



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

GENÉTICA DE POBLACIONES DE *Boa constrictor*
(Serpentes: Boidae) EN LA ISLA COZUMEL,
QUINTANA ROO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MARCO ALEJANDRO SUÁREZ ATILANO



DIRECTOR DE TESIS:

Dra. ELLA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

1. Datos del Alumno

Suárez
Atilano
Marco Alejandro
56 17 83 72
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biólogo
30214255-8

2. Datos del asesor

Dra.
Vázquez
Domínguez
Ella Gloria

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Piñero
Dalmau
Daniel Ignacio

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Becerra
Bracho
Arturo Carlos II

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Nieto
Montes de Oca
Adrián

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Ramírez
Corona
Fabiola

7. Datos de trabajo escrito:

Genética de poblaciones *Boa constrictor* (Serpentes:Boidae) en la Isla
Cozumel, Quintana Roo.
81pp
2009



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Genética de poblaciones de Boa constrictor (Serpentes: Boidae) en la isla Cozumel, Quintana Roo

realizado por **Suárez Atilano Marco Alejandro** con número de cuenta **3-0214255-8** quien ha decidido titularse mediante la opción de **tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau	
Propietario	Dr. Arturo Carlos II Becerra Bracho	
Propietario Tutora	Dra. Ella Gloria Vázquez Domínguez	
Suplente	Dr. Adrián Nieto Montes de Oca	
Suplente	M. en C. Fabiola Ramírez Corona	

Atentamente,

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU ”

Ciudad Universitaria, D. F., a 28 de julio de 2009

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. PEDRO GARCÍA BARRERA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

Dedico esta tesis a:

Yolanda Atilano López y

Marco Alejandro Suárez Virueña;

para ellos, todo mi amor, mi respeto y mi admiración

(Osease, para los que no han entendido, ¡pues a mis papás!)

Este trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo del proyecto del CONACYT “Ecología y manejo para la conservación de una biota endémica insular críticamente amenazada” (SEMARNAT-2002-CO1-0571).

AGRADECIMIENTOS

Muchísimas gracias a mi tutora, la Dra. Ella Vázquez, por aceptar a este herpetólogo renegado como tu alumno; por hacerme participe en este proyecto, que a pesar de lucir en un principio tan lejano y tan complicado, me diste toda la confianza y el apoyo para poder sacarlo adelante y sobre todo por enseñarme (y demostrarme) que “si lo deseas, puedes trabajar la genética de cualquier organismo”, sin importar lo difícil que pueda parecer.

Gracias al Dr. Alfredo Cuarón, pionero de este proyecto en Cozumel, por permitirnos el acceso a las muestras de boas tanto de Cozumel como del continente, sin las cuales este trabajo no se hubiera realizado; así como por mostrar siempre gran interés en el desarrollo de éste.

Gracias al Dr. Warren Booth, por permitirnos utilizar tanto los primers específicos “Bci’s” diseños por él, así como demostrarnos la amplificación de primers no específicos “ μ sat’s”, antes de su publicación y que pudieron ser utilizados exitosamente para la elaboración de este trabajo.

Gracias a mis sinodales: el Dr. Arturo Becerra Bracho y al Dr. Adrián Nieto, por todos sus comentarios y sugerencias, que permitieron enriquecer esta tesis; al Dr. Daniel Piñero, por abrirme las puertas en el taller “Genética de poblaciones y Filogeografía: enfoques y perspectivas” y a la M. en C. Fabiola Ramírez, por permitirme realizar la técnica de PAGE en el Taller de Sistemática y Biogeografía del Edificio Tlauizcalpan de la Facultad de Ciencias.

Gracias a los “murcielagologos”: Paty, Ari y Arturo, con los cuales compartí innumerables aventuras (naturales y sobrenaturales) en la isla de *Lostzumel* (tal vez sin encontrar muchas boas, pero si muchos murciélagos). Gracias a todos aquellos con los cuales compartí la casa de este proyecto: Lorena, Héctor, Itzel, Yunuen y en especial a Sandra, por habernos acogido y ayudado casi dos meses.

Gracias al M. en C. Christopher González Baca, Subdirector de Medio Ambiente y Ecología del Municipio de Cozumel, por facilitarme varias muestras y por permitirme las bases de datos que hicieron posible la identificación de cada individuo utilizado en esta tesis; así como al Biol. Héctor González, coordinador de proyectos de la Fundación de Parques y Museos de Cozumel, por haberme permitido la realización de muestreos en el parque estatal “Punta Sur”.

Muchísimas gracias, a todos y cada uno de los miembros del Laboratorio de Macroecología: David, Daya, Gera, Lore, Fabricio, Pau, Rebeca, en particular a mis compañeros de la parte genética (el hospital psiquiátrico): Arturo, Irma, Sunny, Susette Tania (*Horrizomys*) y Tania (*Nacotylomys*), tanto por su compañerismo, como por los

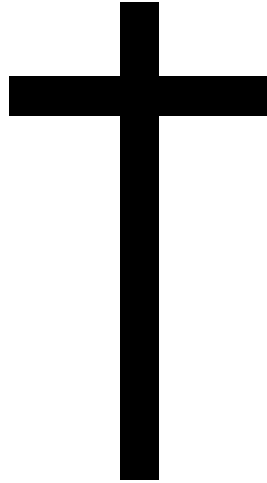
comentarios que aportaron a este trabajo, ya que en este laboratorio además de apoyo y camaradería en el trabajo, he encontrado muchos amigos (y el Oscar fue para...).

Gracias a la Dra. María del Carmen Mandujano y a la M. en C. Mariana Rojas, por permitirme trabajar la parte de biología molecular en el Laboratorio de Dinámica de poblaciones y Evolución de Historias de Vida del Instituto de Ecología, así como a todos y cada uno de los integrantes de este laboratorio, que amenizaron mi trabajo en este laboratorio muchas veces (¡joder!, que me han sonsacado).

Gracias a la M. en C. Laura Márquez, por las facilidades para realizar el secuenciado de microsatélites en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM y por toda la ayuda brindada para el manejo del software especializado.

Gracias a todos mis amigos de la carrera (nótese el diplomático orden alfabético) mis “compañeditos” y la banda del Operation Center (Adán, Billy, Darinka, Diego, Eunice, Fercha, Flower, Lety, Lilia, Montufar, Jelipe, Jero, Sara, Sophie, Proteus, Yara), con los cuales pase 5 años de aventuras y experiencias, que recordaré gratamente por siempre (que horror, ¿no?). Ha sido un honor haber compartido con ustedes, este incomprendido pero fascinante camino de la ciencia: la Biología.

En memoria



Valentín Sánchez Medina

(1986-2009)

Índice

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. Introducción.....	3
1.1 Genética de poblaciones.....	3
1.2 Variación genética.....	4
1.3. Medición de la diversidad genética.....	5
1.4 Marcadores moleculares y uso de los microsatélites.....	6
1.5 Estructura genética.....	8
1.6 Análisis de la estructura génica con respecto a modelos de mutación en microsatélites.....	9
2. Antecedentes.....	12
2.1 <i>Boa constrictor</i> , características y distribución.....	13
2.2 <i>Boa constrictor</i> y su registro en Cozumel.....	14
2.3 Métodos moleculares como herramienta en el estudio de especies introducidas.....	14
3. Objetivos.....	17
4. Hipótesis.....	17
5. Justificación.....	17
6. Materiales y métodos.....	19
6.1 Sitio de estudio.....	19
6.2 Trabajo de campo y obtención de muestras.....	20
6.3 Trabajo de laboratorio.....	21
6.3.1 Extracción de DNA.....	21
6.3.2 Estandarización de PCR.....	22
6.3.3 Secuenciación y genotipado de microsatélites.....	23
6.4 Análisis genéticos y estadísticos.....	23
6.4.1 Definición de subgrupos en una población con muestreo continuo.....	23

6.4.2	Asignación de individuos.....	25
6.4.3	Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	25
6.4.4	Desequilibrio de Ligamiento.....	26
6.4.5	Diversidad genética.....	26
6.4.6	Diferenciación alélica y genotípica.....	27
6.4.7	Estructura genética.....	28
6.4.8	Alelos Nulos.....	30
6.4.9	Parentesco, cuello de botella y tamaño efectivo.....	31
7.	Resultados.....	34
7.1	Amplificación de loci microsatélites.....	36
7.2	Definición de subgrupos y asignación de individuos sin datos.....	37
7.3	Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	38
7.4	Desequilibrio de ligamiento.....	38
7.5	Diversidad Genética.....	39
7.6	Distribución y diferenciación de frecuencias alélicas.....	40
7.7	Distribución y diferenciación de frecuencias genotípicas.....	42
7.8	Estructura y diferenciación genética.....	42
7.9	Alelos nulos.....	45
7.10	Parentesco, cuello de botella y tamaño efectivo.....	45
8.	Discusión	
8.1	Amplificación de microsatélites y diversidad genética.....	49
8.2	Estructura genética y diferenciación.....	52
8.3	Cuello de botella y tamaño efectivo.....	55
8.4	<i>Boa constrictor</i> en Cozumel con respecto a otros ejemplos de introducción de serpientes.....	56
9.	Conclusiones.....	58
10.	Literatura citada.....	59
	ANEXOS.....	66
	Anexo 1 Individuos utilizados.....	66
	Anexo 2: Extracción de DNA.....	68
	Anexo 2.1.....	68

Anexo 2.2.....	69
Anexo 2.3.....	70
Anexo 2.4.....	71
Anexo 2.5.....	72
Anexo 3 Elaboración de geles agarosa.....	73
Anexo 4 Elaboración de geles de poliacrilamida.....	74
Anexo 5 Condiciones de PCR.....	76
Anexo 6 Frecuencias alélicas observadas.....	78
Anexo 7 Genotipos observados.....	79
Anexo 8 Árbol de Neighbour-Joining con seis poblaciones de <i>B. constrictor</i>	80
Anexo 9 Frecuencias alélicas corregidas.....	81

RESUMEN

La genética de poblaciones incluye diversos modelos, como el equilibrio de Hardy-Weinberg, que permiten inferir las fuerzas evolutivas que actúan en las poblaciones. Asimismo, dos aspectos fundamentales en las poblaciones naturales son la cantidad de variación genética y la estructura o diferenciación dentro y entre poblaciones. *Boa constrictor* es una serpiente que se distribuye a lo largo del neotrópico, en una gran variedad de ambientes. A pesar de que la subespecie *B. constrictor imperator* tiene poblaciones distribuidas naturalmente en la península de Yucatán, se considera que fue introducida en la Isla Cozumel en 1971. Actualmente es el principal depredador terrestre en la isla y por lo consiguiente, una amenaza para la conservación de vertebrados terrestres de Cozumel. Ello demuestra cómo la introducción de especies exóticas en un ecosistema es una grave amenaza, por lo que su estudio es imperativo; en particular en términos de su diversidad y estructura genética, información que permiten evaluar su origen, establecimiento y potencial evolutivo, además de proponer estrategias para su control. En este trabajo se analizó la diversidad y la estructura genética de *B. constrictor* en la Isla Cozumel, utilizando cuatro loci de microsatélites en 64 individuos. Se observaron niveles moderadamente altos de diversidad genética ($H_O = 0.740$; $H_{NEI} = 0.746$) y poca diferenciación ($F_{ST} = 0.037$ con una $Nm = 6.52$); se identificaron dos poblaciones cuya separación genética debe ser reciente (basado en la ubicación geográfica de los individuos y sus genotipos). La mayor parte de la variación se encontró al interior de las poblaciones (96%) y no entre ellas (4%) (AMOVA). Finalmente se detectó evidencia de un cuello de botella reciente en ambas poblaciones y para la población en conjunto, además de un tamaño efectivo similar al observado en otras serpientes con distribuciones restringidas. Los resultados sugieren que la estructuración de la población en la isla es resultado de la presencia humana y también que *B. constrictor* fue introducida recientemente en Cozumel.

Palabras clave: *Boa constrictor*, Cozumel, diversidad genética, estructura genética, introducción de especies, microsatélites,

ABSTRACT

Population's genetics provides several models, like Hardy Weinberg's equilibrium, to allow and infer the evolutive forces that occur in the natural populations. Two fundamental aspects in this field are the amount of genetic variation and genetic structure inside and among of these populations. *Boa constrictor* is a snake with an extended neotropical distribution that lives in several environments. Moreover, the subspecies *B. constrictor imperator* has populations naturally widespread on the Yucatan Peninsula, it's considered like exotic in Cozumel Island introduced on 1971. Actually, is the principal terrestrial predator and in consequence, a threat for the endemic terrestrial vertebrates on Cozumel. The introduction of exotical species in ecosystems is considered like a critical menace to the conservation, so it's imperative the study of these cases; especially with respect of their genetic diversity and structure, to evaluate their origins, establishment and evolutive potential, to propose strategies for their control. In this work, we analyzed and evaluated the genetic diversity and structure of *Boa constrictor* in the Cozumel Island, working with four microsatellite loci amplified in a sample of 64 individuals. We found high moderately genetic diversity ($H_O = 0.740$; $H_{NEI} = 0.746$) and weak genetic differentiation ($F_{ST} = 0.037$ con una $Nm = 6.52$); we identified two populations, whose separation most be recent (based in the geographical location of each individual and their genotypes). The most part of the variation was founded within subpopulations (96%), and not among they (4%) (AMOVA). Finally, we found evidence of recent bottleneck detectable with an analysis based on the allelic number and range, in both populations and on the total island population, furthermore, a similar effective population size, with other snakes that exhibits restricted distributions The results suggest that the genetic structure of the population on the island is result of the human presence and also, *B. constrictor* was introduced recently onto Cozumel

Key words: *Boa constrictor*, Cozumel Island, Introduction of species, genetic diversity, genetic structure, microsatellites

1. Introducción

1.1 Genética de poblaciones

La genética de poblaciones es considerada como la rama de la genética que tiene como objetivo el estudio de la variación heredada en los seres vivos, así como sus modificaciones en tiempo y espacio. Permite describir los niveles de variación genética dentro y entre las poblaciones naturales, en términos de la medición de las frecuencias alélicas y genotípicas, a su vez que trata de explicar dicha variación infiriendo las fuerzas evolutivas que pueden actuar sobre dichas poblaciones (Freeman & Herron 2002). La ley de Hardy-Weinberg es un postulado desarrollado por el matemático Godfrey Harold Hardy y el físico Wilhem Weinberg en 1908, el cual permite explicar los aspectos fundamentales de la genética de poblaciones, describiendo las condiciones genéticas de las poblaciones cuando éstas se encuentran en equilibrio, es decir, sin cambios en las frecuencias alélicas a través de las generaciones (Griffiths et al. 2004). Estas condiciones se presentan bajo ciertas premisas: poblaciones de organismos diploides, con generaciones discretas (que no se sobrelapen a través del tiempo), apareamiento al azar, tamaño de población grande (sin acción de la deriva génica), sin mutación, ni migración, ni selección. A partir de esta comparación, se pueden investigar y deducir las causas que originan que una población se desvíe de dicho equilibrio, prediciendo las fuerzas evolutivas que afectan la estructura genética en las poblaciones (Freeman & Herron 2002, Allendorf & Luikart 2006). El equilibrio de Hardy-Weinberg es expresado por el binomio:

$$(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1, p + q = 1$$

que incluye las frecuencias genotípicas esperadas en una población diploide para un solo locus, y describe la frecuencia genotípica para los homocigotos, así como la del heterocigoto:

$$\begin{aligned} p &= f(A) \rightarrow \text{frecuencia del alelo } A \\ q &= f(a) \rightarrow \text{frecuencia del alelo } a \\ p^2 &= f(AA) = D \rightarrow \text{frecuencia del genotipo } AA \\ q^2 &= f(aa) = R \rightarrow \text{frecuencia del genotipo } aa \\ 2pq &= f(Aa) = H \rightarrow \text{frecuencia del genotipo heterocigoto } Aa \end{aligned}$$

1.2 Variación genética

Se entiende por variación genética toda aquella variación dentro del material genético presente en el núcleo celular y otros organelos como mitocondrias, cloroplastos; presente en los individuos de una especie. Está determinada por su historia evolutiva y es consecuencia de las interacciones entre diferentes factores, condicionando la evolución de las poblaciones (Hedrick 2000). En aquellas poblaciones en las cuales no se produce ningún cambio en la frecuencia de alelos, se considera que no están sujetas a proceso evolutivo alguno (Freeman, 2002, Rodríguez et. al. 2004, Templeton 2006).

Las fuentes que generan variación genética en las poblaciones son mutación, migración y recombinación, mientras que la deriva génica y la selección son dos fuerzas evolutivas que reducen y modifican esa variación (Griffiths et al. 2004).

- ✓ Mutación: la mutación es la fuente fundamental de variación genética, ya que conduce a cambios directos en el genoma y a la creación de nuevos alelos en las poblaciones. Ésta se ve ligada con las características fisicoquímicas del DNA. Existen diferentes tipos de mutaciones, desde aquellas que son cambios directos en pares de bases en el DNA, hasta cambios que afectan la estructura de los cromosomas. Puesto que las tasas de mutación son típicamente pequeñas ($u = 10^{-4}$ a 10^{-6} cambios por gen por generación), el cambio de las frecuencias alélicas en el curso de unas cuantas generaciones es insignificante, pero los efectos acumulados en largos periodos son significativos (Freeman & Herron 2002, Griffiths et al. 2004).
- ✓ Migración: el flujo génico es el conjunto de procesos que resultan en el movimiento de genes de una población a otra, mediante la migración de gametos o individuos. Este flujo afecta tanto a loci nucleares como extranucleares. Se ha demostrado que un flujo génico limitado en combinación con la deriva génica, permiten la diferenciación genética entre las poblaciones, estableciendo una relación entre éste y la estructura génica (Griffiths et al. 2004, Rodríguez et al. 2004). El estadístico F es una medida de diferenciación ampliamente usada que se basa en la partición de la varianza genética intra e interpoblacional, midiendo el grado de endogamia y aislamiento en términos de distribución de la varianza genética, mediante el análisis de las frecuencias de los heterocigotos en tres niveles jerárquicos: dentro de las subpoblaciones (F_{IS}), entre subpoblaciones (F_{ST}) y en la población en conjunto (F_{IT}) (Hedrick 2000).
- ✓ Recombinación: se define como recombinación a cualquier proceso que genera un producto meiótico haploide cuyo genotipo difiere de los dos genotipos haploides

iniciales que se combinaron (Griffiths et al. 2004). Este tipo de proceso se observa durante la formación de gametos en la reproducción sexual. La recombinación permite “barajear” los genes que forman pares alélicos y repartirlos en distintas combinaciones. Al igual que como ocurre con la mutación, la recombinación se considera como una fuente de variación hereditaria (Griffiths et al. 2004).

1.3 Medición de la diversidad genética

Diversos estimadores permiten cuantificar la variación genética, además de estandarizar la información obtenida, permitiendo su análisis y comparación. Así, la heterocigosis es una medida que permite describir la variación genética en un único locus o en un número determinado de loci (Hedrick 2000). Existen diferentes estimadores de ésta:

- Estimador de la heterocigosis esperada en una población con equilibrio de Hardy-Weinberg (H_E): dado que los individuos de especies diploides presentan dos estados alélicos idénticos (homocigoto) o diferentes (heterocigoto) para un locus dado, éste permite cuantificar la proporción de individuos heterocigotos de una población determinada para un locus particular con n alelos (Hedrick 2000):

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

donde:

H_E = heterocigosis esperada

p_i^2 = proporción de homocigotos

- Estimador de la heterocigosis observada (H_O): en poblaciones con apareamiento aleatorio, la heterocigosidad observada es cercana a la heterocigosidad esperada bajo el modelo teórico, pero en aquellas poblaciones que presentan desviaciones con respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg, la hetericigosidad observada puede ser calculada como (Hedrick 2000):

$$H_O = \sum_{i < j}^n p_{ij}$$

donde:

H_O = heterocigosis observada

p_{ij} = frecuencia del genotipo ij

- Estimador de la diversidad nucleotídica (π): puede medir polimorfismo alélico basado en el número de diferencias entre los pares de alelos o haplotipos dados. Es utilizado para obtener y comparar la diversidad entre los organismos de una población, permitiendo observar la diversidad de los nucleótidos de un gen o en los aminoácidos en enzimas y otras proteínas (Gillespie 2004):

$$\pi = \frac{S_n}{n(n-1)} \sum_{i=1}^{S_n} 2 p_i^2 (1-p_i^2)$$

donde:

S_n = sitios segregantes

p_i^2 = frecuencia de uno de dos alelos en el i sitio segregante de la muestra

n = tamaño de la muestra

- Estimador del parámetro poblacional $\theta = 4Nu$ (*Theta*): existen diversos métodos para estimar este parámetro ($\theta = 2Nu$ para datos haploides), donde N es el tamaño poblacional y u es la tasa de mutación. Para ambos casos, éste permite determinar el nivel de variación bajo el modelo neutral, asumiendo que la variación del locus no influye sobre la supervivencia de genotipos (Gillespie 2004):

$$\hat{\theta} = \frac{S_n}{1 + 1/2 + 1/3 + \dots + 1/n - 1}$$

donde:

S_n = sitios segregantes (sitios de variación nucleotídica en una muestra de secuencias)

1.4 Marcadores moleculares y uso de los microsatélites

Si una población de determinada especie está bien adaptada a su ambiente y logra reproducirse con éxito, podría suponerse que en los miembros de esa población se han fijado alelos favorables y considerarse que son genéticamente idénticos. Sin embargo, el acervo genético de una población diploide posee un alto grado de heterocigosis –proporción de individuos heterocigotos en una población para un alelo– (Freeman & Herron 2002, Rodríguez-Arnaíz et. al. 2004).

Se denominan marcadores moleculares a aquellas biomoléculas, básicamente DNA o proteínas, que pueden funcionar como caracteres cualitativos o cuantitativos (relacionados con diferentes rasgos genéticos heredables), permitiendo detectar diferencias y similitudes (polimorfismos), presentes en los organismos de los que provienen. Estos marcadores permiten evaluar entonces la variación presente entre organismos de poblaciones de una especie (Avice 1994, Li 2000, Freeman et al. 2002).

Algunos de los marcadores moleculares más utilizados son: (1) aloenzimas, las cuales representan formas alélicas diferentes de un gen, mediante la expresión de formas alternativas de una enzima codificada; (2) la variación en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP's) basado en la detección de fragmentos de DNA de distinto peso molecular obtenidos con enzimas de restricción; (3) la variación en segmentos de DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD's): donde se usan primers aleatorios para amplificar áreas distribuidas al azar por el genoma (Dale & von Schantz, 2002); (4) la variación en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP's). donde se combinan el uso de restrictasas con la ligación de regiones blanco a oligonucleótidos específicos (Sterky & Lundeberg 2000); (5) la hibridación DNA-DNA y la secuenciación de DNA que permite detectar la variación entre nucleótidos de dos o más secuencias (Nei 2000, Rodríguez-Arnaíz et. al. 2004), entre otros.

Uno de los marcadores que más recientemente han sido utilizados, no sólo para estudios genéticos, sino para estudios ecológicos que involucran la estimación de tasas de migración, tamaños poblacionales, cuellos de botella, estudios de paternidad y consanguinidad, entre otros, son los microsatélites. Este marcador codominante consiste de secuencias en tándem formadas por repeticiones de 1-6 nucleótidos encontradas en alta frecuencia en los genomas nucleares en muchos taxa (también en genomas de mitocondrias y cloroplastos) (Selkoe & Tioonen 2006). Son conocidos además como repeticiones de secuencias simples (SSR), repeticiones en tándem de número variable (VNTR) y repeticiones cortas en tándem (STR). Un locus de microsatélite varía típicamente entre 5 y 40 repeticiones, de dinucleótidos, trinucleótidos o tetranucleótidos, siendo los primeros los más encontrados en un gran número de especies (Goldstein & Schlotterer 2000, Li 2000, Selkoe & Tioonen 2006). Su polimorfismo radica en las diferencias en el número de repeticiones, que permite diferenciar alelos por su longitud. Esto hace que los microsatélites sean considerados como un marcador molecular muy útil para detectar variación genética, a tal grado que es posible identificar individuos de una

población con unos pocos loci (Jarne et. al. 1996, Goldstein & Schlotterer 2000, Lougheed et al. 2000, Selkoe & Tioonen 2006)

El alto grado de polimorfismo presente en este tipo de marcadores se debe a la existencia de errores en el apareamiento durante la replicación ('slippage misparing'), generados a su vez por un alto número de repeticiones de nucleótidos cercanas entre sí, lo que provoca duplicaciones o deleciones de segmentos en el DNA y cambios en el número de repeticiones (polimorfismo en la longitud de éstos), distinguibles por electroforesis (Griffiths et al. 2004, Selkoe & Tioonen 2006). Por el contrario, las regiones que flanquean a los microsatélites están altamente conservadas en individuos de la misma especie y en ocasiones de diferentes especies, además, en estas regiones flanqueantes no ocurren dichas mutaciones (Selkoe & Tioonen 2006). Esta característica es la que permite amplificar los microsatélites mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya que los oligonucleótidos o primers utilizados en este procedimiento se sintetizan específicamente para su apareamiento con estas secuencias.

Muchos microsatélites poseen una alta tasa de mutación (entre 10^{-2} y 10^{-6} mutaciones por locus por generación), lo que genera altos niveles de variación alélica útiles para estudios genéticos en tiempo ecológico (Jarne et. al. 1996, Selkoe & Tioonen 2006). En humanos, por ejemplo, miles de loci de microsatélites han sido caracterizados generalmente con varios alelos por locus (desde cinco hasta más de 10), teniendo valores promedio de mutaciones puntuales espontáneas de alrededor de 5×10^{-4} (Awise 1994). Por lo tanto, la distribución de diferentes tamaños alélicos en los microsatélites de una población natural depende básicamente de dos factores: la historia demográfica de ésta, así como por los procesos de mutación inherentes a este tipo de repeticiones (Di Renzo et al. 1994).

1.5 Estructura genética

Se entiende por estructura genética a la cantidad y distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones de una determinada especie, y depende de diversos factores inherentes a la historia natural de las poblaciones, como la subdivisión de la población o el flujo génico entre poblaciones y subpoblaciones (Gillespie 2004). Muchas especies ocupan espacios geográficos amplios o presentan barreras físicas efectivas contra el flujo génico, por lo que no se comportan como una unidad, con apareamiento aleatorio (uno de las condiciones expresadas en el equilibrio Hardy-Weinberg). En

muchos casos existe diferenciación genética, con lo que se generan subgrupos o subpoblaciones al interior de las poblaciones (Gillespie 2004).

Debido a que la estructura genética refleja el número de alelos que son intercambiados entre y dentro de las poblaciones, el intercambio de genes entre éstas homogeniza las frecuencias alélicas, teniendo efecto sobre otros procesos evolutivos como la selección y la deriva génica (Balloux et al. 2002). El flujo genético, como se ha mencionado anteriormente, genera nuevos polimorfismos –puede incrementar el tamaño efectivo de las poblaciones-, favoreciendo la adaptación de las mismas ante cambios ambientales. Por otro lado, un alto nivel de flujo genético limita la adaptación local, al impedir que alelos favorables se fijen ante ciertas condiciones locales, lo que podría impedir a largo plazo ciertos procesos de especiación (Balloux et al. 2002, Godinho et al. 2006). Por ello, es crucial la estimación y el análisis de la estructura genética de las poblaciones para diferentes áreas de la biología, como la biología de la conservación (Slatkin 1995, Balloux et al. 2002, Freeman & Herron 2002).

