



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

**“Estructura genética en poblaciones fragmentadas  
de *Anolis uniformis* (Reptilia: Squamata) usando  
secuencias mitocondriales y microsatélites”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

P R E S E N T A :

**DENISE ARROYO LAMBAER**

DIRECTOR DE TESIS: DR. VÍCTOR HUGO REYNOSO

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE 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.

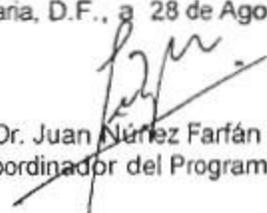
Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 9 de Junio de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL) de la alumna DENISE ARROYO LAMBAER con número de cuenta 94329799 con la tesis titulada "Estructura genética en poblaciones fragmentadas de *Anolis uniformis* (Reptilia: Squamata) usando secuencias mitocondriales y microsátélites.", realizada bajo la dirección del DR. VÍCTOR HUGO REYNOSO ROSALES.

Presidente: DR. JUAN NÚÑEZ FARFÁN  
Vocal: DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS  
Secretario: DR. VÍCTOR HUGO REYNOSO ROSALES  
Suplente: DR. MARK EARL OLSON ZÚNICA  
Suplente: DR. ADRIÁN NIETO MONTES DE OCA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de Agosto de 2008.



Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

**A mi papá, mamá y hermanos  
A mis abuelos y al Sr. Castro**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas por todo el apoyo brindado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado a través de su programa de becas de maestría.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM, que sustentó el proyecto “Diversidad y ecología de anfibios y reptiles en ambientes conservados y fragmentados en la selva tropical perennifolia en la región norte del Istmo de Tehuantepec” (convenio IN233602-3) y gracias al cual se desarrolló esta tesis.

Al comité Tutorial integrado por:

Dr. Víctor Hugo Reynoso

Dr. Juan Núñez Farfán

Dr. Adrián Nieto Montes de Oca

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Víctor Hugo Reynoso por dirigir este trabajo, por su apoyo en todo momento y por hacerme creer en el proyecto de los “Anolis”.

Al Dr. Juan Núñez Farfán y al Dr. Adrián Nieto Montes de Oca por ser parte del Comité Tutoral y por su interés en el desarrollo de la tesis.

A la M. en C. Laura Márquez por toda su ayuda en el laboratorio, pero sobre todo durante el proceso de secuenciación.

A la M. en C. Fabiola Ramírez Corona por ayudarme justo cuando más lo necesitaba, por darme un espacio en el Taller de Sistemática y Biogeografía y por enseñarme la técnica de microsatélites.

Al Dr. Luis Eguiarte por la paciencia y dedicación en la revisión de la tesis, por todos sus comentarios y sugerencias que siguen enriqueciendo este proyecto.

Al Dr. Mark Olson por la revisión de la tesis y por los consejos que llevaré de aquí en adelante para todos los párrafos de mi vida.

A Henry, Elisa, Adriana, Melissa, Tania, Omar y Hugo por su valiosa ayuda y compañía en la colecta del tejido en Los Tuxtlas.

A Martín por ayudarme en la colecta del tejido, en el análisis de los datos pero sobre todo por estar conmigo cuando más lo necesitaba.

A Adriana y José por toda su ayuda durante la búsqueda y elaboración del mapa de distribución.

A la Familia Palacios por su hospitalidad y sus buenos deseos.

A Julieta y Angélica por su apoyo moral y buenos deseos en todo momento.

A Humberto por hacerme creer otra vez en la “taquicardia”.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Fragmentación de la selva.....	3
1.2 Impacto de la fragmentación del hábitat a nivel ecológico y genético.....	5
1.3 Efectos de la fragmentación del hábitat en reptiles.....	7
1.4 Técnicas genéticas y marcadores moleculares.....	10
1.4.1 DNA mitocondrial.....	11
1.4.2 Microsatélites.....	12
1.5 <i>Anolis uniformis</i> .....	14
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo General.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3. HIPÓTESIS.....	18
4. ÁREA DE ESTUDIO.....	19
5. MÉTODO.....	21
5.1 Trabajo de Campo.....	21
5.2 Trabajo de Laboratorio.....	21
5.2.1 Obtención y amplificación de DNA.....	21
5.2.2 Secuencias del gen mitocondrial ND4.....	23

5.2.3 Amplificación de microsatélites.....	26
5.2.4 Geles de poliacrilamida.....	27
5.2.4.1 Lectura de geles.....	29
5.3 Análisis de los datos.....	31
5.3.1 Variación genética dentro de las poblaciones.....	32
5.3.2 Diferencias genéticas entre las poblaciones.....	35
6. RESULTADOS.....	37
6.1 Colecta de tejido.....	37
6.2 Gen mitocondrial ND4.....	38
6.3 Microsatélites.....	43
6.3.1 Diversidad alélica dentro de las poblaciones.....	43
6.3.2 Variación genética dentro de las poblaciones.....	47
6.3.3 Diferenciación genética entre las poblaciones.....	52
7. DISCUSIÓN.....	55
7.1 Secuencias del gen mitocondrial ND4.....	55
7.2 Microsatélites.....	57
7.2.1 Efectos de la fragmentación de la selva.....	57
7.2.2 Baja diversidad alélica.....	59
7.2.3 Diferenciación poblacional.....	60
7.2.4 ¿Reciente reducción del tamaño efectivo?.....	63
7.2.5 Otros métodos para el estudio de microsatélites.....	65
7.2.6 DNA mitocondrial y microsatélites.....	66

CONCLUSIONES.....	68
LITERATURA CITADA.....	70
APÉNDICE I.....	87
APÉNDICE II.....	88
APÉNDICE III.....	91
APÉNDICE IV.....	93

## RESUMEN

*Anolis uniformis* es la especie de lagartija más abundante en la región de los Tuxtlas. Se cree que se encuentra afectada en gran medida por la fragmentación, especialmente las poblaciones que habitan fragmentos pequeños (1-10 ha). Tiene un alto arraigo a zonas de selva no alteradas, una baja movilidad y por lo tanto baja probabilidad de migración y flujo genético entre fragmentos. Este trabajo pretende detectar los efectos de la fragmentación de la selva en *A. uniformis* por medio de secuencias mitocondriales y microsatélites. Se secuenciaron 41 muestras para el gen mitocondrial ND4 y se detectaron 13 haplotipos observándose un bajo nivel de diversidad haplotípica ( $h = 0.504$ ) y nucleotídica ( $\pi = 0.001$ ). En cuanto a microsatélites, se probaron todos los primers reportados en la literatura para el género *Anolis* (14 en total); de éstos, sólo la mitad amplificó exitosamente para la especie. Para registrar el número de alelos por locus y por población se corrieron geles de poliacrilamida al 6 y al 8% (desnaturalizados y no desnaturalizados), teñidos con nitrato de plata. Se usaron 270 muestras en total y de los siete microsatélites que amplificaron exitosamente, dos fueron monomórficos y el resto polimórficos. El porcentaje de loci polimórficos fue de 71%, el número promedio de alelos por locus polimórfico fue 2.4 y la heterocigosidad ( $HE$ ) promedio fue de 0.330. De acuerdo con el análisis de estructura poblacional AMOVA, no hay variación entre las poblaciones ( $F_{ST}$  de 0). Debido a la escasez de alelos se cree que es posible que haya existido una pérdida acelerada de diversidad alélica pero no de heterocigosidad. La mayoría de los microsatélites tienen sólo dos alelos para todas las poblaciones y todavía no es evidente el efecto de la fragmentación. Es probable que los aproximadamente 40 años de fragmentación en la zona aún no sean suficientes como para revelar graves problemas de diversidad genética en las poblaciones de *A. uniformis*. Estudios recientes han documentado la presencia de esta especie sólo en fragmentos de selva. No se ha registrado su presencia en potreros o pastizales que representan una barrera evitando así el flujo génico. Si las poblaciones pequeñas permanecen aisladas por más generaciones es probable que la variación genética se reduzca y la acción de la deriva génica sea más severa.

## ABSTRACT

*Anolis uniformis* is the most abundant lizard species in the rain forest at Los Tuxtlas and appears to be threatened by habitat fragmentation, especially in small isolated populations (1-10 ha). This species is kin to healthy and not disturb areas, and has limited dispersal capabilities due to low mobility, therefore with less possibilities of migration and gene flow. This paper aims to detect the effects of forest fragmentation in *A. uniformis* through mitochondrial sequences and microsatellites. Forty-one samples of ND4 mitochondrial gene were sequenced and 13 haplotypes were detected showing low levels of haplotype ( $h = 0.504$ ) and nucleotide diversity ( $\pi = 0.001$ ). As for microsatellites, were tested all primers reported in literature for the genus *Anolis* (14 total); only half successfully worked for the species. To record the number of alleles per locus and population we used 6 and 8% acrylamide gels and silver staining. Of the 270 individuals genotyped and of the seven microsatellite that successfully amplified, two of them were monomorphic and five polymorphic. The percentage of polymorphic loci was 71%, the average number of alleles by polymorphic locus was 2.4 and the mean heterocigosity ( $HE$ ) was 0.330. Analysis of molecular variance (AMOVA) showed that there is no variation among populations ( $F_{ST} = 0$ ). The lack of alleles indicates that it is possible that the population suffered an accelerated loss of allelic diversity, without heterozygosity loss. Most of microsatellites have only two alleles for all populations and the effect of fragmentation is not yet clear. It is likely that the approximated 40 years of fragmentation in the area are not enough to reveal serious problems of genetic diversity in the populations of *A. uniformis*. Recent studies have documented the presence of this species only in forest fragments. There are no records of *A. uniformis* in pastures or grasslands that represent a geographic barrier avoiding gene flow between isolated populations. If small isolated populations stay within the fragments for several more generations, we expect a reduction of genetic variation and genetic drift will be more severe.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Fragmentación de la selva

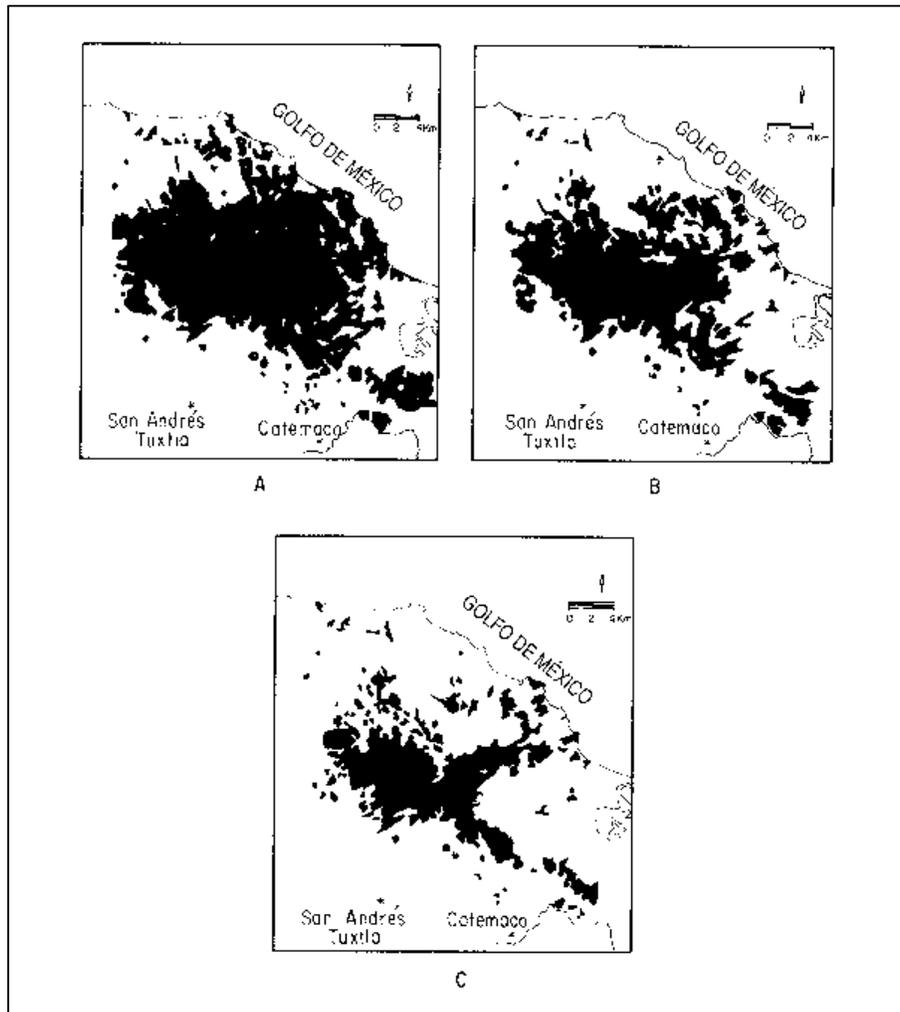
La expansión de uso de tierra que acompaña el crecimiento de las poblaciones humanas resulta en la fragmentación del hábitat. La fragmentación es un proceso de modificación o pérdida del hábitat que produce pequeños remanentes de vegetación aislados en un paisaje de agricultura, urbanización y otras formas de disturbio (Wilcox y Murphy, 1985). Como consecuencia de la fragmentación están la pérdida y cambio en la configuración del hábitat (Villard et al., 1999). La destrucción y fragmentación del hábitat es uno de los problemas más graves de conservación ya que es la que contribuye más a extinciones recientes y futuras (Henle et al., 2004).

El proceso de fragmentación no es al azar. Las áreas accesibles, de topografía poco accidentada y con alta productividad son las primeras en ser alteradas para utilizar la tierra en agricultura, ganadería, asentamientos humanos o extracción forestal (Burgman y Lindenmayer, 1998). Los fragmentos creados difieren del hábitat continuo original en cuatro aspectos importantes: menor tamaño, mayor superficie de borde, proximidad del centro a los bordes y su origen.

La deforestación y en consecuencia la fragmentación es evidente en la Sierra de los Tuxtlas. El continuo de vegetación que ocupaba gran parte del macizo montañoso de la región se está convirtiendo en pequeños fragmentos de vegetación, en su mayoría pastizales dedicados a la ganadería (Dirzo, 1991).

En el estado de Veracruz con un área de 7.28 millones de ha, los pastizales se han extendido desde 1940 a los 90's de 1.6 a 4.5 millones de ha (Barrera-Bassols, 1992); esto es, del 21% al 61% del total superficial del estado (Fig. 1.1). Actualmente, los fragmentos de selva tienen una extensión variable y están

inmersos en una matriz de potreros. Al menos los predios que se encuentran alrededor de la Estación de Biología Los Tuxtlas de la UNAM, tienen de 1 a 40 años de haber sido abiertos, pero el promedio es de más de 20 años (Barrera-Laez, 1995).



**Fig. 1.1** Secuencia de imágenes de la cobertura de vegetación en la parte norte de Los Tuxtlas, A) 1967, B) 1976 y C) 1986, tomada de Dirzo y García (1992).

## **1.2 Impacto de la fragmentación del hábitat a nivel ecológico y genético**

Existen varios estudios del impacto de la fragmentación en especies muy móviles, como son aves y mamíferos. Sin embargo, estudios sobre efectos de la fragmentación en seres poco vágiles, como son anfibios y reptiles, son muy

escasos. De acuerdo con Mac Nally y Brown (2001), el interés sobre el impacto de la fragmentación del hábitat, especialmente en biodiversidad, ha ido en aumento y se refleja en el rápido crecimiento de la literatura. Por ejemplo, en la base de datos bibliográfica Current Contents y Biological Abstracts hasta el 2008 fueron obtenidas 1336 citas sobre el tema. En esta base se detectó una gran cantidad de reportes de impacto de la fragmentación, de los cuales 347 fueron para aves, 325 para mamíferos, 45 para anfibios, 40 para peces y 35 para reptiles. Esto destaca la importancia de incrementar el conocimiento del efecto de la fragmentación del hábitat en este último grupo.

Laurence et al. (2002), como resultado de un proyecto relacionado con la fragmentación del Amazonas, señalan que, tal como se esperaba, la riqueza de especies está correlacionada positivamente con el tamaño del fragmento. Así, los fragmentos pequeños contienen menor número de especies y menor diversidad de hábitat que los fragmentos grandes (Wilcox y Murphy, 1985; Haila et al., 1993). Además, las zonas intactas contienen mucho más especies por unidad de área que los fragmentos. También sugieren que la pérdida de especies difiere entre fragmentos; es decir, una vez aislados, los fragmentos pequeños inicialmente pierden especies a un ritmo más acelerado que los fragmentos grandes.

Algunas de las variables importantes que pueden influenciar las tasas de dispersión, persistencia y estabilidad de las poblaciones incluyen el número de fragmentos, su tamaño y configuración espacial (Ebenhard 1991; Hansson, 1991; Wu et al., 1993; Peacock y Smith, 1997). El tamaño de un fragmento y su aislamiento de otras áreas naturales tiene una fuerte influencia en los procesos ecológicos que ocurren dentro de esa área, incluyendo impacto en el tamaño de la

población, composición de la comunidad, inmigración y emigración (Collinge, 1996).

El mantenimiento de la diversidad local en ciertos paisajes depende en gran medida de la vagilidad de las especies, determinada por la capacidad de sus individuos para moverse entre hábitats aislados (Forman y Gordon, 1986; Turner, 1989; Guevera y Laborde 1993). El efecto de la fragmentación en especies dinámicas depende de la naturaleza de la fragmentación y de las características de historias de vida de las especies en cuestión (Wilcox y Murphy, 1985; Gilpin y Soulé, 1986; Soulé, 1986; Gilpin y Hanski, 1991; Wu y Levins, 1993; Lacy y Lindenmayer, 1995; Peacock y Smith, 1997). La fragmentación del hábitat puede quebrantar la dinámica de poblaciones naturales y afectar a los organismos subdividiendo las poblaciones (Harris, 1984; Gilpin y Hanski, 1991; Mech y Hallett, 2001), reduciendo la dispersión y el flujo genético, y así promover la endogamia, reducción en el tamaño efectivo de la población y pérdida de variabilidad genética (Gilpin, 1991; Hasting and Harrison, 1994; Lacy y Lindenmayer, 1995; Peacock y Smith, 1997). La disminución de la variación genética entre poblaciones reduce la oportunidad de respuestas adaptativas a la variación de condiciones locales; la pérdida de variación genética dentro de las poblaciones también reduce la oportunidad de adaptación pero además puede resultar en baja reproducción o supervivencia y por lo tanto reducir la viabilidad de la población (Madsen et al., 1996).

### **1.3 Efectos de la fragmentación del hábitat en reptiles**

Berry et al. (2005) evaluaron el efecto de la matriz de vegetación en la dispersión de una lagartija, el eslizón *Oligosoma grande*, al sur de Nueva Zelanda.

Combinaron datos demográficos con datos moleculares derivados de microsatélites para investigar la conectividad entre las poblaciones de esta especie en diferentes matrices de vegetación como pastizal nativo y pastizal exótico. Las poblaciones en pastizal exótico tuvieron una mayor estructura poblacional ( $F_{ST}$  0.097  $\pm$  0.0006 SE; significativamente diferente de cero  $P < 0.0002$ ) y menor variación genética que las poblaciones en pastizal nativo, implicando menos dispersión entre las poblaciones de pastizal exótico. La prueba basada en  $F_{ST}$  detectó dispersión significativa sesgada en las hembras en los pastizales nativos ( $F_{ST}$  machos 0.089;  $F_{ST}$  hembras 0.006,  $P = 0.002$ ) pero no en los pastizales exóticos ( $F_{ST}$  machos 0.069;  $F_{ST}$  hembras 0.113,  $P = 0.23$ ).

Los cambios en los patrones de dispersión también puede afectar algunos procesos importantes dentro de las poblaciones como los sistemas de apareamiento y la estructura social del grupo (e.g., Stow y Sunnucks, 2004). Sumner (2005) observó que la fragmentación del hábitat ha tenido efectos en los patrones de dispersión de la lagartija *Gnypetoscincus queenslandiae*. Por medio de microsatélites desarrolló análisis de parentesco en fragmentos y zonas continuas en el bosque tropical al noreste de Australia. Contrario a lo que se esperaba, detectó un bajo nivel de parentesco entre las poblaciones fragmentadas en comparación con las poblaciones de zonas continuas. Sin embargo, el patrón de parentesco genético entre sexos indicó dispersión de los machos en las poblaciones fragmentadas y en zonas continuas. Por otro lado, las hembras estuvieron más relacionadas con otras hembras en zonas fragmentadas pero no en zonas continuas, lo que sugiere una disminución en la dispersión de hembras entre fragmentos. También se enfatizó que sin la creación de corredores que

permitan la dispersión de los individuos entre las poblaciones, más la baja diversidad alélica detectada, conllevará a una erosión genética con el tiempo.

