



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA NUTRIA DE RÍO
(*Lontra longicaudis*) EN LA RESERVA DE
MONTES AZULES, CHIAPAS, MÉXICO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

DAYA ANANDA NAVARRETE VARGAS

TUTOR

DR. JORGE ORTEGA REYES

2008



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM



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.

*A ustedes que son mi
principio y mi fin...*



A tí, mi amado Etznab...

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevo a cabo gracias al apoyo financiero otorgado por los proyectos IN207607 de PAPIIT y 90728 de CONACyT. Así como al apoyo proporcionado por el Instituto de Ecología.

Agradezco a mi tutor, el Dr. Jorge Ortega, que pese a mi rebeldía logró acompañarme hasta el final del trabajo que en sus manos se encuentra. De igual manera agradezco a aquellos que amablemente aceptaron ser parte de mi jurado: el Dr. Daniel Piñero, por su constante asesoría y apoyo; el Dr. Rodrigo Medellín por su apoyo, tolerancia y sabios consejos; a la Dra. Livia León por motivarme con sus palabras; y a la Biol. Gabriela Castellanos, por su compañía. Finalmente, agradezco a la Dra. Ella Vázquez por su valioso apoyo durante la realización de mi tesis.

A Lauren Teerwiller del Center for Disease Control, Washington D. C., Estados Unidos; por la lectura de los microsátélites.

A Ana Soler por donar las muestras colectadas durante 1999 y 2000, ¡Que muy afortunadamente amplificaron! También agradezco a la familia Lombera, muy en especial a mi guía "Tepo" (me disculpo por no recordar su nombre) y al Arca de Noé.

A ti mi compañero de campo y de ciudad, que pese a las dificultades del camino hemos logrado salir adelante; porque encontremos nuestro camino y en él los hermosos frutos de nuestro destino.

A mi familia que me dio su singular pero valioso apoyo y cariño.

Podría llenar hojas agradeciendo a tantas personas cuyo apoyo fue fundamental para la realización de este trabajo, pero no considero suficiente el ponerlos en una enorme lista y espero algún día poder retribuirles lo recibido. Además, podría cometer la imprudencia de olvidar a alguien; así que mejor dejo abiertos los brazos para agradecer no sólo a los que han estado a lo largo de mi camino, sino a los que aun permanecen y a los que algún día estarán. ¡Gracias a todos ustedes!

¡Y claro!, agradezco a las nutrias, sin las cuales indudablemente este trabajo no podría haber sido realizado, y sin su existencia no habría tenido sentido. Porque este trabajo es gracias a ellas y por ellas; les deseo suerte y que el cielo las cuide, pues con el humano en la Tierra se puede esperar cualquier cosa.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES	
2.1. Especie de estudio: <i>Lontra longicaudis</i>	6
2.2. Área de estudio: Reserva de la Biósfera Montes Azules	8
2.3. Diversidad y estructura genética en las nutrias	10
3. OBJETIVOS	15
4. HIPÓTESIS	15
5. MÉTODOS	
5.1. Obtención de muestras	16
5.2. Extracción de ADN	17
5.3. Amplificación y lectura de microsatélites	18
5.4. Análisis estadísticos	
5.4.1. Diversidad genética	19
5.4.2. Estructura genética	21
6. RESULTADOS	
6.1. Diversidad genética	23
6.2. Estructura genética	29
7. DISCUSIÓN	34
8. CONCLUSIÓN	38
9. REFERENCIAS	40
ANEXOS	48

RESUMEN

La nutria neotropical (*Lontra longicaudis*) posee una amplia distribución. Sin embargo, numerosos factores como la destrucción del hábitat, competencia con pescadores, y la cacería ilegal, la han situado en la lista roja. Poco es conocido sobre la diversidad y estructura genética, sólo un artículo referente a su diversidad genética ha sido publicado. Para contribuir al conocimiento de su situación genética, el objetivo de esta presentación es describir la estructura y diversidad genética de la nutria neotropical (*Lontra longicaudis*) en el río Lacantún y cinco de sus mayores tributarios localizados al sur de la Reserva de la Biosfera Montes Azules, en la selva Lacandona. Utilizando un muestro no invasivo, se colectaron 99 excretas en letrinas encontradas a lo largo de los afluentes. 57 muestras fueron colectadas en 2000 y 42 en 2007. Los análisis fueron realizados mediante el uso de 8 microsatélites polimórficos. El rango de alelos por locus encontrado en los seis ríos fue de 3.25 – 4.50, con un promedio de 4.75 ± 2.37 . La heterocigosidad promedio esperada (H_e) y la observada (H_o) fueron de 0.64 ± 0.14

y 0.54 ± 0.17 respectivamente. No se observó estructura genética debido al fuerte flujo genético existente entre los afluentes, obteniendo un F_{st} total de 0.015. Al analizar los ríos en conjunto, la mayoría de la variabilidad (97.2 % de la varianza total AMOVA) se encontró dentro de los sitios. Se encontraron diferencias, estadísticamente no significativas, entre las muestras obtenidas en ambos años resultando en una variación temporal en las frecuencias alélicas. No se observaron efectos significativos de endogamia ni la presencia de un cuello de botella. Finalmente, los resultados obtenidos indican que *L. longicaudis* muestra, en el sitio de estudio, una alta diversidad genética respecto a otras especies de nutrias y un fuerte flujo genético, el cual permite que actúen como una población panmíctica.

Palabras clave: *Diversidad genética, estructura genética, flujo genético, Lontra longicaudis, microsatélites.*

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento exponencial de la población humana ha provocado que nuestras actividades, directa o indirectamente, sean la principal amenaza que enfrenta la biodiversidad. Todo ello como resultado de la sobreexplotación de los recursos naturales, lo cual provoca la pérdida, degradación y fragmentación del hábitat de numerosas especies; arrastrando a la mayoría de ellas a estados críticos para su supervivencia, y en los peores casos, a su extinción (Hedrick y Miller 1992; Lacy 1997; Ceballos *et al.* 1998; Lande 1998; Allendorf y Luikart 2007). Aunado a lo anterior, muchas especies silvestres son capturadas o cazadas para ser posteriormente comercializadas vivas, en partes o procesadas; también son perseguidas al ser consideradas amenazas para las especies de interés económico, e inclusive, para las poblaciones humanas. Finalmente, se encuentra el daño causado por la introducción de especies exóticas (Vaughan *et al.* 2000; Soler 2004); cuyo impacto incluye la depredación, la modificación de comunidades vegetales y alteración del paisaje, la competencia y la introducción de enfermedades y parásitos a las poblaciones de especies nativas (CONABIO 2008b). De acuerdo con la IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) más del 50% de las especies animales se encuentran ya en alguna de las categorías de riesgo (Allendorf y Luikart 2007).

La extinción es un importante proceso biológico, relativamente común, a través del cual se ha desarrollado la historia evolutiva de la biodiversidad presente en nuestro planeta (Raup 1994; Eguiarte y Piñero 1999; Futuyma 2005). Sin embargo, las extinciones que formaron parte de la historia evolutiva se desarrollaron en largos periodos de tiempo; permitiendo el surgimiento de nuevas especies. Mientras que las actuales extinciones suceden tan rápidamente que no permiten que la acción de las fuerzas evolutivas dé origen a nuevas especies. Es por ello, que evitar la extinción de las especies a consecuencia de las actividades humanas, es el principal objetivo de la biología de la conservación; buscando la permanencia de las especies en poblaciones naturales (Allendorf y Luikart 2007). Uno de los factores relacionados con la extinción de las especies es la diversidad genética, ya que además de ser la materia prima de la evolución, ésta es requerida por las poblaciones para adaptarse al cambiante medio ambiente; reflejando el potencial evolutivo de las poblaciones (Lacy 1997; Hedrick *et al.* 1996; Lande 1998; Frankham 2005). Además, la pérdida de diversidad genética esta frecuentemente relacionada con la endogamia y su consecuente reducción en la capacidad reproductiva de las especies. La pérdida de diversidad genética es usual en poblaciones reducidas, situación común en la mayoría de las especies amenazadas,

debido a que las poblaciones pequeñas son más vulnerables a los efectos de la endogamia y de la deriva genética. Otro aspecto que afecta la diversidad genética de las especies amenazadas, y por ende su supervivencia, es el flujo genético; proceso que determina la estructura genética y la diferenciación poblacional. La fragmentación de las poblaciones, resultado de la destrucción y degradación del hábitat, provocan la disminución o eliminación del flujo genético; afectando el movimiento de genes entre las poblaciones, y por ende, de la diversidad genética (Lacy 1987; Hedrick y Miller 1992; Allendorf y Luikart 2007). La falta de flujo genético se refleja en el aislamiento de poblaciones, ya de por sí pequeñas, acentuando los efectos de la endogamia y la deriva genética (Lacy 1987; Frankham *et al.* 2002; Allendorf y Luikart 2007). Ante esta situación es indispensable la realización de estudios enfocados en el análisis del estado actual de la diversidad y estructura genética de las poblaciones de especies amenazadas, pues a partir de ellos, es posible el desarrollo de programas de manejo adecuados.

Existen dos tipos de métodos para estimar el flujo genético existente entre las poblaciones, los directos y los indirectos. Los métodos directos se basan en observaciones o experimentos que permiten determinar el grado de dispersión, mientras que los métodos indirectos estiman el nivel de flujo genético a partir de la interacción entre éste y otros procesos evolutivos. El método directo más comúnmente utilizado está basado en el F_{ST} de Wright (1931); el cual es una medida de la diferenciación genética entre poblaciones (Chesser 1991; Slatkin 1994; Bohonak 1999).

La diversidad genética puede ser medida mediante diferentes marcadores moleculares como las aloenzimas, el ADN mitocondrial (ADNmt), los RFLP (“restriction fragment length polymorphisms”), minisatélites y microsátélites (Hedrick y Miller 1992; Kohn y Wayne 1997, Frankham *et al.* 2002, Allendorf y Luikart 2007). Siendo los microsátélites los más utilizados en ecología molecular y estudios de conservación ya que muestran un alto polimorfismo, lo que permite analizar la diversidad genética incluso en poblaciones pequeñas y con baja diversidad genética. Dicho polimorfismo es el resultado de altas tasas de mutación, lo cual permite analizar las poblaciones a corto plazo, es decir, a una escala ecológica (Allendorf y Luikart 2007). El descubrimiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido fundamental, no sólo para el uso de los microsátélites, sino que ha permitido el aprovechamiento de ADN proveniente de muestras no invasivas tales como pelos, excretas, orina y muestras de museo (Kohn y Wayne 1997, Taberlet *et al.* 1999, Bosch *et al.* 2005). Ofreciendo una valiosa alternativa a las muestras de sangre y tejido anteriormente requeridas para este tipo de estudios, las cuales representan graves complicaciones cuando se trabaja con especies con bajas densidades, elusivas, amenazadas o en

alguna categoría de riesgo. Los avances en las técnicas moleculares no sólo nos permiten analizar la diversidad y estructura genética de las poblaciones, también nos ofrecen una nueva herramienta para la obtención de información sobre diversos aspectos de las especies, como: abundancia, hábitos alimentarios, interacciones sociales, parentesco, dispersión, etc. (Johnson *et al.* 2001; Taberlet *et al.* 2001; Bosch *et al.* 2005; Maldonado 2006).

Estas técnicas han brindado una gran oportunidad para estudiar más a fondo a especies de naturaleza elusiva y que se encuentran en bajas densidades como es el caso de numerosos carnívoros; grupo que es más vulnerable a las amenazas mencionadas con anterioridad debido a que se encuentran en el nivel trófico superior, tienen bajos índices reproductivos, grandes áreas de actividad, y algunas veces poseen complejos sistemas sociales (Arrendal 2007). En las listas de especies con algún tipo de riesgo, se encuentra un alto porcentaje de carnívoros, sólo en México, de las 40 especies de carnívoros presentes en el país (Ceballos y Oliva 2005), el 70% (28 especies) se encuentran en la NOM 59-SEMARNAT-2001 (CONABIO 2008A). El 55% (22 especies) se encuentra en algunos de los Apéndices de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres, CITES por sus siglas en inglés (UNEP-WCMC 2008).

Se han realizado numerosos estudios en carnívoros utilizando análisis genéticos; la mayoría de ellos en especies de félicos, cánidos, úrsidos y pinnípedos. Sólo algunos se han enfocado a carnívoros medianos como los prociónidos y mustélidos (Johnson *et al.* 2001). Entre los trabajos dirigidos a los mustélidos, aquellos enfocados en la nutria europea *Lutra lutra*, se han vuelto cada vez más frecuentes ya que es considerada como una de las mayores especies bioindicadoras de ecosistemas dulceacuícolas y riparios (Ruíz-Olmo *et al.* 1998; Soler 2004).

En México se encuentran tres especies de nutrias: la nutria marina (*Enhydra lutris*); la nutria de río norteamericana (*Lontra canadensis*) y la nutria de río neotropical (*Lontra longicaudis*). Todas estas especies amenazadas debido al fuerte impacto que han sufrido los ecosistemas acuáticos, no sólo en nuestro país, sino en todo el mundo. Se han realizado diversos estudios en estas tres especies, principalmente enfocados en su abundancia y dieta (Gallo 1997, Macías-Sánchez y Aranda 1999, Maldonado y López 2003, Soler 2004, Casariego-Madorell *et al.* 2008, Gallo *et al.* 2008,). Sin embargo, en México no se han realizado estudios de carácter genético, por lo que es esencial el desarrollo de proyectos enfocados al conocimiento de su diversidad genética; los cuales son indispensables no sólo para saber el estado en el que se encuentran sus poblaciones, sino para el adecuado diseño de programas de conservación (Taberlet *et al.* 2001).

La nutria neotropical (*Lontra longicaudis*) posee una amplia distribución en el país, ubicada en su mayoría dentro de regiones hidrológicas prioritarias (Arriaga *et al.* 1998). De las cuales sobresale la cuenca del Río Usumacinta que representa el 30% de los recursos hidrológicos del país; siendo importante no sólo por el volumen y la navegabilidad de sus corrientes, también por que en ella se encuentra localizada la Reserva de la Biosfera de Montes Azules (Figura 1). La Reserva se encuentra dentro de la región de la Selva Lacandona, identificada como importante centro de diversidad biológica y considerada como zona prioritaria de conservación (Medellín 1994; Arriaga *et al.* 2000 y 2002; Soler 2004). Así, el estudio de la diversidad genética de *L. longicaudis* en la Reserva de Montes Azules, no sólo ofrece información indispensable sobre el estado de sus poblaciones, necesaria para su conservación; además, al ser una especie bioindicadora, es posible obtener información sobre el estado de esta importante cuenca.

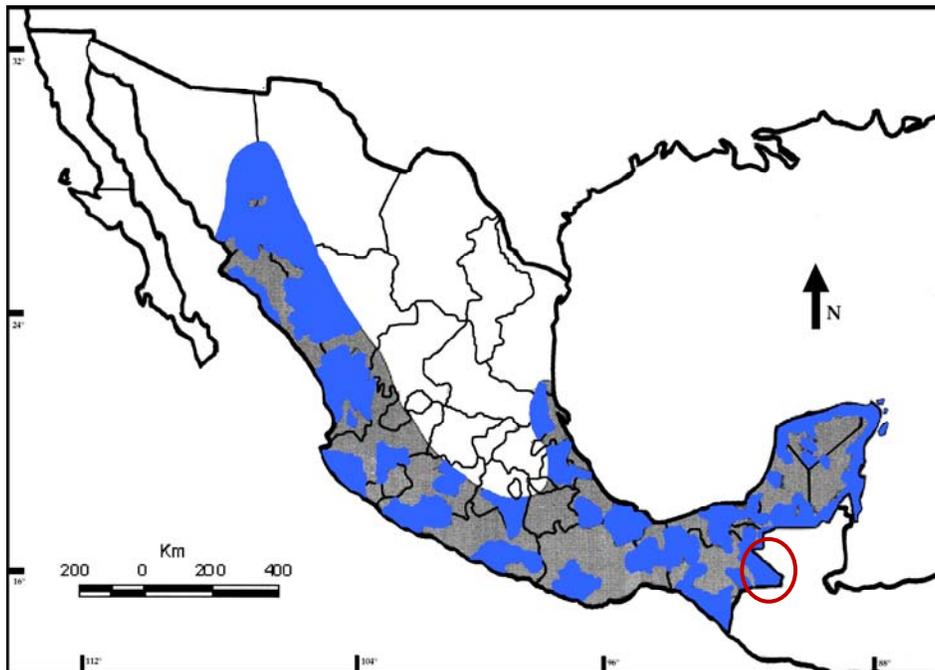


Fig. 1 Mapa de las regiones hidrológicas prioritarias de México (Arriaga *et al* 1998) ubicadas dentro de la distribución de *L. longicaudis* (Ceballos y Oliva 2005). Dentro del círculo se muestra la ubicación de la Reserva de la Biósfera Montes Azules.

