5 IMPLICACIONES TAXONÓMICAS.....	56
5. 6 IMPLICACIONES DE CONSERVACIÓN	58
VI. CONCLUSIONES	60
VII. RECOMENDACIONES	61
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árbol basado en el método de neighbor joining de los miembros del complejo de <i>Ambystoma tigrinum</i>	2
Figura 2. Mapa de ubicación de la zona de estudio y sitios de muestreo en la región de la Cuenca Oriental.	13
Figura 3. Esquema del perfil de los lagos cráter incluidos en el presente estudio.....	15
Figura 4. Patrones de diversidad genética de poblaciones de <i>Ambystoma</i> en cinco lagos cráter.	25
Figura 5. Coeficiente de r_{qg} (<i>relatedness</i>) de las poblaciones de <i>Ambystoma</i> de los lagos cráter de la Cuenca Oriental. IC son los intervalos de confianza.	30
Figura 6. Representación gráfica de un análisis de componentes principales (PCA) que muestra las relaciones entre las poblaciones de <i>Ambystoma</i>	34
Figura 7. Árbol de distancias genéticas entre los lagos cráter realizado con el método de NJ utilizando distancias de <i>Nei</i>	35
Figura 8. Estructura genética de las poblaciones de <i>Ambystoma</i> de los lagos cráter, inferida por asignación Bayesiana efectuado en STRUCTURE..	36
Figura 9. Probabilidades posteriores de los parámetros de migración de Alchichica hacia los demás lagos cráter obtenido del análisis de coalescencia.	42
Figura 10. Probabilidades posteriores de los parámetros de migración de todos los lagos cráter hacia Alchichica, estimados del análisis de coalescencia.	43
Figura 11. Probabilidades posteriores de los parámetros de migración de las poblaciones de Quechulac – Las Minas, obtenido del análisis de coalescencia.	44
Figura 12. Probabilidades posteriores de los parámetros de migración de Las Minas - Atexcac, obtenido del análisis de coalescencia	44

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Características principales de cinco lagos cráter de la Cuenca Oriental, Puebla, México	14
Cuadro 2. Información de los oligos, tamaños y condiciones de amplificación de los microsatélites empleados.	18
Cuadro 3. Variación genética y prueba de equilibrio Hardy-Weinberg en cinco poblaciones de <i>Ambystoma</i> en los lagos cráter, Cuenca Oriental, México..	27
Cuadro 4. Prueba de exceso de heterocigotos en las poblaciones de los lagos cráter de la Cuenca Oriental	29
Cuadro 5. Estructura genética de las poblaciones de <i>Ambystoma</i> de los lagos cráter, Cuenca Oriental.	31
Cuadro 6. Valores de F_{ST} y D_S pareada para todas las poblaciones de <i>Ambystoma</i> de los lagos cráter.	33
Cuadro 7. Estimaciones de θ y tamaño efectivo de población N_e de las salamandras de los lagos cráter de Cuenca Oriental empleando el programa MIGRATE	37
Cuadro 8. Estimaciones de θ y tamaño efectivo N_e de las poblaciones de <i>Ambystoma</i> basado en el análisis de coalescencia bajo el modelo de IM.	39
Cuadro 9. Estimaciones del número efectivo de emigrantes N_{e_x} m_{yx} entre las poblaciones de salamandras, obtenidos mediante el programa MIGRATE	41
Cuadro 10. Cuadro comparativo de diferentes estimaciones de variación y diferenciación genética de anfibios, utilizando microsatélites.	48

RESUMEN

La región Cuenca Oriental se ubica al centro este del Altiplano Mexicano. En ésta área se ubican 11 lagos cráter, seis de ellos contienen cuerpos de agua permanentes, de los cuales cinco albergan poblaciones de salamandras: Alchichica, Quechulac, Las Minas, Atexcac y Tecuitlapa. *Ambystoma taylori* es una salamandra pedomórfica obligada, que es endémica del lago de Alchichica. El resto de los lagos cráter, albergan poblaciones de *Ambystoma velasci* que es una especie metamórfica y de amplia distribución. *Ambystoma taylori* está considerada como una especie críticamente amenazada, debido a que su distribución es muy restringida (menor a 100 km²). El propósito de este estudio fue cuantificar patrones de diversidad genética y determinar si las poblaciones de salamandras de los lagos cráter presentan una estructura genética, usando microsatélites. Se muestrearon los cinco lagos cráter mediante buceo con equipo autónomo (SCUBA), procesando 30 muestras de individuos por cada lago, analizados con 11 microsatélites. Los análisis de variación genética revelan que *A. taylori* exhibe un patrón de diversidad genética diferente al que presentan las poblaciones de *A. velasci*. A diferencia de lo esperado, *A. taylori* exhibe gran diversidad genética, expresada como heterocigosidad ($H_e = 0.662$) y riqueza alélica (6.273). Estimaciones a partir de *likelihood* de N_e muestran un tamaño efectivo grande, el cual probablemente contribuye al mantenimiento de la diversidad genética alta que presenta. Las poblaciones de *A. velasci*, exhiben un patrón de diversidad genética variable, desde poblaciones con alta diversidad genética como Tecuitlapa ($H_e = 0.618$) hasta poblaciones con una reducida diversidad como las poblaciones de Atexcac y Las Minas ($H_e = 0.394$, $H_e = 0.441$ respectivamente). Además estas poblaciones que presentan estimaciones de N_e reducidos, por lo que muy probablemente procesos de endogamia con mayor intensidad puedan estar operando, dado que también presentaron estimaciones de *relatedness* altas ($r_{qg} = 0.531$ y $r_{qg} = 0.433$ respectivamente). Las poblaciones de los lagos cráter presentan una alta diferenciación poblacional (F_{ST} global = 0.280) indicando flujo génico limitado. Los análisis de asignación bayesiana utilizando STRUCTURE señalan que las poblaciones de *Ambystoma* de los lagos cráter también muestran una alta diferenciación poblacional, conformando cuatro demes genéticos. *A. taylori* forma uno, las poblaciones de *A. velasci* de Quechulac y Las Minas conforman otro, y dos demes distintos están

constituidos por las poblaciones de *A. velasci* de Atexcac y Tecuitlapa, respectivamente. Estimaciones de flujo génico histórico basado en *likelihood* revelan que existe un flujo escaso entre las poblaciones de *A. taylori* y de *A. velasci*. Las poblaciones de *A. velasci* presentaron un patrón de flujo génico variable, desde restringido en el caso de Tecuitlapa con respecto al resto de las poblaciones de *A. velasci*, hasta evidencia de flujo simétrico de las poblaciones de Quechulac y Las Minas que conforman un deme genético. Se propone considerar a cada deme genético como una unidad evolutiva significativa (ESUs) para dirigir esfuerzos de conservación de las salamandras de los lagos cráter de la Cuenca Oriental.

ABSTRACT

Oriental Basin is a hydrological basin in the eastern part of the Trans-Mexican Volcanic Belt. Oriental has eleven crater lakes, six of them permanent, with five having salamander populations. These crater lakes are Alchichica, Quechulac, Las Minas, Atexcac and Tecuitlapa. *Ambystoma taylori* is an obligate paedomorphic species endemic to lake Alchichica. The remains of populations that inhabit the other lakes are considered here as belonging to *Ambystoma velasci*, a metamorphic species, widespread in México.

Ambystoma taylori is a critically endangered species, which is on the IUCN red list due to its tiny distribution (less than 100 km²). The main objective of the present study was to determine the population genetic structure of the salamanders from these crater lakes. Specifically, the goals were to evaluate the genetic variability of *A. taylori* and *A. velasci*, to quantify the level gene flow between these species, and to discuss the conservation implications of our findings for *Ambystoma* populations of the Oriental Basin crater lakes. Toward this end, I employed 11 microsatellites molecular markers. The analysis of genetic variation showed that *A. taylori* has a higher level of genetic diversity than expected, in contrast to *A. velasci* populations. The higher genetic diversity of *A. taylori* was reflected in heterozygosity ($H_e = 0.662$) and allelic richness (6.273). High likelihood estimates of N_e indicated that the single population of *A. taylori* has a large effective population size that facilitates maintenance high of genetic diversity. The pattern of genetic diversity of *A. velasci* differs between populations, from high genetic diversity in Tecuitlapa ($H_e = 0.618$) to low in Atexcac and Las Minas ($H_e = 0.394$, $H_e = 0.441$ respectively). Additionally, these populations had low estimates of N_e and high relatedness ($r_{qg} = 0.531$ y $r_{qg} = 0.433$ respectively) suggesting that inbreeding may be intense. Estimates of F_{ST} and Bayesian analysis of the overall populations of crater lakes revealed high population differentiation with restricted gene flow ($F_{ST} = 0.280$). Bayesian analysis in STRUCTURE showed four genetically defined demes: *A. taylori* of Lake Alchichica, *A. velasci* of Quechulac and Las Minas, and the other two were *A. velasci* of Lake Atexcac and Lake Tecuitlapa. Likelihood estimates of gene flow (Nm) showed a limited level of gene flow among *A. taylori* and *A. velasci*. The pattern of gene flow was variable among the populations of *A. velasci*, from highly restricted in Lake Tecuitlapa to symmetric between Quechulac and Las Minas,

which conforming a genetic deme. These results suggest considering as evolutionarily significant units each genetic deme of populations of the Crater Lakes of the Oriental Basin to develop conservation strategies which may differ significantly between populations.

I. INTRODUCCIÓN

El complejo de salamandras *Ambystoma tigrinum* está constituido por varias especies politípicas, con gran variación en el patrón de coloración, historia de vida y ecología (Shaffer 1984a). Este complejo está formado por una especie ampliamente distribuída: *Ambystoma tigrinum*, que se subdivide en 5-7 subespecies distribuidas alopátricamente, desde el sur de Canadá a través de Estados Unidos hasta el norte de México, y por un grupo de unas 16 especies relacionadas con *Ambystoma velasci* que se distribuye desde el norte de México hasta el extremo sur del Altiplano Mexicano (Shaffer & McKnight 1996). En México es donde el complejo de *A. velasci* alcanza su mayor diversidad taxonómica y ecológica.

Shaffer & McKnight (1996) intentaron clarificar las relaciones filogenéticas de este complejo de salamandras mexicanas del género *Ambystoma*, empleando el marcador mitocondrial *d-loop* que tiene tasas de evolución rápida. Reconocen tentativamente ocho grupos, de los cuales al menos siete son considerados monofiléticos (figura 1). Las relaciones entre estos ocho linajes son difíciles de establecer con los datos empleados en su estudio, ya que apenas hay resolución tal como sugieren algunos valores de apoyo de ramas (*bootstrap*) inferiores o iguales al 50%. De forma concordante con la falta de resolución, ese estudio mostró una notable similitud génica entre las 16 especies de *Ambystoma* presentes en México.

De los grupos propuestos en la filogenia molecular de Shaffer & McKnight (1996), el clado del Este del Altiplano Mexicano (figura 1) está constituido por las poblaciones de salamandras que habitan cuerpos de agua permanentes llamados lagos cráter, ubicados en la Región de la Cuenca Oriental del estado de Puebla, todos ellos geográficamente cercanos. Este clado incluye poblaciones de salamandras pertenecientes a dos especies: *Ambystoma taylori*, la cual es una especie endémica del Lago de Alchichica y *Ambystoma velasci*, que habita los lagos de Alchichica, Quechulac, Las Minas, Atexcac y Tecuitlapa.

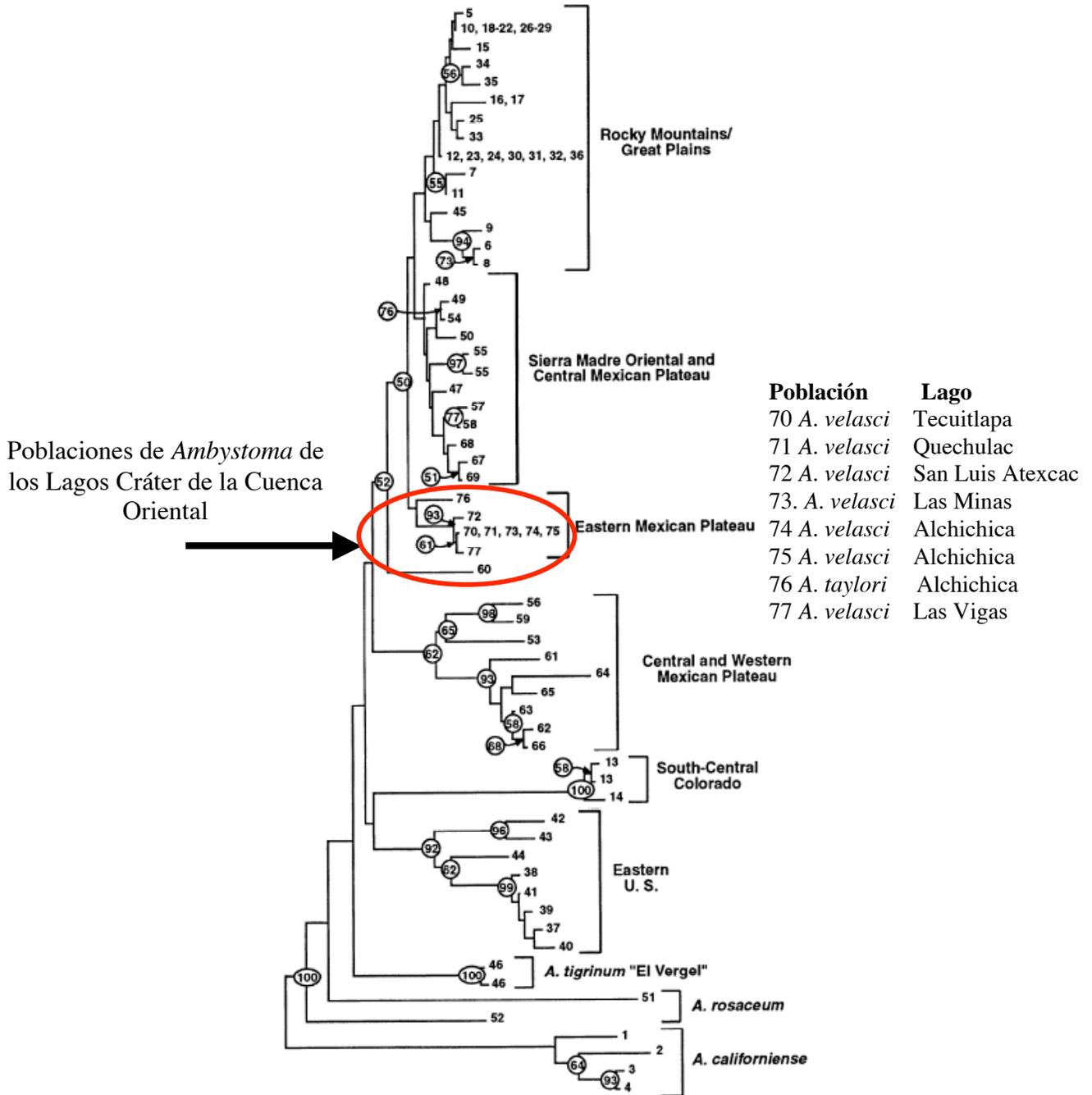


Figura 1. Árbol basado en el método de neighbor joining de los miembros del complejo de *Ambystoma tigrinum*. Los números en los círculos son los valores de bootstrap. Tomado de (Shaffer & McKnight 1996).

Algunas especies de *Ambystoma* exhiben un fenómeno de pedomorfosis, el cual es un tipo de heterocronía, descrito como un proceso que conlleva alteraciones morfológicas en el estado adulto como consecuencia de cambios en el tiempo y/o en las tasas de cambio de la formación ontogénica de caracteres morfológicos (Reilly 1997). Los fenómenos de pedomorfosis se manifiestan con claridad cuando se presenta madurez sexual y reproducción en ejemplares con morfología larvaria (Gould 1977). Algunas especies de *Ambystoma* pueden ser paedomorficas obligadas, debido a que han perdido la capacidad de sufrir metamorfosis completa. En otras especies, la pedomorfosis es resultado de la plasticidad fenotípica expresada sólo en una proporción de individuos de una población, llamados paedomorfos facultativos (Duellman & Trueb 1994, Whiteman 1994).

Algunos autores consideran que la evolución de la pedomorfosis en las especies mexicanas del género *Ambystoma* se ha presentado repetidamente de forma independiente (Shaffer 1984a, Shaffer & Mcknight 1996; Voss & Shaffer 1997), lo que ha conducido a incrementar la divergencia genética entre las poblaciones y por lo tanto a incrementar el potencial para la especiación (Shaffer 1984a). Además, se ha visto que la pedomorfosis conlleva ciertas ventajas adaptativas en ambientes acuáticos favorables (Harris 1987; Semlitsch 1987; Routman 1993). En las poblaciones de los lagos cráter la pedomorfosis está presente en *Ambystoma taylori* mientras que *Ambystoma velasci* es considerada como especie metamórfica.

1. 1 Especies de estudio: *Ambystoma taylori* y *Ambystoma velasci*

En 1943, Taylor describió una especie nueva de *Ambystoma* del Lago de Alchichica: *Ambystoma subsalsum*, la serie tipo constaba de ejemplares terrestres y pedomórficos. Taylor designó como holotipo a uno de los ejemplares transformados. En un estudio posterior Brandon *et al.*, (1981) demostraron que los ejemplares transformados y los ejemplares pedomórficos que utilizó Taylor correspondían en realidad a dos especies diferentes. Brandon *et al.*, (1981) indican que el holotipo de *A. subsalsum*, es en realidad un ejemplar de *A. velasci* (*A. tigrinum* en esa época) y que por lo tanto, el nombre de *A. subsalsum* es un sinónimo de *A. velasci*. Por otro lado, los ejemplares pedomórficos corresponden realmente a una especie distinta aunque sin nombre disponible (la que en

realidad quiso describir Taylor), para la que proponen el nombre de *A. taylori*. Para demostrar que el ejemplar metamórfico, holotipo de *A. subsalsum* realmente no correspondía a la especie neoténica presente en el lago de Alchichica, Brandon *et al.*, (1981) estudiaron numerosos ejemplares vivos en condiciones de cautiverio y comprobaron que los pocos ejemplares pedomórficos (es decir de *A. taylori*) que llevaban a cabo la metamorfosis eran claramente diferenciables del ejemplar que encontró Taylor y también de todos los ejemplares examinados de *A. velasci*. De igual forma, estos autores comprobaron que los ejemplares neoténicos de *A. velasci* de otras localidades diferían considerablemente de los de *A. taylori*.

En este mismo estudio Brandon *et al.*, (1981) revisaron adultos neoténicos de talla grande del Lago de Quechulac y de Las Minas (6 y 5 km, al sureste del lago de Alchichica, respectivamente; figura 2) y encontraron que los ajolotes de estos dos lagos se parecían entre sí, pero diferían morfológicamente de los pedomórficos de Alchichica y de las especies transformadas que habitan en la laguna del Carmen, dejando abierta la discusión de su estatus taxonómico. Además, examinaron adultos neoténicos, larvas, huevos y ejemplares transformados del lago de Tecuitlapa, 33 km SO de Alchichica. Los autores consideran que los ejemplares transformados del lago de Tecuitlapa, son más parecidos a los adultos transformados de la laguna del Carmen.