Hoehn et al. (2007) evaluaron los efectos de la fragmentación con respecto a la especificidad o generalidad al hábitat y la capacidad de dispersión de los organismos. Desde 1900 cerca del 93% de la vegetación original ha sido eliminada y reemplazada por zonas de cultivo. La vegetación remanente está distribuida en cientos de parches de diferente tamaño. El estudio se enfocó en dos especies de geckos (*Oedura reticulata* y *Gehyra variegata*) en zonas fragmentadas y en zonas continuas al oeste de Australia. Estas especies son simpátridas, pero *O. reticulata* es especialista y exclusivamente arbórea; en cambio *G. variegata* es generalista encontrándose en árboles, arbustos, troncos y rocas. Usaron microsatélites para comparar la estructura genética y tasas de dispersión. Los resultados mostraron que estas dos especies presentan diferentes niveles de persistencia en las zonas fragmentadas. *Gehyra variegata* se dispersa más fácilmente que *O. reticulata*, y por eso, la estructura genética de esta especie fue significativamente más alta ( $F_{ST}$  0.041-0.163;  $P < 0.01$ ) que la de *G. variegata* ( $F_{ST}$  0.007-0.081). Este estudio ayudó a demostrar que la dispersión y la especialización al hábitat son factores críticos en la persistencia de ciertas especies en zonas fragmentadas.

Los resultados obtenidos en estos estudios son similares: la fragmentación del hábitat evita el intercambio genético entre las poblaciones locales (reduciendo la dispersión y el flujo genético), así se promueven los apareamientos consanguíneos y se reduce el tamaño efectivo de la población produciéndose la pérdida de variabilidad genética. La mayoría de los trabajos sobre el impacto de la fragmentación del hábitat en reptiles se han desarrollado con marcadores

moleculares neutrales como microsatélites (e.g., Stow et al., 2001: Stow y Briscoe, 2005) pero también con otros marcadores como DNA mitocondrial (e.g., Sarre, 1995; Driscoll y Hardy, 2005) (Cuadro 1.2).

**Cuadro 1.2. Estudios del impacto de la fragmentación del hábitat en reptiles con marcadores moleculares como DNA mitocondrial y microsatélites.**

Especie	Localidad	Años desde la fragmentación	Tamaño (Ha) de los Fragmentos	Marcadores moleculares	Efectos Encontrados	Referencia
<i>Oedura reticulata</i>	Kellerberrin, Australia	60-85	0.25-5.4	DNAmt (RFLP's)	Pérdida de haplotipos raros por deriva génica, tendencia a la fijación de un haplotipo	Sarre, 1995
<i>Amphibolurus nobbi</i>	New South Wales, Australia	35		Secuencias DNAmt	No se detectó reducción significativa en diversidad haplotípica entre las poblaciones	Driscoll y Hardy, 2005
<i>Gnypetoscincus queenslandiae</i>	Queensland, Australia	50-80	2 – 65	Microsatélites	Decremento del tamaño efectivo de la población; disminución de la diversidad alélica	Sumner et al., 2004
<i>Gnypetoscincus queenslandiae</i>	Queensland, Australia	50-80	2 – 65	Microsatélites	Dispersión difiere entre machos y hembras; decremento de dispersión en hembras.	Sumner, 2005
<i>Egernia cunninghami</i>	New South Wales, Australia	70		Microsatélites	Pérdida de diversidad alélica	Stow y Briscoe, 2005
<i>Oedura reticulata</i> y <i>Gehyra variegata</i>	Kellerberrin y Trayning, Australia	90	0.3 – 5.4	Microsatélites	Diferenciación poblacional; <i>G. variegata</i> se dispersa más fácil y frecuentemente que <i>O. reticulata</i>	Hoehn et al., 2007

## **1.4 Técnicas genéticas y marcadores moleculares**

Las técnicas genéticas han sido usadas para examinar a pequeña escala las diferencias en la estructura de la población (Bowen, 1982) y a gran escala la fragmentación del hábitat (e.g., Gaines et al., 1997; Mech y Hallett, 2001).

El análisis de secuencias de DNA entre especies puede proveer información acerca de las relaciones filogenéticas, y dentro de una especie puede proporcionar información sobre filogeografía, estructura e historia de la población (Avice, 1994; Glenn et al., 2002).

Un marcador genético es un carácter medible y que se hereda de forma mendeliana. Tradicionalmente se contraponen los marcadores morfológicos (color, forma, etc) a los marcadores moleculares (diferencias de DNA) y a los bioquímicos (isoenzimas, proteínas, metabolitos secundarios como terpenos, etc). El número de marcadores moleculares de DNA que se pueden desarrollar es prácticamente ilimitado, siendo además independientes del estado de desarrollo o del órgano analizado (Tagu y Moussard, 2006).

### **1.4.1 DNA mitocondrial**

El DNA mitocondrial (DNAMt) es una porción del genoma especialmente útil para mostrar herencia uniparental, en la que las características pasan de un progenitor (madre) a sus descendientes (Klug y Cummings, 1999), y así, revela patrones de filopatría y diferenciación poblacional (Avice, 1994; Moore, 1995; Parker et al., 1998; Glenn et al., 2002). Ha sido usado ampliamente en estudios de poblaciones de varios grupos taxonómicos (Avice, 1994; Dessauer et al., 2002). En reptiles ha sido usado en análisis filogenéticos (e.g., Reeder, 2003; Gifford et al., 2004; Scott et al., 2004; Keogh et al., 2005; Zarza et al., 2007), sobre todo en

estudios que involucran aspectos filogenéticos y su aprovechamiento para la conservación de especies (e.g., Keogh et al., 2003). Sin embargo, existen pocos trabajos en los que se utilice DNAm para conocer los efectos que tiene la fragmentación en la estructura genética de una población o especie (e.g., Cunningham y Moritz, 1998).

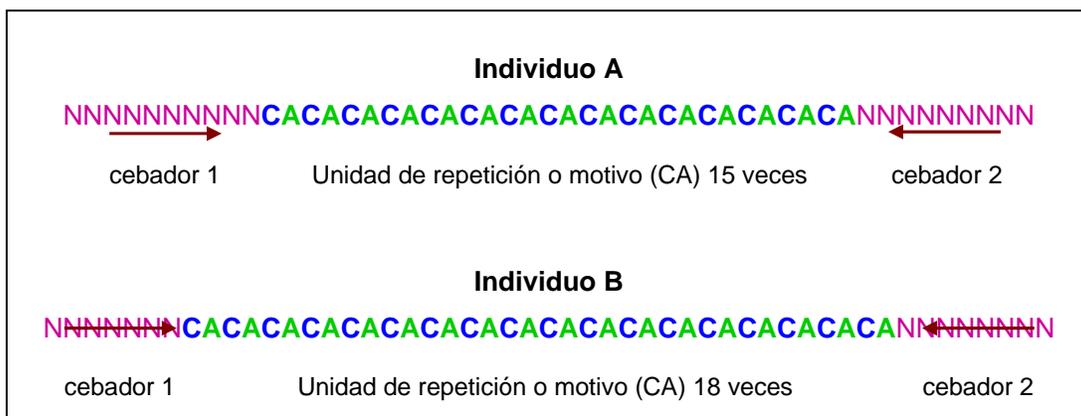
#### **1.4.2 Microsatélites**

Los marcadores moleculares neutrales han sido empleados en estudios de especies amenazadas para analizar la estructura de la población y flujo genético y para asignar niveles de diversidad alélica dentro de las poblaciones (Moritz, 1994; Avise y Hamricj, 1996; Smith y Wayne, 1996; Sherwin y Moritz, 2000). Uno de los marcadores moleculares que se ha convertido en una herramienta de gran importancia en estudios de genética de poblaciones, conservación y manejo de especies en peligro de extinción son los microsatélites (Scribner y Pearce, 2000; González, 2003).

Los microsatélites o SSRs (Simple Sequence Repeats) son secuencias cortas de DNA, de 1 a 6 nucleótidos, repetidas cierto número de veces y que se encuentran esparcidos por todo el genoma de organismos eucariontes (Tautz, 1989). La abundancia, distribución uniforme y alto polimorfismo hacen que estos marcadores sean de gran utilidad en genética de poblaciones y estudios de mapeo de genes (Hillis et al., 1996). Son marcadores codominantes y debido a la elevada tasa de polimorfismo aportan información valiosa para resolver problemas tanto individuales como poblacionales. Son apropiados para el estudio de genética de poblaciones y gracias a la técnica de PCR son fácilmente automatizables y el tejido que se emplea no necesita ser de mucha calidad. Se pueden amplificar por

medio de técnicas no invasivas a partir de muestras de pelo, heces, hueso, plumas, biopsias, sangre, etc; además puede usarse con muestras conservadas de museos ó colecciones privadas de muchos años de antigüedad (González, 2003). Se clasifican con base en la longitud y en la continuidad de la unidad de repetición. De acuerdo con la longitud pueden ser mononucleótidos  $(A)_n$ , dinucleótidos  $(TG)_n$ , trinucleótidos  $(CTG)_n$ , tetranucleótidos  $(GCAA)_n$ , etc, y con respecto a la continuidad pueden ser perfectos  $(AGG)_n$  ó interrumpidos  $(CT)AT(AC)_n$  (Scribner y Pearce, 2000). De acuerdo con Weber (1990), además de microsatélites perfectos e interrumpidos también existen microsatélites compuestos que consisten en 2 o más repeticiones no interrumpidas  $(CA)(GA)_n$ .

Los microsatélites son polimórficos y su fuente de variación es la mutación; que modifica el número de unidades de repeticiones ó motivo y no su secuencia propiamente dicha (Tagu y Moussard, 2006). Por ejemplo,  $(CA)_{10}$ , el motivo ó la unidad de repetición consiste en los nucleótidos C y A que se repiten 10 veces: CACACACACACACACACA. Un locus determinado puede presentar 15 repeticiones del motivo CA en el individuo A, pero en el individuo B el motivo puede repetirse 18 veces (Fig. 1.3).



**Fig. 1.3. Polimorfismo. Unidad de repetición o motivo en diferentes individuos. Modificado de Tagu y Moussard (2006).**

Existen dos modelos de mutación clásicos que se ha sugerido se ajustan a la evolución de los microsatélites. El primer modelo es el de alelos infinitos (Infinite Allele Model, IAM; Kimura y Crow, 1964) en el que una mutación involucra cualquier número de repeticiones y siempre resulta en un estado alélico nunca antes presente en la población. El segundo es el modelo mutacional paso a paso (Step-wise Mutation Model, SMM; Kimura y Ohta, 1978) que involucra la pérdida ó ganancia de una unidad de repetición, así, los alelos pueden mutar a través de estados alélicos ya existentes en la población. Algunos autores (e.g., Valdes et al., 1993; Weber y Wong, 1993) sugieren que este es el mejor modelo para explicar la mutación de los microsatélites.

### **1.5 *Anolis uniformis***

No existen microsatélites específicos para *Anolis uniformis*, pero debido a que la amplificación cruzada para un mismo locus suele mantenerse cuando se trabaja con taxones cercanos pertenecientes al mismo género o a géneros separados recientemente (Scribner y Pearce, 2000) pueden usarse con éxito los microsatélites de otras especies del género *Anolis*. Se han aislado microsatélites para *Anolis oculatus* en las Antillas mayores (Stenson et al., 2000) y para *Anolis roquet* de las Antillas menores (Ogden et al., 2002). Stenson et al. (2000) establecieron dos librerías genómicas obteniendo alrededor de 20 primers, pero de éstos sólo seis pares produjeron bandas polimórficas. Los primers AoGT2, AoGT9, Ao7;73, Ao10;13, AoSA18, AoBA36 mostraron un elevado polimorfismo de entre 13 y 25 alelos en *A. oculatus*. Estos microsatélites también fueron probados en otras especies de la serie *bimaculatus* (*A. marmoratus*, *A. leachi*, *A. gingivinus*, *A. bimaculatus*, *A. sabanus*, *A. nubilus*, *A. lividus*, *A. ferreus* y *A.*

watts). En algunos loci no se detectaron productos de PCR, o bien fueron monomórficos; sin embargo, la mayoría amplificaron exitosamente y fueron altamente polimórficos. Por otro lado, Ogden et al. (2002), con el objetivo de investigar la naturaleza de la diferenciación poblacional tan marcada en *A. roquet*, obtuvieron ocho pares de primers (Ar014, Ar031, Ar035, Ar062, Ar065, Ar068, Ar120, Ar126) que también fueron altamente polimórficos, presentando cada locus de 5 a 19 alelos.

La disminución del área habitada y el creciente aislamiento entre los fragmentos producen extinciones locales y dificultades de colonización, que afectan especialmente a los organismos con poca capacidad de dispersión como los reptiles (Santos et al., 2003). Aunque *Anolis uniformis* es una especie abundante en la selva, con densidades de más de un individuo por metro cuadrado (Villarreal y Heras, 1997), se cree que se encuentra afectada en gran medida por la fragmentación, especialmente las poblaciones que habitan fragmentos pequeños (1-10 ha). Se sabe que tiene un alto arraigo a zonas de selva no alteradas; son poco vágiles y por lo tanto tienen baja probabilidad de migración y flujo genético entre poblaciones de otros fragmentos. Debido a esto, los efectos a nivel genético pueden ser grandes. *Anolis uniformis* es una especie de lagartija pequeña; los machos alcanzan tallas promedio de 37 mm de longitud hocico-cloaca y las hembras son ligeramente más pequeñas, alrededor de 36 mm. Los machos tienen una papada gular de color rojo brillante con una mancha circular grande de color azul púrpura (Fig. 1.4). Las hembras tienen diferentes patrones de coloración en el dorso, con rombos y una raya blanca. Habitan en el sotobosque en contrafuertes de árboles y en arbustos, plántulas y palmas. Forma subpoblaciones en parches homogéneos de vegetación de alrededor de media

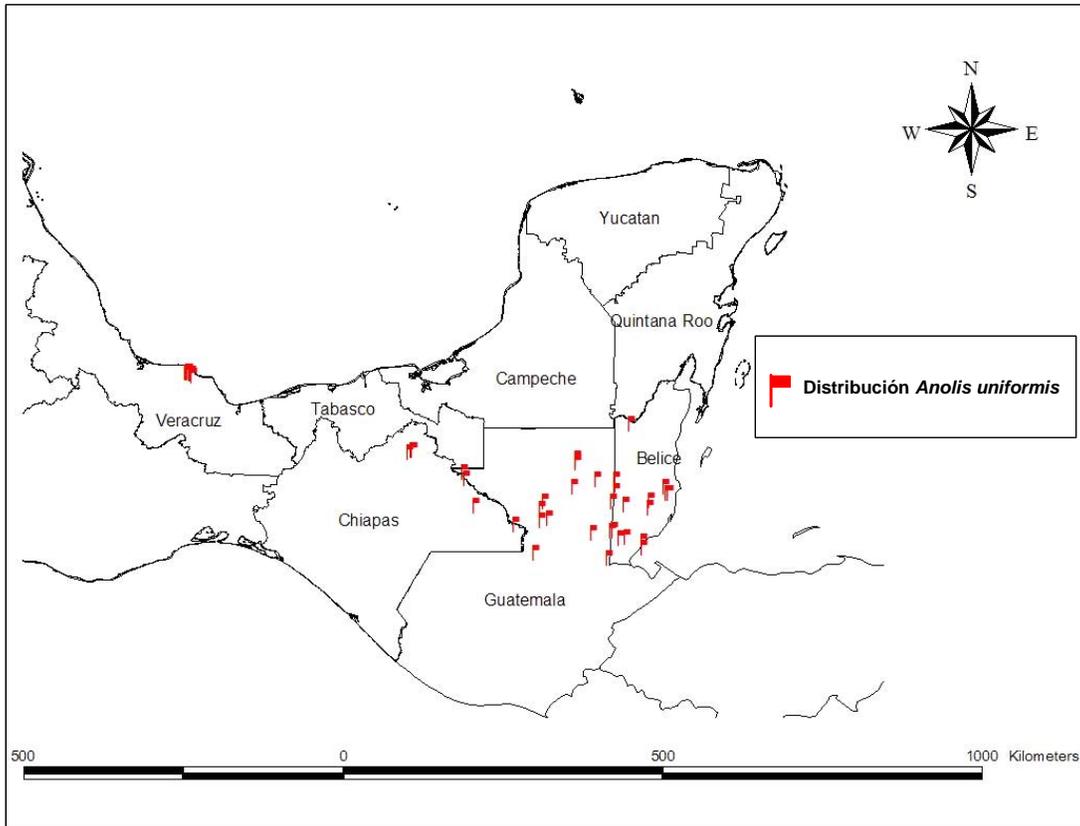
hectárea. Dentro de estos parches se agrupan en pequeños conglomerados de aproximadamente una docena de individuos, con un macho dominante, algunos satélites, dos ó tres hembras adultas y el resto infantiles y juveniles (Villareal y Heras, 1997).

De acuerdo con Villareal y Heras (1997) esta especie se distribuye a través de toda la franja neotropical que va desde el sur de Tamaulipas hasta Guatemala y Belice pasando por Veracruz, Tabasco, Campeche y Chiapas (Fig. 1.5).



**Fig. 1.4. *Anolis uniformis*.**

*Anolis uniformis* es un buen modelo para estudiar el efecto de la fragmentación de la selva ya que es la especie de lagartija más abundante de la Región de los Tuxtlas, tiene alto arraigo a zonas de selva no alteradas, es poco vágil (Villareal y Heras, 1997; Cabrera, 2005) y presenta ciclos de vida cortos (Campbell et al., 1989).



**Fig. 1.5. Distribución de *Anolis uniformis* según Lee (1996) y datos de la Colección Nacional de Anfibios y Reptiles del Instituto de Biología, UNAM.**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Conocer el efecto de la fragmentación en la estructura genética de *Anolis uniformis* en Los Tuxtlas.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Describir la variación genética al interior de fragmentos de selva de diferente tamaño.
- Establecer si hay diferencias genéticas entre fragmentos a diferentes distancias.
- Establecer el efecto del tiempo de origen del fragmento en la variación genética.
- Determinar si existe algún problema de conservación para la especie, y de haberlo, proponer alternativas para conservación.

## **3. HIPÓTESIS**

Se espera encontrar efecto de la fragmentación en *Anolis uniformis* de tal modo que habrá una mayor diferenciación genética entre las poblaciones a medida que los fragmentos están más alejados, y habrá una menor variabilidad al disminuir el tamaño de los fragmentos. Se espera mayor diferenciación en fragmentos más antiguos.

#### 4. ÁREA DE ESTUDIO

La Sierra de Los Tuxtlas es una serie de montañas de origen volcánico. Se localiza entre los 18° 10' y 18° 45' de latitud norte y los 94° 42' y 95° 27' de longitud oeste, abarcando un área de aproximadamente 90 por 50 Km (Dirzo et al., 1997). Se origina a partir de los 200 m snm y se eleva hasta 1700 m snm. Las elevaciones más importantes son el volcán San Martín Tuxtla, volcán Santa Marta, cerro Pelón, cerro Campanario, volcán San Martín Pajapan y cerro Cintepec (Soto y Gama, 1997). En la vertiente del Volcán San Martín Tuxtla se localiza la reserva de la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas. Esta área se encuentra cubierta mayoritariamente por selva alta perennifolia, pero existen variantes como selva mediana y selva alta sobre pedregal (Dirzo et al., 1997).

Para este estudio se eligieron 9 fragmentos en total, 3 fragmentos de selva grandes (con una extensión de 100 ha en adelante), 3 fragmentos medianos (de 20 a 90 ha) y 3 fragmentos chicos (de 1 a 10 ha). La elección de los fragmentos se hizo de acuerdo a los criterios de Cabrera (2005): a) que la vegetación fuera diversa; b) que se presentaran plantas características de selva conservada como por ejemplo *Astrocaryum mexicanum*, *Chamaedorea pinnatifrons*, *Nectandra ambigens*, entre otras (Ibarra-Manríquez et al., 1997); y, c) que hubiera registros de *Anolis uniformis*. Los fragmentos grandes o zonas relativamente continuas son el lote 67 de la reserva de Los Tuxtlas llamada Selva Estación zona baja. El segundo sitio, Selva Estación zona alta, se ubicó en la porción más elevada del polígono de la reserva a 4 Km al oeste de la Estación de Biología (lotes 72 y 73), finalmente el tercer sitio en la Selva de Los Hubber a 2.85 Km al norte de la estación. Los fragmentos medianos son Cerro del Borrego, que se encuentra a unos 6.7 Km al norte de la Estación de Biología, Playa Escondida a un costado del

Hotel del mismo nombre a 2.7 Km al este de la estación y a 5.3 Km al sureste de la estación está el tercer fragmento mediano llamado La Perla. Finalmente los fragmentos chicos F3, F4 y F6 (Cabrera, 2005) se encuentran dentro de ranchos y potreros de familias de ganaderos de la Colonia Agrícola Ganadera Adolfo Ruiz Cortines y se ubican a 7.5 Km al noroeste de la Estación de Biología (Fig. 4.1).