2. ANTECEDENTES

2.1 Especie de estudio: *Lontra longicaudis*

La nutria de río neotropical (*Lontra longicaudis*) es un mustélido de gran tamaño (LT: 89-170 cm) de cuerpo largo y delgado. Posee una cabeza pequeña y plana, con un hocico corto y ancho; sus orejas son cortas y redondeadas. Esta especie de nutria se caracteriza por su rinario angosto y en forma de corona, su larga cola es ancha en la base y de forma oval. Tiene patas cortas con membranas interdigitales bien desarrolladas y de plantas desnudas. Presentan un pelaje suave y fino, compuesto de dos capas que lo aíslan del agua; el pelo es de color café oscuro a rojizo pálido en el dorso y más claro ventralmente, especialmente en el área de la garganta donde va de un blanco plateado a un blanco amarillento. Los machos de *Lontra longicaudis* son 20-25 % más grandes que la hembra (Larivière 1999; Ceballos y Oliva 2005; Gómez-Nisino 2006).

La nutria neotropical esta presente desde el noroeste de México hasta la Argentina septentrional (Figura 2). En México habita en las vertientes de ambas planicies costeras, en regiones tropicales, húmedas y secas (Figura 2); abarca hábitats desde el nivel del mar hasta los 1,700 m de altitud (Larivière 1999; Soler 2004; Ceballos y Oliva 2005). Habita en ríos, arroyos, lagos, presas, lagunas costeras y canales de irrigación; siempre con una amplia vegetación riparia que le ofrece refugio.

Los individuos de nutria neotropical son generalmente solitarios, aunque es posible observarlos en parejas durante la época reproductiva o en grupos de una hembra con sus crías. Mantienen una activa comunicación con otras nutrias mediante marcas olfativas, depositando sus excretas en lugares visibles, secos y cercanos a los cuerpos de agua como rocas y troncos. Su actividad es esencialmente diurna, pero pueden presentar actividad nocturna especialmente cerca de las poblaciones humanas. Se alimentan principalmente de crustáceos, peces, insectos, anfibios, pequeños reptiles, aves y en ocasiones fibra vegetal. (Soler 2004)

Aunque suelen aparearse a lo largo de todo el año, la reproducción ocurre principalmente en primavera, época en la cual el macho y la hembra permanecen juntos algunos días (Gómez-Nisino 2006). La gestación dura entre 50 y 60 días, naciendo de 1 a 5 crías, siendo la camada más frecuente de 2 a 3 crías. La hembra cuida y enseña a cazar a las crías hasta que son independientes al año de vida (Larivière 1999, Ceballos y Oliva 2005; Gómez-Nisino 2006).

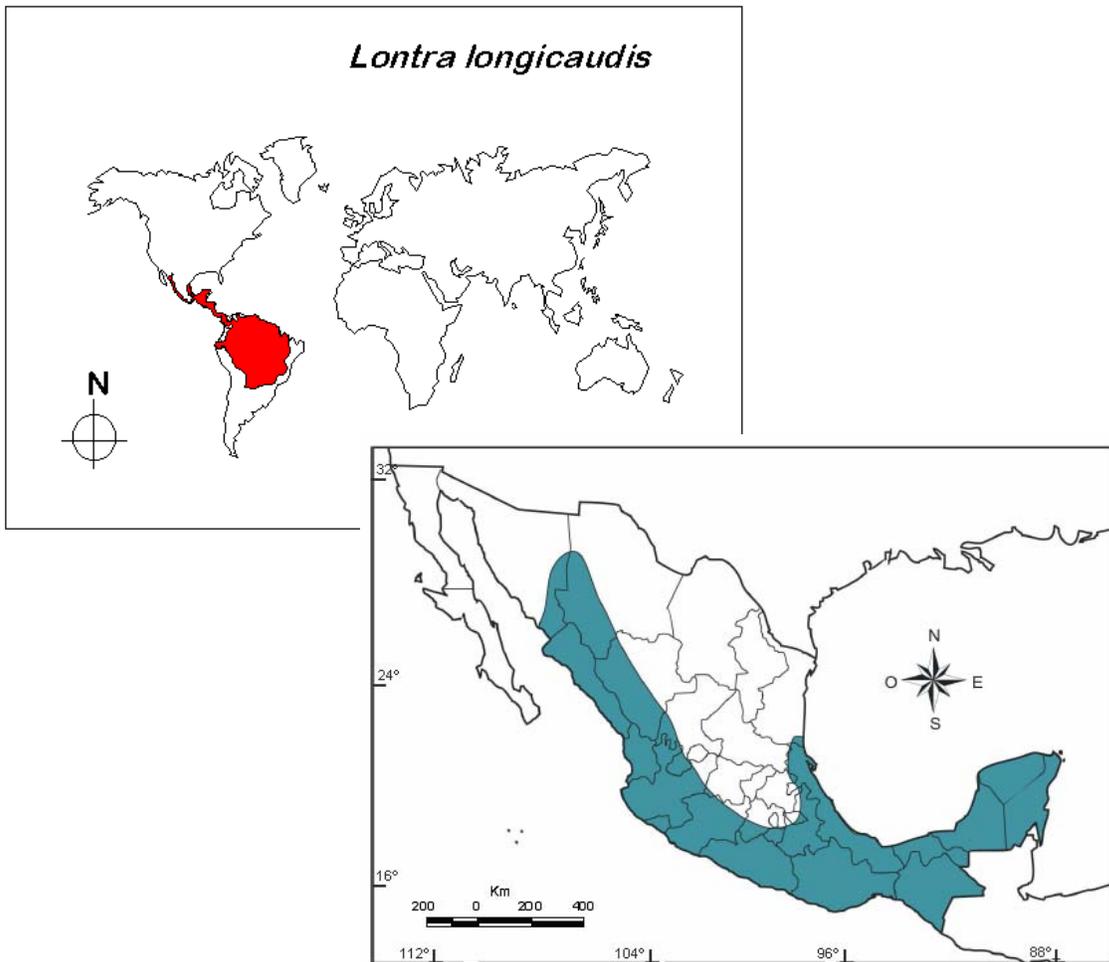


Fig. 2. Distribución actual de *Lontra longicaudis* en el mundo (Sanchez *et al.* 1998) y en México (modificado de Ceballos y Oliva 2005).

Debido a que esta especie depende del hábitat dulceacuícola y de la vegetación abundante, su población se ha visto afectada por la contaminación y destrucción de dicho hábitat. Otros factores importantes que han reducido las poblaciones de nutrias son la captura y la venta de las crías como mascotas; así como la caza furtiva, ya que su piel es muy apreciada en la peletería (Larivière 1999). De acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2001, *Lontra longicaudis* se encuentra como amenazada. Además de encontrarse en el apéndice I de la CITES; la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza la considera como vulnerable pero con datos insuficientes (Soler 2004; Gómez-Nisino 2006 CONABIO 2008A; UNEP-WCM 2008).

2.2 Área de estudio: Reserva de la Biósfera de Montes Azules

La Reserva de Montes Azules se localiza en la región de la Selva Lacandona al sureste de Chiapas (Figura 3), con una superficie total de 331,200 ha; y un gradiente altitudinal que va de los 200 msnm en el Río Lacantún a 1,500 msnm en la región norte de la Reserva. La precipitación anual registrada es de 2,500 a 3,500 mm. La temperatura media anual varía de 24 a 26 °C, con temperaturas mínimas y máxima de 14 y 36 °C respectivamente (INE 2000).

La Selva Lacandona se encuentra dentro del sistema Grijalva-Usumacinta, el de mayor extensión de México. Su escurrimiento medio anual es de 85 billones de m³ de agua. La Reserva se ubica en la cuenca del Río Lacantún, que a su vez, junto con los Ríos Jataté ó Colorado y Lacanjá son sus límites naturales. Existen cuerpos de agua de diferentes extensiones, originados por las condiciones particulares de solubilidad de la roca caliza al formar oquedades que son alimentadas por corrientes de agua subterránea, conformando lagos de origen cárstico y dolinas. En la zona norte del área se localiza el complejo lagunar formado por las lagunas Ojos Azules, Yanqui, Ocotal y El Suspiro; siendo las lagunas Miramar y Lacanjá las de mayores dimensiones (INE 2000). Los suelos, de tonalidades negras, se caracterizan por ser delgados con porciones orgánicas de texturas finas y medias. Las formaciones que predominan son rocas calizas (Arriaga *et al.* 2000; INE 2000). En Montes Azules la mayor parte de la vegetación original corresponde a las selvas alta y mediana perennifolia. Existiendo otros tipos de vegetación como los palmares, que se asocian a los dos tipos de selvas anteriores; el bosque de pino-encino; la vegetación riparia; el jimbal; las sabanas; y el bosque mesófilo de montaña, que se encuentra escasamente representado en pequeños manchones en la región noroeste de la Reserva (Castillo-Campos y Narave 1992; García-Gil y Lugo 1992).

Montes Azules, como parte de la Selva Lacandona, es reconocido como la región con mayor diversidad biológica de México. En esta reserva se encuentra el 27% del total de los mamíferos del país, representados por 114 especies (Medellín 1994; INE 2000). Las aves sobresalen con el 30% del total del país, 341 especies, con representantes como el águila arpía (*Harpia harpyja*) y la guacamaya roja (*Ara macao*). También se encuentran 112 especies de peces, 54 de reptiles y 23 de anfibios. Los invertebrados son de los menos conocidos, solamente se tiene un registro de 1,135 especies. En esta región se han descrito 3,400 especies de plantas (INE 2000).

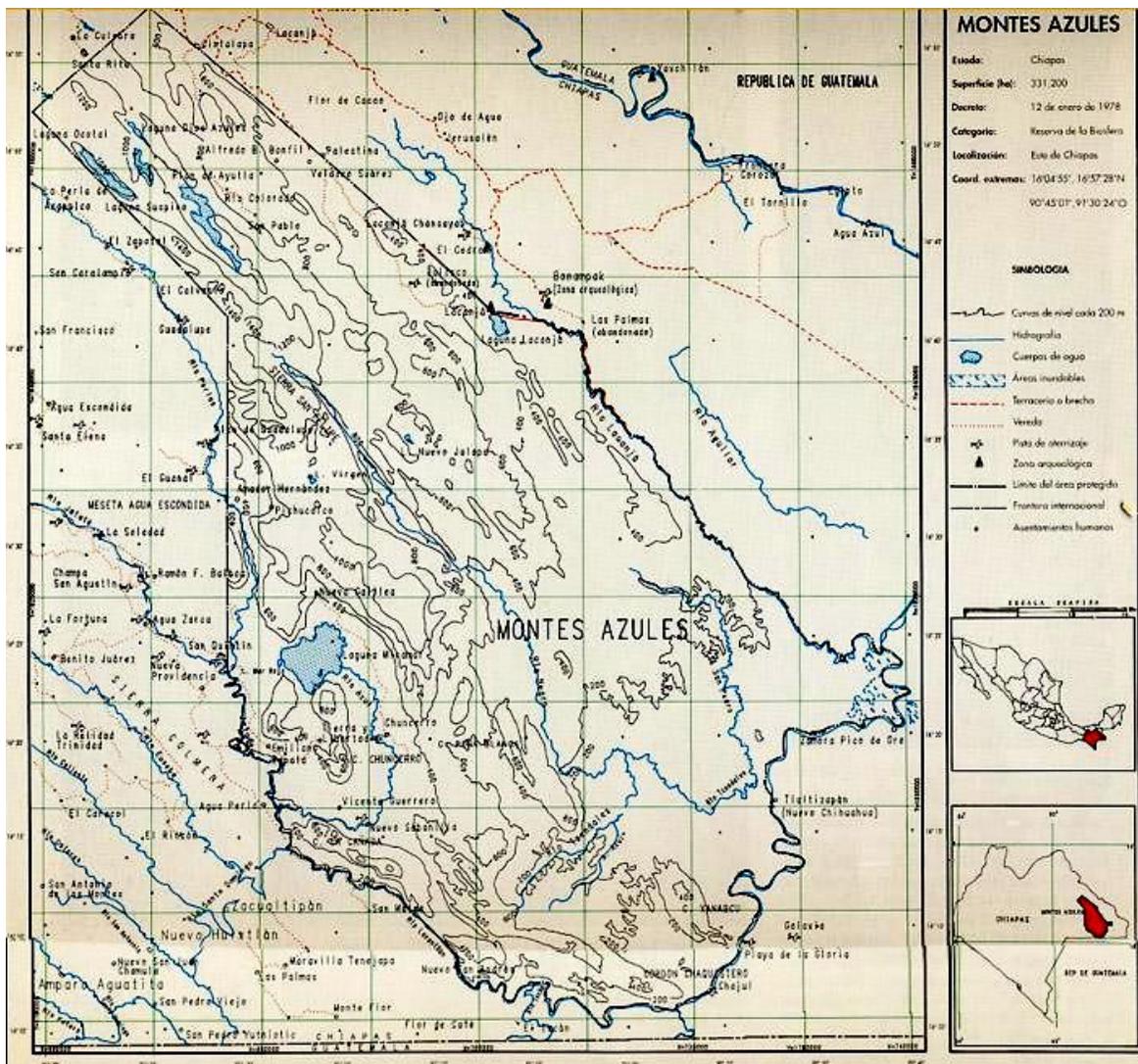


Fig. 3. Localización de la Reserva de la Biósfera Montes Azules en Chiapas, México. (INE 2008).

Actualmente, la reserva de Montes Azules está considerada como críticamente amenazada. Por ello se requieren de soluciones urgentes para asegurar la protección y mantenimiento de su diversidad biológica. Los estudios más recientes señalan que las mayores amenazas son los problemas de tenencia de la tierra, las invasiones, los incendios, la deforestación, el cambio de uso de suelo y el tráfico de especies silvestres (Arriaga *et al.* 2000).

2.3 Diversidad y estructura genética en las nutrias

Mediante la medición de la diversidad genética y la aplicación de diversos modelos, la genética de poblaciones investiga la relación entre las características demográficas de las poblaciones y la distribución de la variación genética dentro y entre éstas, permitiendo hacer inferencias sobre la biología de las especies (Sunnucks 2000). La diversidad genética es la variedad de alelos y genotipos presentes en el grupo de estudio; ésta se ve influenciada en tiempo y espacio por factores como la mutación, selección natural, flujo genético, sistema de apareamiento, tamaño poblacional y deriva genética. Su importancia a largo plazo es la posibilidad de adaptación de las poblaciones a los cambios ambientales, y a corto plazo, el mantenimiento de la capacidad reproductiva (Sunnucks 2000; Johnson *et al.* 2001; Frankham *et al.* 2002). Existen diferentes maneras de medir, directa o indirectamente, la diversidad genética en las poblaciones como: alelos deletéreos, proteínas, loci en ADN n , ó ADN mt (Frankham *et al.* 2002). Los análisis moleculares basados en la utilización del ADN mt se enfocan en la identificación de especies, así como en el estudio de relaciones filogeográficas; mientras que aquellas que utilizan el ADN n buscan determinar parámetros poblacionales, principalmente aquellos que son requeridos por la genética de poblaciones (Taberlet *et al.* 2001; Frankham *et al.* 2002). Como ya mencionamos, dentro de los marcadores para ADN n , los microsatélites son los mas utilizados; éstos son repeticiones en tandem de segmentos cortos de ADN, típicamente de una a seis bases de largo. Usualmente la longitud del locus de un microsatélite varía entre 5 y 40 repeticiones, pero puede haber un mayor número de éstas; las repeticiones de dinucleótidos, trinucleótidos y tetranucleótidos son las más comúnmente utilizadas en los estudios moleculares (Frankham *et al.* 2002; Selkoe y Toonen 2006). Además de las ventajas ya antes mencionadas, al ser fragmentos cortos, es posible obtener amplificaciones de los microsatélites a partir de ADN parcialmente degradado proveniente de muestras no invasivas (Taberlet *et al.* 2001; Frankham *et al.* 2002; Waits y Paetkau 2005; Selkoe y Toonen 2006).

