



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

*ESTRUCTURA, DIVERSIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DE POECILIA
ORRI EN SISTEMAS ACUÁTICOS PERMANENTES Y ESTACIONALES EN LA
RESERVA DE LA BIOSFERA DE SIAN KA'AN, QUINTANA ROO*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGÍA AMBIENTAL)

P R E S E N T A

HUGO REYES PÉREZ

TUTORA PRINCIPAL: DRA. ELLA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ

COMITÉ TUTOR: DR: GERARDO PÉREZ PONCE DE LEÓN

DR. LUIS ZAMBRANO GONZÁLEZ

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2012



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.

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de noviembre de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** del alumno **REYES PEREZ HUGO** con número de cuenta **403054437** con la tesis titulada **"ESTRUCTURA, DIVERSIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DE POECILIA ORRI EN SISTEMAS ACUÁTICOS PERMANENTES Y ESTACIONALES EN LA RESERVA DE LA BIÓSFERA DE SIAN KA'AN, QUINTANA ROO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ**:

Presidente: DR. MANUEL URIBE ALCOCER
Vocal: DRA. MARÍA DEL CARMEN MANDUJANO SÁNCHEZ
Secretario: DR. GERARDO PÉREZ PONCE DE LEÓN
Suplente: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU
Suplente: DR. LUIS ZAMBRANO GONZÁLEZ

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de febrero de 2012.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del interesado.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias Biológicas por permitirme realizar este trabajo, ahora parte fundamental de mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo de beca y otorgar recursos para el proyecto CONACYT 89451, los cuales me permitieron desarrollar esta investigación.

A mi Comité Tutorial, Dra. Ella Vázquez Domínguez, Dr. Gerardo Pérez Ponce de León y Dr. Luis Zambrano González por el tiempo, asesoría y conocimientos que aportaron para que este camino fuera más enriquecedor.

Al Dr. Cock van Oosterhout y al Dr. Mark McMullan por el gran aporte de conocimientos que recibí de ellos durante mi estancia en UEA, además de su paciencia, apoyo y amistad.

Agradecimientos personales

A Dios y a la Stma. Virgen por iluminar mi camino.

Les agradezco a mi familia y amigos toda su ayuda y soporte, alegría y compañía, que fueron ese impulso que en ocasiones necesité.

A mis maestros y sinodales, en especial a la Dra. Ella Vázquez por su confianza, apoyo, y comprensión.

Gracias a todas las personas que dieron parte de sus conocimientos para hacer más fácil mi recorrido.

In manus Tuas Domine

أَلْبَر.

Índice

Resumen	i
Abstract	iii
I. Introducción	1
i. Genética de poblaciones	1
ii. Microsatélites como marcadores moleculares	4
iii. Microsatélites y selección	5
iv. Humedales	6
v. Península de Yucatán y estado de Quintana Roo	7
vi. <i>Poecilia orri</i>	8
II. Objetivos	10
III. Hipótesis	11
IV. Métodos	12
i. Área de estudio	12
ii. Muestreo y obtención de datos	13
iii. Análisis de datos	17
V. Resultados	23
VI. Discusión	31
VII. Conclusiones	37
VIII. Bibliografía	38
ANEXO 1	45

Índice de tablas

Tabla 1. Información de los sitios muestreados.	13
Tabla 2. Listado de primers utilizados para la obtención de genotipos.	16
Tabla 3. Valores de diversidad genética promedio por población.	23
Tabla 4. Valores de F_{ST} y distancia genética de Nei entre pares de poblaciones de cenotes y humedales.	25
Tabla 5. Resultados de AMOVA en tres niveles, basado en F_{ST} y R_{ST} .	27
Tabla 6. Tamaño efectivo de población basado en H_E utilizando dos modelos mutacionales.	28
Tabla 7. Valores de Θ estimados en Migrate, cálculo del tamaño efectivo de población y número efectivo de migrantes por generación (N_{em}) para humedales.	28
Tabla 8. Valores del índice de Garza-Williamson (M) y de M_c por población.	29

Índice de figuras

Figura 1. Mapa de sitios de muestreo.	15
Figura 2. Número de alelos efectivos por población por locus.	24
Figura 3. Asignación de genotipos a grupos para cenotes y humedales basados en su similitud genética.	27
Figura 4. Loci candidatos a estar bajo selección (F_{ST} outlier).	30

Resumen

La Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an (RBSK; 528.47 km²) en el estado de Quintana Roo es el área protegida de humedales más grande en México. Esta zona está formada por calizas porosas y se caracteriza por la presencia de numerosas cuevas y cenotes, que son cuerpos de agua permanentes y relativamente estables. Contrario a lo anterior, los humedales de la región son muy dinámicos debido a que son estacionales pues, durante la temporada de secas, se observa una disminución considerable en el nivel de agua, formando pequeños refugios aislados y dispersos para la fauna acuática, mientras que en la temporada de lluvias dichos refugios se conectan debido a inundaciones y permiten a los sobrevivientes dispersarse, explotar recursos y reproducirse. Entre las especies de peces que pueden encontrarse en la RBSK, *Poecilia orri* es de particular interés pues está presente en la mayoría de los sistemas acuáticos debido a su amplia tolerancia a condiciones ambientales extremas y a que es una especie vivípara que puede tener eventos reproductivos en todo el año.

En este trabajo se analizó la diversidad, diferenciación y estructura genética de *P. orri* utilizando ocho loci microsátélites para nueve poblaciones (cinco de cenotes y cuatro en humedales). Los resultados indicaron que la variación genética es considerablemente menor en cenotes (H_o : 0.047-0.082; n_a : 1-1.75) que en los humedales (H_o : 0.263-0.238; n_a : 2.5-6.87), encontrando por lo menos seis loci monomórficos por población de los primeros. En cuanto a la diferenciación genética entre poblaciones se observó que las poblaciones estudiadas son muy distintas entre sí ya que entre cenotes se encontraron valores elevados de diferenciación (F_{ST} : 0.45-1) en contraste con los humedales (F_{ST} : 0.005-0.51), donde se obtuvo el valor más bajo de estructuración para dos poblaciones que pueden permanecer conectadas durante parte del año. Los resultados del AMOVA indicaron que la mayor variación se encuentra a nivel de poblaciones (64.12%) y las pruebas de Mantel, para determinar si la distancia geográfica podía explicar la diferenciación genética, sólo fueron positivas y significativas al analizar a las poblaciones de cenotes por separado ($r=0.801$; $p=0.021$). Se detectaron cuellos de botella históricos en todas las poblaciones estudiadas, aunque sólo se encontraron reducciones recientes en los humedales. Por último, las pruebas de F_{ST} outlier y de Schlötterer para determinar si algunos loci en las poblaciones de humedales pudieran estar bajo algún tipo de selección encontraron a tres loci candidatos, aunque esta hipótesis se descartó debido a que las poblaciones contrastadas no eran comparables pues la divergencia genética entre ellas, inferida con DNA mitocondrial (D-Loop), fue de 5.4%, que es mayor a lo reportado para comparaciones entre *P. orri* y otras especies como *P. gilli*, *P. sulphuraria* o *P. mexicana*.

Los resultados de este trabajo evidenciaron las diferencias en los patrones genéticos entre poblaciones de *P. orri* que habitan en sistemas acuáticos permanentes y temporales. La estacionalidad, el tamaño poblacional y la presencia, o ausencia, de flujo génico han moldeado la diversidad y diferenciación genética entre estas poblaciones a través del tiempo. Por último, la gran divergencia genética encontrada entre los humedales analizados señala que es necesario realizar estudios que permitan establecer las relaciones filogenéticas entre las distintas especies de poecílicos de la península y definir hasta qué grado el aislamiento entre poblaciones ha sido promotor de la especiación.

Palabras clave: humedales, cenotes, genética de poblaciones, *Poecilia orri*, Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an

Abstract

The Sian Ka'an Biosphere Reserve (Quintana Roo) is the Mexico's greatest wetland protected area. This zone is over a porous limestone platform where numerous caves and sinkholes are present. These systems are permanent and relatively stable water bodies in contrast to wetlands that are quite dynamic due to seasonality. During dry season water level diminishes considerably forming little isolated and scattered refuges for aquatic fauna but in rainy season those refuges interconnect allowing survivors to disperse, exploit resources and reproduce. Within the fish species that can be found in the SKBR, *Poecilia orri* is of particular interest since it is present in most of the aquatic systems due to its wide tolerance to extreme environmental conditions and because it is a viviparous species with many reproductive events along the year.

The genetic diversity, differentiation and structure of *P. orri* were analyzed in this study by using eight microsatellite loci for nine sinkhole and wetland populations. Results showed that genetic variation is considerably lower for sinkholes (H_o : 0.047-0.082; n_a : 1-1.75) than that for wetlands (H_o : 0.263-0.238; n_a : 2.5-6.87), finding at least six monomorphic loci in each sinkhole population. The genetic differentiation between populations was high for sinkholes (F_{ST} : 0.45-1) in contrast to wetlands (F_{ST} : 0.005-0.51) where the lowest value was observed for two populations that remain communicated for some part of the year. AMOVA results indicated that most of the variation is found at the population level (64.12%) and Mantel tests to define if genetic distance is related to geographic distance, were only positive and significant when analyzing sinkholes alone. ($r=0.801$; $p=0.021$). Historic bottlenecks were detected for all the studied populations but signals of recent reductions were observed in wetland populations. Finally, the FST outlier and Schlötterer tests indicated that three loci could be candidates to be under positive selection although this hypothesis was discarded because the genetic divergence value (inferred with mtDNA) for the compared wetland populations was 5.4% and is higher than those reported for comparisons between *P. orri* and other poeciliid species.

The outcome of this work represents an evidence of the difference in the genetic patterns between *P. orri* populations that inhabit permanent and temporal aquatic systems. Seasonality, population size and gene flow have molded the genetic diversity and differentiation between populations through time. Lastly, the calculated genetic divergence for the studied wetland populations points towards the necessity of realizing studies in this region so phylogenetic relationships for poeciliid species in the Yucatan peninsula as well as the role of isolation in promoting speciation could be defined.

Keywords: wetlands, sinkholes, population genetics, *Poecilia orri*, Sian Ka'an Biosphere Reserve

Introducción

i. Genética de poblaciones

La Genética, como ciencia, se refiere en general a la información contenida en el genoma de los organismos, así como a las leyes que gobiernan la herencia de la información genética de una generación a otra. La genética de poblaciones es la rama de la genética que se relaciona con el origen, niveles y distribución de la variación genética presente en las poblaciones, así como de su distribución y cambios en el espacio y tiempo, es decir, estudia la constitución genética de las poblaciones y cómo es que ésta cambia de generación en generación (Ayala 1982; Templeton 2006).

Dichos cambios entre generaciones pueden ser resultado de diferentes procesos como son la mutación, el sistema de apareamiento, la selección natural, el flujo génico o migración y la deriva génica. El principio de Hardy-Weinberg (H-W) considera que en ausencia de cuatro de los procesos mencionados, y después de una generación de apareamiento aleatorio, las frecuencias genotípicas de un locus determinado pueden ser representadas como una función binomial (dos alelos) o multinomial (múltiples alelos) de las frecuencias alélicas, lo que también significa que las frecuencias genotípicas permanecen constantes de una generación a otra. Por lo anterior, el equilibrio de las frecuencias genotípicas está dado por el cuadrado de las frecuencias alélicas que, en el caso de sólo dos alelos, corresponde a (Hedrick 2005; Allendorf 2007):

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

La variación genética es la materia prima de la evolución, del mismo modo que los cambios en la composición genética de las poblaciones y de las especies es el mecanismo principal para el cambio evolutivo dentro de las mismas. Los niveles de variación genética dentro de una población están directamente relacionados con su estructura demográfica y su historia evolutiva; por ejemplo, la divergencia genética entre poblaciones es un indicativo de los niveles de intercambio genético que ha ocurrido entre éstas (Allendorf 2007). Para poder estimar los niveles de variación genética se necesitan medidas estandarizadas que permitan cuantificarla; la heterocigosidad es una medida de variación, y es la más utilizada (Hedrick 2005).

La heterocigosidad esperada de una población para un locus determinado se puede calcular como:

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

que es la resta de la unidad menos la homocigosidad de las proporciones de H-W, y donde p corresponde a la frecuencia del alelo dominante.

En la mayoría de las poblaciones con cruza aleatorias, la heterocigosidad observada es muy parecida a la heterocigosidad teórica. Sin embargo, para poblaciones en las que las frecuencias no son cercanas a las proporciones de H-W, la heterocigosidad observada se puede calcular como:

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

Los cambios genéticos que surgen entre generaciones pueden ir diferenciando a las poblaciones que permanecen separadas en el espacio y tiempo, lo que se conoce como estructuración genética o, en otras palabras, el nivel y distribución de la variación genética dentro y entre las poblaciones de una especie. Dicha diferenciación puede ser afectada por la subdivisión de la población o el flujo génico entre poblaciones y subpoblaciones (Gillespie 2004).

Aunque se han usado distintas formas para estimar los niveles de diferenciación entre las poblaciones, las más utilizadas son las desarrolladas por Wright (1969), quien propuso un marco conceptual y matemático para describir la distribución de la variación genética dentro de una especie; éste consiste en tres coeficientes de endogamia F , que son utilizados para ubicar la variabilidad genética a nivel de la población total (T), de subpoblaciones (S) y de individuos (I); estos coeficientes (F_{ST} , F_{IT} y F_{IS}) están relacionados de tal forma que:

$$1 - F_{IT} = (1 - F_{ST})(1 - F_{IS}) \quad F_{ST} = (F_{IT} - F_{IS}) / (1 - F_{IS})$$

F_{ST} es una medida de la divergencia en las frecuencias alélicas o diferenciación genética entre poblaciones y siempre es positiva; F_{IT} es una medida de la desviación de las proporciones de H-W en la población total (o especies) debido a apareamientos no aleatorios dentro de las subpoblaciones (F_{IS}) y divergencia en las frecuencias alélicas entre subpoblaciones (F_{ST}). Los valores positivos de F_{IS} y F_{IT} indican una deficiencia de heterocigotos y los negativos exceso de los mismos (Hedrick 2005; Allendorf 2007).