1.6 Análisis de la estructura génica con respecto a modelos de mutación en microsatélites

Se han utilizado diferentes aproximaciones para estimar cuantitativamente la diferenciación en poblaciones subdivididas. Sewall Wright desarrolló los estadísticos F como medida de diferenciación, que se basa en la partición de la varianza genética intra e interpoblacional, midiendo el grado de endogamia y aislamiento, mediante el análisis de las frecuencias de los heterocigotos observados y esperados. Esta aproximación consiste en tres diferentes coeficientes de F (coeficiente de endogamia), en tres niveles jerárquicos: variabilidad total de la población (T), en subdivisiones (S) y en individuos (I) (Hedrick 2000):

- F_{ST} : también llamado índice de fijación, es la medida de diferenciación genética que compara a las subpoblaciones con la población total, permite medir el grado de divergencia entre las frecuencias alélicas de las subpoblaciones (Hedrick 2000):

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_s}{H_T}$$

donde:

H_T = Heterocigosidad esperada en el total de la población

H_s = Heterocigosidad esperada dentro de las subpoblaciones

- F_{IS} : permite medir la desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg y la diferenciación en los individuos al interior de las subpoblaciones mismas (Hedrick 2000):

$$F_{IS} = \frac{H_s - H_o}{H_s}$$

donde:

H_o = Heterocigosidad observada dentro de la subpoblación

H_s = Heterocigosidad esperada dentro de las subpoblaciones

- F_{IT} : es la medida de diferenciación de los individuos con respecto a la población en conjunto (Hedrick 2000):

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_o}{H_T}$$

donde:

H_o = Heterocigosidad observada dentro de la subpoblación

H_T = Heterocigosidad esperada en el total de la población

Si la población esta en equilibrio de Hardy-Weinberg, entonces $F_{ST} = 0$; esta definición se ajusta a un modelo de mutación de alelos infinitos (IAM), el cual supone que toda mutación crea un nuevo alelo en la población (Li 2000). Con loci tan variables como los microsatélites, tanto H_T como H_s pueden ser cercanos a 1, y con ello, F_{ST} pequeña, por lo que no considera que en dos poblaciones la heterocigosis sea alta debida a la existencia de alelos diferentes, a pesar de que la diferenciación sea clara entre ambas poblaciones (Escalante 2001). Por otro lado, dado que los loci de microsatélites poseen una tasa de mutación alta, pueden generar convergencia en el tamaño de los alelos (homoplasia), por lo que podría parecer que los alelos de dos poblaciones son iguales aunque provengan de antecesores diferentes, es decir alelos idénticos por estado pero no idénticos por descendencia. En este caso, al no considerar la identidad de los alelos por homoplasia, F_{ST} también es pequeña. Bajo este modelo de alelos infinitos (IAM), la mutación borra la memoria del estado alélico anterior, por lo que una similitud entre poblaciones con F_{ST} sólo puede ser atribuida a flujo génico o a una asociación histórica (Escalante 2001, Balloux et al. 2002).

Para el caso específico de los microsatélites, dado que éstos poseen altas tasas de mutación y además no se borra el estado alélico anterior a éste, se sugiere que es más

adecuado un estimador que se ajuste al modelo de mutación paso a paso (SMM), el cual reconoce una cierta memoria del estado alélico ancestral (Slatkin 1995, Balloux et al. 2002). En este modelo los posibles estados alélicos se visualizan como una línea o secuencia continua, donde cada mutación hace que el alelo retorne o avance en esta secuencia:

$$R_{ST} = \frac{\bar{S} - \bar{S}_W}{S}$$

donde:

S_w = Varianza promedio del tamaño de alelos en cada población

S = Varianza estimada del tamaño de alelo en todas las poblaciones

Sin embargo, a pesar de esta consideración, este modelo tampoco distingue las convergencias de tamaño de estos marcadores.

2. Antecedentes

2.1 Boa constrictor, características y distribución

Boa constrictor (Linnaeus 1758, Squamata: Boidae) es una serpiente no venenosa que puede sobrepasar los tres metros de longitud, posee un cuerpo robusto y cola relativamente corta que representa entre el 15 y 20% de la longitud del cuerpo. La cabeza es ancha, de forma triangular, cubierta de escamas granulares; presenta un hocico achatado, cuello angosto y pupilas elípticas dispuestas verticalmente, con una franja de color negro en la parte posterior de los ojos. Posee una coloración dorsal parda, con manchas oscuras de forma romboide con un centro claro, las cuales se desvanecen hacia la parte posterior del cuerpo, formando dos bandas sinuosas a lo largo del cuerpo; el vientre es generalmente claro (Lee 2000, Brambilia-Navarrete 2007, Pérez-Higareda et al. 2007).

Es un predador generalista de diversos vertebrados terrestres, variando su alimentación con la edad y tamaño. Son terrestres o arborícolas dependiendo de su hábitat. Mata a sus presas por constricción y posee hábitos principalmente nocturnos aunque puede presentar actividad diurna (Bertona & Chiaraviglio 2003, Chiaraviglio et al. 2003, Brambilia-Navarrete 2007, Pérez-Higareda et al. 2007). Posee un par de fosetas nasales entre la segunda y tercera escamas nasales, que funcionan como órganos termosensibles y facilitan la captura de presas de sangre caliente.

Es una especie vivípara que se reproduce estacionalmente, coincidiendo por lo general con la época de lluvias. Alcanza la madurez sexual entre los dos y medio y cuatro años de edad, produciendo de 10 a 20 crías por camada, con una duración de la gestación de entre 120 y 140 días. La longevidad puede ser hasta 30 años en estado silvestre. Existe un cierto dimorfismo sexual donde los machos presentan uñas o espolones queratinizados más conspicuos en la cintura pélvica (Pérez-Higareda et al. 2007), mientras que las hembras presentan un mayor tamaño corporal en comparación con los machos (Chiaraviglio et al. 2003, Álvarez-Romero et al. 2005, Boback 2006, Brambilia-Navarrete 2007). Las hembras suelen presentar colores más oscuros durante la época de gestación, lo que permite aumentar la absorción de luz solar y calor, favoreciendo el desarrollo de las crías en su interior (Bertona & Chiaraviglio, 2003).

Posee una distribución neotropical que va desde el estado de Tamaulipas en el norte de México hasta el norte de Argentina, habitando un amplio espectro de ambientes y tipos de vegetación, desde el nivel del mar hasta los 1,000 m.s.n.m. (Álvarez-Romero et

al.. 2005). Se reconocen diversas poblaciones a lo largo de su distribución, a las cuales se les a dado el *status* de subespecie (Langhammer 1983): *B. c. melanogaster*, *B. c. constrictor*, *B. c. occidentalis*, *B. c. amarali*, *B. c. imperator*, *B. c. orophias*, *B. c. nebulosa*, *B. c. sigma* y *B. c. ortonii* (Langhammer 1983, Kluge 1991, Price & Russo 1991, Rivera et al. 2005), separadas principalmente por su distribución en localidades específicas y restringidas, así como por su variación en características morfológicas externas, como el número de escamas dorsales, número de manchas dorsales y longitud total. En México, de manera natural se encuentra la subespecie *Boa constrictor imperator*, aunque análisis morfológicos recientes evidencian la necesidad de una redefinición de la situación taxonómica de ésta serpiente a nivel de subespecies en el territorio nacional (Santoyo-Brito 2007).

Boa constrictor posee poblaciones reducidas en México y está considerada en la NOM-059-2001 como una especie amenazada, principalmente por su tráfico y comercialización como mascota, así como por la pérdida del hábitat. Asimismo, está enlistada en el Apéndice II del CITES, junto con la gran mayoría de las serpientes de la familia Boidae (Bertona & Chiaraviglio 2003, Álvarez-Romero et al. 2005, Bueno et al. 2005, Brambilia-Navarrete 2007).

2.2 *Boa constrictor* y su registro en Cozumel

Se tienen registros de *B. constrictor* en varias localidades dispersas en la península de Yucatán (Crother 1999, Lee 2000). En la isla Cozumel se considera como una especie exótica, debido a que no se tienen registros de su presencia de manera natural en la isla. Por ejemplo, no hay registros de la especie en expediciones herpetológicas realizadas durante el siglo XIX ni en restos arqueológicos de fauna local (Martínez-Morales & Cuarón 1999). Con mayor certeza se cree que fue introducida en 1971, a partir de un pequeño número de individuos -de dos a 12 liberados tras la filmación de la película mexicana "El Jardín de la Tía Isabel"- (Martínez Morales & Cuarón 1999). Los primeros avistamientos de la especie en la isla son a partir de 1991, posterior a lo cual su número ha aumentado rápida y significativamente, localizándose principalmente en la región sur de la isla que cuenta con vegetación predominante de selva baja subcaducifolia (López-González 1991, Martínez-Morales & Cuarón 1999). A pesar de que la evidencia muestra la introducción de la boa a la isla por acción humana, no se excluye del todo la posibilidad de su dispersión de forma natural, ya que se conocen varias poblaciones naturales de *B. constrictor* en otras islas del Caribe, como el caso de especímenes localizados en los cayos Crawl en

Belice (Boback 2005, 2006), la isla Taboga en Panamá (Langhammer 1983), así como de diversos reportes de la aparición de poblaciones reproductivas de esta serpiente durante la década de los 90 en las islas de Aruba, Donaire y Curaçao (Quick et al. 2005), cuyas poblaciones son de origen desconocido. Es importante mencionar que no se conoce la relación exacta que tiene la población respecto a las poblaciones de la especie en el continente (Martínez Morales & Cuarón 1999).

Por su condición de isla, Cozumel es particularmente vulnerable a problemas de introducción de especies, lo que aunado a las características de rápida adaptación y de depredador generalista de *B. constrictor*, ha generado riesgos para la conservación de las poblaciones nativas de diversas especies de vertebrados terrestres endémicos de la isla, principalmente para especies pequeñas con hábitos de actividad en el sotobosque (Martínez Morales & Cuarón 1999, Álvarez-Romero et al. 2005, Romero-Nájera et al. 2007). Estudios de la ecología del forrajeo de esta serpiente indican que dentro de su dieta incluyen cuatro especies de vertebrados endémicos de la isla: *Aspidoscelis cozumela* (Squamata:Teiidae), *Oryzomys couesi cozumelae* (Rodentia: Muridae) *Reithodontomys spectabilis* (Rodentia: Muridae) y *Melanoptila glabrirostris cozumelana* (Passeriformes: Mimidae) (González Baca 2006), Asimismo su distribución es amplia, abarcando todos los tipos de vegetación presentes en Cozumel, lo que se traduce en que *B. constrictor* se considera como el vertebrado terrestre más abundante de toda la isla (Romero-Nájera 2004, Romero-Nájera et al. 2007). Además no tiene depredadores, y dado que no existen otros depredadores importantes en la isla, es altamente probable que la boa ocupe el nivel más alto de la cadena trófica, como una especie clave que produce efectos de cascada. Por ello, esta especie puede afectar la dinámica de todo el sistema insular, con una participación significativa en el decremento de las poblaciones de especies nativas de vertebrados terrestres (Romero- Nájera 2004).

2.3 Métodos moleculares como herramienta en el estudio de especies introducidas

La introducción de especies no nativas es considerada como el segundo tipo de perturbación más dañino para la conservación de la diversidad biológica a nivel mundial, sólo después de la pérdida del hábitat (Allendorf & Luikart 2007, Ficetola et al. 2007). La introducción y expansión de especies no nativas ha originado una crisis global para la conservación de la biodiversidad en la mayor parte de los ecosistemas terrestres y acuáticos, debido a que este tipo de perturbación afecta seriamente la dinámica de los

mismos (Guretvitch et al. 2004). Cuando una especie es introducida a un nuevo hábitat, ésta actúa como un agente de selección nuevo sobre los taxa nativos en el ecosistema, a la vez que experimenta presiones de selección diferentes a aquellas en su distribución nativa.

En general es reconocido que existen especies que tienen una mayor susceptibilidad a ser especies invasoras, ya sea porque tienen predisposición de ser transportadas por seres humanos, tienen una amplia área de distribución o abundancia en su hábitat de origen, son competidores o depredadores altamente efectivos, poseen alta capacidad de dispersión, entre otros (Gaines 2005, Suarez & Tsutsui 2008). Las islas oceánicas y las continentales (fragmentos de hábitat) son particularmente vulnerables a dichas introducciones (Romero-Nájera 2004).

Una invasión biológica se conforma de varias etapas: la formación de miembros fundadores o propágulos provenientes de su distribución original, la transportación e introducción de éstos a un nuevo ambiente, una fase "lag" de establecimiento, crecimiento exponencial y expansión en la que pueden ocurrir además cambios genéticos importantes, como hibridación con especies nativas emparentadas o con miembros de la misma especie (en un caso de múltiples introducciones), así como la adquisición espontánea de nuevas características generadas por duplicación genética o cromosómica (Suarez & Tsutsui 2008). La supervivencia y proliferación de estos propágulos requiere de la adaptación rápida a su nuevo ambiente, la cual puede ser mediada en muchos casos por otras prácticas antropogénicas, ya que al llegar a ambientes perturbados se facilita el desplazamiento de las especies nativas.

Típicamente, durante la invasión las especies introducidas o invasoras pasan por un periodo donde presentan un tamaño poblacional pequeño, lo que resulta en una disminución de la diversidad genética (cuello de botella). Esta disminución de la diversidad dependerá de factores como la duración de este cuello de botella, la velocidad en el crecimiento poblacional en el nuevo hábitat, el tamaño poblacional inicial, así como si existieron diferentes eventos de invasión (Ficetola et al. 2007, Suarez & Tsutsui 2008). Esto conlleva principalmente a la fijación de versiones alélicas y/o haplotipos raros o poco frecuentes en la distribución natural (Ficetola et al. 2007). Asimismo, la conservación o pérdida de diversidad genética puede relacionarse con la capacidad de la especie introducida para colonizar el nuevo hábitat, ya que la pérdida de dicha diversidad durante un cuello de botella limitará el potencial adaptativo, disminuyendo su adecuación (Colautti et al. 2006, Drake 2006, Dlugosch & Parker 2007).

Los diferentes análisis genéticos, así como varias técnicas utilizadas por la biología molecular, con herramientas importantes en el estudio de estas invasiones, no sólo para conocer información acerca del número de organismos introducidos y su fuente de origen, sino para evaluar aspectos básicos de la genética de la conservación y la biología evolutiva: ¿Cuánta variación genética se necesita para que una población se establezca exitosamente en un nuevo hábitat? ¿A qué mecanismos de selección se ve sometida una población bajo estas condiciones de introducción? (Sax et al. 2005, Allendorf & Luikart 2007, Suarez & Tsutsui 2008). Cabe mencionar que es indispensable identificar los vectores y las fuentes de origen de los organismos introducidos para seleccionar o desarrollar estrategias efectivas de manejo, control y prevención de estas introducciones (Sax et al. 2005, Suarez & Tsutsui 2008).

3. Objetivos

- Estimar la diversidad genética de *Boa constrictor* en la isla Cozumel, Quintana Roo
- Evaluar si existe estructura y diferenciación genética de la boa, considerando su amplia distribución en la isla
- Analizar si es detectable un cuello de botella de la población isleña, como una evidencia de la introducción antropogénica de *B. constrictor* en Cozumel

4. Hipótesis

- *B. constrictor* en Cozumel presentará una variabilidad genética baja, principalmente en términos de diversidad alélica, debido a su probable origen a partir de un reducido número de individuos (dos a 12)
- Presentará poca diferenciación genética y una baja estructuración, resultado de la probable reciente introducción (1970's) a la isla

5. Justificación

Como se ha resaltado con anterioridad, la introducción de especies exóticas a un ecosistema es considerado como un tipo de perturbación altamente agresivo, ya que muchas de las especies introducidas se vuelven competidores o depredadores de las especies nativas, lo que, aunado a otras perturbaciones como la pérdida de hábitat, puede resultar en el desplazamiento y extinción de las especies nativas a nivel local (Martínez Morales & Cuarón 1999, Romero-Nájera 2004, Allendorf & Luikart 2007, Romero-Nájera et al. 2007). Asimismo, los ecosistemas insulares se caracterizan por poseer un alto grado de endemismos, generado precisamente por su aislamiento geográfico, por lo que las especies nativas son altamente vulnerables, ya que poseen características particulares como tamaños poblacionales reducidos y una escasa o nula migración con congéneres continentales (Romero Nájera 2004, Allendorf & Luikart 2007).

Así, la introducción de una pequeña población fundadora en una nueva localidad, mediada por actividades antropogénicas, provee una rara oportunidad de evaluar y

analizar procesos evolutivos rápidos, pudiendo comparar estos eventos antropogénicos con respecto a aquellas colonizaciones o expansiones naturales del hábitat de una especie. Existen ejemplos recientes que demuestran la extinción de vertebrados terrestres en ecosistemas insulares mediados por la introducción de especies exóticas: la desaparición del roedor endémico *Peromyscus guardia* en la Isla Estanque en el Mar de Cortés (Vázquez-Domínguez et al. 2004) resultado de la introducción de un único gato doméstico; la especie del género de lagartijas *Anolis* más abundante en Puerto Rico, *A. cristatellus*, introducida a la República Dominicana, ha generado un decremento en las poblaciones de otras especies del mismo género, endémicas de esa isla (Kolbe et al. 2007, Eales et al. 2008); *Rana ribidunta*, introducida al Reino Unido a principios del siglo XIX, ha desplazado a varias especies de anfibios nativos de esas islas (Suarez & Tsutsui 2008). Más del 70% del total de las extinciones de mamíferos a nivel mundial durante los últimos 500 años han ocurrido en regiones insulares, principalmente las Islas del Mar Caribe (Sax et al. 2005, Vega et al. 2006), mientras que otras estimaciones afirman que el 93% de especies de anfibios y reptiles extintas fueron especies insulares cuya extinción, en muchos casos, fue ocasionada o relacionada con la introducción de especies exóticas (Álvarez-Romero et al. 2008).

En el caso contrario, enfocándose principalmente en la herpetofauna de México, estudios recientes señalan que existen 11 especies de anfibios y reptiles reportadas como introducidas, en la mayoría de los casos de manera intencional, como en el caso particular de la rana toro (*Rana castesbeiana*), originaria del la costa este de los Estados Unidos, criada para ser utilizada como alimento en diferentes estados del país (Álvarez-Romero et al. 2008, Romero-Mayen 2008).

Es importante confirmar si *B. constrictor* es una especie introducida a la isla Cozumel, entre otras cosas porque ello determinaría el tipo de manejo que debe llevarse al cabo de la especie para proteger la diversidad biológica nativa de la isla. De ello también dependería si es necesario realizar campañas de erradicación de la boa en la isla (Álvarez-Romero et al. 2005).

6. Materiales y métodos

6.1 Sitio de estudio

Cozumel (del maya Cuzam, golondrina; lumil, asiento o tierra: Cuzamil, tierra de golondrinas) es una isla de origen coralino, ubicada en el Caribe Mexicano, al noreste de la península de Yucatán, en el estado de Quintana Roo. Posee una superficie de 480 km² y es considerada como la mayor isla habitada del territorio mexicano, ocupando el 10% del territorio insular del país. Se localiza a una distancia aproximada de 17.5 km de la región continental. No presenta ríos superficiales pero posee corrientes subterráneas de agua dulce y salobre, así como humedales, aguadas y cenotes, estos últimos constituyen el principal acceso a los depósitos subterráneos de agua (Romero-Nájera 2004, González-Baca 2006, Fuentes-Montemayor 2007).

Presenta un clima cálido húmedo con una temperatura media de 25.5°C y una precipitación media anual de 1,505 mm con precipitaciones fuertes en verano y menores en invierno; el período más calido del año se presenta de mayo a septiembre, mientras que el período más frío caracterizado por la presencia de vientos del norte, va de diciembre a febrero (Bautista-Denis 2006, Fuentes-Montemayor 2007).

Cozumel es una de las regiones mejor conservadas del estado de Quintana Roo. Hasta el 2004 tenía cerca del 90% de la cubierta vegetal original, presentando como tipo de vegetación predominante la selva mediana subcadocifolia que ocupa un 65% de la cobertura vegetal total. Otros tipos de vegetación se encuentran en proporciones menores: manglar con un 16%, selva baja subcaducifolia 6%, Tasistal 2% y dunas costeras (<1%) (Téllez-Valdés & Cabrera Cano 1987, Téllez-Valdés et al. 1989, Romero Nájera 2004, González Baca 2006). La vegetación secundaria se presenta en áreas con perturbación natural, así como en áreas transformadas por la actividad humana, como en bordes de caminos y carreteras (Perdomo Hernández 2006, Barillas-Gómez 2007).

En Cozumel existen 27 taxa de vertebrados endémicos, cuatro especies y 15 subespecies de aves, una especie de reptil (*Aspidoscelis cozumela*), así como tres especies y cuatro subespecies de mamíferos. Es la isla con mayor riqueza de herpetofauna en México con 33 especies, de las cuales 13 están dentro de alguna categoría de riesgo (Cuarón et al. 2004, González-Baca 2006).

Los huracanes son considerados como uno de los factores ecológicos más importantes que afectan la estructura y composición de las selvas en el Caribe. Cozumel

en particular se encuentra en la zona de más alta incidencia de huracanes en México. Hasta 1995, la frecuencia general de huracanes en la isla era de uno cada 6.2 años, y la frecuencia de huracanes categoría 5 era de uno cada 124 años, sin embargo, en los últimos años Cozumel ha sido afectada por la llegada de diversos huracanes de gran intensidad: Gilberto en 1988 (categoría 5), Roxanne en 1995 (categoría 3), Emily y Wilma en 2005 (categoría 5) (Fuentes-Montemayor 2007).

Cozumel alberga varias especies introducidas: *Rattus rattus*, presente preponderantemente en zonas urbanas, la cual es portadora de enfermedades y tiene además la capacidad de desplazar a las especies de roedores nativas. Se encuentran poblaciones de perros y gatos ferales, relativamente abundantes, que podrían estar ocasionando serios problemas para la supervivencia de la fauna endémica y nativa de Cozumel, principalmente en aquellas especies que por su tamaño son presas potenciales, así como por la transmisión de enfermedades y parásitos (Torres-Villegas 2006, Fuentes-Montemayor 2007). Otro problema particular para las especies endémicas es la introducción de congéneres continentales, principalmente problemático para los carnívoros por ser las especies que más tradicionalmente se utilizan como mascotas, ya que su introducción y liberación puede ocasionar hibridación con las especies endémicas (González-Baca 2006).

6.2 Trabajo de campo y obtención de muestras

Las muestras utilizadas en este trabajo (Anexo 1) proceden de tres tipos de colecta: (i) recorridos a través de la carretera perimetral que rodea a Cozumel y la carretera transversal que cruza la isla, de julio de 2001 a diciembre de 2003, donde se dividió el continuo de las carreteras en cinco tramos de 10 km cada uno (Fig. 1); estos recorridos se realizaron principalmente durante estudios de distribución, abundancia y ecología de forrajeo de la boa (Romero-Nájera 2004, González-Baca 2006); (ii) colectas generadas por encuentros ocasionales al realizar el monitoreo o muestreo de otros organismos estudiados en la Isla (julio de 2001 a marzo de 2008); (iii) muestras provenientes de boas reportadas por la población de la zona urbana de San Miguel Cozumel a Protección Civil y al Departamento de Bomberos, los cuales retiraron a las serpientes de las viviendas y construcciones donde se encontraban.

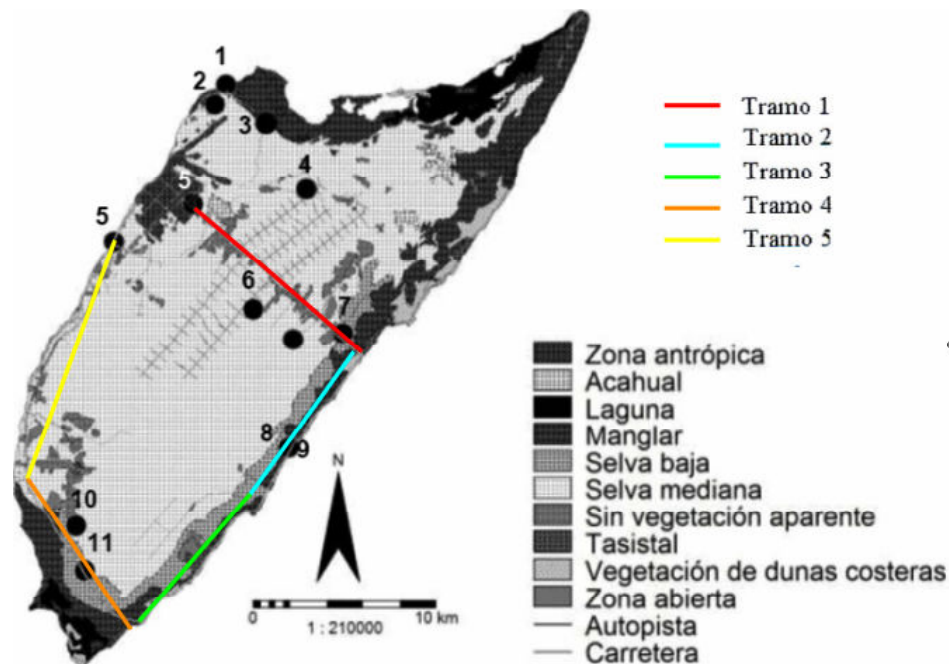


Figura 1. Ubicación de los tramos de carretera utilizados durante las colectas específicas de boas en Cozumel, así como algunos de los puntos de encuentro ocasional de boas (modificado de Romero-Nájera 2003)

Se obtuvieron diferentes tipos muestras de tejido: porciones de la punta de la cola, esqueletos, exhubias, muestras de músculo o piel, así como sangre. El tipo de muestra dependió del estado en que se encontró al organismo (vivo o muerto), así como su grado de descomposición en el caso de organismos muertos. Puntas de cola y pedazos de músculo fueron preservadas en buffer de lisis, etanol al 70% o al 97%, mientras que muestras de hueso, piel y exhubias fueron deshidratadas y preservadas en seco y en refrigeración a 4°C. En su mayoría, las boas utilizadas para este estudio fueron halladas muertas, atropelladas a la orilla de la carretera.

6.3 Trabajo de laboratorio

6.3.1 Extracción de DNA

Para la extracción de DNA a partir de las muestras colectadas se utilizaron tres kits comerciales (Anexo 2), determinado principalmente por el tipo de tejido utilizado para la extracción. Para el caso de tejido fresco, se prefirió el uso del Aquapure Genomic DNA

Isolation Kit (Biorad®); para hueso, exhubia y tejidos preservados en etanol se prefirió en uso del Quick Gene DNA Tissue Kit S (Fujifilms Life Sciences®), para sangre se utilizó el Quick Gene DNA Whole Blood Kit S (Fujifilms Life Sciences®) y para muestras escasas o que no se pudieron extraer con los otros kits, se utilizó el DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen®). Para verificar la integridad, cantidad relativa y calidad del DNA extraído, se realizaron visualizaciones de la extracción de cada uno de los individuos, en geles de agarosa al 1%, teñidos en bromuro de etidio al 5% y examinados bajo luz ultravioleta, (Anexo 2.1) comparando directamente con marcadores de peso molecular (VC 100bp Plus DNA Ladder Vivantis®).