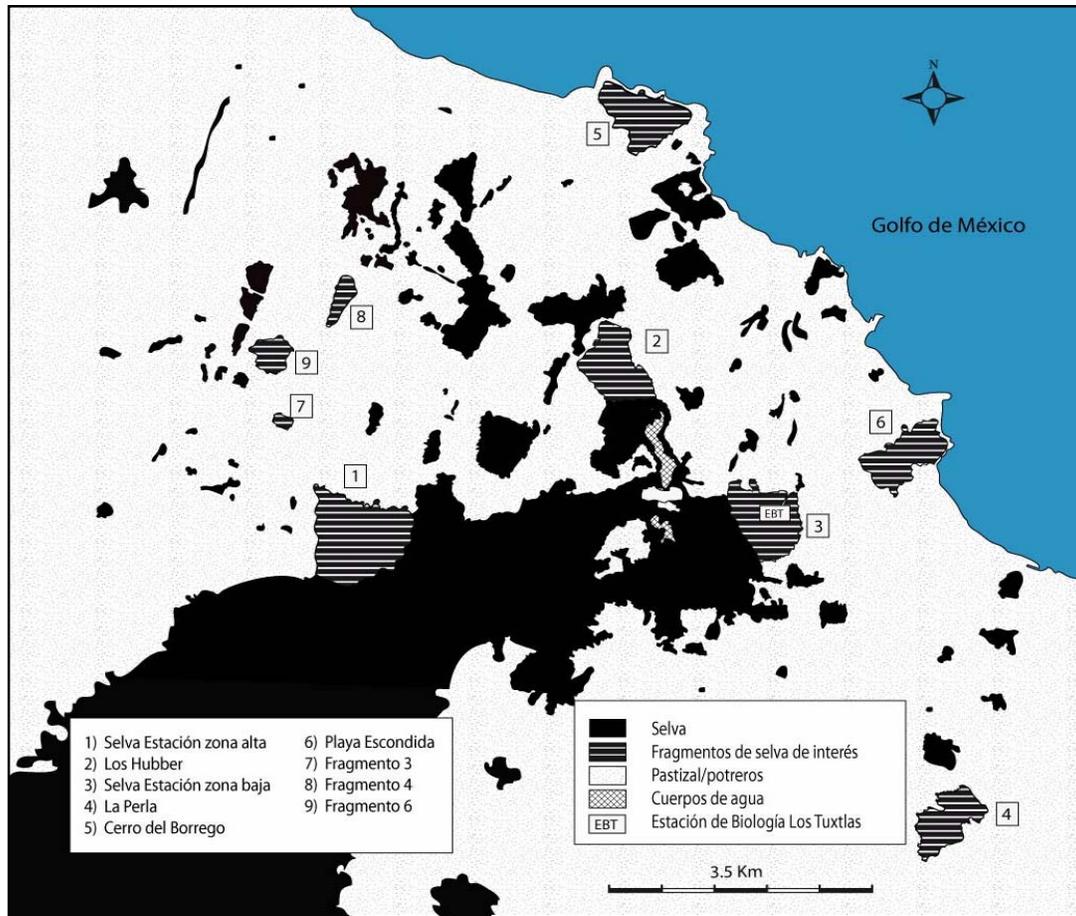


Fig. 4.1 Área de estudio. Fragmentos de selva muestreados.

## **5. MÉTODO**

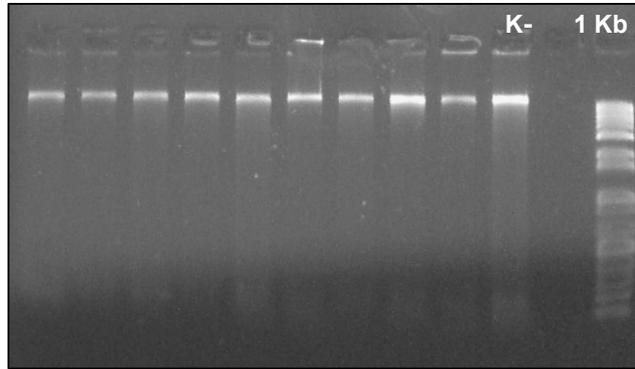
### **5.1 Trabajo de Campo**

Se realizaron cuatro salidas de campo a Los Tuxtlas para coleccionar tejido de *Anolis uniformis*. Las primeras dos salidas se llevaron a cabo del 9 al 18 de julio y del 11 al 18 de septiembre de 2005; la tercera y cuarta del 15 al 23 de enero y del 26 de junio al 15 de julio de 2006. Se coleccionaron 30 puntas de cola por fragmento: 3 fragmentos grandes, 3 fragmentos medianos y 3 fragmentos pequeños cercanos a la estación de Los Tuxtlas. Las lagartijas fueron atrapadas a mano y se registró el sexo y lugar donde fueron encontradas para finalmente ser liberadas exactamente en el mismo sitio. Las colas se fijaron en Etanol absoluto (OH al 100%) y se mantuvieron en refrigeración hasta su uso en el laboratorio.

### **5.2 Trabajo de laboratorio**

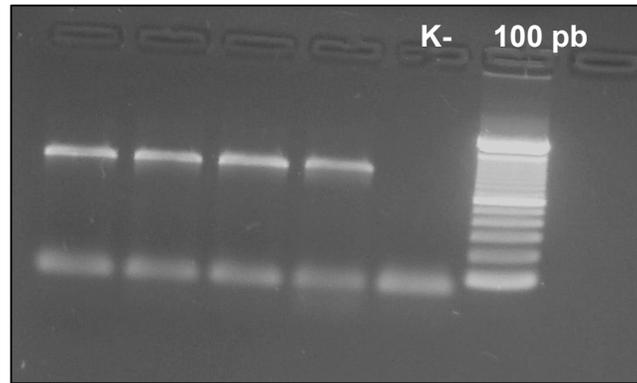
#### **5.2.1 Obtención y amplificación de DNA**

Para la extracción de DNA se empleó la técnica de fenol/cloroformo (Ausbel et al., 1992) (Apéndice I) que es uno de los métodos más usados. Después de las extracciones se corrieron geles de calidad de agarosa al 1% (Fig. 5.1) para comprobar la obtención de DNA y que no hubo contaminación comprobando con un control negativo; además para tener idea del tamaño y peso de los fragmentos de DNA. Para visualizar el DNA se usó Bromuro de Etidio.



**Fig. 5.1. Gel de agarosa al 1% para comprobar la extracción de DNA. Control negativo (K-), 1Kb marcador de peso molecular.**

Mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) se amplificó el DNA. El objetivo de la PCR es la amplificación directa de un gen o un fragmento de DNA. Este proceso involucra una sucesión de ciclos. Cada ciclo tiene tres etapas: desnaturalización o calentamiento a más de 90°C para separar las dos cadenas de DNA, alineamiento del oligonucleótido al templado de cadena sencilla a una temperatura entre 40 y 65°C y finalmente extensión de los oligonucleótidos por la DNA polimerasa termoestable a 72°C (Luque y Herraéz. 2002). Se hicieron reacciones de PCR de 15 ó 25 µl en tubos de 0.2 ó 0.5 ml (Apéndice II). Para comprobar la amplificación del fragmento de DNA de interés y que los productos estuvieran libres de contaminantes se corrieron geles de calidad de agarosa al 1%. Se usó un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb) para estimar el tamaño de los fragmentos de DNA (Fig. 5.2).



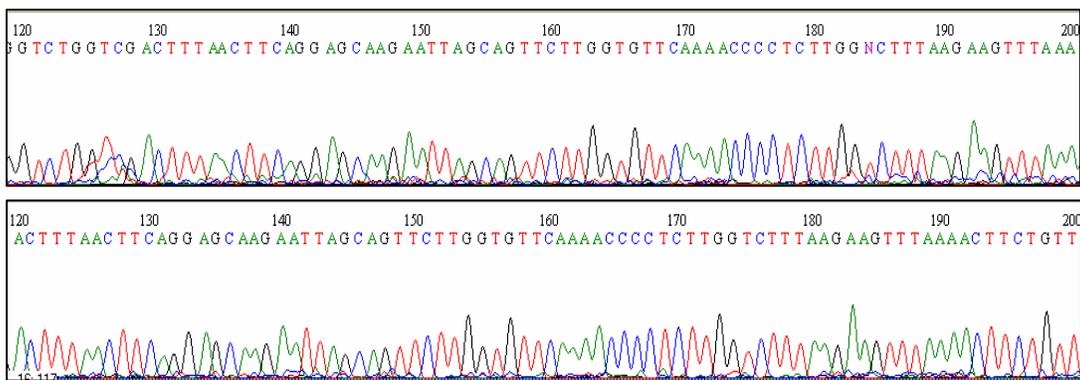
**Fig. 5.2.** Gel de agarosa al 1% para visualizar productos de PCR. Control negativo (K-). Marcador de peso molecular de 100pb.

### **5.2.2. Secuencias del gen mitocondrial ND4**

Para evaluar la utilidad del gen mitocondrial ND4 en este trabajo se procesaron 5 muestras colectadas en cada uno de los fragmentos de selva, es decir, 45 muestras en total. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología, UNAM. Se amplificaron los primers ND4 y Leu (diseñados por Arévalo, 1994). Se hicieron reacciones de PCR en un termocicador Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9700. Se corrieron geles de agarosa al 1% para comprobar la amplificación y que los productos estuvieran libres de contaminación.

Los productos de PCR fueron purificados con un kit comercial (QIAquick PCR Purification kit Qiagen 28106) y posteriormente se hizo la reacción de secuenciación (volumen total de reacción 10  $\mu$ l). Estas reacciones fueron purificadas con Columnas de Sephadex (Centrisep Princeton Separations P/N CS-901) para eliminar impurezas y residuos de la fluorescencia así como residuos de los primers. Las muestras se secuenciaron en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología, UNAM, en un secuenciador automático ABI PRISM<sup>®</sup> 3100.

Se utilizaron los programas Sequencher 4.6 (Gene Codes, an Arbor, Michigan) y Bioedit (Tom Hall) para alinear las 45 secuencias. Sequencher ensambla y crea una secuencia consenso, la cual se corrige, reemplazando N ó bases (A, C, G, T) con ayuda de los cromatogramas Fig. 5.3. Después con Bioedit se llevó a cabo el alineamiento. Finalmente se compararon todas las secuencias alineadas, dentro del fragmento así como entre fragmentos; primero las 5 secuencias de cada fragmento y luego contra los otros fragmentos.



**Fig. 5.3. Cromatogramas con los que se corrigen secuencias consenso.**

Por medio de MEGA versión 4 (Tamura et al., 2007) y ARLEQUIN versión 3.1 (Excoffier et al., 2005) se llevó a cabo un análisis molecular de las secuencias. Se determinó el número de sitios variables, el tipo de sustitución nucleotídica (transversiones o transiciones), número de sitios informativos y composición nucleotídica. También se obtuvieron dos medidas de diversidad genética: diversidad haplotípica ( $h$ ) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ). La primera se usa para inferir la historia demográfica dentro de una especie y se expresa como

$$h = \frac{n}{n-1} \left( 1 - \sum_{i=1}^k P_i^2 \right)$$

donde  $n$  es el número de copias del gen en la muestra,  $k$  es el número de haplotipos y  $P_i$  es la frecuencia de la muestra del  $i$ ésimo haplotipo (Nei, 1987). Por otro lado, la diversidad nucleotídica se usa para determinar la proporción de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias, mediante las frecuencias de las secuencias pesa si éstas son las mismas o no (Hedrick, 2000), y se calcula con la fórmula

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k P_i P_j d_{ij}$$

donde  $d_{ij}$  es la proporción de diferentes nucleótidos entre la  $i$ ésima y  $j$ ésima secuencias,  $k$  es el número de haplotipos,  $P_i$  es la frecuencia del haplotipo  $i$  y  $n$  es el tamaño de la muestra (Nei, 1987). También se realizó la prueba de Tajima ( $D$ ) de neutralidad selectiva (Tajima, 1989). Esta prueba se basa en la diferencia entre dos estimadores de la cantidad de variación; una estimación es obtenida del número de sitios segregados ( $\theta$ ) ó sitios donde difieren las secuencias (Watterson, 1975), y la otra se basa en el número de diferencias pareadas ( $\pi$ ). La hipótesis nula de esta prueba es la evolución neutral en una población en equilibrio, lo que implica que no hay selección. Entonces, si  $D$  es igual a cero quiere decir que no existen diferencias entre estos dos estimadores y hay equilibrio neutral. Si  $D$  es negativa significa que  $\theta$  es mayor que  $\pi$  y se presentan mutaciones deletéreas por lo que podría estar actuando selección purificadora; por otro lado, si  $D$  es positiva ( $\pi$  mayor que  $\theta$ ) significa que algunos alelos se encuentran bajo selección balanceadora (Tajima 1983; 1989). Estas medidas se calcularon para todas las secuencias y por sitio, es decir, se analizaron las secuencias de cada uno de los fragmentos por separado. Finalmente se construyó una red de haplotipos

(Templeton et al., 1992; 1995) con el programa TCS v.1.21 (Clement, et al., 2000) para conocer las relaciones entre los haplotipos y su distribución geográfica.

### **5.2.3 Amplificación de microsatélites**

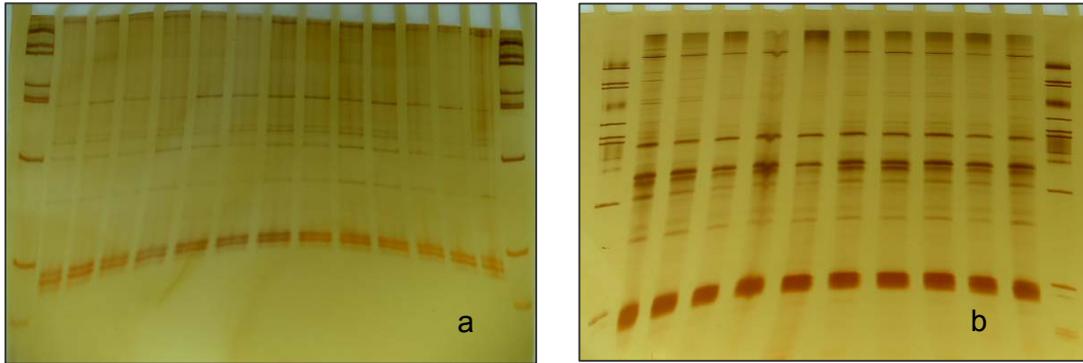
Para la amplificación de los microsatélites se usaron las mismas muestras de DNA usadas en la obtención de las secuencias del gen mitocondrial. Se cuantificó el DNA y obtuvo la concentración y pureza de las muestras en el espectrofotómetro del laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología. Después de las lecturas se hicieron diluciones 9:1 para que las concentraciones finales fueran de 10ng/μl. Sin embargo, para algunas muestras se decidió usar el DNA sin diluir, ya que en algunas pruebas de calidad amplificaban mucho mejor que con DNA diluido. Posteriormente las muestras fueron tratadas con RNAsa para eliminar el RNA, agregando 1 μl e incubando a 37°C por una hora. Este tratamiento se realizó en el taller de Sistemática del edificio Tlahuizcalpan de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Se hicieron pruebas de amplificación de los microsatélites usando 3 muestras de DNA. Se hicieron reacciones de PCR de 15 ó 25 μl en termocicladores Techne Flexigene®. Durante las pruebas y montaje de la técnica, se usaron los primers a 10 μM y fue necesario modificar concentraciones de MgCl<sub>2</sub>, cantidad de templado así como las temperaturas de alineamiento. Una vez que se establecieron las condiciones de PCR (Apéndice II), las reacciones se hicieron en placas de 96 pozos, pudiendo tener en una misma placa tres poblaciones para un locus.

#### **5.2.4 Geles de poliacrilamida**

Los productos de PCR de microsatélites fueron separados en geles de poliacrilamida que son un soporte empleado frecuentemente en electroforesis. Son químicamente inertes, de propiedades uniformes, se preparan de forma rápida y reproducible. La acrilamida forma geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado. Una de sus principales ventajas es que variando la concentración de polímeros se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro. De las tres modalidades de geles de poliacrilamida (en lámina vertical, varilla cilíndrica y lámina horizontal; García, 2000), en este estudio se hicieron en lámina vertical y se emplearon cámaras pequeñas (OWL-PS9) con peines de 1.5 mm de grosor de 15 pozos.

Se hicieron geles al 6 y al 8% (acrilamida 19:1 ó 29:1) no desnaturalizados y desnaturalizados (Apéndice III). Los productos de doble cadena se corren típicamente en un gel de poliacrilamida o en geles de agarosa muy concentrado, sin embargo, los resultados no son tan claros como los obtenidos con sistemas de detección de cadena sencilla por la tendencia a exhibir artefactos de PCR (ej. microsatélites dinucleótidos) que puede complicar el registro de los alelos. Por lo anterior se corrieron geles desnaturalizados para el locus AoGT9, dando una mejor resolución (Fig. 5.4).



**Fig. 5.4. a) Gel no desnaturalizado y b) gel desnaturalizado para el mismo microsatélite, es evidente la resolución que se logró mediante la desnaturalización.**

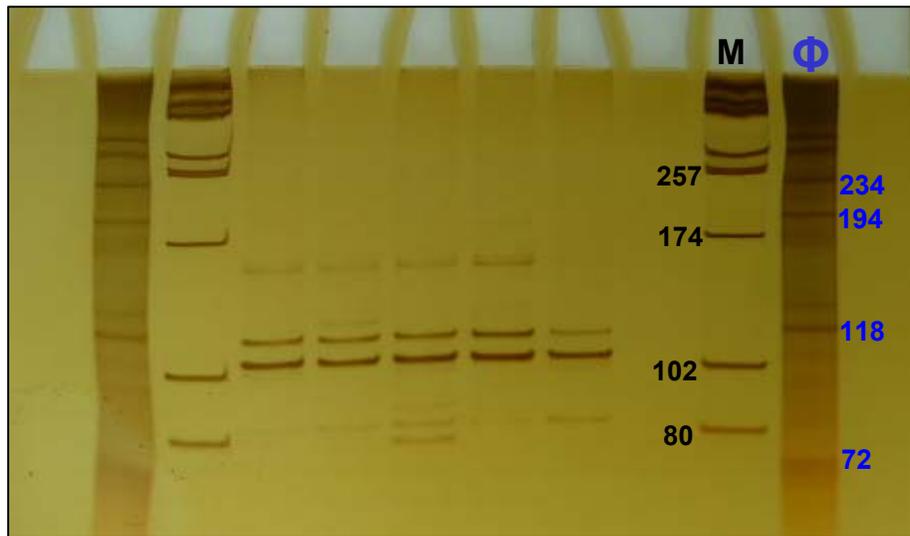
La concentración del gel se basó en el tamaño del fragmento (pb) que se deseaba separar ya que mientras más concentrado fue el gel las bandas se separaron más. Se cargaron 6µl de cada muestra, así como también 6µl de una escalera de peso molecular para identificar el tamaño del fragmento del microsatélite.

Los geles fueron teñidos con nitrato de plata (Apéndice IV). La tinción con plata es una técnica barata y segura, muy sensible y tiene la característica de producir coloraciones de café a negro. Los geles ya teñidos fueron almacenados en un contenedor con la solución detenedora y luego se registró toda la información por medio de fotografías digitales. Las fotografías se imprimieron o se trabajó con las imágenes directamente en la computadora para registrar el número de alelos por locus, el tamaño de los alelos (pb), por locus y para cada población.

#### **5.2.4.1 Lectura de geles**

La lectura de los geles se hizo de abajo hacia arriba, es decir, se estableció el tamaño de los alelos en pares de bases (pb) del más pequeño al más grande. Un organismo heterócigo es el que tiene dos alelos o dos bandas diferentes, en tanto que un homócigo posee sólo un alelo. Para establecer el tamaño de los

alelos éstos fueron comparados con escaleras de peso molecular comerciales. Se usaron varios marcadores de peso molecular: 100pb (100-3000 pb), Micromarker (80-587 pb) y  $\Phi$ X174Hae III (72-1353 pb). Estos marcadores fueron siempre cargados en el primer y último pozo del gel (Fig. 5.5). En el ejemplo de la figura 5.5 se observan dos alelos, el primero es de 108 pb y el segundo de 118 pb.



**Fig. 5.5.** Dos de los marcadores de peso molecular Micromarker (M) (80-587 pb) y  $\Phi$ X174Hae III ( $\Phi$ ) (72-1353 pb) para estimar el tamaño de los alelos.

En la lectura de los geles, es de gran importancia reconocer los artefactos producidos por PCR para poder identificar correctamente los alelos y sus tamaños. Existen varios artefactos de PCR asociados con los microsatélites. El más común es una escalera de fragmentos pequeños que van decreciendo en tamaño con respecto al alelo primario. Estas bandas falsas, llamadas sombra o tartamudeo (stutter bands), son particularmente evidentes en dinucleótidos y se cree que son resultado de un deslizamiento durante la replicación mediada por la Taq polimerasa (enzima termoestable activa a temperaturas elevadas). La intensidad de estas bandas decrece monótonamente mientras se incrementa la diferencia en

tamaño del alelo primario. También, durante el proceso de PCR y bajo ciertas condiciones, la Taq polimerasa puede inducir la adición de un nucleótido (casi siempre dATP) en el extremo 5' de la cadena sintetizada, produciendo una banda adicional más grande, por un par de bases, que cualquiera de los alelos primarios (Scribner y Pearce, 2000). Aunque las bandas falsas (stutter bands) pueden llegar a ser una complicación en la lectura de los geles, también pueden ayudar a identificar el tamaño de los alelos; en algunas ocasiones funcionan como otro marcador de peso molecular debido a que pueden presentarse como una escalera de fragmentos pequeños que disminuyen en tamaño con respecto al alelo primario.