Cuando se estudian diversas poblaciones es útil saber qué tanto se parecen o no entre ellas, de manera que se puedan definir grupos basados, por ejemplo, en similitudes, y que sea factible hacer inferencias acerca del tiempo y forma en la que se originaron. Una forma de estimar la diferenciación es a partir de la distancia genética entre poblaciones o subpoblaciones; se han propuesto diversas medidas de distancia genética y en general son análogas a la distancia geométrica, es decir, valores cercanos a cero indican que no hay diferencias entre los grupos. Las similitudes o diferencias en el nivel, tipo o patrones de variación genética entre las poblaciones

pueden ser resultado de diversos factores. Por ejemplo, si dos poblaciones son genéticamente similares puede deberse a que:

- se separaron recientemente en dos poblaciones
- existe flujo génico entre ellas
- eran poblaciones grandes con poca deriva génica
- presiones de selección similares afectaron a ciertos loci del mismo modo en ambas poblaciones

Del mismo modo, si dos poblaciones son distintas, puede ser debido a que:

- han estado aisladas por un tiempo largo y no ha habido flujo génico entre ellas
- la deriva génica ha generado diferencias cuantificables
- existen distintas presiones de selección entre las dos poblaciones

La forma más común para medir la distancia genética es la propuesta por Nei (1972), que se obtiene, para un locus sencillo con n alelos, a partir de la identidad genética definida como:

$$I = J_{xy} / (J_x J_y)^{1/2}$$

donde

$$J_{xy} = \sum_{i=1}^n p_{i,x} p_{i,y}, \quad J_x = \sum_{i=1}^n p_{i,x}^2, \quad J_y = \sum_{i=1}^n p_{i,y}^2$$

siendo $p_{i,x}$ y $p_{i,y}$ las frecuencias del n alelo en las poblaciones x y y . Los valores que se obtienen van desde cero (ningún alelo compartido entre las poblaciones) hasta 1 (las dos poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas).

Después de obtener esta identidad (I), se puede calcular la distancia genética estándar a partir de:

$$D = -\ln(I),$$

con un rango que va desde cero, para poblaciones con frecuencias alélicas idénticas, hasta infinito, en caso de que las poblaciones no compartan ningún alelo. Esta medida de distancia genética es interesante pues, si no hay flujo génico entre las poblaciones, irá aumentando linealmente en el tiempo t como una función de la tasa de mutación μ , siendo: $D = 2\mu t$ (Ayala 1982; Hedrick 2005; Allendorf 2007).

Finalmente, un parámetro que aporta información sobre la estructura poblacional es el flujo génico o migración, el cual permite determinar el grado de aislamiento entre poblaciones e inclusive definir si cada población de una especie se puede considerar como una unidad evolutiva

independiente (Slatkin 1994). El flujo génico se refiere a los mecanismos mediante los cuales puede haber intercambio de genes entre poblaciones. Uno de los métodos más utilizados para medir el flujo génico entre poblaciones es Nm , que se puede estimar a partir de la multiplicación del tamaño efectivo (N_e) por la tasa de migración (m), por lo que el valor obtenido es el número de migrantes efectivos (Piñero et al. 2008). El modelo más utilizado para estimar el flujo génico es el de islas infinitas de Wright (1951), a través de la fórmula:

$$F_{ST} \approx 1 / (4Nm + 1)$$

de donde se obtiene: $Nm \approx (1 - F_{ST}) / 4$

Este método es sencillo pero se debe tener en cuenta que depende de la estimación de parámetros previos, por lo que la estimación de Nm reflejará el error en la estimación de F_{ST} (Piñero et al. 2008). La estimación de la variación, estructura, flujo génico y distancia genética se han visto favorecidos por la aparición y uso de técnicas moleculares modernas que permiten el estudio de parámetros diversos en tiempos relativamente cortos. Este es el caso de los marcadores moleculares como las isoenzimas, RFLP's y microsatélites.

ii. Microsatélites como marcadores moleculares

Se define como marcador molecular a aquellas moléculas, como DNA o proteínas, que pueden funcionar como caracteres cualitativos o cuantitativos y que permiten establecer diferencias o similitudes (basadas en polimorfismos) entre distintos individuos de una especie. Los marcadores moleculares genéticos reflejan directamente la variación a nivel del DNA (Awise 2004; Chenuil 2006). Aunque existen diferentes tipos de marcadores, los microsatélites son en la actualidad el método más usado en estudios de genética de poblaciones dada su característica de marcadores altamente polimórficos (Awise 2004).

Los microsatélites, también conocidos como repeticiones cortas en tándem (*Short Tandem Repeats*) son secuencias repetitivas en tándem no codificantes compuestas de pequeños motivos de uno a seis nucleótidos, usualmente di, tri o tetranucleótidos, y que se encuentran dispersos en el genoma de eucariontes y procariontes (Hamada et al. 1984; Oliveira et al. 2006). Debido a que tienen una alta tasa de mutación, son muy polimórficos, es decir, que tienen un número variable de repeticiones, se pueden generar múltiples alelos distinguibles para un mismo locus dentro de una población. Muchas de las mutaciones que surgen en los microsatélites, aunque no todas, derivan en la aparición de nuevos alelos (Templeton 2006; Griffiths 2008).

Estos marcadores pueden ser detectados (i.e. amplificados) de manera relativamente fácil, con lo que es posible identificar distintos alelos individuales para un mismo locus. Junto con esto, las regiones que flanquean a los loci microsatélites están conservadas en individuos de la misma

especie, dado que no ocurren mutaciones frecuentes, lo que permite analizar estos marcadores mediante el uso de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), a partir del diseño de oligonucleótidos específicos para dichas regiones (Templeton 2006). Por otra parte, la desventaja en el uso de este tipo de marcadores se relaciona con su rápida tasa de sustitución y con la naturaleza de sus procesos mutacionales, para los cuales se han planteado distintos modelos. Los modelos más empleados son el de Alelos infinitos y el de Mutación paso a paso. En el primer modelo, cada mutación crea aleatoriamente un nuevo alelo, es decir, considerando loci microsatélites, las mutaciones modifican el número de repeticiones presentes en un locus. Este es el modelo clásico de Wright (1969) donde se utilizan estadísticos F .

El modelo de mutación paso a paso, propuesto por Slatkin (1995) es el más utilizado para microsatélites. Éste considera que cuando un locus microsatélite muta, se gana o pierde solo una repetición. Este modelo se basa en características con distribución continua, números de pares de bases o de repeticiones y en donde la agrupación de individuos es acorde al número de repeticiones (Estoup et al. 2002; Balloux y Lugon-Moulin 2002; Avise 2004; Oliveira 2006). La medida de diferenciación genética propuesta (R_{ST}) es similar a la F_{ST} de Wright (1969) y la G_{ST} de Nei (1972). Una de las limitantes de este modelo es que puede ser problemático al momento de interpretar resultados, ya que los alelos que son idénticos por estado no son necesariamente idénticos por descendencia (homoplasia), es decir, un mismo tamaño de microsatélite puede ser originado a partir de distintas mutaciones independientes (Oliveira et al. 2006). Otro problema surge con las estimaciones de R_{ST} , pues éstas sólo son válidas cuando las mutaciones en los microsatélites siguen únicamente el modelo paso a paso, situación que en la práctica es muy poco probable y que sugiere el desuso de este estimador (Balloux et al., 2000; Excoffier y Hamilton 2003). Finalmente, gracias a que los microsatélites tienen una alta tasa de mutación (entrea 10^{-2} y 10^{-6} nucleótidos por locus por generación), su uso es de gran utilidad para estudios intra e interpoblacionales sobre historia demográfica, estructura poblacional o filogeografía (Chenuil 2006; Oliveira et al. 2006; Templeton 2006).

iii. Microsatélites y selección

Los microsatélites son comúnmente considerados como marcadores neutrales que no están bajo presiones de selección, por lo que son útiles para evaluar parámetros poblacionales como F_{ST} , Nm o N_e , que requieren de este tipo de datos genéticos. Hasta hace poco se seguía pensando en los microsatélites como marcadores neutrales, sin embargo, se ha encontrado evidencia que indica que la expansión en el número de repeticiones puede causar ciertos padecimientos en humanos, como la enfermedad de Huntington, la cual es causada por un incremento en la longitud del motivo repetido CAG presente en el gen de la proteína huntingtina en el cromosoma cuatro (Moxon y

Wills, 1999), así como en diversas enfermedades neurodegenerativas que se han relacionado a repeticiones microsatélites expandidas, principalmente trinucleótidas (Goldsten y Schlötterer, 1999)

Debido a la neutralidad de los marcadores microsatélites, sólo se esperaría encontrar efectos evidentes de selección natural sobre la estructura genética dentro y entre poblaciones si dichos marcadores estuvieran ligados en algún grado a loci que estén bajo selección. Un fenómeno que puede explicar la reducción en la variación genética en loci neutrales es el barrido genético o selective sweep, derivado de eventos de secuestro genético (genetic hitchhiking), que consiste en que un alelo que presenta una ventaja selectiva, al incrementar su frecuencia, puede modificar — comúnmente disminuir— la variación genética de otras variantes que se encuentren ligadas a ese alelo por desequilibrio de ligamiento (Hedrick 2005, Allendorf, 2007).

iv. Humedales

Los ecosistemas acuáticos pueden ser muy diversos y en general se definen a partir de las características físicas y biológicas que presentan, como el tamaño, profundidad o factores fisicoquímicos del agua. Los humedales se definen como extensiones de marismas, pantanos y turberas o superficies cubiertas de agua, ya sea de régimen natural o artificial, permanente o temporal, estancado o corriente, dulce, salobre o salado, cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros. Las características más importantes que determinan a un humedal son la presencia de agua aunque sea periódica, de un tipo de suelo distintivo y de vegetación adaptada o tolerante de suelos saturados. Dentro de esta definición se considera en general a las zonas donde el agua es el principal factor controlador del medio y la vida asociada, tanto vegetal como animal (RAMSAR 2006; Nestlerode et al. 2008).

Las interacciones de los componentes bióticos y abióticos dentro de los humedales permiten que dichos ecosistemas desempeñen funciones importantes como: almacenamiento de agua, control de la erosión, recarga y descarga de acuíferos, depuración de agua, retención de nutrientes, sedimentos y contaminantes, estabilización de las condiciones climáticas locales (e.g. lluvia y temperatura), entre otros. Los humedales tienen además una elevada productividad primaria, son centros de alta biodiversidad y dan sustento y protección a diversas especies de aves, mamíferos, reptiles, anfibios, peces e invertebrados (RAMSAR 2006; Nestlerode et al. 2008)

Ciertos hábitats dinámicos se caracterizan por una gran variación en el régimen hidrológico. Los humedales costeros son un ejemplo, dado que presentan regímenes altamente variables e impredecibles, asociados fuertemente a la temporada de lluvias. Así, la época de lluvias es un factor clave en la hidrología, ya que modifica el nivel de agua y extensión de inundación en ecosistemas costeros tropicales y subtropicales dulceacuícolas como los humedales (Trexler et al. 2005; Rodríguez y Pizarro 2007). Durante la temporada de secas el nivel del agua baja

considerablemente, lo que se traduce en una disminución de la extensión del hábitat. Ello tiene afectaciones a su vez sobre la biota, por ejemplo las comunidades de peces presentan alta mortalidad, ya que al secarse su hábitat no todos los individuos logran migrar y encontrar refugio. En la temporada de lluvias, estos hábitats aumentan de tamaño, muchas veces interconectándose con otros cuerpos de agua, y los peces que sobrevivieron el periodo de secas se dispersan. Estos cambios drásticos en el nivel del agua promueven cambios en los factores bióticos y abióticos del hábitat, lo que afecta directamente la abundancia y riqueza de especies que habitan esos sitios (Zambrano et al. 2006; Escalera-Vázquez y Zambrano 2010). Por lo anterior, estos ecosistemas son sistemas ideales para evaluar qué organismos pueden tolerar dicha dinámica estacional, lo que resulta particularmente interesante al considerar a residentes permanentes como los peces.

v. Península de Yucatán y estado de Quintana Roo

La península de Yucatán es una llanura formada por sedimentos marinos del terciario, constituida por calizas, dolomitas y otros materiales calcáreo-arcillosos. La formación de la península es relativamente reciente pues se considera que su historia biológica comenzó hace 65 millones de años (CIQRO 1983; Vázquez-Domínguez y Arita 2010). El estado de Quintana Roo se encuentra en la porción oriental de la península de Yucatán, con una superficie de 50,840 km², planicie de origen marino formada en su totalidad por rocas sedimentarias del Cenozoico. Las rocas calizas son predominantes, por lo que es característico el relieve kárstico (cenotes; del maya *d'zonot*, «averna con depósito de agua»). El terreno es casi plano en toda su extensión, con una altitud media no mayor a 10 msnm, con excepción de la porción occidental donde se forma la meseta tectónica baja de Zohlaguna, a poco más de 300 m de altitud.