Siguiendo el criterio de Brandon *et al.*, (1981) existen dos especies de *Ambystoma* en los alrededores del lago de Alchichica: *A. taylori*, pedomórfico dentro del lago de Alchichica (posiblemente sin posibilidad de llevar a cabo la metamorfosis en condiciones naturales) y *A. velasci* que sí puede llevar a cabo una metamorfosis y que probablemente es incapaz de reproducirse en las aguas salobres del Lago de Alchichica. Además *A. velasci* es la especie que está presente en los lagos cráter cercanos al lago de Alchichica, como Quechulac, Las Minas, Atexcac y Tecuitlapa (Shaffer 1984b; Shaffer & McKnight 1996).

Ambystoma velasci es una especie de amplia distribución en México. De acuerdo con los datos mitocondriales esta especie es polifilética y tiene relaciones evolutivas complejas con las especies paedomórficas (*A. andersoni*, *A. mexicanum* y *A. taylori*). La

divergencia genética entre las especies paedomórficas y las poblaciones de *A. velasci* aledañas es muy baja de acuerdo al estudio de Shaffer & McKnight (1996). El estatus taxonómico de *A. velasci* no está claro pero sin embargo, Irschick & Shaffer (1997) la reconocen como un taxón distinto de *A. tigrinum*, aunque evidentemente forma parte de un complejo de especies, que probablemente representa un conjunto de especies crípticas (Highton 2000).

Dentro de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2000 de Protección Ambiental-especies de Flora y fauna silvestres de México, *A. taylori* y *A. velasci*, están consideradas como *especies sujetas a protección especial*. Esta categoría incluye “especies o poblaciones que podrían llegar a encontrarse amenazadas por factores que inciden negativamente en su viabilidad, por lo que se determina la necesidad de propiciar su recuperación y conservación de poblaciones de especies asociadas”. En la lista roja de especies críticamente amenazadas emitida por la IUCN, se encuentra *A. taylori*, debido a que: 1) su rango de distribución es menor a los 100 km² y su área de ocupación es menor a los 10 km² (Infonatura 2004); 2) todos los individuos constituyen una sola población (Shaffer *et al.* 2004). Asimismo, en los últimos años ha habido un decremento en el volumen del lago de Alchichica, poniendo en riesgo su permanencia (Alcocer *et al.* 1990, Alcocer *et al.* 2004). La Cuenca Oriental enfrenta problemas de deforestación, sobrepastoreo, sobreexplotación de los acuíferos y la salinización de los suelos derivado de malas prácticas de riego, introduciendo procesos de erosión severa y desertización generalizada (Alcocer *et al.* 1990, Alcocer *et al.* 2004).

1. 2 Microsatélites como herramienta en la genética de la conservación.

Una herramienta importante para estudios de conservación de especies a nivel poblacional son los marcadores moleculares llamados microsatélites (Goldstein & Schlötterer 1999). Estos nos permiten identificar poblaciones con una diversidad genética reducida y generalmente más vulnerables ante un posible cambio ambiental. Además nos permiten distinguir subpoblaciones genéticamente diferenciadas para dirigir esfuerzos de conservación hacia ellas, entre otras aplicaciones (Jehle & Arntzen 2002).

Los microsatélites son secuencias cortas de ADN de 1 a 6 pares de bases que se repiten un cierto número de veces. Las repeticiones pueden ser dinucleótidos como CA/TG siendo más frecuentes que AT y AG/TC o tri-tetra nucleótidos como CAG y AAT o GATA (Hancock 1999). Son marcadores codominantes, es decir, se pueden diferenciar individuos homocigóticos de los heterocigóticos (Goldstein & Pollock 1997; Beaumont & Bruford 1999) y son altamente polimórficos (tienen un alto número de alelos en un mismo locus) (Hancock 1999; Jehle & Arntzen 2002). Otra de las ventajas de trabajar con microsatélites es que es posible usar cantidades reducidas de ADN, lo que elimina la necesidad de sacrificar a los organismos (Taberlet & Luikart 1999, González 2003).

Los microsatélites aparecen con frecuencia en genomas nucleares de eucariontes y algunos procariotas (Jehle & Arntzen 2002). Su tasa de mutación se ha estimado que varía entre 10^{-2} y 10^{-5} por generación (Tautz 1989) y esto se explica por la acumulación de errores producidos por el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN (González 2003). Los microsatélites también son ampliamente usados en estudios de hibridación, divergencia poblacional, inferencia de procesos demográficos pasados, éxito reproductivo, estructura social, estructura poblacional genética y estudios de endogamia y parentesco (Beaumont & Bruford 1999).

Los microsatélites presentan patrones de mutación complejos que implican un cambio en el número de las repeticiones. El entendimiento de estos procesos de mutación es esencial dado que a partir de estos se realizan estimaciones de parámetros poblacionales. Los procesos de mutación que presentan los microsatélites son sensibles al modelo de mutación que se asume, debido a que pueden incrementar la tasa de mutación. Los modelos de mutación más discutidos y que se emplean frecuentemente son el modelo de alelos infinitos (Kimura & Crow 1964) y el modelo de mutación de un paso (*stepwise model* SMM) de Kimura & Ohta (1978). El primero asume que una mutación puede generar cualquier número de repetición y siempre va a resultar en un estado de alelo que no era previamente encontrado en la población, es decir se forman nuevos alelos diferentes a los que ya existían, por lo que la homoplasia no existe o es mínima. El segundo modelo asume

que las mutaciones de los alelos pueden ser por ganar o perder una sola unidad de repetición, por lo que posiblemente los alelos pueden mutar hacia un estado ya presente en la población y puede existir homoplasia.

Otro modelo menos utilizado es el de dos fases (Di Rienzo *et al.* 1994), similar al SMM donde las mutaciones pueden ser por ganar o perder X número de repeticiones, pero de mayor magnitud, además de que predice la varianza esperada en número de repeticiones bajo diferentes escenarios. En este modelo se pueden dar *mutaciones viejas*, es decir alelos ya existentes en la población, y también *mutaciones nuevas*, alelos nuevos en la población, con esto la cantidad de homoplasia existente será menor que en modelo de SMM.

La homoplasia por lo tanto se presenta por tamaño, es dependiente de la tasa de mutación de un locus y del tiempo de divergencia entre poblaciones. Hay evidencia directa e indirecta de que los microsatélites evolucionan en una forma de SMM, por lo que siempre se va a esperar una cantidad substancial de homoplasia por tamaño en los microsatélites, además de que se caracterizan por tener altas tasas de mutación y un rango limitado en el tamaño de los alelos, (reduciendo el número de posibles estados alélicos). Estas razones en parte, explican porque los estudios filogenéticos con microsatélites han sido restringidos a relaciones intra-específicas (Goldstein & Schlötterer 1999).

La secuenciación de microsatélites es una forma de poder detectar la presencia de homoplasia por tamaño. Así también, es posible detectar otra forma de cambio mutacional, que se presenta en la región de los flancos de las secuencias de repetición, donde puede haber inserciones o deleciones de uno o más nucleótidos. Especialmente se ha observado, cuando se compara a niveles interespecíficas y raramente a niveles intraespecíficas. No obstante, un análisis de la ortología de cada par de alelo, está limitado en términos económicos y de tiempo, particularmente si son análisis multilocus.

1. 3 Planteamiento del problema

El estudio de los procesos microevolutivos tales como la selección, la deriva génica, el sistema de apareamiento, el flujo génico y la mutación en el potencial para la adaptación en diferentes taxa es esencial para la comprensión del proceso evolutivo y sus implicaciones. Un primer acercamiento para conocer cómo operan tales procesos microevolutivos, es la descripción y cuantificación de la variación genética intrapoblacional y la identificación de los patrones de diferenciación genética entre poblaciones (Hedrick 2005).

Por otra parte, el conocimiento de la distribución y extensión del flujo génico entre las poblaciones contiene información sobre los factores que determinan si las poblaciones se encuentran fragmentadas o diferenciadas genéticamente. Si una población está subdividida, la cantidad de conectividad genética entre las distintas subpoblaciones depende de cuánto flujo génico exista entre estos grupos. Si el flujo génico es alto, provoca un efecto homogeneizador de la diferenciación genética de las poblaciones, pero si es bajo, procesos como deriva génica y selección pueden conducir al incremento de la diferenciación genética (Hedrick 2005). Por lo tanto, es primordial entender si las poblaciones se encuentran estructuradas y cuáles de los mecanismos mencionados están actuando en ellas.

Dado el proceso de pedomorfosis y la distribución restringida de *A. taylori* en la región de Cuenca Oriental, hace que sea un sistema ideal para examinar el efecto relativo de conectividad genética, flujo génico y tamaños poblacionales pequeños sobre la distribución de la variación genética entre poblaciones, posiblemente generalizables a otros organismos que habitan en sistemas geológicos similares (como las cuencas endorreicas a lo largo del eje neovolcánico). El conjunto de la información obtenida servirá para conocer el estatus genético de las poblaciones y generar propuestas de conservación y manejo de éstas poblaciones.

En concreto, se pusieron a prueba las siguientes hipótesis:

1. Como consecuencia de un reducido tamaño poblacional, *Ambystoma taylori* presenta una diversidad genética reducida.
2. Considerando que es una especie de mas amplia distribución y probablemente con un tamaño poblacional mayor, *Ambystoma velasci* presenta niveles de diversidad genética más altos que *A. taylori*.
3. La existencia de pedomorfosis obligada en *A. taylori* pero no en *A. velasci* tiende a incrementar su aislamiento reproductivo y por ello la divergencia poblacional será elevada.

II. OBJETIVO GENERAL

- ❖ Determinar el patrón de variación y estructura genética de las poblaciones de *A. taylori* y *A. velasci* en los lagos cráter de la Cuenca Oriental del Estado de Puebla, mediante el uso de microsatélites nucleares.

2.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Determinar y comparar el patrón de diversidad genética de *A. taylori* (especie pedomórfica obligada) y *A. velasci* (especie metamórfica).
- ❖ Determinar si existe flujo génico entre la población de *A. taylori* con respecto a las poblaciones de *A. velasci*.
- ❖ Determinar si existe flujo génico entre las poblaciones de *A. velasci*.
- ❖ Estimar el tamaño efectivo de las poblaciones de *A. taylori* y *A. velasci*, para efectuar posibles cálculos de la pérdida de diversidad genética y endogamia.
- ❖ Evaluar el estado de conservación de *A. taylori* y de las poblaciones de *A. velasci* de los lagos Cráter de la Cuenca Oriental en términos de diversidad genética y tamaño efectivo poblacional.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Área de estudio y sitios de muestreos.

Oriental es una cuenca hidrológica localizada en la zona oriental de la Faja Volcánica Transmexicana ubicada entre los estados de Puebla, Veracruz y Tlaxcala, 18°57' - 19°44' N, 97°10' - 98°05'W (Alcocer *et al.* 1998b). Su altitud promedio es de 2334 msnm y abarca una superficie de ≈ 4982 km² (figura 2). Está delimitada por dos estructuras volcánicas altas: la Sierra Madre Oriental y el Pico de Orizaba, con basamentos de arcilla del Cretácico (Gasca 1981). En la parte central de la cuenca, hay dos áreas de lagos efímeros El Salado o Tepeyahualco al norte y El Carmen o Totolcingo en la parte sur, producto del afloramiento del acuífero subterráneo y de las precipitaciones pluviales. Actualmente éstos lagos se han quedado secos y si se llegan a formar, es de manera esporádica (Alcocer *et al.* 1997, Alcocer *et al.* 2004). Contiene además 11 cráteres, seis de ellos contienen cuerpos de agua, nombrados como “axalapazcos”, y el resto han quedado secos, localmente referidos como “xalapazcos”.

Los lagos cráter que están presente en la Cuenca Oriental fueron formados por múltiples explosiones volcánicas, dejando estructuras con forma de cono y en cuyo cráter inactivo se formó un lago, alimentado de aguas subterráneas (Reyes 1979; Gasca 1981). Se propone que su origen fue en un tiempo de intensa actividad volcánica, que comenzó en la región desde el terciario medio (Oligoceno 33.7 – 23.8 millones de años) hasta el Cuaternario superior, durante el período del Pleistoceno fue la mayor actividad volcánica en el área (≈ 1.8 ma – 0.01 ma) (Gasca 1981).

Se dividen en dos grupos geográficos (Arredondo-Figueroa *et al.* 1983): 1) Alchichica, Quechulac, Las Minas y San Luis Atexcac, al norte, con una transición entre climas semiáridos y templados. 2) Aljojuca y Tecuitlapa al sur, con un clima predominantemente sub-húmedo. En conjunto cubren un área de 4.13 km² (Alcocer *et al.* 2004).

Alchichica es el lago cráter más grande (en área y volumen) de la Cuenca Oriental y está caracterizado por su alcalinidad ($\text{pH} > 9$) y agua hiposalina ($8.5 \pm 0.2 \text{ g/l}^{-1}$) (Vilaclara *et al.* 1993). La profundidad máxima del lago es de 60 metros, aunque el nivel del agua ha ido decreciendo durante las últimas décadas (Alcocer *et al.* 2004). El lago de Atexcac también contiene agua hiposalina ($6 - 7 \text{ g/l}^{-1}$) (Alcocer *et al.* 1998a, Lugo *et al.* 1998). Las características del resto de los lagos cráter se muestran en el cuadro 1 y se presenta un esquema del perfil de cada uno en la figura 3.

Las poblaciones de salamandras que se contemplan en este estudio se encuentran en los lagos del grupo 1: Lago de Alchichica, donde habita *A. taylori* que es una especie endémica de este lago (Brandon *et al.* 1981); Lago Quechulac, Lago de Las Minas, y Lago de San Luis Atexcac que albergan poblaciones de *A. velasci*. Del grupo 2 sólo el Lago de Tecuitlapa con poblaciones de *A. velasci* fue muestreado, ya que en Lago Aljojuca se realizaron muestreos esporádicos, sin haber registrado la presencia de éstas salamandras. No obstante comentarios verbales han sugerido la existencia que si hay salamandras en ese lago (Alcocer J *comunicación personal*).

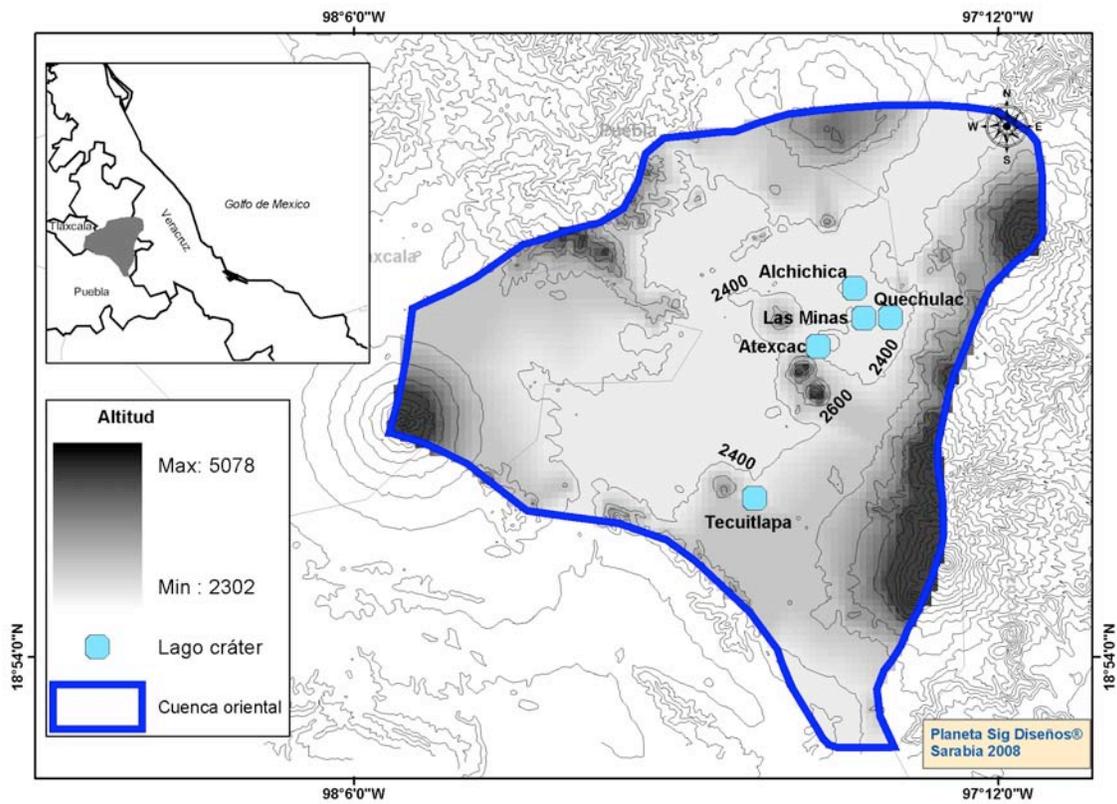


Figura 2. Mapa de ubicación de la zona de estudio y sitios de muestreo en la región de la Cuenca Oriental.

Cuadro 1. Características principales de cinco lagos cráter de la Cuenca Oriental, Puebla, México. Fuente: Arredondo-Figueroa *et al.* (1983), Vilaclara *et al.* (1993), Caballero *et al.* (2003), Filonov *et al.* (2006). Los datos de latitud y longitud están en grados decimales. La precipitación esta dada por milímetros por año (mm/año).