Una banda verdadera (o alelo primario) es más oscura que una banda fantasma (Scribner y Pearce, 2000); entonces, el principal criterio que se siguió para la identificación de los alelos fue la intensidad de las bandas, descartando así las bandas tenues. Otro criterio importante fue el rango de tamaño esperado, aunque los microsatélites no fueron específicos para *Anolis uniformis* se mantuvo un rango de tamaño de alelos (Fig. 5.6).

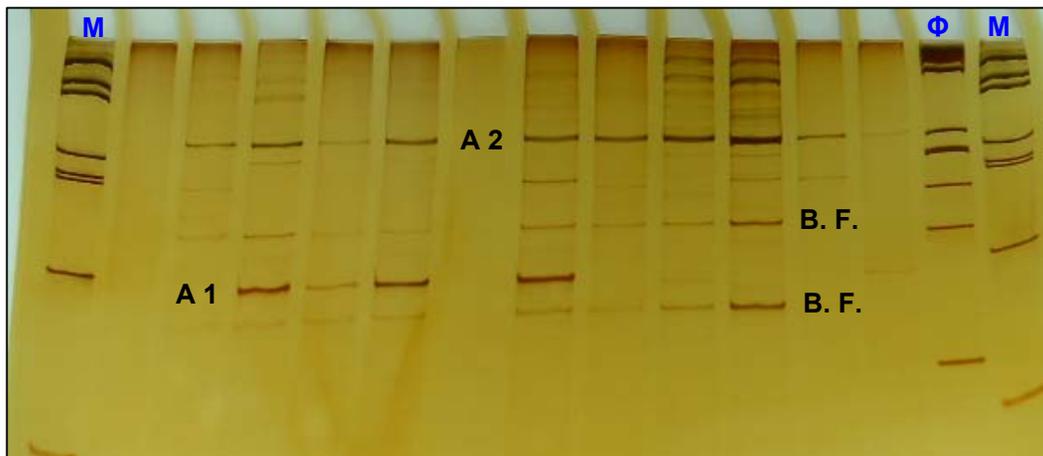


Fig. 5.6. Alelos verdaderos (A1 y A2), son bandas gruesas bien definidas, en cambio las bandas falsas ó tartamudeo (B. F.) son bandas tenues que difieren de la posición de los alelos verdaderos. Marcadores de peso molecular  $\Phi$ X174Hae III ( $\Phi$ ) y Micromarker (M).

El registro del número y tamaño de los alelos se hizo tomando fotografías de cada uno de los geles. Estas fotografías se imprimieron o se analizaron directamente en la computadora.

### **5.3 Análisis de los datos**

Para conocer la variación genética dentro y entre poblaciones se analizaron las proporciones correspondientes de los diferentes genotipos y su distribución en el espacio y tiempo (Eguiarte, 1991). Para el análisis de los datos se usaron los programas ARLEQUIN versión 3.1 (Excoffier et al., 2005) y GENEPOP versión 4 (Raymond y Rousset, 1995) y se generó una matriz de datos en EXCEL. La información más importante fue número de alelos y su tamaño en pares de bases por locus para todos los individuos en cada población.

#### **5.3.1 Variación genética dentro de las poblaciones**

La diversidad genética de cada población fue cuantificada como el número de alelos por locus y la heterocigosidad esperada y observada.

El principio de Hardy-Weinberg es de gran importancia en el campo de la genética de poblaciones. Este principio dice, que en una población grande con apareamientos al azar, sin selección natural, mutación o migración, las frecuencias alélicas y genotípicas son constantes de generación en generación (Gou y Thompson, 1992). La herencia Mendeliana tiende a mantener constantes las frecuencias alélicas y preserva la variación genética. Debido a que las frecuencias alélicas se mantienen iguales, también lo hacen las genotípicas en una proporción

$p^2$ ,  $2pq$ ,  $q^2$  (Hartl, 2000). Los métodos para probar este equilibrio se clasifican en dos grupos, en el primero están las pruebas de bondad de ajuste tal como la  $\chi^2$ ,  $G^2$  o estadístico de verosimilitud, y una prueba condicional de  $\chi^2$  (Li, 1955); en el segundo grupo están las pruebas exactas (Chapco, 1976). Se ha visto que las pruebas de bondad de ajuste pueden conducir a un falso rechazo o aceptación del equilibrio de Hardy-Weinberg cuando los tamaños de muestra son pequeños y/o algunas frecuencias son pequeñas o de cero (Gou y Thompson, 1992). Con marcadores moleculares como RFLP's y microsatélites (con genes con 10 a más alelos), si el tamaño de la muestra es moderadamente grande, el número de genotipos es tan grande que algunas frecuencias genotípicas serán de cero, especialmente cuando las frecuencias alélicas correspondientes sean bajas; en estos casos es cuestionable la aplicación de pruebas de bondad de ajuste y es deseable el uso de una prueba exacta. Para loci con múltiples alelos se usan dos algoritmos para estimar el nivel de significancia de una prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg: el método convencional de Monte Carlo y la cadena de Markov (Gou y Thompson, 1992), que es una adaptación del algoritmo de Metropolis (Metropolis et al., 1953). Las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg dentro de las poblaciones fueron analizadas en ARLEQUIN con la prueba exacta, usando el método de la cadena de Markov. El principio de este método es explorar el espacio de todas las tablas de contingencia posibles, y determinar si su probabilidad es mayor o no que la probabilidad de la tabla observada (Raymond y Rousset, 1995). Además también se calculó el índice de fijación (F) que es una medida basada en la heterocigosidad observada y heterocigosidad esperada, y si hay equilibrio de Hardy-Weinberg este índice es de cero (Hedrick, 2000).

El desequilibrio del ligamiento es la asociación no aleatoria de alelos entre pares de loci (Hedrick, 2000) y brinda información sobre la historia de la población, las fuerzas evolutivas que están actuando y la localización de los loci en el cromosoma. Además, la combinación de selección natural, mutación, crecimiento ó decline poblacional puede promover la existencia de desequilibrio del ligamiento (Excoffier y Slatkin, 1998). Para evaluar las desviaciones del ligamiento esperado para cada par de loci en todas las poblaciones se usó el método de la cadena de Markov (Gou y Thompson, 1992) en GENEPOP.

Finalmente con el programa ARLEQUIN se obtuvo el índice Garza-Williamson (2001), que se basa en la proporción del número total de alelos y el rango total de tamaño de los alelos por locus (definido como secuencia o longitud de repetición) y la fórmula es:

$$G-W = k / R+1$$

donde  $k$  es el número de alelos en un locus en una población y  $R$  es el rango alélico, (la distancia entre alelos en número de repeticiones, es decir, el alélo más pequeño y el más grande). Originalmente el denominador fue definido sólo como  $R$  en Garza y Williamson (2001) pero esto puede conducir a una división entre cero si una muestra es monomórfica, por eso este ajuste fue introducido en Excoffier et al. (2005). Este estadístico es sensible a cuellos de botella debido a que el número de alelos se reduce más de lo que se reduce el rango de alelos por una reciente reducción en el tamaño de la población, de esta forma, la distribución de la longitud del alelo mostrará vacantes o posiciones vacías. De acuerdo con este índice, los valores son muy bajos en poblaciones que han sufrido una reciente reducción del tamaño poblacional, y valores cercanos a 1 en poblaciones estacionarias (Excoffier et al., 2005). Se realizó una prueba de  $t$  para probar las

diferencias en el número de alelos y el índice Garza-Williamson entre los fragmentos de selva.

Se han descrito otros métodos para detectar cambios en la demografía de una población por medio de microsatélites (Cornuet y Luikart, 1996; Luikart et al., 1998; Beaumont, 1999). Por ejemplo, el método de Beaumont (1999) utiliza la teoría de la coalescencia y un modelo estricto de mutación de un paso para obtener la máxima verosimilitud de la tasa de crecimiento poblacional. No es totalmente comparable con el índice Garza-Williamson, ya que debe ser usado para detectar cambios a largo plazo en el tamaño de la población y no para detectar cuellos de botella o reducciones recientes. El índice Garza-Williamson está diseñado para detectar la distribución alélica de poblaciones con cambios abruptos recientes en tamaño e incorpora modelos mutacionales de uno y dos pasos. Hay varias diferencias entre estos métodos, quizá una muy importante es que este índice puede distinguir entre poblaciones que han sufrido reducciones recientes en el tamaño poblacional de aquellas que han sido pequeñas por mucho tiempo, mientras que en los otros métodos no está comprobado si tienen esta capacidad (Garza y Williamson, 2001).

### **5.3.2 Diferencias genéticas entre las poblaciones**

Para evaluar el grado de estructura genética en las poblaciones se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA; Excoffier et al., 1992) en ARLEQUIN. Para ello fue necesario definir una estructura previa que estuviera relacionada con la distribución de las poblaciones a comparar. En la base de datos se agruparon los fragmentos de selva de acuerdo al tamaño: grupo 1 fragmentos grandes (Selva Estación zona alta, Selva de Los Hubber y Selva Estación zona baja), grupo 2

fragmentos medianos (La Perla, Cerro del Borrego y Playa Escondida) y grupo 3 fragmentos chicos (Fragmento 3, Fragmento 4 y Fragmento 6). Los componentes de varianza ( $\sigma$ ) se usaron para calcular los índices de fijación de Wright (1951) en términos de coeficientes de endogamia.

La subdivisión poblacional se evaluó usando estadísticos F (ó estadísticos R, Slatkin, 1995), siguiendo el criterio de Weir y Cockerman (1984).  $F_{ST}$  es una medida de la diferenciación genética entre poblaciones y es siempre positiva,  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  son medidas de la desviación de las proporciones Hardy-Weinberg dentro de subpoblaciones y en el total de la población, respectivamente, donde los valores positivos indican una deficiencia de heterócigos y valores negativos un exceso de heterócigos (Hedrick, 2000), por lo que también se obtuvieron los valores de  $F_{IS}$  para cada población.

La  $F_{ST}$  fue calculada con la siguiente fórmula:  $F_{ST} = (H_T - H_E) / H_T$  (Hedrick, 2000), donde  $H_T$  es el promedio de la heterocigosidad esperada en la población total para todos los loci y  $H_E$  es el promedio de la heterocigosidad esperada dentro de subpoblaciones para todos los loci (ver Cuadro 6.10).

Para establecer las distancias entre las poblaciones se hicieron estimaciones pareadas de  $R_{ST}$ , que es una medida análoga de  $F_{ST}$  y supone el modelo mutacional paso a paso (Step-wise Mutation Model, SMM). Algunos investigadores han encontrado que el modelo de alelos infinitos (infinite alleles model, IAM), modelo mutacional en el que se basan muchas distancias genéticas, no es apropiado para microsatélites. Estos marcadores moleculares mutan de manera consistente con el modelo mutacional paso a paso (SMM) (Scribner y Pearce, 2000). La notación ( $R_{ST}$ ) es para enfatizar la similitud con  $F_{ST}$ , pero el método de distancia usado es la suma de diferencias de tamaño cuadradas (en

relación con las unidades de repetición), que es el método que mejor se ajusta para microsatélites (Slatkin, 1995).

En GENEPOP se estimó el número de migrantes ( $Nm$ ) por el método de alelos únicos. Este método está basado en las propiedades de la “frecuencia promedio condicional” (Slatkin, 1981; Slatkin, 1985a), es decir, la frecuencia promedio de alelos encontrados solo en algunas subpoblaciones. Si hay  $d$  localidades muestreadas, la frecuencia promedio condicional  $p(i)$ , es la frecuencia promedio de todos los alelos encontrados en exactamente  $i$  de las  $d$  localidades. Entonces  $p(i)$  es la frecuencia promedio de los alelos encontrados en una sola localidad o bien de alelos privados o únicos. Los alelos raros son particularmente sensibles al flujo génico, ya que es poco probable que sean llevados por la dispersión de gametos o individuos a menos que ésta sea frecuente (Slatkin, 1985b). GENEPOP calcula la frecuencia promedio condicional a partir de la distribución de las frecuencias alélicas, brinda tres estimaciones de  $Nm$  usando las tres líneas de regresión publicadas en Barton y Slatkin (1986).

En ARLEQUIN se realizó la prueba exacta de diferenciación poblacional, que somete a prueba la hipótesis de una distribución al azar de  $k$  diferentes genotipos entre  $r$  poblaciones (Raymond y Rousset, 1995). Esta prueba es análoga a la prueba exacta de Fisher con una tabla de contingencia  $2 \times 2$ ; todos los estados de la tabla son explorados con el método de la cadena de Markov.

Finalmente, se usó el programa MICRO-CHECKER (Van Oosterhout et al., 2004) para detectar errores de genotipificación como alelos nulos que son causados por mutaciones en la región flanqueante del primer previniendo la amplificación y produciendo falsos homocigos (Pemberton et al., 1995).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Colecta de tejido

Se tienen 278 muestras, 155 hembras (55.75%) y 122 machos (43.88%) más uno indefinido ya que no se pudo comprobar el sexo (Cuadro 6.1). Aunque para algunos fragmentos de selva se colectó más tejido, sólo se usaron 30 muestras de cada sitio para el procesamiento y análisis de los datos con microsatélites.

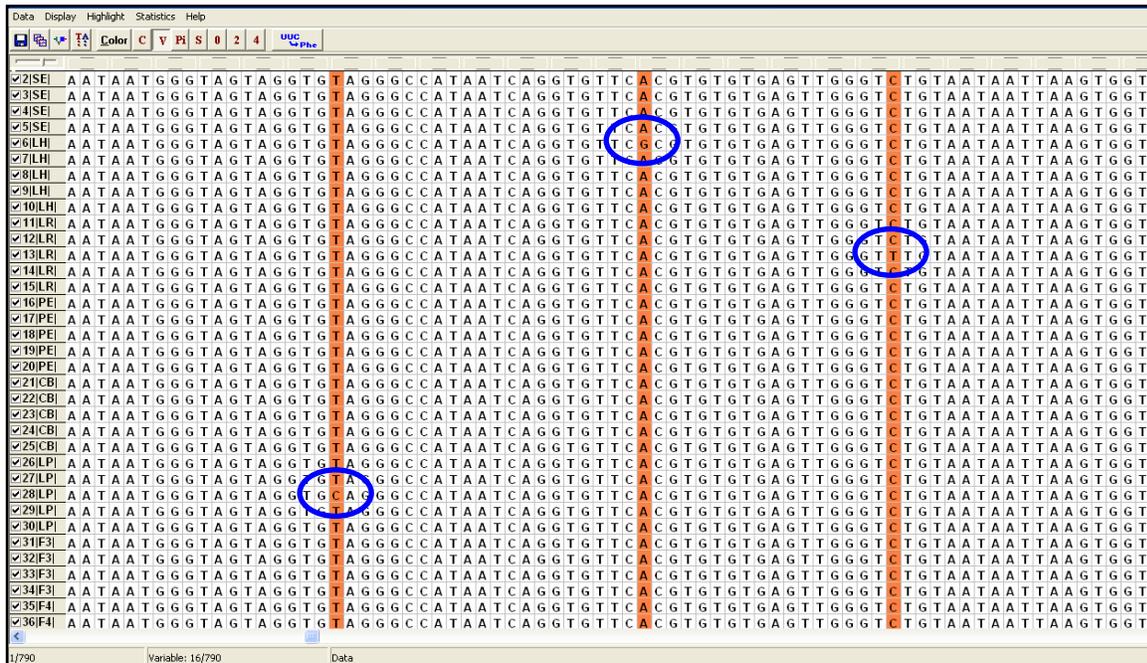
**Cuadro 6.1. Número de tejido colectado, número de machos y hembras por fragmento.**

Nombre	Fragmentos Grandes	Fragmentos Medianos	Fragmentos Chicos	♀	♂	?
Selva Estación zona alta (SEza)	30			16	13	1
Los Hubber (LH)	32			14	18	
Selva Estación zona baja (SEzb)	30			21	9	
La Perla (LP)		31		18	13	
Cerro del Borrego (CB)		32		18	14	
Playa Escondida (PE)		32		17	15	
Fragmento 3 (F3)			31	21	10	
Fragmento 4 (F4)			30	13	17	
Fragmento 6 (F6)			30	17	13	
<b>Total 278</b>	<b>92</b>	<b>95</b>	<b>91</b>	<b>155</b>	<b>122</b>	<b>1</b>

### 6.2 Gen mitocondrial ND4

Se obtuvieron 41 secuencias del gen mitocondrial ND4; fueron eliminadas cuatro secuencias, ya que no estaban lo suficientemente limpias ni presentaron la calidad necesaria. En secuencias de 790 pares de bases se observaron 16 sitios variables. En la mayoría de estos sitios sólo cambió una base y en dos sitios cambiaron dos bases (Fig. 6.2). Se detectaron 13 haplotipos, la mayoría de éstos se diferenciaron sólo por el cambio de una base. Uno de estos haplotipos presentó una frecuencia de 0.707, mientras que el resto presentó una frecuencia de 0.024 (Cuadro 6.3). En los 16 sitios variables todas las sustituciones fueron transiciones. En cuanto

a la composición nucleotídica se obtuvo que 11.90% de las bases fueron citocina (C), 31.77% timina (T), adenina (A) el 28.49% y guanina (G) el 27.84%.



**Fig. 6.2. Secuencias del gen mitocondrial ND4. Se muestran 3 de los 16 sitios variables.**

El cuadro 6.3 muestra que el haplotipo A es el más frecuente; está presente en todas las poblaciones, por lo que puede decirse que es el haplotipo ancestral. El haplotipo B es exclusivo para la población del fragmento Selva Estación zona baja y el C es exclusivo para Los Hubber (fragmentos grandes). Las poblaciones de los fragmentos medianos Cerro del Borrego y La Perla presentaron 3 haplotipos cada una (F-G-H e I-J-K respectivamente). Para los fragmentos de selva chicos solo el F6 presentó dos haplotipos (L y M), mientras que F3 y F4 compartieron el haplotipo A.

**Cuadro 6.3. Haplotipos, frecuencias y haplotipos por fragmento.**

Haplotipo	Número de secuencias	Frecuencia	Sitios
A	29	0.707	En todos
B	1	0.024	SEzb
C	1	0.024	LH
D	1	0.024	SEza
E	1	0.024	SEza
F	1	0.024	CB
G	1	0.024	CB
H	1	0.024	CB
I	1	0.024	LP
J	1	0.024	LP
K	1	0.024	LP
L	1	0.024	F6
M	1	0.024	F6

También en la red de haplotipos (Figura 6.4) se observa que el haplotipo A es el más frecuente (el tamaño de los círculos representa la frecuencia de los haplotipos) y que a partir de éste se derivan los demás haplotipos. La mayoría de haplotipos presentan solo un paso mutacional, excepto para los haplotipos F, J y L que tienen dos pasos mutacionales y K que presenta 4 pasos mutacionales a partir del haplotipo ancestral A. Los círculos más pequeños de color gris representan los haplotipos inexistentes que pudieron no haber sido muestreados o que existieron en algún momento y desaparecieron. En general puede decirse que no se han acumulado muchos cambios mutacionales, por lo que esta red refleja el poco tiempo que lleva la fragmentación de la selva.