En las muestras no invasiva, como pelos o excretas, la cantidad de ADN disponible para los análisis es muy baja y se encuentra parcialmente degradado (Taberlet *et al.* 1999). En el caso de las excretas, no sólo se encuentra presente ADN de la especie de interés, sino que existe ADN de sus presas y de bacterias, así como una gran cantidad de inhibidores del PCR. Estas circunstancias dan origen a dos tipos de errores durante los análisis: los alelos nulos y los errores de lectura. En el primer caso, sólo uno de los alelos de un individuo heterocigoto es detectado, produciendo un

falso homocigoto. Esto puede surgir debido al polimorfismo presente en las regiones flanqueantes de los primers utilizados durante el PCR, lo cual provoca que sólo los alelos que tengan una mayor semejanza con los primers usados amplifiquen; otra posible causa es la amplificación preferencial de los alelos cortos en ADN degradado. En el segundo caso, la generación de falsos alelos durante el PCR, los cuales pueden ser interpretados como verdaderos alelos, puede generar el registro de alelos inexistentes o al ocurrir esto en un individuo homocigoto, éste puede ser registrado como heterocigoto. Pese a que la generación de falsos alelos ocurre en menos del 5% de las amplificaciones, no se debe ignorar su efecto en los resultados. El “stuttering” o tartamudeo, es otro error de lectura, éste consiste en la generación de fragmentos de ADN que son una o varias veces más pequeños que el alelo real, produciendo numerosas bandas que dificultan la adecuada lectura de los resultados (Chapuis y Estoup 2007). Para evitar estos errores, especialmente los alelos nulos, es recomendable realizar cuantificaciones del ADN presente en la muestra. Pero, ante el hecho de que en las excretas se encuentra una gran cantidad de ADN ajeno a la especie de interés, se deben realizar repeticiones para detectar dichos errores (Taberlet *et al.* 1999; Taberlet *et al.* 2001; Piggott y Taylor 2003; Waits y Paetkau 2005). Otra forma de disminuir la frecuencia de los alelos nulos es incrementando el rango de éxito en las amplificaciones, optimizando el protocolo de muestreo y almacenamiento de las muestras para reducir la degradación del ADN durante estos procesos. Aunque ningún método ha sido considerado superior, diferentes estudios concluyen que la mejor forma de almacenar las excretas, disminuyendo la degradación del DNA, son el secado de éstas con sílica y su posterior almacenamiento a -20°C , preservándolas en etanol o en buffer DETs (Johnson *et al.* 2001; Waits y Paetkau 2005).

Aún con estas dificultades, las muestras no invasivas representan la mejor opción para la realización de estudios genéticos en especies de carnívoros cuya captura, para la obtención de muestras de sangre o tejido, representa un riesgo para éstas o implica un alto costo dada la dificultad que implica capturarlos (Taberlet *et al.* 2001). Además, mediante el uso de dichos métodos es posible incrementar el número de animales incluidos en el muestreo, principalmente en especies elusivas como las nutrias, haciendo más factible la estimación de parámetros poblacionales (Taberlet *et al.* 1999; Hájková *et al.* 2007).

En los últimos años se han comenzado a realizar estudios de carácter genético para conocer el estado de las poblaciones de diversas especies de nutrias, siendo los microsatélites los marcadores más frecuentemente usados. Éstos han sido utilizados para analizar principalmente

muestras no invasivas como excretas, pelos, tejido de museo e incluso tejido obtenido de animales atropellados en las carreteras. La finalidad de los análisis realizados ha ido desde el estudio de la diversidad genética, determinación del flujo genético, la dispersión y la estructura genética, hasta estimar tamaños poblacionales y analizar programas de traslocación o de reintroducción (Jansman *et al.* 2001; Dallas *et al.* 2002; Arrendal *et al.* 2004; Ferrando *et al.* 2005; Zemanova *et al.* 2005; Anderson *et al.* 2006; Hobbs *et al.* 2006; Kalz *et al.* 2006; Prigioni *et al.* 2006). Sin embargo, dichos estudios están enfocados en su mayoría a la nutria euroasiática *Lutra lutra* y en la nutria marina *Enhydra lutris*; aunque actualmente han surgido estudios con *Lontra canadensis*. Para la realización de esta gran variedad de estudios, sobre todo aquellos que involucran el manejo de las poblaciones, es indispensable realizar análisis para determinar la diversidad genética, así como la estructura genética, presente dentro y entre las poblaciones de nutrias.

Los resultados obtenidos para *Lutra lutra* en Europa indican que a pesar de ser genéticamente variable posee un número de alelos por locus considerablemente menor que los niveles de variabilidad normalmente reportados para microsatélites, el rango típico de alelos por locus en microsatélites es de 5 a 10 (Frankham *et al.* 2002), mientras que en Europa se ha encontrado un promedio de 2.1 – 6.17 alelos por locus (Tabla 1). Además, las poblaciones de *L. lutra* en Europa no presentan una diferenciación geográfica fuerte, lo que sugiere un origen reciente a partir de una población común, posiblemente como efecto de la recolonización post glaciación. Sin embargo, algunas poblaciones locales muestran signos de divergencia genética, tal vez debido a la fragmentación y recientes cuellos de botella; particularmente notable en el sur de Italia, la cual presenta una clara diferenciación respecto al resto de Europa (Dallas *et al.* 1999; Pertoldi *et al.* 2001; Dallas *et al.* 2002; Randi *et al.* 2005; Hájková *et al.* 2007).

Aguilar *et al.* (2008) reporta niveles muy bajos de diversidad genética en la nutria marina (*Enhydra lutris*), con 2.2 alelos por locus y un polimorfismo de 0.56 (14 de 25 microsatélites). Mostrando signos de cuellos de botella recientes, así como un pequeño tamaño efectivo poblacional. Para el caso de *Lontra canadensis*, Blundell *et al.* (2002) reporta 3.0 – 4.4 alelos por locus, mientras que un reciente estudio realizado por Latch *et al.* (2008) muestra un número de alelos por locus de 5.25 – 6.75.

Finalmente, el único trabajo hasta ahora realizado sobre la diversidad genética de *Lontra longicaudis* indica que ésta posee una baja diversidad genética respecto a otros mustélidos, pero mayor a la reportada para otras especies de nutrias; siendo reportados para la nutria neotropical 12 haplotipos, una diversidad nucleotídica de 0.0049 y una diversidad haplotípica de 0.818. No se

encontró una divergencia genética significativa ($F_{ST} = 0.0511$, $p=0.1113$) entre las poblaciones estudiadas (Trinca *et al.* 2007).

Los proyectos con *Lutra lutra*, *Lontra canadensis* y *Enhydra lutris* continúan, y los resultados obtenidos ven frutos en el desarrollo de programas de conservación que incluyen reintroducciones y traslocaciones. Sin embargo, las otras 10 especies de nutrias (Anexo 1) no han sido beneficiadas por estudios de este tipo, de manera que sus poblaciones no sólo son víctimas de las amenazas conocidas sino del desconocimiento del estado de sus poblaciones, datos necesarios para el diseño de acciones realmente efectivas para su conservación.

Tabla 1. Comparación de la diversidad genética en diversas especies de nutrias.

ADN MITOCONDRIAL					
REFERENCIA	ESPECIE	REGIÓN ADN _{mt}	HAPLOTIPOS	DIVERSIDAD HAPLOTÍPICA	DIVERSIDAD NUCLEOTÍDICA
Effenberger y Suchentrunk 1999	<i>L. lutra</i>	Región control Citocromo B	3 1	-	0.0044
Ferrando <i>et al.</i> 2004	<i>L. lutra</i>	Región control 361pb	7	0.16	0.0006
Ketmaier y Bernardini 2005	<i>L. lutra</i>	Región control 249pb 134pb	4 7	-	-
Arrendal <i>et al.</i> 2005	<i>L. lutra</i>	-	2	-	-
Trinca <i>et al.</i> 2007	<i>L. longicaudis</i>	Región control 516pb	12	0.8188	0.0049
MICROSATÉLITES					
REFERENCIA	ESPECIE	ALELOS POR LOCUS		HETEROCIGOSIDAD	
Arrendal <i>et al.</i> 2005	<i>L. lutra</i>	2.50 – 6.17		0.60	
Dallas <i>et al.</i> 1999	<i>L. lutra</i>	2.1 – 5.3		0.26 – 0.75	
Pertoldi <i>et al.</i> 2001	<i>L. lutra</i>	3.1 – 3.9		-	
Dallas <i>et al.</i> 2002	<i>L. lutra</i>	2.1 – 5.3		0.26 – 0.72	
Blundell <i>et al.</i> 2002	<i>L. canadensis</i>	3.0 – 4.4		0.38 – 0.51	
Ferrando <i>et al.</i> 2007	<i>L. lutra</i>	3.5 - 5.0		0.60	
Hajková <i>et al.</i> 2007	<i>L. lutra</i>	4.12 – 4.68		0.51 – 0.55	
Latch <i>et al.</i> 2007	<i>L. canadensis</i>	5.25 – 6.75		0.53 – 0.62	

3. OBJETIVOS

- ✎ Determinar la diversidad genética de *Lontra longicaudis* en el Río Lacantún y cinco de sus afluentes mediante la utilización de microsatélites.
- ✎ Evaluar la estructura genética de *Lontra longicaudis* en los sitios muestreados.

4. HIPÓTESIS

- ✎ Debido a la capacidad de carga que ofrece la Reserva de la Biósfera Montes Azules para mantener una población de *Lontra longicaudis*, se espera encontrar una diversidad genética semejante a la reportada para otras especies de nutrias sin efectos considerables por endogamia o deriva genética.
- ✎ Habrá baja estructuración genética entre los afluentes, resultado del fuerte flujo genético permitido por el complejo sistema hidrológico característico de la zona de estudio.

5. MÉTODOS

5.1 Obtención de muestras



Fig. 4. Localización de los afluentes en los cuales se realizó la colecta de excretas en 2000 y 2007, ubicados al sur de la Reserva de la biósfera de montes Azules, Chiapas,

De marzo a abril de 2007 se obtuvieron muestras de excretas de *L. longicaudis* en el río Lacantún y tres de sus principales afluentes: el río Colorado o Jataté, arroyo Miranda y arroyo José. Todos ellos ubicados dentro de la Reserva de la Biosfera de Montes Azules. En cada uno de los afluentes se realizaron dos trayectos de 10 kilómetros desde la boca del afluente. Debido a que en el río Lacantún confluye con el resto de los afluentes, los trayectos se realizaron a lo largo del fragmento existente entre los puntos de contacto de los tributarios con el río Lacantún. Durante los recorridos se buscaron letrinas de *L. longicaudis*, cada una de las cuales fueron marcadas y geoposicionadas. En los casos en los que se encontraron muestras frescas, éstas se colocaron cuidadosamente en tubos para centrífuga de 50ml, etiquetados y previamente preparados con sílica gel. Tras colectar la muestra, la letrina fue limpiada con agua para evitar que los restos de excretas viejas contaminasen muestras posteriores. 57 muestras colectadas entre 1999 y 2000 fueron donadas al presente trabajo por Soler (2004). Estas muestras fueron colectadas en el arroyo Miranda, el arroyo José, el arroyo Lagartos y el río Tzendales; permitiendo incrementar el número de sitios muestreados (Figura 4).

5.2 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de todas las muestras colectadas se utilizó el kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del proveedor. La integridad del ADN se observó por medio de geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio a 0.5 µg/ml y visualizados con luz UV (Figura 5).

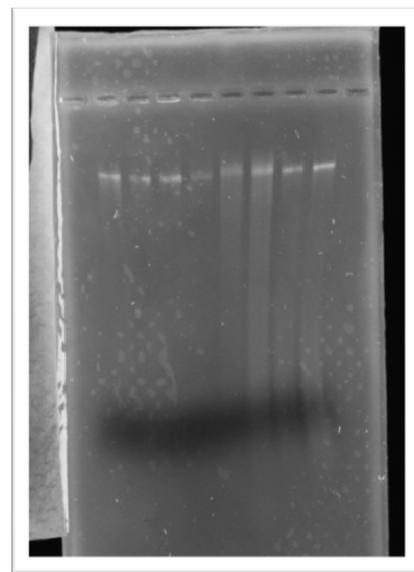


Fig. 5. Extracción de ADN de excreta de *L. longicaudis*, fotografía de gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV.

5.3 Amplificación y lectura de microsatélites

Se estandarizaron ocho loci de microsatélites (Tabla 2) diseñados previamente para *L. canadensis* (Beheler *et al.* 2004 y 2005). En todas las amplificaciones se utilizó un control negativo a base de agua bidestilada para asegurar que no hubiera contaminación durante la amplificación. Además, para asegurar que las condiciones de amplificación se mantuvieran entre experimentos se utilizó como control positivo el DNA obtenido de excretas frescas de un individuo de *L. longicaudis* del Zoológico de Chapultepec, Distrito Federal, México. Todos los microsatélites fueron estandarizados bajo las mismas condiciones, el PCR se realizó en un volumen de reacción de 20µl usando un “touchdown”. Se utilizaron 4µl de ADN, 0.3mM de dNTP’s, 0.5µM de cada primer, 1x Buffer, 2mM MgCl₂, 2.5x BSA y 1U FlexiTaQ (PROMEGA). Los productos de PCR se observaron en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio a 0.5 µg/ml y visualizados con luz UV.

Para su lectura, los primers “forward” de cada locus fueron marcados en su extremo 5’ con el Dye 6-FAM. Los productos amplificados fueron leídos en un secuenciador ABI Prism 3100.

Tabla 2. Microsatélites diseñados para *L. canadensis* (Beheler *et al.* 2004; Beheler *et al.* 2005) y estandarizados para su amplificación en *L. longicaudis*.

LOCUS	No. Acceso GeneBank	Motivo	Rango de alelos (pb)	Número de alelos
RIO 02	AY268052	(TC) ₉ (AC) ₁₂ (GA) ₄	184-198	7
RIO 04	AY268054	(GT) ₅ (GT) ₁₅	255-273	11
RIO 07	AY268057	(AC) ₂₁	167-177	6
RIO 08	AY268058	(TG) ₁₅	204-214	6
RIO 10	AY268060	(CT) ₄ (AC) ₁₇	243-259	12
RIO 11	AY833262	(AC) ₁₄	156 - 168	8
RIO 13	AY833264	(GT) ₂₀	254 - 274	5
RIO 16	AY833267	(GT) ₁₄	266 - 280	4

5.4 Análisis estadísticos

5.4.1 Diversidad genética

La proporción de loci polimórficos (P) y el promedio del número de alelos por locus (A) fueron obtenidos usando el programa GDA (Lewis y Zaykin 2001). Además de éstos parámetros, la heterocigosidad observada es otra forma de medir la variación genética presente en una población, ya que ésta no sólo refleja el número de alelos presentes sino las combinaciones existentes en la población; por esta razón, Nei (1978) se refiere a la heterocigosidad como la riqueza génica. Asimismo, la heterocigosidad es una buena medida de la respuesta de una población a la selección natural, deriva genética y endogamia. La heterocigosidad observada (H_o) y la esperada (H_e) de acuerdo a Levene (1949) se estimaron usando PopGene (Yeh y Boyle 1997).

El principio de Hardy-Weinberg es un modelo teórico de la genética de poblaciones que nos permite describir las características genéticas de una población al asumir que no existen factores que causen cambios genéticos de una generación a otra, es decir, no hay efecto de las fuerzas evolutivas en la población; diciéndose que esta en Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW). Los supuestos de éste modelo incluyen el apareamiento al azar, un tamaño poblacional infinito, no mutación ni migración, y que todos los individuos de la población tienen la misma probabilidad de reproducirse y dejar descendencia, es decir, que no haya selección natural. Por lo que la desviación de una población respecto al EHW nos indica la presencia de alguna de estos procesos evolutivos (Allendorf y Luikart 2007). Dicha desviación se estimo en los 8 loci utilizados mediante el programa GenePop v. 4.0 (Rousset 2008). Para verificar su significancia, a los valores p obtenidos, se les aplico la corrección de Bonferroni secuencial. La corrección de Bonferroni se realizó debido a que la probabilidad de tener un Error de Tipo I (falso positivo) se incrementa conforme aumenta el número de comparaciones pareadas, problema que se puede evitar siendo mas conservador en cada una de las comparaciones; es decir, reduciendo el nivel de α en cada una de las comparaciones nos aseguramos que la significancia del total de las comparaciones se mantiene a un nivel predeterminado. El nivel de significancia de cada comparación depende del número de pruebas realizadas; conforme mayor es el número de pruebas, menor debe ser el nivel de significancia (Pagamo y Gauvrear 2000; McKillup 2006).

Utilizando el mismo programa, GenePop v. 4.0, se obtuvo el coeficiente de endogamia (F_{IS}) para cada locus según Weir y Cokerham (1984).

Se realizó una prueba para estimar el desequilibrio de ligamiento de todos los pares de loci, con la finalidad de verificar la presencia de loci ligados entre sí. La probabilidad de desequilibrio de ligamiento fue evaluada mediante una prueba exacta de Fisher, utilizando cadenas de Markov. La significancia de la probabilidad (valor p) fue verificada con la corrección de Bonferroni secuencial. Dicho análisis también se realizó en GenePop v.4.0. Con el mismo software se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas para cada afluente y para todo el conjunto de muestras.