Lago Cráter	Latitud	Longitud	Superficie (km^2)	Profundidad (m) ¹ máxima/ promedio	Altitud (m)	Clima	Precipitación promedio anual	pH
Alchichica	19.4166	97.4000	2.3	60/40.9	2350	Sub-árido	<400	9.0
Quechulac	19.3666	97.3500	0.50	40/21.71	2395	Sub-árido	<500	8.4
Las Minas	19.3666	97.3836	0.78	45/20.7	2365	Sub-arido	<500	8.7
Atexcac	19.3333	97.4500	0.29	39/25.7	2510	Sub-árido	500	8.4
Tecuitlapa	19.3666	97.3500	0.26	2.5/1.36	2390	Templado	600	8.5

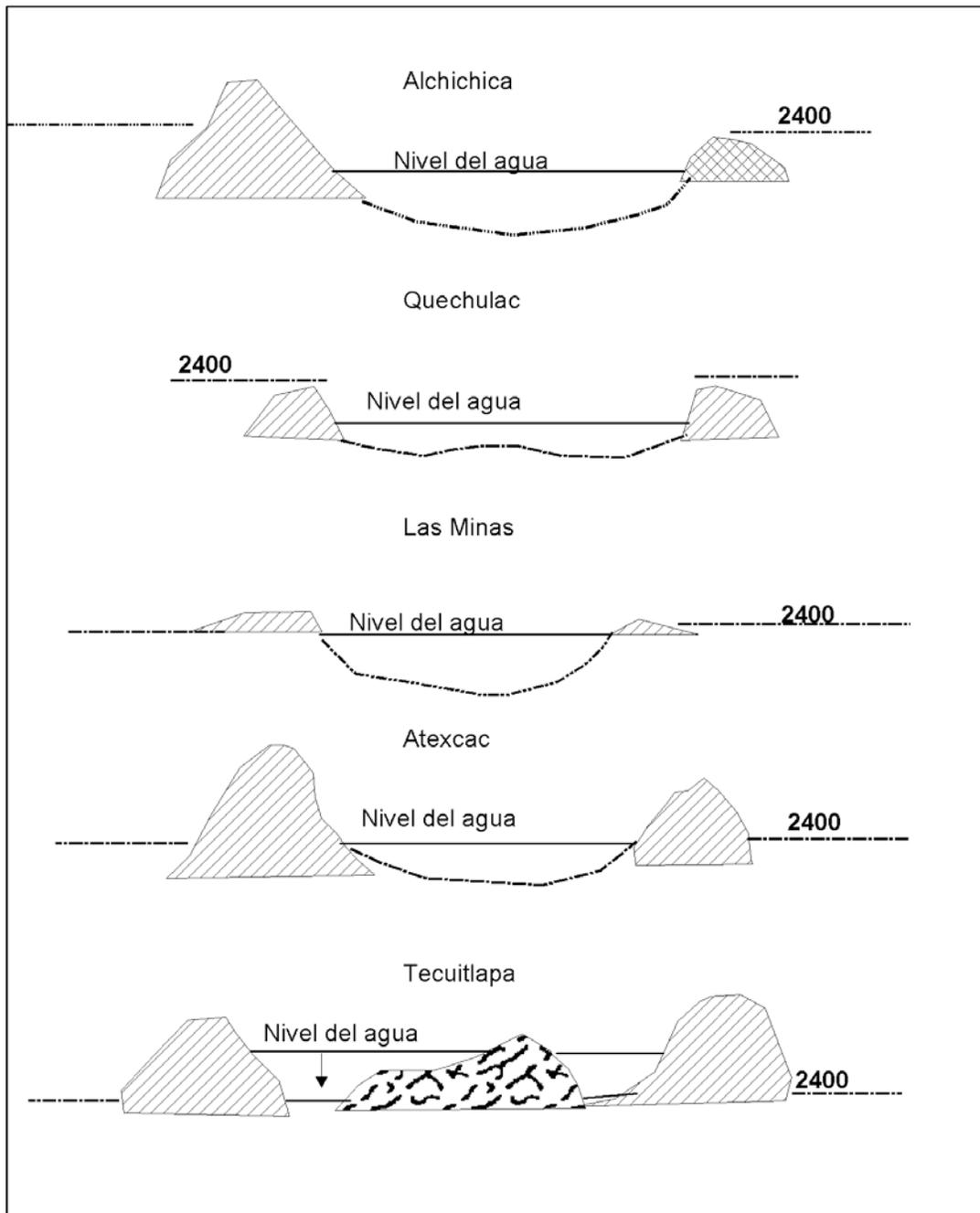


Figura 3. Esquema del perfil de los lagos cráter incluidos en el presente estudio. Tomado de Gasca (1981). Escala a 1:20 000.

3.2 Obtención de muestras.

En el 2005 se llevaron a cabo dos salidas al Lago de Tecuitlapa, con recorridos en lancha y el uso de atarraya. Se obtuvieron 40 organismos de los cuales se tomaron muestras de tejido (cola o hígado) que se colocaron en alcohol al 100% y después fueron congeladas en un ultracongelador a -70°C en el Instituto de Biología, UNAM. Posteriormente se realizaron cuatro salidas de campo usando buceo con equipo autónomo (SCUBA) con la ayuda del Equipo de Buceo de la Facultad de Ciencias, UNAM, para los Lagos de Alchichica, Quechulac, Las Minas y Atexcac. Los organismos fueron capturados con una red de mano, subidos a superficie en donde se les tomaba una muestra de tejido y eran liberados posteriormente en el lago. Se obtuvo en promedio 35 muestras por lago. Los organismos fueron encontrados desde los 12 metros (Quechulac) hasta los 15 y 20 metros de profundidad en Alchichica, Las Minas y Atexcac.

3.3 Trabajo de laboratorio

3.3.1 Extracción de ADN genómico

Se procesaron 30 muestras de cola o hígado por cada lago. Se realizó el procedimiento de extracción de ADN genómico de las muestras congeladas siguiendo un protocolo de Fenol-Cloroformo/Proteinasa SDS. Se verificó la cantidad de ADN corriendo $5\mu\text{l}$ de la muestra con azul de bromofenol en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. La visualización fue hecha mediante un transiluminador de luz ultravioleta y todas las muestras fueron almacenadas a -4°C .

3.3.2 Obtención de microsatélites.

Se emplearon 11 microsatélites de los cuales nueve fueron desarrollados para el complejo *A. velasci* de México por Parra-Olea *et al.* (2007). Los otros dos loci ATS4-20 fueron previamente caracterizados por Mech *et al.*, (2003) y Atex65 por Williams & DeWoody

(2004) para las especies *Ambystoma tigrinum* y *Ambystoma texanum* de los Estados Unidos. En el cuadro 2 se presentan sus características.

Cuadro 2. Información de los oligos, tamaños y condiciones de amplificación de los microsatélites empleados. T_a es la temperatura de “annealing” en °C a la cual se optimizó la PCR. F y R son los oligos de “ida” 5' –3' y “regreso” 3' – 5' respectivamente.

Locus	Fragmento repetido	Secuencia del Oligo	Rango de tamaño	T_a (°C)
AT52.29	(CT) _n	F:TGCAGGCACAGAAAAGGGTAACAAAAGA R:CTGGGGAAGAGGGACTGAGGGAGACAA	248-317	72
AT52.1	(GA) ₁₅ GT(GA) ₂ GTGAGT(GA) ₂₇	F:GACACCCACAATGCATTTCTACACC R:GCTCTGGCCTTACCCTGCTATCC	378-392	72
AT60.3	(AG) ₃₀ (TG) ₁₁	F:TTTGCCAATGTTTACCTGCCTGAAT R:TGAGTCATGCCTTTCCTGGTGTA	202-240	65
AT52.6	(ATGT) ₃ (ATCT) (ATGT) ₅	F:TACTCAATATCAGACTCCCCAAATGT R:CCTATCCCTTCCCCAGCACTCC	132-185	67
AT52.20	(TC) ₁₇	F:TTCCTCTTCCCACTTCTCGTTCTGTATT R:TTTCGAGGGTAAGGGTCTATTGATTC	264-305	68.5
AT52.10	(GTT) ₇	F:GGTGCAACGAGGCAGTTTTTACCTATTT R:GTCGCTCCTTTCCTAAGCAAAGTAT	417-441	58.5
AT52.16	(TG) ₈ CG(TG) ₃ (CGTG) ₂ ..(TG) ₁₄	F:TGCTTGATTTATTTTACATTATTTA R:ATTCTACTATTTTTCAGCAGGCACAT	376-449	59
AT52.2	(GATT) ₈	F:GGGAGAGCCAGCCACAGAGTAT R:CCCTTTGCCACAGTTAATTGCTTTTT	223-251	58
ATIG52.115	(TC) ₁₅	F:AGCACAAGTTCTGAACCTTTCAC R:CCGATCACTCGGGTACTGT	225-261	63.5
Atex65	(GATA) ₁₉	F:TTCTGAGCTGTCCATGTTTCATATGC R:CGCTAGGAAGTCACATTTACTTTGTC	257-323	58
ATS4-20	(CA) ₉	F:TGTTTTGCCCTTATGTCG R:GCCCAAATCCTAAAGAGTAAGT	374-390	51

3.3.3 Amplificación de microsatélites mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Cada PCR se hizo a un volumen total de 10µl, añadiendo: 1µl del ADN diluido (1:50µl) ; 0.2µl del oligo de cada loci, el oligo de reversa fue marcado con fluorescencia (Applied Biosystem); 6.45 µl de agua; 2.5 µl de buffer 10x; 1µl de MgCl₂; 0.1µl, de DNTP y 0.2µl y de taq (Invitrogen). Los loci se amplificaron bajo las siguientes condiciones: temperatura de desnaturalización a 94°C por cinco minutos, de acoplamiento a 94°C por un minuto y de extensión a 72°C por 30 minutos seguidos de otros 35 ciclos. Las temperaturas de *annealing* se muestran en el cuadro 2. Estas reacciones se hicieron en un termociclador modelo PTC-100.

Para verificar la calidad y el tamaño del producto amplificado se corrieron 5µl en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, junto con una escala de peso molecular de 100kb. La visualización se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta.

3.3.4 Genotipificación de los microsatélites.

En un secuenciador ABI310 se genotipificaron todas las muestras, utilizando un tamaño interno estándar ROX –500 (Applied Biosystem). Posteriormente se usó el programa de GENESCAN v. 3.1 y GENOTYPER v. 2.1 (Applied Biosystem) para obtener el tamaño de los alelos de cada locus para cada muestra.

3. 4. Análisis de los datos.

El análisis de los datos se divide en cuatro secciones: 1. Cuantificación de la diversidad genética de las poblaciones, 2. Estructura genética de las poblaciones utilizando las estimaciones de F_{ST} y análisis Bayesianos, 3. Tamaño efectivo poblacional y 4. Patrones de migración histórica de las poblaciones.

3.4.1 Análisis de diversidad genética

Para cuantificar los niveles de diversidad genética de las poblaciones se emplearon diferentes índices: número promedio de alelos por locus (n_a), número efectivo de alelos n_e , frecuencias alélicas y porcentaje de polimorfismos, estimados mediante el programa de cómputo GENALEX v. 6 (Peakall & Smouse 2006). Se hizo un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) para evaluar si existían diferencias significativas entre los niveles de diversidad genética empleados entre todos los lagos (Zar 1999). Posteriormente se empleó la prueba *post hoc* de Tukey para ver entre que lagos se dan esas diferencias. Cuando las estimaciones de diversidad no cumplieron con los supuestos paramétricos, se utilizó un análisis de varianza no paramétrico de rangos Kruskal-Wallis (Zar 1999), y las pruebas *post hoc* que se utilizaron fue la de Dunn. Estos análisis estadísticos fueron realizados en el programa Sigma-Stat v. 2.

Para evaluar si las poblaciones se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg (H-W), se estimó la heterocigosidad esperada H_E y la heterocigosidad observada H_O de las frecuencias genotípicas por locus y por población; posteriormente se evaluó estadísticamente la desviación del equilibrio de H-W con la prueba exacta de Fisher (Guo & Thompson 1992) que utiliza una aproximación de Monte-Carlo y se utilizó también la corrección de Bonferroni. Se evaluó la unión de ligamiento de todos los loci mediante la prueba de probabilidades exacta implementada en GENEPOP v. 3.1 (Raymond & Rousset 1995).

En los casos donde se observó desviaciones de las proporciones de H-W, se utilizó el programa MICRO-CHECKER (Van Oosterhout *et al.* 2004) para detectar la presencia de alelos nulos que son producto de errores en la genotipificación, debido a la no amplificación de alelos. La presencia de alelos nulos en un locus, puede causar desviación de las proporciones de H-W. También se realizó una prueba para identificar si los loci que mostraron desviaciones del equilibrio H-W, es debido a un déficit o exceso de heterocigotos. Esta prueba fue hecha en el programa GENEPOP v. 3.1 (Raymond & Rousset 1995).

Para investigar si las poblaciones han experimentado una reciente reducción de su tamaño efectivo poblacional (cuello de botella) se empleo el programa BOTTLENECK v. 1.2.02 (Piry *et al.* 1999). Este programa analiza si un número significativo de loci exhibe un exceso de heterocigosis, dado que la diversidad alélica se reduce más rápido que la heterocigosidad en poblaciones con cuello de botella (Cornuet & Luikart 1997). Se utilizó el modelo de mutaciones de dos fases (*two-phased model of mutation* TPM Di Rienzo *et al.* 1994) y la prueba para evaluar la significancia fue la de Wilcoxon (Luikart & Cornuet 1998). Además se utilizó el descriptor cualitativo de la distribución de las frecuencias alélicas llamado “*mode – shift*”, el cual identifica poblaciones estables, de poblaciones que presentan cuellos de botella (Luikart *et al.* 1997).

Como una medida de endogamia, se evaluó el grado de relación genética (*relatedness*) entre individuos dentro de cada lago, usando el estimador de *relatedness* r_{qg} de Queller & Goodnight (1989). Este estimador es la proporción de alelos compartidos entre dos individuos debido a descendencia común (frecuentemente conocido como identidad por descendencia). Esta medida se calculó con el programa de computo GENALEX v. 6 (Peakall & Smouse 2006). Se estimaron intervalos de confianza al 95% de r_{qg} mediante un remuestreo de *bootstrap* para cada población. Si los valores de r_{qg} de cada población caen arriba de los intervalos de confianza esperados, indican que procesos como endogamia, deriva génica o un sesgo reproductivo están incrementando el *relatedness* o parentesco genético.

3.4.2 Análisis de estructura genética de la población.

Para determinar la estructura genética de las poblaciones, se realizó una prueba de diferenciación poblacional global F_{ST} (no asumiendo equilibrio H-W dentro de las poblaciones) efectuada en programa FSTAT v. 2.9.3.2 (Goudet 1995; 2001). Esta prueba realiza la permutación de los genotipos entre las poblaciones para crear una distribución nula y hace la comparación con los niveles de diferenciación observados de la población (Goudet 1995). Se calculó de forma global los estadísticos F_{IS} y F_{IT} , el primero es una

medida del déficit de heterocigotos dentro de poblaciones debido a endogamia y el segundo estima la reducción en heterocigosidad de un individuo con respecto al total de la población, debido a deriva génica entre subpoblaciones (Hedrick 2005). Ambas estimaciones fueron efectuadas en el programa FSTAT v. 2.9.3.2. Consecutivamente, se calculó el grado de subdivisión entre todos los pares de poblaciones mediante estimaciones de F_{ST} pareadas. A partir de estas estimaciones se realizó un análisis de componentes principales entre todos los pares de poblaciones para visualizar gráficamente los agrupamientos genéticos.

F_{ST} es una medida de divergencia poblacional basada en la varianza de las frecuencias alélicas entre las poblaciones, usando el estimador de θ de Weir & Cockerham (1984). Estas pruebas fueron realizadas en FSTAT v. 2.9.3.2 (Goudet 1995). Además se calcularon las pruebas estadísticas de significancia para F_{ST} mediante la permutación y el remuestreo de los genotipos multilocus entre los pares de poblaciones. Se realizaron 10000 permutaciones aleatorias para tener una tabla de significancia a un nivel del 5% nominal después de las correcciones estándares de Bonferroni.

También se utilizó otra medida de distancia genética, D_S de Nei (1987) entre todos los pares de las poblaciones mediante el programa GENALEX v. 6. D_S es comúnmente empleada y fue derivada de un modelo de mutación de alelos infinitos. Con base en estos valores se realizó un árbol con el método de *neighbor joining* (NJ) con el fin de representar gráficamente las distancias.

3.4.3. Análisis de la estructura poblacional mediante estimaciones bayesianas.

Para probar la estructura poblacional y asignar los individuos a demos genéticos, se utilizó un método de agrupamiento bayesiano efectuado en el programa STRUCTURE v. 2.1 (Pritchard *et al.* 2000). El método supone K agrupaciones genéticas, cada una caracterizada por el conjunto de frecuencias alélicas de cada locus. Los individuos en la muestra son asignados (por probabilidad) a poblaciones sobre la base de su genotipo, y simultáneamente se estiman las frecuencias alélicas de la población. Se empleó el modelo de mezcla

(*admixture model*), el cual estima por probabilidad, la proporción de individuos con ancestría en cada agrupamiento.

El programa STRUCTURE realizó el agrupamiento de las muestras excluyendo la información de la población de origen y suponiendo independencia entre los loci. Se estima la $Pr(X|K)$, donde X representa a los datos; K es el número de demes esperados (entre 1 y 6) asumiendo que todas las poblaciones pertenecieran al mismo deme reproductivo. La media y varianza de la verosimilitud para cada K fue calculada por 20 iteraciones independientes con un corrida de 3 000 000 de iteraciones (seguidas de 200 000 iteraciones del periodo del *burn in*). A partir de estas iteraciones se determina el valor más probable de K (con el valor de probabilidad posterior más alto). Posteriormente se usa el ΔK que toma en cuenta la forma de la curva de verosimilitud con el incremento de K y la varianza entre las estimaciones de las múltiples corridas (Evanno *et al.* 2005). Finalmente, se graficaron los coeficientes de ancestría de los individuos y de los demes inferidos mediante el programa DISTRUCT v. 1 (Rosenberg 2004).

3.4.4 Tamaño efectivo de las poblaciones y flujo génico.

Se estimó el tamaño efectivo poblacional (N_e) y tasas de migración histórica (M) de las poblaciones bajo un modelo de coalescencia. Se utilizaron dos programas de cómputo: MIGRATE 2.1.3 (Beerli & Felsenstein 1999, 2001) y IM (Hey & Nielsen 2004, 2005, 2007). Se calculó el estimador theta θ como $4N_e\mu$, donde N_e es el tamaño efectivo de la población y μ es la tasa de mutación. El estimador M se calcula a partir de $m\mu$. A continuación se describen las características de los programas y las condiciones que se utilizaron para realizar los análisis. La estimación de N_e fue calculada a partir de las estimaciones de θ usando una tasa de mutación de 10^{-4} que es la reportada en vertebrados (Lehmann *et al.* 1998, Thuillet *et al.* 2002, 2005).

El programa MIGRATE 2.1.3 sigue un método de máxima verosimilitud (L_{MAX}) basado en coalescencia y supone un modelo de n islas donde hay un equilibrio entre mutación-migración y deriva génica, con valores de θ y M constantes en el tiempo (Beerli

2004). El programa MIGRATE usa la aproximación de las cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) para encontrar el conjunto de parámetros del modelo que maximiza la probabilidad de los datos observados.

Se utilizó el modelo de un solo paso mutacional (*Stepwise Mutation Model SMM*; Ohta & Kimura 1973). Este modelo ha sido recomendado para el análisis de poblaciones que se han separado recientemente. El SMM es aplicado a la variación alélica en la cual cada mutación causa un incremento o decremento por un solo paso, cualquiera que sea la forma de medición de los alelos. En este caso los microsatélites experimentan altas tasas de mutación debido a un diferente número de repeticiones.

La estrategia de búsqueda fue usando máxima verosimilitud, haciendo varias corridas para encontrar la convergencia de los parámetros y siguiendo el SMM. El análisis final fue usando los parámetros obtenidos de las corridas previas, con las siguientes condiciones: 10 cadenas cortas de 1000 genealogías muestreadas cada 50 árboles, seguidas de 5 cadenas cortas de 10000 genealogías muestreadas cada 50 árboles. Los primeros 10000 árboles fueron descartados.