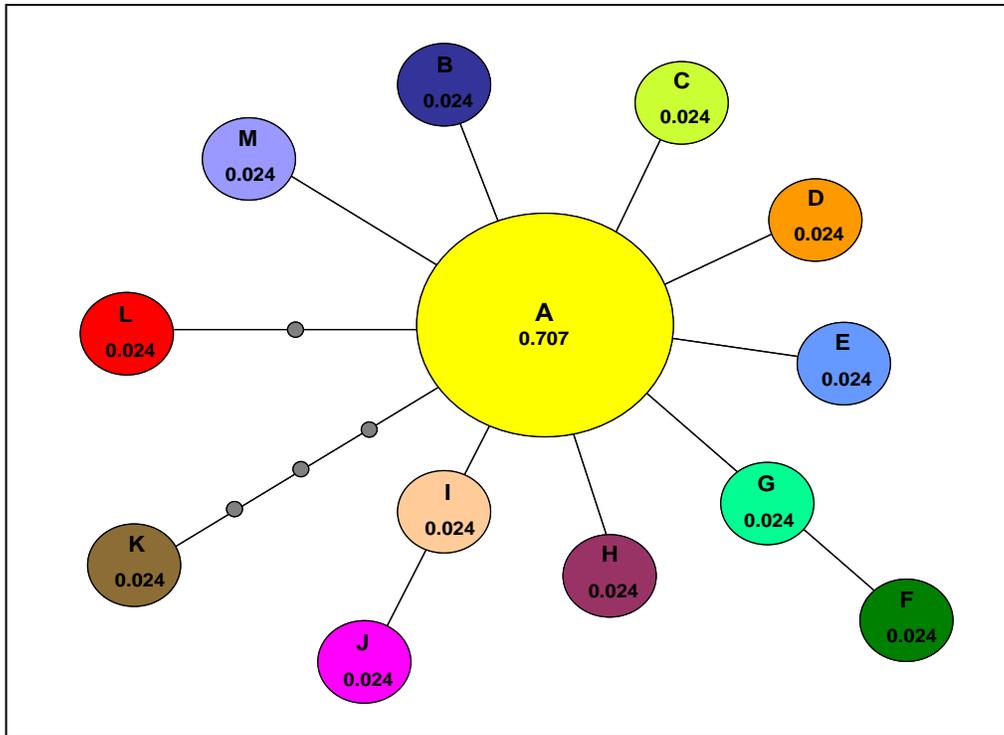
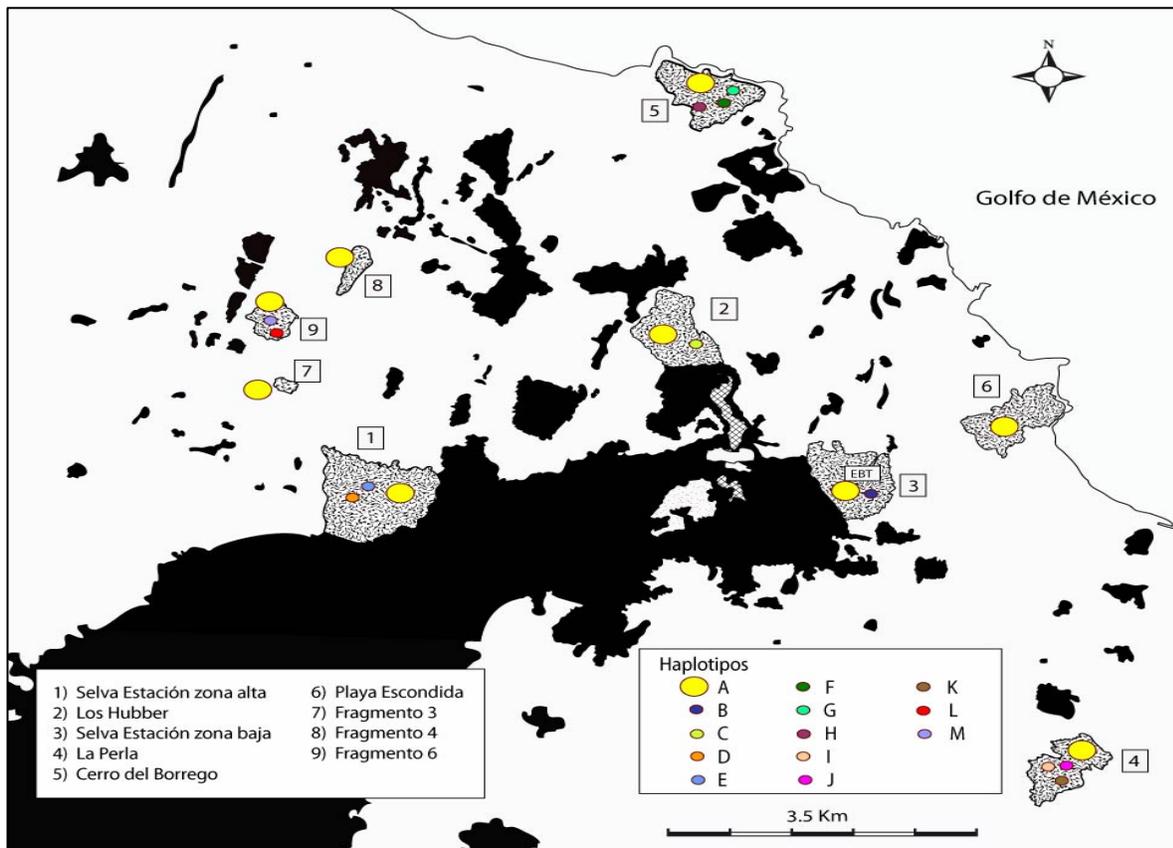


Fig. 6.4. Red de haplotipos y sus frecuencias. El tamaño de los círculos refleja la frecuencia de los haplotipos.

Con base en esta red de haplotipos se llevó a cabo la distribución geográfica de los haplotipos en las localidades o sitios muestreados en la Región de los Tuxtlas (Figura 6.5). Se observa que el haplotipo A está en todos los fragmentos de selva, pero Playa Escondida (fragmento mediano), F3 y F4 (fragmentos chicos) solo presentan este haplotipo, mientras que Cerro del Borrego y La Perla (medianos) además del haplotipo A tienen otros 3 haplotipos cada uno, es decir, exclusivos de cada sitio.



**Fig. 6.5. Distribución geográfica de los haplotipos.**

La diversidad haplotípica ( $h$ ) fue de 0.5049 (desviación estándar  $\pm 0.0974$ ) y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) fue de 0.001105 (d.e.  $\pm 0.000880$ ). El Cuadro 6.6 muestra un resumen del análisis realizado para cada uno de los fragmentos. Se encontró que sólo tres poblaciones presentaron una diversidad haplotípica considerable: La Perla (0.900), Cerro del Borrego (0.900), que son dos fragmentos medianos, y F6 (0.833) que es un fragmento pequeño. En cuanto a los fragmentos grandes, Selva Estación zona alta presentó diversidad haplotípica media, Selva Estación zona baja y Los Hubber presentaron diversidad haplotípica baja. Para Playa Escondida y F3 y F4, la diversidad fue de 0. En cuanto a la diversidad nucleotídica, los nueve fragmentos

presentaron niveles muy bajos, de 0 a 0.003. La prueba de Tajima ( $D$ ) mostró que las mutaciones no fueron significativamente diferentes del modelo neutral de mutación (Cuadro 6.6).

**Cuadro 6.6. Secuencias analizadas, haplotipos, diversidad haplotípica ( $h$ ), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), Theta de Watterson ( $\theta$ ) y prueba de Tajima ( $D$ ) por sitio.**

Fragmento	Número secuencias	Haplotipos	$H$	$\pi$	$\theta$	$D$
SEza	5	3	0.700	0.001	0.96000	-0.97256 (NS)
LH	5	2	0.400	0.000	0.48000	-0.81650 (NS)
Sezb	5	2	0.400	0.000	0.48000	-0.81650 (NS)
LP	5	4	0.900	0.003	2.88000	-0.66823 (NS)
CB	5	4	0.900	0.001	1.44000	-0.17475 (NS)
PE	5	1	0	0	0	0
F3	4	1	0	0	0	0
F4	3	1	0	0	0	0
F6	4	3	0.833	0.001	1.63636	-0.75445 (NS)

(NS) No Significativo ( $P > 0.1$ ).

## 6.3 Microsatélites

### 6.3.1 Diversidad alélica dentro de las poblaciones

De los siete loci amplificados, cinco fueron polimórficos y sólo dos monomórficos. De acuerdo con la clasificación de microsatélites (Weber, 1990; Scribner y Pearce, 2000), cuatro de los cinco loci polimórficos fueron dinucleótidos perfectos (AoGT2, AoBA36, Ar014 y Ar065) y sólo uno compuesto (AoGT9), mientras que los dos monomórficos fueron dinucleótidos perfectos (AoSA18 y Ar035). La diversidad alélica fue baja. El mayor número de alelos detectados fue de tres para los loci AoGT2 y Ar014, los demás loci presentaron sólo dos alelos (Cuadros 6.7 y 6.8).

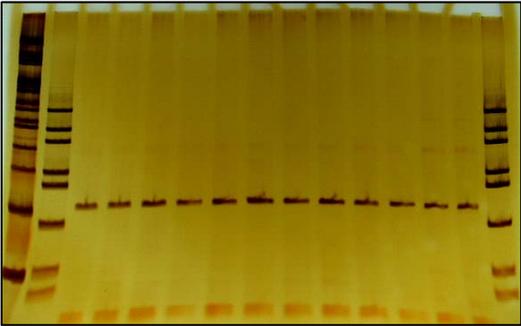
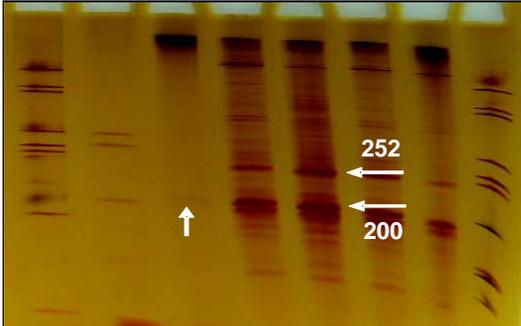
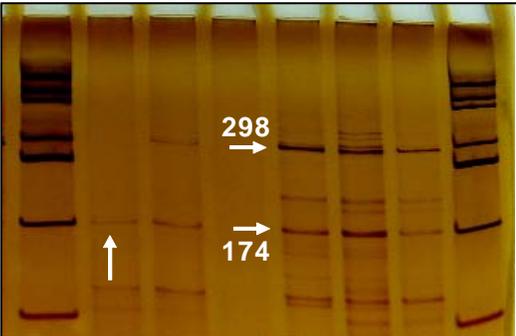
En el Cuadro 6.8 se muestran las imágenes de los geles de poliacrilamida con el número de alelos para cada locus y su tamaño en pares de bases.

**Cuadro 6.7. Microsatélites probados en *A. uniformis*. Temperatura de alineamiento (°C), concentración de cloruro de magnesio [MgCl<sub>2</sub>] (mM), tamaño de los alelos TA y número de alelos NA. Para la mitad de los loci no se lograron las condiciones de amplificación.**

Locus	Región repetida	Temp. alineam. °C	[MgCl <sub>2</sub> ] (mM)	TA (pb)	NA
AoGT2	(GT) <sub>10</sub>	52.5	0.375	160-310	3
AoGT9	(TG) <sub>5</sub> (TA) <sub>4</sub> (TG) <sub>12</sub>	55	1	200-256	2
Ao7;73	(CT) <sub>8</sub>	-	-		
Ao10;13	(CT) <sub>10</sub> AT(AC) <sub>7</sub>	-	-		
AoSA18	(CA) <sub>10</sub>	55	1	200	1
AoBA36	(GT) <sub>10</sub>	57	3.5	116-150	2
Ar014	(TG) <sub>10</sub>	57	1	174-298	3
Ar031	(GT) <sub>7</sub>	-	-		
Ar035	(TG) <sub>13</sub>	55	1	140	1
Ar062	(AG) <sub>9</sub>	-	-		
Ar065	(GT) <sub>15</sub>	64.5	1.5	108-118	2
Ar068	(GT) <sub>10</sub>	-	-		
Ar120	(AC) <sub>14</sub>	-	-		
Ar126	(GT) <sub>5</sub>	-	-		

El porcentaje de loci polimórficos fue de 71%. El número promedio de alelos por locus polimórfico fue de 2.4 y el número promedio de alelos por locus (loci monomórficos y polimórficos) fue de dos. Todas las poblaciones presentaron los mismos alelos y no se registraron alelos únicos.

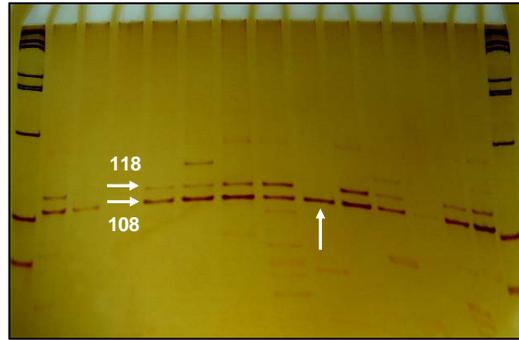
Cuadro 6.8. Número de alelos por locus y su tamaño en pares de bases (pb).

Locus	Geles	Lectura
AoSA18		Un alelo de 200 pb (Monomórfico)
AoGT9		2 alelos: 200 y 252 pb; la flecha en el carril 3 señala un homócigo para el alelo 200
Ar014		3 alelos: 174, 290 y 298 pb. En el carril 2 se observa un homócigo para el alelo 174.

Cont. Cuadro 6.8

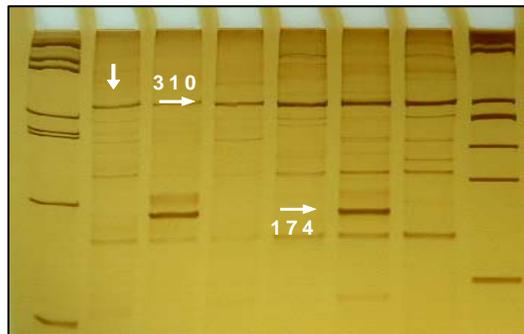
Locus	Geles	Lectura
-------	-------	---------

Ar065



2 alelos:  
108 y 118 pb.  
La flecha en el  
carril 9 muestra un  
homócigo para el  
alelo de 108 pb

AoGT2



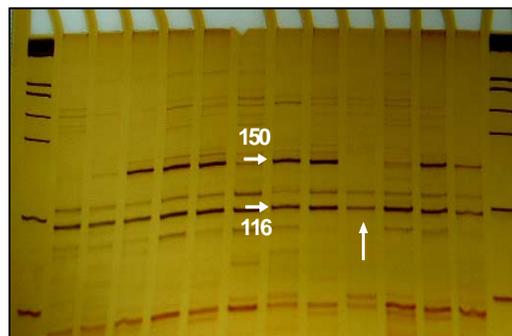
3 alelos: 160, 174 y  
310 pb.  
En el segundo  
carril se observa un  
homócigo para el  
alelo 310

Ar035



Un alelo de  
140 pb  
(Monomórfico)

AoBA36



2 alelos: 116 y 150  
pb. La flecha en el  
carril 10 señala un  
homócigo para el  
alelo de 116 pb

Se obtuvieron las frecuencias alélicas para todos los loci en todas las poblaciones (Cuadro 6.9) y también para hembras y machos por separado. Con estos datos se realizó una prueba de  $t$  y se infirió que no hay diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de hembras y machos ( $t=0$ ;  $P=0.9$ ).

### **6.3.2 Variación genética dentro de las poblaciones**

La heterocigosidad esperada ( $H_E$ ) por locus en todos los sitios tuvo un rango de 0.223 a 1 (promedio  $H_E$  0.330; Cuadro 6.10). Para todas las poblaciones de detectaron desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg ( $P<0.05$ ), excepto para los loci AoGT2 y AoBA36, que no muestran diferencias significativas. En cuanto al índice de fijación ( $F$ ) los valores son negativos, lo que refleja un exceso de heterocigosidad excepto para los loci AoGT2 y AoBA36 en las poblaciones F4 y F3 respectivamente.

No se encontró desequilibrio del ligamiento consistente; sólo tres de 189 pruebas realizadas (pares de loci) presentaron valores significativos ( $P<0.05$ ), por lo que no se detectaron relaciones no azarosas de alelos entre los loci.

**Cuadro 6.9. Frecuencias alélicas para todas las poblaciones y para hembras y machos.**

<b>Frecuencias alélicas</b>														
<b>Locus</b>	<b>AoSA18</b>	<b>AoGT9</b>		<b>Ar014</b>			<b>Ar065</b>		<b>AoGT2</b>			<b>Ar035</b>	<b>AoBA36</b>	
<b>Alelos</b>	200	200	252	174	290	298	108	118	160	174	310	140	116	150
<b>Fragmentos</b>														
<b>SEza</b>	1	0.500	0.500	0.411	0.411	0.179	0.589	0.411	0.155	0.069	0.776	1	0.729	0.271
<b>LH</b>	1	0.500	0.500	0.414	0.448	0.138	0.550	0.450	0.125	0.000	0.875	1	0.654	0.346
<b>SEzb</b>	1	0.500	0.500	0.426	0.556	0.259	0.534	0.466	0.100	0.100	0.800	1	0.775	0.225
<b>LP</b>	1	0.517	0.483	0.483	0.259	0.259	0.521	0.479	0.152	0.000	0.848	1	0.646	0.354
<b>CB</b>	1	0.533	0.467	0.483	0.466	0.052	0.517	0.483	0.250	0.000	0.750	1	0.617	0.383
<b>PE</b>	1	0.500	0.500	0.533	0.250	0.217	0.500	0.500	0.054	0.107	0.839	1	0.800	0.200
<b>F3</b>	1	0.500	0.500	0.565	0.391	0.043	0.586	0.414	0.155	0.000	0.845	1	0.727	0.273
<b>F4</b>	1	0.518	0.482	0.483	0.417	0.100	0.567	0.433	0.208	0.000	0.792	1	0.780	0.220
<b>F6</b>	1	0.500	0.500	0.483	0.433	0.083	0.550	0.450	0.080	0.040	0.880	1	0.717	0.283

<b>Locus</b>	<b>AoSA18</b>	<b>AoGT9</b>		<b>Ar014</b>			<b>Ar065</b>		<b>AoGT2</b>			<b>Ar035</b>	<b>AoBA36</b>	
<b>Alelos</b>	200	200	252	174	290	298	108	118	160	174	310	140	116	150
<b>Hembras</b>	1	0.510	0.490	0.479	0.417	0.104	0.535	0.465	0.135	0.040	0.825	1	0.871	0.129
<b>Machos</b>	1	0.504	0.496	0.468	0.383	0.149	0.559	0.441	0.154	0.029	0.817	1	0.519	0.481

Cuadro 6.10. Loci usados en las 9 poblaciones de *Anolis uniformis*. Número de alelos ( $N_A$ ), heterocigosidad esperada ( $H_E$ ), heterocigosidad observada ( $H_O$ ) e índices de fijación ( $F$ ) para cada locus en cada población.  $H_T$  heterocigosidad total para cada locus. Valores no significativos (\*).

Poblaciones												
	SEza	LH	SEzb	LP	CB	PE	F3	F4	F6	PROM.	$H_T$	$F$
<b>AoSA18</b>												
$N_A$	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
$H_E$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
$H_O$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
$F$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<b>AoGT9</b>												
$N_A$	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
$H_E$	0.508	0.508	0.508	0.508	0.506	0.508	0.508	0.508	0.508	0.508	0.500	-0.937
$H_O$	1	1	1	0.965	0.933	1	1	0.964	1	0.984		
$F$	-0.968	-0.968	-0.968	-0.899	-0.843	-0.968	-0.968	-0.897	-0.968			
<b>Ar014</b>												
$N_A$	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
$H_E$	0.642	0.619	0.519	0.644	0.557	0.616	0.537	0.592	0.581	0.589	0.599	-0.471
$H_O$	0.750	0.827	0.703	0.896	0.965	0.866	0.869	0.966	0.966	0.867		
$F$	-0.168	-0.336	-0.354	-0.391	-0.732	-0.405	-0.618	-0.631	-0.662			
<b>Ar065</b>												
$N_A$	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
$H_E$	0.492	0.503	0.506	0.509	0.507	0.508	0.493	0.499	0.503	0.502	0.496	-0.788
$H_O$	0.821	0.900	0.931	0.875	0.966	1.000	0.827	0.866	0.900	0.898		
$F$	-0.668	-0.789	-0.839	-0.719	-0.905	-0.968	-0.677	-0.735	-0.789			

Cont. Cuadro 6.10

	SEza	LH	SEzb	LP	CB	PE	F3	F4	F6	PROM.	$H_T$	$F$
<b>AoGT2</b>												
$N_A$	3	2	3	2	2	3	2	2	3	2.44		
$H_E$	0.375*	0.223*	0.348*	0.263*	0.381*	0.286*	0.266*	0.336*	0.222*	0.300	0.303	-0.15
$H_O$	0.448	0.250	0.400	0.304	0.500	0.321	0.310	0.333	0.240	0.345		
$F$	-0.194	-0.121	-0.149	-0.155	-0.312	-0.122	-0.165	0.008	-0.081			
<b>Ar035</b>												
$N_A$	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
$H_E$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
$H_O$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
$F$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<b>AoBA36</b>												
$N_A$	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
$H_E$	0.421*	0.461*	0.357*	0.467*	0.480	0.325*	0.405*	0.372*	0.412*	0.411	0.412	-0.265
$H_O$	0.500	0.615	0.450	0.625	0.766	0.400	0.363	0.400	0.566	0.520		
$F$	-0.187	-0.250	-0.260	-0.338	-0.595	-0.230	0.103	-0.075	-0.373			
<b>PROM <math>H_E</math></b>	0.348	0.330	0.320	0.341	0.347	0.320	0.316	0.329	0.318	0.330		
<b>PROM <math>H_O</math></b>	0.502	0.513	0.497	0.523	0.59	0.512	0.481	0.504	0.524	0.516		
<b>PROM <math>H_T</math></b>											0.330	

Nombres de los fragmentos de selva: Selva Estación zona alta (SEza), Los Hubber (LH), Selva Estación zona baja (SEzb), La Perla (LP), Cerro del Borrego (CB), Playa Escondida (PE), Fragmento 3, Fragmento 4 y Fragmento 6.

En el siguiente cuadro (6.11) se presentan las medias de la variación genética (heterocigosidad esperada  $H_E$ ) para cada uno de los tratamientos, es decir, para los fragmentos de selva grandes, los fragmentos medianos y los fragmentos chicos.

**Cuadro 6.11. Medias de variación genética ( $H_E$ ) para los fragmentos de selva grandes, medianos y chicos.**

Nombre	Grandes	Medianos	Chicos
Selva Estación zona alta	0.348		
Los Hubber	0.330		
Selva Estación zona baja	0.320		
La Perla		0.341	
Cerro del Borrego		0.347	
Playa Escondida		0.320	
Fragmento 3			0.316
Fragmento 4			0.329
Fragmento 6			0.318
Medias	0.333	0.336	0.321

Un Análisis de Varianza (ANOVA) comparando las medias de la variación genética de los diferentes tratamientos (fragmentos grandes, medianos y chicos) indica que las medias no son diferentes ( $F = 1.25 < F_{0.05} = 5.14$   $P=0.35$ ) (Cuadro 6.12).