6.3.2 Estandarización de PCR

En este caso se probaron varios pares de oligonucleótidos o primers específicos y no específicos. Hille et al. (2002) mencionan la amplificación heteróloga exitosa de varios microsatélites probados en varias familias de serpientes; de estos se seleccionaron seis pares de primers polimórficos que Hille et al. (2002) indican en su artículo que amplifican con *B. constrictor* (Ns μ 2, Ns μ 3, Ts1, Ts4, Hb2 y Hb30). Por otro lado, se utilizaron cuatro pares de oligonucleótidos diseñados específicamente para *B. constrictor imperator*: *Bci-14*, *Bci-19*, *Bci-21* y *Bci-23* (Booth et al. En revisión); finalmente, se probaron primers diseñados para la boa amarilla de Jamaica, *Epicrates subflavus* (Tzika et. al. 2008a, Tzika et al. 2009), cuya amplificación fue probada y estandarizada para *B. constrictor* (μ sat1 y μ sat36) por el Dr. Warren Booth de la North Carolina State University y colaboradores.

Las optimizaciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se llevaron a cabo en volúmenes de 7.5 μ L utilizando el kit comercial Taq DNA Polymerase Recombinant Vivantis®. Estas modificaciones consistieron principalmente en cambios de la concentración de MgCl₂, primer y DNA (Anexo 4), así como probando diferentes combinaciones de temperatura de alineamiento y número de ciclos de PCR para el caso de los primers no específicos. En cada experimento de PCR realizado, se utilizó un control negativo (usando agua bidestilada en lugar de DNA). Se visualizaron los productos de PCR de varios individuos en geles de agarosa al 1.5% (Anexo 3.1).

Para los primers *Bci-19* y *Bci-21*, de los cuales no se tenía certeza de su polimorfismo, se realizó un análisis preliminar de los productos de PCR por medio de electroforesis vertical en geles de poliacrilamida (PAGE) al 12.5%, teñidos con nitrato de plata al 2% (Anexo 3.2). Estas pruebas se realizaron analizando el producto de PCR de 25 individuos provenientes de la isla, comparando “a ojo” las bandas de alelos con

respecto al marcador de peso molecular (DNA Micro Marker Amresco® y VC 100bp Plus DNA Ladder Vivantis®), para así determinar la presencia de dos o más alelos en la muestra.

6.3.3 Secuenciación y genotipado de microsatélites

A excepción del marcador *Bci-19*, para todos los demás casos se utilizaron primers fluorescentes; para cada par de primers se tuvieron diferentes condiciones de concentración de $MgCl_2$, primer y DNA, así como de temperatura (Anexo 4). Los productos de PCR de seis loci marcados (*Ts4*, *Hb2*, *Hb30*, *Bci-14*, *Bci-21* y $\mu sat1$) fueron analizados en un secuenciador ABI Prism 3730xl Analyzer (Applied Biosystems®), con el servicio de secuenciación de la Universidad de Illinois, mientras que cuatro de los loci restantes ($Ns\mu2$, $Ns\mu3$, *Bci-23* y $\mu sat36$), fueron analizados en un secuenciador ABI Prism-Hitachi 3100 Analyzer (Applied Biosystems®), del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM. En ambos casos se adicionó como marcador de peso molecular la escalera ROX 500 Size Standard (Applied Biosystems®).

El genotipado se obtuvo con la lectura de los cromatogramas en el programa GeneMapper V.4.0 (Applied Biosystems®), por medio de la comparación directa en el tamaño de los alelos del producto de PCR correspondiente, con la escalera interna del programa, GS500.

6.4 Análisis genéticos y estadísticos

6.4.1 Definición de subgrupos en una población con muestreo continuo

Un enfoque tradicional de la genética de poblaciones consiste en la partición *a priori* de una población en subdivisiones denominadas subpoblaciones, generalmente originadas por métodos de muestreo en diferentes sitios. La correcta subdivisión es importante para la estimación y análisis de la estructura genética, ya que en poblaciones con una distribución continua, por ejemplo, esta subdivisión puede resultar arbitraria o errónea (Balloux et al. 2002)

Dado que *B. constrictor* se encuentra ampliamente distribuida en Cozumel (Romero-Nájera 2004, González-Baca 2006) y presenta una distribución homogénea que pareciera independiente del tipo de vegetación, aunado al hecho de que el muestreo fue a lo largo de carreteras o delimitado por la presencia de caminos (Fig. 2), se obtuvo una partición de

la población global definida por los propios datos (i.e. no definida *a priori*). Para ello se utilizó el programa Geneland 3.1.4 (Guillot et al. 2005a, 2005b, Guillot 2009), el cual permite detectar el número de “poblaciones” presentes en una determinada área, así como la ubicación de discontinuidades genéticas entre las mismas. Este programa utiliza la plataforma de análisis estadístico R y está basado en una combinación de diferentes algoritmos tipo MCMC (Monte Carlo-Cadena de Markov), lo que permite la asignación de individuos a partir de sus coordenadas geográficas y de los genotipos multilocus de cada individuo. Trabaja además bajo la premisa de la presencia de un K número de poblaciones dentro del área geográfica delimitada Δ , ocupada por los individuos muestreados. El programa genera mapas de la ubicación de estas poblaciones, a partir de la creación de polígonos de Voronoi, que son asociados a cada individuo. Así, la delimitación de las poblaciones a partir de la unión de estos polígonos depende directamente de la probabilidad de cada individuo de pertenecer a una población u otra.

En este caso en particular se eligió la combinación de modelos, dentro de las opciones que da el programa, que más se adecuara a los datos; se trató a las frecuencias alélicas bajo el modelo F, el cual asume una correlación de las frecuencias alélicas de cada población vía la existencia de una población hipotética ancestral (F-model, allelic frequencies correlated; Falush et al. 2003, Guillot 2005a). Asimismo, se consideró un modelo espacial verdadero, el cual asume la existencia de una delimitación espacial entre las poblaciones (Spatial Model TRUE, Guillot et al. 2005a). Esta combinación de modelos es recomendable para aquellos datos que sugieran una diferenciación espacial entre las poblaciones debida a rasgos en el paisaje, tanto naturales como generados por el hombre (e.g. carreteras y zonas habitadas en el caso de Cozumel), así como para aquellos datos donde se espera una baja diferenciación genética relacionada con un evento ecológico reciente (Guillot et al. 2008).

Para la determinación de K número de “poblaciones” se realizaron cinco corridas independientes con 500,000 iteraciones, *thinking* = 100 y un *burnin* = 100, utilizando $K=10$, $K=5$ y $K=3$ en cada ensayo. Una vez obtenido el parámetro del número máximo de posibles “poblaciones”, que en este caso fue de tres, se prosiguió con la asignación de los individuos a cada una de éstas, mediante la generación de 15 corridas independientes con 1,000,000 de iteraciones cada una, un *thinking* = 100 (se escoge una de cada 99 cadenas a lo largo de la corrida) y *burnin* = 1,000 (se consideran los datos de 1,000 cadenas seleccionadas para generar los gráficos). Para el procesamiento de los gráficos y

mapas, se empleó la opción de 100 píxeles para el eje x y 200 píxeles para el eje y. Todas las corridas fueron realizadas bajo la combinación de modelos anteriormente descritos.

6.4.2 Asignación de individuos

Se realizó además un análisis de asignación debido a que 11 de los 64 individuos utilizados para este estudio no tenían datos precisos referentes a las coordenadas geográficas de su ubicación o al sitio de colecta. Este análisis se realizó con el programa GeneClass 2.0 (Piry et al. 2004), el cual analiza el genotipo multilocus de cada individuo para determinar a qué población es más probable que pertenezca el genotipo de cada individuo, con base en las frecuencias genotípicas que se presenten en las poblaciones de referencia, en este caso, las poblaciones obtenidas con el análisis utilizando el programa Geneland descrito con anterioridad.

6.4.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg

En una población natural, las frecuencias genotípicas necesitan ser comparadas con las de una población ideal “esperada” para conocer si ésta se encuentra o no en equilibrio de Hardy-Weinberg. Para ello se requieren estadísticos que permitan inferir qué tan “suficientemente” semejantes o diferentes son las frecuencias reales de las teóricas. Los métodos de comparación de frecuencias genotípicas se clasifican en dos grandes grupos: pruebas de bondad de ajuste (Hedrick 2000, Freeman & Herron 2002, Allendorf & Luikart 2007) y pruebas exactas (Chapco 1976). Se ha observado que las pruebas de bondad de ajuste, como la χ^2 , pueden conducir a una falsa aceptación o rechazo del equilibrio Hardy-Weinberg cuando los tamaños de muestra son pequeños, cuando existen frecuencias alélicas bajas o cercanas a cero, o cuando se trabajan con loci hipervariables que presentan 10 o más alelos (Guo & Thompson 1992).

Así, se analizó la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg con el programa GenePop 4.0 (Raymond & Rousset 2007) realizando una prueba exacta a partir de un método de cadenas de Markov (Guo & Thompson 1992) para cada locus por población. En este mismo análisis se obtuvo el coeficiente de endogamia (F_{IS}) por el método de Weir y Cockerham para cada locus por población, conocido también como coeficiente de fijación, y que se define como la probabilidad de que dos alelos en un individuo sean idénticos por descendencia; un valor positivo indica una deficiencia de heterocigotos y un valor negativo indica un exceso (Hartl & Clark 1997, Hedrick 2000). La hipótesis nula para esta prueba es la “unión aleatoria de los gametos”, que es rechazada cuando el valor

de probabilidad estadística es $P \leq 0.05$. Se realizaron 1,000 dememorizaciones, 200 “batch” y 100 iteraciones. Para determinar la probabilidad de rechazo de la hipótesis nula se ajustó la probabilidad de error tipo I (falso positivo) mediante la corrección secuencial de Bonferroni (Rice 1988), que permite evaluar la significancia de los valores P a partir de un nivel de significancia dado ($\alpha = 0.05$) y respecto a un número de k comparaciones. Para realizar la corrección, los valores de P se ordenan de menor a mayor ($P_1 < P_2 < \dots < P_i$). Si $P_1 \leq \alpha/k$, se rechaza la hipótesis nula y se prosigue con el segundo valor más pequeño. Si $P_2 \leq \alpha/(k-2+1)$ se rechaza nuevamente la hipótesis nula y se prosigue con el siguiente valor $P_i \leq \alpha/(k-i+1)$ sucesivamente hasta que se acepta la hipótesis alternativa. Este tipo de corrección elimina los valores de significancia asignados por el azar y puede ser utilizada cuando se tienen comparaciones múltiples (Rice 1989, Koen et al. 2005).

6.4.4 Desequilibrio de Ligamiento

El desequilibrio de ligamiento consiste en la asociación no aleatoria entre alelos de diferentes pares de loci (Hedrick 2000, Allendorf & Luikart 2007). Éste puede ser generado por la combinación de diversos factores incluyendo la cercanía física de los loci en el cromosoma, epistasis, “arrastre genético” (hitch-hiking), migración o unión entre poblaciones, así como por deriva génica (Nei & Li 1972, Freeman & Herron 2002, Allendorf & Luikart 2007), lo que impide la segregación independiente entre alelos. Debido a estas características, el desequilibrio de ligamiento puede proveer información sustancial acerca de la historia evolutiva y demográfica de las poblaciones, así como permitir la ubicación espacial de los loci en los cromosomas (Excoffier & Slatkin 1998).

La ocurrencia de desequilibrio se evaluó con el programa GenePop 4.0, analizando todas las combinaciones de pares de loci utilizados, bajo la hipótesis nula de que “los genotipos entre cada locus son independientes uno de otro”, con $P \leq 0.05$ y con la corrección de Bonferroni secuencial respectiva.

6.4.5. Diversidad genética

Para la estimación de la diversidad genética presente al interior y entre las poblaciones, se tomaron en cuenta varios parámetros que permiten describirla: el número observado de alelos (n_o), el número efectivo de alelos (n_e), la heterocigosis observada (H_o), la heterocigosis esperada (H_e) y la heterocigosidad de Nei (H_{NEI}). El número observado de alelos se considera como un parámetro muy útil, ya que es sensible a la pérdida de la diversidad genética en poblaciones pequeñas. El número efectivo de alelos

se considera como el número de alelos que son igualmente frecuentes en una población ideal, los cuales producirían la misma heterocigosidad observada en la población actual (Allendorf & Liukart 2007), y es calculado como el inverso de la homocigosidad esperada.

Nei desarrolló una medida de diversidad genética basada en la heterocigosidad esperada, con una corrección apropiada para tamaños poblacionales pequeños:

$$H_{NEI} = \frac{2N}{2N-1} \left(1 - \sum_{i=1}^n p_i^2\right)$$

donde N es el tamaño de la muestra y p_i^2 es la proporción de individuos homocigotos (Hedrick 2000). Estos parámetros fueron obtenidos con el programa GenAlEx v.6 (Peakall & Smouse 2006).

Para determinar si existe una diferencia significativa entre la heterocigosidad observada para los loci de las poblaciones, se llevó a cabo el método de comparación entre valores de H_o de Nei y Kumar (2000). Este consiste en el cálculo de la diferencia genética del i ésimo locus entre las poblaciones X y Y (Faria et al., 2008): $d_i = h_{xi} - h_{yi}$, donde h_{xi} es la heterocigosidad observada del locus i en la población X , y h_{yi} es la heterocigosidad observada del locus i en la población Y , para todos los loci polimórficos. El promedio (d) y la varianza $V(d)$ se obtienen como:

$$\bar{d} = \frac{\sum_{i=1}^{L'} d_i}{L'}$$

$$V(d) = \frac{\sum_{i=1}^{L'} (d_i - \bar{d})^2}{[L'(L'-1)]}$$

donde L' es el número de loci polimórficos.

El grado de significancia de cada diferencia entre los valores de heterocigosidad en diferentes poblaciones, puede ser probado por una prueba de t :

$$t_{L-1} = d/s(d)$$

donde $L-1$ son los grados de libertad, $s(d)$ es la raíz cuadrada de cada $V(d)$.

6.4.6 Diferenciación alélica y genotípica

Se evaluó la diferenciación alélica y genotípica entre poblaciones con el programa GenePop 4.0, donde la hipótesis nula es que la distribución alélica y genotípica es la misma en las diferentes poblaciones. La prueba se hizo por poblaciones pareadas para cada locus y con todos los loci en conjunto. Los valores P se obtuvieron mediante dos pruebas: 1) prueba de Fisher (Raymond & Rousset 1995) para el caso de la diferenciación alélica y 2) una prueba de G (Goudet et al. 1996) para la diferenciación genotípica. Nuevamente se empleó la corrección de Bonferroni secuencial.

6.4.7 Estructura genética

Como se ha mencionado anteriormente, el grado de endogamia que resulta de la fragmentación de una población puede ser usado como medida de la estructuración y diferenciación entre poblaciones. Se obtuvieron los estadísticos F de Wright (Weir & Cockerham 1984, Weir & Hill 2002) en sus tres niveles jerárquicos (F_{IS} , F_{IT} , F_{ST}) describir la distribución de la diversidad genética dentro y entre poblaciones. Estos índices se obtuvieron por locus con el programa FSTAT 2.9.3 (Goudet 2002).

Otro análisis que se realizó para la evaluación de la estructura genética fue un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA; Excoffier et al. 1992, Hartl & Clarck 1997), que utiliza métodos permutacionales, basados en las diferencias entre sumas de cuadrados de pares de observaciones, generando una matriz de distancias cuadráticas de varianza molecular a diferentes niveles jerárquicos de agrupación (diferencias entre poblaciones y entre los individuos). Este análisis se realizó con el programa Arlequin 3.1 (Excoffier et al. 2006), utilizando 30,000 permutaciones. Se calculó F_{ST} como estimador de las diferencias alélicas entre poblaciones y su análogo R_{ST} , que como ya se mencionó, es más adecuado para los microsatélites, ya que está basado en la varianza de los tamaños alélicos.

El flujo genético o migración es un aspecto importante relacionado directamente con el grado de estructura y diferenciación genética, el cual puede ser medido indirectamente por el número de migrantes (Nm), calculado a partir de las diferencias alélicas entre las poblaciones y utilizando los estimadores F_{ST} y R_{ST} con la fórmula $Nm = [(1/F_{ST}) - 1] / 4$ (según Wright 1965, Hedrick 2000, Gillespie 2004). Este parámetro se obtuvo con Arlequin 3.1.

Un método que permite estudiar la diferenciación entre las poblaciones y comparar las frecuencias alélicas observadas y esperadas para cada locus, es el cálculo de la distancia genética (Aranguren-Méndez et al. 2005), que mide el grado de diferenciación

existente entre pares de poblaciones o especies, permitiendo además, la estimación de tiempos de divergencia entre éstas y la construcción de dendrogramas. Un tipo de distancia ampliamente utilizada para marcadores acordes al modelo de mutación SMM como los microsatélites es la distancia de Nei (D_N ; Nei 1972, Reynolds et al. 1983, Nei & Takezaki 1994), definida como:

$$D_N = -\ln(I_N)$$

donde I_N es el índice de similitud o identidad genética de Nei (Nei 1972), que se define como:

$$I_N = \sum_{i=1}^m (P_{ix} P_{iy}) / [(\sum_{i=1}^m P_{ix}^2)(\sum_{i=1}^m P_{iy}^2)]^{1/2}$$

donde P_{ix} es la frecuencia del alelo i en la población x y P_{iy} es la frecuencia del alelo i en la población y , m es el número de alelos presentes en el locus. El valor de la distancia genética es inversamente proporcional a la identidad o similitud genética (Hedrick 2000).

Para complementar el análisis de la distancia genética entre las poblaciones de Cozumel, se incorporaron los genotipos de individuos de *B. constrictor* provenientes del continente, específicamente de los estados de Yucatán (7 individuos), Campeche (3), Tabasco (3) y Jalisco (5), y se estimó a su vez la distancia genética entre estas poblaciones y las de Cozumel. Posteriormente se construyó una matriz de distancias genéticas con la que se obtuvo un árbol de Neighbour-Joining (N-J), utilizando la paquetería de programas PHYLIP v.3.68 (Felsenstein 2008). Este método de agrupación encuentra pares de unidades taxonómicas operacionales (OTU's), las cuales en este caso son las distancias pareadas de cada población, minimizando las distancias de las ramas del árbol durante cada paso del proceso de agrupamiento, partiendo de una topología de estrella. Para obtener el nivel de soporte entre las ramas de las diferentes poblaciones en el árbol de N-J, se realizó un "bootstrap" con 1,000 réplicas. Cabe señalar que las localidades fuera de Cozumel sólo se utilizaron para el análisis de distancia, y no para los otros realizados en este trabajo, debido a su reducido tamaño de muestra.

Adicionalmente, se realizó un análisis factorial de correspondencias (AFC Benzécri 1973) con el programa Genetix 5.1.26 (Belkhir et al. 2004). El AFC permite analizar datos cualitativos a partir de la construcción de tablas de contingencia. Los objetos analizados, en este caso los individuos, son vistos como una nube de puntos en un hiperespacio con

tantas dimensiones como número de alelos existan. El algoritmo del programa busca la dirección en el hiperespacio en la cual los datos producen un elongamiento máximo o inercia. En este caso, para tomar en cuenta el genotipo de cada individuo, a cada uno de los alelos en los diferentes loci se les asigna un valor de 0 para la ausencia, 1 para el estado heterocigoto y 2 para el estado homocigoto (Belkhir et al. 2004). Específicamente el análisis factorial de correspondencias se hizo sobre las poblaciones ('AFC sur populations'), ya que permite manipular el centro de gravedad de las muestras y visualizar así más fácilmente la posición de los individuos en las nubes de puntos (Belkhir et al. 2004).

6.4.8 Alelos Nulos

Se considera como alelo nulo a aquellas versiones alélicas que no generan algún producto identificable (Hedrick 2000). En términos de loci microsatélites, éstos son resultado de mutaciones en las regiones flanqueantes al motivo, que impiden la unión de los primers a dicha región (Brookfield 1996, Allendorf & Luikart 2007) y por ende su amplificación, lo que genera que los heterocigotos con un alelo nulo sean analizados como homocigotos. Ello puede generar un aparente exceso de homocigotos y desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg. Se utilizó el programa Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004) para detectar la presencia de alelos nulos, con un intervalo de confianza de 95% y 1,000 repeticiones.

Este programa también corrige las frecuencias alélicas y genotípicas en caso de encontrar alelos nulos. Se eligió el estimador Brookfield 1 (Brookfield 1996), el cual supone que no existen homocigotos con alelos nulos y permite descartar las muestras que no amplificaron debido a DNA degradado o poca cantidad de DNA templado, así como detectar errores en el genotipado (Van Oosterhout et al. 2004). La heterocigosidad observada es calculada como n_2/n_1+n_2 , donde n_1 es el número de individuos con una sola banda y n_2 el número de individuos con dos bandas, mientras que la heterocigosidad esperada es la sumatoria del producto de las frecuencias alélicas observadas.

Adicionalmente a este análisis, con el programa Free-Na (Chapuis & Estoup 2007) se estimó la F_{ST} de Weir (1996) mediante el método ENA (Excluding Null Alleles; Chapuis & Estoup 2007), el cual permite corregir cualquier efecto generado por la presencia de alelos nulos. Otro método implementado en el programa es el INA (Including Null Alleles; Chapuis & Estoup 2007), con el cual se obtiene una base de datos con los genotipos corregidos, y a partir del cual se estimó la distancia genética de Cavalli-Sforza y Edwards

(D_{C-S} , 1967) en el programa GeneClass 2. Este tipo de distancia geométrica es ampliamente utilizada para marcadores codominantes (como los microsatélites) sin asumir suposiciones biológicas (Cavalli-Sforza & Edwards 1967):

6.4.9. Parentesco, cuello de botella y tamaño efectivo

La capacidad de inferir las relaciones genealógicas (parentesco) entre los individuos de una población es una herramienta importante con amplias aplicaciones en los estudios evolutivos y de conservación (Blouin 2003). Los métodos para el análisis de parentesco se pueden dividir en dos grandes categorías: (i) métodos de “conectividad” (relatedness), que analizan a los individuos con respecto a la identidad por descendencia de sus alelos, y (ii) métodos de relación (relationship), que clasifican a los individuos por categorías en una genealogía (progenitor-descendiente, hermanos, medios hermanos, etc.) (Marshall et al. 1998, Blouin 2003). Con el programa ML-RELATE (Kalinowski et al. 2006) se estimó la relación de parentesco entre los individuos, el cual usa pruebas de máxima verosimilitud y ofrece ambos tipos de resultados (de conectividad y de relación).

Las poblaciones que han experimentado reducciones sustanciales o recientes en el tamaño poblacional, como cuellos de botella, son sujetas a diversos cambios: se incrementa la probabilidad de identidad por descendencia, puede aumentar el efecto de factores estocásticos como la deriva génica y sustancialmente se genera un decremento en la variación genética, lo que resulta en una limitante en el potencial evolutivo (Garza & Williamson 2001, Palstra & Ruzzante 2008). Para determinar si las poblaciones en la isla han pasado por cuellos de botella, se utilizó el programa Bottleneck 5.1.26 (Cornet & Luikart 1996). Cabe resaltar que en poblaciones que han sufrido reducciones en el tamaño efectivo poblacional, la diversidad alélica (número de alelos) se pierde más rápido que la diversidad genética en conjunto (heterocigosis observada), por lo que si se encuentra un exceso de heterocigosis observada respecto a la heterocigosis esperada, se puede considerar que la población ha sufrido un cuello de botella reciente. Ello se ha comprobado para loci que siguen el modelo de mutación de alelos infinitos (IAM, 5-10%), bajo un equilibrio de mutación y deriva (Cournet & Luikart 1996).

Debido a que los microsatélites presentan predominantemente el modelo de mutación paso a paso (SMM) pero con un cierto porcentaje de mutación tipo IAM, se recomienda considerar un tipo de mutación denominado de dos fases (TPM, Di Renzo et al. 1994, Cournet & Luikart 1996). Así, se estimó la heterocigosis observada y esperada

bajo el modelo de TPM (90% SMM y 10% IAM) y una varianza de 10%. Se emplearon además los valores “default” del programa (70% SMM y 30% IAM con varianza de 10%), ambos con 10,000 replicaciones. Para determinar si la población presentó un exceso significativo de heterocigosidad se realizó una prueba de Wilcoxon, ya que ésta puede usarse con pocos loci y sin importar el tamaño de muestra. Este proceso se realizó para cada población y para la población de Cozumel en conjunto, tomando en cuenta los datos acerca del número reducido de individuos introducidos.

Otro efecto relevante que ocurre con la diversidad genética al presentarse un cuello de botella, es que el número de versiones alélicas presentes en una población se pierde más rápidamente que el rango de alelos (longitud de repeticiones) (Garza & Williamson 2001). Con el programa M_P_VAL (Garza & Williamson 2001) se obtuvo el índice Garza-Williamson (2001), que se basa en esta proporción del número y rango de alelos:

$$M = k/R+1$$

donde k es el número de alelos en un locus en una población y R es el rango alélico (diferencia entre el alelo más grande y el más pequeño). Este valor se obtuvo para las poblaciones por separado y para la población en conjunto de Cozumel.

Para determinar la significancia de los índices M obtenidos, se compararon estos valores observados con respecto a una distribución de valores obtenidos de simulaciones poblacionales, con el programa CRITICAL_M (Garza & Williamson 2001). Estas simulaciones se realizaron de la siguiente forma: se simula inicialmente una población bajo equilibrio de Hardy-Weinberg, y posteriormente que pase por un proceso de deriva génica basado en el modelo matemático de Wright-Fisher (1931); se realizan 10,000 permutaciones de este proceso y se calcula el índice M en cada permutación;. Estos índices se organizan en orden decreciente y se escoge el valor M de la permutación 9501, es decir, este valor crítico de M (M_c) se considera como aquel valor donde en el 95% de las veces, $M > M_c$. Los parámetros utilizados para estas simulaciones provienen de los propios datos: tamaño de muestra, número de alelos en cada loci y tipo de repetición del motivo. El tipo de mutación que se considera en estas simulaciones es el modelo TPM. Otros parámetros considerados para la generación de M_c son: Δg considerado como el tamaño promedio del microsatélite generado por un proceso de mutación diferente del modelo TPM, P_g como la proporción de mutaciones tipo TPM en el microsatélite y $\theta = 4N_e\mu$ (Garza & Williamson 2001). Se consideraron los valores “default” del programa

donde $\Delta g = 2.8$, $Pg = 0.8$ y $\mu = 5 \times 10^{-4}$ /loci/generación. Este índice permite detectar la distribución alélica de poblaciones con cambios drásticos en tamaño poblacional, lo que permite distinguir entre aquellas poblaciones con reducciones recientes de aquellas que han tenido tamaños poblacionales pequeños por mucho tiempo (Garza & Williamson 2001). Valores cercanos a 1 se reportan para poblaciones estacionarias, mientras que para poblaciones que han sufrido reducciones poblacionales drásticas los valores son cercanos a cero

Un concepto ampliamente difundido a pesar de que no existe una definición precisa de éste, es el de tamaño efectivo (N_e), el cual se refiere a la porción de individuos en una población que puede reproducirse exitosamente, ya que estos son los que contribuyen a la generación siguiente en términos demográficos y genéticos (Hedrick 2000). Existen diferentes métodos que permiten estimar N_e , en relación con diferentes cualidades de las poblaciones: (i) métodos directos basados en el censo directo de los individuos, que utilizan información como la proporción de sexos; (ii) métodos ecológicos y demográficos, que adicionan información disponible de las poblaciones como la estructura de edades, fecundidad o tasa reproductiva; y (iii) los métodos indirectos que utilizan marcadores moleculares, los cuales se basan en los cambios en la diversidad y estructura genética o en la teoría de coalescencia (Moreno 2008).