Finalmente, se utilizó el software Bottleneck (Cornuet y Luikart 1996) para detectar si la población de nutrias presentes en la zona de estudio ha sufrido un cuello de botella reciente, es decir, una reducción en el tamaño efectivo de la población $0.2 - 4N_e$ generaciones atrás (Cornuet y Luikart 1996). Dicho análisis se realizó para todo el conjunto de muestras y para cada año por separado. A partir del número de alelos observados, del tamaño de las muestras, y bajo el supuesto del equilibrio entre mutación y deriva genética; es posible estimar la heterocigosidad esperada en una población en el equilibrio (H_{eq}). Si la H_{eq} es igual a la heterocigosidad registrada, la población no ha sufrido un cuello de botella reciente. Sin embargo, si ésta es mayor a la H_{eq} , el equilibrio mutación-deriva ha sido roto e indica la presencia de un cuello de botella reciente. Este exceso de heterocigosidad es provocado debido a que el número de alelos se pierde más rápidamente que ésta, ya que durante los cuellos de botella los alelos raros se pierden rápidamente teniendo poco efecto en la heterocigosidad (Cornuet y Luikart 1996).

Para la estimación de H_{eq} es importante el modelo mutacional utilizado; el modelo de mutación de dos fases (TPM, "two phased model of mutation") considera tanto al modelo de paso a paso (SMM, "stepwise mutation model") como al modelo de alelos infinitos (IAM, "infinite allele model"), además es el más recomendable para microsatélites (Cornuet y Luikart 1996). Para determinar la presencia de cuellos de botella recientes se estimó la H_{eq} con el modelo de TPM, bajo dos supuestos diferentes; el primero con 90% SMM y 10% IAM. El segundo con 70% SMM y 30% IAM (valores *default*). Para probar si la diferencia entre la H_e y la H_{eq} era significativa, se realizó una prueba de Wilcoxon de una cola para exceso de heterocigosos.

5.4.2 Estructura genética

Los estadísticos F de Wright son los parámetros más utilizados para describir la estructura genética de una población, es decir, la distribución de la variación genética entre demes o subpoblaciones. Éstos son una medida del déficit de heterocigos respecto a los esperados bajo las proporciones de Hardy-Weinberg (H-W), es decir, nos muestran la proporción de la reducción en la heterocigosidad respecto a la heterocigosidad esperada en una población con las mismas frecuencias alélicas pero con reproducción al azar. Tres son los estadísticos F: F_{IS} , F_{ST} y F_{IT} . F_{IS} es una medida de la desviación existente entre las subpoblaciones respecto a las proporciones de Hardy-Weinberg (H-W):

$$F_{IS} = 1 - (H_O / H_S)$$

Donde H_O es el promedio de la heterocigosidad observada en todas las subpoblaciones, y H_S es el promedio de la heterocigosidad esperada en todas las subpoblaciones. Si F_{IS} es positivo indica un déficit de heterocigos y si es negativo, un exceso.

F_{ST} es una medida de la divergencia genética entre poblaciones:

$$F_{ST} = 1 - (H_S / H_T)$$

Donde H_T es la heterocigosidad esperada en toda la población bajo los supuestos de H-W. F_{ST} va de valores cercanos a cero cuando todas las subpoblaciones muestran frecuencias alélicas iguales, a uno cuando todas las subpoblaciones están fijadas para diferentes alelos.

F_{IT} es la medida de la desviación total respecto a las proporciones de H-W, dentro y entre las poblaciones (Allendorf y Luikart 2007):

$$F_{IT} = 1 - (H_O / H_T)$$

Estos tres estadísticos fueron calculados utilizando GenePop v. 4.0 (Rousset 2008) según Weir y Cockerham (1984). También se estimaron los F_{ST} pareados entre cada uno de los afluentes para conocer la divergencia genética existente entre ellos mediante el programa Arlequin v. 3.1 (Excoffier *et al.* 2005). De igual manera se obtuvo la R_{ST} pareada, ésta es un análogo de la F_{ST} , desarrollado por Slatkin (1995), que se define como la proporción de variación en el tamaño de los alelos debido a la diferencia existente entre las poblaciones. Este estadístico asume un modelo mutacional de paso a paso (SMM), por lo que se le considera como un índice de divergencia genética mas adecuado para microsatélites; los cuales presentan un modelo mutacional mas semejante al SMM que al IAM utilizados en los estadísticos F (Slatkin 1995).

$$R_{ST} = (\hat{S} - S_w) / \hat{S}$$

Donde \hat{S} es el promedio de la diferencia cuadrada entre todos los pares de copias de alelos y S_w es el promedio de la suma de cuadrados de las diferencias de los tamaños de los alelos. En ambos casos, se determinó la significancia del valor obtenido mediante 1023 permutaciones.

El número efectivo de migrantes totales se estimó mediante alelos privados en GenePop, mientras que el número efectivo de migrantes por generación entre pares de poblaciones (M) se calculó en Arlequín, a partir de R_{ST} y F_{ST} . Para organismos diploides $M = 2N_e m$, siendo:

$$M = (1 - F_{ST})/2F_{ST} \quad \text{y} \quad M = (1 - R_{ST})/2R_{ST}$$

Para determinar la fuente de variación se realizó en Arlequín un análisis de varianza molecular (AMOVA) de todos los afluentes, este análisis realiza una partición de la varianza total en componentes de covarianza dados por las diferencias entre poblaciones y entre individuos dentro de las poblaciones. Los componentes de varianza se utilizan para calcular los índices de fijación; su significancia se obtiene utilizando una prueba no paramétrica de permutación de genotipos entre poblaciones, $p < 0.05$ y 10,100 permutaciones (Excoffier *et al.* 2005).

Se realizó una prueba de asignación en GeneClass 2 (Piry *et al.* 2004) utilizando el algoritmo de Paetkau *et al.* (1995), el cual calcula la frecuencia esperada de los genotipos de cada individuo en cada una de las poblaciones, asignando posteriormente a los individuos a aquella población donde la frecuencia esperada de su genotipo es mayor. Asimismo, se realizó un análisis factorial de correspondencias (AFC) para obtener una mejor visualización de la distribución de los individuos respecto al afluente de origen, dicho análisis se efectuó en Genetix v. 4.03 (Belkhir *et al.* 1996 - 2004)

Finalmente se analizó la presencia de alelos nulos mediante el software MicroChecker v. 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004) utilizando el estimador de Brookfield 1 (Brookfield 1996), el cual se recomienda utilizar cuando se encuentran una o dos bandas en todas las muestras, es decir, todas las muestras amplifican. El efecto de los alelos nulos en F_{ST} fueron evaluados en FreeNa (Chapuis y Estoup 2007) mediante la corrección ENA (Excluding Null Alleles) que calcula F_{ST} a partir de una base de datos previamente realizada, en la cual aquellos loci con presencia de alelos nulos poseen correcciones en las frecuencias de homocigos.

6. RESULTADOS

Se amplificaron con 8 microsátélites un total de 99 muestras de excretas de *L. longicaudis*, 42 se obtuvieron en los recorridos realizados por cuatro afluentes de Montes Azules en el 2007 (Figura 7) y 57 fueron donadas por Soler (2004) previamente (Tabla 3).

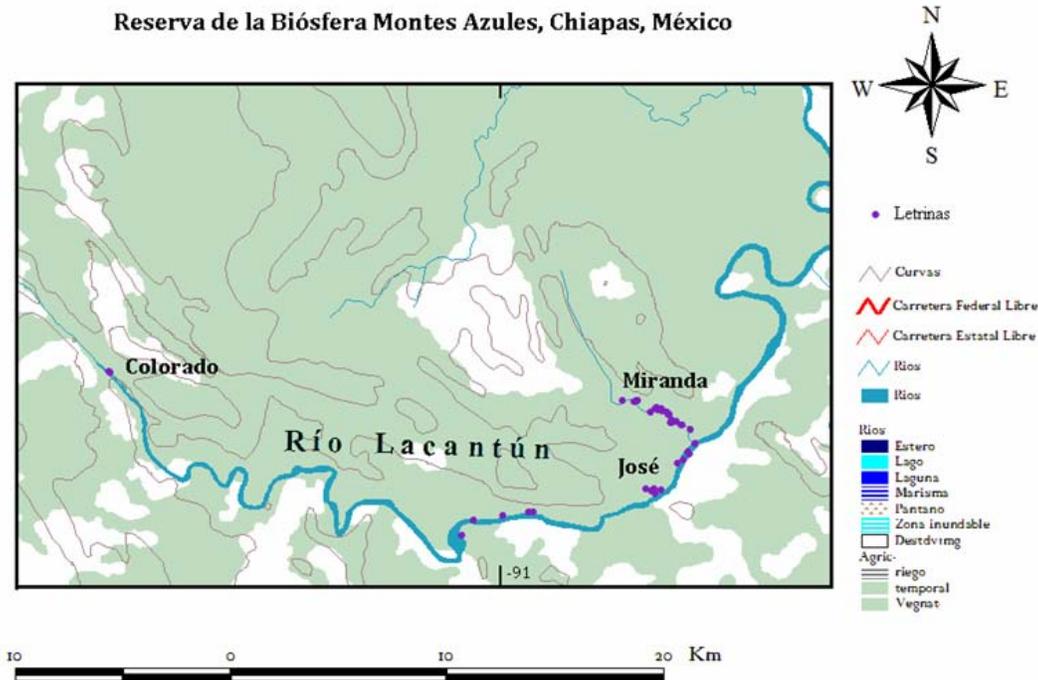


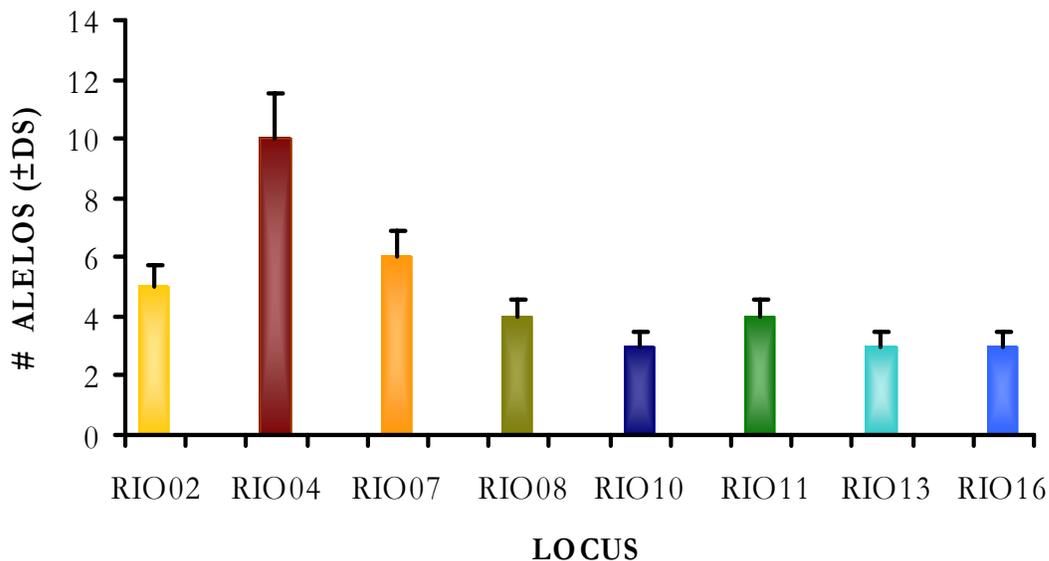
Fig. 7. Ubicación de las muestras obtenidas en el 2007, en cuatro afluentes de Montes Azules: río Colorado, río Lacantún, arroyo Miranda y arroyo José.

Tabla 3. Número de muestras obtenidas por afluente y por año. Se indica con *nm* los afluentes no muestreados.

Afluente	1999 - 2000	2007	Total
Miranda	18	20	38
Lacantún	<i>nm</i>	14	14
José	12	4	16
Colorado	<i>nm</i>	4	4
Lagartos	15	0	15
Tzendales	12	<i>nm</i>	12

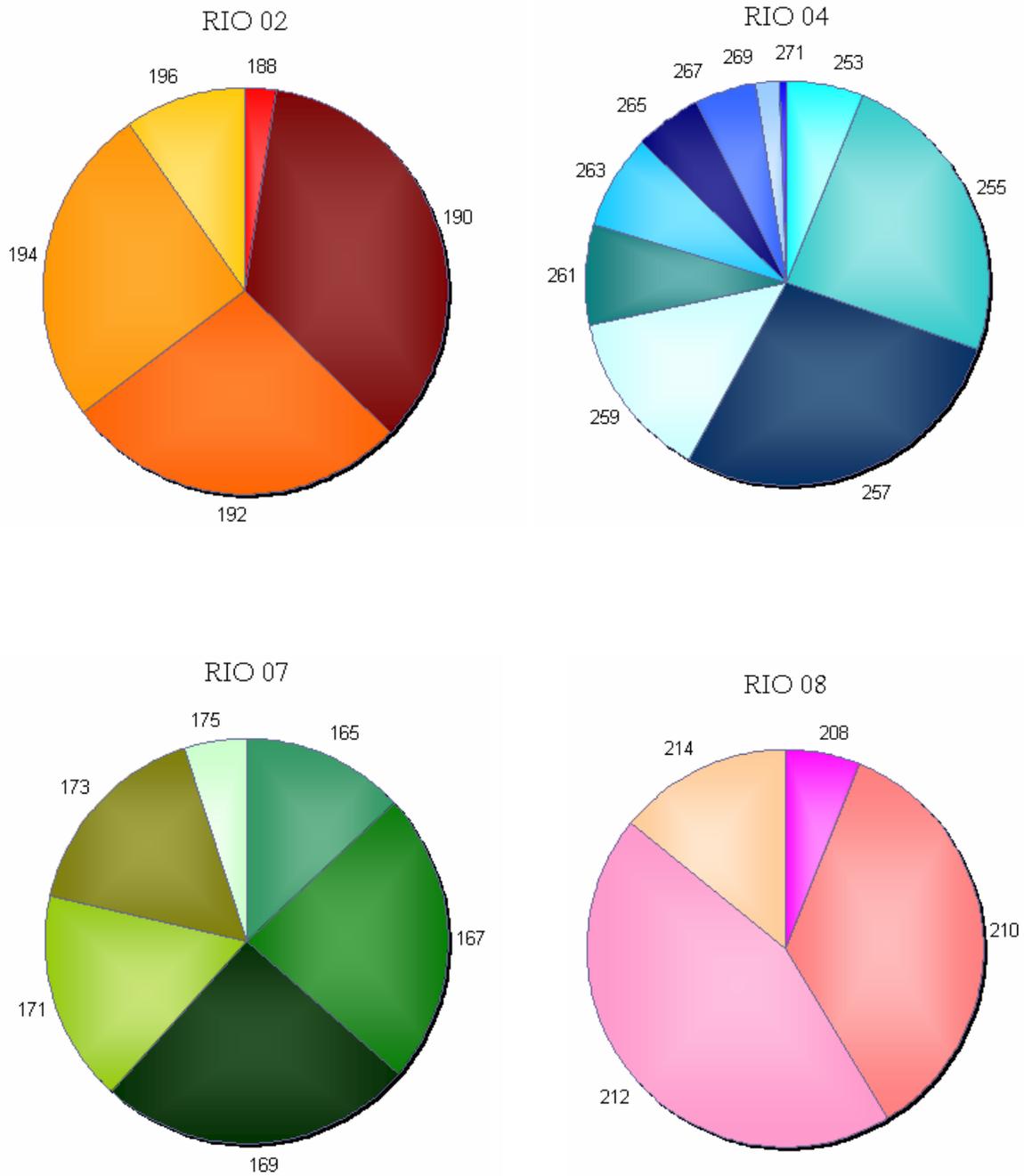
6.1 Diversidad genética

Los 8 loci utilizados fueron polimórficos, registrándose un total de 38 alelos y un promedio de 4.75 ± 2.37 alelos por locus (A). El locus más polimórfico fue RIO 04 con 10 alelos, mientras que RIO 10, RIO 13 y RIO 16 presentaron tan solo 3 alelos (Gráfica 1). La mayoría de los alelos se encontraron presentes en todos los afluentes, a excepción del alelo 271 de RIO 04; el cual sólo se registro en el río Tzendales. Las frecuencias alélicas totales se muestran en las Gráficas 2a y 2b, las frecuencias alélicas por afluente y totales se indican en el Anexo 2. Se encontraron un total de 95 genotipos para los 8 loci utilizados (Anexo 3), variando entre 5 y 30 genotipos por locus. Presentando RIO 10 tan sólo 5 genotipos, mientras que en RIO 04 se encontraron 30. El porcentaje de genotipos heterocigos fue del 50% al 73%, con un promedio de $60.25 \pm 7.76\%$.