El programa IM (Hey & Nielsen 2004, 2005, 2007) también implementa el método de las cadenas de Markov Monte Carlo, para el análisis de los datos bajo el modelo de divergencia poblacional “Aislamiento con Migración” entre dos poblaciones relacionadas. El modelo supone que entre dos poblaciones relacionadas ha habido intercambio de genes por un periodo de tiempo indefinido; también sigue el modelo de mutación de un solo paso (*SMM*) (Kimura & Ohta 1978). Se realizaron todas las combinaciones por pares de poblaciones, sin embargo, sólo se reportan aquellas que alcanzaron una convergencia en los parámetros.

IV. RESULTADOS

4.1 Análisis de diversidad genética

Se estudiaron genéticamente 155 individuos en total de las cinco poblaciones. Todos los microsatélites empleados fueron polimórficos en todas las poblaciones.

El número de alelos por locus varió de 4 (locus ATS420) hasta 21 (locus AT52.29) (cuadro 3); el número promedio de alelos en cada población fue de 3.8 a 6.2 (figura 4). En general todas las poblaciones mostraron niveles de diversidad genética relativamente altos ($H_E = 0.44 - 0.66$, figura 4) mostrando diferencias estadísticas significativas ($H_4 = 12.20$, $P = 0.016$). Las diferencias estadísticas significativas en la heterocigosidad, se observaron entre los lagos de Alchichica y Atexcac (prueba *pos hoc* de Dunn $P < 0.05$) y entre Tecuitlapa y Atexcac (prueba *post hoc* de Dunn $P < 0.05$).

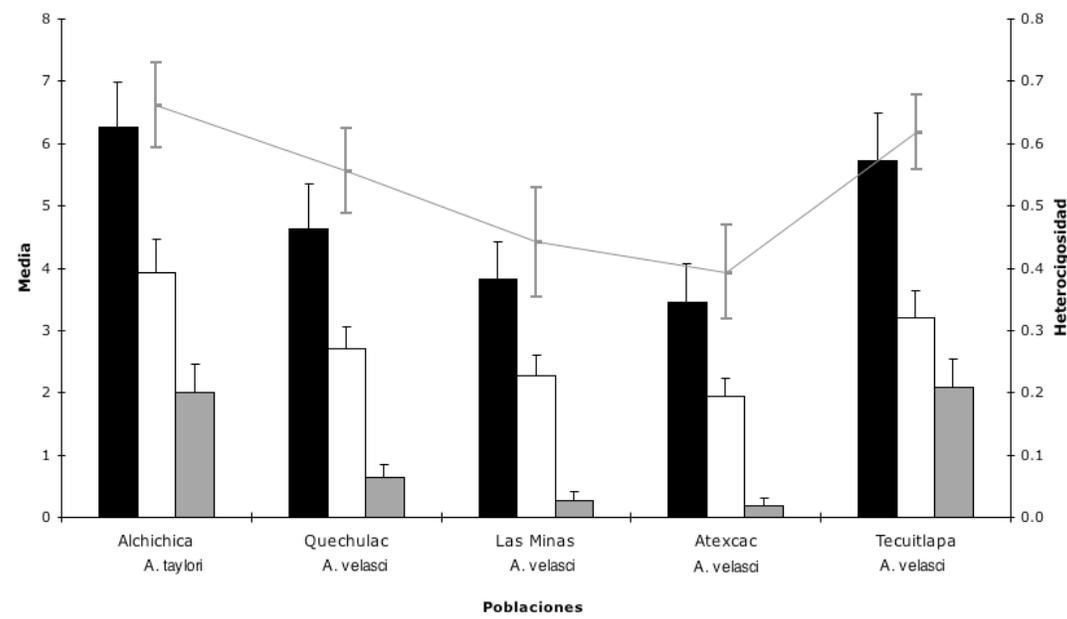


Figura 4. Patrones de diversidad genética de poblaciones de *Ambystoma* en cinco lagos cráter. Barras negras representan el número promedio de alelos (media \pm desviación estándar DS). Las barras blancas son el número promedio de alelos efectivos (media \pm DS). Las barras grises son el número promedio de alelos únicos (media \pm DS). Las líneas grises son la heterocigosidad promedio (media \pm DS).

El número efectivo de alelos es más alto en Alchichica con respecto a los otros lagos ($F_{4,50} = 3.914$, $P = 0.008$), observando diferencias estadísticas significativas entre Alchichica con respecto a los lagos de Las Minas y Atexcac (prueba *post hoc* de Tukey, $P = 0.007$ y $P = 0.036$ respectivamente). El número de alelos únicos también es más alto en Alchichica y Tecuitlapa con respecto a los otros lagos ($H_4 = 23.67$, $P < 0.001$), las diferencias estadísticas significativas se pueden apreciar entre los lagos de Alchichica y Tecuitlapa con respecto a los lagos de Las Minas y Atexcac (Prueba *post hoc* de Dunn $P < 0.05$) y además tienen el mayor número promedio de alelos los cuales en su mayoría son propios de éstas lagunas ($F_{4,50} = 3.115$, $P = 0.023$).

Con respecto a la heterocigosidad esperada varía de un 10% hasta un 85% con un promedio de 67.5% en todos los loci. La heterocigosidad observada varía entre 8% y hasta un 100%, con una media 47.6% de todas las muestras. La mayoría de los loci en todas las poblaciones están en equilibrio Hardy Weinberg (H-W) (cuadro 3); sin embargo, algunos de ellos muestran desviaciones dependiendo de la población de estudio, como es el caso de Alchichica que tiene loci que no mantienen las proporciones H-W, lo cual se debe a un exceso de y a la presencia de alelos nulos (cuadro 3), mientras que la población de Las Minas es la que tiene la mayoría de sus loci en equilibrio H-W.

Los loci que no están en equilibrio H-W no son consistentes en todas las poblaciones de estudio, por lo que se supone que los procesos que causan este desequilibrio son específicos a las poblaciones que los presentan, y por lo tanto se consideraron en los subsiguientes análisis. No se detectó desequilibrio de ligamiento en ninguna de las comparaciones pareadas de los 11 loci en todas las poblaciones ($P < 0.05$).

Cuadro 3. Variación genética y prueba de equilibrio Hardy-Weinberg en cinco poblaciones de *Ambystoma* en los lagos cráter, Cuenca Oriental, México. (N) número de individuos genotipificados, (PLP) porcentaje de loci polimórficos, (A) número de alelos, (*H_o*) heterocigosidad observada, (*H_e*) heterocigosidad esperada y (F) Índice de Fijación. Los valores marcados en negrita indican desviaciones significativas del equilibrio H-W después de las correcciones de Bonferroni para múltiples comparaciones ($P = 0.0009804$). La cruz (†) indica que ese locus en la población dada presenta un exceso de heterocigotos ($P < 0.05$) y la doble cruz ‡ indica un déficit de heterocigotos $P < 0.05$. El asterisco (*) indica la presencia de alelos nulos.

Locus		Alchichica	Quechulac	Las Minas	Atexcac	Tecuitlapa	Total alelos
N		30	30	30	35	30	
PLP	%	100	90.91	90.91	81.82	100	
At52.29	A	9	8	5	6	10	21
	<i>H_o</i>	1.000	0.679	0.783	0.484	0.773	
	<i>H_e</i>	0.840	0.804	0.715	0.493	0.843	
	<i>P</i>	0.000 †	0.003	0.000 †	0.496	0.002	
	F	-0.190	0.156	-0.095	0.019	0.083	
At52.1	A	4	4	3	4	4	6
	<i>H_o</i>	0.080	0.308	0.091	0.419	0.480	
	<i>H_e</i>	0.186	0.706	0.168	0.508	0.695	
	<i>P</i>	0.002‡	0.000 ‡*	0.135	0.023‡	0.000 ‡*	
	F	0.571	0.564	0.460	0.175	0.310	
At60.3	A	7	6	4	1	8	11
	<i>H_o</i>	0.467	0.407	0.100	-	0.500	
	<i>H_e</i>	0.792	0.606	0.097	-	0.678	
	<i>P</i>	0.000 ‡*	0.007‡	1.000	-	0.000 ‡*	
	F	0.411	0.327	-0.034	-	0.263	
At52.6	A	4	3	3	4	4	7
	<i>H_o</i>	0.100	0.480	0.667	0.765	0.700	
	<i>H_e</i>	0.269	0.474	0.651	0.585	0.530	
	<i>P</i>	0.000 ‡*	1.000	0.741	0.015†	0.104	
	F	0.629	-0.012	-0.024	-0.307	-0.321	
Ats4-20	A	4	1	2	1	2	4
	<i>H_o</i>	0.467	-	0.379	-	0.036	
	<i>H_e</i>	0.608	-	0.479	-	0.101	

	<i>P</i>	0.132	-	0.265	-	0.055	
	<i>F</i>	0.233	-	0.207	-	0.648	
At52.20	<i>A</i>	5	7	4	5	7	15
	<i>Ho</i>	0.370	0.346	0.000	0.324	0.448	
	<i>He</i>	0.695	0.715	0.570	0.465	0.578	
	<i>P</i>	0.000 ‡*	0.000 ‡*	0.000 ‡*	0.002‡	0.000 ‡*	
	<i>F</i>	0.467	0.516	1	0.304	0.225	
At52.10	<i>A</i>	5	3	1	2	5	9
	<i>Ho</i>	0.524	0.370	-	0.086	0.724	
	<i>He</i>	0.713	0.578	-	0.082	0.700	
	<i>P</i>	0.000 ‡*	0.004*‡	-	1.000	0.11	
	<i>F</i>	0.266	0.359	-	-0.045	-0.034	
At52.16	<i>A</i>	9	8	6	7	6	18
	<i>Ho</i>	0.923	0.607	0.920	0.818	0.500	
	<i>He</i>	0.831	0.707	0.726	0.770	0.667	
	<i>P</i>	0.005†	0.051	0.000 †	0.000 †	0.000 ‡*	
	<i>F</i>	-0.110	0.142	-0.268	-0.062	0.251	
At52.2	<i>A</i>	4	4	4	2	3	7
	<i>Ho</i>	0.269	0.783	0.600	0.714	0.724	
	<i>He</i>	0.723	0.669	0.628	0.477	0.504	
	<i>P</i>	0.000 ‡*	0.832	0.799	0.0165	0.000	
	<i>F</i>	0.627	-0.169	0.045	-0.497	-0.438	
Atig52.115	<i>A</i>	10	5	8	4	5	16
	<i>Ho</i>	0.926	0.333	0.700	0.484	0.750	
	<i>He</i>	0.821	0.521	0.729	0.454	0.691	
	<i>P</i>	0.000 †	0.007‡	0.034	0.000	0.155	
	<i>F</i>	-0.128	0.360	0.040	-0.065	-0.086	
Atex65	<i>A</i>	8	2	2	2	9	13
	<i>Ho</i>	0.111	0.000	0.000	0.000	0.852	
	<i>He</i>	0.806	0.337	0.095	0.496	0.807	
	<i>P</i>	0.000 ‡*	0.000 ‡*	0.025‡	0.000 ‡*	0.000	
	<i>F</i>	0.862	1	1	1	-0.055	
F promedio		0.331	0.324	0.233	0.058	0.077	

Con referencia a reducción en el tamaño poblacional, no se detectó en ninguna población la presencia de un cuello de botella a un nivel de significancia de 95% (cuadro 4). El indicador *mode-shift* distingue poblaciones estables de aquellas que presentan cuellos de botella. Si la distribución de las frecuencias alélicas muestra una distribución normal con forma de L, se interpreta como una población que se encuentra en equilibrio bajo un modelo de deriva génica- mutación.

Cuadro 4. Prueba de exceso de heterocigotos en las poblaciones de los lagos cráter de la Cuenca Oriental. Los números en la tabla son los valores de *P*.

Prueba	Alchichica	Quechulac	Las Minas	Atexcac	Tecuitlapa
<i>(TPM Two-phase mutation model)</i>					
Wilcoxon	0.32031	0.43164	1.00	0.91016	0.89844
<i>Mode-shift</i>	normal	normal	normal	normal	normal

El coeficiente de r_{qg} (*relatedness o parentesco*) de Queller & Goodnight (1989) estimado entre los individuos de cada población fue significativamente más alto que el esperado de la distribución nula creada para todas las poblaciones (figura 5). Esto era de esperarse dada las restricciones evolutivas de la pedomorfosis que presentan estas poblaciones de salamandras y también al que se encuentran aisladas como se verá más adelante. Los valores de r_{qg} de Las Minas y Atexcac tienen las estimaciones más altas ($r_{qg} = 0.433$ y $r_{qg} = 0.531$ respectivamente). Este patrón es similar al de diversidad genética de los lagos cráter (figura 3) y a las estimaciones de tamaño efectivo poblacional (ver adelante).

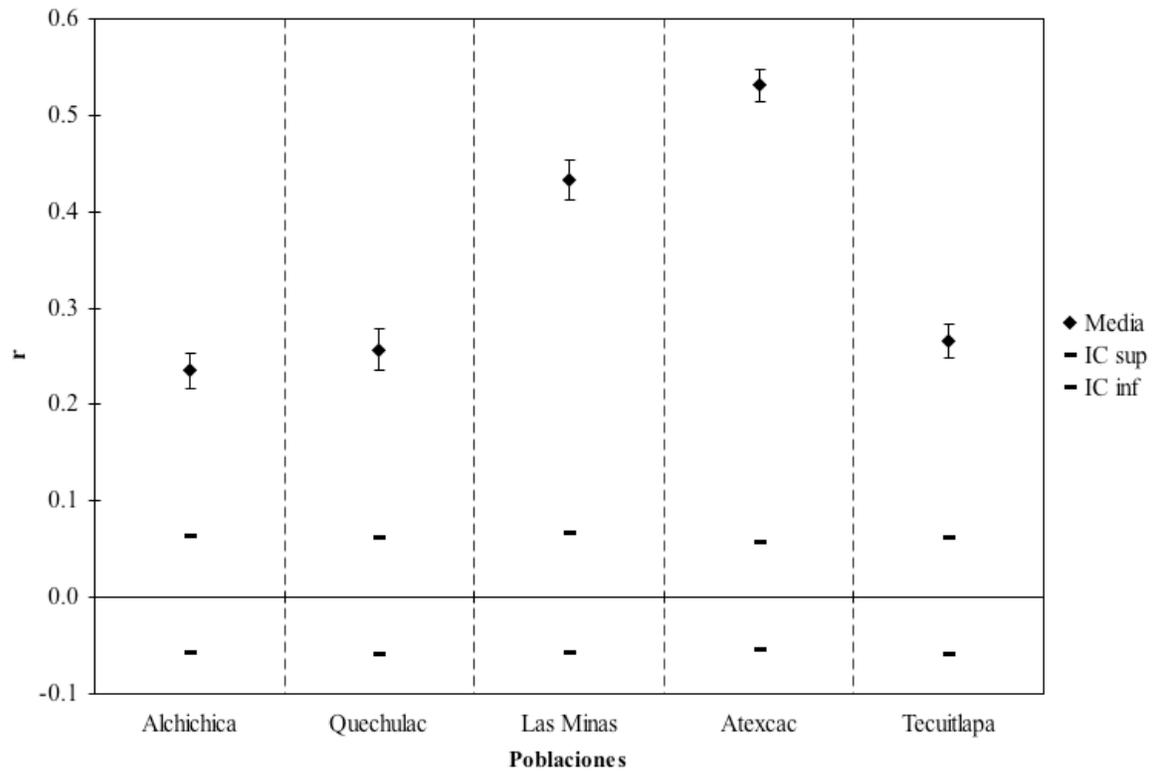


Figura 5. Coeficiente de r_{qs} (*relatedness*) de las poblaciones de *Ambystoma* de los lagos cráter de la Cuenca Oriental. IC son los intervalos de confianza.

4.2 Análisis de la estructura genética de la población.

Las estimación global de F_{ST} de las poblaciones fue de 0.280 (IC al 95% = 0.226-0.332) indicando divergencia poblacional (Cuadro 5). Este valor de F_{ST} es alto cuando se compara con otros grupos de salamandras del mismo género (Zamudio & Wieczorek 2006). El valor de F_{IS} global obtenido fue relativamente bajo, comparado con los F_{IS} de cada lago (cuadro 3). La estimación de F_{IT} fue un valor alto, lo que sugiere también una notable estructura poblacional.

Cuadro 5. Estructura genética de las poblaciones de *Ambystoma* de los lagos cráter, Cuenca Oriental. (IC = intervalos de confianza).

	Estadísticos	F_{ST}	F_{IS}	F_{IT}
Todas las poblaciones	Media	0.280	0.186	0.414
	IC inferior	0.226	0.055	0.286
	IC superior	0.332	0.347	0.549
	valor de P	0.00010	0.00091	0.00010

Las estimaciones de F_{ST} pareadas en todas las poblaciones fueron altas. Los valores van de 0.1748 a 0.3815, revelando altos niveles de diferenciación poblacional, sobre todo entre Alchichica y los demás lagos, así como entre Atexcac y Tecuitlapa (Cuadro 6). Esto se puede corroborar gráficamente en la figura 6, que muestra el patrón de diferenciación genética mediante un análisis de componentes principales. Los dos primeros ejes explican un 37.37% y 19.22% respectivamente. Se observan tres grupos: 1) Alchichica, 2) Atexcac y 3) Tecuitlapa. El eje uno separa el grupo de Alchichica y Atexcac, y el eje dos separa a

Tecuitlapa y los otros dos lagos: Quechulac y Las Minas. Este patrón se corrobora con los resultados obtenidos en el análisis de asignación bayesiana.

Cuadro 6. Valores de F_{ST} pareada para todas las poblaciones de *Ambystoma* de los lagos cráter (por debajo de la diagonal). Todas las comparaciones son estadísticamente significativas a una P de 5%. Los valores arriba de la diagonal son las distancias de *Nei* (D_S) y entre paréntesis están las distancias geográficas en kilómetros.