Para estimar el tamaño efectivo tanto de las poblaciones por separado, así como de todos los individuos de la isla en conjunto, se usaron dos métodos:

- 1) Un método de estimación del tamaño efectivo (N_e) a partir de la medida del desequilibrio de ligamiento en una población (Hill 1981, Waples 1991), implementado en el programa NeEstimator v1.3 (Peel et al. 2004). El desequilibrio de ligamiento por efecto de una reducción en el tamaño poblacional es generado a partir del muestreo de gametos en la generación anterior que se distribuyen al azar entre un pequeño número de cigotos. Este cambio en las frecuencias alélicas y genotípicas en la generación anterior proveen una medida de la probabilidad por descendencia de los alelos en una población, lo que a su vez se puede utilizar para estimar N_e (Hill 1991, Waples 1991, 2006).

Así, el tamaño efectivo por desequilibrio de ligamiento se puede calcular a partir de loci no ligados como:

$$N_e(D) = 1/[3 (r^2 - 1/S)]$$

donde r es el coeficiente de correlación entre loci, el cual se traduce como la probabilidad de que un gameto recombinante sea producido durante la meiosis (Gillespie 2004) y S es el tamaño de la muestra. El valor de r se calcula como: $r = D/[p(1-p)q + (1-q)]^{1/2}$, donde p y q son las frecuencias del alelo A en el locus 1 y el alelo B en el locus 2, respectivamente, y D es la diferencia del producto de los gametos parentales menos el producto de los gametos recombinantes. Para realizar este método el programa requiere de un aproximado del número de generaciones que han sucedido a partir de la reducción poblacional al presente (en nuestro caso el momento de la introducción). Este cálculo se realizó con base en el tiempo generacional de las hembras (GT), respecto al tiempo transcurrido a partir de la introducción (Ficetola et al. 2008):

$$GT = (AM+L)/2$$

donde AM es la edad en la cual se alcanza la madurez sexual y L es la longevidad. Para el caso de *B. constrictor* $AM= 3$ años y $L= 30$ años, por lo que $GT= 16.5$ años/generación. Por lo tanto, el número de generaciones que han ocurrido en la isla desde su probable introducción hasta el presente (1971-2008), es de 2.24 generaciones.

- 2) Se obtuvo un estimado del N_e a partir del parámetro poblacional θ (Theta), el cual permite estimar el número de mutaciones por generación a partir de la homocigosis esperada (HomE) en una población con equilibrio entre mutación y deriva, junto con un proceso de mutación tipo SMM (Excoffier et al. 2006), donde $\theta = (1 - HomE)/HomE = 4N_e\mu$. Este parámetro se obtuvo para cada población y en la población de Cozumel en conjunto con el programa Arlequín 3.1, utilizando una tasa de mutación μ típica para microsatélites de vertebrados que va de 1×10^{-3} a 1×10^{-5} (Avice 1994).

7. Resultados

El número total de individuos utilizados en este estudio fue de 64; 13 machos y 17 hembras, el resto (34) no pudieron ser sexados (Fig. 2).

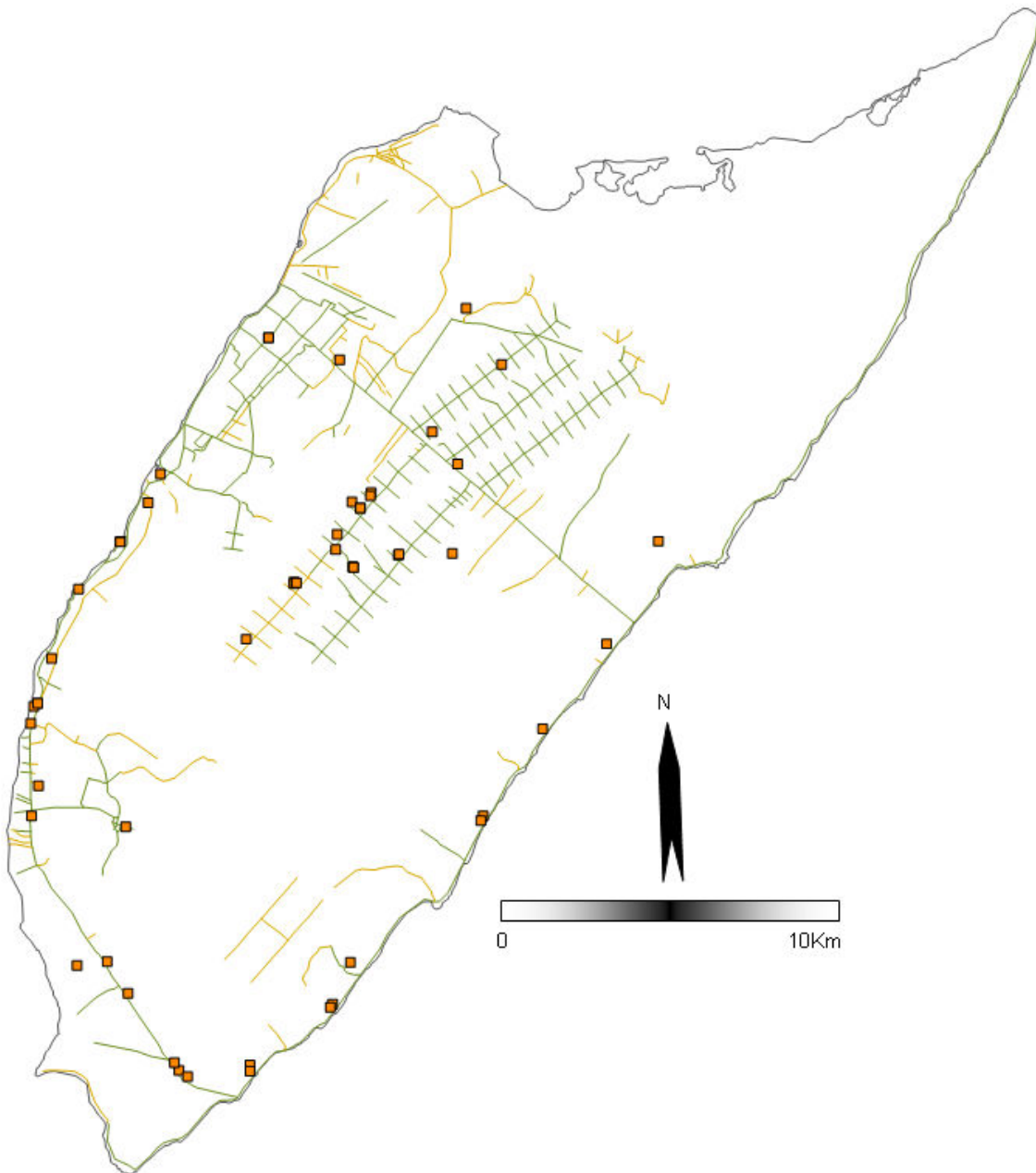


Figura 2. Mapa de localización de 56 individuos con datos de ubicación geográfica utilizados en este estudio

7.1 Amplificación de loci microsatélites

Sólo se pudieron utilizar cuatro loci de microsatélites de los 12 que se probaron, ya que los seis loci heterólogos reportados por Hille et al. (2002) no amplificaron con nuestras muestras, a pesar de múltiples ensayos y pruebas distintas. Dado el nulo éxito se contactó al autor, quien señaló que los resultados reportados en su estudio (Hillie et al. 2002) habían sido de pruebas realizadas con tejido de la anaconda *Eunectes murinus* y no con muestras de *B. constrictor*, como se menciona en el artículo antes citado (Hille comun. person.). De los loci específicos (Booth et al. En revisión), el loci *Bci-19* resultó monomórfico, mientras que el loci *Bci-23*, cuyas amplificaciones fueron analizadas tanto en PAGE como en secuenciador y con 65 individuos, se observó la presencia sistemática de tres alelos (188, 208 y 220 bp) y con un genotipo heterocigoto en todos los individuos, por lo que se descartó su utilización. Los loci restantes (Tabla 1), incluyendo aquellos creados para la boa de Jamaica *Epicrates subflavus*, se pudieron amplificar y genotipar correctamente y fueron polimórficos.

Tabla 1. Loci de microsatélites polimórficos utilizados en este estudio para *B. constrictor*.

Nombre	Secuencia del primer	Rango observado (bp)	Motivo	Fluorescencia	GenBank
<i>Bci-14</i> Fw	GCTGTGGTTGGTAAGCAA	230–286	(AAGA) ₂₆ (AGGA) ₂₇	HEX	S/N
<i>Bci-14</i> Rv	AAGACAGAACCCAGCCAA				
<i>Bci-21</i> Fw	TTGAGAGATGGACCTGGA	238-274	(AG) ₁₂	6-FAM	S/N
<i>Bci-21</i> Rv	AGAGACGGAGATACCCAA				
μ sat1 Fw	GTTTCTTTTTGTTTGTGTTCCCAATGCC	328-392	(AGAT) ₁₆	HEX	EU138906
μ sat1 Rv	GGTGGAGACTATAAATGCCTTACTT				
μ sat36 Fw	GTTTCTTTGATACTGGACAGAAAAG	274-306	(CTTT) ₁₃ (CTTC) ₁₂	6-FAM	EU138912
μ sat36 Rv	AAATCAAACAGAAGGGAAAG				

7.2 Definición de subgrupos y asignación de individuos sin datos

Con el programa Geneland, se observó que en 11 de las 15 corridas totales utilizadas con la combinación de modelos “*F-model*” + “*Spatial model*”, se generó la definición de dos poblaciones [$\ln \Pr(K=2) = -1152.343$] cuyos individuos fueron repetidamente distribuidos de la misma forma. Así, de aquí en adelante estas poblaciones se denominan como CZM1 y CZM2 (Fig. 3).

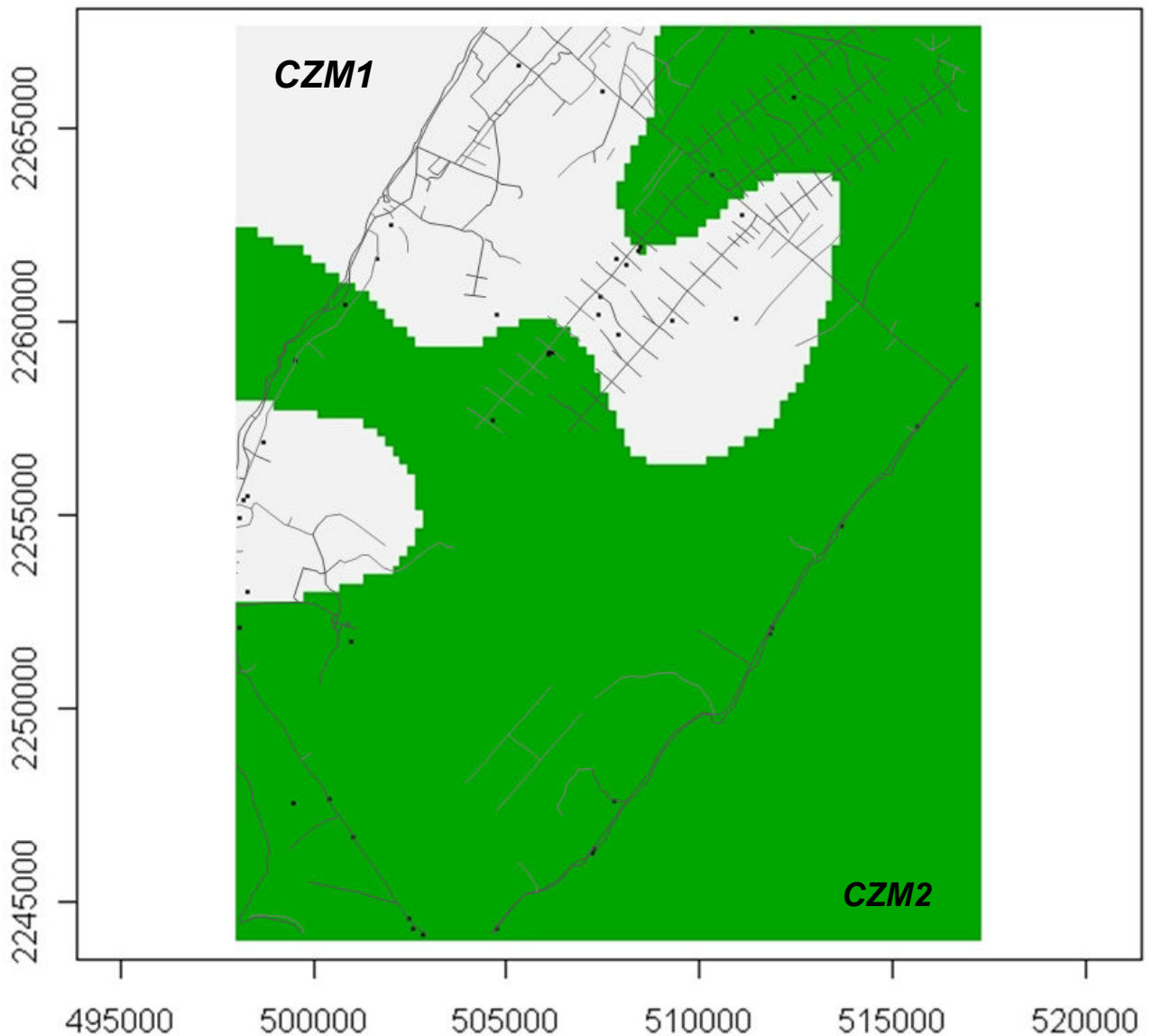


Figura 3. Distribución de las dos poblaciones obtenidas tras el análisis de agrupación. CZM1 se muestra en color blanco y CZM2 en color verde

El análisis de asignación realizado posteriormente a la definición de las dos poblaciones, distribuyó a los 11 individuos sin datos de georreferencia homogéneamente en ambas poblaciones: seis individuos fueron asignados a la población CZM1 (83.6 a 99.2% de probabilidad de pertenencia a esta población) y 5 individuos a CZM2 (74.8 a 99.6% de probabilidad). Con ello se obtuvo un número final total de 30 individuos presentes en CZM1 y 34 en CZM2.

7.3 Equilibrio de Hardy Weinberg

Se observó que para la población CZM1 existe un exceso de heterocigotos para los loci BCI-14 y usat36 (Tabla 2), así como una deficiencia de heterocigotos en los loci *Bci-21* y $\mu\text{sat}1$, los cuales fueron significativos después de la corrección de Bonferroni secuencial. Los valores de coeficiente de fijación (F_{IS}) según el método de Weir & Cockerham mostraron valores de -0.086 a 0.381. Para la población CZM2, no se muestra una deficiencia de heterocigotos significativa, El resultado basado en el método exacto de Fisher, que toma en cuenta a todos los loci en conjunto, mostró que la población CZM1, lo mismo que al considerar la población de Cozumel en conjunto, están fuera de equilibrio de Hardy-Weinberg ($P < 0.001$).

Tabla 2. Coeficientes de fijación (F_{IS}) de Weir & Cockerham para cada locus por cada población (* $P_{\leq} 0.05$ con corrección de Bonferroni secuencial)

Pob.	Locus	F_{IS}	P	Pob.	Locus	F_{IS}	P	Pob.	Locus	F_{IS}	P
CZM1	<i>Bci-14</i>	-0.054	0.033*	CZM2	<i>Bci-14</i>	0.121	0.029	Cozumel	<i>Bci-14</i>	0.065	0.0001*
	<i>Bci-21</i>	0.381	0.0004*		<i>Bci-21</i>	0.056	0.064	en	<i>Bci-21</i>	0.217	0.0*
	$\mu\text{sat}1$	0.400	0.001*		$\mu\text{sat}1$	0.305	0.017	conjunto	$\mu\text{sat}1$	0.346	0.0*
	$\mu\text{sat}36$	-0.086	0.0008*		$\mu\text{sat}36$	0.226	0.022		$\mu\text{sat}36$	0.094	0.0*

7.4 Desequilibrio de ligamiento

Se encontró que de las seis combinaciones posibles entre los cuatro loci utilizados, ninguna presentó desequilibrio de ligamiento significativo para ambas poblaciones ($P \leq 0.05$), lo mismo que al analizar la población de Cozumel en conjunto, donde no hubo desequilibrio de ligamiento después de la corrección de Bonferroni secuencial (Tabla 3).

Tabla 3. Desequilibrio de ligamiento entre pares de loci (* $P \leq 0.05$, con corrección de Bonferroni secuencial)

Pares de loci	P
<i>Bci-14-Bci-21</i>	0.469
<i>Bci-14-usat1</i>	0.043
<i>Bci-21-usat1</i>	0.370
<i>Bci-14-usat36</i>	0.305
<i>Bci-21-usat36</i>	0.030
<i>usat36-usat1</i>	0.509

7.5 Diversidad Genética

Los cuatro loci utilizados en el análisis fueron polimórficos en ambas poblaciones (Tabla 4). El mayor número promedio de alelos observados y efectivos se observó en CZM1, con 7 y 5.4 respectivamente, mientras que en CZM2 fueron 6 y 3.3. La media total de la población con respecto a estos valores fue 9.2 alelos observados y 4.3 alelos efectivos. En CZM1, el locus con el menor valor tanto de alelos observados como efectivos fue *usat1* (5 y 1.9, respectivamente), mientras que los valores mayores se encontraron para el locus *Bci-14* con 11 y 7.7. En el caso de CZM2, de nuevo, el locus *usat1* tuvo los valores menores (5 y 2.6), y el locus con valores mayores fue *Bci-21* (7 y 4.3).

En la población CZM1, la heterocigosidad observada promedio fue $H_o = 0.667$, con valores entre loci de 0.300 a 0.933, mientras que en CZM2 fue $H_o = 0.581$ (intervalo 0.441 a 0.735). Para la población total, H_o promedio fue 0.621 (intervalo 0.375 a 0.750) (Tabla 4). Los valores promedio de heterocigosidad esperada (H_E) y heterocigosidad de Nei (H_{NEI}) para Cozumel fueron 0.740 y 0.746, respectivamente; para CZM1 0.689 y 0.700, y para CZM2 0.740 y 0.746 (Tabla 4). Los loci que presentaron una menor y mayor diversidad genética en términos de heterocigosidad fueron *Bci-14* y *usat1* para la subpoblación CZM1, *Bci-21* y *usat1* para CZM2 y para la población en conjunto fueron *Bci-14* y *usat1*, respectivamente

Con respecto a los pares de comparaciones entre las heterocigosidades observadas en cada loci, estas no muestran diferencias significativas ($t_{L-1} = 0.047$, g. l. = 3, $P > 0.05$), consecuentemente, los valores de diversidad genética observados entre el par de poblaciones son similares.

Tabla 4. Valores de diversidad genética para CZM1 y CZM2, así como para la población de Cozumel en conjunto (A exc: alelos exclusivos por población)

Población	Locus	n_a	n_e	A exc	H_o	H_e	H_{NEI}
CZM1 N=30	<i>Bci-14</i>	11	7.7	6	0.933	0.871	0.886
	<i>Bci-21</i>	11	6.3	5	0.533	0.842	0.856
	μ sat1	5	1.9	1	0.300	0.488	0.497
	μ sat36	7	5.4	1	0.900	0.816	0.830
Media		8.5	5.4	3.25	0.667	0.754	0.767
CZM2 N=34	<i>Bci-14</i>	5	2.9	0	0.588	0.658	0.668
	<i>Bci-21</i>	7	4.3	1	0.735	0.767	0.779
	μ sat1	5	2.6	1	0.441	0.623	0.633
	μ sat36	7	3.4	1	0.559	0.709	0.719
Media		6.0	3.3	0.75	0.581	0.689	0.700
Cozumel N=64	<i>Bci-14</i>	11	4.9		0.750	0.796	0.802
	<i>Bci-21</i>	12	5.3		0.641	0.811	0.818
	μ sat1	6	2.3		0.375	0.568	0.572
	μ sat36	8	4.7		0.719	0.787	0.793
Media		9.2	4.3		0.621	0.740	0.746

7.6 Distribución y diferenciación de frecuencias alélicas

Se obtuvieron un total de 37 alelos en los cuatro loci analizados para *B. constrictor* en la isla Cozumel en conjunto, el número de alelos por locus varió entre 6 y 12. Se observaron alelos exclusivos en todos los loci en ambas poblaciones. El mayor número de alelos exclusivos en la población CZM1 fue de seis en el locus *Bci-14* (Tabla 4; Fig. 5 y 6), mientras que μ sat1 presentó un solo alelo exclusivo. Para CZM2, se observaron solo tres alelos exclusivos, uno en cada locus, *Bci-21*, μ sat1 y μ sat36, respectivamente. Considerando todos los loci, la población CZM1 presentó 13 alelos exclusivos, mientras que CZM2 sólo 3, y ambas comparten 21 alelos (57%; Fig. 6), cuyas frecuencias varían entre 0.015 y 0.683. El locus que presentó el mayor número de alelos compartidos fue μ sat1, del cual las dos poblaciones comparten 5 alelos de 6 (83.3%), con frecuencias que van de 0.033 a 0.683; mientras que el locus con menor número de alelos compartidos fue *Bci-14* (5 alelos de 11; 45%), con frecuencias que van de 0.083 a 0.529 (Figs. 5, 6).

Los resultados de la diferenciación alélica muestran que sólo el locus μ sat1 presentó una distribución homogénea, siendo heterogénea para el resto (Tabla 5; $P \leq$

0.05, con corrección de Bonferroni). Considerando los cuatro loci en conjunto, se observó una distribución alélica heterogénea para ambas poblaciones ($P < 0.001$).

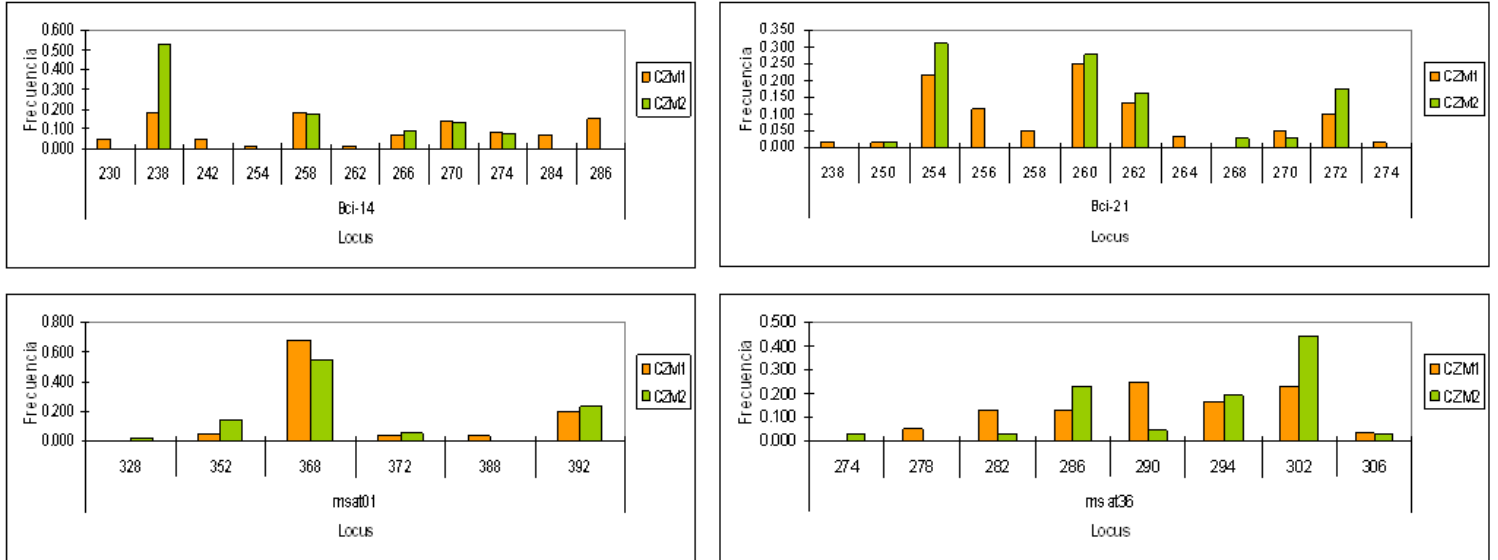


Figura 5. Frecuencias alélicas observadas para cada loci en ambas poblaciones de Cozumel

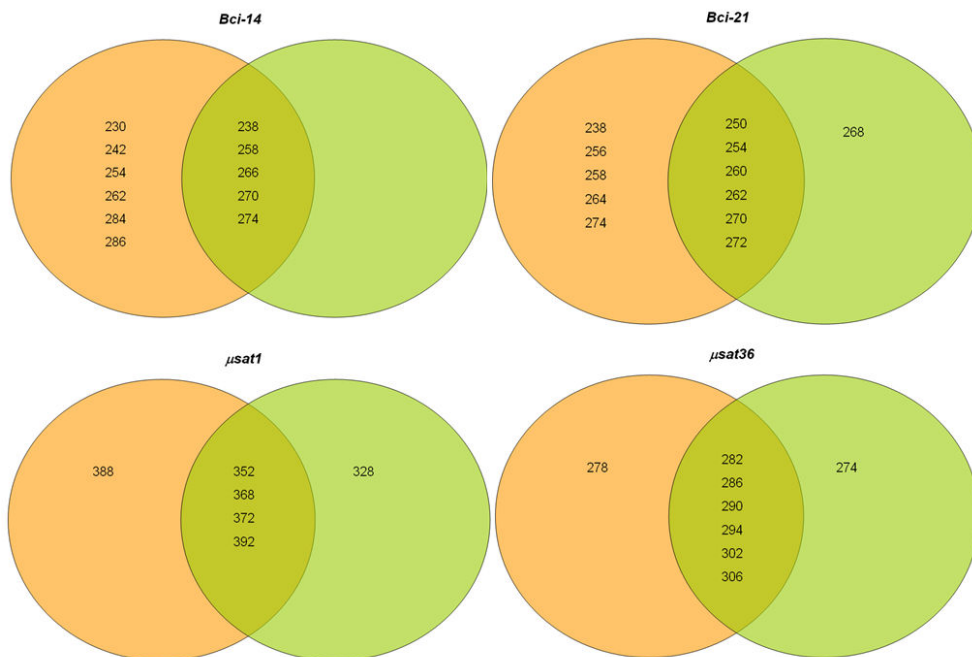


Figura 6. Diagramas de Venn que muestran los alelos privados y en común para cada población: CZM1-anaranjado, CZM2-verde

7.7 Distribución y diferenciación de frecuencias genotípicas

Se encontraron un total de 73 genotipos para los cuatro loci para la población de la isla en conjunto, que variaron de 24 genotipos para el locus *Bci-14* a 11 para $\mu\text{sat}1$ (Anexo 6). El locus *Bci-21* presentó el mayor número de genotipos homocigotos, con 7, mientras que el locus *Bci-14* presentó sólo 3. Asimismo, el locus *Bci-14* presentó el mayor número de genotipos heterocigotos (17) y el menor fue en $\mu\text{sat}1$ (6).