En Quintana Roo no hay corrientes superficiales, con excepción del Río Hondo en la frontera con Belice. El agua de lluvia se filtra a través del sustrato poroso y corre lentamente bajo la superficie en dirección SW-NE, dando origen a corrientes subterráneas. El clima en general es cálido subhúmedo, con una precipitación media anual de 1300 mm, presentándose el 90% de ésta entre los meses de mayo y octubre y con una marcada sequía durante los meses de diciembre a abril (UNAM-CIQRO 1982). Los meses más calientes son julio y agosto mientras que diciembre y enero los más fríos. La combinación de la elevada temperatura junto con la abundante vegetación da como resultado una evapotranspiración del orden del 85 % de la precipitación. El 15 % restante de la precipitación se infiltra y pasa a formar parte de las aguas subterráneas (Villasuso y Méndez-Ramos, 2000). El nivel freático es muy cercano a la superficie, a 8 m máximo, y en las partes más bajas puede aflorar formando lagunas someras, humedales o bien zonas inundables durante las lluvias (UNAM 1980; SEMARNAP 1996).

En Yucatán se ubica la superficie protegida de humedales más grande de México, en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an, la cual representa el 10% de la superficie del estado. En esta reserva la estacionalidad impone marcadas diferencias en los sistemas acuáticos, ya que los hábitats temporales poco profundos, como los humedales, permanecen secos la mayor parte del año y sólo durante las lluvias se inundan. Los sistemas con mayor profundidad son relativamente estables, donde el nivel del agua no cambia significativamente. Asimismo, durante la temporada seca algunos sistemas aislados pueden mantener cierto nivel de agua y sirven como refugio para diferentes especies de peces, mientras que durante la temporada lluviosa, las inundaciones pueden unirlos en un solo sistema acuático. Por este motivo la fauna ictiológica experimenta cada año extinciones locales y procesos de colonización, contracciones y expansiones que estructuran a las poblaciones a diferentes escalas de tiempo y espacio (Zambrano et al. 2006; Escalera-Vázquez y Zambrano 2010).

Es interesante mencionar que los cambios en los factores abióticos, como la salinidad y la concentración de oxígeno disuelto, pueden ser más importantes que los factores bióticos en el control del tamaño de las poblaciones de peces. Del mismo modo, los patrones de estacionalidad del hábitat y la complejidad de las comunidades de peces son factores clave que afectan las interacciones de las distintas poblaciones presentes en un mismo cuerpo de agua (Torres-Castro et al. 2009; Escalera-Vázquez y Zambrano 2010).

vi. *Poecilia orri*

Poecilia orri (Fowler, 1943), pez de la familia Poeciliidae y conocido comúnmente como molly o topote, se distribuye desde Yucatán hasta Honduras y es muy abundante en lagunas y cenotes costeros. La familia es de las más abundantes en la Reserva Sian Ka'an y está presente en la mayoría de los sistemas acuáticos de ésta (Schmitter-Soto y Gamboa Pérez 1996; Zambrano et al. 2006). Se caracteriza por tener 16 escamas alrededor del pedúnculo caudal y carecer de poros supraorbitales sobre el hocico, además de no poseer gancho en el tercer radio gonopodial. Los dientes de las series internas son unicúspides y tiene el centro de las escamas laterales manchado de naranja o con algunas barras verticales en los costados. En la temporada reproductiva, el macho exhibe una mancha sobre las aletas pectorales y los bordes de las aletas dorsal y caudal se tornan amarillos. El crecimiento de *P. orri* es isométrico y alcanzan unos nueve centímetros de longitud patrón (LP), es decir, del hocico hasta la primera vértebra caudal. Del mismo modo que otras especies del género *Poecilia*, las aletas pélvicas son mayores en los machos que en las hembras, modificándose en los primeros para formar una estructura denominada gonopodio, que es relativamente corto y presenta un capuchón a manera de prepucio. Es vivíparo y se reproduce todo el año (Schmitter-Soto 1999). Puede alimentarse de microalgas, crustáceos zooplácticos e

insectos. Se reproduce cuando alcanza alrededor de los 5 cm de LP y se le ha encontrado en proporción de 1.5 hembras por cada macho. Otra característica interesante de esta especie es su tolerancia a la salinidad; se le puede encontrar en concentraciones hasta de 21% e incluso en agua marina, asociado con manglares y arrecifes.

Cabe mencionar que los poecílicos se han convertido en modelos clásicos para estudios de ecología y evolución debido a su marcada heterogeneidad genética y fenotípica, que es más evidente en áreas geográficas confinadas (Magurran 2005). Muchas de sus poblaciones presentan aislamiento geográfico y tamaños poblacionales pequeños, debido a que pueden habitar desde cuerpos de agua reducidos por fragmentación hasta cuerpos profundos en tierras bajas, es decir, tienen una amplia tolerancia a condiciones ambientales extremas. Por ello, son organismos ideales para estudiar los efectos de dichas características sobre la genética y estructura poblacional (van Oosterhout 2006; Barson et al. 2009; Suk y Neff 2009; Willing et al. 2010).

En cuanto a la información genética que se conoce de las poblaciones y comunidades de poecílicos en México, Vázquez-Domínguez et al. (2009) reportaron que al analizar la diversidad, la estructura genética y el grado de aislamiento de poblaciones de *P. orri* y *Gambusia yucatanana* (otra especie de la familia Poeciliidae) con tres microsatélites, se encontró que las dos especies tuvieron baja diversidad genética, siendo *P. orri* la menos diversa y la única con poblaciones estructuradas. Asimismo, reportan que los distintos cuerpos de agua muestreados tuvieron una composición genética distintiva. La información sobre humedales al sur de México es limitada (Schmitter-Soto 1999; Schmitter-Soto y Gamboa-Pérez 1996), y son todavía más escasos los estudios sobre genética de especies de peces de esta región.

Tomando en cuenta las características particulares mencionadas de los poecílicos y el sistema tan dinámico presente en la Reserva de Sian Ka'an, donde los cambios estacionales en los sistemas acuáticos afectan directamente a las poblaciones de peces, este estudio se enfoca en conocer la diversidad y estructura genética, así como el grado de aislamiento, de las poblaciones de *P. orri* dentro y entre sistemas acuáticos temporales (humedales) y permanentes (cenotes).

II. Objetivos

Objetivo general

Evaluar patrones genéticos de *Poecilia orri* en sistemas acuáticos permanentes (cenotes) y temporales (humedales) de la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an, Quintana Roo.

Objetivos particulares

Estimar la diversidad genética de *Poecilia orri* en poblaciones de cenotes y humedales, con base en microsatélites.

Estimar la estructuración genética en poblaciones de *Poecilia orri* dentro y entre cenotes y humedales, a partir del análisis de flujo y aislamiento genético.

Determinar si existe evidencia de reducción poblacional (cuellos de botella) en las poblaciones de *Poecilia orri* de cenotes y humedales.

III. Hipótesis

Considerando el efecto que tiene la estacionalidad sobre los sistemas a estudiar, donde los cuerpos de agua temporales (humedales) tienen menor aislamiento y mayor flujo génico y migración que los sistemas permanentes (cenotes), y considerando la distancia entre ellos, se espera que:

- a) Las poblaciones en sistemas permanentes presenten una mayor estructuración genética en comparación con las poblaciones de sistemas temporales.
- b) La diferenciación genética será mayor conforme aumente el grado de aislamiento entre sistemas (distancia y comunicación); los permanentes, que están incomunicados, mostrarán mayor diferenciación entre sí y con respecto a los temporales, los cuales se pueden interconectar al inundarse, propiciando la migración de individuos.

IV. Métodos

i. Área de estudio

Reserva de la Biosfera Sian Ka'an, Quintana Roo

La Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an (RBSK) tiene una superficie de 528 km² y se localiza a lo largo del centro de la costa este de la península de Yucatán (20° 07' 48"N - 18° 54' 00"N y 88° 12' 12"W - 87° 24' 36"W), dentro de los municipios de Felipe Carrillo Puerto y Tulum, en el estado de Quintana Roo. La barrera de arrecifes de Sian Ka'an, con cerca de 110 km de longitud, forma parte de la segunda cadena arrecifal más larga del mundo. La reserva se sitúa en la franja geológicamente más reciente de la península, donde la mayor parte de sus terrenos emergidos son de hace menos de 2 millones de años. Las zonas de marismas son más jóvenes que las zonas más altas y secas que están ocupadas por las selvas. Toda el área de la reserva es una extensa llanura cuya cota máxima alcanza tan sólo 10 msnm (UNAM-CIQRO 1982).

El clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano, con estiaje prolongado y con una canícula durante el mes de agosto. La temporada de lluvias se presenta de mayo a octubre, con máximas en junio y septiembre, siendo la precipitación media anual de 1,300 mm, mientras que el mes más seco recibe menos de 60 mm (UNAM-CIQRO 1982; CIQRO 1983). La temperatura oscila entre 21 y 28°C, siendo la media anual de 26°C. Los meses más calientes son julio y agosto (27.8°C en promedio) y el mes más frío enero (23°C), con una oscilación térmica anual de 4.8°C. Esta región está dentro de la zona ciclónica tropical del Caribe, y presenta los ciclones más fuertes en promedio cada ocho años (CIQRO 1983; Schmitter-Soto y Gamboa-Pérez 1996).

La RBSK se caracteriza por tener un relieve kárstico, con presencia de cuerpos de agua como cenotes, algunos con más de 50 m de diámetro, lagunas, alrededor de 70 reportadas, que se forman en oquedades impermeabilizadas, poco profundas y con mayor materia orgánica. El agua en estos sistemas suele ser muy transparente por su dureza y oligotrofia, relacionadas con la presencia de un lecho calcáreo poco soluble, situación que limita también el crecimiento de algas y plancton (Semarnap 1996). Otra característica importante es su marcado patrón estacional de lluvias, donde al menos un 75% de la superficie de la reserva se encuentra inundado al final de la estación lluviosa y casi completamente seco el resto del año. Normalmente el agua de lluvia se filtra a través de los suelos permeables de rendzina y *saskab* (calizas granulosas, blanquecinas y deleznales cuya formación y tiempo de aparición no han permitido su mineralización), hasta alcanzar las corrientes subterráneas, que aparecen comunicadas en el subsuelo. La permeabilidad del sustrato presenta variaciones según la acumulación de sedimentos finos y de la proximidad al manto freático, lo que determina la existencia de áreas inundadas permanentes o estacionales, y de extensión variable (CIQRO 1983).

A partir de los inventarios de fauna realizados por Navarro y Robinson (1990) y Navarro y Suárez (1992) se tienen registradas 2,161 especies que incluyen a las cinco especies de felinos neotropicales: jaguar (*Panthera onca*), puma (*Puma concolor*), ocelote, (*Felis pardalis*), tigrillo (*F. weidi*) y leoncillo (*F. yagouaroundi*). Se consideran que hay más de 320 especies de aves (residentes y migratorias), entre ellas la fragata rabihorcado (*Fragata magnificens*), pelícano café (*Pelecanus occidentalis*), el cormorán (*Phalacrocorax olivaceus*), ibis blanco (*Eudocimus albus*) y la espátula rosa (*Ajaja ajaja*). No existe un listado completo de anfibios y reptiles pero se han registrado diversas especies como la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*), tortuga caguama (*Caretta caretta*), tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*), cocodrilo (*Crocodylus moreletii* y *C. acutus*) y nauyaca (*Bothrops asper*); de anfibios la rana de ojos rojos (*Agalychnis callidryas*) y otras como *Smilisca baudini*, *Hyla stauffery*, *Leptodactylus melanonotus* e *Hypopachus cuneus* (Semarnap 1996).

En cuanto a la vegetación, los dos tipos dominantes en donde se ubicaron los sitios de muestreo son: selva mediana subperennifolia y selva baja caducifolia. El primero, donde se encuentra la mayoría de las localidades estudiadas, está constituido por varios estratos entre 7-25 m de altura, encontrando arbustos, herbáceas, algunas suculentas y epífitas. Existe un elevado grado de humedad debido a la gran cantidad de cenotes y lagunas presentes. Las especies arbóreas que generalmente dominan en esta comunidad son: *Brosimum alicastrum*, *Bursera simaruba*, *Manilkara zapota*, *Metopium brownei*, *Psidium sartorianum* y *Vitex gaumeri*. El segundo tipo de vegetación presenta una comunidad compuesta por árboles de 8 a 15 metros de alto donde más del 75% de las especies son caducifolias, con abundantes arbustivas, algunas de éstas espinosas, relativamente pocas herbáceas y epífitas (UNAM-CIQRO 1982).

ii. Muestreo y obtención de datos

Se realizaron dos muestreos en y cerca de la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an durante la temporada de lluvias (noviembre de 2009 y enero de 2010). Se capturaron en promedio 30 individuos de *P. orri* (N = 241) de cuatro cuerpos de agua temporales (humedales) y cinco permanentes (cenotes) (Tabla 1, Fig. 1), utilizando trampas tipo naza sin cebar (2mm de apertura de malla y 20mm de apertura de entrada). Los organismos capturados se pesaron y midieron (largo total y largo estándar), para posteriormente colocarlos en viales con etanol al 90% y conservarlos para análisis molecular.

Tabla 1. Información de los sitios muestreados.