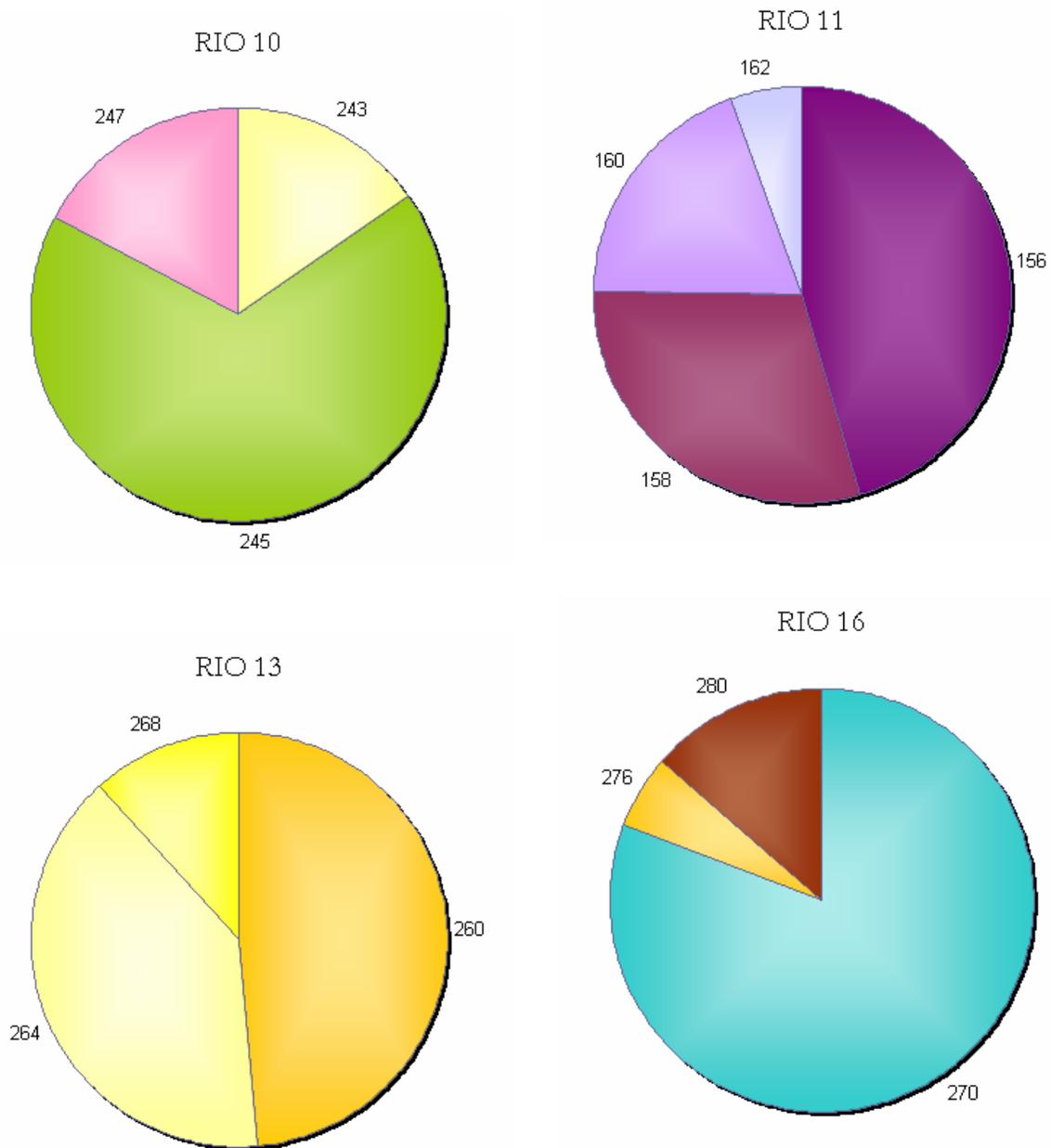


Gráfica 1. Número de alelos presentes en cada locus. Las barras muestran el número de alelos encontrados en cada uno de los loci utilizados. Siendo el menor número de alelos 3 y 10 el mayor.

La heterocigosidad observada se encontró entre 0.26 y 0.73, siendo menor a la heterocigosidad esperada según Levene (1949); con un rango de 0.33 - 0.83. Respecto al Equilibrio de Hardy-Weinberg, sólo tres loci se encontraron en equilibrio (RIO 10, RIO 13 y RIO 16). El resto de los loci mostraron una desviación respecto al EHW por una deficiencia de heterocigos, exceptuando RIO 10 que mostró un exceso de heterocigos (Tabla 4). De las 28 combinaciones posibles entre los 8 microsatélites, no se observó ningún desequilibrio por ligamiento significativo (Anexo 3).



Gráfica 2a. Frecuencias alélicas encontradas en los locus RIO 02, RIO 04, RIO 07 y RIO 08 para el total de las muestras obtenidas. Los números indicados representan el tamaño de los alelos encontrados en cada caso.



Gráfica 2b. Frecuencias alélicas encontradas en los locus RIO 10, RIO 11, RIO 13 y RIO 16 para el total de las muestras obtenidas. Los números indicados representan el tamaño de los alelos encontrados en cada caso.

Tabla 4. Tamaño de muestra por locus (n) y número de alelos por locus. Equilibrio de Hardy-Weinberg y F_{IS} según Weir y Cockerham (1984). En negritas se muestran los valores significativos de p tras la corrección de Bonferroni. Heterocigosidad observada (Ho) y esperada según Levene (He) por afluente y totales.

		RIO02	RIO04	RIO07	RIO08	RIO10	RIO11	RIO13	RIO16	TODOS
n		99	99	99	99	99	99	99	99	99
Alelos		5	10	6	4	3	4	3	3	38
EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG										
<i>p</i>		0.001	0.000	0.000	0.000	0.064	0.003	0.160	0.089	
F_{IS}		0.131	0.122	0.241	0.294	-0.047	0.139	0.049	0.167	
HETEROCIGOSIDAD										
Afluente										
Lacantún	Ho	0.643	0.857	0.571	0.071	0.428	0.571	0.571	0.143	0.48 ± 0.26
	He	0.743	0.878	0.778	0.606	0.593	0.518	0.500	0.140	0.59 ± 0.23
Miranda	Ho	0.710	0.684	0.632	0.500	0.474	0.579	0.579	0.263	0.55 ± 0.14
	He	0.702	0.813	0.815	0.701	0.412	0.685	0.547	0.313	0.62 ± 0.18
José	Ho	0.437	0.750	0.812	0.500	0.437	0.500	0.500	0.312	0.53 ± 0.16
	He	0.796	0.814	0.790	0.619	0.458	0.704	0.627	0.377	0.65 ± 0.17
Colorado	Ho	0.500	0.750	0.250	0.750	1.000	0.250	1.000	0.250	0.59 ± 0.32
	He	0.678	0.857	0.893	0.750	0.679	0.536	0.571	0.250	0.65 ± 0.20
Lagartos	Ho	0.667	0.600	0.467	0.533	0.600	0.733	0.467	0.467	0.57 ± 0.10
	He	0.738	0.770	0.761	0.689	0.515	0.687	0.653	0.439	0.66 ± 0.12
Tzendales	Ho	0.667	0.833	0.667	0.583	0.583	0.583	0.583	0.167	0.58 ± 0.19
	He	0.706	0.811	0.841	0.627	0.598	0.746	0.648	0.420	0.67 ± 0.13
TODOS	Ho	0.636	0.727	0.616	0.465	0.515	0.576	0.566	0.263	0.54 ± 0.14
	He	0.732	0.828	0.811	0.657	0.492	0.668	0.595	0.328	0.64 ± 0.17

Al considerar todas las muestras juntas se encontró evidencia de cuellos de botella en la población muestreada. Sin embargo, al realizar la prueba para cada año por separado no se encontraron resultados significativos ($p \leq 0.05$ con corrección de Bonferroni) para la presencia de un cuello de botella reciente (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de heterocigosidad (H_e) y heterocigosidad en equilibrio (H_{eq}) obtenidos en la prueba de cuellos de botella. En negritas se indican los valores de p significativos tras la corrección de Bonferroni.

	90% SMM, 10% IAM			70% SMM, 30% IAM		
	He	H_{eq}	D.S.	He	H_{eq}	D.S.
TODAS						
RIO 02	0.732	0.618	0.108	0.732	0.557	0.137
RIO 04	0.828	0.809	0.047	0.828	0.773	0.065
RIO 07	0.811	0.680	0.089	0.811	0.624	0.116
RIO 08	0.657	0.530	0.133	0.657	0.473	0.157
RIO 10	0.492	0.408	0.159	0.492	0.356	0.177
RIO 11	0.668	0.536	0.131	0.668	0.475	0.157
RIO 13	0.595	0.407	0.159	0.595	0.354	0.178
RIO 16	0.327	0.413	0.156	0.327	0.354	0.176
	<i>p</i> = 0.0098			<i>p</i> = 0.0039		
99/00						
RIO 02	0.723	0.636	0.104	0.723	0.586	0.126
RIO 04	0.757	0.822	0.046	0.757	0.792	0.056
RIO 07	0.796	0.695	0.082	0.796	0.648	0.105
RIO 08	0.662	0.555	0.124	0.662	0.490	0.152
RIO 10	0.495	0.422	0.156	0.495	0.379	0.169
RIO 11	0.717	0.545	0.125	0.717	0.492	0.151
RIO 13	0.626	0.425	0.158	0.626	0.375	0.169
RIO 16	0.442	0.424	0.157	0.442	0.375	0.176
	<i>p</i> = 0.0976			<i>p</i> = 0.0059		
2007						
RIO 02	0.735	0.651	0.094	0.735	0.597	0.123
RIO 04	0.885	0.811	0.046	0.885	0.778	0.063
RIO 07	0.795	0.708	0.075	0.795	0.667	0.098
RIO 08	0.648	0.564	0.124	0.648	0.514	0.148
RIO 10	0.493	0.433	0.155	0.493	0.386	0.169
RIO 11	0.534	0.564	0.119	0.534	0.515	0.144
RIO 13	0.540	0.433	0.153	0.540	0.386	0.170
RIO 16	0.136	0.437	0.152	0.136	0.397	0.165
	<i>p</i> = 0.1250			<i>p</i> = 0.0371		

6.2 Estructura genética

Los estadísticos F de Wright (1931) se muestran en la Tabla 6. Los loci RIO 07 y RIO 08 presentaron los valores más altos del valor de fijación de los individuos dentro de todos los afluentes ($F_{IS} = 0.242$ y $F_{IS} = 0.290$ respectivamente), mostrando una deficiencia de heterocigos. Por otro lado RIO 10 fue el único con un valor negativo ($F_{IS} = -0.047$) y por ende, con un exceso de heterocigos. La mayoría de los loci presentaron valores no significativos ($p \leq 0.05$) de F_{ST} . En la Tabla 7 se pueden observar los valores obtenidos de F_{ST} y R_{ST} para cada par de afluentes, todos ellos son bajos; yendo desde 0 (valores negativos) hasta 0.018 en el caso de la F_{ST} y de 0 - 0.12 para R_{ST} . La R_{ST} muestra una diferenciación genética significativa ($p \leq 0.05$) entre el arroyo José y el río Lacantún, así como entre el arroyo Lagartos respecto al Lacantún. La F_{ST} también fue significativa ($p \leq 0.05$) para la pareja del río Lacantún y el arroyo José.

Tabla 6. Estadísticos F según Weir y Cockerham (1984).

LOCUS	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
RIO 02	0.131	0.002	0.130
RIO 04	0.125	0.013	0.114
RIO 07	0.242	0.004	0.239
RIO 08	0.290	-0.028	0.309
RIO 10	-0.047	0.001	-0.048
RIO 11	0.138	-0.003	0.141
RIO 13	0.056	0.027	0.030
RIO 16	0.164	-0.013	0.175
Todos	0.145	0.002	0.144

El número absoluto de migrantes efectivos por generación (M), que es igual a $2N_e m$ en organismos diploides, obtenido a partir de F_{ST} y R_{ST} se muestran en la Tabla 8. Todos los valores obtenidos fueron mayores a 1 (3.6 - Inf.), sin embargo, debido a que algunos valores de F_{ST} y R_{ST} eran negativos o equivalentes a cero, el número de migrantes efectivos por generación estimado es infinito. Por otra parte, el número de migrantes obtenidos entre todos los afluentes, calculado a

partir del método de los alelos privados y después de una corrección por tamaño de muestra generada por GenePop v. 4.0 (Rousset 2008), fue de 4.6 migrantes efectivos por generación ($2N_e m$).

Tabla 7. Valores de F_{ST} (bajo la diagonal) y R_{ST} (sobre la diagonal) por cada par de afluentes. En negritas se marcan los valores significativos ($p < 0.05$).

	Miranda	Lacantún	José	Colorado	Lagartos	Tzendaes
Miranda	0	0.0506	0.0259	-0.0159	0.0135	-0.0078
Lacantún	0.0182	0	0.1201	0.0232	0.1225	0.0764
José	0.0172	0.017	0	0.0326	-0.0168	-0.0237
Colorado	-0.0013	-0.0197	0.0149	0	0.0035	0.0054
Lagartos	0.0011	0.0192	-0.0091	-0.0059	0	-0.0153
Tzendaes	-0.0034	0.0185	-0.0182	0.0026	-0.0135	0

Tabla 8. Valores del número efectivo de migrantes por generación ($2N_e m$) calculados a partir de F_{ST} (bajo la diagonal) y R_{ST} (sobre la diagonal) por cada par de afluentes.

	Miranda	Lacantún	José	Colorado	Lagartos	Tzendaes
Miranda	-	9.4	18.8	Inf.	36.5	Inf.
Lacantún	26.8	-	3.7	21.0	3.6	6.0
José	28.6	17.0	-	14.8	Inf.	Inf.
Colorado	Inf.	Inf.	32.9	-	143.4	91.5
Lagartos	455.9	25.5	Inf.	Inf.	-	Inf.
Tzendaes	Inf.	26.4	Inf.	194.4	Inf.	-

El análisis de varianza molecular (AMOVA) para todas las muestras mostró que el porcentaje de variación entre afluentes es muy baja (2.8%), encontrándose la mayor parte de la variación (97.2%) dentro de los afluentes (Tabla 8).

Tabla 8. Componentes del análisis de varianza molecular (AMOVA).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje De variación
Entre poblaciones	515.24	1.58	2.8%
Dentro de las poblaciones	10584.34	55.13	97.2%
Total	11099.58	56.71	

Los resultados del análisis de asignación mostraron que no hay una clara diferencia entre los afluentes, ya que las muestras fueron asignadas en su mayoría a afluentes diferentes al de origen (Tabla 9). Teniendo un porcentaje de asignación al lugar de origen de 28.57% a 36.86% para el caso del arroyo Miranda, arroyo José y río Lacantún; de 8.33% para el río Tzendales y de 0% para el río Colorado y el arroyo Lagartos. Teniendo una probabilidades de asignación de 18.6 - 25.9%. El análisis factorial de correspondencias (AFC) muestra mas claramente la baja o nula estructuración genética presente en la zona de estudio (Figura 6a).

Tabla 9. Análisis de asignación, se muestra el porcentaje de individuos que fueron asignados al afluente de origen y el tamaño de muestra (n).

Origen	Miranda	Lacantún	José	Colorado	Lagartos	Tzendales
n	38	14	16	4	15	12
	36.84	28.57	31.25	0	0	8.33

Al realizar el análisis factorial de correspondencias (AFC) para todas las muestras en función del año de colecta, se obtuvo una clara diferencia entre éstas; indicando la existencia de diferencias en las frecuencias entre los años muestreados (Figura 6b). Sin embargo, dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$).