La distribución de los genotipos entre poblaciones fue homogénea para los loci *Bci-21* y $\mu\text{sat}1$, y heterogénea para los otros dos ($P \leq 0.05$, con corrección de Bonferroni) (Tabla 5). Al considerar los cuatro loci en conjunto, se observa que CZM1 y CZM2 presentaron una distribución genotípica heterogénea ($P < 0.001$).

Tabla 5. Diferenciación alélica y genotípica para cuatro loci, entre las poblaciones CZM1 y CZM2 (* $P \leq 0.05$ con corrección de Bonferroni)

Locus	Alélica		Genotípica	
	<i>P</i>	<i>S. E.</i>	<i>P</i>	<i>S. E.</i>
<i>Bci-14</i>	0.000*	0.0000	0.000*	0.0000
<i>Bci-21</i>	0.008*	0.0004	0.042	0.0009
$\mu\text{sat}1$	0.128	0.0019	0.352	0.0025
$\mu\text{sat}36$	0.000*	0.0001	0.001*	0.0001

7.8 Estructura y diferenciación genética

Con respecto a los estadísticos *F* de Wright, los valores positivos de F_{IS} indican una deficiencia de heterocigotos para todos los loci, con valores que fueron de 0.101 a 0.349 (Tabla 6). El intervalo de valores para F_{ST} fue 0.002 a 0.077, lo que indica que en todos los loci las frecuencias alélicas son diferentes (Tabla 7). Los valores de F_{ST} y R_{ST} pareados para ambas poblaciones fueron de $F_{ST}=0.037$ con un valor de $Nm = 6.5$, y $R_{ST}=0.090$ y $Nm = 2.5$.

Tabla 6. Estadísticos F según el método de Weir & Cockerham

Locus	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
<i>Bci-14</i>	0.101	0.077	0.026
<i>Bci-21</i>	0.219	0.002	0.217
μsat1	0.349	0.007	0.344
μsat36	0.118	0.052	0.069
Total	0.184	0.039	0.153

Los resultados de la AMOVA mostraron, con base en los valores de F_{ST} , que poco más del 81% de la variación se distribuyó en los individuos, 14.7% se localizó entre individuos dentro de las poblaciones, mientras que cerca del 4% de la variación se atribuyó a la existente entre poblaciones (Tabla 7). Los resultados basados en R_{ST} mostraron lo mismo (64.9% en los individuos, 26% entre individuos dentro de las poblaciones y 9% entre poblaciones).

Tabla 7. AMOVA con base en (a) valores de F_{ST} y (b) valores de R_{ST} (* $P \leq 0.05$)

Fuente de variación	g. l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	% de variación	P
Entre las poblaciones	1	5.271	0.056Va	3.69	0.00196*
Entre individuos dentro de las poblaciones	62	104.783	0.223 Vb	14.71	0.00000*
En los individuos	64	79.5	1.242 Vc	81.6	0.00000*
Total	127	189.555	1.522		
Índice de Fijación $F_{ST}=0.0369$					

Fuente de variación	g. l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	% de variación	P
Entre las poblaciones	1	4063.279	53.039 Va	9.092	0.00000*
Entre individuos dentro de las poblaciones	62	42285.69	151.685 Vb	26.001	0.00000*
En los individuos	64	24234	378.656 Vc	64.907	0.00000*
Total	127	70582.969	583.381		
Índice de Fijación $R_{ST}=0.0909$					

La distancia genética de Nei entre las poblaciones CZM1 y CZM2 fue de 0.110. En el árbol de NJ obtenido a partir de los valores pareados de distancia genética, se observa que estas dos poblaciones se agrupan en un nodo, el cual muestra el nivel de soporte más alto (83.6%) (Anexo 8). Se observó además que las poblaciones de la península (Tabasco, Campeche y Yucatán) forman un grupo, que se encuentra más cercano a la población de Cozumel que a las de Jalisco, que es el grupo más distanciado. Cabe señalar que los valores de soporte de cada nodo deben considerarse cuidadosamente debido al reducido número de individuos en las poblaciones del continente, así como por el número de loci utilizados.

El análisis factorial de correspondencia mostró la presencia de dos grupos que, aunque dentro de una nube continua de puntos, se distinguen claramente, por un lado los genotipos de la gráfica tridimensional pertenecen a la población CZM1, y aquéllos al otro lado a CZM2 (Fig. 8). Destaca la presencia de puntos “outliers” en ambas poblaciones, los cuales indican la presencia de algunos individuos con profundas diferencias genotípicas.

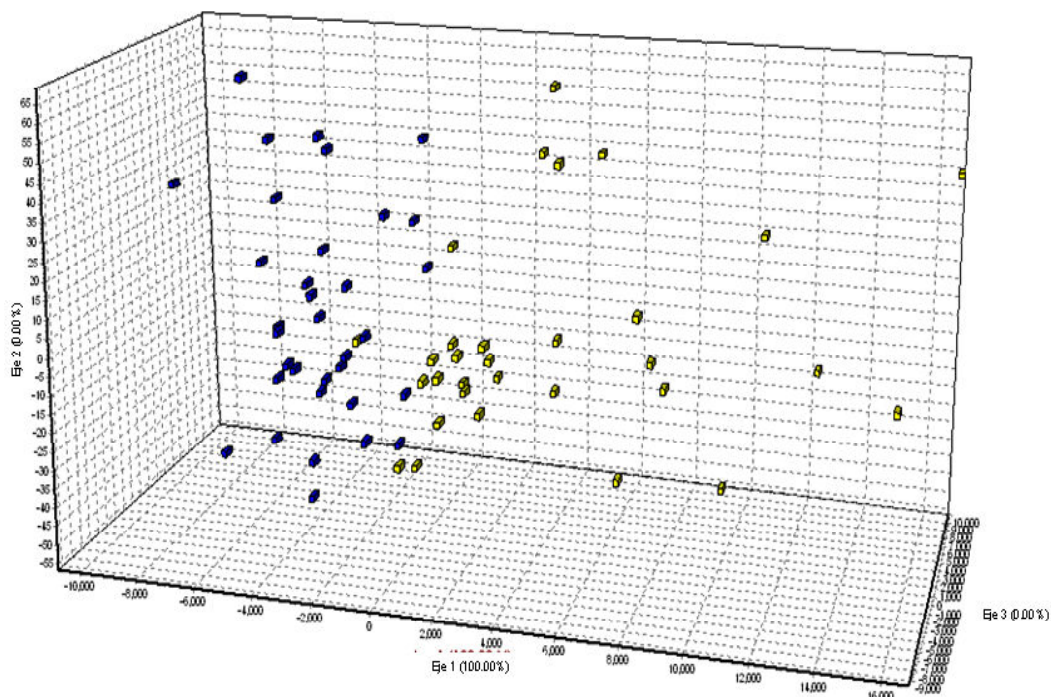


Figura 8. Proyección tridimensional del análisis factorial de correspondencia para las poblaciones CZM1-azul y CZM2-amarillo

7.9 Alelos nulos

Los resultados indicaron la presencia de alelos nulos en dos loci de cada población y en un locus al analizar la isla en conjunto (Tabla 8), pero donde sólo el locus $\mu\text{sat}1$ tuvo alelos nulos consistentes para los tres casos (poblaciones e isla). El locus *Bci-14* no presentó alelos nulos en ningún nivel de comparación. Asimismo, se obtuvieron las frecuencias alélicas corregidas para alelos nulos con el método Brookfield 1 (Anexo 7), donde el valor de F_{ST} corregido fue de 0.361, el cual no fue significativamente diferente del valor de F_{ST} sin corrección (0.360). Asimismo, el valor de distancia de Cavalli-Sforza (D_{C-S}), tanto corregido como sin corrección para alelos nulos fue el mismo: $D_{C-S} = 0.317$.

Tabla 8. Presencia de alelos nulos en cada locus para las poblaciones CZM1 y CZM2 y para la isla en conjunto

Locus	CZM1	CZM2	Cozumel en conjunto
<i>Bci-14</i>	No	No	no
<i>Bci-21</i>	Si	No	no
$\mu\text{sat}1$	Si	si	si
$\mu\text{sat}36$	No	si	no

7.10 Parentesco, cuello de botella y tamaño efectivo

El análisis de parentesco mostró que existen relaciones de parentesco entre individuos al interior de cada población y entre los individuos de la isla en conjunto (Tabla 9). Para el caso de CZM1 (435 combinaciones), el mayor porcentaje fue para el caso de individuos no relacionados (79%), seguido del tipo de relación de hermanos, medios hermanos y en menor proporción la relación padres e hijos (3.4%). Para CZM2 (561 combinaciones) y la isla en conjunto (2016 combinaciones), el tipo de relación en mayor proporción fue también la de sin relación, pero seguido de medios hermanos (Tabla 9).

Tabla 9. Relaciones de parentesco entre los individuos de CZM1, CZM2 y de la isla en conjunto

Parentesco	CZM1	CZM2	Cozumel
Padres-Hijos	3.4%	11.5%	5.7%
Medios hermanos	5.7%	24.7%	11.8%
Hermanos	11%	11.5%	5.3%
Sin relación	79%	52%	77.2%

Los resultados del análisis de cuello de botella mostraron que hay evidencia de cuello de botella asociado a un exceso de heterocigosis en la población CZM2 y para la población de Cozumel en conjunto, bajo el modelo IAM ($P < 0.05$). Ni CZM1, CZM2 ni la población en conjunto mostraron evidencia de cuello de botella bajo los modelos de TPM en sus dos modalidades y bajo el modelo SMM (Tabla 10).

Tabla 10. Exceso de heterocigosis en ambas poblaciones y para la isla en conjunto bajo los diferentes modelos de mutación establecidos ($*P \leq 0.05$)

Población	Modelo de mutación	P
CZM1	IAM	0.06250
	TPM 70%-30%	0.15625
	TPM 90%-10%	0.56250
	SMM	0.56250
CZM2	IAM	0.03125*
	TPM 70%-30%	0.09375
	TPM 90%-10%	0.84375
	SMM	0.96875
Cozumel	IAM	0.03125*
	TPM 70%-30%	0.90625
	TPM 90%-10%	0.96875
	SMM	1.00000

En relación con los índices Garza-Williamson se obtuvo un valor de $M = 0.213$ para CZM1 y para CZM2 de $M = 0.182$, mientras que para Cozumel fue de $M = 0.197$, siendo todos significativamente menores a los valores críticos de M (M_c) ($P \leq 0.05$) (Tabla 11), lo que significa que sí existió una reducción drástica y/o reciente del tamaño poblacional. Cabe señalar que se realizaron varias simulaciones a partir de diferentes valores de theta, bajo la suposición de que el tamaño efectivo se considera como el tamaño poblacional anterior al “cuello de botella” (Marshall Jr. et al. 2009).

Tabla 11. Valores de M observados para CZM1, CZM2 y la isla en conjunto, así como los valores críticos Mc obtenidos con distintas simulaciones de theta ($P \leq 0.05$)

Población	Theta (θ)	N_e	M	Mc	P
CZM1	1	500	0.213	0.725	0.015*
	2	1000		0.700	0.015*
	4	2000		0.682	0.016*
	6	3000		0.669	0.016*
	8	4000		0.660	0.016*
	10	5000		0.657	0.016*
CZM2	1	500	0.182	0.730	0.012*
	2	1000		0.707	0.013*
	4	2000		0.688	0.013*
	6	3000		0.675	0.013*
	8	4000		0.671	0.014*
	10	5000		0.663	0.014*
Cozumel	1	500	0.197	0.734	0.013*
	2	1000		0.716	0.014*
	4	2000		0.707	0.014*
	6	3000		0.704	0.014*
	8	4000		0.701	0.014*
	10	5000		0.699	0.014*

Se obtuvo un tamaño efectivo poblacional (N_e) para CZM1 de $N_e = 90.5$ individuos, cálculo basado en el desequilibrio de ligamiento en un momento en el tiempo; para CZM2 fue $N_e = 138.4$ y para Cozumel en conjunto fue $N_e = 485.8$. Con respecto a la estimación a partir del parámetro poblacional theta, con tres tasas de mutación típicas en microsatélites de vertebrados, se obtuvieron para CZM1 tamaños efectivos que van de 574.9 a 57,493 individuos, para CZM2 de 469.8 a 46,981 individuos y para Cozumel de 522.37 a 52,237 individuos (Tabla 12).

Tabla 12. Tamaño efectivo poblacional para cada población y la población de la isla en conjunto obtenidos a partir del parámetro poblacional Theta

Theta (θ)	Tasa de mutación (μ)	N_e
CZM1 = 2.299	1×10^{-3}	574.9
	1×10^{-4}	5749.4
	1×10^{-5}	57493.7
CZM2 = 1.879	1×10^{-3}	469.8
	1×10^{-4}	4698.1
	1×10^{-5}	46981.0
Cozumel = 2.081	1×10^{-3}	522.4
	1×10^{-4}	5223.8
	1×10^{-5}	52237.7

8. Discusión

8.1 Amplificación de microsatélites y diversidad genética

Este trabajo representa el primer estudio de diversidad y estructura genética de *B. constrictor* en México, además, se utilizaron por primera vez microsatélites como marcadores moleculares para analizar la variabilidad genética de una población natural de esta especie.

A pesar de que recientemente se han utilizado microsatélites en estudios genéticos en varias familias de reptiles (Lougheed et al. 2000, Howeth et al. 2008, Tzika et al. 2008b), su uso en serpientes (Prosser et al. 1999, Manier & Arnold 2005, Lukoschek et al. 2008, Tzika et al. 2008, 2009, Marshall et al. 2009) se ve limitado debido a que este tipo de marcadores requieren de un diseño y optimización específicos. Esta limitante fue evidente al intentar en este trabajo la amplificación de microsatélites en *B. constrictor* diseñados para especies de las familias Colubridae ($Ns_{\mu}2$, $Ns_{\mu}3$, Ts1 y Ts4) y Elapidae (Hb2 y Hb30). Otro tipo de marcadores moleculares con relativamente menor dificultad en su diseño y optimización, como mtDNA, RAPD's, AFLP's o ISSR's, se han utilizado con éxito para evaluar patrones de diversidad y estructura genética en serpientes en relación con procesos en tiempo ecológico (Prioir et al. 1996, Groot et al. 2003, Guicking et al. 2006).

Cabe resaltar que, en relación con el número de alelos observados, éste fue mayor para los loci específicos de boa (*Bci-14* y *Bci-21*) en comparación con aquellos no específicos (diseñados para *Epicrates subflavus*; $\mu\text{sat}1$ y $\mu\text{sat}36$, Tzika et al. 2008a, 2009). Este patrón es congruente con lo observado en otras especies de serpientes, como el caso de *Nerodia clarkii compressicauda*, donde se utilizaron de manera similar cuatro loci de microsatélites, un par específicos y un par diseñados para otra especie del mismo género; en seis poblaciones, el número de alelos para los loci no específicos varía entre 2 y 7, mientras que para los loci específicos es de 13 a 17 alelos (Jansen et al. 2008). A pesar de que *Boa* y *Epicrates* son géneros filogenéticamente cercanos (Bubring 2005), el tiempo de divergencia aproximado entre *Boa* y los otros géneros de la subfamilia Boinae -*Eunectes*, *Epicrates* y *Corallus*- es de aproximadamente 50 millones de años (Noonan & Chippindale 2006). La amplificación exitosa de los loci $\mu\text{sat}1$ y $\mu\text{sat}36$ en *B. constrictor*, permite inferir que las regiones flanqueantes al motivo de estos loci se encuentran altamente conservadas a lo largo de la subfamilia, y que se ha conservado un polimorfismo ancestral en las regiones motivo; por lo que resulta factible pensar en la utilización de estos loci para el análisis de otras especies de

la familia Boidae. La amplificación heteróloga exitosa de loci microsatélites se ha observado en otros vertebrados; Lima-Rosa et al. (2000) mencionan la ampliación exitosa de loci diseñados para los géneros de roedores *Rattus* y *Mus*, en ratones de los géneros *Oryzomys*, *Oligoryzomys*, *Oecomys*, *Nectomys* y *Rhipidomys* (Muridae), pero también con una pérdida de polimorfismo alélico.

La heterocigosidad observada para la población de boa de la isla en conjunto fue moderadamente alta ($H_o = 0.621$, $H_E = 0.740$, $H_{NEI} = 0.746$), pero comparativamente menor con respecto a poblaciones de vertebrados que han permanecido demográficamente estables ($H_o \approx 0.85$, Allendorf & Luikart 2007, Douglosh & Parker 2008). Sin embargo, el valor encontrado es similar a la heterocigosidad observada en otras poblaciones de lagartijas y serpientes que han estado sometidas a fragmentación del hábitat, disminución del tamaño poblacional o que han pasado por un cuello de botella asociado a un efecto fundador (Prosser et al. 1999, 2000, Jansen et al. 2008). Por ejemplo, la lagartija *Anolis cristatellus*, introducida de Puerto Rico a la República Dominicana en el año 2000, presenta valores de $H_o = 0.774$ en la población introducida, mientras que en dos poblaciones del sitio de origen es de $H_o = 0.798$ y 0.892 (Eales et al. 2008).

Se observa también que, a pesar de que la población CZM1 presentó una diversidad alélica mayor respecto a la población CZM2, la heterocigosidad observada promedio no fue significativamente diferente ($H_o \text{ CZM1} = 0.667 \approx H_o \text{ CZM2} = 0.581$). Esto puede explicarse debido a que la diversidad alélica (número de alelos) se pierde más rápidamente que la heterocigosidad durante un cuello de botella, lo que resulta en valores similares de H_o entre poblaciones, a pesar de que exista una diferenciación alélica y genotípica significativa entre éstas.

Una de las hipótesis planteadas en este trabajo era que *B. constrictor* en Cozumel presentaría una variabilidad genética baja, en términos de diversidad alélica, debido a su probable origen a partir de un reducido número de individuos. Sin embargo los resultados mostraron que la población de Cozumel en conjunto tiene una diversidad alélica relativamente alta, así como la ausencia de un desequilibrio de ligamiento (relacionado también con cambios en el tamaño poblacional).

Un aumento en la diversidad genética de marcadores moleculares con segregación mendeliana, como los microsatélites, puede relacionarse directamente con un aumento en el tamaño efectivo de los propágulos en el momento de la introducción (Douglosh & Parker 2008). Múltiples introducciones, o la introducción de propágulos provenientes de diferentes fuentes de origen, pueden generar un aumento a corto plazo del tamaño efectivo, N_e , lo que

permite a su vez el mantenimiento de hasta el 80% de la diversidad genética, al comparar una población introducida con su población de origen (Douglosh & Parker 2008). En nuestro caso, a pesar de que no se pudo comparar directamente la relación que guarda la población de Cozumel con la de sus posibles fuentes de origen (Morelos y/o Veracruz; Álvarez-Romero et al. 2008), sí podemos descartar la introducción de individuos de múltiples fuentes (Cuarón comun. pers.), aunado además a que se observa un rango alélico continuo en la población de Cozumel en conjunto. Por lo tanto, la diversidad observada puede explicarse en términos de factores inherentes a la biología de esta serpiente, que pueden asociarse con un aumento de la diversidad genética inicial de los individuos introducidos, dado por: *i*) la presencia de hembras preñadas durante la introducción, ya que considerando que la introducción fue en abril, y que la época de apareamiento de la boa es durante diciembre a marzo, es probable que haya habido nacimiento de crías inmediato a la introducción; *ii*) se ha observado que la introducción de individuos no emparentados puede retrasar los efectos de la endogamia por varias generaciones, proceso que disminuye la probabilidad de identidad por descendencia entre los alelos en descendientes sucesivos (Allendorf & Luikart 2006); y *iii*) se sabe que existe paternidad múltiple o almacenamiento de esperma de manera natural en reptiles, incluyendo algunas familias de serpientes (McCracken et al. 1999, Server & Hamlett 2002, Uller & Olson 2008). Asimismo, se conoce que taxa que presentan paternidad múltiple poseen también una mayor diversidad genética, así como tamaños efectivos mayores comparándolas con grupos que presentan monogamia estricta (Karl 2008). A pesar de que la paternidad múltiple no se ha confirmado en ninguna subespecie de *B. constrictor*, sí se conoce que forman agregados múltiples durante el apareamiento (*B. c. occidentalis*; Bertona & Chiaraviglio 2003, Rivas & Burghardt 2005). También, se ha reportado almacenamiento de esperma en individuos en cautiverio de la subespecie *B. c. imperator* (Smith 2005), donde una hembra tuvo crías en dos ocasiones hasta 21 meses después de un único apareamiento. Así, si algunas de las hembras introducidas en Cozumel hubieran tenido esperma almacenado de eventos reproductivos anteriores a la introducción, ello podría asociarse a un efecto fundador menor.

Se observó asimismo una desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg en la población CZM1 y para la población de la isla en conjunto. En el caso de la población CZM1 los loci *Bci-14* y $\mu\text{sat}36$ mostraron una deficiencia de heterocigotos, mientras que en los loci *Bci-21* y $\mu\text{sat}1$ hubo exceso de heterocigotos. Este contraste en el desequilibrio de Hardy-Weinberg en poblaciones adyacentes o geográficamente cercanas a poblaciones en equilibrio, se ha reportado para serpientes con una estructura genética a “escala fina”, donde

poblaciones separadas por menos de 2 km exhiben este contraste, como la culebra acuática *Nerodia sipedon sipedon* (Prosser et al. 1999, 2000), en la víbora de cascabel *Sistrurus catenatus catenatus* que presenta hábitos de hibernación (Lougheed et al. 2000), así como en otros reptiles, como en la lagartija *Anolis unifomis*, donde se observan poblaciones con diferentes grados de desequilibrio, dependiendo del tamaño de los “parches” de vegetación donde estas se localicen (Arroyo-Lambaer 2008).

La desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg puede darse en las poblaciones debido a diferentes factores: deriva génica, selección, presencia de alelos nulos, endogamia o el efecto Wahlund (Hedrick 2000, Allendorf & Luikart 2006, Templeton 2006). Este último ocurre cuando una muestra que es considerada como una sola población, en realidad se encuentra estructurada en varias subdivisiones, generadas ya sea por barreras ecológicas, físicas o temporales, lo que resulta en un exceso de homocigotos. Para este estudio se puede descartar un efecto importante de los alelos nulos ya que solamente el locus $\mu\text{sat}1$ presentó este tipo de alelos para la población en conjunto. Por otro lado, el efecto Wahlund puede señalarse como factor causante de la desviación del equilibrio de H-W en la población de Cozumel en conjunto, ya que como muestran los resultados, esta población posee dos “subdivisiones”: CZM1 y CZM2.

En cuanto a la población CZM1, que presentó tanto un exceso como una deficiencia de heterocigotos para ciertos loci, podría explicarse en términos de la acción de la deriva génica a nivel local. La ciudad de San Miguel Cozumel y la mayor zona hotelera de la isla se encuentran dentro del área que ocupa CZM1: dada la cercanía a esta zona habitada, con frecuencia se matan o atropellan animales, lo cual se refleja en una menor presencia de boas vivas (Romero-Nájera 2006, Romero-Nájera et al. 2007). Los 13 alelos exclusivos para esta población se encuentran en frecuencias muy bajas (0.017 a 0.117), y en no más de tres individuos de esta población. Este número reducido de individuos con alelos privados concuerda con un escenario donde la deriva permite observar alelos que son poco frecuentes en la población de la isla en conjunto, pero son relativamente más frecuentes en la población CZM1.

8.2 Estructura genética y diferenciación

El valor de F_{ST} obtenido fue muy pequeño (0.037) y con un consecuente alto número de migrantes ($Nm=6.5$), lo que indica una diferenciación genética débil (Hartl & Clark 1999, Balloux & Lougon-Mouloin 2002). Los valores basados en R_{ST} fueron mayores ($R_{ST}=0.090$ y

$Nm=2.5$). Aunque se reconoce que el índice R_{ST} es más adecuado para el análisis con microsatélites, con tamaños de muestra reducidos ($N < 50$) y pocos loci analizados (< 20), F_{ST} es más adecuado para evaluar estructura genética (Gaggiotti et al. 1999), además de que presenta una sensibilidad alta en relación con flujo genético reducido (Balloux & Lougou-Mouloin 2002). Dado que no hubo diferencias significativas al comparar los valores de F_{ST} y D_{C-S} con y sin la corrección para alelos nulos, se puede descartar un efecto de alelos nulos sobre la estimación de la estructura genética. Asimismo, se obtuvo un valor marcadamente bajo de distancia genética entre poblaciones ($D_{NEI} = 0.110$), mientras que su valor recíproco que es la identidad genética, fue de 0.895, lo que indica también una escasa diferenciación entre CZM1 y CZM2. En el árbol de Neighbor-Joining (NJ), que incluye también poblaciones de boa del continente, se aprecia que la distancia genética entre las poblaciones de Cozumel es la distancia más pequeña en relación con cualquier población continental.

En varias especies de serpientes se ha observado una correlación positiva entre la distancia genética y la distancia geográfica, es decir un aislamiento por distancia positivo y significativo, así como otros tipos de correlación entre la distancia genética y factores ambientales (e.g. temperatura), independientes del hábito (terrestre o acuático) y del tipo de marcador molecular usado (Prioir et al. 1996, Prosser et al. 1999, Groot et al. 2003, Bertona & Chiaraviglio 2003, Manier & Arnold 2005, Guicking et al. 2006, Jansen et al. 2008, Lukoschek et al. 2008, Tzika et al. 2008a, 2009, Marshall Jr. et al. 2009). La topología del árbol de NJ sugiere un patrón similar para las poblaciones de *B. constrictor* de México, dado que la población de Jalisco es la más distanciada y las de la península intermedias; sin embargo, es necesario un muestreo más completo para confirmar este patrón.

Los valores bajos de F_{ST} , indicativos de poca o nula estructuración, van acorde con otra de las hipótesis de este trabajo: que *B. constrictor* presentaría poca diferenciación genética y una baja estructuración, resultado de la reciente introducción a la isla hace poco más de 40 años. Estos resultados concuerdan con datos de reptiles y anfibios introducidos en otras islas oceánicas, como la *Rana ribunda* introducida a Gran Bretaña en 1935, que presenta valores de F_{ST} entre 0.051 y 0.206 (Zeisset & Beebee, 2003); *A. cristatellus* introducida en la República Dominicana en el año 2000, presenta valores de 0.033 (Eales et al. 2008). Por el contrario, poblaciones de reptiles nativos de islas oceánicas presentan una estructuración más marcada: *E. subflavus*, serpiente endémica de Jamaica, presenta valores de F_{ST} de 0.12 (Tzika et al. 2008a), mientras que en las Islas Galápagos, especies del género de iguanas *Conolophus* presentan valores entre 0.170 a 0.700 (Tzika et al. 2008b). Además, se ha observado que los patrones de flujo genético en serpientes dependen frecuentemente de

barreras ecológicas (Manier & Arnold 2006, Marshall Jr. et al. 2009), lo que se relaciona con una mayor estructuración de poblaciones nativas con respecto a las introducidas. Asimismo, el alto número de migrantes observado entre poblaciones es consistente con datos biológicos reportados para *B. c. occidentalis* en el norte de Argentina, donde los machos durante la época de reproducción pueden llegar a desplazarse una distancia promedio de 1.5 km por mes (Rivera et al. 2006).

La distribución de las dos poblaciones de *B. constrictor* en Cozumel tiene una estructuración este-oeste, lo cual sugiere un efecto importante de la presencia humana (Fig. 2). Esto es, la población de CZM1 se encuentra en la zona con mayor urbanización en la isla, delimitada por características antropogénicas del paisaje, como los ejes trazados para el sistema de captación de agua, el pueblo "El Cedra" y la presencia de las carreteras transversal y perimetral oeste. En contraste, la población CZM2 se localiza en la zona con menor ocupación humana, incluido el parque estatal de "Punta Sur".