	Humedal / Cenote	Coordenadas	No. de muestras
--	------------------	-------------	-----------------

Aktun Ha	Cenote	N 20° 16' 28.9" W 87° 29' 10.1"	29
Cenote Escondido	Cenote	N 20° 11' 38.53" W 87° 29' 45.52"	29
Santa Teresa	Cenote	N 19° 44' 37.6" W 87° 47' 01.1"	30
Taj Mahal	Cenote	N 20° 29' 00.2" W 87° 16' 37.8"	33
Grand Cenote	Cenote	N 20° 14' 47.25" W 87° 27' 50.58"	8
Mahahual	Humedal	N 18° 57' 18.5" W 87° 57' 41.9"	40
Vigía chico 1	Humedal	N 19° 47' 00.73" W 87° 36' 06.01"	30
Vigía chico 2	Humedal	N 19° 46' 56.75" W 87° 35' 51.74"	30
Petenes	Humedal	N 19° 47' 16.2" W 87° 41' 9.2"	12

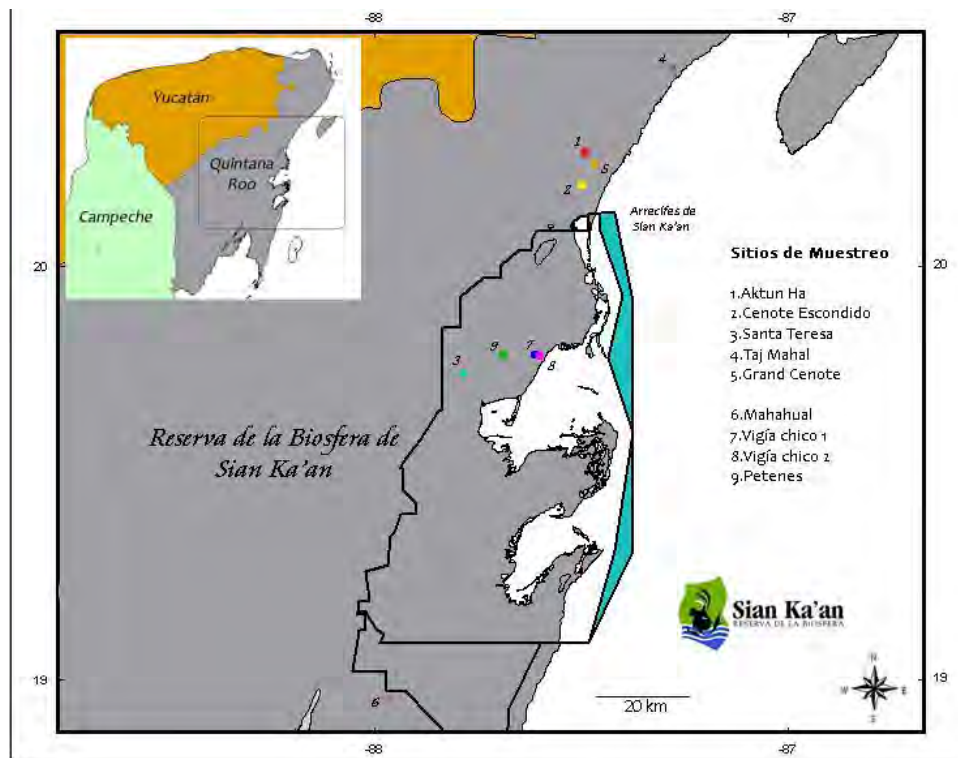


Figura 1. Mapa de sitios de muestreo; 1-5: cenotes; 6-9: humedales.

Para obtener el genotipo de cada individuo se extrajo DNA a partir de tejido muscular utilizando el kit S QuickGene DNA tissue (Fujifilm-LifeScience). Posteriormente, se realizaron amplificaciones de distintos microsatélites mediante PCR. Las secuencias de los oligonucleótidos para cada microsatélite se basan en microsatélites reportados en la literatura y corresponden a cuatro repeticiones imperfectas: Pret39, Pret46, Pret69 y Pret77 (Watanabe 2003) y cuatro repeticiones dinucleótidas perfectas: Pr39, Pr40, Pr80 y Pr92 (Becher 2002) (Tabla 2). Todos los oligonucleótidos *forward* (F) fueron marcados con un fluoróforo HEX o FAM, de manera que se pudieran utilizar para genotipificar posteriormente los productos obtenidos en cada reacción.

Tabla 2. Listado de primers utilizados para la obtención de genotipos. Las secuencias corresponden al primer *forward* (F) y *reverse* (R). T_a: temperatura de hibridación empleada en PCR.

Primer	Secuencias (5' – 3')		T _a
Pr39	F	GGTAAGGACTGATGAATAGCTTG	56
	R	TTAGGGCCGTGTCTTTTG	
Pr40	F	AGGTGGGATGAAGTCGTG	60 – 54*
	R	ACCAGAGCCAAACAACAATC	
Pr80	F	GTACGAACTCTCTCGCAA	56
	R	TGTGGTTTAGGTTGGACTGGG	
Pr92	F	ACCCTGTGCAGAGCAAAGAC	60 – 54*
	R	TGGGCTGCTTTGTGAAGT	
	R	TCAGTCCAATACCAAGACAACC	
Pret39	F	GCCCGGGTTAGAGATGCT	56
	R	TCTGGTGTCCGGCTTTACTG	
Pret46	F	AACCCTAATGACTCCCAACA	60 – 54*
	R	CGACCCACCAGTAATCCAA	
Pret69	F	GGTTGCTGCATGTGGTC	56
	R	CTAGCGTTCCTGCATTCTG	
Pret77	F	CTGCCACTGACCCTTTATTC	56
	R	TTTGTTGCCAGCATTAC	

T_a = temperatura de hibridación

* Touch-down

Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en reacciones de 20µl que contenían 0.2mM de cada dNTP, 1X Buffer de reacción, 2mM MgCl₂, 0.3µM de cada primer, 1u de Taq polimerasa y 1µl de DNA. Se utilizó un termociclador PTC-100 thermal cycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA) con el siguiente protocolo (para Pr39, Pr80, Pr92, Pret69 and Pret77): 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C y 30 segundos a 72°C, con una elongación final de 5 minutos a 72°C. Se empleó asimismo un protocolo touch-down que consistió en una desnaturalización inicial de 3 min a 94°C, seguida de once ciclos de 30 seg a 94°C, 45 seg a 65°C y 30 seg a 72°C, disminuyendo 1°C la temperatura de hibridación en cada ciclo, y 24 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 54°C, 30 seg a 72°C y con una elongación final de 5 min a 72°C. Para comprobar que no hubiera contaminación ni amplificaciones inespecíficas, siempre se utilizaron controles negativos. Finalmente, los productos amplificados fueron secuenciados en un secuenciador ABI Prism 3730xl Analyzer (Applied BiosystemsR) en una institución especializada (Core Sequencing Facility, Illinois). Se utilizó el marcador de peso molecular ROX 500 (Applied BiosystemsR). El genotipo de cada individuo para cada loci microsatélite se obtuvo con el programa GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystems) a partir de los cromatogramas obtenidos.

iii. Análisis de datos

a) Descriptivos poblacionales

La diversidad genética se evaluó a partir del número de alelos observados (n_a), alelos efectivos (n_e), heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_E) para cada sitio de estudio, así como la distancia genética de Nei entre pares de poblaciones. Estos valores se calcularon utilizando el macro para Excel GenAlex (Peakall y Smouse, 2006). Para analizar si las poblaciones se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg, y evaluar si existía desequilibrio de ligamiento (DL) entre los distintos loci analizados, se utilizó el programa GenePop v. 4.1 (Raymond y Rousset, 1995). En el caso del equilibrio de HW se realizó un prueba exacta, donde la probabilidad de la muestra observada es utilizada para definir la zona de rechazo y el valor de P de la prueba equivale a la suma de probabilidades de todas las comparaciones (con el mismo conteo alélico), pero con una probabilidad igual o menor. En cuanto al desequilibrio de ligamiento se examinaron todos los loci de forma pareada considerando que los genotipos entre cada locus eran independientes entre sí. Debido al número de pruebas de hipótesis que se realizan en estas dos pruebas (HW y DL) y al riesgo que se corre de cometer errores Tipo 1 (probabilidad de rechazar erróneamente la hipótesis nula), se utilizó una corrección FDR (False Discovery Rate) implementada en Q-value para R v.2.13.1 (The R Foundation for Statistical Computing). Esta corrección hace un balance entre los riesgos de los errores Tipo 1 y 2 y se basa en controlar la proporción esperada de rechazo erróneo de las hipótesis puestas a prueba, en lugar de controlar todas las hipótesis falsamente rechazadas mediante una reducción en los valores críticos (α) (Narum, 2006).

Se utilizó el programa MICRO-CHECKER (van Oosterhout et al. 2004) para verificar y corregir las frecuencias genotípicas en caso de presencia de alelos nulos. Se utilizó la corrección de Brookfield Estimator 1 (1996), que supone que no hay homocigotos con alelos nulos e ignora todas las muestras no amplificadas, degradadas o errores humanos.

b) Estructura poblacional

La diferenciación y estructura poblacional se evaluó a partir del cálculo de F_{ST} (10000 permutaciones y valor de significancia $\alpha=0.05$) para todos los pares de poblaciones utilizando el programa Arlequin v.3.5.1.2 (Excoffier, 2009), realizando posteriormente una corrección FDR para pruebas de hipótesis múltiples. Además, debido al interés en detectar de manera más puntual el grado de diferenciación genética, se calculó G'_{ST} (Hedrick, 2005), pues esta medida de diferenciación fue desarrollada a partir de la G_{ST} propuesta por Nei (1987), que se basa en una comparación de la diversidad genética o heterocigosidad esperada dentro y entre poblaciones. La diferencia principal entre G'_{ST} y su predecesora es que consiste en una estandarización de ésta

con respecto al máximo valor que puede adquirir dada la diversidad observada dentro de la población, permitiendo que el valor máximo de G'_{ST} sea 1; dicho valor se observa cuando las poblaciones no comparten alelos o cuando todas presentan un solo alelo (fijado), es decir, cuando la heterocigosidad esperada es nula ($H_S=0$), con dos o más diferentes alelos entre las poblaciones. Para obtener G'_{ST} , Hedrick usó la definición original de $G_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$ de Nei y definió el valor de G_{STmax} como una función de la heterocigosidad esperada (H_S) y del número de poblaciones muestreadas k ; definiendo G_{STmax} como:

$$(k-1)(1-H_S) / k-1+H_S$$

a partir de la cual se obtiene:

$$G'_{ST} = G_{ST} / G_{STmax} = G_{ST} (k-1+H_S) / (k-1)(1-H_S),$$

donde H_S es la heterocigosidad promedio para cada par de poblaciones comparadas y que considera que las poblaciones tienen tamaños similares.

Utilizando la fórmula anterior se desarrolló un macro que fue implementado en el programa MINITAB (Minitab, Inc, State College, PA). Se calcularon los valores de G'_{ST} por locus entre pares de poblaciones de humedales, realizando 1000 muestreos con reemplazo, lo que permitió obtener valores del intervalo de confianza (5 y 95%). Debido a que la idea de este análisis era obtener valores de diferenciación genética más precisos, se decidió no realizarlo para los cenotes porque las poblaciones de cenotes mostraron ser en su mayoría monomórficas y estar altamente diferenciadas (ver resultados).

Para analizar la estructuración poblacional de cenotes y humedales se empleó el programa STRUCTURE v.2.3.3 (Pritchard et al. 2000), el cual utiliza un método de agrupamiento Bayesiano para definir un número K de grupos en donde, con base en la similitud genotípica, asigna a los individuos analizados. Se decidió remover de este análisis a los cuerpos de agua con un número de muestras pequeño (GC y Pt), insuficiente para el buen desempeño de la prueba.

En el caso de los cenotes se utilizaron los modelos de No admixture y frecuencias alélicas independientes, debido a la ausencia de migración hacia estos cuerpos de agua. Para los humedales se utilizaron los modelos opuestos (Admixture y frecuencias alélicas correlacionadas), puesto que era necesario tomar en cuenta la migración entre las poblaciones Vigía chico 1 y Vigía chico 2 (ver resultados). Las corridas se configuraron con 500,000 pasos para la cadena de Markov-Monte Carlo y un burn-in, o pasos omitidos, de 100,000. El valor de K con máxima verosimilitud relativa se obtuvo a partir de la comparación de los valores de máxima similitud de las corridas, con valores desde uno hasta nueve, promediando seis iteraciones para cada valor K . Las

probabilidades log estimadas $\Pr(X|Y)$ para cada valor de K se evaluaron calculando ΔK , que es la tasa de cambio en dicha probabilidad entre valores sucesivos del número de grupos definidos. Esta tasa de cambio es más confiable para predecir el verdadero número de grupos definidos, que aquella de elegir el valor de K con el mayor valor de probabilidad posterior (Evanno et al. 2005).

La subdivisión poblacional y la distribución de la variación genética dentro y entre las distintas poblaciones muestreadas se estimó mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA), que se basa en las diferencias entre sumas de cuadrados de pares de observaciones y genera una matriz de distancias cuadráticas de varianza molecular en distintos niveles de agrupación jerárquica. Este análisis se realizó con el programa Arlequin, utilizando 30,000 permutaciones.

Por último se realizó una prueba de Mantel para determinar si existía aislamiento por distancia entre poblaciones utilizando los valores de distancia genética y geográfica (en km) implementada en el macro para Excel XLStat 2012.1.01 (Addinsoft, NY, USA).

c) Tamaño efectivo de población y tasas de migración

Para determinar el tamaño efectivo de todas las poblaciones analizadas se utilizaron dos modelos modificados (Marshall et al. 2009) basados en las ecuaciones de Hartl y Clark (1989) y Ohta y Kimura (1973). El primero asume un modelo de alelos infinitos (IAM):

$$N_e = H_E / 4\mu(1-H_E)$$

y una segunda ecuación, que considera un modelo de paso a paso (SMM), propuesta por Ohta y Kimura (1973):

$$N_e = (1/(1-H_E))^2 - 1 / 8\mu.$$

En ambas ecuaciones H_E es la heterocigosis esperada.

Por otro lado se utilizó un método de máxima verosimilitud coalescente implementado en el programa MIGRATE v.3.2.7 (Beerli y Felsenstein, 1999) para calcular Θ (que equivale a $4N_e\mu$, donde N_e es el tamaño efectivo y μ es la tasa de mutación) y la tasa de migración M ($M=m/\mu$, donde m es la tasa de inmigración por generación). Este análisis fue empleado sólo en el caso de humedales ya que el programa considera que hay migración entre las poblaciones para calcular parámetros poblacionales. Nuevamente, debido al reducido número de muestras se decidió excluir a la población Pt.