**Cuadro 6.12. Tabla de análisis de varianza.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	$F$
Tratamientos	2	0.000378	0.000189	1.255
Error	6	0.000903	0.0001505	
Total	8	0.001281		

Los resultados del cuadro 6.13 muestran que el promedio del índice Garza-Williamson (2001) para todas las poblaciones es de 0.330, el locus AoGT2 presentó el promedio más bajo (0.01619) y el promedio más alto fue para el locus Ar065 (0.1818). De acuerdo con este índice los valores son muy bajos en poblaciones que han sufrido una reducción reciente, y valores cercanos a 1 en poblaciones estacionarias. Esto sugiere que las poblaciones de *Anolis uniformis* en la Región de Los Tuxtlas han pasado por una reducción en el tamaño efectivo o cuello de botella.

La prueba de t no mostró diferencias en el número de alelos (promedio 2 y 1.857;  $t=0.35$ ;  $P=0.72$ ; *g.l.* 12) ni en el índice Garza-Williamson (promedio 0.3315 y 0.3305;  $t=0.004$ ;  $P=0.99$ ; *g.l.* 12) entre los fragmentos de selva.

**Cuadro 6.13. Índice de Garza-Williamson para cada locus en todas las poblaciones. \*Loci monomórficos.**

Locus	SE za	LH	SE zb	LP	CB	PE	F3	F4	F6	Prom	D.E.
AoSA18*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.0000
AoGT9	0.0377	0.0377	0.0377	0.0377	0.0377	0.0377	0.0377	0.0377	0.0377	0.0377	0.0000
Ar014	0.0240	0.0240	0.0240	0.0240	0.0240	0.0240	0.0240	0.0240	0.0240	0.0240	0.0000
Ar065	0.1818	0.1818	0.1818	0.1818	0.1818	0.1818	0.1818	0.1818	0.1818	0.1818	0.0000
AoGT2	0.0198	0.0132	0.0198	0.0132	0.0132	0.0198	0.0132	0.0132	0.0198	0.0161	0.0032
Ar035*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.0000
AoBA36	0.0571	0.0571	0.0571	0.0571	0.0571	0.0571	0.0571	0.0571	0.0571	0.0571	0.0000
Prom.	0.3315	0.3305	0.3315	0.3305	0.3305	0.3315	0.3305	0.3305	0.3315	0.330	0.0004
D. E.	0.4258	0.4265	0.4258	0.4265	0.4265	0.4258	0.4265	0.4265	0.4258	0.4262	0.0002

### 6.3.3 Diferenciación genética entre las poblaciones

Contrario a lo que se esperaba, no se detectó una estructura poblacional. De acuerdo con el AMOVA (Cuadro 6.14), toda la variación se registró dentro de las poblaciones (100%) y no hay variación entre los grupos de poblaciones (0.24%) o bien entre las poblaciones grandes con respecto a las medianas, medianas con respecto a las chicas, etc. Tampoco hay variación entre las poblaciones dentro de los grupos (-1.23%) o entre poblaciones del mismo tamaño (grandes con grandes, medianas con medianas, etc). Se esperaba encontrar variación entre los grupos, por ejemplo, que las poblaciones chicas fueran distintas que las medianas y todavía más distintas que las grandes.

**Cuadro 6.14. Análisis de estructura genética AMOVA ( $P < 0.001$ ).**

Fuente de variación	Grados libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje variación
Entre grupos	2	1.407	0.00240	0.24
Entre poblaciones dentro de grupos	6	1.633	-0.01234	-1.23
Dentro de poblaciones	531	537.833	1.01287	100.99
Total	539	540.874	1.00292	

La  $F_{ST}$  calculada a partir del promedio de la heterocigosidad esperada en la población total para todos los loci ( $H_T$ ) y el promedio de la heterocigosidad esperada dentro de subpoblaciones para todos los loci ( $H_E$ ) (Cuadro 6.1), fue igual a cero lo que quiere decir que no hay diferenciación genética entre las poblaciones.

Todos los valores de los índices  $F_{IS}$  (para cada población) ó  $R_{IS}$  (ya que el método de distancia usado fue la suma de diferencias de tamaño cuadradas) fueron negativos (promedio -0.6835), haciendo evidente el exceso de heterocigosidad, por lo que dentro de las poblaciones los apareamientos no son aleatorios.

Con respecto a las distancias genéticas entre las poblaciones, los valores de  $R_{ST}$  son mostrados en la matriz (Cuadro 6.15). Los valores estuvieron en el rango de -0.001 a -0.052 y no fueron significativos, lo que indica que las poblaciones no son diferentes. Solamente el par de poblaciones de los fragmentos Playa Escondida (mediano) y Fragmento 3 (chico) fue significativo ( $P < 0.05$ ), por lo que estas dos poblaciones son diferentes entre sí.

**Cuadro 6.15. Valores de  $R_{ST}$ . Método de distancia: suma de diferencias de tamaño cuadradas. Debajo de la diagonal valores de  $R_{ST}$ , por encima de la diagonal valores de  $P$ . Valor de significancia 0.05. \*Valor significativo.**

	SEza	LH	SEzb	LP	CB	PE	F3	F4	F6
SEza	0.0000	0.8108	0.3873	0.6846	0.0900	0.0540	0.8558	0.9909	0.8558
LH	-0.0169	0.0000	0.9909	0.9729	0.3873	0.2702	0.6756	0.9909	0.9909
SEzb	-0.0167	-0.0169	0.0000	0.9729	0.4234	0.3873	0.3153	0.8108	0.9909
LP	-0.0169	-0.0169	-0.0174	0.0000	0.9909	0.9909	0.9189	0.7747	0.9819
CB	-0.0145	-0.0146	-0.0147	-0.0177	0.0000	0.4324	0.1081	0.7837	0.3153
PE	-0.0165	-0.0167	-0.0168	-0.0176	-0.0147	0.0000	0.0400*	0.5315	0.1801
F3	-0.0169	-0.0168	-0.0167	-0.0171	-0.0144	-0.0164	0.0000	0.9909	0.7027
F4	-0.0187	-0.0186	-0.0186	-0.0181	-0.0185	-0.0183	-0.0187	0.0000	0.9909
F6	-0.0169	-0.0169	-0.0169	-0.0176	-0.0146	-0.0167	-0.0168	-0.0186	0.0000

Dado que no se detectaron alelos únicos podría pensarse que hay dispersión y flujo génico entre las poblaciones de todos los fragmentos de selva. Sin embargo, no hay evidencia o registros de presencia de esta lagartija en cercas vivas, potreros o pastizales.

Los resultados de la prueba exacta de diferenciación poblacional (Cuadro 6.16) mostraron que algunas poblaciones no son panmícticas ( $P < 0.05$ ). Los genotipos no están distribuidos al azar, entonces la probabilidad

de que un individuo se aparee al azar con cualquier otro individuo no es la misma. Los 3 pares de poblaciones de los fragmentos grandes (SEza vs. LH, SEza vs. SEzb, LH vs. SEzb) mostraron que no son significativamente diferentes, y por lo tanto son panmícticos entre sí. Lo mismo se observó entre las poblaciones de los fragmentos pequeños (F3 vs. F4, F3 vs. F6, F4 vs. F6). Con las poblaciones de los fragmentos medianos fue lo contrario ya que los 3 pares (LP vs. CB, LP vs. PE, CB vs. PE) resultaron significativos ( $P < 0.05$ ) por lo que no hay panmixia entre estas poblaciones; tampoco son panmícticas con respecto a las poblaciones de los fragmentos grandes ni con las de los fragmentos pequeños. En cuanto a pares de poblaciones de fragmentos de diferente tamaño se observó que no son panmícticos ( $P < 0.05$ ), por ejemplo los pares de las poblaciones SEza vs LP, CB vs SEzb, F3 vs LP. Si la  $F_{ST}$  es de cero, esta prueba no debería resultar significativa para la mayoría de pares de poblaciones.

**Cuadro 6.16. Prueba exacta de diferenciación poblacional. Debajo de la diagonal valores de  $P$ , arriba de la diagonal diferencias significativas + (nivel de significancia 0.05).**

	SEza	LH	SEzb	LP	CB	PE	F3	F4	F6
SEza	0	-	-	P<0.05	P<0.05	-	P<0.05	-	P<0.05
LH	0.18887	0	-	-	-	P<0.05	-	-	-
SEzb	0.25630	0.37144	0	P<0.05	P<0.05	P<0.05	-	-	-
LP	0.04248	0.90846	0.02472	0	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05	-
CB	0.00000	0.53611	0.00473	0.00526	0	P<0.05	P<0.05	-	P<0.05
PE	0.09160	0.00911	0.02876	0.00214	0.00009	0	P<0.05	-	-
F3	0.03073	0.31739	0.76336	0.01276	0.03645	0.01784	0	-	-
F4	0.07882	0.61187	0.50087	0.04064	0.15406	0.08319	0.50032	0	-
F6	0.03212	0.69384	0.20825	0.05689	0.04143	0.21239	0.16413	0.56588	0

El análisis para detectar alelos nulos usando el programa MICROCHECKER mostró que no hay evidencia de la presencia de éstos ni de otros errores de genotipificación.

## **7. DISCUSIÓN**

En esta sección del estudio se abordarán los resultados más importantes producidos por las secuencias del gen mitocondrial y por los microsatélites. Contrario a lo que se esperaba, no se detectaron efectos relevantes de la fragmentación de la selva en *Anolis uniformis*. Parece que el tiempo de fragmentación no ha sido suficiente para reflejar efectos entre las poblaciones. Además, también para los microsatélites se discuten aspectos como la amplificación cruzada y el exceso de heterocigosidad así como otros métodos para su estudio.

### **7.1 Secuencias del gen mitocondrial ND4**

Las secuencias del gen mitocondrial ND4 ayudaron a revelar la baja estructura genética de *Anolis uniformis* en la región de los Tuxtlas. Todas las poblaciones comparten un haplotipo, por lo que parecería que hay suficiente flujo génico homogeneizando las poblaciones. Sin embargo, la presencia de algunos haplotipos únicos en la mayoría de las poblaciones, indican que no hay flujo génico, pues estos haplotipos no se comparten. Esto sugiere que la fragmentación es reciente al mantenerse un haplotipo común a todas las poblaciones, pero las poblaciones han evolucionado independientemente generando varios haplotipos únicos por población. La red de haplotipos mostró que los pasos mutacionales acumulados tienen un valor de uno y el mayor número de pasos observados fue de 4, soportando que la fragmentación de la selva en la Región de los Tuxtlas es reciente.

Dentro de las poblaciones se obtuvo una variación genética baja, lo que probablemente se debe al tamaño de la muestra. Al comparar estos resultados

con otros estudios (Cuadro 7.1), se observa que los valores de la diversidad nucleotídica para *Anolis uniformis* son bajos y también se observa un menor número de sitios variables. Por ejemplo, para *Sceloporus woodi*, en secuencias de 273 pares de bases de 135 individuos, se registraron 44 sitios variables, 30 haplotipos y una diversidad alélica de 0.91.

La prueba de neutralidad selectiva de Tajima ( $D$ ) arrojó valores negativos por lo que  $\theta$  es mayor que  $\pi$ , pudiendo haber mutaciones deletéreas y selección purificadora. Sin embargo, todos los valores fueron no significativos (lo que en parte puede deberse al tamaño de muestra pequeño (Hartl, 2000)) y puede decirse que la evolución es neutral.

**Cuadro 7.1. Comparación de la diversidad haplotípica y nucleotídica. (N) Número de muestras, (pb) longitud de la secuencia en pares de bases, (SV) número de sitios variables, (H) número de haplotipos, (h) diversidad haplotípica y ( $\pi$ ) diversidad nucleotídica.**

Especie	N	Pb	SV	H	h	$\pi$	Referencia
<i>Anolis uniformis</i>	45	790	16	13	0.50	0.001	Este estudio
<i>Sceloporus woodi</i>	135	273	44	30	0.91	0.009	Clark et al., 1999
<i>Lacerta schreiberi</i>	83	663	-	24	-	0.025	Paulo et al., 2001
<i>Holbrookia maculata</i>	39	797	29	-	-	0.012	Rosenblum et al., 2004
<i>Aspidocelis inornata</i>	29	779	11	-	-	0.001	Rosenblum et al., 2004
<i>Amphibolurus nobbi</i>	94	2008	82	40	-	-	Driscoll y Hardy, 2005

Las secuencias mitocondriales son apropiadas en estudios filogenéticos, o bien, si se aplica con poblaciones con una amplia distancia geográfica (e.g., Paulo et al., 2001; Zarza et al., 2007). Los efectos de procesos históricos se acentúan cuando los patrones genéticos son analizados con marcadores moleculares que tienen tasas de mutación conservativas como las isoenzimas y el DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>). En la mayoría de los casos, cuando se usan estos marcadores, es poco probable que estén sincronizados con procesos actuales de fragmentación del hábitat (Larson et al., 1984). Marcadores hipervariables como

los microsatélites, con tasas de mutación rápidas, tienen la capacidad de rastrear procesos actuales más rápidamente, lo que los hace ideales para estudios genéticos de fragmentación (Cunningham y Moritz, 1998).

## **7.2 Microsatélites**

### **7.2.1 Efectos de la fragmentación de la selva**

La situación de *Anolis uniformis* es complicada; aparentemente no está siendo afectada por la fragmentación de la selva y parece que el tiempo de fragmentación no ha sido suficiente para reflejar efectos entre las poblaciones de esta especie. *Anolis uniformis* es la especie de lagartija más abundante en la Región de los Tuxtlas (Cabrera, 2005) y no es evidente un decline demográfico. Sin embargo, es probable que se encuentre en una etapa temprana crítica de erosión genética (ver Sirkwan y Woodruff, 2000). Puede ser que la diversidad alélica se esté perdiendo más rápidamente que la heterocigosidad.

Sirkwan y Woodruff (2000), reportaron estos eventos para algunas especies de mamíferos; usaron 7 microsatélites para conocer y monitorear la erosión genética en tres especies de pequeños mamíferos en zonas fragmentadas en Tailandia. Encontraron que la respuesta demográfica y genética a la fragmentación fue específica para cada especie, reflejando diferencias en historia de vida y comportamiento. La variación alélica invariablemente se perdió más rápido que la heterocigosidad y en una especie en particular la erosión genética estuvo precedida claramente por decline demográfico. Además, también encontraron que las poblaciones fragmentadas recientemente perdieron la variación más rápido que lo admitido para una práctica de conservación y que la erosión genética puede comenzar antes de que sea evidente el decline

demográfico. Para una especie de lagartija (*Gynpetoscincus queensladiæ*), Sumner et al. (2004), encontraron que los cambios observados en la diversidad genética dentro y entre las poblaciones fueron pequeños, pero en la dirección que predice la teoría de la erosión genética, ya que observaron un decremento importante en la diversidad alélica de poblaciones de fragmentos pequeños.

En teoría se tienen claros los efectos de la erosión genética en la viabilidad de poblaciones pequeñas que han sufrido fragmentación, pero los estados tempranos críticos en el proceso no han sido documentados porque los cambios son rápidos y difíciles de monitorear (Sirkwan y Woodruff, 2000). En el caso *Anolis uniformis* las poblaciones de los fragmentos pequeños se comportan igual que las de los fragmentos grandes, cuando se esperaba que presentaran menos variación genética y una marcada diferenciación con respecto a las poblaciones de los fragmentos grandes. Por lo anterior, es recomendable monitorear la erosión genética de las poblaciones fragmentadas en la Región de los Tuxtlas.

### **7.2.2 Baja diversidad alélica**

En este estudio se registró un bajo número de alelos para todos los loci en todas las poblaciones de *Anolis uniformis*. Lo anterior puede deberse a la “amplificación cruzada”. Está documentado que aunque se haya observado un elevado polimorfismo en la especie para la que originalmente fueron aislados los microsatélites, no garantiza que este polimorfismo se observe similar en especies relacionadas, especialmente a medida que se incrementa la distancia evolutiva (Rubinsztein et al., 1995; Morin et al., 1998; Zane et al., 2002). Para las especies *A. oculatus* y *A. roquet*, especies para las que originalmente fueron aislados los microsatélites probados y usados en *A. uniformis*, se obtuvieron loci altamente

polimórficos, detectándose de cinco a 24 alelos, en cambio en *A. uniformis* sólo se detectaron dos y tres alelos. Stenson et al. (2000) probaron seis microsatélites altamente polimórficos para *A. oculatus* (mismos que fueron usados en este estudio) en otras especies de la serie *bimaculatus*, resultando en la disminución de alelos, pero no tan notable como en *A. uniformis*. Esto corrobora que mientras aumenta la distancia entre las especies hay menos oportunidad de encontrar loci altamente polimórficos. En la filogenia propuesta por Nicholson et al. (2005) basada en el gen mitocondrial ND2, es evidente que, aunque pertenecen al mismo género, la distancia entre las especies para las que fueron aislados originalmente los microsatélites (*A. oculatus* y *A. roquet*) con respecto a *A. uniformis* es considerable. Además de lo anterior, no se descarta la acción de fuerzas evolutivas como la deriva génica, que podría estar disminuyendo la variabilidad genética.

Morin et al. (1998), mediante un estudio de rastreo y comparación de microsatélites de humanos en babuinos, encontraron que el tamaño de los alelos se conserva, pero no el número. En babuinos se detectó la tendencia a presentar menor número de alelos que los identificados en humanos. Sugieren que la selección de los microsatélites no debe hacerse con base en la diversidad alélica sino al azar o bien en las unidades de repetición. Al igual que en este caso, los microsatélites probados en *A. uniformis* estuvieron dentro del rango de tamaño de los alelos (pb), pero no en número y esto es una consecuencia de la amplificación cruzada.

Debido a lo anterior es de gran importancia tener microsatélites específicos para *A. uniformis*, ya que se podría obtener mayor variación genética. También es importante analizar la situación de las especies hermanas y comparar con *A.*

*uniformis* para saber si la carencia de alelos se presenta en la especie o en el grupo.

### 7.2.3 Diferenciación poblacional

Los valores negativos de  $R_{ST}$  pueden explicarse por la combinación de varios factores, por ejemplo, diferencias en la magnitud de varianza del tamaño de los alelos entre loci. La baja varianza en el tamaño de alelos (loci menos variables) contribuyen poco al valor final de  $R_{ST}$  (Goodman, 1997); además, Slatkin (1995) supone el modelo de islas de estructura poblacional, apareamientos al azar y una población en equilibrio deriva-mutación, criterios que no pueden satisfacerse en poblaciones naturales, por lo tanto pueden ser una fuente de error en la estimación de diferenciación genética (Goodman, 1997).

De acuerdo con los resultados de distancias genéticas, las poblaciones no son diferentes; no hay diferenciación genética, excepto para el par de poblaciones de los fragmentos Playa Escondida (mediano) y Fragmento 3 (chico). Los resultados no son los esperados ya que se pensaba que habría una mayor diferenciación entre los fragmentos a medida que éstos estuvieran más alejados. Estos resultados, sin embargo, corroboran el poco tiempo que la selva lleva fragmentada así como la reciente separación de las poblaciones. Resultados similares se observaron en el estudio de Sumner et al. (2004), en el que *Gnypetoscincus queenslandiae* sólo ha sufrido pequeños cambios genéticos como consecuencia de una fragmentación del hábitat de 50 a 80 años.

Otra posible razón por la que tampoco se observó diferenciación poblacional es que las poblaciones de *Anolis uniformis* tengan tamaños grandes (o tuvieron un tamaño considerable antes de la fragmentación), y muy poca deriva

génica o bien que estén siendo afectadas por presiones de selección similares. La prueba exacta de diferenciación poblacional mostró que los genotipos no se están distribuyendo al azar, por lo tanto, los apareamientos no son aleatorios. No hay pruebas de flujo génico aunque la estimación del  $Nm$  no mostró alelos únicos, y la deriva todavía no está actuando tan severamente como para generar diferencias genéticas entre las poblaciones, sobre todo las más pequeñas que están en fragmentos chicos. Es necesario poner toda la atención en estos fragmentos de selva y en toda la región de los Tuxtlas. Aunque los resultados mostraron un exceso de heterocigosidad, en el futuro, si las poblaciones permanecen aisladas por más generaciones serán irreversibles los daños causados por la fragmentación, evitando así la dispersión y flujo génico entre las poblaciones y promoviendo la endogamia hasta tener una notable pérdida de variabilidad genética con lo que se reducirán las oportunidades de adaptación y llevará a la extinción de la especie. En este estudio sólo nos enfocamos en la especie más abundante de lagartija, lo que nos lleva a preguntar en qué situación están las especies menos abundantes de reptiles y anfibios y en qué forma pueden estar siendo afectadas.