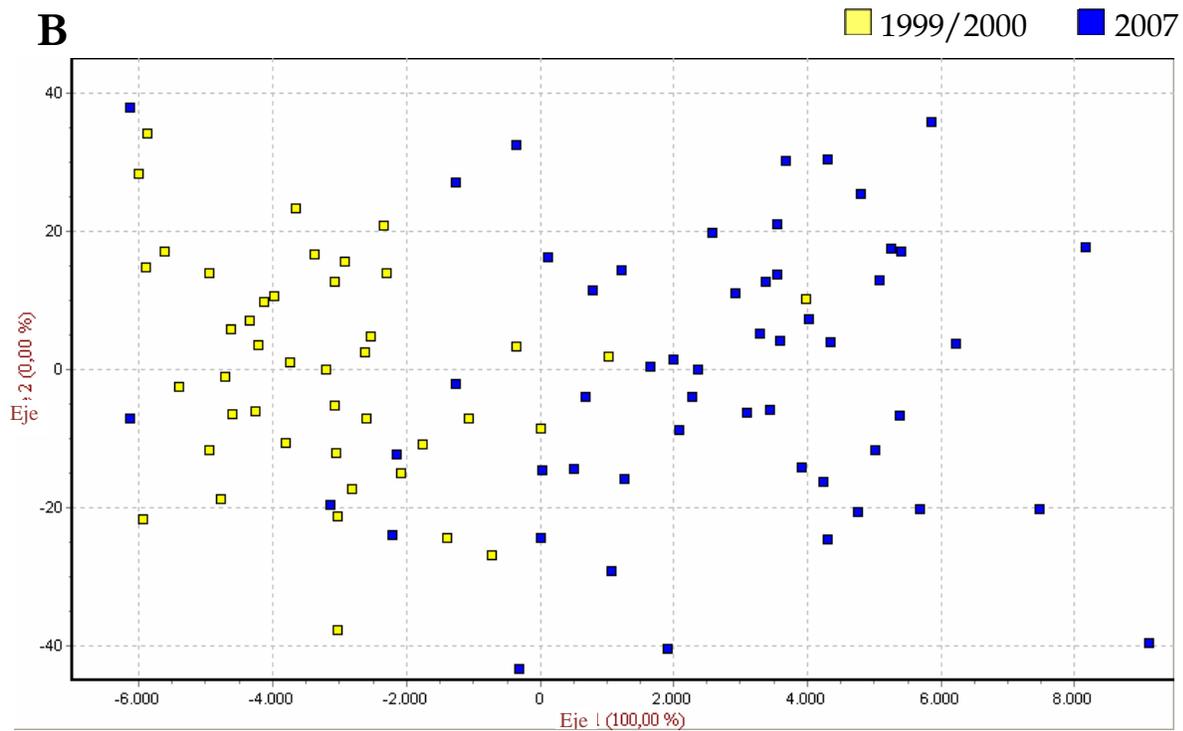
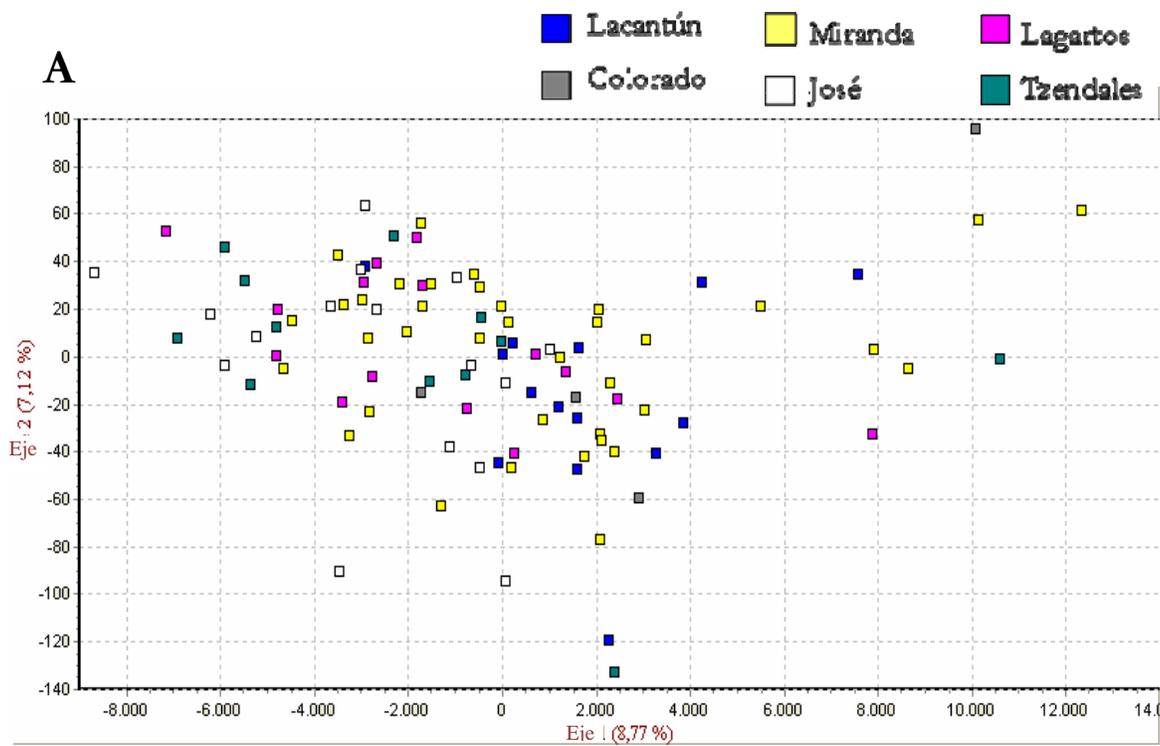


Fig. 6. Análisis Factorial de Correspondencias. A) Entre los afluentes en que fueron colectadas las muestras. B) Entre años de colecta.

Los resultados obtenidos para analizar la presencia de alelos nulos nos muestran que de acuerdo al estimador de Brookfield (1996), éstos si se encuentran presentes (Tabla 10); afectando a cuatro de los ocho microsatélites utilizados (RIO 02, RIO04, ROI 07 y RIO 08). Sin embargo, sólo en dos de éstos (RIO 07 y RIO 08) cuando se realiza el análisis por separado de acuerdo al año de colecta. Por otro lado, las comparaciones entre las F_{ST} estimadas con alelos nulos y aquellas obtenidas tras la corrección de ENA para la presencia de estos, muestran que no hay una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los valores obtenidos con o sin corrección.

Tabla 10. Alelos nulos, frecuencias de los alelos nulos de acuerdo al estimador de Brookfield (1996). F_{ST} con y sin corrección ENA (Chapuis y Estoup 2007). La presencia de alelos nulos se indica con una ✓, y con un ✕ se indican los loci en los que no se encontraron alelos nulos.

LOCUS	Alelos nulos			Frecuencia	F_{ST} sin ENA	F_{ST} con ENA
	99/00	2007	Todas			
RIO 02	✕	✕	✓	0.053	0.0017	0.0109
RIO 04	✕	✕	✓	0.053	0.0128	0.0117
RIO 07	✓	✓	✓	0.105	0.0037	0.0033
RIO 08	✓	✓	✓	0.114	-0.0278	-0.0170
RIO 10	✕	✕	✕	-0.017	0.0014	0.0036
RIO 11	✕	✕	✕	0.053	-0.0027	0.0007
RIO 13	✕	✕	✕	0.016	0.0269	0.0315
RIO 16	✕	✕	✕	0.039	-0.0126	0.0041
Todos	-	-	-	-	0.0015	0.0064

7. DISCUSIÓN

Los ocho microsatélites utilizados fueron polimórficos; no obstante, a excepción de RIO 07 que presentó el mismo número de alelos que los reportados, en todos los loci se encontró un número menor de alelos que el reportado (Beheler *et al.* 2004; Beheler *et al.* 2005); con una diferencia de sólo uno o dos alelos. En RIO 10 se encontraron 3 alelos, mientras que Beheler *et al.* (2004) reporta 12. Todos los loci se encontraron dentro de los rangos reportados (Beheler *et al.* 2004; Beheler *et al.* 2005). Esta diferencia en el número de alelos puede surgir no sólo por diferencias en las poblaciones mismas, sino debido a que dichos microsatélites fueron diseñados para *Lontra canadensis*, que divergió de *Lontra longicaudis* hace aproximadamente 1.2 millones de años (Kruuk 2006). Así, las diferencias encontradas no representan un problema para la utilización de estos microsatélites en estudios con *L. longicaudis*.

Pese a lo anterior, la diversidad genética encontrada en la nutria neotropical fue mayor a la reportada para otras especies de nutrias, lo cual concuerda con lo encontrado por Trinca *et al.* (2007) en Brasil usando ADNm. Además de la alta diversidad genética encontrada, no se encontró la presencia de un cuello de botella reciente en la población de nutrias localizadas en el sitio de estudio. Sin embargo, la distribución de *L. longicaudis* es muy amplia y no se deben generalizar estos resultados a toda el área, ya que ambos estudios fueron realizados en sitios relativamente bien conservados: la selva Lacandona y la selva Amazónica. Por lo cual es indispensable la realización de estudios genéticos en un mayor número de sitios a lo largo de la distribución de *L. longicaudis* para tener un conocimiento más integral de su estado de conservación.

Otra medida de la variación genética es la heterocigosidad, la cual fue alta en la mayoría de los casos (0.26 - 0.73). Así mismo, no se encontró una diferencia significativa entre la heterocigosidad esperada y la observada ($p \leq 0.05$); reforzando la idea de que la población de nutrias en Montes Azules no tiene efectos considerables de la endogamia y la deriva genética. No obstante, cinco de los ocho loci utilizados se encontraron fuera del Equilibrio de Hardy-Weinberg. Estos desequilibrios pueden deberse a la presencia de alelos nulos, al flujo genético o el efecto Wahlund; puntos que se discuten a mayor profundidad posteriormente.

Pese a que no se encontró una estructura genética, los resultados obtenidos son muy interesantes. Tanto los valores pareados de F_{ST} y R_{ST} obtenidos fueron igualmente bajos (0 - 0.018 y 0 - 0.12 respectivamente), siendo significativos ($p \leq 0.05$) sólo en uno y dos casos respectivamente: Lacantún vs. José para ambos estadísticos, y Lagartos vs. Lacantún sólo para R_{ST} . Sin embargo, esta

diferencia poblacional no es tal, muy probablemente resulta de la diferencia temporal en las frecuencias alélicas de las muestras; ya que todas las muestras del Lacantún fueron obtenidas en el 2007, mientras que todas las muestras del Lagartos y la mayor parte de las pertenecientes al José se obtuvieron en 1999/2000.

La falta de estructura genética es reforzada por la prueba de asignación y el AFC; en la primera, tan sólo el 24.2% de todas las muestras fue asignado a su afluente de origen. Dicha asignación fue realizada con tan sólo 18.6 - 25.9% de probabilidad de asignación. Y en el caso del AFC, la falta de una estructuración es muy evidente (Fig. 6). Como principal causal de la falta de estructuración se encuentra el flujo genético, el cual es tan fuerte que permite a las nutrias muestreadas actuar como una población panmíctica. De acuerdo con la regla de "Un migrante por generación" propuesta por Wright (1931), un migrante efectivo por generación es suficiente para evitar la diferenciación poblacional; sin embargo, Mills y Allendorf (1996) y Wang (2004) consideran que debido a los supuestos que implica el modelo propuesto por Wright, que rara vez coinciden con las poblaciones naturales, un migrante por generación es un mínimo aceptable y sugieren un máximo de diez migrantes efectivos como máximo; esto debido a que un fuerte flujo genético tiende a homogenizar la diversidad genética. Por ello, las poblaciones divididas pierden rápidamente su variabilidad intra-subpoblacional, pero retienen una mayor variación inter-subpoblacional que las poblaciones panmícticas (Lacy 1987).

Así, en la población de *L. longicaudis* estudiada se encontró un número efectivo de migrantes muy elevado, indicándonos el grado tan intenso de flujo genético presente en la zona; lo cual coincide con el complejo sistema hidrológico presente en la selva Lacandona, donde además de los ríos y arroyos principales existen numerosos arroyos secundarios y de escorrentía, que permiten a las nutrias tener en Montes Azules una distribución bidimensional casi uniforme y no sólo unidimensional como se esperaría en un animal acuático.

Sin embargo, los resultados obtenidos en cuanto a estructura genética y número efectivo de migrantes se deben interpretar con cautela, pues se pueden generar graves errores. Por ello es indispensable considerar tres factores muy importantes: Primero, el número efectivo de migrantes no es una función lineal de F_{ST} , por lo que la estimación de $N_e m$ a partir de éste puede generar grandes alteraciones en los resultados, debido a que los errores en la estimación de F_{ST} se ven amplificados al estimar $N_e m$; por lo cual, el intervalo de confianza para la estimación de $N_e m$ debe ser muy grande cuando los valores de F_{ST} son cercanos a 0.2, como es en la mayoría de los casos (Whitlock y McCauley 1999). Segundo, aunque algunos investigadores han encontrado una

correlación negativa entre la capacidad de dispersión de las especies y la estructura poblacional, o visto de otra forma, una correlación positiva entre la capacidad de dispersión y el flujo genético; existen marcadas diferencias entre la dispersión y el flujo genético. La estimación de la dispersión mediante estudios de campo está limitado en tiempo y espacio, mientras que la estructura genética es reflejo de miles de generaciones, además, dicha estructuración no sólo es afectada por el flujo genético sino por la historia evolutiva y demográfica de las poblaciones (Bohonak 1999). Así, el flujo genético estimado no es el actual sino el “promedio” del flujo genético a lo largo de muchas de generaciones.

Tercero, y muy importante para efectos de conservación, el número de migrantes efectivos estimados (N_{em}) no equivale ni al tamaño poblacional (N) ni al tamaño efectivo poblacional (N_e). Es decir, el que se haya encontrado un N_{em} de 26.4 o de 146.4 no significa que físicamente existan esa cantidad de nutrias; dicho valor es sólo una estimación para conocer el grado de diferenciación poblacional.

Se encontró la presencia de alelos nulos en cuatro de los ocho loci utilizados, no obstante, no tuvieron un efecto significativo en la estimación de F_{ST} ; posiblemente debido a que la F_{ST} no es afectada cuando no hay una estructura genética, pese a que los alelos nulos tienden a provocar una sobreestimación de ésta (Chapuis y Estoup 2007). Sin embargo, en su trabajo realizado con *Habromys simulatus*, Castañeda (2008) no encuentra un efecto significativo de los alelos nulos en la estimación de F_{ST} pese a tener una estructura genética bien marcada entre sus poblaciones muestreadas.

Al analizar el conjunto de muestras por separado de acuerdo a su año de colecta, se encontraron alelos nulos en tan sólo dos de los ocho loci, RIO 07 y RIO 08 (Tabla 10). Estos resultados, semejantes a lo sucedido con el análisis de cuello de botella, y observando los patrones obtenidos en el AFC nos sugieren la presencia del efecto Wahlund. El efecto Wahlund establece que al mezclarse dos o más poblaciones con diferentes frecuencias alélicas, la población resultante de dicha mezcla presenta una deficiencia de heterócigos (Hedrick 2000). Así, la diferencia en las frecuencias alélicas entre las muestras colectadas en diferentes años genera un efecto Wahlund al ser analizadas en conjunto; afectando tanto los resultados de alelos nulos como de cuello de botella. Esto nos indica la cautela con la que los datos deben ser interpretados, pues aunque no parezca muy grande una diferencia de siete años, el método de muestreo o el constante movimiento de los individuos puede generar errores en la interpretación y posterior aplicación de la información, sobre todo cuando involucra a especies amenazadas como la nutria neotropical.

Retomando los resultados obtenidos en la prueba del equilibrio de Hardy-Weinberg, donde cinco loci se encontraron en desequilibrio. Dos de éstos, RIO 07 y RIO 08, presentaron alelos nulos; lo cual podría explicar su desequilibrio. Por otro lado, RIO 11 puede deber su desequilibrio al efecto Wahlund, ya que al realizar la prueba por separado para cada año de colecta (no reportado), este locus se encontró en Equilibrio de Hardy-Weinberg. Los otros dos loci, RIO 02 y RIO 04 pueden estar siendo afectados por el flujo genético presente en la zona. Respecto al flujo genético, que también podría estar afectando a los otros tres loci (RIO 07, RIO 08 y RIO 11), hay que recordar que para la prueba del Equilibrio de Hardy-Weinberg se utilizó a todas las muestras como una sola población por lo que el flujo genético causante del desequilibrio no es aquel que ocurre entre los afluentes muestreados, sino entre éstos y otros afluentes cercanos. Lo cual no resulta extraño, pues el río Lacantún tiene contacto tanto con ríos provenientes de Guatemala como con ríos que desembocan en el Golfo de México.

Finalmente, en cuanto a la conservación de la nutria neotropical en la Reserva de la Biósfera Montes Azules, debido a la capacidad de carga ofrecida por los afluentes presentes en la reserva y al ser uno de los mayores remanentes del bosque tropical perennifolio (Medellín 1994), es posible la existencia de una población de nutria neotropical genéticamente sana, es decir, sin efectos considerables por endogamia y deriva genética. Y debido a que existe una correlación positiva entre la diversidad genética y el tamaño efectivo poblacional (Montgomery *et al.* 2000), el nivel de diversidad genética encontrada en el sitio de estudio nos sugiere un tamaño poblacional de *L. longicaudis* grande, sin embargo, el alto flujo genético disminuye considerablemente la pérdida de variación genética incluso en poblaciones pequeñas, haciendo la cantidad de diversidad genética independiente del tamaño poblacional (Lacy 1987). Ante esta situación, es difícil saber si la alta diversidad genética encontrada es el resultado de una población grande, del fuerte flujo genético o de la combinación de ambas. Pero sin duda, el flujo genético juega un papel fundamental en la zona, por lo que la conservación del río Lacantún resulta indispensable al funcionar como un importante corredor que permite la dispersión de las nutrias entre diferentes afluentes, incluso muy probablemente con poblaciones localizadas en Guatemala.