Se realizó una primera corrida para obtener los valores de Θ y M basados en los estimados de F_{ST} como valores iniciales. Los valores de salida se utilizaron como parámetros de inicio para la subsecuente corrida y así sucesivamente hasta que los estimados de N_e y N_{em} fueran

consistentes y al graficarse se observara un traslape en los intervalos de confianza de 95%. Los parámetros para cada corrida fueron diez cadenas cortas y tres cadenas largas con 10,000 y 100,000 genealogías visitadas respectivamente, y un burn-in de 10,000 genealogías para cada cadena (González et al. 2008). Las genealogías reconstruidas muestreadas para todas las cadenas fue una cada 20. La mutación se consideró constante para todos los loci con un modelo de mutación Browniano (Beerli, 2008). El valor de M , que mide la cantidad de nuevas variantes llevadas a la población por inmigración comparada con la mutación, se utilizó para estimar el número de migrantes por generación (Nem) al multiplicar M por Θ . Los cálculos del tamaño efectivo de población se realizaron considerando dos tasas de mutación ($\mu=2\times 10^{-4}$ y 5×10^{-4}) que se aplican comúnmente en peces (Estoup y Angers 1998; Ellegren 2000; Lippé et al. 2006).

d) Reducción del tamaño poblacional (cuello de botella)

La evidencia de cuellos de botella se analizó de dos formas: primero se utilizó el programa Bottleneck (Cornuet y Luikart, 1997) que busca evidencia de cuellos de botella recientes. Se supuso un modelo mutacional de dos fases (TPM: two phased model; Di Rienzo et al. 1994) considerando 70% de mutación paso a paso y 30% del modelo de alelos infinitos, con 10,000 iteraciones y determinando significancia mediante una prueba de Wilcoxon. Por otra parte, se calculó el estadístico M de Garza y Williamson (Garza and Williamson, 2001), que evalúa señales de reducciones poblacionales históricas.

Estas dos medidas evalúan evidencia de cuellos de botella de distintas formas. La primera busca un relativo exceso de heterocigotos que es aparente por varias generaciones después de un cuello de botella, mientras que la segunda corresponde a la proporción media entre el número de alelos y el rango alélico, indicando el cociente o proporción (M) de clases alélicas faltantes o "huecos" en dicho rango, que serán mayores en poblaciones que han sufrido un cuello de botella. Para determinar la significancia del cociente M , éste se comparó con el valor crítico (M_c) obtenido a partir de simulaciones de una población ficticia con el mismo tamaño de muestra y modelo de mutación, definiendo una distribución donde los M_c señalan el límite del 5% debajo del cual se puede asumir que la población analizada ha experimentado una reducción significativa en su tamaño. Para calcular M_c deben considerarse tres parámetros: μ (frecuencia de mutaciones de un paso), Δg (proporción de cambios mayores a un paso) y Θ , los cuales fueron definidos a partir de los valores recomendados por Garza y Williamson (2001).

e) Pruebas de selección

Cuando se observó que el locus Pret69 en la población Mh tenía un bajo número de alelos efectivos y que la diferencia en los valores de heterocigosidad observada eran significativamente

menores que en el resto de los loci, se pensó que una posible explicación sería que fuerzas no neutrales estuvieran operando en este locus. Para determinar si el locus Pret69 era un candidato a estar bajo selección o ligado a un sitio que lo estuviera, se utilizó el programa LOSITAN (Antao et al. 2008), el cual se basa en el método de F_{ST} outlier propuesto en Beaumont y Nichols (1996) y en Beaumont (2004). Este método evalúa la relación entre F_{ST} y H_E , describiendo la distribución esperada entre ellos bajo un modelo de isla de migración con marcadores neutrales (Wright, 1931). Una vez obtenida esta distribución, aquellos loci que tienen valores extremos, excesivamente altos o bajos, de F_{ST} comparados con lo esperado bajo neutralidad, son considerados como candidatos a estar sujetos a algún tipo de selección (Antao et al. 2008).

Se utilizó además una segunda prueba, la propuesta por Schlötterer (2002, 2003), la cual se basa en las reducciones observadas en la diversidad genética en un locus de una población que ha sufrido un barrido génico (*selective sweep*). La manera en que detecta evidencia de selección en un locus es mediante el logaritmo natural de la relación del tamaño alélico o la H_E (diversidad génica) entre dos poblaciones, siendo $\ln(RH)=\ln(H_{E1}/H_{E2})$, donde RH es el cociente de las heterocigosidades esperadas de las dos poblaciones comparadas. Aunque no existe un método estándar para estimar la distribución esperada de los valores de $\ln(RH)$ en neutralidad, estudios previos con simulaciones han mostrado que los valores de $\ln(RH)$ tienen una distribución normal bajo condiciones neutrales (Kauer et al. 2002; Schlötterer 2002; Kauer et al. 2003). Por lo tanto, en neutralidad y después de estandarizar el cociente obtenido (media=0 y D.E.=1), se espera que el 95% de los valores de $\ln(RH)$ caigan entre la distribución neutral, que va de -1.96 y 1.96, mientras que los loci extremos pueden identificarse fácilmente al quedar fuera de esta distribución. La relación $\ln(RH)$, a diferencia de otros métodos, puede proveer una indicación de la dirección de la selección, pues un locus extremo puede tener un valor positivo o negativo dependiendo de qué población tenga mayor diversidad genética (Schlötterer 2002, 2003).

f) Divergencia genética entre humedales

Finalmente, para evaluar si la disminución de la variación genética en el locus Pret69 en Mh (ver resultados) era una comparación errónea por tratarse de poblaciones genéticamente distantes y con frecuencias alélicas características, en lugar de deberse a un proceso de selección, se decidió amplificar la región control (D-loop) de 20 individuos provenientes de las poblaciones de humedales Vigía chico 1 (N=5), Hum2 (N=5) y Mh (N=10). Para ello se usaron los primers L15926 (Kocher et al. 1989) y H16498 (Shields and Kocher 1991) en reacciones de 20 μ l que contenían Buffer 1X, MgCl₂ 3mM, dNTP's 0.1mM, 0.4mM de cada oligonucleótido y 0.5u de Taq polimerasa, con un programa que consistió en una desnaturalización inicial de 3min a 96°C, 30 ciclos de 60seg a 96°C, 90seg a 53°C, 90seg a 72°C, y una elongación final de 5min a 72°C. El producto de PCR

se envió a una institución especializada para su secuenciación (Macrogen, Macrogen Inc., Corea).

Las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando ClustalW y editadas a mano utilizando el programa BioEdit (Hall, 1999). Para evaluar qué tan diferentes eran las poblaciones, se calculó la divergencias genética como: D_a (número de sustituciones nucleotídicas netas por sitio entre poblaciones) y D_{xy} (número promedio de sustituciones nucleotídicas por sitio entre poblaciones) con el programa DNASP v.4.1 (Rozas et al. 2003).

V. Resultados

a) Descriptivos poblacionales

En cuatro de las poblaciones estudiadas se encontró que cuatro loci no se ajustaban a las proporciones esperadas en el equilibrio de HW. Después de corregir los valores de p para pruebas múltiples utilizando FDR, en todos estos casos la desviación con respecto al equilibrio fue significativa debido a una deficiencia en el número de heterocigotos. En el caso de desequilibrio de ligamiento, después de la corrección para p para todas las combinaciones de alelos, se detectó que el locus Pr80 puede estar ligado a los loci Pr39 y Pr92 ($p=0.0000$).

Se detectó la presencia de alelos nulos para cuatro loci en cuatro poblaciones (Pret69 en CE, Pr39 en Hum2 y Mh, Pr80 en Mh y Pt y Pr92 en Pt), por lo que se obtuvieron las frecuencias alélicas corregidas.

Los valores de alelos observados promedio por locus, alelos efectivos, así como heterocigosidad observada y esperada mostraron que los cenotes son sistemas con baja diversidad genética en comparación con los humedales, inclusive considerando una población con un bajo número de muestras (Pt) (Tabla 3). La característica constante en los cenotes fue poseer loci monomórficos (por lo menos seis por población), mientras que para los humedales, Mh fue la población con los mayores valores de diversidad genética para casi todos los loci analizados, sólo exceptuando a Pret69.

Tabla 3. Valores de diversidad genética promedio por población. N=tamaño de muestra, n_a =alelos observados, n_e =alelos efectivos, H_o =heterocigosidad observada, H_E =Heterocigosidad esperada. Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar.

Población	N	n_a	n_e	H_o	H_e
Cenotes					
Cenote Escondido (CE)	29	1.75 (0.620)	1.420(0.346)	0.082 (0.054)	0.138 (0.097)
Santa Teresa (ST)	30	1.00 (0.000)	1.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
Taj Mahal (TM)	33	1.00 (0.000)	1.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
Aktun Ha (AH)	29	1.125 (0.125)	1.078 (0.078)	0.047 (0.047)	0.048 (0.048)
Grand Cenote (GC)	8	1.125 (0.125)	1.121 (0.121)	0.078 (0.078)	0.062 (0.062)
Humedales					
Vigía chico 1 H(um1)	30	3.875 (1.552)	2.233 (0.862)	0.288 (0.122)	0.275 (0.120)
Vigía chico 2 (Hum2)	30	4.25 (1.556)	2.585 (1.082)	0.263 (0.114)	0.304 (0.126)
Mahahual (Mh)	40	6.875 (2.191)	2.878 (0.859)	0.338 (0.067)	0.434 (0.110)
Petenes (Pt)	12	2.5 (0.378)	1.863 (0.271)	0.302 (0.111)	0.369 (0.096)

Dado que hubo una alta variación en el número de alelos observados por locus por población (Anexo 1), lo que dificulta su comparación, se calculó asimismo el número de alelos efectivos por locus utilizando un muestreo con reemplazo entre individuos para cada población. Esto se estimó como $n_e = 1 / (1 - \sum p_i^2)$ (donde p es la frecuencia del alelo i) utilizando 1000 simulaciones y por medio de un macro que se desarrolló para utilizarse en el programa MINITAB. Los resultados mostraron que la mayor parte de la variación genética se encontró en sólo cuatro loci (Pret69, Pr39, Pr80 y Pr92) (Fig. 2). Llama la atención que el número de n_e para el locus Pret69 en la población Mh (flecha en el gráfico) es considerablemente menor comparado con los otros dos humedales, aunque Mh es la población con la mayor diversidad para el resto de los loci analizados.

Debido a lo anterior se buscó determinar si existía diferencia significativa en los valores de variación genética de los distintos loci en la población Mh, por lo que se realizó una Regresión Logística Binaria que comparó la heterocigosidad observada por locus por población, encontrando diferencias significativas en el locus Pret69 de la población Mh [Población x Pret69: $Z = -5.26$; $p = 0.000$; Odds ratio = 0.03 (0.01-0.11)], lo que sugiere que fuerzas no neutrales pueden estar operando en este locus.

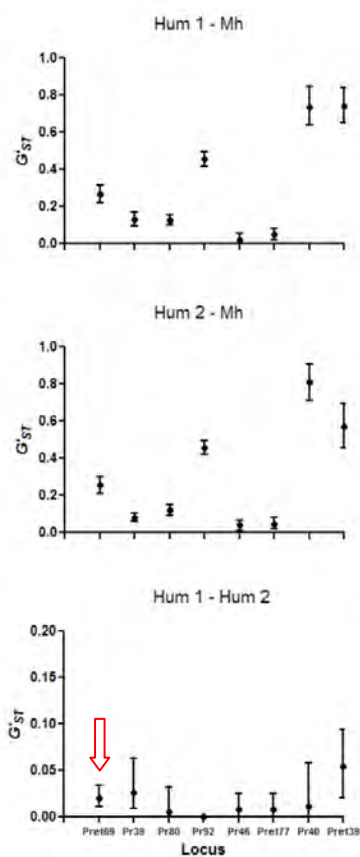


Figura 2. Número de alelos efectivos por población por locus. Los valores se obtuvieron mediante un muestreo con reemplazo. Las barras representan el error estándar de 1000 simulaciones.

b) Estructura poblacional

Los valores corregidos de F_{ST} y de distancia genética de Nei mostraron alta diferenciación entre los cenotes (Tabla 4), lo cual probablemente esté relacionado con que varios de los loci analizados fueron monomórficos y a que, en la mayoría de los casos, el alelo presente por población no se compartió. Por ejemplo, se observó que las poblaciones ST y TM, al no compartir ningún alelo, tuvieron un valor de diferenciación genética de $F_{ST}= 1$. De todas las comparaciones poblacionales sólo una no fue significativa, entre Vigía chico 1 y Vigía chico 2 ($F_{ST}= 0.006$; $P=0.22$).

Tabla 4. Valores de F_{ST} (abajo diagonal) y distancia genética de Nei (arriba diagonal) entre pares de poblaciones de cenotes y humedales. Valor en negritas: no significativo ($p=0.2$).