	Alchichica	Quechulac	Las Minas	Atexcac	Tecuitlapa
Alchichica	-	1.08 (7.0)	1.39 (5.7)	1.20 (10.6)	0.94 (35.5)
Quechulac	0.2810	-	0.35 (3.7)	0.36 (11)	0.41 (33)
Las Minas	0.3648	0.2101	-	0.31 (8.17)	0.68 (31.5)
Atexcac	0.3815	0.2440	0.2580	-	0.65 (25)
Tecuitlapa	0.2384	0.1748	0.2904	0.3151	-

<

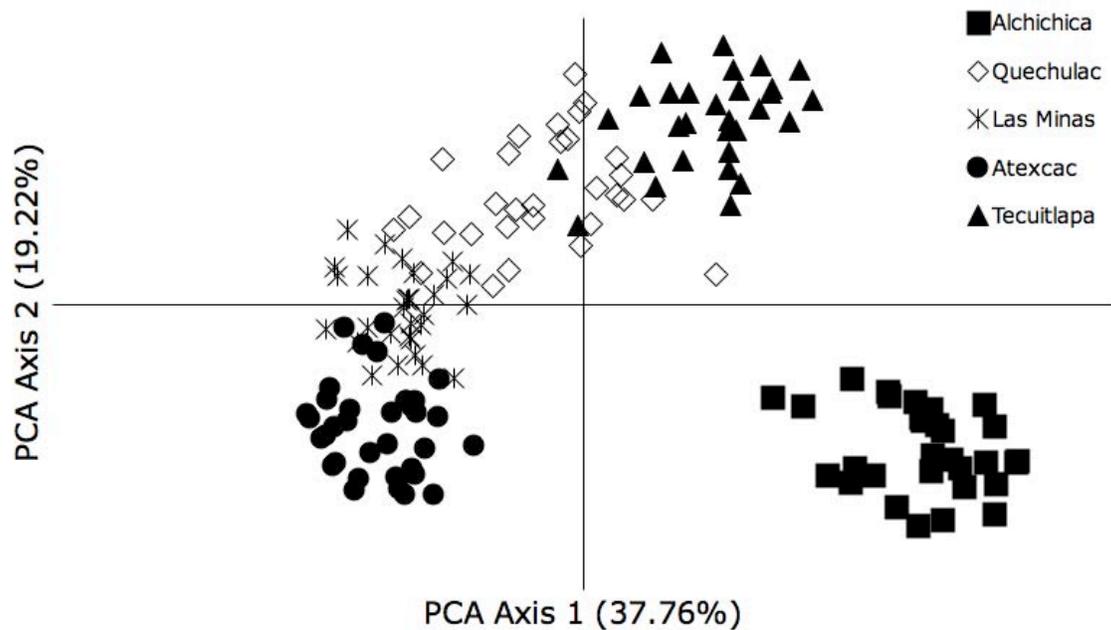


Figura 6. Representación gráfica de un análisis de componentes principales (PCA) que muestra las relaciones entre las poblaciones de *Ambystoma*. Se muestran los dos primeros ejes, con el porcentaje de variación explicado en paréntesis.

El árbol construido a partir de distancias genéticas de *Nei* muestra tres grupos: Alchichica, se separa claramente de los otros lagos. El otro grupo está constituido por Quechulac, Las Minas y Atexcac ($D_s = 0.315$), mostrando pequeñas distancias entre ellos, y el tercer grupo es el lago de Tecuitlapa (cuadro 6, figura 7).

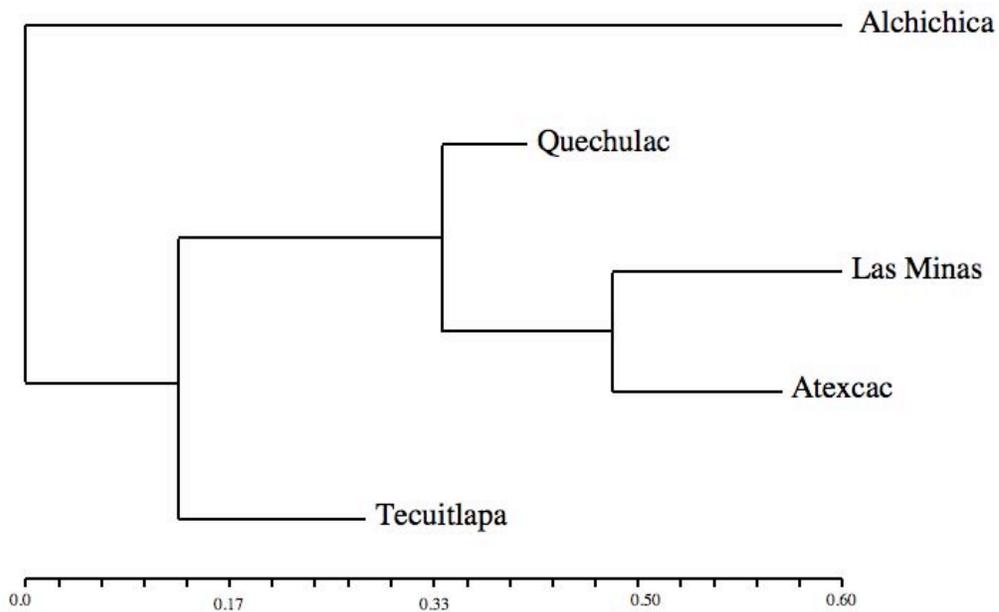


Figura 7. Árbol de distancias genéticas entre los lagos cráter realizado con el método de NJ (*neighbor joining*), utilizando distancias de *Nei*.

4.3 Análisis de la estructura poblacional mediante agrupamiento bayesiano

Los resultados obtenidos de los análisis de asignación bayesiana efectuados en STRUCTURE sugieren que los individuos estudiados caen dentro de cuatro demes genéticos $K=4$. Estos son: 1) Alchichica, 2) Quechulac-Las Minas, 3) Atexcac y 4) Tecuitlapa (figura 8). El $\Delta K = 4.21$ fue obtenido mediante el método que utiliza las curvas de *log* probabilidad (Evanno *et al.* 2005). Como se observó en la figura 6 del PCA, el grupo Quechulac-Las Minas, muestra una sobreposición de estas dos poblaciones, de forma similar, el análisis bayesiano los agrupa en un solo demo, como se muestra en la figura 8.

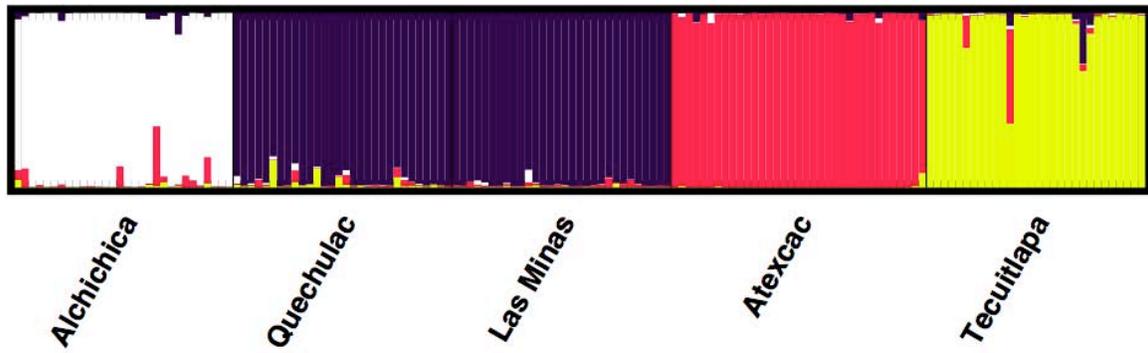


Figura 8. Estructura genética de las poblaciones de *Ambystoma* de los lagos cráter, inferida por asignación Bayesiana efectuado en STRUCTURE. Se distinguen cuatro demes genéticos: 1) Alchichica, 2) Quechulac-Las Minas, 3) Atexcac y 4) Tecuitlapa.

4.4 Tamaño efectivo poblacional histórico.

A continuación se presentan las estimaciones de tamaño efectivo poblacional histórico obtenido mediante el programa MIGRATE que supone un modelo de equilibrio entre migración y deriva génica. Posteriormente se presentan los resultados generados por el programa IM que supone un modelo de aislamiento con migración.

Los valores de tamaño efectivo obtenidos por MIGRATE son de un orden de magnitud más bajos en comparación de los estimados en el programa IM, sin embargo, ambos modelos coinciden en la tendencia del tamaño efectivo que presentan las poblaciones de salamandras de los lagos cráter.

El tamaño efectivo poblacional obtenido en MIGRATE, muestra que *A. taylori* de Alchichica es la población moderadamente más grande cuando se compara con el resto de las poblaciones de la Cuenca ($N_e = 1530.67$). Mientras que Atexcac y Quechulac, son las poblaciones que tienen el menor tamaño efectivo (cuadro 7).

Cuadro 7. Estimaciones de θ y tamaño efectivo de población N_e de las salamandras de los lagos cráter de Cuenca Oriental empleando el programa MIGRATE. IC = intervalo de confianza al 95%.

	θ	IC	N_e	IC
Alchichica	0.612	(0.564 - 0.630)	1530.67	(1411.02 - 1575.50)
Quechulac	0.218	(0.199 - 0.224)	544.01	(496.48 - 560.88)
Las Minas	0.256	(0.234 - 0.263)	639.47	(587.03 - 659.19)
Atexcac	0.179	(0.165 - 0.185)	448.39	(412.14 - 461.76)
Tecuitlapa	0.295	(0.271 - 0.303)	736.80	(678.57 - 758.35)

Los resultados obtenidos bajo el modelo de aislamiento con migración (IM), también apuntan que Alchichica es la población que tiene el mayor tamaño efectivo (5251-

6651) con respecto a los otros lagos, seguida por la población de Tecuitlapa (4088). La población con el menor tamaño efectivo es Las Minas; así también el lago de Atexcac exhibe un tamaño relativamente bajo (cuadro 8).

Cuadro 8. Estimaciones de θ y tamaño efectivo N_e de las poblaciones de *Ambystoma* basado en el análisis de coalescencia bajo el modelo de Aislamiento con migración, efectuado en el programa IM. IC = intervalo de confianza al 95%. a. Se reportan las estimaciones de los parámetros de los cuatro análisis pareados efectuados independientemente, que alcanzaron convergencia.

Comparación ^a	θ_1	θ_2	N_{e_1}	N_{e_2}
Alchichica x Quechulac				
MLE	2.3804	0.7865	6651	1966
IC	(0.98-4.34)	(0.26-1.83)	(2450-10850)	(650-4575)
Alchichica x Las Minas				
MLE	2.6604	0.2854	5951	714
IC	(1.54-4.90)	(0.28-0.85)	(3850- 12250)	(700-2125)
Alchichica x Atexcac				
MLE	2.1003	0.4311	6651	1078
IC	(0.98-4.34)	(0.1437-0.7185)	(2420-10850)	(359-1796)
Alchichica x Tecuitlapa				
MLE	2.6604	1.6350	5251	4088
IC	(1.54-4.34)	(1.04-2.53)	(3850- 10850)	(2600-6325)

4. 5 Patrones de flujo génico histórico.

Los resultados obtenidos bajo el programa de MIGRATE indican estimaciones en un orden de magnitud más altos que los registradas por el modelo de IM. MIGRATE reporta niveles relativamente pequeños de flujo génico hacia la población de *A. taylori* de Alchichica por parte de los otros lagos desde 1.25 a 1.9 número de emigrantes por generación (cuadro 9). A diferencia se presentan niveles moderados de Alchichica hacia el resto de los lagos (2.45 – 5.35). El nivel de flujo génico de las poblaciones de *A. velasci* de los lagos de Atexcac hacia Las Minas exhiben el nivel más alto de 11.71, así como de Atexcac hacia Quechulac y de Las Minas hacia Quechulac, 8.51 y 8.09 respectivamente (cuadro 9).

Cuadro 9. Estimaciones del número efectivo de emigrantes $Ne_x m_{yx}$ entre las poblaciones de salamandras de la Cuenca Oriental, obtenidos mediante el programa MIGRATE. Los números entre paréntesis son los intervalos de confianza al 95%.

	Fuente de migración (y)				
	Alchichica	Quechulac	Las Minas	Atexcac	Tecuitlapa
Lago receptor (x)					
Alchichica	-	1.762 (1.325 - 2.614)	1.903 (1.407 - 2.093)	1.750 (1.290 - 1.930)	1.252 (0.735 - 1.470)
Quechulac	2.457 (1.735 - 2.746)	-	8.092 (6.400 - 8.648)	8.513 (6.942 - 9.104)	6.147 (4.876 - 6.639)
Las Minas	3.012 (2.043 - 3.405)	3.917 (3.052 - 4.252)	-	11.718 (9.308 - 12.545)	1.508 (1.037 - 1.697)
Atexcac	5.354 (4.426 - 5.701)	3.627 (2.836 - 3.930)	8.380 (7.060 - 8.867)	-	2.412 (1.778 - 2.660)
Tecuitlapa	3.972 (3.235 - 4.248)	3.864 (3.175 - 4.129)	2.000 (1.357 - 2.261)	3.031 (2.285 - 3.321)	-

Las estimaciones de migración bajo el modelo de IM son un orden de magnitud menor que las obtenidas por MIGRATE. El patrón de migración de Alchichica hacia las poblaciones de *A. velasci* de Las Minas y Atexcac es bajo y nulo hacia Quechulac y Tecuitlapa (figura 9). Así también un patrón apenas visible de migración hacia la población de *A. taylori* de Alchichica por parte de los otros lagos (Figura 10).

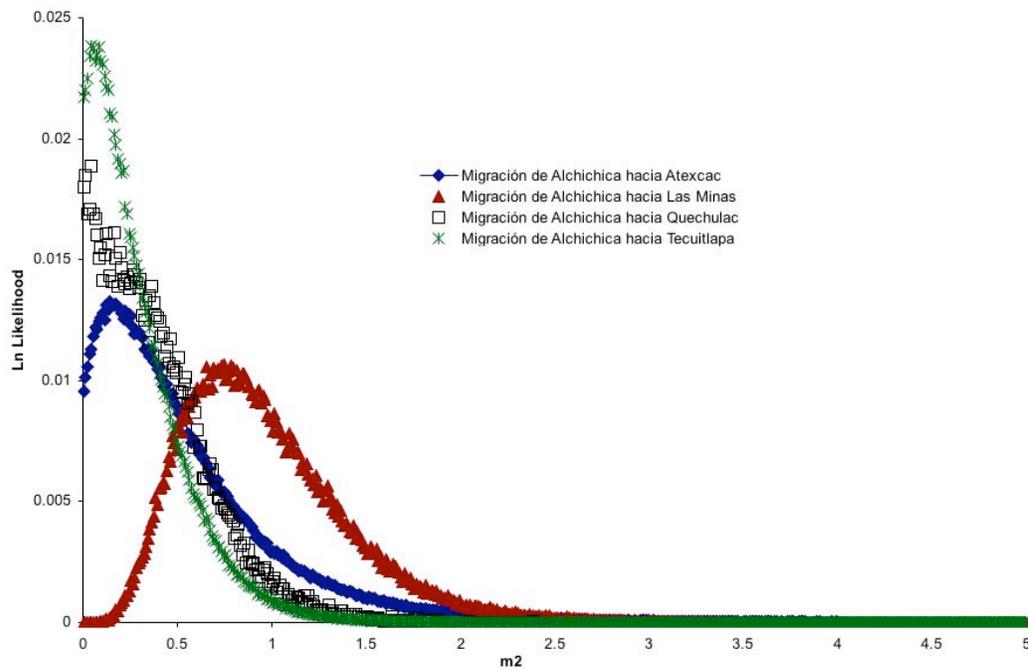


Figura 9. Probabilidades posteriores de los parámetros de migración de Alchichica hacia los demás lagos cráter obtenido del análisis de coalescencia bajo el modelo de IM.

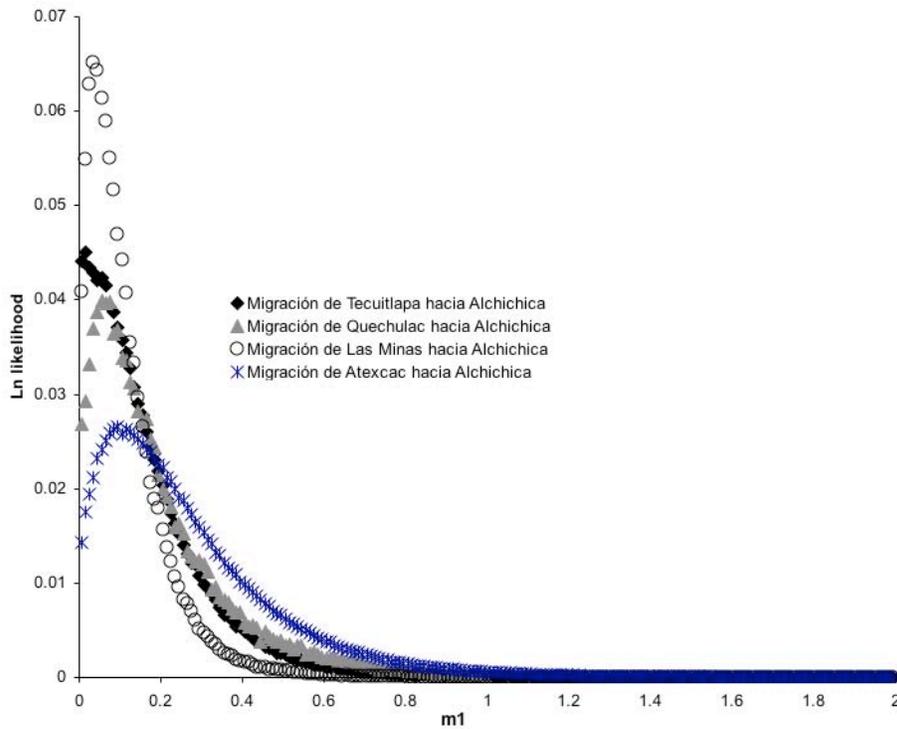


Figura 10. Probabilidades posteriores de los parámetros de migración de todos los lagos cráter hacia Alchichica, estimados del análisis de coalescencia bajo el modelo de IM.

En el caso de las poblaciones de *A. velasci* de Quechulac y Las Minas, se observa que existe un patrón simétrico de migración, siendo una de las estimaciones más altas encontradas entre todas las poblaciones (figura 11). Las poblaciones de *A. velasci* de Atexcac y Las Minas exhiben una migración asimétrica, siendo escasa la migración de Las Minas hacia Atexcac (figura 12), mientras que de Atexcac hacia Las Minas es más alta (figura 12), lo cual también se obtuvo bajo el modelo de MIGRATE.

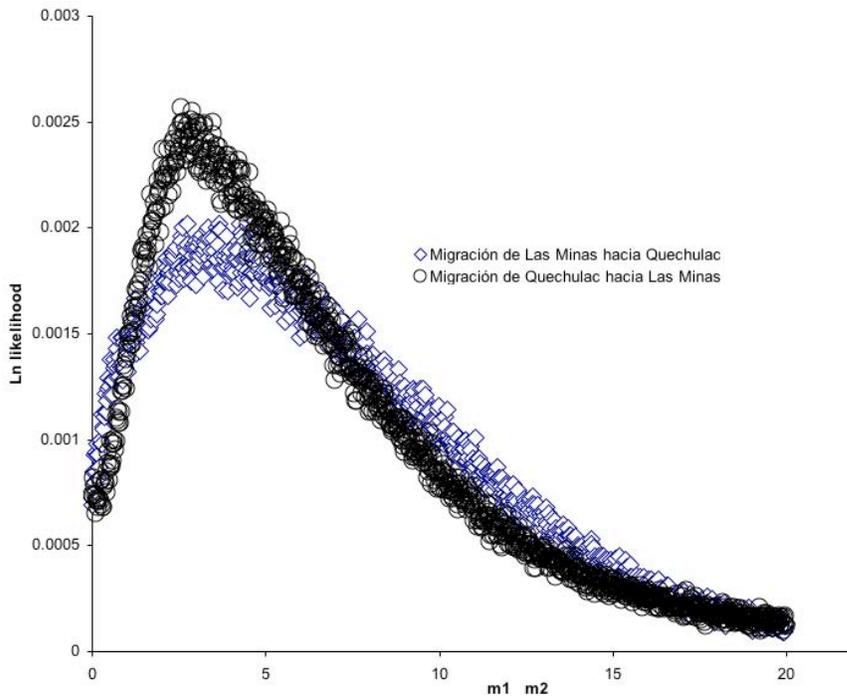


Figura 11. Probabilidades posteriores de los parámetros de migración de las poblaciones de Quechulac – Las Minas, obtenido del análisis de coalescencia bajo el modelo de IM.