La escasa pero clara estructuración entre las poblaciones en Cozumel se aprecia también con los resultados del análisis factorial de correspondencia donde se muestran dos grupos formados por los genotipos de cada individuo, que corresponden a las dos poblaciones genéticas (Fig. 8). Otra diferencia notoria entre las poblaciones fueron las relaciones de parentesco: en CZM1 la mayor proporción fueron individuos no relacionados seguida de hermanos, mientras que para CZM2, la mayor frecuencia fue sin relación, seguido de medios hermanos. Esto sugiere que en la población CZM1 puede existir una mayor endogamia, lo cual además resulta congruente con el hecho de que esta población se encuentra fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg.

Finalmente, los resultados de la AMOVA mostraron que el mayor porcentaje de variación genética se distribuye dentro de los individuos (70%) y el menor entre las poblaciones (4%). Ello es coherente con el hecho de tener un número desigual de alelos exclusivos en las poblaciones, lo cual enfatiza las diferencias genotípicas entre los individuos en cada población. Patrones similares de varianza molecular se observan en serpientes y lagartijas que han sufrido una reducción poblacional o fragmentación reciente (Eales et al. 2008, Jansen et al. 2008, Marshall Jr. et al. 2009), donde un 75% de la variación genética se observa en los individuos y menos de un 25% entre poblaciones o grupos.

Todo lo mencionado anteriormente sugiere que el tiempo desde la introducción de la boa a Cozumel y del establecimiento de las poblaciones es suficientemente reciente como para que la diferenciación entre poblaciones sea en la actualidad baja. Pero al mismo tiempo

se evidencia que la estructuración genética está en proceso y que ésta será mayor en el corto o mediano plazo.

8.3 Cuello de botella y tamaño efectivo

Los resultados mostraron evidencia de un cuello de botella asociado con exceso de heterocigotos en la población CZM2 y para la población de Cozumel en conjunto, bajo el modelo IAM. Por el contrario, no se detectó señal de cuello de botella bajo los modelos de TPM y SMM (Bottleneck; Cornet & Luikart 1996). Estos resultados deben tomarse con precaución ya que, bajo el modelo de mutación IAM, es posible detectar un exceso de heterocigosis asociado a cuello de botella cuando se utilizan microsatélites, incluso en poblaciones que no han pasado por una disminución poblacional reciente (Luikart & Cournet 1998). Ello porque los microsatélites se aproximan más a un modelo de mutación tipo SMM, y el modelo IAM tiende a predecir una heterocigosis en equilibrio mutación-deriva menor que el esperado bajo SMM (Luikart & Cournet 1998). Con respecto a la no detección del cuello de botella bajo los otros modelos de mutación, puede deberse al hecho de que el número de loci polimórficos recomendados para que este método detecte una reducción poblacional es de al menos cinco (Cournet & Luikart 1996, Luikart & Cournet 1998). Sin embargo, con base en el índice Garza-Williamson (M ratio; Garza & Williamson 2001) se detectó una reducción drástica del tamaño poblacional para todos los casos (CZM1, CZM2 y Cozumel en conjunto). Aunque los dos métodos utilizados se basan en el número y proporción de alelos, así como en el exceso de heterocigosidad para estimar cambios en el tamaño poblacional (M y M_c Garza & Williamson 2001; H_e y H_{eQ} Cournet-Luikart 1996), el método Garza-Williamson genera un índice dependiente del proceso de mutación a partir de dichas características, por lo que se pueden considerar específicos para microsatélites (Garza-Williamson 2001). Otra ventaja de este método es su capacidad para distinguir entre poblaciones que han sufrido reducciones poblacionales recientes de aquéllas que han tenido un tamaño poblacional reducido por largo tiempo (Garza & Williamson 2001). Por lo tanto, se puede concluir que sí existe una señal de un cuello de botella en la población de *B. constrictor* en la isla, acorde con el hecho de que indudablemente, hubo un efecto fundador a partir de la introducción de un número reducido de serpientes hace poco más de 40 años.

También se obtuvieron resultados diferentes en la estimación del tamaño efectivo (N_e) según el método utilizado para calcularlo. La población CZM2 presentó el tamaño efectivo

más grande al estimarlo con el método basado en el desequilibrio de ligamiento, mientras que con el método basado en el parámetro poblacional theta, el tamaño efectivo mayor fue para CZM1. En general, los tamaños inferidos a partir de theta fueron en promedio 10 veces más grandes. Una posible explicación para esta diferencia entre la estimación del tamaño efectivo puede ser que con el método de desequilibrio de ligamiento, si se tiene un tamaño de muestra mucho menor que el N_e real, se puede subestimar el tamaño efectivo verdadero (England et al. 2005). En comparación, para la población de Cozumel en conjunto se obtuvieron tamaños efectivos similares con ambos métodos, por lo que se puede indicar un N_e promedio para Cozumel de 490.6 individuos. Se han reportado valores de N_e similares en serpientes con distribuciones geográficas restringidas: la culebra *Nerodia erythrogaster negleca*, que se distribuye en poblaciones separadas por distancias de hasta 300 km, presenta un N_e ajustado para un modelo de mutación SMM de 563.8 a 1166.7 individuos. Un estudio con las serpientes semiacuáticas *Thamnophis elegans* y *T. sirtalis* muestra N_e similares, ya sea basados en un método de recaptura ($N_e = 274.5$), como a partir de microsatélites ($N_e = 325.75$) (Manier & Arnold 2005).

8.4 Boa constrictor en Cozumel con respecto a otros ejemplos de introducción de serpientes

Hay pocos ejemplos que hayan estudiado específicamente la introducción de serpientes es a islas oceánicas y que sean comparables con este trabajo. Un ejemplo ampliamente estudiado y del cual se tienen datos muy precisos acerca del proceso e impacto de la introducción es el de la serpiente arbórea marrón *Boiga irregularis*, la cual se distribuye de manera natural en Indonesia, Nueva Guinea y costas del norte de Australia, y que fue introducida accidentalmente a la isla de Guam en 1952 (Fritts & Roda 1998, Roda et al. 2001, IUCN 2001). Cabe señalar que en Guam no existían serpientes de manera natural. Entre 1960 y 1985, esta serpiente provocó la extinción virtual de todos los vertebrados terrestres nativos en la isla: 10 especies de pájaros, dos especies de murciélagos y 10 especies de reptiles, además de que esta serpiente posee un veneno moderadamente tóxico para los humanos (Fritts & Roda 1998), por lo que se han reportado casos fatales de mordeduras accidentales en niños pequeños (IUCN 2001, Roda et al. 2001). A pesar de que se tiene amplio conocimiento sobre la biología e historia de la invasión de *B. irregularis* en Guam, sólo recientemente se han realizado estudios genéticos donde se investiga su origen (Rawlings en prensa, Waye en prensa).

Otro ejemplo es el de *Natrix maura*, una serpiente introducida a la isla de Mallorca, España, la cual se considera el principal factor de disminución de las poblaciones del sapo endémico *Alytes muletensis*. A pesar de que existían evidencias biológicas que sugerían la introducción reciente de *N. maura* en la isla (e.g. su ausencia en el registro fósil), fue gracias a estudios moleculares basados en ISSR's y mtDNA, que se logró confirmar que esta serpiente fue introducida por los romanos durante el siglo I d.C, a partir de poblaciones localizadas en España y Francia (Guicking et al. 2006).

Es importante mencionar que la presencia de *B. constrictor* en Cozumel está directamente asociada con la disminución de poblaciones de diferentes vertebrados terrestres (González-Baca 2006), ya que hoy por hoy es el depredador más abundante de la isla. La extinción virtual del roedor endémico *Peromyscus leucopus cozumelae* (Vega-Bernal et al. 2007, Fuentes-Montemayor et al. 2009) puede relacionarse directamente con la introducción de la boa, ya que mientras que este roedor era el más abundante de los roedores antes de 1970, en los últimos 15 años no se ha tenido registro alguno de éste (Vázquez-Domínguez com. pers.), periodo que coincide con la introducción y expansión de *B. constrictor* en Cozumel. A pesar de que el origen de la boa en Cozumel no ha podido ser confirmado (Veracruz o Morelos), los resultados del presente estudio sugieren que, de las boas continentales evaluadas en este estudio, están más cercanamente relacionadas con aquéllas de la península que con la de Jalisco. Un mayor muestreo, tanto de número de individuos pero sobre todo de localidades continentales, en conjunto con la utilización de más loci de microsatélites, permitirán resolver esta incógnita.

9. Conclusiones

Boa constrictor en la Isla Cozumel presenta niveles de diversidad genética y alélica relativamente altos, que a su vez son comparables con los observados en otras especies de reptiles que han experimentado subdivisiones poblacionales a lo largo de su distribución. La población total en la isla presentó una estructuración genética que aunque escasa, permite separarla en dos poblaciones, cada una con cualidades genéticas significativamente diferentes. La presencia humana se observa como el factor principal que puede estar generando esta diferenciación.

Se confirmó que, como se había hipotetizado, la población de *B. constrictor* de Cozumel sí pasó por un cuello de botella resultado de la introducción de pocos individuos a la isla hace 40 años. Por otro lado, la boa tiene un tamaño poblacional efectivo similar al observado en otras serpientes con distribuciones restringidas o que han sufrido una fragmentación reciente de su hábitat.

Las características anteriormente mencionadas concuerdan con el resto de los datos ecológicos e históricos que indican que *B. constrictor* fue introducida recientemente en la isla Cozumel.

A partir de este caso en particular, se denota que es necesario profundizar en la búsqueda de información biológica sobre estas especies introducidas, para tomar decisiones acertadas con respecto a su manejo y control, pensando a corto y largo plazo.

10. Literatura citada

- Allendorf F.W., G. Luikart 2007. *Conservation and the genetics of populations*. Blackwell Publishing. USA. 641pp.
- Avice J. C. 1994. *Molecular markers, the natural history and evolution*. Chapman & Hall. USA. 511pp.
- Álvarez-Romero J. G, R. A. Medellín, A. Oliveras de Ita, H. Gómez de Silva y O Sánchez. 2008. *Animales exóticos en México: una amenaza para la biodiversidad*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Instituto de Ecología UNAM, Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Proyecto U020. México. 518pp.
- Aranguren-Méndez J. A. R., W. Román-Bravo, Y. Isea, J. Villasmil, J., Jordana. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 13. 1-6
- Arroyo-Lamber, D. 2008. Estructura genética en poblaciones fragmentadas de *Anolis uniformis* (Reptilia: Squamata) usando secuencias mitocondriales y microsatélites. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. México.
- Balloux F. & N. Lugon-Moulin. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11, 5-165.
- Barillas-Gómez, A. L. 2007. Influencia de la exposición al borde sobre la estructura de la vegetación de la Selva Mediana en la Isla Cozumel. Tesis de maestría. UNAM. Centro de Investigaciones en Ecosistemas. México. 58pp.
- Beaumont M.A., B. Rannala. 2004. The Bayesian revolution in genetics. *Nature Reviews: Genetics* 5. 251-261.
- Belkhir K.P., L. Borsa, N. Chikhi, N. Arrufaste, F. Bonhomme. 2004: GENETIX 4.05: logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome. Populations, Interactions. CNRS UMR 500, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Benzécri J. P. 1973. L'Analyse des Données: Tome. II, L'Analyse des correspondances. Dunod Francia.
- Bertona M., M. Chiaraviglio, 2003. Reproductive biology, mating aggregations and sexual dimorphism of the argentine *Boa constrictor* (*Boa constrictor occidentalis*). *Journal of Herpetology* 37, 510-516.
- Blouin, M. S. 2003: DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends in Ecology and Evolution* 18. 503-511.
- Boback S. M. 2005: Natural History and Conservation of Island Boas (*Boa constrictor*) in Belize. *Copeia* 4, 879-884pp.
- Boback S. M. 2006. A morphometric comparison of island and mainland boas (*Boa constrictor*) in Belize. *Copeia* 2. 261-267pp.
- Bonhomme M., A. Blancher, S. Cuartero, L. Chikhi, B. Crouau-Roy. 2008. Origin and number of founders in an introduced insular primate: estimation from nuclear genetic data. *Molecular Ecology* 17. 1009-1019.
- Brambilla-Navarrete, J. 2007. Distribución de abundancia de la serpiente *Boa constrictor imperator* (Linnaeus 1758) en el ejido La Perla de San Martín los Tuxtlas, Veracruz. Tesis de Licenciatura. UNAM, Facultad de Ciencias. México. 51pp.
- Brookfield J. F.Y., 1996: A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* 5. 453-455.
- Burbrink F.T. 2005. Inferring the phylogenetic position of *Boa Constrictor* among the Boinae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34.167-180.
- Castañeda-Rico S.S. 2008. Diversidad Genética de *Habromys simulatus*, una especie endémica y restringida al bosque mesófilo de montaña. Tesis de Maestría. Instituto de Ecología. México.

- Cavali-Sforza L.L., A.W.F. Edwards. 1967: Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* 19. 2333-257.
- Chapco, W. 1976. An exact test of the Hardy-Weinberg law. *Biometrics* 32. 183-189.
- Chapuis M., P.A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24. 621-631.
- Chiaraviglio M., M. Bertona, M. Sironi, S. Luciano, 2003. Intrapopulation variation in life history traits of *Boa constrictor occidentalis* in Argentina. *Amphibia-Reptilia* 24. 65-74.
- Colautti R. I., I. A. Grigorovich, H. J. MacIsaac 2006. Propagule pressure: a null model for biological invasions. *Biological Invasions* 2006. 1023-1037.
- Copa-Álvaro M. E. C. 2007. Efectos de los huracanes Emily y Wilma en los mamíferos medianos de Cozumel. Tesis de Maestría. Instituto de Ecología. México. 101pp.
- Cournet J. M. & G. Luikart, 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144. 2001-2014.
- Crother B. I. 1999: *Caribbean amphibians and reptiles*. Academic Press. USA. 495pp
- Cuarón A.D., M.A. Martínez-Morales, K.W. McFadden, D. Valenzuela, M.E. Gompper. 2004. The status of dwarf carnivores of Cozumel Island, Mexico. *Biodiversity and Conservation* 13. 317-331.
- Dale J.W., M. von Schantz: 2002. *From genes to genomes: concepts and applications of DNA technology*. Wiley, England: 360pp.
- Dever J.A., R. E. Strauss, T.R. Rainwater, S. T. McMurry, LL. D. Densmore III. 2002. Genetic diversity, population subdivision and gene flow in Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) from Belize, Central America. *Copeia* 4. 1078-1091
- Di Renzo A., A.C. Peterson, J.C. Garza, A.M. Valdés, M. Slatkin, N.B. Fremier, 1994. Mutational Processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 3166-3170.
- Dlugosh K.M, M. Parker, 2008. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology* 17, 431-449.
- Drake J.M. 2006. Heterosis, the catapult effect and establishment success of a colonizing bird. *Biology Letters* 2. 304-307.
- Eales J., R. S. Thorpe, A. Malhotra, 2008. Weak founder effect signal in a recent introduction of Caribbean *Anolis*. *Molecular Ecology* 17, 1416-1426.
- England P.R., J. M. Cournet, P. Berthier, D.A. Tallamont, G: Luikart. 2005. Estimating effective population size from linkage disequilibrium: sever bias in small samples. *Conservation Genetics* 7. 3003-308.
- Escalante-Hernández A. E. 2001. Estructura genética de poblaciones de *Pinnus pinacea*, usando como marcadores microsatélites de cloroplasto (cpSSR's). Tesis de Licenciatura. UNAM. Facultad de Ciencias. México.
- Excoffier, L. & M. Slatkin. 1998. Incorporating Genotypes of Relatives into a Test of Linkage Disequilibrium. *American Journal of Human Genetics* 62. 171-180.
- Excoffier, L., P. E. Smmosue, J. M. Quattro. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Applications to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics* 131: 479-491.
- Excoffier, L., G., Laval, S. Schenider. 2005. Arlequin v. 3.0: An integrated software Packaged for populations genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 46-50.
- Falush, D., M., Stephens, J. K., Pritchard. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587.
- Faria P.J., N.M.R. Guedes, C. Yamashita, P. Martuscelli, C. Y. Miyaki. 2008. Genetic variation and population structure of endangered Hyacinth Macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*): implications for conservation. *Biodiversity and Conservation* 17. 765-779.
- Felstein J. 2008: PHYLIP 3.68, the Phylogeny Inference Package. Departamento of Genome Sciences and Department of Biology. University of Washington, USA.

- Flores-Villela, O., L. Canseco-Márquez. 2004. Nuevas Especies y cambios taxonómicos para la herpetofauna en México. *Acta Zoológica Mexicana* 20. 115-144.
- Forsyth D. M: and R. P. Duncan. 2001. Propagule Size and the Relative Success of Exotic Ungulate and Bird Introductions to New Zealand. *The American Naturalist* 157. 583 – 594
- Freeman S., J. C. Herron. 2002: *Análisis Evolutivo*. Prentice Hall. España. 703pp
- Fritts, T. H. and Rodda G. H. 1998. The role of introduced species in the degradation of island ecosystems: a case history of Guam. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 113-140.
- Fuentes-Montemayor E. 2007. Efectos de borde provocados por caminos sobre poblaciones de ratones endémicos de la Isla Cozumel. Tesis de Maestría. UNAM. Instituto de Ecología. México.
- Fuentes-Montemayor E., A. D. Cuarón, E. Vázquez-Domínguez, J. Benítez-Malvido, D. Valenzuela-Galvan, E. Andersen. 2009. Living on the Edge: roads and Edge effects on small mammal populations. *Journal of Animal Ecology*, doi: 10.1111/j.1365-2656.2009.01551.x.
- Gaggiotti, O.E., O. Lange, K. Rassmann, C. Gliddons. 1999, A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology* 8. 1513-1520.
- Garza J. C., E. G. Williamson: Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10. 305-318.
- Gillespie J. H. 2004. *Population genetics: A concise guide*. The John Hopkins University Press. USA. 223pp.
- Godinho, R., Mendonça, B., Crespo, E. G., Ferrand, N. 2006. Genealogy of the nuclear beta-fibrinogen locus in a highly structured lizard species: comparison with mtDNA and evidence for intragenic recombination in the hybrid zone. *Heredity*, 96.454-463.
- Goudet J. 1995. FSTAT(v 1.2): A computer program to calculate f-statics. *Journal of Heredity* 86: 485-486.
- Griffiths A. J. F., W.M. Gelbart, J. H. Miller, R.C. Lewontin. 2004. *Genética Moderna*. McGraw Hill Interamericana. España. 676 pp.
- Groot T.V.M., E. Bruins, J.A.J. 2003: Molecular genetic evidence for parthenogenesis in the Burmese python, *Python molorus bivittatus*. *Heredity* 90. 130-135.
- Goldstein D.B., C. Schlötterer 2000. *Microsatellites*. Oxford University Press. USA, 352pp.
- González-Baca, C.A. 2006. Ecología de forrajeo de *Boa constrictor*, un predador introducido a la isla de Cozumel. Tesis de Maestría, UNAM, Centro de Investigaciones en Ecosistemas, México.
- Guicking D.A., R.A. Griffiths, R.D. Moore, U. Joger, M. Wonk. 2006. Introduced alien or persecuted native? Resolving the origin of the viperine snake (*Natrix maura*) on Mallorca. *Biodiversity and Conservation* 15. 3045-3054.
- Guillot G., A. Estoup, F. Mortier, J.F. Cosson. 2005. A spatial statical model of landscape genetics *Genetics* 170: 1261-1280.
- Guillot, G., F. Mortier, A. Estoup. 2005: GENELAND: a computer package for landscape genetics *Molecular Ecology Notes* 2005. 712-715
- Guillot, G. 2009. On the inference of spatial structure from population genetics data using the Tess program *Bioinformatics*. In press
- S.W. Guo, E.A.Thompson.1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. 48. 361-72
- Hartl D.L., A.G. Clark, 1997. *Principles of Population Genetics*, Sinauer Associates, Inc. USA. 682pp.
- Hedrick P.W: 2000: *Genetics of Populations*. Jones and Bartlett Publishers. Canada. 544 pp
- Hill W.G., 1981. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium *Genetics Research* 38:209-216.

- Hille A., I.A.W. Janssen, S.B.J. Menken, M. Schlegel, R.S. Thorpe. 2002. Heterologous amplification of microsatellite markers from colubroid snakes in European Natricinae. *The Journal of Heredity* 93. 63-66
- Howeth J.G., S.E. McGaugh, D. A. Hendrickson. 2008. Contrasting demographic and genetic estimates of dispersal in the endangered Coahuilan box turtle: a contemporary approach to conservation. *Molecular Ecology* 17. 4209-4221
- Invasive Species Specialist Group of the IUCN Species Survival Commission: 2001, *ALIENS*. 14, Special Issue on Island
- Jansen K.P., H.R. Mushinsky, S.A. Karl, 2008. Population genetics of the mangrove salt marsh snake, *Nerodia clarkii compressicauda*, in a linear fragmented habitat. *Conservation Genetics* 9. 401-410
- Jarne, P., P.J.L. Lagoda. 1996: Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11. 424-429
- Kalinowski S.T., A.P. Wagner, M.L. Taper. 2006. ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* 6 576-579.
- Karl S.A. 2008. The effect of multiple paternity on the genetically effective size of a population. *Molecular Ecology* 17. 3973-3977.
- Kluge A.G. 1991. *Boine snake phylogeny and research*. *Miscellaneous Publications of Museum of Zoology*. University of Michigan, 178. 68pp.
- Koen J. F., K. L. Verhoven, L. Simonsen and L. M. McIntyre. 2005. Implementing false discovery rate control: increasing your power. *Oikos* 108. 643-647.
- Kolbe J.J., R.E. Glor, L.R. Schettino, A.C. Lara, A. Larson, J.B. Losos: 2007: Multiple sources, admixture, and genetic variation in introduced *Anolis* Lizard populations. *Conservation Biology* 21 1612 – 1625
- Langhammer, James K. 1983. A new subspecies of boa constrictor, *Boa constrictor melanogaster*, from Ecuador (Serpentes: Boidae). *Tropical Fish Hobbyist* 32. 70-79.
- Lee J.C. 2000: *A Field Guide to the amphibians and reptiles of the Mayan World: the lowlands of Mexico, Northern Guatemala and Belize*. Cornell University Press. USA, 402pp.
- Li W.H., 2000. *Fundamentals of molecular evolution*. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA. 478pp.
- Li Y.C., A.B. Korol, T. Fahima, A. Beiles, E. Nevo 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11. 2453-2465.
- Lima-Rosa C. A. V., M.H. Hurtz, L.F.B. Oliveira, J. Andrades-Miranda, M.S. Mattevi. 2000. Heterologous amplification of microsatellite loci from Mouse and Rat in Oryzomyine and Thomasomyine South American rodents. *Biochemical Genetics* 38. 97-108.
- Lougheed S.C., H.L. Gibbs, K.A. Prior, Wearhead P. J. 2000. A comparison of RAPD vs. microsatellite DNA markers in population studies of the Massasauga rattlesnake. *The Journal of Heredity* 91. 458-463.
- Luikart G. 1999. Statistical analysis of microsatellite DNA data. *Trends in Ecology and Evolution* 14.253-256.
- Luikart G., J.M. Cournet. 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology* 12. 228-237.
- Lukoschek V., M. Waaycott, S. Keogh 2008. Relative information content of polymorphic microsatellites and mitochondrial DNA for inferring dispersal and population genetic structure in the olive sea snake, *Aypisurus laevis*. *Molecular Ecology* 17. 3062-377.
- Manier M.K., S. J. Arnold: Populations genetic analysis identifies source –sink dynamics for tow sympatric garter snakes species (*Thamnophis elegnas* and *Thamnophis sirtalis*). *Molecular Ecology* 14. 3965-3976.
- Manier M.K., S.I. Arnold. 2006. Ecological correlates of population genetic structure: a comparative using a vertebrate metacommunity. *Proceedings of The Royal Society of London, Biology Letters* 273. 3001-3009.

- Martínez-Morales M.A., A.D Cuarón 1999. *Boa constrictor*, an introduced predator threatening the endemic fauna on Cozumel Island, México. *Biodiversity and Conservation* 8. 957-963.
- Marshall Jr. J.C., B.A. Kinsgbury, D.J. Minchella, 2009. Microsatellite variation, population structure, and bottlenecks in the threatened copperbelly water snake. *Conservation Genetics* 10. 465-476.
- McCracken G.F., Burghardt G.M., S.E. Houts. 1999: Microsatellite markers and multiple paternity in the garter snake *Thamnophis sirtalis*. *Molecular Ecology* 8. 1475-1479.
- Michalakis Y., L. Excoffier. 1996. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics* 142. 1061-1064
- Moreno-Letelier, A. 2007. Tamaño Efectivo de la Población *in Ecología Molecular*. Eguiarte L.E., V. Souza, X. Aguirre (compiladores). SEMARNAT-INE-UNAM-CONABIO, 2007. 592pp.
- Murphy R.W., B. Crabtree. 1985. Genetic relationships of the Santa Catalina Island rattles rattlesnake *Crotalus catalinensis* (Serpentes: Viperidae). *Acta Zoológica Mexicana* 9. 16pp
- Nei M. 1972. Genetic distance between Populations. *The American Naturalist* 106. 283-292.
- Nei M., W.H. Li. 1972. Linkage Disequilibrium in Subdivided Populations. *Genetics* 75. 213-219.
- Nei, M. 2000: *Molecular evolution and phylogenetics*. University of Oxford. New York. 333pp.
- Noonan B.P., P.T. 2006. Chippindale: Dispersal and Vicariance: The complex evolutionary history of Boid snakes. *Molecular phylogenetics and evolution* 40. 347-358.
- Peel, D., Ovenden, J.R., Peel, S.L., 2004. NeESTIMATOR: Software for Estimating Effective Population Size, Version 1.3. Queensland Government: Department of Primary Industries and Fisheries, Brisbane, Queensland.
- Palstra F. P. D. E. Ruzzante. 2008. Genetic estimates of contemporary effective population size: what can they tell us about the importance of genetic stochasticity for wild population persistence? *Molecular Ecology* 17. 3428-3447.
- Payne C.M., C.V. Tillberg, A.V. Suarez 2004. Recognition systems and biological invasions. *Annales Zoologici Fennici* 41: 843-858.
- Peakall R., P.E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6. 288-295.
- Perdomo-Velásquez, H. 2006. Caminos como barreras para el movimiento de aves y efectos del huracán Wilma, en una comunidad de aves de sotobosque de la selva mediana subcaducifolia de la Isla Cozumel. Tesis de Maestría. UNAM, Centro de Estudios Ecosistémicos. México.
- Pérez-Higareda, G., M. A. López-Luna, H. M. Smith. 2007. *Serpientes de la región de Los Tuxtlas, Veracruz, México: Guía de identificación ilustrada*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Price, Robert M. and Russo, Paul, 1991: Revisionary Comments on the Genus *Boa* with the description of a new subspecies of *boa constrictor* from Peru. *The Snake* 23. 29-35.
- Piry S., A. Alapetite, J. M. Cornuet, D. Paetkau, L. Baudouin, A. Estoup. 2004: GENECLASS 2: A software for genetics assignment and first-generation migrant detections. *Journal of Heredity* 95. 536-539.
- Prior K. A., H. L. Gibbs, P.J. Weatherhead. 1996. Population genetic structure y Black Rat Snake: implications for management. *Conservation Biology* 11. 1147-1158.
- Pritchard J. K., M. Stephens, P. Donnelly. 2000: Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155. 945-959.
- Prosser M. L., H. L. Gibbs, P.J. Weatherhead. 1999. Microgeographic population structure in the northern water snake, *Nerodia sipedon sipedon* detected using microsatellite DNA loci. *Molecular Ecology* 8. 329-333
- Prosser M. L., H. L. Gibbs, P.J. Weatherhead, H.L. Gibbs, G.P. Brown. 2000. Genetic analysis of the mating system and opportunity for sexual selection in northern water snakes (*Nerodia sipedon*). *Behavioral Ecology* 13. 800-807.