No se detectó una estructura poblacional para *Anolis uniformis*, pero si hay una estructura reproductiva. Los resultados de la prueba de diferenciación poblacional revelaron que las poblaciones de los fragmentos grandes fueron panmícticas entre sí al igual que las de los fragmentos pequeños. En el caso de los fragmentos grandes y chicos los resultados son congruentes con la  $F_{ST}=0$ ; estos sitios tienen relativamente poco tiempo desde la fragmentación. Además los fragmentos de selva grandes no están completamente separados, habiendo aún conectividad entre la parte alta y baja de la estación por un estrecho de selva y

éstas con Los Hubber con un continuo de vegetación a la orilla de Laguna Escondida. Estos conectores pueden funcionar como corredores para especies no tolerantes a pastizales. Para los fragmentos pequeños la presencia de la unidad reproductiva se debe probablemente a que son fragmentos mucho más jóvenes, de 25 a 30 años. En cambio, en las poblaciones de los fragmentos medianos, no se observa una unidad reproductiva siendo no panmícticas entre sí y con los demás fragmentos grandes y pequeños; tienen mas tiempo de aislamiento estimándose más de 100 años para Cerro del Borrego, y entre 40 y 50 para La Perla. Playa Escondida es uno de los fragmentos más jóvenes del sistema; hace aproximadamente 10 años se perdió la conectividad total, y aún mantiene similitud genética con la selva de la Estación.

Si la  $F_{ST}$  es de cero, la prueba exacta de diferenciación poblacional no debería resultar significativa para algunos pares de poblaciones. Lo anterior puede ser un reflejo del poco tiempo de fragmentación de la selva y de la ausencia de flujo génico. Los genotipos no se están distribuyendo azarosamente, las poblaciones pequeñas están totalmente asiladas y no hay forma en que pueda suscitarse algún evento de intercambio de migrantes entre ellas y las demás poblaciones, por lo que se están empezando a reflejar los primeros efectos de la fragmentación.

#### **7.2.4 ¿Reciente reducción del tamaño efectivo?**

Dado que la diversidad alélica se reduce más rápido de lo que se reduce la heterocigosidad durante un cuello de botella (Nei et al., 1975; Cornuet y Luikart, 1996), es probable que las poblaciones de *Anolis uniformis* hayan sufrido una reducción reciente en el tamaño efectivo (índice Garza-Williamson 0.330). Para

loci selectivamente neutrales, el número de alelos y la distribución de frecuencias de los alelos en poblaciones naturales es resultado de un equilibrio entre mutación y deriva génica. Los parámetros de éste equilibrio son la tasa de mutación y el tamaño efectivo de la población. Cuando en una población ocurre un cuello de botella y el tamaño efectivo de la población se reduce significativamente, también hay una reducción correlativa y progresiva del número de alelos y generalmente desarrolla un exceso de heterocigosidad (Cornuet y Luikart, 1996). Este exceso se debe a que los alelos raros generalmente se pierden más rápido debido a la deriva génica. Si una población ha sufrido una reducción reciente de tamaño, presentará un déficit de alelos raros con respecto al número esperado en una población en equilibrio. Debido a que los alelos raros contribuyen muy poco a la heterocigosidad esperada, habrá un exceso de heterocigosidad observada cuando se compare con una población en equilibrio con un número equivalente de alelos (Cornuet y Luikart, 1996).

El exceso de heterocigosidad se puede explicar por medio de varias hipótesis como por ejemplo la dominancia (o recesivos deletéreos) en donde las mutaciones espontáneas generan continuamente alelos recesivos letales o deletéreos que se expresan en los individuos homócigos, así, los individuos heterócigos funcionan mejor para un mayor número de genes. Por otra parte está la sobredominancia (o ventaja del heterócigo) en la que un individuo heterócigo puede ser más exitoso que los dos homócigos para un locus; los heterócigos tienen la información de los dos homócigos, por lo tanto, pueden funcionar mejor en un mayor rango de condiciones y ser más estables (Dobzhansky et al., 1977; Allendorf y Leary, 1986).

En este estudio, el exceso de heterocigosidad también podría entenderse como una ventaja sobre los heterócigos si los microsatélites no fueran selectivamente neutros. Actualmente no hay evidencia directa del papel que juegan los microsatélites en el genoma de eucariontes, pero existen trabajos que sugieren que fuerzas evolutivas como la selección podría estar limitando las unidades de repetición (Garza et al., 1995) actuando directamente en la evolución de algunos microsatélites (Estoup y Cornuet, 1999). Intuitivamente los arreglos de repetición de los di ó tetranucleótidos generalmente han sido considerados como no-codificantes, porque las secuencias y su polimorfismo podrían romper cualquier marco de lectura abierta. En este estudio la mayoría de los loci usados son dinucleótidos, por lo que se esperaría que este exceso de heterocigosidad fuera por la reducción reciente en el tamaño de las poblaciones y no por la acción de la selección natural.

### **7.2.5 Otros métodos para el estudio de microsatélites**

Aunque los microsatélites amplificaron exitosamente en *Anolis uniformis*, los productos de PCR sólo se separaron por medio de geles de poliacrilamida. Esta técnica puede llegar a requerir más horas de trabajo de laboratorio, pero sobre todo ser menos eficiente que el marcaje de los primers con fluorescencia y detección en secuenciador automático.

Los productos de PCR pueden ser mejorados con un sistema de desnaturalización y uno de tres métodos de amplificación. Primero, pueden usarse primers marcados en el extremo 3' con ATP ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P) o ATP ( $\gamma$ -<sup>33</sup>P) para lo cual un primer de cada par de locus es marcado usando T4 polinucleótido kinasa. La reacción de PCR se mezcla con un desnaturalizante (por ejemplo formamida,

EDTA, azul de bromofenol y azul de xilencianol) y calentado por aproximadamente 5 minutos a 95°C antes de cargar en el gel. Segundo, <sup>35</sup>S ó nucleótidos trifosfato <sup>32</sup>P (NTPs) pueden ser incorporados directamente en la reacción de PCR. Finalmente se puede usar tecnología de secuenciación automatizada, donde los primers son marcados en el extremo 5' con fluorescencia de varias longitudes de onda y detectados por láser. Con este sistema pueden correrse varios loci al mismo tiempo aún cuando los alelos sean del mismo tamaño (Scribner y Pearce, 2000).

Se recomienda en el futuro se marquen los siete pares de primers con fluorescencia y sean detectados en secuenciador y así poder comprobar el número de alelos y sus tamaños para cada locus.

#### **7.2.6 DNA mitocondrial y microsatélites**

A pesar de que los microsatélites presentan tasas de mutación mucho mayores que las del DNA mitocondrial, los resultados finales fueron similares. Por medio de las secuencias del gen mitocondrial y de los microsatélites se apoya la hipótesis de la reciente fragmentación de la selva con escasos efectos genéticos sobre *Anolis uniformis*. Los resultados del análisis de las secuencias demuestran que aunque hay haplotipos únicos para algunas poblaciones, los pasos mutacionales a partir del haplotipo ancestral son escasos reflejando el poco tiempo de fragmentación de la selva. Además, las medidas de diversidad genética (diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica) mostraron valores bajos evidenciando escasa estructura genética de la especie en la región.

Los microsatélites arrojaron información relevante como una baja diversidad alélica, que aunque pueda deberse a la amplificación cruzada no se descarta la

pérdida de alelos por erosión genética. Por medio de estos marcadores moleculares tampoco se detectó una estructura genética ya que toda la variación genética se presentó dentro de las poblaciones. De acuerdo con la  $F_{ST}$  no hay diferenciación genética entre las poblaciones lo que demuestra que la fragmentación en la región de los Tuxtlas es reciente y por lo tanto no se detectan problemas genéticos graves en *A. uniformis*.

## CONCLUSIONES

Es posible que en las poblaciones de *Anolis uniformis* en los Tuxtlas haya existido una pérdida acelerada de diversidad alélica (en la que la mayoría de microsatélites tiene solo dos alelos para todas las poblaciones), pero no de heterocigosidad. De acuerdo con los resultados, parece que todavía no es evidente el efecto de la fragmentación. Es probable que 40 años aproximadamente no sea suficiente tiempo como para revelar graves problemas en las poblaciones de esta especie, y quizá tampoco lo sean el tamaño de los fragmentos y la distancia entre ellos. A pesar de esto, sí se detectó una estructura reproductiva; las poblaciones de los fragmentos grandes resultaron panmícticas entre sí, al igual que las de los fragmentos pequeños, pero no las poblaciones de los fragmentos medianos, lo que nos hace pensar que se están empezando a reflejar los primeros efectos de la fragmentación. Estudios recientes han documentado la presencia de esta especie en selva continua y en fragmentos de selva (e.g., Urbina et al., 2006) y no se ha registrado su presencia en potreros o pastizales. La dependencia de esta especie a la selva indica que las poblaciones sí están siendo afectadas por la fragmentación, ya que los potreros representan una barrera evitando el flujo génico. Es probable que esta especie se encuentre en un estado temprano de erosión genética. Se espera que si las poblaciones pequeñas permanecen aisladas por más generaciones habrá una pérdida importante de variación genética y la acción de la deriva génica será más severa.

## **El futuro**

Hasta este momento se ha visto que el tiempo que lleva fragmentada la selva no ha sido suficiente para manifestar problemas en las poblaciones de *Anolis uniformis*. No se puede asegurar que el tamaño de los fragmentos y las distancias entre ellos sean determinantes en la variación genética y en la diferenciación poblacional. Debido a que no hay suficientes datos y a que el proceso de erosión genética puede llegar a ser muy rápido, se propone el monitoreo de esta especie en la región. Se sugiere que se lleven a cabo colectas de tejido (por lo menos cada dos años) en los mismos fragmentos de selva así como en fragmentos más alejados (Santa Martha, Jaguarundi, Francisco Villa, etc) e incluso cubrir todo el rango de distribución de la especie; aislar y usar microsatélites específicos para *A. uniformis* (marcados con fluorescencia para ser detectados en un secuenciador automático) y analizar también a las especies hermanas. Además, se debe integrar datos moleculares con otro tipo de datos, por ejemplo, demográficos y conductuales de esta lagartija.

## LITERATURA CITADA

- Allendorf, F. W. y R. F. Leary. 1986. Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. En: M. E. Soulé (Ed.). Conservation Biology. The science of scarcity and diversity. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Arévalo, E., D. K. Scott y J. E. Sites. 1994. Mitochondrial DNA sequence divergent and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae) in central Mexico. Systematic Biology 43(3):387-418.
- Ausbel, A., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith y K. Struhl. 1992. Current protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, USA.
- Avise, J. C. 1994. Molecular markers, natural history y evolution. New York. Chapman & Hall. 511 p.
- Avise, J. C. y J. L. Hamrici. 1996. Conservation Genetics. Chapman & Hall. New York. 512 p.
- Barrera-Bassols, N. 1992. El impacto ecológico y socioeconómico de la ganadería bovina en Veracruz. En: E. Boege y H. Rodríguez (Eds.). Desarrollo y medio ambiente en Veracruz, CIESA-Golfo, Instituto de Ecología A.C., Fundación Frederich Ebert, Xalapa, Veracruz, pp. 79-114.
- Barrera-Laez, O. 1995. Uso y manejo de árboles en potreros de los Tuxtlas, Veracruz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Agronomía, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz.

- Barton, H. y M. Slatkin. 1986. A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. *Heredity* 56:409-415.
- Beaumont, M. A. 1999. Detecting populations expansion and decline using microsatellites. *Genetics* 153:2013-2029.
- Berry, O., M. D. Tocher, D. M. Gleeson y S. D. Sarre. 2005. Effect of variation matrix on animal dispersal: genetic evidence from a study of endangered skinks. *Conservation Biology* 19(3):855-864.
- Bowen, B. S. 1982. Temporal dynamics of microgeographic structure of genetic variation in *Microtus californicus*. *Journal of Mammalogy* 63:625-638.
- Burgman, M. A. y D. B. Lindenmayer. 1998. *Conservation Biology for the Australian environment*. Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton. 388 p.
- Cabrera, G. E. 2005. Estructura de las comunidades de anfibios y reptiles en fragmentos pequeños de bosque tropical perennifolio de los Tuxtlas, Veracruz. Tesis de Maestría. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Campbell, J. A., D. R. Formanowicz Jr. y P. B. Medley. 1989. The reproductive cycle of *Norops uniformis* (Sauria: Iguanidae) en Veracruz, Mexico. *Biotropica* 21(3):237-243.
- Clark, A. M., B. W. Bowen y L. C. Branco. 1999. Effects of natural habitat fragmentation on an endemic scrub lizard (*Sceloporus woodi*): an historical perspective based on a mitochondrial DNA gene genealogy. *Molecular Ecology* 8:1093-1104.
- Clement, M., D. Posada y K. A. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10):1657-1660.

- Cornuet, J. M. y G. Luikart. 1996. Description and power analysis of two test for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001-2014.
- Collinge, S. K. 1996. Ecological consequences of habitat fragmentation: implications for landscape architecture and planning. *Landscape Urban Planning* 36:59-77.
- Cunningham, M. y C. Moritz. 1998. Genetics effects of forest fragmentation on a rainforest restricted lizard (Scincidae: *Gnypetoscincus queenslandiae*). *Biological Conservation* 83: 19-30.
- Chapco, W. 1976. An exact test of the Hardy-Weinberg law. *Biometrics* 32:183-189.
- Dessauer, H. C., T. C. Glenn y L. D. Densmore. 2002. Studies on the molecular evolution of the Crocodylia: footprints in the sands of time. *Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)* 294:302-311.
- Dirzo, R. 1991. Rescate y restauración ecológica de la selva de los Tuxtlas. *Ciencia y Desarrollo* 17:33-45.
- Dirzo, R. y M. C. García. 1992. Rates of deforestation in Los Tuxtlas, a neotropical area in southeast Mexico. *Conservation Biology* 6:84-90.
- Dirzo, R., E. González y R. Vogt. 1997. *Historia natural de Los Tuxtlas*. Universidad Nacional Autónoma de México. 647 p.
- Dobzhansky, T., F. J. Ayala, G. L. Stebbins y J. W. Valentine. 1977. *Evolution*. San Francisco. 572 p.
- Driscoll, D. A. y C. M. Hardy. 2005. Dispersal and phylogeography of the agamid lizard *Amphibolorus nobbi* in fragmented and continuous habitat. *Molecular Ecology* 14:1613-1629.

- Ebenhard, T. 1991. Colonization in metapopulation: a review of theory and observations. En: Gilpin, M. E. y I. Hanski (Eds.) *Metapopulation dynamics: empirical and theoretical investigations*. Academic Press, San Diego, pp. 105-121.
- Eguiarte, L. 1991. Genética de poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liebm. en Los Tuxtlas, Veracruz. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Estoup, A. y J. M. Cornuet. 1999. Micosatellites evolution: inferences from population data. En: Goldstein, D. B. y C. Schlotterer (Eds.). *Microsatellites, evolution and applications*. Oxford University Press. New York. pp. 50-65.
- Excoffier, L. y M. Slatkin. 1998. Incorporating genotypes of relatives into a test of linkage disequilibrium. *American Journal of Human Genetics* 62:171-180.
- Excoffier, L., P. Smouse y J. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes : Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Excoffier, L., G. Laval y S. Schneider. 2005. ARLEQUIN ver. 3.1: An integrated package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Forman R. T. y M. Gordon. 1986. *Landscape ecology*. Jonh Wiley & Sons, New York. 619 p.
- Gaines, M. S., J. E. Diffendorfer, R. H. Tamrin y T. S. Whittam. 1997. The effects of habitat fragmentation on the genetic structure of small mammal populations. *Journal of Heredity* 88:294-304.
- García, H. M. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico* 1(2):31-41.

- Garza, J. C. y E. G. Williamson. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10:305-318.
- Garza, J. C., M. Slatkin y N. B. Freimer. 1995. Microsatellite allele frequencies in human and chimpanzees, with implications for constraints on allele size. *Molecular Biology and Evolution*. 12(4):594-603.
- Gifford, M. E., R. Powell, A. Larson y R. L. Gutberlet. 2004. Population structure and history of a phenotypically variable teiid lizard (*Ameiva chrysolema*) from Hispaniola: the influence of a geologically complex island. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32:735-748.
- Gilpin, M. E. y M. E. Soulé. 1986. Minimum viable populations processes of species extinction. En: Soulé M. E. (Ed.) *Conservation Biology*. Sinauer, Sunderland, pp.19-34.
- Gilpin, M. E. 1991. The genetic effective population size of a metapopulations. En: Gilpin M.E. y I. Hanski (Eds.) *Metapopulation dynamics: empirical and theoretical investigations*. Academic Press, San Diego, pp. 165-175.
- Gilpin, M. y I. Hanski. 1991. *Metapopulation dynamics: empirical and theoretical investigations*. Academic Press, San Diego, California. 300 p.
- Glenn, T. C., J. L. Staton, A. T. Vu, L. M. Davis, J. R. Alvarado, W. E. Rhodes, I. Leher y R. H. Sawyer. 2002. Low mitochondrial DNA variation among american alligators and a novel non-coding region in crocodylians. *Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)* 294:312-324.
- Goldberg, C. S., B. K. Sullivan, J. H. Malone y C. R. Schwalbe. 2004. Divergence among barking frogs (*Eleutherodactylus augusti*) in the southwestern United States. *Herpetologica* 60(3):312-320.

- González, E. G. 2003. Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia* 59(2-3):377-388.
- Goodman, S. J. 1997. *R<sub>ST</sub> Calc*: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellites data and determining their significance. *Molecular Ecology* 6:881-885.
- Gou, S. y E. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48:361-372.
- Guevara, S. y J. Laborde. 1993. Monitoring seed dispersal at isolated standing trees in tropical pastures: consequences for local species availability. *Vegetatio* 107/108:319-338.
- Haila, Y., I. Hanski y S. Raivio. 1993. Turnover of breeding birds in small forest fragments: the sampling colonization hypothesis corroborated. *Ecology* 74:714-725.
- Hansson, L. 1991. Dispersal and connectivity in metapopulations. En: Gilpin M. E. y I. Hanski (Eds.) *Metapopulation dynamics: empirical and theoretical investigations*. Academic Press, San Diego, pp. 89-103.
- Harris, L. D. 1984. *The fragmented forest: island biogeography theory and preservation of biotic diversity*. University of Chicago Press, Chicago. 211 p.
- Hartl, D. 2000. *A primer of population genetics*. Sinauer associations. Sunderland, Massachusetts. 221 p.
- Hastings, A. y S. Harrison. 1994. Metapopulation dynamics and genetics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25:167-188.
- Hedrick, P. W. 2000. *Genetics of populations*. Second edition. Jones and Bartlet publishers. Subdury, Masachusetts. 553 p.

- Henle, K., D. B. Lindenmayer, C. R. Margules, D. A. Saunders y C. Wissel. 2004. Species survival in fragmented landscapes: where are we now?. *Biodiversity and Conservation* 13:1-8.
- Hillis, D. M., B. K. Mable, A. Larson, S. K. Davis y E. A. Zimmer. 1996. Nucleic Acids: Sequencing and Cloning. En: Hillis, D., C. Moritz y B. K. Mable (Eds.) *Molecular Systematics*. Publishers Sunderland, Massachusetts, pp. 321-382.
- Hoehn, M., S. D. Sarre y K. Henle. 2007. The tales of two geckos: does dispersal prevent extinction in recently fragmented populations?. *Molecular Ecology* 16:3299-3312.
- Ibarra-Manríquez, G., M. Martínez-Ramos, R. Dirzo y J. Nuñez-Farfán. 1997. La vegetación. En: Dirzo, R., E. González y R. Vogt (Eds.) *Historia natural de Los Tuxtlas*. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 61-85.
- Keogh, S. J., I. Scott, M. Fitzgerald y R. Shine. 2003. Molecular phylogeny of the Australian venomous snake genus *Hoplocephalus* (Serpentes, Elapidae) y conservation genetics of the threatened *H. stephensii*. *Conservation Genetics* 4:57-65.
- Keogh, S. J., I. Scott y C. Hayes. 2005. Rapid and repeated origin of insular gigantism and dwarfism in Australian tiger snakes. *Evolution* 59(1):226-233.
- Kimura, M. y J. F. Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49:725-738.
- Kimura, M. y T. Ohta. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 75:2868-2872.
- Klug, W. S. y M. R. Cummings. 1999. *Conceptos de Genética*. Quinta Edición. Prentice Hall. 814 p.

- Lacy, R. C. y D. B. Lindenmayer. 1995. A simulation study of the impacts of population subdivision on the montain brushtail possum *Trichosurus caninus* Ogilby (Phalangeridae: Marsupialia), in south-eastern Australia. II. Loss of genetic variation whitin and between subpoblations. *Biological Conservation* 73:131-142.
- Larson, A., D. B. Wake y K. P. Yanev. 1984. Measuring gene flow among polulations having high levels of genetic fragmentation. *Genetics* 106:293-308.
- Laurence, W. F., T. E. Lovejoy, H. I. Vasconcelos, E. M. Bruna., R. K. Didham, P. C. Stouffer, C. Gascon, R. O. Bierregaard, S. G. Laurence y E. Sampaio. 2002. Ecosystem decay of Amazonian forest fragments: a 22-year investigation. *Conservation Biology* 16(3):605-618.
- Lee, J. C. 1996. The amphibians and reptiles of the Yucatan peninsula. Cornell University. 500 p.
- Li, C. C. 1955. Population genetics. Chicago: University of Chicago. 366 p.
- Luikart, G., F. W. Allendorf, J. M. Cornuet y W. B. Sherwin. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity* 89:238-247.
- Luque, J y A. Herraéz. 2002. Biología Molecular e ingeniería genética. Ed. Harcourt Brace de España, S.A. 492 p.
- Mac Nally, R. y G. Brown. 2001. Reptiles and habitat fragmentation in the box-forest of central Victoria, Australia: predictions, compositional change and faunal nestedness. *Oecologia* 128:116-125.
- Madsen, T., B. Stille y R. Shine. 1996. Inbreeding depression in an isolated colony of adders, *Vipera brevis*. *Biological Conservation* 75:113-118.