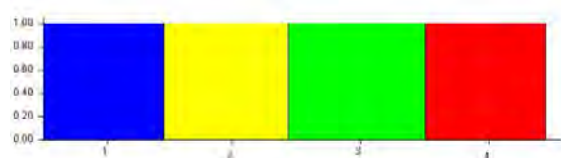
	CE	ST	TM	AH	GC	Vc1	Vc2	Mh	Pt
CE	-	1.312	0.255	0.321	0.128	0.085	0.09	0.877	0.734
ST	0.908	-	0.981	1.362	1.355	1.209	1.164	0.208	0.199
TM	0.762	1	-	0.395	0.186	0.283	0.289	0.675	0.779
AH	0.724	0.968	0.933	-	0.103	0.15	0.156	0.984	0.783
GC	0.454	0.981	0.930	0.633	-	0.12	0.133	0.921	0.776
Vc1	0.232	0.812	0.621	0.420	0.277	-	0.009	0.837	0.667
Vc2	0.228	0.791	0.600	0.406	0.277	0.006	-	0.815	0.650
Mh	0.571	0.400	0.621	0.635	0.540	0.494	0.475	-	0.152
Pt	0.647	0.599	0.816	0.748	0.617	0.510	0.482	0.147	-

Al analizar todas las poblaciones en conjunto (datos no mostrados) se encontró que los cenotes y humedales fueron sistemas genéticamente distintos. La gráfica de barras de la figura 3 muestra la sumatoria de resultados obtenidos por separado para los dos tipos de cuerpos de agua, donde cada cenote se asignó a un grupo ($k=4$) mientras que los humedales conservaron el mismo patrón de asignación, es decir, un grupo para Mh y otro para los dos humedales restantes. Cabe mencionar que estos resultados fueron constantes inclusive al utilizar los modelos de frecuencias alélicas combinadas y correlacionadas, lo que aumenta la probabilidad de que se agrupen genotipos de distintas localidades. Para determinar si existía alguna señal de diferenciación entre Vigía chico 1 y Vigía chico 2 se realizó una última prueba utilizando los modelos de frecuencias alélicas no combinadas e independientes, así como un modelo de prioridad para definir la localidad de la que proviene cada individuo (datos no mostrados). El resultado se mantuvo: las poblaciones

son altamente similares y tanto los valores de máxima similitud como el algoritmo ΔK dieron el resultado de $k=2$.

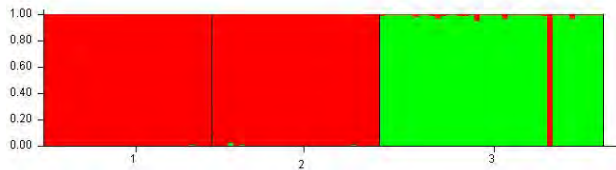
Tanto el AMOVA basado en F_{ST} como en R_{ST} mostraron que la variación genética se encuentra distribuida principalmente entre las poblaciones (64.12 y 72.3%, respectivamente), seguido de aquella en los individuos (33 y 21%) (Tabla 5). Por último, la prueba de Mantel realizada para determinar si existía aislamiento por distancia indicó que la correlación de la distancia genética con la geográfica es muy débil además de no significativa ($r=0.03$; $p=0.886$) aunque, al realizar el análisis sólo con poblaciones de cenotes, la correlación fue positiva y significativa ($r=0.801$; $p=0.021$)

a)



1. CE
2. ST
3. TM
4. AH

b)



1. Vc1
2. Vc2
3. Mh

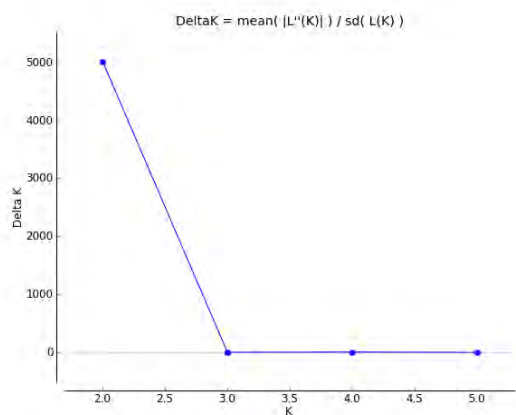


Figura 3. Las gráficas de barras representan la asignación de genotipos a grupos basados en su similitud genética para cenotes (a) y humedales (b). Cada cuadro representa un grupo (k). La gráfica del algoritmo ΔK para humedales muestra la

tasa de cambio entre las probabilidades posteriores. El valor mayor indica el valor real de k .

Tabla 5. Resultados de AMOVA en tres niveles, basado en F_{ST} y R_{ST} . El * indica que el valor es significativamente distinto ($\alpha=0.05$).

a) F_{ST}

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	P
Entre poblaciones	8	524.097	1.31179	64.12	0.00007*
Entre individuos dentro de las poblaciones	232	177.317	0.06681	3.26	0.00000*
En los individuos	241	154.000	0.66708	32.60	0.00000*
Total		873.414	2.04569		

b) R_{ST}

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	P
Entre poblaciones	8	212983.428	529.01485	72.3	0.00083*
Entre individuos dentro de las poblaciones	232	55412.007	51.14545	6.98	0.00000*
En los individuos	241	34604.000	151.54740	20.72	0.00000*
Total		302999.435	731.70770	100	

c) Tamaño efectivo de población y tasas de migración

Los tamaños efectivos de población calculados para el modelo SMM fueron mayores que los obtenidos mediante IAM. Los N_e de humedales fueron superiores en promedio 6 y 7.3 veces, para IAM y SMM respectivamente, en comparación con los de cenotes. Asimismo, en cuanto a las tasas de mutación, los estimados considerando la tasa de mutación más alta (5×10^{-4}) fueron en promedio 2.5 veces menores (Tabla 6).

Tabla 6. Tamaño efectivo de población basado en H_E utilizando dos modelos mutacionales. IAM= modelo de alelos infinitos. SMM=modelo de mutación paso a paso. Las tasas de mutación utilizadas fueron 2×10^{-4} y 5×10^{-4} (Estoup y Angers 1998; Ellegren 2000; Lippé et al. 2006)

	IAM		SMM	
	0.0002	0.0005	0.0002	0.0005
Población	0.0002	0.0005	0.0002	0.0005
CE	200.12	80.05	216.13	86.45
AH	63.03	25.21	64.61	25.85
ST	--	--	--	--
TM	--	--	--	--
GC	82.62	33.05	85.35	34.14
Vc1	474.14	189.66	564.06	225.62
Vc2	545.98	218.39	665.21	266.09
Mh	958.48	383.39	1325.96	530.38
Pt	782.52	313.01	1027.46	410.98

Los estimados del parámetro poblacional Θ para Vigía chico 1, Vigía chico 2 y Mh, calculados con Migrate fueron $\Theta_{Vc1}=1.2188$, $\Theta_{Vc2}=1.3536$ y $\Theta_{Mh}=1.8402$. El cálculo de $N_e=\Theta / 4\mu$ a partir de estos estimados se muestra en la Tabla 7. Los resultados obtenidos son entre 1.4 y 5.2 veces mayores que los obtenidos usando las ecuaciones para los modelos mutacionales IAM y SMM, respectivamente. En cuanto al número de migrantes por generación (N_{em}) entre los humedales Vigía chico 1 y 2 se encontró que en la dirección Vigía chico 1 hacia Vigía chico 2 existe una migración de 2.66 individuos por generación, mientras que es de 2.55 migrantes en la dirección contraria.

Tabla 7. Valores de Θ estimados en Migrate, cálculo del tamaño efectivo de población y número efectivo de migrantes por generación (N_{em}) para humedales.

	Θ	N_e		N_{em}
		0.0002	0.0005	
Población		0.0002	0.0005	
Vc1	1.2188	1523.5	609.4	2.55
Vc2	1.3536	1692	676.8	2.66
Mh	1.8402	2300.25	920.1	-

d) Reducción tamaño poblacional: cuellos de botella

Los resultados de Bottleneck mostraron una señal significativa de reducción del tamaño poblacional reciente, relacionada con una deficiencia de heterocigotos, para Mh (TPM, $p=0.01367$; SMM, $p=0.004$), Vc1 (SMM, $p=0.016$) y Vc2 (SMM, $p=0.016$). Los resultados no fueron significativos para ninguno de los cenotes. En cuanto al índice de Garza-Williamson, los valores estimados de M para todas las poblaciones fueron menores que M_c , y todas las comparaciones fueron significativas, sin importar la magnitud de Θ o Δg , lo que indica una señal de reducción histórica del tamaño poblacional en todas las poblaciones (Garza y Williamson 2001) (Tabla 7).

Tabla 8. Valores del índice de Garza-Williamson (M) y de Mc por población. Los valores de M se calcularon a partir de H_E para cada población. Mc calculado para $\Theta=0.1-10$ y $\Delta g= 3.5$ y 2.8 .

Pob	M	Mc 2.8				Mc 3.5			
		0.1	1	2	4	0.1	1	2	4
CE	0.60	0.83	0.81	0.78	0.76	0.85	0.76	0.73	0.69
ST	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AH	0.4	0.83	0.81	0.78	0.76	0.85	0.76	0.73	0.69
Vc1	0.61	0.85	0.81	0.79	0.76	0.83	0.75	0.73	0.70
Vc2	0.55	0.85	0.81	0.79	0.76	0.83	0.75	0.73	0.70
Mh	0.69	0.85	0.81	0.79	0.77	0.83	0.76	0.73	0.71

e) Pruebas de selección y distancia genética

De los ocho microsatélites analizados con el método de F_{ST} outlier, sólo tres (Pret69, Pr40 y Pret39) se encontraron como candidatos a estar bajo selección positiva (Figura 4). Para el caso de la prueba Schlötterer, a pesar de que algunos loci tuvieron valores cercanos a ± 1.96 (Pret69 y Pr40), ninguno fue significativo.

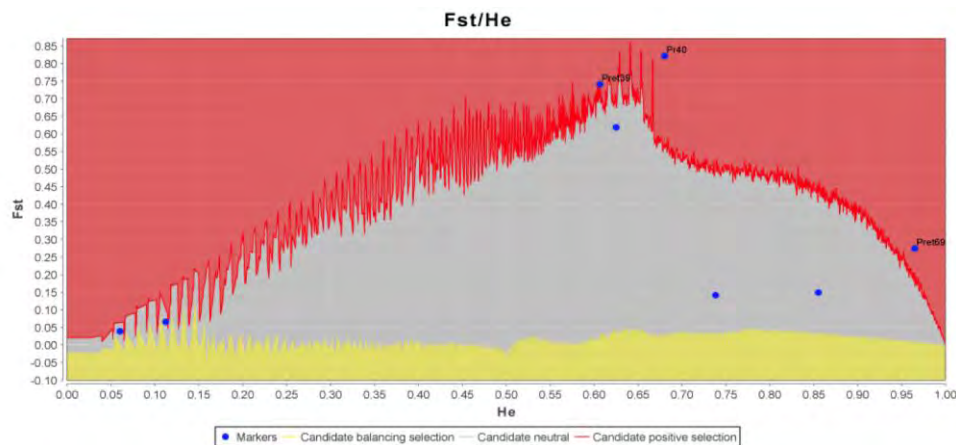


Figura 4. Loci candidatos a estar bajo selección (F_{ST} outlier). Los loci cuyo nombre se muestra son posibles candidatos a estar bajo selección positiva. La distribución final se obtuvo después de 1×10^6 simulaciones.

f) Divergencia genética (DNA mitocondrial)

Los resultados mostraron que la divergencia genética basada en la región control del ADN mitocondrial es prácticamente nula entre las poblaciones Vigía chico 1 y Vigía chico 2 ($D_A=0$; $D_{xy}=0.0014$), mientras que hay más del 5% de divergencia de éstas con respecto a Mh: Vc1-Mh

$(D_A=0.053; D_{xy}=0.054)$, Vc2-Mh $(D_A=0.053; D_{xy}=0.055)$. Si se considera a Vc1 y Vc2 como una sola población, se mantiene el mismo vaor de divergencia respecto a Mh (5.2%).

VI. Discusión

1. Diversidad y diferenciación genética

La península de Yucatán es una extensa planicie constituida de calizas, cuya disolución genera el relieve cárstico característico de la región. Se estima que la historia biológica de la península comenzó hace unos 65 millones de años (Vázquez Domínguez y Arita 2010) y que gran parte de las formaciones geológicas que se aprecian en la actualidad se formaron conforme fue disminuyendo el nivel del mar, fenómeno que comenzó durante el Pleistoceno (Suárez-Morales et al. 1996). El nivel actual del mar se alcanzó hace 5,000 años aproximadamente (Beddows et al. 2007). A lo largo de este proceso, la filtración de agua definió distintos sistemas tales como los cenotes, que son el rasgo topográfico más importante de la península y cuya profundidad promedio es de 10 a 20 m (Scholz et al. 1995), además de la red de cuevas inundadas más grande del mundo cuyas profundidades pueden llegar hasta 119m (Beddows et al. 2007). Por otra parte, aunque existen corrientes subterráneas que pueden comunicar varios sistemas, la migración de fauna ictiológica entre ellos es poco probable, sólo exceptuando el caso de *Astyanax fasciatus*, que ha sido encontrado en cuevas de alrededor de 25m profundidad (Ilfiffe y Kornicker 2009).

En el caso de los poecílicos, no se tienen referencias de que puedan desplazarse muy profundo en la columna de agua, además de que en todos los sistemas muestreados en este estudio se observaron sólo cerca de la superficie, a no más de un metro de profundidad. Esto limita la migración de individuos entre cenotes, generando aislamiento genético y aumentando la diferenciación entre poblaciones, lo cual se observa claramente en los resultados de las poblaciones de cenotes que mostraron bajos niveles de variación genética ($n_a=1-1.75$, $He=0-0.138$), con al menos seis loci monomórficos, además de una alta diferenciación entre poblaciones ($F_{ST}= 0.454-1.0$). Vázquez et al. (2009), al realizar una red mínima de haplotipos con nueve poblaciones dentro de la RBSK, encontraron dos grupos divergentes muy marcados que separaron cenotes de humedales, además de que se observó al haplotipo más común, y probablemente el más ancestral, en el grupo de los cenotes, por lo que sugirieron no hay conexión ni migración entre cuerpos de agua.

Los microsatélites utilizados no son específicos para *P. orri* ya que fueron desarrollados para *P. reticulata*. A pesar de que esto pudiera significar estimaciones inferiores de diversidad genética, ya que utilizar primers no específicos puede reflejarse en un menor número de alelos observados en comparación con el uso de marcadores específicos (Jansen et al. 2008), se han reportado niveles bajos de variación también para poblaciones de *P. reticulata*. Suk y Neff (2009) utilizando el locus Pr92, encontraron únicamente nueve alelos en 373 individuos de esta especie, mientras que Barson et al. (2009) amplificaron seis de los loci utilizados en este estudio y encontraron, en

poblaciones aisladas de *P. reticulata*, valores de variación genética similares ($n_a= 1.5-2.53$) a los valores de los cenotes analizados.