- Quick J.S., H.K. Reinert, E.R. de Cuba, R.A. Odum. 2005. Recent Occurrence and Dietary Habits of *Boa constrictor* on Aruba, Dutch West Indies. *Journal of Herpetology* 39. 304-307
- Raymond, M., F. Rousset 1995: GENEPOP v 1.2: population genetics software for exact test and ecumenicism . *Journal of Heredity*. 86. 248-249.
- Rawlings L.H., J. M. Whittier, R.T. Mason, S.C. Donellan. Origin of Guam's feral brown tree snakes (*Boiga irregularis*) inferred by molecular genetic markers. *Molecular Ecology* En revisión
- Reaser, J.K., LA. Meyerson, Q. Cronk, M. De, L.G. Eldrege, E. Green, M. Kairo , P. Latasi , RN Mack, J. Mauremootoo, D. O'dowd, W. Orapa, S. Sastroutomo, A, C. Shine, S. Thrainsson, L. Vaiutu 2007. Ecological and socioeconomic impacts of invasive alien species in island ecosystems. *Environmental Conservation* 34. 98-111.
- Reynolds J., B.S. Weir, C. Cockerham. 1983. Estimation of the coancestry coefficient basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105. 767-779.
- Rice W. R. 1988. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43. 223-225.
- Rivas J. A., G. M. Burghardt. 2005. Snake mating systems, behavior, and evolution: the revisionary implications of recent findings. *Journal of Comparative Psychology* 119. 447-454
- Rivera P.C., M. Chiaraviglio, Pérez G., C.N. Cardenal 2005. Protein polymorphism in populations of *Boa constrictor occidentalis* (Boidae) from Cordoba province, Argentina. *Amphibia-Reptilia* 26. 175-181.
- Rivera P.C., C.N. Cardenal, M. Chiaraviglio. 2006. Sex-biased dispersal and high levels of gene flow among local populations in the argentine boa constrictor, *Boa constrictor occidentalis*. *Austral Ecology* 31 948-955
- Rodríguez-Arnaiz, R., A. Castañeda-Sortibrán, M. G. Ordáz-Téllez. 2004. *Conceptos Básicos de Genética*. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 262 Pp.
- Rodda G.H., T.H. Fritts, E.W. Campbell III, K. Dean Bradley, G. Perry, C. P. Qualls. 2002. Practical Concerns in the eradication of island snakes in Turnin the tide: the eradications of invasive species. Veitch C.R., M.N. Clout (eds.) IUCN SSC-Invasive Species Specialist Group. IUCN. UK. pp260-265
- Romero-Mayen, A.R. 2008. Impacto Ecológico de la Herpetofauna Introducida e Invasora en la Republica Mexicana. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias. México.
- Romero-Nájera I, 2004. Distribución, abundancia y uso de hábitat de *Boa constrictor*, introducida a la isla Cozumel. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Romero-Nájera I, A.D. Cuarón, Gonzalez-Baca C. 2007: Distribution, abundance, and habitat use of introduced *Boa constrictor* threatening the native biota of Cozumel Island, Mexico. *Biodiversity and Conservation* 16. 1183-1195.
- Roth E.D. 2005. Spatial ecology of a cottonmouth (*Agkistrodon piscivorus*) population in East Texas. *Journal of Herpetology* 39. 312-315
- Santoyo-Brito, E. 2007. Análisis Taxonómico de las subespecies de *Boa constrictor*, descritas para el territorio mexicano. *Boletín de la Sociedad Herpetológica Mexicana* 15. 45-47
- Sax D.F., J.J. Stachowicz, S.D. Gaines, (Editores) 2005. *Species invasions: insights into ecology, evolution and biogeography*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. USA. pp135-308
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2002. Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001), Protección ambiental-Especies nativas de México de Flora y Fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificación para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en Riesgo. Diario Oficial de la Federación, Segunda Sección, miércoles 6 de marzo de 2002.
- Selkoe, K. A., R. J. Tioonen, 2006. Microsatellites for ecologist: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9. 615-629.
- Sever D.M., W.C. Hamlett. 2002. Female sperm storage in reptiles. *Journal of Experimental Zoology* 292. 187-199.

- Slatkin M, 1995 A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139. 457-462.
- Smith B.W. 2005. Offspring as a result of extended sperm retention in a female Colombian Boa Constrictor (*Boa constrictor imperator*), an account. Animal South LLC, Association of Southern Reptile Education.
- Suarez A. V., N. D. Tsutsui. 2008. The evolutionary consequences of biological invasions. *Molecular Ecology* 17. 351-360.
- Téllez-Valdés O., E. F. Cabrera-Cano. 1987. Listados Florísticos de México. VI. Flórua de la isla Cozumel, Quintana Roo. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México
- Templeton, A.R. 2006. *Population genetics and microevolutionary theory*. Wiley-Liss. UK 705pp.
- Torres-Villegas C.P. 2006. Distribución, abundancia y comportamiento de perros y gatos en la Isla de Cozumel. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México.
- Tzika A.C., S. Koenig, R. Miller, G. García, C. Remy, M. Milinkovitch. 2008a. Population structure of an endemic vulnerable species, the Jamaican boa (*Epicrates subflavus*). *Molecular Ecology* 17. 533-544pp
- Tzika A.C. S.F.P Rosa, A. Fabiani, H.L. Snell, H.M. Snell, C. Marquez, W. Tapia, K. Rassmann, G. Gentile, M. C. Milinkovitch. 2008b. Population genetic of Galápagos land iguana (genus *Colophus*) remnant populations. *Molecular Ecology* 17. 4943-4952.
- Tzika A.C. Remy, M. R. Gibson, Milinkovitch. 2009. Molecular genetic analysis of a captive-breeding program: the vulnerable endemic Jamaican yellow boa. *Conservation Genetics* 10. 69-77pp
- Uller T., M. Olsson. 2008: Multiple paternity in reptiles: patterns and processes. *Molecular Ecology* 17. 2566-2580.
- Van Oosterhout, C., W. F. Hutchinson, D. P. M. Willis, P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping error in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.
- Vázquez-Domínguez E., D. Paetkau, N. Tucker, G. Hintens, C. Moritz. 2001. Resolution of natural groups using iterative assignment test: an example from two species of Australian native rats (*Rattus*). *Molecular Ecology* 10. 2069-2078
- Vázquez-Domínguez E., G. Ceballos, J. Cruzado. 2004. Extirpation of an insular subspecies by a single introduced cat: the case of the endemic deer mouse *Peromyscus guardia* on Estanque Island, Mexico. *Oryx* 38. 2004.
- Vega-Bernal R. R. 2006: Estructura y Diversidad genética de *Orizomys palustris cozumeale* de la isla Cozumel. Instituto de Ecología, UNAM. Tesis de Maestría. México.
- Vega-Bernal R. R., E. Vázquez-Domínguez, A. Mejía-Puente, A. Cuarón. 2007. Unexpected high levels of genetic variability and the population structure of an island endemic rodent (*Orizomys couesi cozumelae*). *Biological Conservation* 137. 210-222.
- Waples R. S. 1989. A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. *Genetics* 121. 379-391.
- Waples R. S. 2006. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked loci. *Conservation Genetics* 7. 167-184.
- Waye, H., Blaustein, A. R. and R. T. Mason. The brown tree snake (*Boiga irregularis*) and its introduction to the island of Guam. *Conservation Biology*, en prensa
- Weir B. S., C. C. Cockerham. 1984. Estimating f-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38.1358-1370.
- Weir B. S., W. G., Hill. 2002: Estimating F-Statistics. *Annual Reviews of Genetics* 36. 721-750
- Zeiseet I., T. J. C. Beebee. 2003: Populations genetics of a successful invader: the marsh frog *Rana ridibunda* in Britain. *Molecular Ecology* 12 639-646.

ANEXOS

Anexo 1: Individuos utilizados durante este estudio (64 individuos de la Isla Cozumel y 17 individuos continentales de México)

ID individuo	Fecha	Localidad	Sexo
BC02	10/01/2008	Cozumel	Hembra
BC03	08/02/2008		Macho
BC04	08/02/2008		Hembra
BC05	08/02/2008		Hembra
BC06	08/02/2008		Hembra
BC07	24/01/2004		
BC08	24/01/2004		
BC09	24/01/2004		
BC10	24/01/2004		
BC11	24/01/2004		Macho
BC12	24/01/2004		Macho
BC13	25/01/2004		
BC14	25/01/2004		Hembra
BC15	25/01/2004		
BC16	26/01/2004		
BC17	29/01/2004		
BC18	27/01/2004		
BC19	27/01/2004		
BC20	16/07/2001		
BC21	16/07/2001		
BC22	03/08/2001		Macho
BC23	05/08/2001		Hembra
BC24	05/08/2001		Macho
BC26	13/11/2001		Hembra
BC27	16/11/2001		Hembra
BC28	09/12/2001		
BC29	10/12/2001		
BC30	11/12/2001		
BC31	13/12/2001		Macho
BC32	16/12/2001		
BC33	27/01/2002		
BC34	02/04/2002		Hembra
BC35	02/04/2002		Macho
BC36	06/04/2002		Macho
BC37	07/04/2002		Hembra
BC38	07/04/2002		Hembra
BC39	20/07/2002		Hembra
BC40	08/08/2002		
BC41	09/08/2002		
BC42	12/08/2002		Macho
BC43	14/08/2002		Hembra
BC45	11/09/2002		

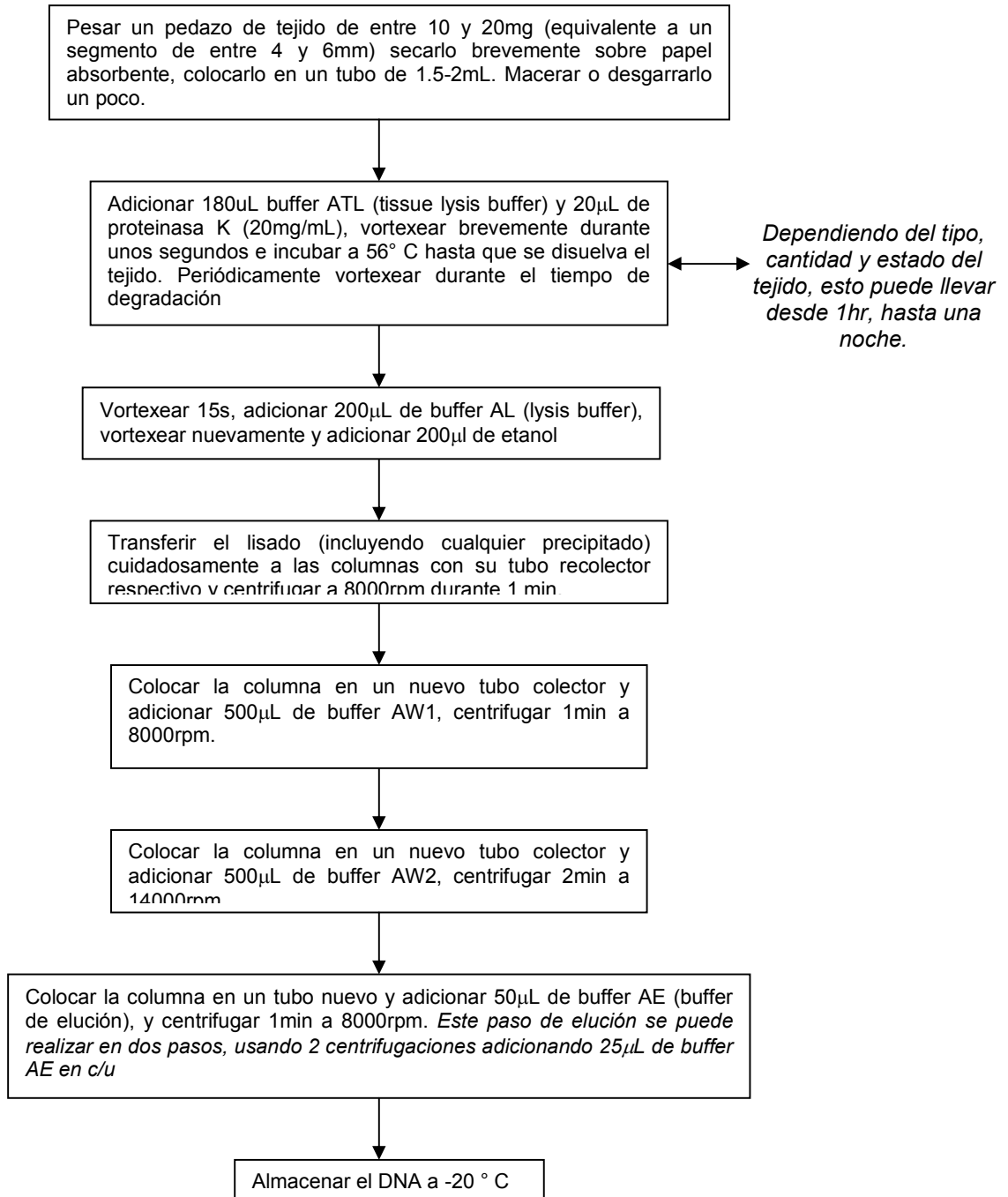
BC46	26/11/2002	
BC47	06/02/2003	Hembra
BC48	06/02/2003	Macho
BC49	21/02/2003	Macho
BC50	21/02/2003	Hembra
BC51	21/02/2003	Hembra
BC52	07/03/2003	Hembra
BC53	08/03/2003	Macho
BC54	08/03/2003	
BC56	10/03/2003	Macho
BC57	01/05/2001	Hembra
BC58	03/05/2001	
BC59	31/07/2001	
BC60	21/12/2001	
BC63	15/08/2002	
BC64	16/08/2002	
BC65	17/08/2002	
BC68	07/10/2002	Hembra
BC69	15/10/2002	
BC74		
BC75		
BC76		
BC77		
BC91	03/09/2008	

Boas del Continente

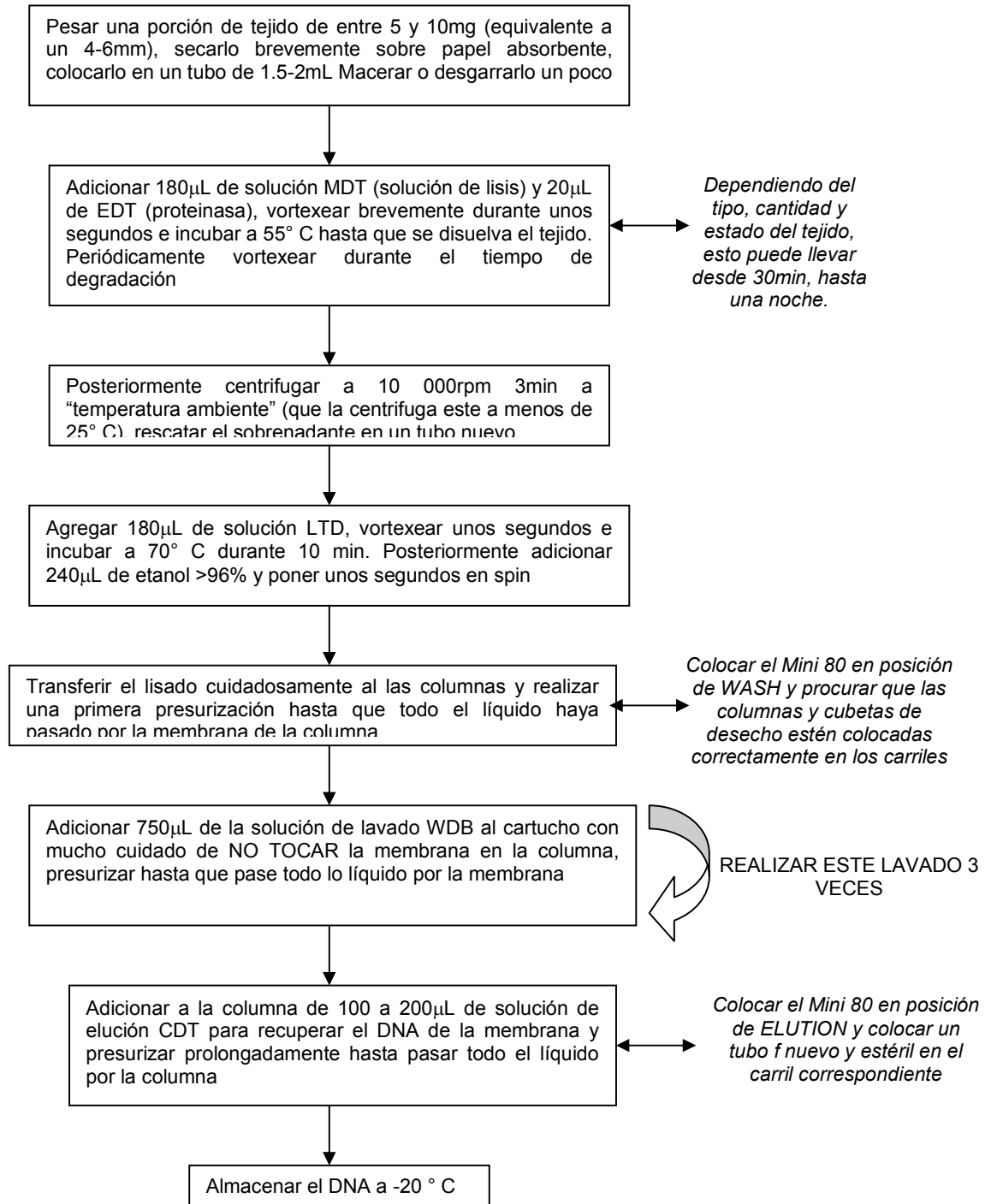
BC78	29/08/2002	Mérida
BC79	29/08/2002	Mérida
BC80	29/08/2002	Mérida
BC81	29/08/2002	Mérida
BC82	29/08/2002	Mérida
BC83	29/08/2002	Mérida
BC84	30/08/2002	Campeche
BC85	30/08/2002	Campeche
BC86	30/08/2002	Campeche
BC87	30/08/2002	Tabasco
BC88	30/08/2002	Tabasco
BC89	30/08/2002	Tabasco
BC90	30/08/2002	Valladolid
BC92		Puerto Vallarta
BC93	11/06/2001	Puerto Vallarta
BC94	15/06/2001	Puerto Vallarta
BC01	27/12/2007	Manzanillo

Anexo 2: Extracción de DNA

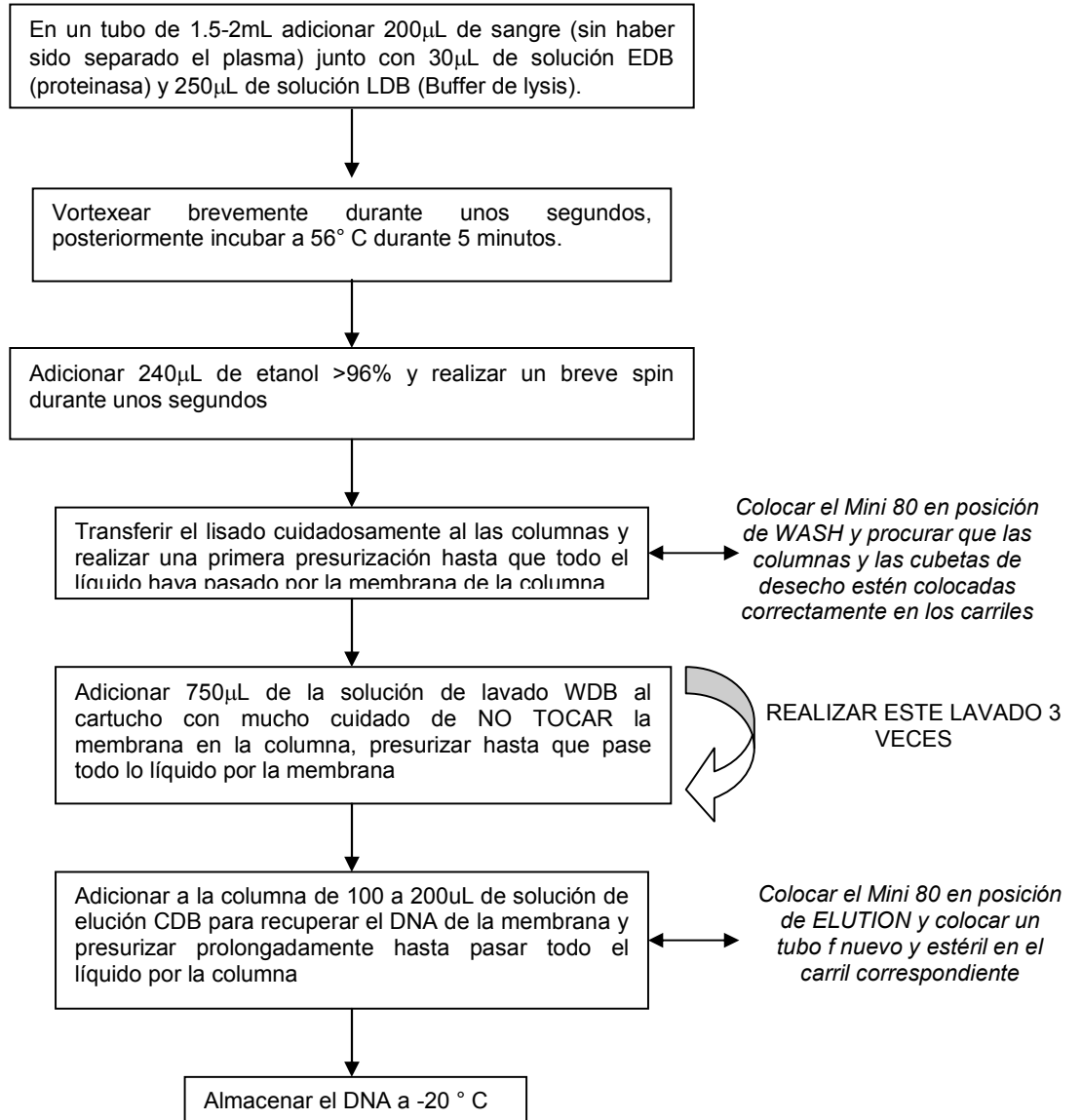
Anexo 2.1: Protocolo de extracción de DNA con el kit comercial DNeasy Blood and Tissue Kit marca Qiagen® a partir de tejido animal.



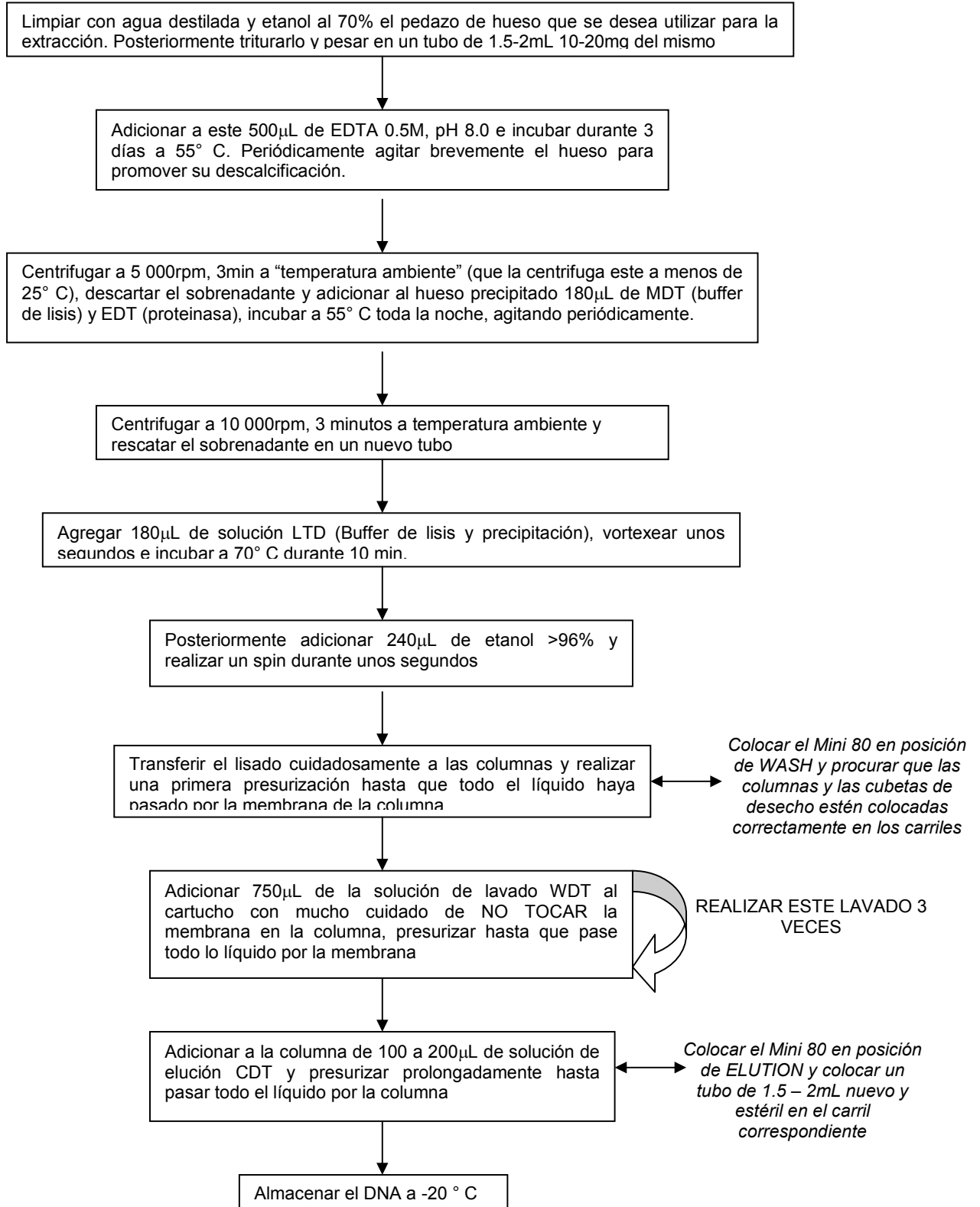
Anexo 2.2: Protocolo de extracción de DNA con el kit comercial Quick Gene DNA Tissue Kit S de la marca Fujifilms Life Sciences® a partir de tejido animal



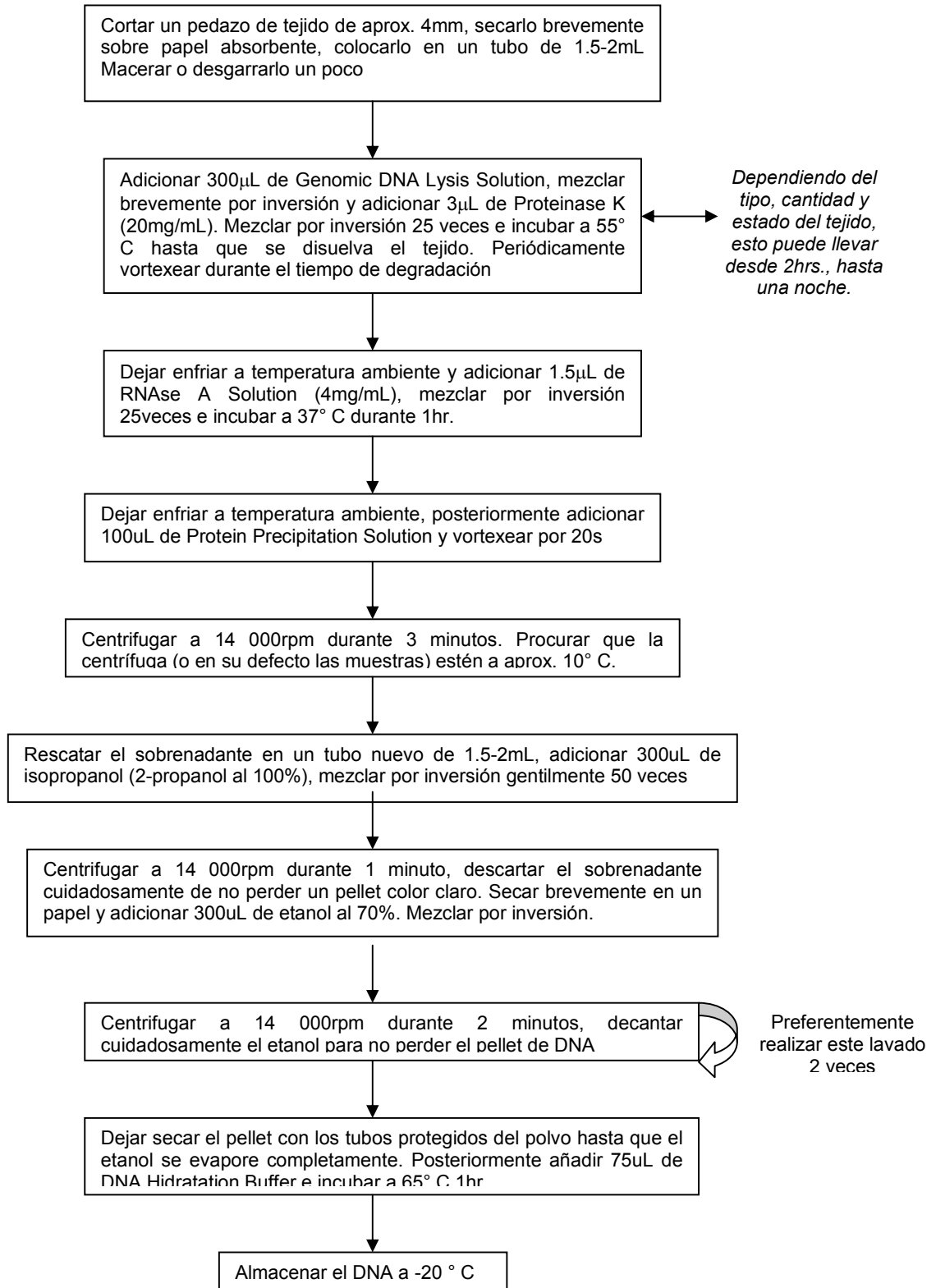
Anexo 2.3: Protocolo de extracción de DNA con el kit comercial Quick Gene DNA Whole Blood Kit S de la marca Fujifilms Life Sciences® a partir de sangre.