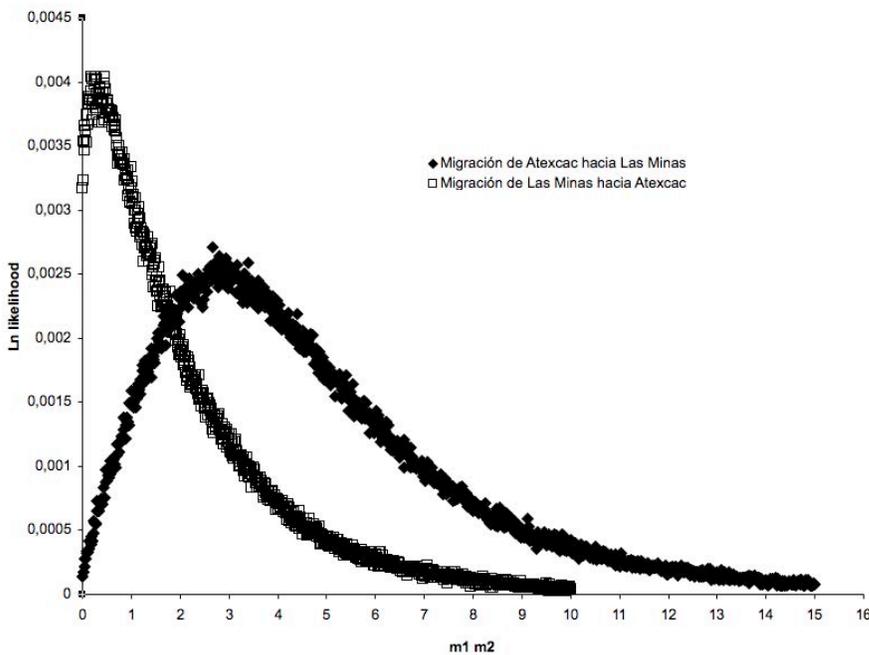


Figura 12. Probabilidades posteriores de los parámetros de migración de Las Minas - Atexcac, obtenido del análisis de coalescencia bajo el modelo de IM.

V. DISCUSIÓN

5. 1 Diversidad genética

Las poblaciones naturales contienen gran cantidad de variabilidad genética (Hedrick 2005), y uno de los retos de la genética de la conservación es el tratar de mantener esos patrones de variabilidad si es que hay una pérdida de ésta (Hedrick 2004). Estudios en anfibios utilizando microsatelites han sido utiles para detectar poblaciones con baja diversidad genética, como por ejemplo en anuros de las especies *Hyla arborea* debido a un efecto de endogamia y fragmentación de las poblaciones que reducen sus tamaños (Andersen *et al.* 2004), *Rana sylvatica* también por un efecto causado por la fragmentación de sus poblaciones (Newman & Squire 2001), *Rana temporaria* por una reducción en el tamaño poblacional (Palo *et al.* 2004), entre otras (ver cuadro 10).

En especies de salamandras, también se han registrado niveles de diversidad bajos como *Dicamptodon tenebrosus* asociado a pérdida de hábitat (Curtis & Taylor 2003) y *Ambystoma tigrinum* del Parque Nacional de Yellowstone, Estados Unidos. Las poblaciones de *A. tigrinum*, especie metamorfica, exhiben bajo niveles de diversidad genética (H_e promedio = 31.7, H_e 0.212 – 0.373), como resultado de procesos históricos tales como cuellos de botella que han reducido el tamaño efectivo y factores recientes como introducción de truchas en su hábitat y enfermedades emergentes (iridiovirus) (Spear *et al.* 2006).

En otros estudios de salamandras, se han reportado niveles de diversidad altos (Myers & Zamudio 2004; Steinfartz *et al.* 2006, Marsh *et al.* 2007, ver cuadro 10). Estos niveles de diversidad son similares a los registrados en las poblaciones de salamandras de Alchichica y Tecuitlapa, especialmente cuando se compara con las poblaciones de *Ambystoma maculatum*, especie metamórfica de Estados Unidos, utilizando también 11 microsatélites (Zamudio & Wieczorek 2007). La heterocigosidad promedio de *A. macualtum* ($H_e = 68.9$) es parecida a la obtenida en las poblaciones de los lagos cráter (H_e

= 67.5), aunque es diferente cuando se considera el número promedio de alelos; las poblaciones de *A. maculatum* presentan mayor número de alelos (4.9 – 9.2), en comparación con las poblaciones del presente estudio (3.8 – 6.2). No obstante, la medida de variación alélica es considerada una estimación pobre, dado su dependencia por el tamaño de muestra, por lo que el uso del valor de heterocigosis es un mejor estimador para hacer comparaciones entre otras poblaciones de otros estudios realizados.

La población de *A. taylori* presenta una heterocigosidad relativamente alta comparada con los estudios de salamandras metamórficas de *A. maculatum* y *A. tigrinum* como se ha mencionado anteriormente. Contrariamente a lo esperado, dadas las constricciones evolutivas que presenta como especie pedomórfica obligada y a su limitada distribución, frecuentemente asociada a una reducida heterocigosidad resultado de un tamaño poblacional pequeño. La alta heterocigosidad que exhibe *A. taylori* podría ser debida bien a que los individuos heterocigóticos son favorecidos por selección o bien como resultado de un tamaño efectivo poblacional grande, como se discutirá más adelante en el apartado de tamaño efectivo. No obstante, el valor del índice de fijación de Alchichica es relativamente alto (cuadro 3) lo cual se debe a un exceso de homocigos, explicado en parte por la presencia de algunos alelos nulos en la población y quizá a un proceso de endogamia no tan intenso como se discute abajo.

Los análisis de endogamia realizados muestran que *A. taylori* de Alchichica presenta un valor de *relatedness* no tan alto ($r_{gg} = 0.235$) en comparación con los otros lagos, sin embargo, nos sugieren que cierto grado de endogamia pudiera estar operando, pero no tan intenso como en Atexcac o en Las Minas ($r_{gg} = 0.531$ y 0.433 respectivamente) Comparando con las poblaciones de *A. maculatum* los valores de r_{gg} son más bajos (0.02 – 0.17) que los de todos los lagos cráter. Solo una población de *A. maculatum* presentó un valor de 0.40 sugiriendo cierto grado de endogamia o tamaño de la población pequeño (Zamudio & Wiczorek 2007).

Cuando se compara la diversidad genética de *A. taylori* con la población de *A. mexicanum* del lago de Xochimilco, la cual es también una especie pedomórfica obligada,

también ésta presenta niveles de diversidad genética alta. El estudio fue realizado por Graue (1998) utilizando 16 loci aloenzimáticos, aunque es difícil hacer una comparación directa con datos de aloenzimas, dado la diferente tasa de mutación de los marcadores, se sugiere que estas salamandras presentan niveles de heterocigosidad relativamente altos. Su estudio reveló además que la población del lago de Xochimilco no ha sufrido un cuello de botella. En los últimos años, no obstante, *A. mexicanum* es poco abundante en Xochimilco, debido a los distintos factores que amenazan su hábitat, tales como transformación de su hábitat y la introducción de tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Zambrano *et al.* 2007). Las poblaciones de salamandras de los lagos cráter, de acuerdo a los análisis realizados revelan que no han sufrido cuellos de botella (cuadro 4).

La población de *A. velasci* de Quechulac presenta una diversidad relativamente alta, a diferencia de las poblaciones de Las Minas y Atexcac. Sin embargo, al igual que Alchichica, también presenta un índice de fijación relativamente alto lo cual también puede estar explicado por un déficit de heterocigosidad y un cierto grado de endogamia como se aprecia con la estimación de r_{gg} . Las Minas y Atexcac muestran una diversidad más baja en comparación con las otras poblaciones de lagos cráter, siendo Atexcac la población con la diversidad genética menor de la mitad que la registrada en las poblaciones de Alchichica y Tecuitlapa.

Los niveles de diversidad bajos de Las Minas y Atexcac puede deberse a un tamaño poblacional pequeño y por lo tanto podría existir un proceso de endogamia en estas poblaciones, en especial en la población de Atexcac que tiene un coeficiente de *relatedness* significativamente más alto ($r_{gg} = 0.531$) en comparación con las otras poblaciones de los lagos cráter (figura 5). En el caso de Atexcac y Tecuitlapa, los índices de fijación son muy cercanos a cero, sin embargo, Atexcac presenta niveles de endogamia altos. Lo cual puede indicar que las estimaciones de los índices de fijación de cada lago, están muy relacionados con la presencia de ciertos alelos nulos y no necesariamente están sugiriendo que un proceso de endogamia pueda estar operando, ya que entonces debería ser congruente con las estimaciones de endogamia altas del análisis de *relatedness*.

Cuadro 10. Cuadro comparativo de diferentes estimaciones de variación y diferenciación genética de anfibios, utilizando microsatélites. 1. Los números entre paréntesis son el rango promedio de alelos. He obs = heterocigosidad observada, He esp= heterocigosidad esperada.

Especie	Rango de alelos¹	He obs	He esp	F_{ST}	F_{ST} apareadas	F_{IS}	Fuente
<i>Bufo calamita</i>	2 – 8		0.24 – 0.37	0.060 - 0.224			Rowe <i>et al.</i> (2000)
<i>Hyla arborea</i>	6 - 21	0.351 - 0.534		0.2245	0.029 - 0.332	0.105	Andersen <i>et al.</i> (2004)
<i>Physalaemus pustulosus</i>	6 - 20			0.18	0.008 – 0.261 0.012 – 0.257		Pröhl <i>et al.</i> (2006)
<i>Eleutherodactylus ockendeni</i>	14 - 29	0.90				0.154	Elmer <i>et al.</i> (2007)
<i>Rana catesbeiana</i>	11 - 32	0.495 - 0.728		0.1078	0.008 0.102	0.146 - 0.172 -0.004 - -0.163	Austin <i>et al.</i> (2004)
<i>Rana sylvatica</i>	9 - 17	0.42	0.31	0.11			Squire & Newman (2002)
<i>Rana sylvatica</i>	2 - 18	0.44 - 0.50					Newman & Squire (2001)
<i>Rana temporaria</i>	9 - 34 (24.8) 3.9 – 3.5 (8.6)		0.35	0.238		0.021	Palo <i>et al.</i> (2004)
<i>Rana temporaria</i>			0.62 (0.50 - 0.66)	0.24	0.13 - 0.36	-0.023	Palo <i>et al.</i> (2003) Cano <i>et al.</i> (2004)
<i>Ambystoma maculatum</i>		0.4393	0.68				Myers & Zamudio (2004) Zamudio & Wicczorek (2007)
<i>Ambystoma maculatum</i>	13 - 44 (4.9 - 9.2)	0.534	0.69	0.073	0 - 0.2	0.215 (0.248 – 0.266)	
<i>Ambystoma tigrinum</i>	1 - 5 (2 - 2.62)			0.24	0.10 - 0.48		Spear <i>et al.</i> (2005)

<i>melanostictum</i>						
<i>Ambystoma tigrinum</i>						
<i>melanostictum</i>	1 - 5 (2.23)	0.295	0.31		0.072	Spear <i>et al.</i> (2006)
<i>Ambystoma texanum</i>	5 - 22	0.87	0.92			Gopurenko <i>et al.</i> (2007)
<i>Ambystoma tigrinum tigrinum</i>	3 - 23 (12.3)					Gopurenko <i>et al.</i> (2006)
<i>Dicamptodon tenebrosus</i>	3 - 5	0.124	0.12	0.08		Curtis & Taylor (2003)
<i>Desmognathus ocoee</i>	17 - 47	0.881	0.93			Adams <i>et al.</i> (2005)
<i>Plethodon cinereus</i>	5 - 18 (12)	0.38 - 0.49	0.44 - 0.66	0.19	0.027 - 0.108	Noel <i>et al.</i> (2007)
		0.62 - 0.69	0.44 - 0.76			
<i>Plethodon cinereus</i>	6 - 14	0.55	0.58	0.013 - 0.050		Marsh <i>et al.</i> (2007)
<i>Triturus cristatus</i>		0.55	0.59	0.07	0.012 - 0.183	Jehle <i>et al.</i> (2005)
<i>Triturus marmoratus</i>		0.37	0.43	0.11	0.007 - 0.303	Jehle <i>et al.</i> (2005)
<i>Salamandra salamandra</i>	2 - 10	0.62				Steinfartz <i>et al.</i> (2006)

5.2 Estructura genética poblacional

La existencia de valores altos de F_{ST} (global y pareadas) permite detectar un considerable grado de diferenciación genética en las poblaciones de los lagos cráter, indicando escaso flujo génico entre estas poblaciones de salamandras. Estos valores de diferenciación genética son igual o más altos que los encontrados en estudios de anfibios y en general de salamandras (ver cuadro 10) tanto de hábitos acuáticos como terrestres (Rowe *et al.* 2000, Spear *et al.* 2005, Noël *et al.* 2007, Zamudio & Wieczorek 2007). Específicamente, los valores de F_{ST} registrados en especies de *Ambystoma* van de 0.073 a 0.24 (Spear *et al.* 2005, Zamudio & Wieczorek 2007).

La existencia de una divergencia genética relativamente elevada entre éstas poblaciones de los lagos cráter, se corrobora con el análisis bayesiano de asignación donde se identifican cuatro demos genéticos: *A. taylori* constituye un solo demo genético, las poblaciones de *A. velasci* de Quechulac y Las Minas conforman otro demo y dos más son las poblaciones de *A. velasci* de Atexcac y Tecuitlapa.

El agrupamiento genético de Quechulac y Las Minas exhibe mezcla genotípica, lo cual también se muestra con el análisis de flujo génico dado que presentan migración simétrica entre ambas poblaciones. Las poblaciones de los lagos cráter de Atexcac y Tecuitlapa donde está presente *A. velasci* no se observa indicio alguno de mezcla genotípica.

Algunos estudios han registrado la presencia de organismos de *A. velasci* de los alrededores de Alchichica (Brandon *et al.* 1981; Shaffer & Mcknight 1996). Estos registros han sido reportados a una distancia entre cinco o seis kilómetros, la cual es la distancia a la que se encuentra el lago de Quechulac o Las Minas; salvo el registro del espécimen número 75 en Shaffer & Mcknight (1996), encontrado en la playa del lago de Alchichica a unos 20 m de distancia. En el presente estudio no se observaron organismos en la superficie, ni en la playa. No obstante, aunque estuvieran presentes, no se muestra ningún grado de introgresión con la población de *A. taylori*. Además es poco probable que se encuentren

organismos metamórficos de *A. velasci* en los alrededores del lago de Alchichica, ya que éste lago ofrece condiciones acuáticas hiposalinas, que probablemente no son adecuadas para el establecimiento de *A. velasci*. Se corrobora entonces que únicamente *A. taylori* es la especie que vive en el lago de Alchichica y que presumiblemente esté especializada para vivir en agua hiposalina (Brandon *et al.* 1981).

Algunos autores señalan que es común encontrar patrones de subdivisión poblacional en anfibios a escalas geográficas pequeñas (Rowe *et al.* 2000, Newman & Squire 2001, Palo *et al.* 2003). Las causas que generan estos patrones son variables, generalmente atribuidas a la presencia de metapoblaciones o fragmentación de hábitat (natural o inducido). En el presente estudio, las poblaciones de *A. velasci* son un ejemplo de que estos patrones se presentan a una pequeña escala y que esta diferenciación puede ser explicada como un efecto producido por el proceso de pedomorfosis que se presenta en este grupo de salamandras. El cual ha conducido a incrementar la divergencia poblacional (Shaffer 1984a, Shaffer & Mcknight 1996; Voss & Shaffer 1997) debido al escaso flujo génico y quizá agudizando el aislamiento entre las poblaciones de salamandras.

Uno de los factores que ha contribuido en la fijación de la pedomorfosis en las poblaciones de los lagos cráter, es el ambiente árido de la Cuenca Oriental, no sólo en Alchichica, sino en el resto de las poblaciones de esta cuenca. Además se ha propuesto que la evolución de la pedomorfosis, ha sido favorable en ambientes acuáticos estables, es decir, en cuerpos de agua permanentes (Semlitsch & Gibbons 1985; Semlitsch 1987, Petranka 1998), donde se ofrecen las condiciones de alimento, necesarias y libres de depredadores. Los lagos cráter son un hábitat acuático permanente y grande, cada lago está aislado uno de otro, no hay conexión subterránea. La vegetación que los rodea es matorral xerófilo, con una precipitación pluvial escasa (<400 mm anuales), lo que provee las condiciones necesarias para que la pedomorfosis sea exitosa y como consecuencia la divergencia poblacional se incrementa.

Algunos registros anecdóticos (Taylor 1943, Brandon *et al.* 1981) señalan que anteriormente en la Cuenca Oriental, cuando las lluvias se presentaban, era común observar

zonas inundadas, donde se estancaba el agua en zanjas o depresiones del suelo. Estos encharcamientos posiblemente permitían actuar como un sistema de conexión entre diferentes pozas por donde las salamandras de la especie *A. velasci* se estarían desplazando y donde probablemente fuesen abundantes. Se ha documentado la presencia de fuertes lluvias de duración corta, que han provocado que en un sólo día suba el nivel de agua de Alchichica y luego vuelva a su nivel normal (Alcocer & Filonov 2007). Es posible que estos fenómenos hayan pasado y contribuido a la formación de cuerpos de agua temporales. En especial en el área del Tepeyahualco y Totolcingo donde se formaban lagos temporales, grandes, y era frecuente encontrar *A. velasci* (Brandon *et al.* 1981). Sin embargo, en los últimos años ha quedado seca esta zona, la mayor parte del año (Alcocer *et al.* 1997), en parte debido a que en la zona se han establecido grandes extensiones con fines agrícolas.

5.3 Evolución de la pedomorfosis

La pedomorfosis presente en las poblaciones de salamandras de los lagos cráter es un proceso de especiación por el cual probablemente evolucionaron. Como ha sido documentado en otros casos de salamandras *Dicamptodon* (Nussbaum 1976, Steele *et al.* 2005) y *Eurycea* (Chippindale *et al.* 2000). Este proceso se debió dar en un inicio, como un carácter expresado de forma facultativa y determinado por las condiciones ambientales que se presentaron (ambiente árido); subsecuentemente se vio favorecido y posteriormente se fijó.

La evolución de la pedomorfosis de acuerdo a Voss & Smith (2005) ha sido producto del efecto de un gen, el cual es recesivo y produce un fenotipo que es claramente adaptativo. Estos mismos autores proponen que la evolución de la pedomorfosis en *A. mexicanum* (especie paedomórfica obligada) está asociada con cambios genéticos que retrasan el tiempo de metamorfosis en el ciclo de vida bifásico. Es probable que estos efectos que mencionan Voss & Smith (2005), se hayan presentado en las poblaciones de los lagos cráter, aunado al ambiente árido, que pudo actuar como un factor limitante para que las salamandras no se transformaran y por lo tanto se favoreciera la pedomorfosis;

limitando el flujo génico entre ellas y produciendo que cada población conformase una entidad evolutiva independiente.