Asimismo, el monomorfismo observado en los cenotes es un reflejo del número reducido de individuos en las poblaciones, además de la falta de migrantes que aporten nuevas variantes genéticas. Barson et al. (2009) encontraron valores reducidos de diversidad genética en poblaciones de *P. reticulata* aisladas río arriba ($n_a= 1.5-2.5$; $H_o=0.023-0.252$), debido a que la corriente impide la migración, mientras que en las poblaciones de la parte baja de los ríos, donde se favorece la llegada de nuevos individuos, los valores de diversidad fueron considerablemente mayores ($n_a= 6.1-13.6$; $H_o= 0.517-0.725$).

Por el contrario, las poblaciones de humedales fueron notablemente más diversas que los cenotes ($n_a=2.5-6.875$; $H_o=0.263-0.338$) y con valores de diferenciación comparativamente más bajos ($F_{ST}= 0.006-0.510$). Inclusive la población de Petenes, de la que se evaluaron sólo 12 individuos, tuvo valores de diversidad más altos que cualquiera de los sistemas permanentes. Dos de los humedales estudiados fueron genéticamente similares con diferencias no significativas (Vigía chico 1 y Vigía chico 2; $F_{ST}= 0.006$; $Nei=0.009$). Ello puede explicarse por el hecho de que, durante la temporada de lluvias cuando el nivel del agua aumenta, estos cuerpos de agua se unen a lo largo de grandes extensiones (varios cientos de metros cuadrados), lo cual facilita el movimiento y migración de individuos (la migración estimada fue de 2.6 por generación).

Una de las hipótesis planteadas en este trabajo era que la distancia geográfica pudiera estar relacionada positivamente con la magnitud de la diferenciación genética, es decir, las poblaciones más lejanas entre sí serán genéticamente más distintas. Al analizar a las poblaciones de cenotes y humedales en conjunto no pudo confirmarse dicha hipótesis pues se encontró que la correlación entre matrices de distancias fue muy débil y no significativa ($r=0.03$; $p=0.886$). Esto pudo deberse a que algunos cenotes cercanos tuvieron valores muy altos de F_{ST} entre sí (ej. AH-CE están a 9.51km de distancia, con $F_{ST}=0.72$), mientras que las poblaciones de humedales, con relativamente poca diferenciación genética, estuvieron separadas por distancias considerables, tal como ocurre con Mh-Pt ($F_{ST}=0.15$, a 96.33km). Interesantemente, al analizar a los cenotes por separado, se encontró una correlación positiva y significativa ($r=0.801$; $p=0.021$), que reflejaría el origen de dichas poblaciones pues, al quedar aisladas y carecer de migración, su variación genética mostraría cierta similitud con las poblaciones con las que previamente tuvieron contacto y que fueran entonces las más cercanas a ellas.

Por otra parte, el tamaño efectivo (N_e) estimado para humedales fue considerablemente mayor que el de cenotes. La baja variación genética de los segundos sin duda está ligada con el valor de N_e , ya que se sabe existe una relación entre bajos niveles de variación y tamaños efectivos pequeños (Crow y Kimura 1970). El efecto conjunto de la endogamia y la deriva génica pueden

explicar la baja diversidad genética en cenotes, ya que ambas tienen un efecto significativo sobre las poblaciones pequeñas; un limitado número de individuos reproductores provoca pérdida de heterocigosidad, aunque no necesariamente implique cambios en las frecuencias alélicas, además de la disminución de la adecuación individual asociada al aumento de heterocigotos para alelos deletéreos. Dichos efectos incrementan la probabilidad de extinción. En contraste con la endogamia, la deriva génica provoca una pérdida aleatoria de alelos sin importar si son neutros, ventajosos o deletéreos aunque, debido a la fijación de alelos deletéreos recesivos en algunos loci, irremediablemente provoca un decremento en la adecuación de la población (Frankham, 1995; Shikano et al. 2001; Allendorf 2007).

Los resultados de los análisis de cuellos de botella mostraron una señal de reducción histórica del tamaño poblacional para todos los sitios estudiados, mientras que la señal de cuello de botella más reciente sólo se observó en los humedales. Esto es interesante puesto que en estos sistemas ciertamente hay una disminución drástica estacional en el número de individuos resultado de la disminución del nivel del agua durante la temporada de secas, evento que no afecta a los cuerpos de agua permanentes. Con el tiempo, los eventos recurrentes de cuellos de botella pueden implicar una reducción de la diversidad genética (Mamuris et al. 2005; Huey et al. 2008), como se presenta en el estudio de Graputto et al. (2006) donde encontraron que un cuello de botella severo, en cuatro poblaciones de *Gambusia holbrooki*, produjo una marcada reducción en el número de loci polimórficos y en la heterocigosidad. Vázquez et al. (2009) encontraron una baja diversidad genética en varias poblaciones de *P. orri* y *Gambusia yucatana* dentro de la RBSK. Los valores de diversidad obtenidos fueron menores que el promedio reportado ($H_o=0.540$) para peces de agua dulce (DeWoody y Avise 2000). Los autores concluyeron que la baja variación intrapoblacional observada en los loci estudiados se asocia con los eventos sucesivos de contracción-expansión poblacional provocados por la estacionalidad, además de que la falta de migración y flujo génico, junto con tamaños reducidos de población y cuellos de botella frecuentes se relacionan con valores bajos de diversidad genética.

Una estrategia para sobrevivir en sistemas hidrológicos altamente variables es tener la capacidad de explotar rápidamente eventos de conectividad, por lo que se espera que algunas especies en estos ambientes tengan historias demográficas complejas dominadas por eventos de colonización-extinción o expansiones y cuellos de botella poblacionales (Matthews y Marsh-Matthews 2003). La mayoría de los poecílidos en la RBSK se consideran especies oportunistas ya que presentan tiempos de maduración temprana y una alta habilidad de colonización (DeAngelis et al. 2005). El patrón reproductivo de los poecílidos, que involucra fertilización interna, retención de embriones hasta estadios avanzado de desarrollo, junto con el almacenamiento de esperma y la superfetación (Meffe y Snelson 1989; Soucy y Travis 2003) les permite mantener ciertos niveles de

variación genética gracias a la adquisición de alelos distintos y a la mezcla de generaciones, lo que contrarresta la disminución en la heterocigosidad producido por las reducciones poblacionales.

Por otra parte, los valores de diversidad de las poblaciones de *P. orri* estudiadas son estimaciones en un solo punto en el tiempo, lo cual es importante considerar, en especial respecto a N_e . Por ejemplo, Vázquez et al. (2009) calcularon una heterocigosidad de 0.26 para el cenote ST en la RBSK, mientras que en el caso del presente estudio se obtuvo una heterocigosidad de 0. En otro caso, Crispo y Chapman (2010) encontraron cambios marcados en las frecuencias alélicas en dos años distintos para un cíclido africano que habita en ríos con inundaciones bianuales. Estas poblaciones sufren una reducción drástica del tamaño poblacional de manera estacional, debido a la disminución del nivel del agua. Esto es, los ciclos dependientes de la hidrología tienen el potencial de reducir dramáticamente el N_e , mediante cuellos de botella repetidos, extinción local y eventos de recolonización. Este es el mismo escenario que se observa en los humedales estudiados, por lo que los valores obtenidos no son definitivos para estas poblaciones; la forma de obtener estimaciones más representativas de diversidad y diferenciación genética sería mediante colectas en distintos tiempos.

2. Selección y divergencia genética entre poblaciones

La selección natural es una fuerza evolutiva que opera sobre las poblaciones y que puede modificar las frecuencias alélicas de ciertos loci en el tiempo, en ambientes divergentes e inclusive en distintas cohortes dentro de una misma población (Shikano et al. 2001; Crispo y Chapman 2010; Plath et al. 2010). Crispo y Chapman (2010) encontraron una disminución significativa de la variación genética en un locus (Pmv9) para la misma población de peces cíclidos, analizada en dos años distintos en los cuales se registraron eventos inusuales de inundaciones. De acuerdo con los autores, estas alteraciones en las condiciones bióticas y abióticas en el sistema provocaron modificaciones en los patrones de selección natural, lo que permitió que sólo los genotipos mejor adaptados a esos cambios sobrevivieran. Crispo y Chapman (2010) explicaron la baja variación en el locus Pmv9 a partir de que éste estuviera ligado a alguno de los loci seleccionados positivamente. La diferencia en las frecuencias alélicas entre las poblaciones de humedales también pudiera deberse a que en poblaciones con sobrelape de generaciones las distintas cohortes pueden ser genéticamente diferentes, lo cual incrementa la variación interpoblacional y tiene como consecuencia que al comparar las frecuencias alélicas en un solo punto en el tiempo, éstas podrán ser distintas debido a fluctuaciones generacionales que ocurren junto con la deriva génica (Palm et al. 2003).

La baja diversidad genética observada para el locus Pret69 en la población de Mahahual con respecto a los otros dos humedales se consideró inicialmente como una potencial evidencia de

selección pues éste mostró tener muy poca variación en comparación con las otras dos poblaciones, considerando que Mh es la población genéticamente más diversa para el resto de los loci analizados. La prueba de F_{ST} outlier identificó a éste y otros tres loci como candidatos a estar sujetos a selección. Sin embargo, la marcada divergencia observada entre las poblaciones de estos humedales (5.3-5.4%) sugiere que la disminución de la variación genética en el locus Pret69 en la población de Mahahual se debe no a que el locus está bajo selección, sino a que estas poblaciones son marcadamente diferentes (divergentes) genéticamente.

Es importante hacer notar que la prueba de F_{ST} outlier se basa en un cálculo global de la diferenciación entre poblaciones y un valor relativo de heterocigosidad, con lo que determina si alguno de los marcadores genéticos analizados tiene un valor de diferenciación genética no esperado bajo un modelo con distribución normal, con lo que entonces se identifica como candidato a estar bajo selección (Beaumont y Nichols 1996). En el caso de los ocho loci analizados, cuatro tuvieron bajos valores de diversidad genética en todas las poblaciones genotipificadas (Pr46, Pret77, Pr40 y Pret39), lo que predispone a que dichos loci puedan ser considerados como sujetos a selección. Narum y Hess (2011), por medio de simulaciones, detectaron un alto número de falsos positivos al utilizar cuatro métodos distintos de F_{ST} outliers, encontrando que FDIST2, en el cual se basa el programa que se empleó en el presente estudio, tiene problemas para identificar loci bajo selección en casos de evidencia débil, además de detectar varios marcadores en principio neutrales como posibles candidatos a selección (error tipo 1), por lo que recomiendan ser cautelosos al interpretar los resultados de estas pruebas. Aunado a esto, Excoffier et al. (2009) reportan que ciertos eventos demográficos, como reducciones poblacionales, también pueden resultar en numerosos loci falsos positivos. Es por ello que el resultado que considera al locus Pret69 en la población Mh bajo selección, junto con los otros tres loci candidatos, no es concluyente, considerando además que el método de Schlötterer no detectó a ninguno de estos como sujetos a selección.

En cuanto a los resultados de divergencia genética, Ptacek y Breden (1998) y Breden et al. (1999) compararon secuencias de DNA mitocondrial (D-loop y NADH deshidrogenasa subunidad 2) de 14 y 18 especies de poecílicos, respectivamente, y encontraron que *Poecilia orri* y *P. gilli* tienen una divergencia genética de 2.2%, concluyendo que estas especies pudieran considerarse como hermanas. Además, encontraron que el porcentaje de variación entre *P. orri* - *P. mexicana* y *P. orri* - *P. sulphuraria* es de 3.5%. Al comparar estos valores de divergencia con el observado entre los humedales estudiados (5.4%), la conclusión es que estas poblaciones pueden ser consideradas como diferentes especies, invalidando en gran medida la hipótesis de selección. Rojas-Santoyo (2008) y Vázquez et al. (2009) reportaron que la divergencia entre poblaciones de *P. orri* en cenotes/lagos contra humedales en la RBSK, utilizando DNA mitocondrial (D-loop), fue

de 4.5%, concluyendo que las poblaciones comparadas pudieran ser consideradas como unidades evolutivas independientes o, inclusive, como especies distintas. La divergencia observada entre los humedales puede deberse por un lado a aislamiento geográfico, dado que estos cuerpos de agua están separados por 99.4 km, y por otro a procesos de adaptación local que favorecerían la diferenciación genética incluso en la ausencia de barreras geográficas, en la cual aumenta el aislamiento reproductivo como resultado de agentes selectivos como uso diferencial de recursos, depredación o exposición a diferentes parásitos, entre otros (van Oosterhout et al. 2006; Plath et al. 2010).

Así, se evidencia que es necesario realizar un estudio filogenético de los poecílidos de la península de Yucatán, evaluando el efecto que ha tenido el aislamiento geográfico y la presión ambiental sobre la divergencia genética entre poblaciones y especies. Además, debe considerarse la presencia de híbridos, que no son raros en esta familia de peces, como es el caso de *P. formosa* (Girard 1859), originada de la cruce entre *P. velífera* y *P. mexicana*. En condiciones de simpatria, se han reportado híbridos de *P. mexicana* - *P. orri* (de aleta dorsal corta) y *P. velífera* - *P. laticipina* (con aleta dorsal larga), que se relaciona con la elección de machos por parte de las hembras, quienes prefieren individuos con aleta dorsal grande, no importando la especie de la que se trate. Esto significa que en diferentes localidades en la península de Yucatán donde coexisten estas especies, los machos de especies con aleta dorsal larga tendrán ventaja sobre otros individuos (Kittell et al. 2005).