8. CONCLUSIÓN

En la población de *L. longicaudis* en Montes Azules el flujo genético es fundamental para el mantenimiento de la diversidad genética. Siendo el río Lacantún un corredor fundamental para la dispersión de las nutrias, por lo que como ya se mencionó, su conservación es indispensable. No obstante, la conservación de este tipo de ríos es compleja dada la gran conectividad y extensión de los afluentes. Además, el río Lacantún es parte de la cuenca Grijalva-Usumacinta, la cual compartimos con Guatemala; y aunque el 79% de la longitud total de los afluentes que la conforman se encuentran en México, gran parte de ellos se originan en Guatemala y desembocan en ríos mexicanos, como por ejemplo, el río Ixcán proveniente de Guatemala que junto con el Colorado dan origen al Lacantún. De esta forma, la conservación del Lacantún implica el trabajo conjunto entre México y Guatemala, pues todo contaminante proveniente de Guatemala termina en nuestros ríos. Desafortunadamente, a diferencia del tratado con Estados Unidos, en las fronteras con Guatemala y Belice no existe un acuerdo firmado de por medio (CONAGUA 2008).

La conservación de los ríos debe estar ligada a los esfuerzos de conservación en tierra, ya que los cambios en el manejo de la tierra afectan directamente el bienestar de los ríos (Corkum 1999). Desgraciadamente, la baja eficiencia en el uso del agua, el crecimiento poblacional desproporcionado y la poca disponibilidad de agua han ocasionado que el recurso sea insuficiente en algunas zonas, que las fuentes de abastecimiento subterráneas estén sobreexplotadas y que en gran parte del país, la calidad natural del agua se haya deteriorado (CONAGUA 2008).

Al igual que para muchas otras especies en alguna categoría de riesgo, la realización de estudios sobre la diversidad y estructura genética de *L. longicaudis* a lo largo de su distribución es importante, ya que las condiciones de cada zona son diferentes; provocando una variación en la dinámica de los procesos evolutivos, debido no sólo a las cualidades intrínsecas de cada sitio (vegetación, sistemas hidrológicos, disposición de alimento, etc.) sino de su estado de conservación. Por lo cual, algunas poblaciones de *L. longicaudis* pueden verse más afectadas por la endogamia y la deriva genética que otras, presentando incluso un mayor grado de diferenciación genética. Siendo variables los requerimientos en cuanto a la genética de la conservación, y por ende el diseño de programas de manejo adecuado, es indispensable la obtención de información sobre la diversidad genética y los diferentes procesos implicados en la conservación de ésta; lo cual resulta indispensable para la conservación de la nutria neotropical. Sin embargo, más allá de los factores genéticos, la pérdida y fragmentación de los ambientes naturales, así como la

contaminación e incluso la persecución directa de las especies silvestres continúan siendo los principales factores que llevan a las especies en extinción. Por lo que el mantenimiento de los ambientes naturales es indispensable para la sobrevivencia de las especies, y ello depende del trabajo de cada uno de nosotros. Todos somos parte del mismo planeta, y como seres concientes tenemos la responsabilidad de ver por el bienestar de la enorme biodiversidad con la que tenemos la dicha de coexistir.

“Un PCR no puede amplificar el número de nutrias, pero si puede ayudar a conservarlas”

D a y a

9. REFERENCIAS

- Aguilar A, Jessup D, Estes J y Garza J (2008) The distribution of nuclear genetic variation and historical demography of sea otters. *Animal Conservation* 11(1): 35-45.
- Allendorf F y Luikart G (2007) Conservation and the Genetics of Populations. Blackwell Publishing, Reino Unido.
- Anderson H, McCafferty, Saccheri I, McCluskie A (2006) Non-invasive genetic sampling of the Eurasian otter (*Lutra lutra*) using hairs. *Hystrix Italian Journal of Mammalogy* 17(1): 65-77.
- Arrendal J, Walker C, Sundqvist, Hellborg L, Vilá C (2004) Genetic evaluation of an otter translocation program. *Conservation Genetics* 5: 79-88.
- Arrendal J, Vilá C, Björklund M (2005) Population structure of the Eurasian otter in Sweden through noninvasive genetic sampling. Paper presented at the European Otter Workshop, Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano, Italia, 20-23 octubre 2005.
- Arrendal J (2007) Conservation genetics on the Eurasian otter in Sweden. *Acta Universitatis Upsaliensis* 278: 11-43.
- Arriaga L, Aguilar J, Alcocer R, Jiménez E, Muñoz E, Vázquez Domínguez E (coordinadores) (1998) Regiones hidrológicas prioritarias. Escala de trabajo 1:4 000 000. 2ª. edición. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- Arriaga L, Espinoza J, Aguilar C, Martínez E, Gómez L, Loa E (coord.) (2000) Regiones terrestres prioritarias de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad, México.
- Arriaga L, Aguilar V, Alcocer J (2002) Aguas continentales y diversidad biológica de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad, México.
- Beheler A, Fike J, Murfitt L, Rhodes O, JR, Serfass T (2004) Development of polymorphic microsatellite loci for North American river otters (*Lontra canadensis*) and amplification in related Mustelids. *Molecular Ecology Notes* 4: 56-58.
- Beheler A, Fike J, Dharmarajan G, Rhodes O, JR, Serfass T (2005) Ten new polymorphic microsatellite loci for North American river otters (*Lontra canadensis*) and their utility in related mustelids. *Molecular Ecology Notes* 5: 602-604.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1996 - 2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

- Blundell G, Ben-David M, Groves P, Bowyers T, Geffen E (2002) Characteristics of sex-biased dispersal and gene flow in coastal river otters: implications for natural recolonization of extirpated populations. *Molecular Ecology* 11: 289-303.
- Bohonak A (1999) Dispersal, gene flow, and population structure. *The Quarterly Review of Biology* 74(1): 21-45.
- Bosch M, Marmi J, Ferrando A, López-Giráldez F, Andrés O, García-Franquesa E, Ponsá M, Kellermann T, Guallar B, Bisbal F, Domingo-Roura X (2005) Genotipar sin capturar. *Galemys* 7: 81-102.
- Brookfield J (1996) A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* 5: 453-455.
- Casariego-Madorell M, List R, Ceballos G (2008) Tamaño poblacional y alimentación de la nutria de río (*Lontra longicaudis annectens*) en la costa de Oaxaca, México. *Acta Zoológica Mexicana* 24(2): 179-200.
- Castañeda S (2008) Diversidad genética de *Habromys simulatus*, una especie endémica y restringida al bosque mesófilo de montaña. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Biológicas, Instituto de Ecología, UNAM, México.
- Castillo-Campos G y Narave H (1992) Contribución al conocimiento de la vegetación de la reserva de la biosfera Montes Azules, Selva Lacandona, Chiapas, México. En: Vásquez-Sánchez M, Ramos M (eds) Reserva de la Biósfera Montes Azules, Selva Lacandona: Investigación para su conservación. ECOSFERA, México.
- Ceballos G y Oliva G (2005) Los mamíferos silvestres de México. Fondo de Cultura Económica, CONABIO, México.
- Ceballos G, Rodríguez P, Medellín R (1998) Assessing conservation priorities in megadiverse Mexico: mammalian diversity, endemism, and endangerment. *Ecological Applications* 8(1): 8-17.
- Chapuis M y Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24(3): 621-631.
- Chesser R (1991) Influence of gene flow and breeding tactics on gene diversity within populations. *Genetics* 129: 573-583.
- CONABIO (2008a) Fichas de especies NOM-059-SEMARNAT-2001. <http://www.conabio.gob.mx>. Citado 10 febrero 2008.
- CONABIO (2008b) Especies exóticas. <http://www.conabio.gob.mx>. Citado 23 septiembre 2008.

CONAGUA (2008) Tribunal del agua.

<http://www.conagua.gob.mx>. Citado 14 junio 2008

Corkum L (1999) Conservation of running waters: beyond riparian vegetation and species richness.

Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems 9: 559-564.

Cornuet M y Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001-2014.

Dallas J, Bacon P, Carss D, Conroy J, Green R, Jefferies D, Kruuk H, Marshall F, Pieltney S, Racey P (1999) Genetic diversity in the Eurasian otter *Lutra lutra*, in Scotland. Evidence from microsatellite polymorphism. *Biological Journal of the Linnean Society* 68:73-86.

Dallas J, Marshall F, Pieltney S, Bacon P, Racey P (2002) Spatially restricted gene flow and reduced microsatellite polymorphism in the Eurasian otter *Lutra lutra* in Britain. *Conservation Genetics* 3: 15-29.

Effenberger S y Suchentrunk F (1999) RFLP analysis of the mitochondrial ADN of otters (*Lutra lutra*) from Europe - implications for conservation of a flagship species. *Biological Conservation* 90: 229-234.

Eguiarte L y Piñero D (1999) Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. En: Nuñez-Farfán J y Eguiarte L (compiladores) *La Evolución Biológica*, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.

Ferrando A, Ponsá M, Marmi J, Domingo-Roura X (2004) Eurasian otter, *Lutra lutra*, have a dominant mtADN haplotype from Iberian Peninsula to Scandinavia. *Journal of Heredity* 95(5): 430-435.

Ferrando A, Domingo-Roura X, Ponsá M (2005) Distribution of otter genotypes obtained from non-invasive samples in a reintroduction area. Paper presented at the European Otter Workshop, Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano, Italia, 20-23 octubre 2005.

Ferrando A, Lecis R, Domingo-Roura X, Ponsá M (2007) Genetic diversity and individual identification of reintroduced otters (*Lutra lutra*) in north-eastern Spain by DNA genotyping of spraints. *Conservation Genetics* 9(1): 129-139.

Frankham R (2005) Genetics and extinction. *Biological Conservation* 126: 131-140.

Frankham R, Ballou J, Briscoe D (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Reino Unido.

- Futuyma D (2005) *Evolution*. Sinauer. Estados Unidos.
- Gallo J (1997) Status of sea otters (*Enhydra lutris*) in Mexico. *Marine Mammal Science* 13(2): 332-340.
- Gallo J, Ramos N, Rangel O (2008) Depredación de aves acuáticas por la nutria neotropical (*Lontra longicaudis annectens*), en el río Yaqui, Sonora, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 79: 275-279.
- García-Gil G y Lugo J (1992) Las formas del relieve y los tipos de vegetación en la Selva Lacandona. *En: Vásquez-Sánchez M, Ramos M (eds) Reserva de la biosfera Montes Azules, Selva Lacandona: Investigación para su conservación*. ECOSFERA, México.
- Gómez-Nísino A (2006) Ficha técnica de *Lontra longicaudis*. *En: Medellín R. (compilador) Los mamíferos mexicanos en riesgo de extinción según el PROY-NOM-059-ECOL-2000*. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W005. México. DF.
- Hájková P, Pertoldi C, Zemanová B, Roche K, Hájek B, Bryja J, Zima J (2007) Genetic structure and evidence for recent population decline in Eurasian otter populations in the Czech and Slovak Republics: implications for conservation. *Journal of Zoology* 272: 1-9.
- Hedrick P (2000) *Genetics of Populations*. Jones and Bartlett Publishers. Estados Unidos.
- Hedrick P y Miller P (1992) Conservation genetics: Techniques and fundamentals. *Ecological Applications* 2(1): 30-46.
- Hedrick P, Lacy R, Allendorf F, Soulé M (1996) Directions in conservation biology: Comments on Caughley. *Conservation Biology* 10(5): 1312-1320.
- Hobbs G, Chadwick A, Slater M, Bruford W (2006) Landscape genetics applied to a recovering otter (*Lutra lutra*) population in the UK: Preliminary results and potential methodologies. *Hystrix Italian Journal of Mammalogy* 17: 47-63.
- Instituto Nacional de Ecología (2000) Programa de Manejo Reserva de la Biosfera Montes Azules. INE, México.
- Jansman J, Chanin P, Dallas P (2001) Monitoring otter populations by ADN typing of spraints. *IUCN Otter Specialist Group Bulletin*. 18(1): 12-19.
- Johnson W, Eizirik E, Roelke-Parker M, O'Brien S (2001) Applications of genetic concepts and molecular methods to carnivore conservation. *En: Gittlemand J, Funk S, MacDonald, Wayne R (eds) Carnivore Conservation*, Cambridge University Press, Reino Unido.
- Kalz B, Jewgenow K, Fickel J (2006) Structure of an otter (*Lutra lutra*) population in Germany - results of ADN and hormone analyses from faecal samples. *Mammalian Biology* 71: 321-335.

- Ketmaier V y Bernardini C (2005) Structure of the mitochondrial control region of the Eurasian otter (*Lutra lutra*; Carnivora; Mustelidae): Patterns of genetic heterogeneity and implications for conservation of the species in Italy. *Journal of Heredity* 96(4): 318-328.
- Kohn M y Wayne R (1997) Facts from feces revisited. *Trends in Ecology and Evolution* 12(6): 223-227.
- Kruuk H (2006) Otters: Ecology, behaviour and conservation. Oxford University Press. Gran Bretaña.
- Lacy R (1987) Loss of genetic diversity from managed populations: Interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. *Conservation Biology* 1(2): 143-158.
- Lacy R (1997) Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *Journal of Mammalogy* 78(2): 320-335
- Lande R (1998) Anthropogenic, ecological and genetic factors in extinction and conservation. *Resp. Popul. Ecol.* 40(3): 259-269.
- Larivière S (1999) Lontra longicaudis. *Mammalian Species* 609: 1-5.
- Latch E, Scognamillo D, Fike J, Chamberlain M, Rhodes O (2008) Deciphering ecological barriers to North American River otter (*Lontra canadensis*) gene flow in the Louisiana landscape. *Journal of Heredity*. 99(3): 265-274.
- Levene H (1949) On a matching problem arising in genetics. *The Annals of Mathematical Statistics* 20: 91 - 94.
- Lewis P y Zaykin D (2001) Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>
- Macías-Sánchez S y Aranda M (1999) Análisis de la alimentación de la nutria *Lontra longicaudis* (Mamalia: Carnivora) en un sector del río Los Pescados, Veracruz, México. *Acta Zoológica Mexicana* 76: 49-57.
- Maldonado J (2006) Monitoreo de especies raras y amenazadas de mamíferos utilizando análisis genéticos y muestreos no invasivos. En: Vázquez-Domínguez E, Hafner D (eds) Genética y mamíferos mexicanos: presente y futuro. New México Museum of Natural History and Science Bulletin No. 32, Nuevo México.
- Maldonado J y López González C (2003) Recent records for the Neotropical River otter (*Lontra longicaudis*) in Guerrero, Mexico. *IUCN Otter Specialist Group Bulletin* 20(2): 65-68.

- McKillup S (2006) *Statistics explained an introductory guide for life scientists*. Cambridge University Press, Reino Unido.
- Medellín R (1994) Mammal diversity and conservation in the Selva Lacandona, Chiapas, México. *Conservation Biology* 8(3): 780-799.
- Mills L y Allendorf F (1996) The One-migrant-per-generation rule in conservation and management. *Conservation Biology* 10(6):1509-1518.
- Montgomery M, Woodworth L, Northen R, Gilligan D, Briscoe D, Frankhan R (2000) Relationships between population size and loss of genetic diversity: comparisons of experimental results with theoretical predictions. *Conservation Genetics* 1: 33-43.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences* 70(12): 3321-3323.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozigosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 588-590.
- OSG-IUCN (2008) Otter Specialist Group-IUCN.
<http://www.otterspecialistgroup.org>. Citado 13 febrero 2008.
- Paetkau D, Calvert W, Stirling I, Strobeck C (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4: 347-354.
- Pagamo M y Gauvrear (2000) *Principles of biostatistics*. Duxbury Thomson Learning, Estados Unidos.
- Pertoldi C, Moller M, Loeschcke V, Bo Madsen A, Jacobsen L, Baagoe H(2001) Genetic consequences of population decline in the European otter (*Lutra lutra*): an assessment of microsatellite ADN variation in Danish otters from 1883 from 1993. *Proceedings of the Royal Society of London* 268: 1775-1781.
- Piggott M, Taylor A (2003) Remote collection of animal ADN and its applications in conservation management and understanding the population biology of rare and cryptic species. *Wildlife Research* 30: 1-12.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet J, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A (2004) GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity* 95:536-539.
- Prigioni C, Remonti L, Balestrieri A, Sgrosso S, Priore G, Mucci N, Randi E (2006) Estimation of European otter (*Lutra lutra*) population size by fecal ADN typing in Southern Italy. *Journal of Mammalogy* 87(5): 855-858.