Si es cierto el supuesto de que la expresión de un gen recesivo es ventajosa en las poblaciones paedomórficas, se debió dar en un tiempo relativamente rápido y en poblaciones de tamaños pequeños. Sin embargo, los resultados del presente estudio no parecen apoyar éstos supuestos ya que en el caso de *A. taylori* de Alchichica y *A. velasci* de Tecuitlapa los resultados muestran que estas poblaciones han tenido tamaños poblacionales relativamente grandes (cuadro 7 y 8). La expresión de alelos recesivos, que tienen frecuencias alélicas bajas en una población, generalmente son invisibles a la selección hasta que los homocigotos se forman (Hedrick 2005). Una vez que los homocigotos están establecidos, la población se caracteriza por presentar endogamia, lo cual no parece haber sucedido en las poblaciones de los lagos cráter, no al menos en las poblaciones de Alchichica y Tecuitlapa.

5.4 Tamaño efectivo poblacional histórico y patrones de migración histórica

El tamaño efectivo (N_e) de una población, es un concepto fundamental en la teoría evolutiva (Wright 1931) y útil en la generación de propuestas prácticas de conservación (Frankham 1996, Frankham *et al.* 2002). Este parámetro describe la intensidad de la pérdida de diversidad genética y cambios en las frecuencias alélicas debido a procesos de endogamia y deriva génica (Crow & Kimura 1970).

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que las poblaciones de *A. taylori* de Alchichica y *A. velasci* de Tecuitlapa exhiben tamaños efectivos de moderados a grandes demostrado por los modelos empleados (MIGRATE y IM). Esto sugiere que el mantenimiento de la alta diversidad genética encontrada en éstas poblaciones posiblemente se debe al tamaño efectivo, y no al flujo génico histórico. Mientras que el tamaño poblacional que presentan Alchichica y Tecuitlapa son debido a la contribución de distintos factores, como un efecto fundador, dado por presentar tamaños ancestrales grandes y por ser salamandras con generaciones sobrepuestas (Graue 1998, Petranka 1998).

Además de que *A. taylori* tiene un tamaño poblacional grande se sugiere que ha estado aislada, con escaso flujo génico por parte de las otras poblaciones de salamandras de los lagos cráter, posiblemente desde que se separó de la población ancestral. El patrón de flujo génico de Alchichica hacia las poblaciones de *A. velasci*, evidenciado por MIGRATE sugiere un escaso flujo génico hacia Atexcac y Tecuitlapa, y un flujo moderado hacia Las Minas. Mientras que en IM apenas exhibe flujo escaso de Alchichica hacia Las Minas. Estos patrones de flujo génico histórico, muy probablemente muestran que en el proceso especiación de las salamandras en los lagos cráter, una limitada cantidad de flujo génico pudo presentarse aún cuando el proceso de especiación se completó (Machado & Hey 2003).

La población de *A. velasci* de Quechulac muestra un tamaño efectivo moderado, su patrón de flujo génico histórico mostrado por MIGRATE y IM apuntan a que esta población ha tenido flujo génico simétrico con la población de Las Minas. Este patrón de flujo, a diferencia de Atexcac y Tecuitlapa, probablemente señala que las poblaciones de Quechulac y Las Minas históricamente conforman una sola población. Además el análisis de asignamiento revela que actualmente también conforman una unidad genética homogénea.. Las Minas exhiben un tamaño efectivo moderado y se revela un patrón de flujo génico simétrico con Quechulac y relativamente alto de Atexcac, sin embargo, presentan una diversidad genética reducida, asociado con un considerable grado de endogamia. Lo cual implica consideraciones importantes sobre su conservación, si se agudizarán las condiciones mencionadas anteriormente, medidas de translocación de individuos provenientes de Quechulac serían importantes.

La población de *A. velasci* de Atexcac determinado por ambos modelos, apuntan a que es la poblaciones que tiene el menor tamaño efectivo. Es posible que la deriva génica pueda estar actuando con mayor intensidad en esta población, dado el tamaño poblacional pequeño, la heterocigosidad baja que presenta y quizá también un proceso de endogamia podría estar actuando evidenciado por los altos valores de *relatedness*. El patrón de flujo génico histórico encontrado en Atexcac mostró que fue simétrico con Las Minas. Es

probable que los patrones de flujo génico en estas poblaciones se deben a la presencia de polimorfismos ancestrales que están presentes en las poblaciones de salamandras de los lagos cráter, dado que han divergido relativamente reciente, estimado en menos de dos millones de años para el complejo de *Ambystoma* en México (Highton 2000) y quizá con una edad mucho menor en los lagos cráter, dado que evidencias geológicas al menos para el lago de Atexcac, apuntan a una edad máxima datada en 0.33 ± 0.08 millones de años (Carrasco-Núñez *et al.* 2007).

Atexcac es la población que se encuentra más aislada de la Cuenca Oriental, se encuentra sumergida en un cono volcánico que es de difícil acceso; para llegar a la superficie del lago hay que descender alrededor de 100 metros. Está rodeado por un ambiente xérico, con pendientes pronunciadas que difícilmente permiten la formación de cuerpos de agua cercanos (figura 3). Lo anterior indica que es poco probable que las salamandras que viven en este lago actualmente, puedan desplazarse hacia otros cuerpos de agua o sufran metamorfosis, además de que el ambiente acuático donde habitan, aparentemente es estable. Por lo que Atexcac, no podría incrementar su diversidad genética por un proceso de migración proveniente de los otros lagos.

Con respecto a los modelos empleados, para las poblaciones de los lagos cráter, el tamaño efectivo estimado por MIGRATE, que supone un modelo de equilibrio entre migración y deriva génica da estimaciones bajas en comparación al modelo de IM que supone un modelo de aislamiento con migración. No obstante, ambos modelos revelan el mismo patrón de tamaño efectivo presente en las poblaciones de los lagos cráter.

Las razones por las cuales ambos modelos presentan diferencias de magnitud en las estimaciones realizadas en las poblaciones de los lagos cráter, se debe a que IM explícitamente estima el tamaño efectivo de las poblaciones desde el momento de la divergencia poblacional o especiación (Won & Hey 2005), mientras que MIGRATE no toma en cuenta la variación entre especies que es causada por la variación en la población ancestral. Además el modelo de IM, está limitado a un análisis pareado, de dos poblaciones

relacionadas entre sí, lo cual en la realidad no se presenta, dado que las poblaciones generalmente se encuentran dentro de un complejo contexto geográfico y demográfico.

Por otra parte, se ha mencionado que las estimaciones de tamaño efectivo son difíciles de calcular, debido a que esta medida depende de muchos supuestos que debe presentar la población (Hedrick 2005, Wang 2005). Las estimaciones dependen de la tasa de mutación y del tiempo generación, ambos supuestos. En el presente trabajo, se supuso una tasa de mutación de 10^{-4} para la transformación en parámetros demográficos de N_e , generado por θ . No obstante, esta tasa de mutación puede ser mucho más rápida y por lo tanto producir medidas más conservadoras. Caso contrario, es cuando la tasa de mutación es más lenta, produciendo un incremento en la magnitud de N_e .

Finalmente, sería importante realizar estudios ecológicos demográficos (marca – recaptura) y de historia de vida que permitan estimar tamaños poblacionales temporales, los cuales son consecuencias de diferentes procesos. Esto nos daría un escenario general del balance relativo entre procesos históricos y contemporáneos (Crandall *et al.* 1999) que están operando en las poblaciones de los lagos cráter.

5. 5 Implicaciones taxonómicas

La radiación de especies mexicanas de *Ambystoma* ha sido muy reciente, de acuerdo al estudio realizado por Shaffer & Mcknight (1996) utilizando DNA mitocondrial. Ellos estiman que el tiempo de radiación fue hace menos de cinco millones de años. Highton (2000) propone un tiempo de divergencia aún menor estimado entre 1.7 a 2.6 millones de años, a principios del pleistoceno.

El complejo de salamandras de *A. velasci* exhibe una compleja historia de especiación y rápida diversificación adaptativa. Algunos autores sugieren la existencia de especies crípticas en éste complejo de salamandras (Highton 2000). Es probable que sea el caso del clado del Este (figura 1), propuesto por Shaffer & Mcknight (1996) al cual pertenecen las poblaciones del presente estudio. Estas poblaciones de los lagos cráter,

limitadas a una región geográfica pequeña, presentan una alta diferenciación genética, demostrado con los marcadores moleculares empleados en el presente estudio. A pesar de que exhiben una similitud génica en su DNA mitocondrial (Shaffer & Mcknight 1996), las poblaciones morfológicamente constituyen entidades distintas (Shaffer 1984b).

Los estudios previos acerca de la filogenia del complejo de *A. velasci*, han mostrado una escasa diferenciación genética entre las poblaciones mexicanas de *Ambystoma* (Shaffer 1984a, Shaffer & Mcknight 1996). Se ha señalado que la falta de resolución de la filogenia de este complejo es debida al marcador molecular usado; ya que por una parte, el marcador *dloop* usado en la filogenia del grupo presenta pocos sitios variables e informativos. Y por otra parte, existe evidencia de que otros marcadores mitocondriales tal como *nd1* y *nd2* son más variables en anfibios en comparación con la región control *dloop* (Samuels *et al.* 2005).

Recientemente el uso de marcadores moleculares nucleares ha sugerido que los marcadores mitocondriales empleados en el complejo de salamandras de la familia Ambystomatidae, no reflejan los procesos complejos que probablemente están operando en las especies de *Ambystoma*, tal como un sorteo de linajes incompleto (*lineage sorting*) o procesos de hibridación entre las especies de *Ambystoma*, en particular especies pedomorficas facultativas (Weisrock *et al.* 2006).

La taxonomía del complejo *A. velasci* no está clara aún, sin embargo con el presente estudio usando microsatélites como marcadores moleculares, con tasas de evolución más altas que las de los marcadores mitocondriales, apropiados para estudios de divergencia poblacional, muestran que hay una notable diferenciación poblacional en este grupo de salamandras, constituyendo cuatro demes altamente diferenciados. Lo que sugiere dar a cada deme genético de las poblaciones de *A. velasci* un estatus de especie. *A. taylori* como se esperaba, constituye un taxón totalmente distinto al resto de las otras poblaciones de los lagos cráter. En consecuencia, habría tres especies diferentes de salamandras, además de *A. taylori* que habitan en Alchichica.

Tradicionalmente la descripción de nuevas especies en salamandras ha sido con base en la morfología y en el patrón de coloración (Wake 2006). Sin embargo, en los últimos años con el advenimiento de nuevas herramientas moleculares y el desarrollo de nuevas metodologías de estudio, ha generado un debate continuo sobre el reconocimiento y la delimitación de especies (Wake 2006, Vences & Wake 2007). Especialmente el debate se ha dado bajo que criterios seguir, sobre los diferentes tipos de datos empleados y cuál metodología es la correcta (Sites & Marshall 2003, 2004). En el presente estudio, se recomienda darle un estatus como especies diferentes a las poblaciones de *A. velasci* que conforman demes genéticos, no obstante, tratando de utilizar diferentes líneas de evidencia (Wake 2006) como genes *nd1* y *nd2* (Samuels *et al.* 2005) y genes nucleares (Weisrock *et al.* 2006) que muy probablemente podrían apoyar los resultados de este estudio para todo.

5. 6 Implicaciones de conservación

La identificación de unidades evolutivas significativas (*evolutionarily significant units* o ESUs) en términos de conservación es importante (Moritz 1994, Hedrick *et al.* 2001). El propósito de definir estas unidades es asegurar que la herencia evolutiva sea reconocida y protegida; en otras palabras, que el potencial evolutivo heredable sea mantenido mediante un conjunto de ESUs (Moritz 1994, 1995). Los resultados del presente estudio sugieren que cada uno de los demes genéticos presentes en las poblaciones de los lagos cráter deben ser consideradas como unidades evolutivas significativas y por lo tanto, los esfuerzos de conservación deben dirigirse a proteger a cada una de estas unidades evolutivas.

Así como *A. taylori* está considerada como una especie críticamente amenazada bajo los criterios de IUCN, las poblaciones de lagos de Quechulac-Las Minas, Atexcac y Tecuitlapa deberían recibir el mismo estatus de *especies* críticamente amenazadas, de acuerdo a las categorías emitidas por IUCN (2007), dado que están expuestas a las mismas condiciones que ponen en peligro su permanencia en los lagos cráter. Las principales amenazas que enfrentan los lagos cráter son la disminución del nivel de agua en los últimos años (Caballero *et al.* 2003, Alcocer *et al.* 1998b, Alcocer & Escobar-Briones 2007),

debido a fluctuaciones causadas por el cambio climático; y por otro lado, problemas de deforestación, sobrepastoreo, sobreexplotación de los acuíferos, la salinización de suelos producido por mala prácticas de riego han provocado procesos de erosión severa y desertización en general de la Cuenca Oriental (Alcocer *et al.* 1998b, Alcocer *et al.* 2004).

Deben dirigirse esfuerzos de conservación a todas estas unidades evolutivas de los lagos cráter de igual manera, sin embargo, el presente estudio apunta a que la población de Atexcac, es la que se encuentra más susceptible en comparación con las demás poblaciones de salamandras de la Cuenca Oriental, dado sus niveles de diversidad genética y tamaño efectivo pequeño.

Los lagos cráter de la Cuenca Oriental actualmente no se encuentran protegidos bajo ninguna categoría por instancias gubernamentales, ya sea como parque, reserva o alguna otra denominación. Sin embargo, se recomienda tener protección especial dado que cada lago cráter constituye un biotipo único caracterizado por su alcalinidad y salinidad, que además de albergar *A. taylori* y las otras poblaciones de salamandras de *A. velasci*, contiene una gran diversidad de fauna acuática única (Tavera & Komárek 1996, Alcocer *et al.* 1998a) como la especie de pez *Poblana alchichica* (IUCN 2007), y el isopodo *Caecidotea williamsi* (Escobar-Briones & Alcocer 2002, Alcocer & Escobar-Briones 2007).

Finalmente hay algunos factores que podrían mermar las poblaciones de salamandras en los lagos cráter, sin embargo no se han documentado sistemáticamente y se desconoce su efecto sobre ellas. Como es la introducción de peces como truchas en los lagos de Quechulac y Las Minas y carpas en Tecuitlapa (Alcocer *com. pers.*). Y recientemente se ha reportado la presencia del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* en la población de Quechulac (Frías-Alvarez *et al. en prensa*), que causa una enfermedad infecciosa llamada quitridiomycosis que ha sido la causante de mortandades masivas y declive en algunas poblaciones de anfibios a nivel mundial (Berger *et al.* 1998). Estudios futuros son necesarios para evaluar los efectos que pueden producir estos problemas en las poblaciones de salamandras de los lagos cráter.

VI. CONCLUSIONES

1. El patrón de diversidad genética que exhibe *A. taylori* es diferente al que presentan las poblaciones de *A. velasci* de los lagos cráter. A diferencia de lo esperado, *A. taylori* exhibe gran diversidad genética, expresada como heterocigosidad y riqueza alélica. Además presenta un tamaño efectivo poblacional grande, en comparación al que presentan las poblaciones de *A. velasci* de los lagos cráter, el cual probablemente contribuye al mantenimiento de la diversidad genética alta que presenta *A. taylori*.
2. Las poblaciones de *A. velasci* de los lagos cráter, exhiben un patrón de diversidad genética variable, desde poblaciones con alta diversidad genética como Tecuitlapa hasta poblaciones con una reducida diversidad como las poblaciones de *A. velasci* de Atexcac y Las Minas. Además presentan un patrón de tamaño efectivo variable, la población de Tecuitlapa es moderadamente grande, Quechulac moderado; mientras que Atexcac y Las Minas presentan un tamaño efectivo reducido.
3. Las poblaciones de *Ambystoma* de los lagos cráter de la Cuenca Oriental muestran una alta diferenciación poblacional, conformando cuatro demes genéticos. *A. taylori* forma uno, las poblaciones de *A. velasci* de Quechulac y Las Minas conforman otro, y dos demes distintos están constituidos por las poblaciones de *A. velasci* de Atexcac y Tecuitlapa, respectivamente.
4. *Ambystoma taylori* exhibe un patrón de flujo génico histórico diferente al que presentan las poblaciones de *A. velasci* de los lagos cráter. No existe flujo proveniente de *A. velasci* hacia la población de *A. taylori*, mientras que un escaso flujo histórico de Alchichica hacia las poblaciones de *A. velasci* se presenta.
5. Las poblaciones de *A. velasci* presentan un patrón de flujo génico histórico variable, desde restringido en el caso de Tecuitlapa con respecto al resto de las poblaciones de *A. velasci*, hasta evidencia de flujo simétrico y asimétrico de las poblaciones de

Quechulac y Las Minas que conforman un deme genético, así como Las Minas y Atexcac, respectivamente.

VII. RECOMENDACIONES

- Se propone considerar a cada deme genético como una unidad evolutiva significativa (ESUs) para dirigir esfuerzos de conservación de las salamandras de los lagos cráter de la Cuenca Oriental.
- Se recomienda darles un estatus como especies diferentes a los tres demes genéticos consideradas como *A. velasci* integrando diferentes líneas de evidencia.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, EM, AG Jones & SJ Arnold (2005) Multiple paternity in a natural population of a salamander with long-term sperm storage. *Molecular Ecology* **14**, 1803-1810.
- Alcocer, J & E Escobar (1990) The drying up of the Mexican Plateau Axalapazcos. *Salinet* **7**, 34-36.
- Alcocer, J, A Lugo, E Escobar & M Sánchez (1997) The macrobenthic fauna of a former perennial and now episodically filled Mexican saline lake. *International Journal of Salt Lake Research* **5**, 261-274.
- Alcocer, J, E Escobar, A Lugo & L Peralta (1998a) Littoral benthos of the saline crater lakes of the basin of Oriental, Mexico. *International Journal of Salt Lake Research* **7**, 87-108.
- Alcocer, J, A Lugo, MR Sánchez, M Chávez & E Escobar (1998b) Threats to the saline lakes of the Oriental Basin, Mexico, by human activities. *Verhandlungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* **26**, 1383-1386.
- Alcocer, J, O Escolero & L Marín (2004) Problemática del agua de la Cuenca Oriental, estados de Puebla, Veracruz y Tlaxcala. En B. Jimenez & L Marin (eds). Pags. 57-77 *El agua en México vista desde la academia*. Academia Mexicana de Ciencias.
- Alcocer, J & E Escobar-Briones (2007) On the ecology of *Caecidotea williamsi* Escobar-Briones & Alcocer (Crustacea: Isopoda: Asellidae) from Alchichica saline lake, Central Mexico. *Hydrobiologia* **576**, 103-109.
- Alcocer, J & A Filonov (2007) A note on the effects of an individual large rainfall event on saline Lake Alchichica, Mexico. *Environmental Geology* **53**, 777-783.