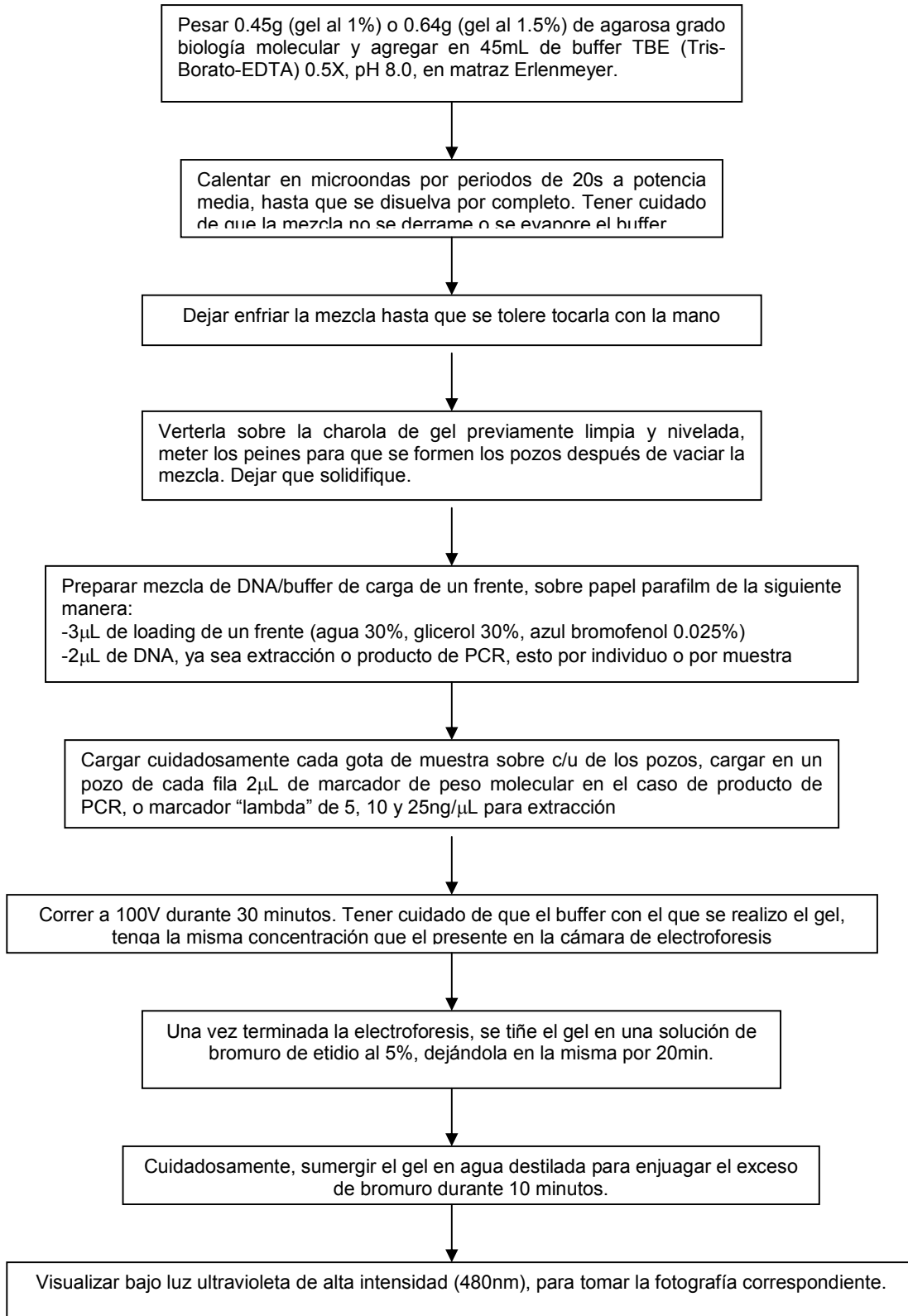
Anexo 2.4: Protocolo de extracción de DNA con el kit comercial Quick Gene DNA Tissue Kit S de la marca Fujifilms Life Sciences® a partir de hueso.



Anexo 2.5: Protocolo de extracción de DNA con el kit comercial Aquapure DNA Isolation Kit de la marca BioRad® a partir de tejido animal.



Anexo 3 Elaboración de geles de agarosa al 1 y 1.5% para visualización de extracción de DNA y producto de PCR



Anexo 4 Elaboración geles nativos de poliacrilamida y tinción con nitrato de plata:

-Gel de poliacrilamida (acrilamida 19:1)

	12%
<i>Acrilamida 40%</i>	8.1mL
<i>Buffer TBE 5X</i>	5.4mL
<i>ddH₂O</i>	14.5mL
<i>APS 25%</i>	140μL
<i>TEMED</i>	14μL

-Solución de tinción Nitrato de plata (AgNO₃) al 0.2%

	800mL	1L
<i>AgNO₃</i>	1.6g	2g
<i>ddH₂O</i>	800mL	1L

-Fijador: etanol 10%, ácido acético 0.5%

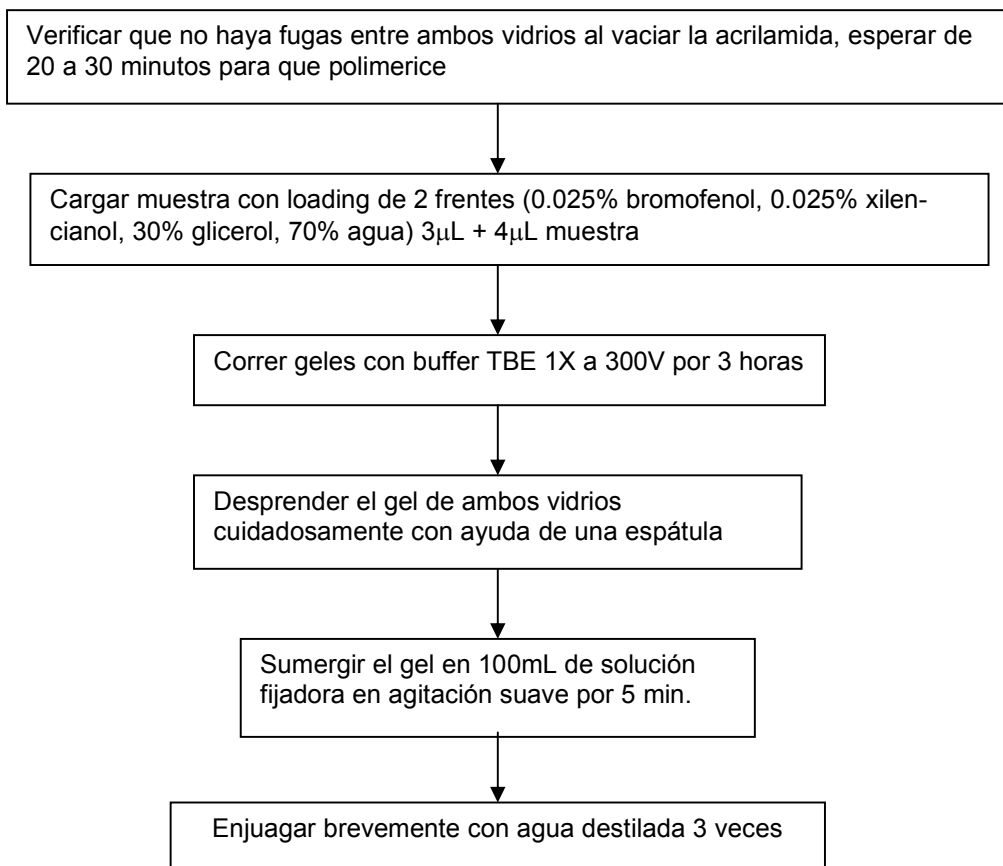
	800mL	2L
<i>Etanol</i>	80mL	200mL
<i>Ácido acético</i>	4mL	10mL
<i>ddH₂O</i>	716mL	1 790mL

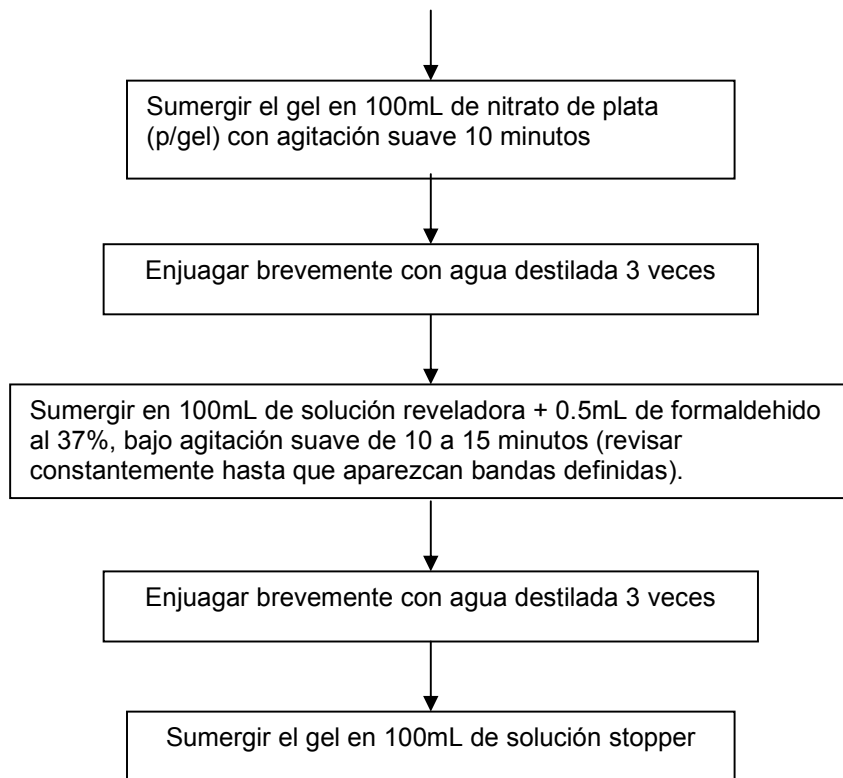
-Revelador: 3%NaOH + Formaldehído

	800mL	2L
<i>NaOH</i>	24g	60g
<i>ddH₂O</i>	800mL	2L
<i>formaldehído</i>	4mL	6mL

-“Stoper” EDTA

	800mL	1L
<i>EDTA Na₂•H₂O</i>	30g	60g
<i>ddH₂O</i>	1L	2L

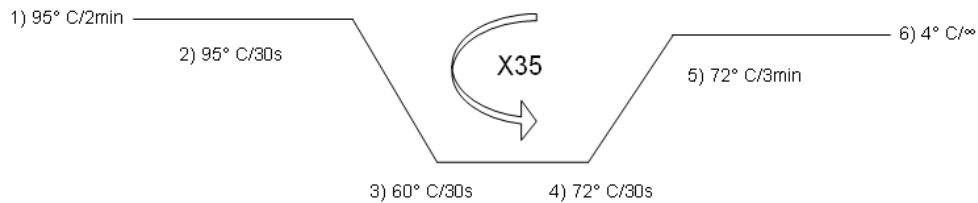




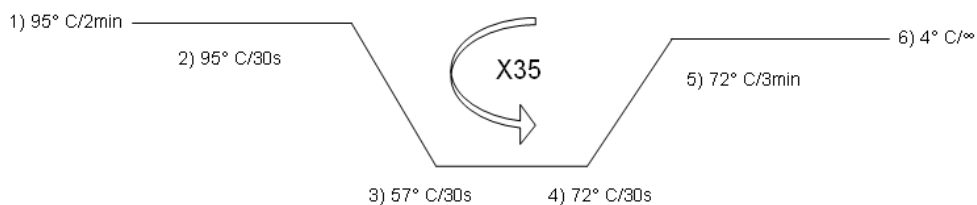
Anexo 5: Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

A continuación se muestran las condiciones de PCR así como las temperaturas y número de ciclos de amplificación, utilizadas para cada par de primers. La reacción de polimerasa para cada individuo se realizó en un volumen final de 7.5µL. Cabe señalar que para el locus BCI-14, se utilizaron dos diferentes condiciones dependiendo del tipo de tejido del cual se extrajo el DNA.

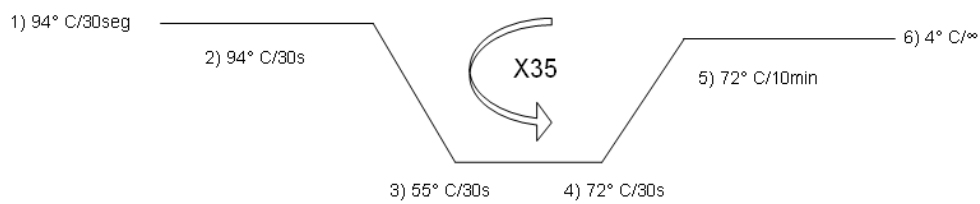
Bci-14	[MgCl ₂]= 1.5mM	Master Mix	[MgCl ₂]= 1.3mM	Master Mix
Volumen final	7.5µL PCR	X70 reacciones	7.5µL PCR	X70 reacciones
H ₂ O	2.45	171.5	2.98	208.6
MgCl ₂ (50mM)	0.225	15.75	0.195	13.65
Buffer 10X	0.75	52.5	0.75	52.5
dNTP's (2mM)	0.98	68.6	0.975	68.25
PR (10µM)	0.45	31.5	0.675	47.25
PF (10µM)	0.45	31.5	0.675	47.25
Taq (5U/µL)	0.2	14	0.25	17.5
ADN	2	2 c/u	1	1 c/u
	*[primer] = 0.6 µM PDC, exhubia		*[primer] = 0.9 µM Hueso y sangre	



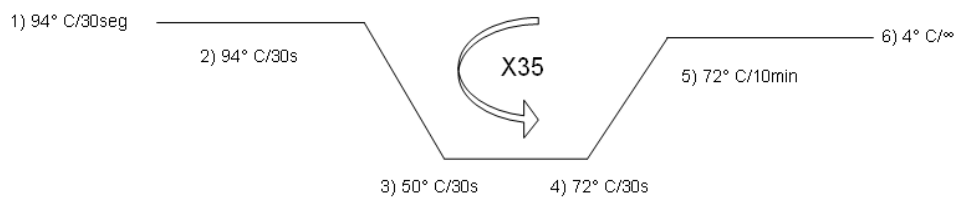
Bci-21	[MgCl ₂]	Master Mix
Volumen final	7.5ul p/PCR	X 70 reacciones
H ₂ O	2.7	189
MgCl ₂ (50mM)	0.3	21
Buffer	0.75	52.5
dNTP's (2mM)	0.975	68.25
PR (10µM)	0.5625	39.375
PF (10µM)	0.5625	39.375
Taq (5U/µL)	0.15	10.5
ADN	1	1 c/u
	*[primer] = 0.75 µM	



μsat1	[MgCl ₂]= 2.0mM	Master Mix
	7.5μl PCR	X70 reacciones
H ₂ O	1.225	85.75
MgCl ₂ (50mM)	0.3	21
Buffer	0.75	52.5
dNTP's (2mM)	0.975	68.25
PR (10μM)	1	70
PF (10μM)	1	70
Taq (5U/μL)	0.25	17.5
ADN	2	2 c/u
	[primer] = 1.0μM	



μsat36	[MgCl ₂]= 2.0mM	Master Mix
	7.5μl PCR	X70 reacciones
H ₂ O	1.725	85.75
MgCl ₂ (50mM)	0.3	21
Buffer	0.75	52.5
dNTP's (2mM)	0.975	68.25
PR (10μM)	0.75	70
PF (10μM)	0.75	70
Taq (5U/μL)	0.25	17.5
ADN	2	2 c/u
	[primer] = 1.0μM	



Anexo 6. Frecuencias alélicas en ambas poblaciones presentes en la Isla Cozumel (CZM1, N=30, CZM2, N=34) y en la Isla como población en conjunto (Cozumel, N=64)

Locus	Alelo	CZM1	CZM2	Cozumel
Bci-14	230	0.050	0.000	0.023
	238	0.183	0.529	0.367
	242	0.050	0.000	0.023
	254	0.017	0.000	0.008
	258	0.183	0.176	0.180
	262	0.017	0.000	0.008
	266	0.067	0.088	0.078
	270	0.133	0.132	0.133
	274	0.083	0.074	0.078
	284	0.067	0.000	0.031
	286	0.150	0.000	0.070
Bci-21	238	0.017	0.000	0.008
	250	0.017	0.015	0.016
	254	0.217	0.309	0.266
	256	0.117	0.000	0.055
	258	0.050	0.000	0.023
	260	0.250	0.279	0.266
	262	0.133	0.162	0.148
	264	0.033	0.000	0.016
	268	0.000	0.029	0.016
	270	0.050	0.029	0.039
	272	0.100	0.176	0.141
274	0.017	0.000	0.008	
μsat1	328	0.000	0.015	0.008
	352	0.050	0.147	0.102
	368	0.683	0.544	0.609
	372	0.033	0.059	0.047
	388	0.033	0.000	0.016
	392	0.200	0.235	0.219
μsat36	274	0.000	0.029	0.016
	278	0.050	0.000	0.023
	282	0.133	0.029	0.078
	286	0.133	0.235	0.188
	290	0.250	0.044	0.141
	294	0.167	0.191	0.180
	302	0.233	0.441	0.344
	306	0.033	0.029	0.031

Anexo 7. Genotipos observados en ambas poblaciones presentes en la Isla Cozumel (CZM1, N=30, CZM2, N=34).

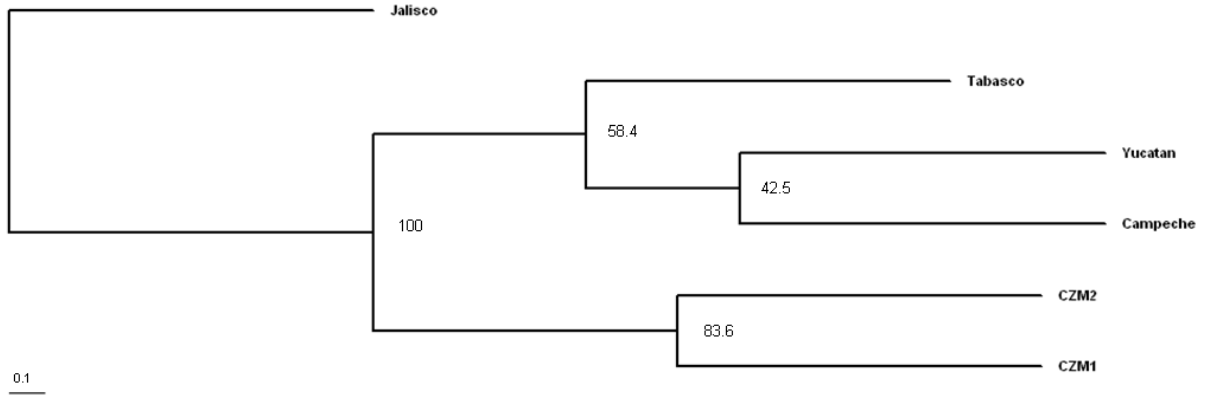
Bci-14			
Genotipo	CZM1	CZM2	Total
230238	1	0	1
238238	1	11	12
230242	2	0	2
238258	1	4	5
258258	1	1	2
238262	1	0	1
238266	4	6	10
238270	1	3	4
242270	1	0	1
254270	1	0	1
258270	2	2	4
270270	0	2	2
238274	0	1	1
258274	1	4	5
258284	2	0	2
270284	2	0	2
238286	1	0	1
258286	3	0	3
270286	1	0	1
274286	4	0	4

μsat 36			
Genotipo	CZM1	CZM2	Total
274274	1	0	1
282286	2	0	2
286286	2	0	2
282290	0	7	7
286290	1	2	3
290290	0	1	1
286294	3	4	7
290294	1	0	1
294294	2	0	2
278290	2	0	2
278302	1	0	1
286302	6	2	8
290302	1	1	2
294302	5	6	11
302302	9	2	11
282306	0	1	1
290306	0	1	1
306306	1	0	1

Bci-21			
Genotipo	CZM1	CZM2	Total
238254	1	0	1
254254	3	1	4
250256	1	0	1
256256	1	0	1
258258	1	0	1
254260	4	7	11
256260	2	0	2
260260	4	4	8
250262	0	1	1
254262	1	5	6
258262	1	0	1
260262	0	2	2
262262	2	1	3
250264	0	1	1
254264	1	1	2
256264	1	0	1
262270	1	0	1
270270	1	1	2
254272	0	6	6
260272	1	1	2
262272	1	1	2
272272	2	2	4
256274	1	0	1

μsat1			
Genotipo	CZM1	CZM2	Total
352352	1	0	1
328368	1	0	1
352368	7	3	10
368368	12	16	28
368372	1	0	1
372372	1	1	2
352392	1	0	1
368392	4	6	10
372392	1	0	1
388388	1	0	1
392392	5	3	8

Anexo 8. Árbol de Neighbour-Joining con seis poblaciones de *B. constrictor*



Árbol de N-J obtenido a partir de seis poblaciones de *B. constrictor*. Se observan los valores de “bootstrap” de cada nodo obtenido con 1,000 réplicas (%). Cabe señalar que la escala de la distancia genética observada en el árbol se encuentra desproporcionada con respecto a la distancia genética de Nei obtenida de los datos, debido al resmuestreo generado a partir de las frecuencias alélicas observadas en cada loci.

	CZM1	CZM2	Yucatán	Campeche	Tabasco	Jalisco
CZM1	-	0.895	0.302	0.358	0.356	0.211
CZM2	0.110	-	0.348	0.275	0.405	0.209
Yucatán	1.198	1.056	-	0.613	0.645	0.226
Campeche	1.027	1.291	0.490	-	0.807	0.157
Tabasco	1.032	0.905	0.438	0.214	-	0.281
Jalisco	1.558	1.567	1.489	1.854	1.269	-

Matriz de distancias genéticas de Nei (D_{NEI} , debajo de la diagonal), así como de identidad genética (I_{NEI} , arriba de la diagonal) de seis poblaciones de *B. constrictor*.

Anexo 9. Frecuencias alélicas corregidas con el programa Micro-Cheker (Brookfield 1) en ambas subpoblaciones presentes en la Isla Cozumel (CZM1, CZM2) y la población de la isla en conjunto para cada locus

Bci-21	CZM1		CZM2		Cozumel total	
Alelo	Freq. Observadas	Brookfield 1	Freq. Observadas	Brookfield 1	Freq. Observadas	Brookfield 1
238	0.0167	0.0139			0.0078	0.0071
250	0.0167	0.0139			0.0156	0.0142
254	0.2167	0.1803			0.2656	0.2406
256	0.1167	0.0971			0.0547	0.0495
258	0.0500	0.0416			0.0234	0.0212
260	0.2500	0.2081			0.2656	0.2406
262	0.1333	0.1110			0.1484	0.1345
264	0.0333	0.0277			0.0156	0.0142
268					0.0156	0.0142
270	0.0500	0.0416			0.0391	0.0354
272	0.1000	0.0832			0.1406	0.1274
274	0.0167	0.0139			0.0078	0.0071
μsat1	CZM1		CZM2		Cozumel total	
Alelo	Freq. Observadas	Brookfield 1	Freq. Observadas	Brookfield 1	Freq. Observadas	Brookfield 1
328	-	-	0.0147	0.0131	0.0078	0.0069
352	0.05	0.0437	0.1471	0.1306	0.1016	0.0897
368	0.6833	0.5969	0.5441	0.4831	0.6016	0.5315
372	0.0333	0.0291	0.0588	0.0522	0.0469	0.0414
388	0.0333	0.0291	-		0.0156	0.0138
392	0.2	0.1747	0.2353	0.2089	0.2266	0.2002
μsat1			CZM2		Cozumel total	
Alelo			Freq. Observadas	Brookfield 1		
274			0.0294	0.0268		
282			0.0294	0.0268		
286			0.2353	0.2146		
290			0.0441	0.0402		
294			0.1912	0.1744		
302			0.4412	0.4024		
306			0.0294	0.0268		