- Randi E, Mucci N, Arrendal J, Ansorge H, Bailey M, Bodner M, Dallas J, Delibes M, Domingo-Roura X, Ferrando A, Fournier P, Godoy A, Hajkova P, Hauer S, Heggberget TM, Heidecke D, Jansman H, Krueger H, Kvaloy K, Lafontaine L, Lemarchand C, Liukko UM, Madsen AB, Mercier L, Ozolins J, Paunovic M, Pertoldi C, Piriz A, Prigioni C, Suchentrunk F, Teubner J, Zinke O (2005) Assessing the patterns of genetic diversity in otter populations in Europe. Paper presented at the European Otter Workshop, Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano, Italia, 20-23 octubre 2005.
- Raup D (1994) The role of extinction in evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(15): 6758-6763.
- Rousset F (2008) Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8(1) : 103-106.
- Ruíz-Olmo J, Calvo A, Palazón S, Arqued V(1998) Is the otter a bioindicator?. *Galemys* 10: 227-237.
- Sanchez O, Pineda M, Benitez.H (1998), Guía de identificación para las aves y mamíferos silvestres de mayor comercio en México protegidos por la CITES. SEMARNAP - CONABIO, México.
- Selkoe K y Toonen R (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615-629.
- Slatkin M (1994) Gene flow and population structure. En: *Ecological genetics*, Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Slatkin M (1995) A Measure of population subdivision based on microsatellite frequencies. *Genetix* 139: 457-462.
- Soler A (2004) Cambios en la abundancia relativa y dieta de *Lontra longicaudis* en relación a la perturbación de la Selva Lacandona, Chiapas, México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Sunnucks P (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 199-203.
- Taberlet P, Waits L, Luikart G (1999) Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 323-327.
- Taberlet P, Luikart G, Gefen E (2001) New methods for obtaining and analyzing genetic data from free-ranging carnivores. En: Gittlemand J, Funk S, MacDonald D, Wayne R (eds) *Carnivore Conservation*, Cambridge University Press, Reino Unido.

- Trinca C, Waldemarin H, Eizirik E (2007) Genetic diversity of the Neotropical otter (*Lontra longicaudis* Olfers, 1818) in Southern and Southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 67(4): 813-818.
- UNEP-WCMC (2008) UNEP-WCMC Species Database: CITES-Listed Species. <http://www.cites.org>. Citado 10 febrero 2008.
- Vaughan T, Ryan J, Czaplewski N (2000) Mammalogy. Thomson Learning, Estados Unidos.
- Van Oosterhout, Hutchinson W, Wills D, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.
- Waits L y Paetkau D (2005) Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management* 69(4): 1419-1433.
- Wang J (2004) Application of the One-migrant-per-generation rule to conservation and management. *Conservation Biology* 18(2): 332-343.
- Weir B y Cokerham C (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38(6): 1358-1370.
- Whitlock M y McCauley D (1999) Indirect measures of gene flow and migrations $F_{ST} \neq 1/(4Nm+1)$. *Heredity* 82: 117-125.
- Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 27-259.
- Yeh C y Boyle B (1997) Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany* 129: 157.
- Zemanova B, Hajkova P, Bryja J, Roche K, Hajek B, Zima J (2005) Assessing of otter population size in Trebonsko (Czech Republic) using non-invasive genetic method. Paper presented at the European Otter Workshop, Parco Nazionale Del Cilento e Vallo di Diano, Italia, 20-23 octubre 2005.

ANEXOS

Anexo 1. Las trece especies de nutrias que actualmente habitan nuestro planeta (OSG-IUCN, 2007).

1. *Aonyx capensis* (Schinz, 1821), nutria africana
2. *Aonyx cinereus* (Illiger, 1815), nutria asiática de garras pequeñas
3. *Aonyx congicus* (Lönnberg, 1910), nutria del Congo
4. *Enhydra lutris* (Linnaeus, 1758), nutria de mar
5. *Lontra canadensis* (Shreber, 1776), nutria de río norteamericana
6. *Lontra felina* (Molina, 1782), nutria marina
7. *Lontra longicaudis* (Olfers, 1818), nutria neotropical
8. *Lontra provocax* (Thomas, 1908), nutria de río del sur
9. *Lutra lutra* (Linnaeus, 1758), nutria euroasiática
10. *Lutra maculicollis* (Lichtenstein, 1835), nutria de cuello manchado
11. *Lutra sumatrana* (Gray, 1865), nutria de nariz peluda
12. *Lutrogale perspicillata* (Geoffroy Saint-Hilaire, 1826), nutria de pelo suave
13. *Pteronura brasiliensis* (Gmelin, 1788), nutria gigante

Anexo 2. Tabla de las frecuencias alélicas por afluente y totales, de cada uno de los alelos presentes en los 8 loci utilizados.

LOCUS	Alelos									
RIO02	188	190	192	194	196					
Miranda	0.026	0.421	0.276	0.224	0.053					
Lacantún	0.000	0.250	0.357	0.286	0.107					
José	0.063	0.281	0.219	0.250	0.188					
Colorado	0.000	0.125	0.500	0.375	0.000					
Lagartos	0.000	0.267	0.267	0.367	0.100					
Tzendales	0.042	0.500	0.167	0.167	0.125					
TODOS	0.025	0.348	0.273	0.258	0.096					
RIO 04	253	255	257	259	261	263	265	267	269	271
Miranda	0.039	0.329	0.211	0.066	0.158	0.092	0.053	0.053	0.000	0.000
Lacantún	0.107	0.107	0.286	0.143	0.071	0.036	0.071	0.107	0.071	0.000
José	0.063	0.125	0.344	0.250	0.063	0.063	0.031	0.031	0.031	0.000
Colorado	0.375	0.250	0.125	0.000	0.000	0.125	0.125	0.000	0.000	0.000
Lagartos	0.033	0.233	0.400	0.167	0.000	0.100	0.033	0.033	0.000	0.000
Tzendales	0.000	0.292	0.292	0.208	0.000	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042
TODOS	0.061	0.242	0.278	0.136	0.081	0.076	0.051	0.051	0.020	0.005
RIO 07	165	167	169	171	173	175				
Miranda	0.118	0.211	0.263	0.211	0.145	0.053				
Lacantún	0.036	0.036	0.25	0.214	0.357	0.107				
José	0.188	0.344	0.219	0.094	0.156	0.000				
Colorado	0.125	0.125	0.250	0.250	0.000	0.250				
Lagartos	0.133	0.367	0.300	0.133	0.067	0.000				
Tzendales	0.208	0.25	0.208	0.125	0.167	0.042				
TODOS	0.131	0.232	0.253	0.172	0.162	0.051				

RIO 08	208	210	212	214
Miranda	0.118	0.342	0.395	0.145
Lacantún	0.000	0.393	0.500	0.107
José	0.000	0.406	0.469	0.125
Colorado	0.125	0.250	0.500	0.125
Lagartos	0.033	0.300	0.433	0.233
Tzendales	0.042	0.375	0.500	0.083
TODOS	0.061	0.354	0.444	0.141
RIO 10	243	245	247	
Miranda	0.132	0.75	0.118	
Lacantún	0.143	0.571	0.286	
José	0.125	0.719	0.156	
Colorado	0.375	0.500	0.125	
Lagartos	0.133	0.667	0.200	
Tzendales	0.208	0.583	0.208	
TODOS	0.152	0.677	0.172	
RIO 11	156	158	160	162
Miranda	0.408	0.316	0.237	0.039
Lacantún	0.643	0.286	0.071	0.000
José	0.469	0.188	0.219	0.125
Colorado	0.625	0.375	0.000	0.000
Lagartos	0.400	0.367	0.200	0.033
Tzendales	0.375	0.292	0.208	0.125
TODOS	0.455	0.298	0.192	0.056

RIO 13	260	264	268
Miranda	0.566	0.368	0.066
Lacantún	0.643	0.321	0.036
José	0.250	0.531	0.219
Colorado	0.500	0.500	0.000
Lagartos	0.467	0.333	0.200
Tzendales	0.375	0.458	0.167
TODOS	0.485	0.399	0.116
RIO 16	270	276	280
Miranda	0.816	0.026	0.158
Lacantún	0.929	0.036	0.036
José	0.781	0.094	0.125
Colorado	0.875	0.000	0.125
Lagartos	0.733	0.100	0.167
Tzendales	0.750	0.083	0.167
TODOS	0.808	0.056	0.136

Anexo 3. Tabla de las frecuencias genotípicas por afluente y totales, de cada uno de los 8 loci utilizados.

n	Afluente						
	Miranda	Lacantún	José	Colorado	Lagartos	Tzendales	Todos
	38	14	16	4	15	12	99
RIO 02							
188, 188	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,010
190, 188	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,020
190, 190	0,184	0,071	0,188	0,000	0,067	0,333	0,162
192, 188	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
192, 190	0,289	0,214	0,063	0,250	0,267	0,167	0,222
192, 192	0,053	0,143	0,188	0,250	0,067	0,000	0,091
	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010
194, 190	0,105	0,143	0,000	0,000	0,133	0,000	0,081
194, 192	0,158	0,071	0,000	0,250	0,067	0,167	0,111
194, 194	0,053	0,143	0,125	0,250	0,200	0,000	0,101
196, 188	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
196, 190	0,053	0,000	0,125	0,000	0,000	0,083	0,051
196, 192	0,000	0,143	0,000	0,000	0,067	0,000	0,030
196, 194	0,053	0,071	0,250	0,000	0,133	0,167	0,111
196, 196	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
RIO 04							
253, 253	0,000	0,000	0,000	0,250	0,000	0,000	0,010
255, 253	0,000	0,071	0,063	0,250	0,067	0,000	0,040
255, 255	0,158	0,000	0,000	0,000	0,067	0,167	0,091
257, 253	0,026	0,143	0,000	0,000	0,000	0,000	0,030
257, 255	0,211	0,143	0,188	0,250	0,133	0,167	0,182
257, 257	0,053	0,071	0,125	0,000	0,267	0,000	0,091
259, 253	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,010
259, 255	0,053	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,030
259, 257	0,079	0,143	0,250	0,000	0,133	0,333	0,152
259, 259	0,000	0,000	0,063	0,000	0,067	0,000	0,020
261, 253	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010
261, 255	0,053	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020
261, 257	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
261, 259	0,000	0,143	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020
261, 261	0,053	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,030
263, 253	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
263, 255	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067	0,000	0,010
263, 257	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,010

263, 259	0,000	0,000	0,063	0,000	0,067	0,000	0,020
263, 261	0,105	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040
263, 263	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010
265, 253	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
265, 255	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010
265, 257	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
265, 259	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
265, 261	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010
265, 263	0,026	0,000	0,063	0,250	0,067	0,000	0,040
265, 265	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
267, 253	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010
267, 255	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067	0,000	0,010
267, 257	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
267, 259	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
267, 261	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
267, 263	0,000	0,071	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010
267, 265	0,026	0,143	0,000	0,000	0,000	0,083	0,040
267, 267	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010
269, 253	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
269, 255	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
269, 257	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
269, 259	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
269, 261	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
269, 263	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
269, 265	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
269, 267	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,010
269, 269	0,000	0,071	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010
271, 253	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
271, 255	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
271, 257	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
271, 259	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
271, 261	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
271, 263	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
271, 265	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
271, 267	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
271, 269	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010
271, 271	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,000
RIO 07							
165, 165	0,053	0,000	0,000	0,000	0,067	0,167	0,051
167, 165	0,132	0,000	0,250	0,250	0,133	0,083	0,131
167, 167	0,079	0,000	0,125	0,000	0,200	0,000	0,081
169, 165	0,000	0,071	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010
169, 167	0,105	0,071	0,188	0,000	0,200	0,417	0,162
169, 169	0,132	0,071	0,063	0,250	0,200	0,000	0,111
171, 165	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
171, 167	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010
171, 169	0,079	0,071	0,063	0,000	0,000	0,000	0,051

171, 171	0,053	0,071	0,000	0,250	0,067	0,083	0,061
173, 165	0,000	0,000	0,125	0,000	0,000	0,000	0,020
173, 167	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
173, 169	0,079	0,143	0,063	0,000	0,000	0,000	0,061
173, 171	0,158	0,143	0,125	0,000	0,133	0,083	0,131
173, 173	0,026	0,214	0,000	0,000	0,000	0,083	0,051
175, 165	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
175, 167	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
175, 169	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
175, 171	0,053	0,071	0,000	0,000	0,000	0,000	0,030
175, 173	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,010
175, 175	0,026	0,071	0,000	0,250	0,000	0,000	0,030

RIO 08

208, 208	0,053	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020
210, 208	0,079	0,000	0,000	0,250	0,067	0,083	0,061
210, 210	0,132	0,357	0,250	0,000	0,067	0,167	0,172
212, 208	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010
212, 210	0,263	0,000	0,250	0,250	0,267	0,333	0,232
212, 212	0,237	0,500	0,000	0,250	0,267	0,250	0,283
214, 208	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010
214, 210	0,079	0,071	0,063	0,000	0,133	0,000	0,071
214, 212	0,026	0,000	0,188	0,250	0,067	0,167	0,081
214, 214	0,079	0,071	0,000	0,000	0,133	0,000	0,061

RIO 10

243, 243	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
245, 243	0,237	0,286	0,250	0,750	0,200	0,333	0,273
245, 245	0,526	0,357	0,500	0,000	0,400	0,333	0,434
247, 243	0,026	0,000	0,000	0,000	0,067	0,083	0,030
247, 245	0,211	0,143	0,188	0,250	0,333	0,167	0,212
247, 247	0,000	0,214	0,063	0,000	0,000	0,083	0,051

RIO 11

156, 156	0,184	0,357	0,313	0,500	0,133	0,167	0,232
158, 156	0,316	0,429	0,188	0,250	0,467	0,167	0,313
158, 158	0,105	0,071	0,063	0,250	0,067	0,167	0,101
160, 156	0,105	0,143	0,125	0,000	0,067	0,167	0,111
160, 158	0,079	0,000	0,063	0,000	0,133	0,000	0,061
160, 160	0,132	0,000	0,063	0,000	0,067	0,083	0,081
162, 156	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,020
162, 158	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,020
162, 160	0,026	0,000	0,125	0,000	0,067	0,083	0,051
162, 162	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,010

RIO 13							
260, 260	0,316	0,357	0,125	0,000	0,333	0,250	0,273
264, 260	0,447	0,500	0,063	1,000	0,200	0,250	0,354
264, 264	0,105	0,071	0,375	0,000	0,133	0,167	0,152
268, 260	0,053	0,071	0,188	0,000	0,067	0,000	0,071
268, 264	0,079	0,000	0,250	0,000	0,200	0,333	0,141
268, 268	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067	0,000	0,010
RIO 16							
270, 270	0,684	0,857	0,625	0,750	0,533	0,667	0,677
276, 270	0,053	0,071	0,188	0,000	0,133	0,000	0,081
276, 276	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,010
280, 270	0,211	0,071	0,125	0,250	0,267	0,167	0,182
280, 276	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067	0,000	0,010
280, 280	0,053	0,000	0,063	0,000	0,000	0,083	0,040

Anexo 4. Prueba de desequilibrio de ligamiento realizado para todas las combinaciones de los 8 loci utilizados, ninguna de éstas fue significativa tras la corrección de Bonferroni.

Locus 1	Locus 2	Valor p	E. S.	"Switches"
RIO02	RIO04	0.60811	0.064479	2757
RIO02	RIO07	0.788360	0.031485	7495
RIO04	RIO07	0.260310	0.058576	1887
RIO02	RIO08	0.657250	0.022793	10341
RIO04	RIO08	0.953440	0.015158	3185
RIO07	RIO08	0.179570	0.037476	7876
RIO02	RIO10	0.898700	0.008517	19723
RIO04	RIO10	0.290370	0.033654	7971
RIO07	RIO10	0.161190	0.016322	16583
RIO08	RIO10	0.474600	0.018501	19689
RIO02	RIO11	0.111430	0.023608	10428
RIO04	RIO11	0.427460	0.065027	3102
RIO07	RIO11	0.343620	0.032296	8246
RIO08	RIO11	0.446210	0.033636	10848
RIO10	RIO11	0.471320	0.017516	20753
RIO02	RIO13	0.025510	0.005260	18208
RIO04	RIO13	0.615280	0.033716	6853
RIO07	RIO13	0.718340	0.023451	14832
RIO08	RIO13	0.528460	0.018601	18266
RIO10	RIO13	0.590990	0.012656	29853
RIO11	RIO13	0.645920	0.017307	18857
RIO02	RIO16	0.041380	0.006978	9418
RIO04	RIO16	0.794140	0.034368	3453
RIO07	RIO16	0.111400	0.018290	7537
RIO08	RIO16	0.837700	0.013397	9613
RIO10	RIO16	0.913050	0.005122	17408
RIO11	RIO16	0.214630	0.016366	10187
RIO13	RIO16	0.063650	0.007645	16125