- Andersen, LW, K Fog & C Damgaard (2004) Habitat fragmentation causes bottlenecks and inbreeding in the European tree frog (*Hyla arborea*). *Proceedings of the Royal Society* **271**, 1293-1302.
- Arredondo-Figueroa, JL, LE Borrego-Enríquez, RM Castillo-Domínguez & MA Valladolid-Laredo (1983) Batimetria y morfometria de los lagos “Maars” de la Cuenca de Oriental, Puebla, México. *Biotica* **8**, 37-47.
- Austin, JD, SC Loughheed & PT Boag (2004) Controlling for the effects of history and nonequilibrium conditions in gene flow estimates in northern bullfrog (*Rana catesbeiana*) populations. *Genetics* **168**, 1491-1506.
- Beaumont MA & MW Bruford (1999) Microsatellites in conservation genetics. En D B Goldstein & Schlötterer. Pags. 165-182. *Microsatellites. Evolution and Applications*. Oxford University Press.
- Berli, P (2004) *MIGRATE*: Documentation and program, part of LAMARC. Version 2.0. Disponible en <http://evolution.gs.washington.edu/lamarc.html>
- Berli, P, & J Felsenstein (1999) Maximum likelihood estimation of migration rates and population numbers of two populations using a coalescent approach. *Genetics* **152**, 763-773.
- Berli, P, & J Felsenstein (2001) Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**, 4563-4568.
- Berger, L, R Speare, P Daszak, DE Green, AA Cunningham, CL Goggin *et al.* (1998) Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in

- the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**, 9031-9036.
- Brandon, RA, E J Maruska & WT Rumph (1981) A new species of neotenic *Ambystoma* (Amphibian, Caudata) Endemic to Laguna Alchichica, Puebla, Mexico. *Bulletin of the Southern California Academy of Science* **80**, 112-125.
- Caballero, M, GA Vilaclara, A Rodríguez & D Juárez (2003) Short-term climatic change in lake sediments from lake Alchichica, Oriental, Mexico. *Geofísica Internacional* **42**, 529-537
- Cano, JM, A Laurila, J Palo & J Merilâ (2004) Population differentiation in G matrix structure due to natural selection in *Rana temporaria*. *Evolution* **58**, 2013-2020.
- Carrasco-Nuñez, G, MH Ort & C. Romero (2007) Evolution and hydrological conditions of a maar volcano (Atexcac crater, Eastern Mexico). *Journal of Volcanology and Geothermal Research* **159**, 179-197.
- Cornuet, JM & Luikart G (1997) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**, 2001-2014.
- Crandall, K. A., D. Posada, and D. Vasco. 1999. Effective populations sizes: missing measures and missing concepts. *Animal Conservation* **2**, 317-319.
- Crow, JF & M Kimura (1970) *An introduction to population genetics theory*. Harper & Row, New York.
- Curtis, JMR & EB Taylor (2003) The genetic structure of coastal giant salamanders (*Dicamptodon tenebrosus*) in a managed forest. *Biological Conservation* **115**, 45-54.

Diario Oficial de la Nación Mexicana (2000) Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2000. Protección ambiental-Especies de flora y fauna silvestres de México-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca 55pp.

Di Rienzo, A, AC Peterson, JC Garza, AM Valdes, M Slatkin & NB Freimer (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**, 3166-3170.

Duellman WE & L Trueb (1994) *Biology of amphibians*. The Johns Hopkins University Press.

Elmer, KR, JA Dávila & SC Loughheed (2007) Applying new inter-individual approaches to assess fine-scale population genetic diversity in a neotropical frog, *Eleutherodactylus ockendeni*. *Heredity* **99**, 506-515.

Escobar-Briones, E & J Alcocer (2002) *Caecidotea williamsi* (Crustacea: Isopoda: Asellidae), a new species from a saline crater-lake in the eastern Mexican Plateau. *Hydrobiologia* **477**, 93-105.

Evanno, G, S Regnaut & J Goudet (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611–2620.

Filonov, A, I Tereshchenko & J Alcocer (2006) Dynamic response to mountain breeze circulation in Alchichica, a crater lake in Mexico. *Geophysical Research Letters* **33**, 1-4.

Frankham, R (1996) Relationship of Genetic Variation to Population Size in Wildlife. *Conservation Biology* **10**, 1500-1508.

- Frankham, R, JD Ballou & DA Briscoe (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.
- Gasca, AD (1981) Algunas notas de la Génesis de los lagos cráter de la Cuenca de Oriental. Puebla-Tlaxcala-Veracruz. *Instituto Nacional de Antropología e Historia. Dpto. de Prehistoria* **98** Colección Científica, México, D. F.
- Goldstein, DB & DD Pollock (1997) Launching microsatellites: A review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *Journal of Heredity* **88**, 335-342.
- Goldstein, DB & C Schlotterer (eds.) (1999) *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press.
- González, EG (2003) Microsatélites: Sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia* **59**, 377-388.
- Gopurenko, D, RN Williams, JA DeWoody (2007) Reproductive and mating success in the small-mouthed salamander (*Ambystoma texanum*) estimated via microsatellite parentage analysis. *Evolutionary Biology* **34**, 130-139.
- Gopurenko, D, RN Williams, CR McCormick & JA DeWoody (2006) Insights into the mating habits of the tiger salamander (*Ambystoma tigrinum tigrinum*) as revealed by genetic parentage analyses. *Molecular Ecology* **15**, 1917-1928.
- Goudet, J (1995) FSTAT (versión 1.2): a computer program to calculate *F*-statistics. *Journal of Heredity* **86**, 485-486.
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Gould SJ (1977) *Ontogeny and phylogeny*. Cambridge, MA Harvard University Press.

- Graue, W V (1998) Estudio genético y demográfico de la población del anfibio *Ambystoma mexicanum* (Caudata: Ambystomatidae) del lago de Xochimilco. Tesis Doctoral. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. 107p.
- Guo, SW & EA Thompson (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiples alleles. *Biometrics* **48**, 361-372.
- Hancock, JM (1999) Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. En DB Goldstein & Schlötterer. Pags. 1-9 *Microsatellites. Evolution and Applications*. Oxford University Press.
- Harris, RN (1987) Density-dependent paedomorphosis in salamander *Notophthalmus viridescens dorsalis*. *Ecology* **68**, 705-712.
- Hedrick, PW (2004) Recent developments in conservation genetics. *Forest Ecological Management* **197**, 3-19.
- Hedrick, PW (2005) *Genetics of populations*. Jones and Hartlett. 3th Ed.
- Hedrick, PW, KM Parker & RN Lee (2001) Using microsatellite and MHC variation to identify species, ESUs, and MUs in the endangered Sonoran topminnow. *Molecular Ecology* **10**, 1399-1412.
- Hey, J. & R Nielsen (2004) Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics* **167**, 747-760.

- Hey, J & R Nielsen (2005) *IM Documentation*. An implementation of the MCMC method for the analysis of genetic data under the 'Isolation with Migration' model of population divergence. 34pp.
- Hey, J & R Nielsen (2007) Integration within the Felsenstein equation for improved Markov chain Monte Carlo methods in population genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **104**, 2785-2790.
- Highton, R (2000) Detecting cryptic species using allozyme data. En RC Bruce, RG Jaeger, & LD Houck, (eds). Pags. 215-241. *The biology of plethodontid salamanders*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, NY.
- InfoNatura: Birds, mammals, and amphibians of Latin America [web application] (2004) Version 4.1 . Arlington, Virginia (USA): NatureServe. Available: <http://www.natureserve.org/infonatura>. (Accessed: September 2, 2005).
- Irschick, DJ & HB Shaffer (1997) The polytypic species revisited: morphological differentiation among tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*) (Amphibia: Caudata). *Herpetologica* **53**, 30-49.
- IUCN (2007) IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 06 March 2006.
- Jehle, R, GA Wilson, JW Arntzen & T Burke (2005) Contemporary gene flow and the spatio-temporal genetic structure of subdivided newt populations (*Triturus cristatus*, *T. marmoratus*). *Journal of Evolutionary Biology* **18**, 619-628.
- Jehle, R & JW Arntzen (2002) Review: Microsatellite markers in amphibian conservation genetics. *Herpetological Journal* **12**, 1-9.

- Kimura M & JF Crow (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite populations. *Genetics* **49**, 725-738.
- Kimura, M & T Ohta (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **75**, 2868-2872.
- Lehmann, T, WA Hawley, H Grebert & FH Collins (1998) The effective population size of *Anophles gambiae* in Kenya: implications for population structure. *Molecular Biology and Evolution* **15**, 264-276.
- Luikart, G. & Cornuet JM (1998) Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology* **12**, 228-237.
- Luikart G, FW Allendorf, JM Cornuet & WB Sherwin (1997) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity*, **89**, 238-247.
- Lugo, A, J Alcocer, MR Sánchez & E Escovar (1998) Litoral protozoan assemblages from two Mexican hyposaline lakes. *Hydrobiología* **381**, 9-13.
- Machado, CA & J Hey (2003) The causes of phylogenetic conflict in a classic *Drosophila* species group. *Proceedings of Royal Society of London* **270**, 1193-1202.
- Marsh, DM, RB Page, TJ Hanlon, H Bareke, R Corritone, N Jetter, NG Beckman, K Gardner, DE Selfert & PR Cabe (2007) Ecological and genetic evidence that low-order stream inhibit dispersal by red-backed salamanders (*Plethodon cinereus*). *Canadian Journal of Zoology* **85**, 319-327.

- Mech SG, A Storfer, JA Ernst, MW Reudink & SC Maloney (2003) Polymorphic microsatellite loci for tiger salamanders, *Ambystoma tigrinum*. *Molecular Ecology Notes* **3**, 79-81.
- Moritz, C (1994) Defining “Evolutionary significant units” for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* **9**, 373-375.
- Moritz, C (1995) Uses of molecular phylogenies for conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **349**, 113-118.
- Myers, EM & R Zamudio (2004) Multiple paternity in an aggregate breeding amphibian: the effect of reproductive skew on estimates of male reproductive success. *Molecular Ecology* **13**, 1951-1963.
- Nei, M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Newman, RA & T Squire (2001) Microsatellite variation and fine-scale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*). *Molecular Ecology* **10**, 1087-1100.
- Nöel, S, M Ouellet, P Galois & FJ Lapointe (2007) Impact to urban fragmentation on the genetic structure of the eastern red-backed salamander. *Conservation Genetics* **8**, 599-606.
- Nussbaum, RA (1976) Geographic variation and systematics of salamanders of the genus *Dicamptodon* Strauch (Ambystomatidae). *Misc. Publ. Mus Zool. Univ. Michigan* **149**, 1-94.
- Ohta, T. & M Kimura (1973) The model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genet Res* **22**, 201-204.

- Palo, JU, RB O'Hara, AR Laugen (2003) Latitudinal divergence of common frog (*Rana temporaria*) life history traits by natural selection, evidence from a comparison of molecular and quantitative genetic data. *Molecular Ecology* **12**, 1963-1978.
- Palo, JU, DS Schmeller, A Laurila, CR Primmer, SL Kuzmin & J Merilä (2004) High degree of populations subdivision in a widespread amphibian. *Molecular Ecology* **13**, 2631-2644.
- Parra-Olea, G, E Recuero & KR Zamudio (2007) Primer Note: Polymorphic microsatellite markers for Mexican salamanders of the genus *Ambystoma*. *Molecular Ecology Notes* **7**, 818-820.
- Peakall, R & PE Smouse (2006) Genalex6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**, 288-295.
- Petranka, JW (1998) *Salamanders of the United States and Canada*. Smithsonian Institution Press, Washington, Estados Unidos.
- Piry, S, G Luikart & JM Cornuet (1999) BOTTLENECK v. 1.2.02 A program for detecting recent effective population size reductions from allele frequency data. Guide users.
- Pritchard, JK, M Stephens, P Donnelly (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Pröhl, H, RA Koshy, U Mueller, AS Rand & M Ryan (2006) Geographic variation of genetic and behavioral traits in northern and southern túngara frogs. *Evolution* **60**, 1669-1679.
- Queller, DC & KF Goodnight (1989) Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* **43**, 258-275.

- Raymond, M & F Rousset (1995) Genepop version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Reilly, SM (1997) An integrative approach to heterochrony: the distinction between interspecific and intraspecific phenomena. *Biological Journal of the Linnean Society* **60**, 119-143.
- Reyes, CM (1979) Geología de la Cuenca de Oriental. Estados de Puebla, Veracruz y Tlaxcala. Colección científica SEP-INAH México.
- Rosenberg, NA (2004) Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* **4**, 137-138.
- Routman, E (1993) Populations structure and genetic diversity of metamorphic and paedomorphic populations of the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Journal of Evolutionary Biology* **6**, 329-357.
- Rowe, G, TJC Beebee & T Burke (2000) A microsatellite analysis of natterjack toad, *Bufo calamita*, metapopulations. *Oikos* **88**, 641-651.
- Samuels, AK, DW Weisrock, JJ Smith, KJ France, JA Walker, S Putta & SR Voss (2005) Transcriptional and phylogenetic analysis of five complete ambystomatid salamander mitochondrial genomes. *Gene* **329**, 43-53.
- Shaffer, HB (1984a) Evolution in a paedomorphic lineage. I. An electrophoretic analysis of the Mexican ambystomatid salamanders. *Evolution* **38**, 1194-1206.
- Shaffer, HB (1984b) Evolution in a paedomorphic lineage. II. Allometry and form in the Mexican ambystomatid salamanders. *Evolution* **38**, 1207-1218.

- Shaffer, HB & ML McKnight (1996) The polytypic species revisited: genetic differentiation and molecular phylogenetics of the tiger salamander *Ambystoma tigrinum* (Amphibia: Caudata) Complex. *Evolution* **50**, 417-433.
- Shaffer, B, G Parra Olea, & D Wake (2004) *Ambystoma taylori*. In: IUCN 2006. 2006 IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 06 February 2006.
- Semlitsch, RD (1985) Reproductive strategy of a facultatively paedomorphic salamander *Ambystoma talpoideum*. *Oecology* **65**, 305-313.
- Semlitsch, RD (1987) Paedomorphosis in *Ambystoma talpoideum*: Effects of density, food, and pond drying. *Ecology* **68**, 994-1002.
- Semlitsch, RD, & JW Gibbons (1987) Phenotypic variation in metamorphosis and paedomorphosis in the salamander *Ambystoma talpoideum*. *Ecology* **66**, 1123-1130.
- Sites, JW & JC Marshall (2003) Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution* **18**, 462-470.
- Sites, JW & JC Marshall (2004) Operational criteria for delimiting species. *Annual Review of Ecology Evolution & Systematics* **35**, 199-227.
- Spear, SF, CR Peterson, MD Matocq & A Storfer (2005) Landscape genetics of the blotched tiger salamander (*Ambystoma tigrinum melanostictum*). *Molecular Ecology* **14**, 2553-2564.
- Spear, SF, CR Peterson, MD Matocq & A Storfer (2006) Molecular evidence for historical and recent population size reductions of tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*) in Yellowstone National Park. *Conservation Genetics* **7**, 605-611.

- Squire, T & RA Newman (2002) Fine-scale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*) in a northern woodland. *Herpetologica* **58**, 119-130.
- Steinfartz, S, K Stemshorn, D Kuesters & D Tautz (2006) Patterns of multiple paternity within and between annual reproduction cycles of the fire salamander (*Salamandra salamandra*) under natural conditions. *Journal of Zoology* **268**, 1-8.
- Steele, CA, BC Cartens, A Storfer & J Sullivan (2005) Testing hypotheses of speciation timing *Dicamptodon copei* and *Dicamptodon aterrinus* (Caudata: Dicamptodontidae). *Molecular Phylogenetics and Ecology* **36**, 90-100.
- Taberlet, P & G Luikart (1999) Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of Linnean Society* **68**, 41-55
- Tautz, D (1989) Hypervariability of simple sequences as general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* **17**, 6463-6471.
- Tavera, R & J Komárek (1996) Cyanoprokaryotic assemblages in the volcanic lake of Alchichica, Puebla State, Mexico. *Hydrobiología* **83**, 511-538.
- Taylor, EH (1943) A new ambystomid salamander adapted to brackish water. *Copeia* **3**, 151-156.
- Thuillet, AC, D Bru, J David, P Roumet, S Santoni, P Sourdille & T Bataillon (2002) Direct estimation of mutation rate for 10 microsatellite loci in durum wheat, *Triticum turgidum* (L.) Tell. Ssp *durum*. *Molecular Biology and Evolution* **19**, 122-125.
- Thuillet, AC, T Bataillon, S Poirer, S Santoni & J David (2005) Estimation of long-term effective population sizes through the history of durum wheat using microsatellite data. *Genetics* **169**, 1589-1599.

- Van Oosterhout, C, WF Hutchinson, DPM Wills & P Shipley (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**, 535-538.
- Vilaclara, G, M Chávez, A Lugo, H González & M Gaytán (1993) Comparative description of crater-lakes basic chemistry in Puebla State, Mexico. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **25**, 435-440.
- Vences, M & D Wake (2007) Speciation, species boundaries and phylogeny of amphibians. *Amphibian Biology* **6**, 2613-2669.
- Voss, SR & HB Shaffer (1997) Adaptive evolution via a major gene effect: paedomorphosis in the Mexican axolotl. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **94**, 14185-14189.
- Voss, SR & JJ Smith (2005) Evolution of salamander life cycles: A major-effect quantitative trait locus contributes to discrete and continuous variation for metamorphic timing. *Genetics* **170**, 275-281.
- Wake, D (2006) Problems with species: patterns and processes of species formation in salamanders. *Annals Missouri Botanical Garden* **93**, 8-23.
- Wang, J (2005) Estimation of effective population sizes from data on genetic markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **360**, 1395-1409.
- Weir, BS & CC Cockerham (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.

- Weisrock, DW, HB Shaffer, BL Storz, SR Storz & SR Voss (2006) Multiple nuclear gene sequences identify phylogenetic species boundaries in the rapidly radiating clade of Mexican ambystomatid salamanders. *Molecular Ecology* **15**, 2489-2503.
- Williams, RN & JA DeWoody (2004) Fluorescent dUTP helps characterize ten novel tetranucleotide microsatellite from an enriched salamander (*Ambystoma texanum*) genomic library. *Molecular Ecology Notes* **4**, 17-19.
- Whiteman, HH (1994) Evolution of facultative paedomorphosis in salamanders. *Quarterly Review of Biology* **69**, 205-221.
- Wright, S (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics* **16**, 97-159.
- Won, YJ & J Hey (2005) Divergence population genetics of Chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* **22**, 297-307.
- Zambrano, L, E Vega, LG Herrera, E Prado & VH Reynoso (2007) A population matrix model and population viability analysis to predict the fate of endangered species in highly managed water system. *Animal Conservation* **10**, 297-303.
- Zamudio, KR, & AM Wieczorek (2007) Fine-scale spatial genetic structure and dispersal among spotted salamander (*Ambystoma maculatum*) breeding populations. *Molecular Ecology* **16**, 257-2