- Mech, S. y J. G. Hallett. 2001. Evaluating the effectiveness of corridors: a genetic approach. *Conservation Biology* 15(2): 467-474.
- Metropolis, N., A. W. Rosenbluth, M. N. Rosenbluth, A. H. Teller y E. Teller. 1953. Equation of state calculations by fast computing machines. *Journal of Chemical Physics* 21:1087-1092.
- Moore, W. S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation mitochondrial gene trees versus nuclear gene trees. *Evolution* 49:718-726.
- Morin, P. A., P. Mahboubi, S. Wedel y J. Rogers. 1998. Rapid screening and comparison of human microsatellite markers in baboons: allele size is conserved, but allele number is not. *Genomics* 53:12-20.
- Moritz, C. 1994. Applications of mitochondrial DNA analysis to conservation: a critical review. *Molecular Ecology* 3:401-411.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press. 512 p.
- Nei, M., T. Maruyama y R. Chakraborty. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29:1-10.
- Nicholson, K. E., R. E. Glor, J. J. Kolbe, A. Larson, S. B. Hedges y J. B. Losos. 2005. Mainland colonization by island lizards. *Journal of Biogeography* 32:929-938.
- Ogden, R., T. J. Griffiths y R. S. Thorpe. 2002. Eight microsatellite loci in the Caribbean lizard, *Anolis roquet*. *Conservation Genetics* 3: 345-346.
- Pang, J., Y. Wang, Y. Zhong, A. R. Hoelzel, T. J. Papenfuss, X. Zeng, N. B. Ananjeva y Y. Zhang. 2003. A phylogeny of Chinese species in the genus *Phrynocephalus* (Agamidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27:398-409.

- Parker P. T., A. A. Snow, M. D. Schug, G. C. Booton y P. A. Fuerst. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79:361-382.
- Peacock, M. M. y A. T. Smith. 1997. The effect of habitat fragmentation on dispersal patterns, mating behavior, y genetic variation in a pika (*Ochotona princeps*) metapopulation. *Oecologia* 112:524-533.
- Pemberton, J. M., J. Slate, D. R. Bancroft y J. A. Barrett. 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology* 4:249-252.
- Paulo, O. S., C. Dias, M. W. Bruford, W. C. Jordan y R. A. Nichols. 2001. The persistence of Pliocene populations through the Pleistocene climatic cycles: evidence from the phylogeography of an Iberian lizard. *Proceedings: Biological Science* 268:1625-1630.
- Raymond, M. y F. Rousset. 1995. GENEPOP, ver 3.0. Institut des Sciences de l'Evolution. Université de Montpellier, France.
- Reeder, T. W. 2003. A phylogeny of the Australian *Sphenomorphus* group (Scincidae: Squamata) and the phylogenetic placement of the crocodile skinks (*Tribolonotus*): Bayesian approaches to assessing congruence and obtaining confidence in maximum likelihood inferred relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27:384-397.
- Rosenblum, E. B., H. E. Hoekstra y M. W. Nachman. 2004. Adaptive reptile color variation and the evolution of the *MC1R* gene. *Evolution* 58(8):1794-1808.
- Rubinsztein, D. C., W. Amos, J. Leggo, S. Goodburn, S. Jain, S. Li, R. L. Margolis, C. A. Ross y M. A. Ferguson-Smith. 1995. Microsatellite evolution –

evidence for directionality and variation in rate between species. *Nature Genetics* 10:337-343.

- Santos, T., Díaz, J., Tellería, J., Pérez, J., Pérez-Tris y Carbonell, R. 2003. Efectos de la fragmentación y la calidad del hábitat sobre la distribución y reproducción de la lagartija Colilarga (*Psammodromus algirus*). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). J. Gutiérrez Abascal 2, 28006, Madrid, España.
- Sarre, S. 1995. Mitochondrial DNA variation among populations of *Oedura reticulata* (Gekkonidae) in remnant vegetation: implications for metapopulations structure and population decline. *Molecular Ecology* 4:395-405.
- Scott, I., J. S. Keogh y M. J. Whiting. 2004. Shifting sands and shifty lizards: molecular phylogeny and biogeography of African flat lizards (*Platysaurus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31:618-629.
- Scribner, K. T. y J. M. Pearce. 2000. Microsatellites: evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population and phylogenetic levels. En: A. Barker (Ed.) *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell Science Limited. UK. pp. 235-271.
- Sherwin, W. B. y C. Moritz. 2000. Managing and monitoring genetic erosion. En: A. G. Young y G. M. Clarke (Eds.) *Conservation Biology* 4. Genetics, demography and viability of fragmented populations. Cambridge University Press. UK pp. 9-34.
- Sirkwan, S. y D. S. Woodruff. 2000. Genetic erosion in isolated small-mammal populations following rainforest fragmentation. En: A. G. Young y G. M. Clarke (Eds.) *Conservation Biology* 4. Genetics, demography and viability of fragmented populations. Cambridge University Press. UK pp. 149-172.

- Slatkin, M. 1981. Estimating levels of gene flow in natural populations. *Genetics* 99:323-335.
- Slatkin, M. 1985a. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39(1):53-65.
- Slatkin, M. 1985b. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16:393-430.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139:457-462.
- Slatkin, M. y L. Excoffier. 1996. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the EM algorithm. *Heredity* 76:377-383.
- Smith, T. B. y R. K. Wayne. 1996. *Molecular genetics approaches in conservation*. Oxford University Press. New York. 504 p.
- Stenson, A., A. Malhotra y R. S. Torpe. 2000. Highly polymorphic microstellite loci from the Dominican anole (*Anolis oculatus*) and their amplification in other series anoles. *Molecular Ecology* 9: 1680-1681.
- Stow, A. D., P. Sunnucks, D. A. Briscoe y M. G. Gardner. 2001. The impact of habitat fragmentation on dispersal of Cunningham's skink (*Egernia cunninghami*): evidence form allelic and genotypic analysis of microsatellites. *Molecular Ecology* 10:867-878.
- Stow, A. D. y P. Sunnucks. 2004. High mate and site fidelity in Cunningham's skinks (*Egernia cunninghami*) in natural and fragmented habitat. *Molecular Ecology* 13:419-430.
- Stow, A. J. y D. A. Briscoe. 2005. Impact of habitat fragmentation on allelic diversity at microsatellite loci in Cunningham's skink (*Egernia cunninghami*); a preliminary study. *Conservation Genetics* 6:455-459.

- Soto, M. y L. Gama. 1997. Climas. En: González, S. E., R. Dirzo y R. Vogt (Eds.) Historia Natural de los Tuxtlas. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 7-18.
- Soulé, M. E. 1986. Conservation biology: the science of scarcity and diversity. Sinauer, Sunderland. 584 p.
- Sumner, J. 2005. Decreased relatedness between male prickly forest skinks (*Gnypetoscincus queenslandiae*) in habitat fragments. Conservation Genetics 6:333-340.
- Sumner, J., T. Jessop, D. Paetkau y C. Moritz. 2004. Limited effect of anthropogenic habitat fragmentation on molecular diversity in a rain forest skink, *Gnypetoscincus queenslandiae*. Molecular Ecology 13:259-269.
- Tagu, D. y C. Moussard. 2006. Techniques for molecular biology. Science Publishers. Enfield, NH, USA. 227 p.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. Genetics 105:437-460.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123:585-595.
- Tamura K., J. Dudley, M. Nei y S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24(8):1596-1599.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Research 17:6463-6471.
- Templeton, A. R., K. A. Crandall y C. F. Sing. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease

mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132:619-633.

- Templeton, A. R., E. Routman y C. A. Phillips. 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribución of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger Aalamander, *Ambystoma trigrinum*. *Genetics* 140:767-782.
- Thorpe, R. 2002. Analysis of color spectra in comparative evolutionary studies: Molecular phylogeny and habitat adaptation in the St. Vicent anole (*Anolis trinitatis*). *Systematic Biology* 51(4):554-569.
- Turner, M. G. 1989. Landscape ecology: the effect of pattern on process. *Annual Review of Ecology Systematics* 20:171-197.
- Urbina, J. N., Olivares, M. y Reynoso, V. H. 2006. Herpetofauna diversity and microenvironment correlates across the pasture-edge-interior gradient in tropical rainforest fragments in the region of Los Tuxtlas, Veracruz. *Biological Conservation* 132:61-75.
- Valdes, A. M., M. Slatkin y N. B. Freiner. 1993. Allelic frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revised. *Genetics* 133:737-749.
- Van Oosterhout, C., W. F. Hutchinson, P. M. Willis y P. Shipley. 2004. MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535-538.
- Villard, M. A., M. K. Trzcinski y G. Merriam. 1999. Fragmentation effects on forest birds: relative influence of woodland cover and configuration on landscape occupancy. *Conservation Biology* 13:774-784.

- Villarreal, J. L. y L. Heras. 1997. Historia Natural de especies, *Anolis uniformis*. En: Dirzo, R., E. González y R. Vogt (Eds.) Historia natural de Los Tuxtlas. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 476-478.
- Watterson, G. A. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology* 7:256-276.
- Weber, J. L. 1990. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>-(dGdT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics* 7:524-530.
- Weber, J. L. y C. Wong. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 2:1123-1128.
- Weir, B. S. y C. C. Cockerman. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- Wilcox, B. A. y D. D. Murphy. 1985. Conservation strategy: the effects of fragmentation on extinction. *American Naturalist* 125:879-887.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annual of Eugenetics* 15:323-354.
- Wu J. y S. A. Levins. 1993. A spatially explicit patch dynamic modeling approach: principles and an example from the Jasper Ridge serpentine grassland. *Bulletin of the Ecological Society of America* 74:494.
- Wu, J., J. L. Vankat y Y. Barlas. 1993. Effects of patch connectivity and arrangement on animal metapopulation dynamics: a simulation study. *Ecological Modelling* 65:221-254.
- Zaldivar, R. A., A. Nieto y J. P. Lacleste. 2005. Phylogeny and evolution of dorsal pattern in the Mexican endemic lizard genus *Barisia* (Anguidae: Gerrhonotinae). *Journal of Zoology Systematics* 43(3):243-257.

- Zane, L., L. Bargelloni y T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11:1-16.
- Zarza, E, V. H. Reynoso y B. C. Emerson. 2008. Diversification in the northern neotropics: mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of the iguana *Ctenosaura pectinata* and related species. *Molecular Ecology* 17:3259-3275.

## APÉNDICE I

### TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE DNA POR FENOL/CLOROFORMO

Día 1.

- Rotular una serie de microtubos de 1.5 ml. Añadir un fragmento de tejido (de aproximadamente 3 mm<sup>2</sup>), 600 µl de buffer de extracción (10mM Tris-HCl pH 8; 100mM EDTA y 100mM NaCl y 1% SDS) y 7 µl de proteinasa K (a 20mg/ml).
- Se dejan incubando a 56°C con agitación, durante 24 hrs.

Día 2.

- En los tubos con las muestras, añadir 300 µl de fenol y 300 µl de cloroformo (diclorometano + isoamílico, 24:1). Agitar bien y centrifugar 10 minutos a 13200 rpm.
- Trasladar el sobrenadante a la segunda serie de tubos rotulados y añadir 600µl de cloroformo, agitar bien y volver a centrifugar 10 min.
- Trasladar el sobrenadante en la tercera serie de tubos y añadir 700 µl de alcohol frío (100%). Dejar precipitar durante toda la noche a 4°C.

Día 3.

- Centrifugar durante 10 minutos a 13200 rpm, de preferencia en una centrífuga refrigerada. Decantar el alcohol o sacarlo utilizando una pipeta de 200 µl, teniendo cuidado de no llevarse el botón de ADN.
- Añadir a cada tubo 700 µl de etanol al 70% frío. Volver a centrifugar 10 minutos a la misma velocidad.
- Decantar de nuevo el alcohol o sacarlo utilizando una pipeta de 200 µl, teniendo cuidado de no llevarse el botón de ADN.
- Secar el precipitado en la centrífuga con vacío o dejar secando los tubos abiertos dentro de una caja con tapa, de un día para otro.
- Resuspender en 200 µl de agua bi-destilada esterilizada.

## APÉNDICE II

### AMPLIFICACIÓN GEN MITOCONDRIAL Y MICROSATÉLITES

#### Primers ND4

ND4-Leu	
STOCK	25µl RXN
ddH <sub>2</sub> O	17.2
Buffer 10x (libre Mg)	2.5
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2.0
dNTP Mix (10 mM)	0.2
Primer F (10 µM)	0.5
Primer R (10 µM)	0.5
Taq (5 U/µl)	0.125
DNA (10ng/µl)	2

Desnatur. inicial	94 °C	5 min.
Desnaturalización	94 °C	1 min
Alineamiento	55 °C	1min
Extensión	72 °C	1 min
Extensión final	72 °C	5 min
35 ciclos		

#### Microsatélites

AoGT2	
STOCK	15µl RXN
ddH <sub>2</sub> O	2.22
Buffer 10x (libre Mg)	1.50
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0.75
dNTP Mix (2.5 mM)	1.20
Taq (5 U/µl)	0.20
Glicerol (100%)	0.38
Primer F (1 µM)	1.875
Primer R (1 µM)	1.875
DNA (10ng/µl)	5

Desnatur. inicial	94 °C	3 min.
Desnaturalización	94 °C	30 seg
Alineamiento	52.5°C	30 seg
Extensión	72 °C	30 seg
Extensión final	72 °C	5 min
35 ciclos		

AoGT9	
STOCK	25µl RXN
ddH <sub>2</sub> O	16.2
Buffer 10x (libre Mg)	2.5
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2.0
dNTP Mix (10 mM)	0.2
Primer F (10 µM)	0.5
Primer R (10 µM)	0.5
Taq (5 U/µl)	0.125
DNA (10ng/µl)	3

Desnatur. inicial	94 °C	3 min.
Desnaturalización	94 °C	30 seg
Alineamiento	55 °C	30 seg
Extensión	72 °C	30 seg
Extensión final	72 °C	5 min
35 ciclos		

<b>AoSA18</b>	
<b>STOCK</b>	<b>25µl RXN</b>
ddH <sub>2</sub> O	17.2
Buffer 10x (libre Mg)	2.5
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2.0
dNTP Mix (10 mM)	0.2
Primer F (10 µM)	0.5
Primer R (10 µM)	0.5
Taq (5 U/µl)	0.125
DNA (10ng/µl)	2

Desnatur. inicial	94 °C	3 min.
Desnaturalización	94 °C	30 seg
Alineamiento	55 °C	30 seg
Extensión	72 °C	30 seg
Extensión final	72 °C	5 min
35 ciclos		

<b>AoBA36</b>	
<b>STOCK</b>	<b>25µl RXN</b>
ddH <sub>2</sub> O	11.2
Buffer 10x (libre Mg)	2.5
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	7.0
dNTP Mix (10 mM)	0.2
Primer F (10 µM)	0.5
Primer R (10 µM)	0.5
Taq (5 U/µl)	0.125
DNA (10ng/µl)	3

Desnatur. inicial	94 °C	3 min.
Desnaturalización	94 °C	30 seg
Alineamiento	57 °C	30 seg
Extensión	72 °C	30 seg
Extensión final	72 °C	5 min
35 ciclos		

<b>Ar014</b>	
<b>STOCK</b>	<b>25µl RXN</b>
ddH <sub>2</sub> O	16.2
Buffer 10x (libre Mg)	2.5
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2.0
dNTP Mix (10 mM)	0.2
Primer F (10 µM)	0.5
Primer R (10 µM)	0.5
Taq (5 U/µl)	0.125
DNA (10ng/µl)	3

Desnatur. inicial	94 °C	3 min.
Desnaturalización	94 °C	30 seg
Alineamiento	57 °C	30 seg
Extensión	72 °C	30 seg
Extensión final	72 °C	5 min
35 ciclos		

<b>Ar035</b>	
<b>STOCK</b>	<b>25µl RXN</b>
ddH <sub>2</sub> O	16.2
Buffer 10x (libre Mg)	2.5
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2.0
dNTP Mix (10 mM)	0.2
Primer F (10 µM)	0.5
Primer R (10 µM)	0.5
Taq (5 U/µl)	0.125
DNA (10ng/µl)	3

Desnatur. inicial	94 °C	3 min.
Desnaturalización	94 °C	30 seg
Alineamiento	55 °C	30 seg
Extensión	72 °C	30 seg
Extensión final	72 °C	5 min
35 ciclos		

---

**Ar065**

---

<b>STOCK</b>	<b>25µl RXN</b>
ddH <sub>2</sub> O	13.4
Buffer 10x (libre Mg)	2.5
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	3
dNTP Mix (10 mM)	0.2
Primer F (10 µM)	0.5
Primer R (10 µM)	0.5
Taq (5 U/µl)	0.125
DNA (10ng/µl)	3

---

Desnatur. inicial	94 °C	3 min.
Desnaturalización	94 °C	30 seg
Alineamiento	64.5°C	30 seg
Extensión	72 °C	30 seg
35 ciclos		
Extensión final	72 °C	5 min
	60 °C	30 min

---

## APÉNDICE III

### GELES DE POLIACRILAMIDA

#### Geles nativos, no desnaturalizados

Para prepara un gel, cámara de electroforesis P9Ds OWL (geles de 14 x 16 cm).

	<b>6%</b>	<b>8%</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>
<b>Acrilamida 40%</b>	4.0 ml	5.4 ml	6.8 ml	8.1 ml
<b>Buffer TBE 5x</b>	5.4 ml	5.4 ml	5.4 ml	5.4 ml
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	18.4 ml	16.8 ml	15.6 ml	14.5 ml
<b>APS 25%</b>	140 µl	140 µl	140 µl	140 µl
<b>TEMED</b>	14 µl	14 µl	14 µl	14 µl

Para correr geles se usa Buffer TBE 1x.

Buffer de carga: 0.025% bromofenol, 0.025% xilene cianol, glicerina.

#### Geles Desnaturalizados

Para preparar acrilamida:

<b>Acrilamida 6% urea 7M (100ml)</b>	
dH <sub>2</sub> O	35 ml
Buffer TBE 10x	10 ml
Urea	42g
Acrilamida 40%	15 ml

Filtrar con malla de 0.45 microtones y aforar a 100ml. Almacenar a 4°C en un recipiente oscuro.

Para prepara un gel, cámara de electroforesis P9Ds OWL (geles de 14 x 16 cm):

<b>Acrilamida 6% urea 7M</b>	28 ml
Aps 10%	84 µl
TEMED	24 µl

Para correr geles se usa Buffer TBE 1x.

Buffer de carga desnaturalizante: Formamida 96% EDTA 20mM pH8.0, Azul de bromofenol 0.025% xilene cianol 0.025%). Almacenar a 4°C.

Para preparar Buffer TBE 10x:

Trizma base	108 gr
Acido Bórico	55 gr
0.5 M EDTA	40 ml
ddH <sub>2</sub> O	600 ml
Disolver muy bien y aforar a 1L.	

## APÉNDICE IV

### TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA

#### Solución fijadora - EtOH 10%, Ácido acético 0.5

	100 ml	200 ml	400 ml	800 ml	2L
<b>EtOH</b>	10 ml	20 ml	40 ml	80 ml	200 ml
<b>Ac. ac.</b>	500 µl	1 ml	2 ml	4 ml	10 ml
<b>dd H<sub>2</sub>O</b>	89.5 ml	179 ml	358 ml	716 ml	1790 ml

#### Solución de tinción - Nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>)

	100 ml	200 ml	400 ml	800 ml	1L
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	200 mg	400 mg	800 mg	1.6 g	2 g
<b>dd H<sub>2</sub>O</b>	100 ml	200 ml	400 ml	800 ml	1L

#### Solución reveladora – 3% NaOH + formaldehído\*

	100 ml	200 ml	400 ml	800 ml	2L
<b>NaOH</b>	3 g	6 g	12 g	24 g	60 g
<b>dd H<sub>2</sub>O</b>	100 ml	200 ml	400 ml	800 ml	2L
<b>Formald.</b>	500 µl	1 ml	2 ml	4 ml	6 ml

\*el formaldehído se agrega al momento, usar máscara.

#### Solución detenedora – EDTA

	100 ml	200 ml	400 ml	800 ml	2L
<b>EDTA Na<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O</b>	3 g	6 g	15 g	30 g	60 g
<b>dd H<sub>2</sub>O</b>	100 ml	200 ml	500 ml	1L	2L

**Tinción:**

- Lavar con la solución fijadora durante 5 minutos (100 ml para un gel).
- Enjuagar con agua 3 veces
- Lavar con nitrato de plata de 7 a 10 minutos
- Enjuagar con agua 3 veces
- Lavar con solución reveladora + 500  $\mu$ l de formaldehído de 10 a 15 minutos o hasta que aparezcan bandas
- Enjuagar con agua destilada una vez
- Agregar solución detenedora.