Es sin duda necesario también considerar las características del hábitat como variables que pueden influir en la diferenciación entre poblaciones, como en el estudio de Plath et al. (2010), quienes encontraron que el tipo de hábitat, en comparación con la distancia geográfica, predice de mejor manera la diferenciación genética entre poblaciones de *P. mexicana*, aún en sistemas continuos sin barreras para la dispersión. De igual modo, los factores abióticos, como la calidad y cantidad de agua, modifican la abundancia y riqueza de especies al afectar directamente la supervivencia de los individuos, lo cual es más marcado en sistemas altamente variables con marcadas estacionalidad, como son los humedales de la RBSK (Escalera-Vázquez y Zambrano 2010).

VII. Conclusión

Los estudios sobre la genética de poecílicos en sistemas acuáticos de la península de Yucatán son muy escasos. El presente estudio se enfocó en determinar y comparar la diversidad y diferenciación genética de poblaciones de *P. orri* en cenotes y humedales de la Reserva de Sian Ka'an, encontrando que la diferenciación entre estos tipos de hábitat es muy marcada y está relacionada con el efecto que tiene la estacionalidad sobre el tamaño poblacional y la migración de individuos. Los cenotes se caracterizaron por tener baja diversidad genética con numerosos loci monomórficos, relacionado con el aislamiento geográfico, la falta de migración y el efecto que tiene la deriva génica sobre el reducido tamaño poblacional. Los humedales fueron más diversos a pesar de las disminuciones poblacionales estacionales que presentan, lo cual se relaciona con los eventos de rápida colonización y migración de individuos. En general, el aislamiento entre humedales y cenotes en la RBSK, junto con el patrón anual de aumento y reducción poblacional estacional han derivado en la baja variación intrapoblacional y en la marcada estructuración genética de *P. orri*.

Finalmente, la evidencia de selección encontrada en la población Mh quedó descartada debido a que los humedales estudiados mostraron ser altamente divergentes, lo que nulifica la comparación. Esta notable divergencia entre poblaciones permite pensar que se trate de dos especies distintas que se diferenciaron por la distancia y con el paso de numerosas generaciones, lo cual sugiere la necesidad de realizar análisis filogenéticos del género *Poecilia* en la región, de manera que se defina adecuadamente el estatus de las especies presentes en la península. Sobre todo, considerando que las poblaciones viven en una dinámica estacional caracterizada por incrementos y reducciones drásticos del número de individuos, así como cambios en los factores abióticos y bióticos del hábitat. Por ello, se necesita llevar al cabo estudios que consideren más sitios de muestreo, con colectas en distintos tiempos, para obtener estimaciones concluyentes de parámetros poblacionales, diversidad y estructuración genética de los poecílicos de Sian Ka'an.

VIII. Bibliografía

- Allendorf, F.W. and G. Luikart. 2007. Conservation and the Genetics of Populations. Blackwell Publishing.
- Antao, T., Lopes, A., Lopes, R.J., Beja-Pereira, A., Luikart, G. 2008. LOSITAN: a workbench to detect molecular adaptation based on a F_{ST} -outlier method. BMC Bioinformatics, 9:323
- Avice, J. 2004. Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press. Cambridge, MA.
- Avice, J.C. 2004. Molecular Markers, Natural History, and Evolution. Sinauer Associates, Massachusetts
- Ayala, F.J. 1982. Population and Evolutionary Genetics: A primer. The Benjamin/Cummings Company, California
- Balloux, F., Lugon-Moulin, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. Molecular Ecology, 11:155-165
- Balloux, F., Lugon-Moulin, N., Hausser, J. 2000. Estimating gene flow across hybrid zones: How reliable are microsatellites? Acta Theriologica, 45:93-101
- Barona, A., Espinasa, L. 2004. Speciation in aquatic Trogloxenes in cenotes. AMCS Activities Newsletter 27: 60-63
- Barson, N.J., Cable, J., van Oosterhout, C. 2009. Population genetic analysis of microsatellite variation of guppies (*Poecilia reticulata*) in Trinidad and Tobago: evidence for a dynamic source-sink metapopulation structure, founder events and population bottlenecks. Journal of Evolutionary Biology, 22:485-497
- Beaumont, M.A., Balding, D.J. 2004. Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans. Molecular Ecology, 13:969-980
- Beaumont, M.A., Nichols, R.A. 1996. Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. Proceedings of the Royal Society London Series B, 263:1619-1626
- Becher, S.A., Russell, T., Magurran, E. 2002. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in the Trinidadian guppy (*Poecilia reticulata*). Molecular Ecology Notes, 2:456-458.
- Beddows, P.A., Blanchon, P., Escobar, E., Torres-Talamante, O. 2007. Los cenotes de la península de Yucatán. Arqueología Mexicana, 16: 32-35.
- Berli, P., Felsenstein, J. 1999. Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. Genetics, 152:763-773

- Breden, F., M. B. Ptacek, M. Rashed, D. Taphorn, and C. A. Figueiredo. 1999. Molecular phylogeny of the live-bearing fish genus *Poecilia* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Molecular Phylogeny and Evolution* 12:95–104.
- Chenuil, A. 2007. Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetica*, 131(1):107
- CIQRO, 1982. Imágenes de la flora quintanarroense. Centro de Investigaciones de Quintana Roo A.C. / Instituto de Biología de la UNAM
- CIQRO/SEDUE. 1983. Sian Ka'an: Estudios preliminares para el establecimiento de una zona en Quintana Roo propuesta como Reserva de la Biosfera
- Clegg, S.M., Degnan, S.M., Kikkawa, J., Moritz, C., Estoup, A., Owens, I.P.F. 2002. Genetic consequences of sequential founder events by an island-colonizing bird. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(12): 8127–8132
- Cornuet J.M., Luikart, G., 1997. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144:2001-2014
- Crispo, E., Chapman, L.J. 2010. Temporal variation in population genetic structure of a riverine African cichlid fish. *Journal of Heredity*, 101(1):97-106
- Crow, J.F., Kimura, M. 1970. *An Introduction to Population Genetics Theory*. Harper & Row, New York, Evanston, London
- DeAngelis, D.L., Trexler, J.C., Loftus, W.F. 2005. Life history trade-offs and community dynamics of small fishes in a seasonally pulsed wetland. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 62:781-790
- DeWoody, J.A., Avise, J.C. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 56:461-473.
- 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*, 91:3166-3170.
- Escalera-Vázquez, L.H., Zambrano, L. 2010. The effect of seasonal variation in abiotic factors on fish community structure in temporary and permanent pools in a tropical wetland. *Freshwater Biology*, 55:2557-2569.
- Estoup, A., Jarne, P., Cornuet, J.M. 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*, 11:1591-1604
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14:2611-2620
- Excoffier L., Hofer T., Foll M. 2009. Detecting loci under selection in a hierarchically structured population. *Heredity*, 103, 285–298

- Excoffier, L., Hamilton, G. 2003. Comment on "Genetic structure of human populations". *Science*, 300:1877
- Fowler, H.W. 1943. A new poeciliid fish from Honduras. *Notulae Naturae*, 117: 1-3
- Frankel, O.H., Soulé, M.E. 1943. *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press
- Frankham, R. 1996. Relationship of Genetic Variation to Population Size in Wildlife. *Conservation Biology*, 10: 1500-1508
- Garant, D., Forde, S.F., Henry, A.P. 2007. The multifarious effects of dispersal and gene flow on contemporary adaptation. *Functional Ecology* 21: 434-443
- Garza, J.C., Williamson, E.G. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10:305-318
- Gillespie, John. 2004. *Population Genetics: A Concise Guide, Second Edition*. Johns Hopkins University Press
- Goldstein, D.B., Schlötterer, C. 1999. *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, New York
- Grapputo, A., Bisazza, A., Pilastro, A. 2006. Invasion success despite reduction of genetic diversity in the European populations of eastern mosquito fish (*Gambusia holbrooki*). *Italian Journal of Zoology*, 73:67-73
- Griffiths, A.J.F., Wessler, S.R., Lewontin, R.C., Carroll, S.B. 2008. *Introduction to genetic analysis*. Freeman and Company, New York
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41:95-98
- Hamada, H., Petrino, M.G., Kakunaga, T., Seidman, M., Stollar, B.D. 1984. Characterization of genomic poly(dT-dG) poly(dC-dA) sequences: structure, organization, and conformation, *Molecular and Cellular Biology*, 19:327-335
- Hankison, S.J., Ptacek, M.B. 2008. Geographical variation of genetic and phenotypic traits in the Mexican sailfin mollies, *Poecilia velifera* and *P. petenensis*. *Molecular Ecology*, 17(9): 2219-2233
- Hartl, D.L., Clark, A.G. 1989. *Principles of population genetics*, 2^a ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA
- Hedrick, P. W. 2005. *Genetics of Populations*. Jones and Bartlett, Boston, MA.
- Hedrick, P.W. 2005. A standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 59:1633–1638
- Huey, J.A., Baker, A.M., Hughes, J.M. 2008. The effect of landscape processes upon gene flow and genetic diversity in an Australian freshwater fish, *Neosilurus hyrtlui*. *Freshwater Biology*, 53(7):1393–1408

- Iliffe, T.M. and L.S. Kornicker. 2009. Worldwide diving discoveries of living fossil animals from the depths of anchialine and marine caves. *Smithsonian Contributions to Marine Sciences*, 38:269-280.
- Jansen K.P., Mushinsky, H.R., Karl, S.A. 2008. Population genetics of the mangrove salt marsh snake, *Nerodia clarkii compressicauda*, in a linear fragmented habitat. *Conservation Genetics*, 9:401-410
- Kauer, M.O., Dieringer, D., Schlötterer, C. 2003. A Microsatellite Variability Screen for Positive Selection Associated With the "Out of Africa" Habitat Expansion of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 165: 1137–1148
- Kauer, M.O., Zangerl, B., Dieringer, D., Schlötterer, C. 2002. Chromosomal patterns of microsatellite variability contrast sharply in African and non-African populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 160:247–256
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Paabo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA sequence evolution in animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86:6196-6200
- Lippé, C., Dumont, P., Bernatchez, L. 2006. High genetic diversity and no inbreeding in the endangered copper redhorse, *Moxostoma hubbsi* (Catostomidae, Pisces): the positive sides of a long generation time. *Molecular Ecology*, 15:1769-1780
- Magurran, A.E. 2005. *Evolutionary Ecology. The Trinidadian Guppy*. Oxford University Press, Oxford.
- Mamuris, Z., Stoumboudi, M. T., Stamatis, C., Barbieri, Katerina. 2005. Genetic variation in populations of the endangered fish *Ladigesocypris ghigii* and its implications for conservation. *Freshwater Biology*, 50: 1441–1453
- Marshall Jr. J.C., Kingsbury, B.A., Minchella, D.J. 2009. Microsatellite variation, population structure, and bottlenecks in the threatened copperbelly water snake. *Conservation Genetics*, 10: 465-476
- Matthews, W.J., Marsh-Matthews, E. 2003. Effects of drought on fish across axes of space, time, and ecological complexity. *Freshwater Biology* 48:1232-1253
- Meffe, G.K., Snelson, F.F. 1989. *Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliidae)*. Prentice Hall. Englewood Cliffs
- Moxon, R., Willis, C. 1999. DNA microsatellites: Agents of evolution? *Scientific American*, 280:94-99.
- Narum, S., Hess, J. 2011. Comparison of F_{ST} outlier tests for SNP loci under selection. *Molecular Ecology Resources* 11: 184–194

- Narum, S.R. 2006. Beyond Bonferroni: Less conservative analyses for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 7(5): 783-787
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106:283-292
- Nei, M. 1973. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12):3321-3323
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nestlerode, J.A., Engle, V.D., Bourgeois, P., Heitmuller, P.T., Macauley, J.M., Allen, Y.C. 2008. An integrated approach to assess broad-scale condition of coastal wetlands—the Gulf of Mexico Coastal Wetlands pilot survey. *Environmental Monitoring and Assessment*, 150(1-4):21-29
- Ohta, T., Kimura, M. 1973. The model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a genetic population. *Genetical Research*, 22:201–204
- Oliveira, E.J., Gomes Pádua, J., Zucchi, M.I., Vencovsky, R., Carneiro, M.L. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites *Genetics and Molecular Biology*, 29(2):294-307
- Palm, S., Laikre, L., Jorde, P.E., Ryman, N. 2003. Effective population size and temporal genetic change in stream resident brown trout (*Salmo trutta*). *Conservation Genetics*, 4: 249-264.
- Peakall, R., Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6:288-295
- Piñero, D. et al . 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en *Capital Natural de México*, vol I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, pp. 415-435
- Plath, M., Hermann, B., Schröder, C., Riesch, R., Tobler M., García de León, F.J., Schlupp, I., Tiedemann R. 2010. Locally adapted fish populations maintain small-scale genetic differentiation despite perturbation by a catastrophic flood event. *Evolutionary Biology*, 10:256
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155:945–959
- Ptacek, M.B., Breden, F. 1998. Phylogenetic relationships among the mollies (Poeciliidae: *Poecilia*: *Mollienesia* group) based on mitochondrial DNA sequences. *Journal of Fish Biology*, 53:64-81
- Raymond, M., Rousset, F. 1995. GENEPOP Version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249
- Rodríguez, P., Pizarro, H. 2007. Phytoplankton productivity in a highly colored shallow lake of a South American floodplain. *Wetlands*, 27: 1153-1160
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 19:2496-2497
- Schlötterer, C. 2002. A microsatellite-based multilocus screen for the identification of local selective sweeps. *Genetics*, 160(2):753-63.

- Schlötterer, C. 2003. Hitchhiking mapping--functional genomics from the population genetics perspective. *Trends in genetics*, 19(1):32-38
- Schmitter-Soto J.J. 1999. Distribution of continental fishes in northern Quintana Roo, Mexico. *The Southwestern Naturalist*, 44(2):166-172
- Schmitter-Soto, J.J., Gamboa-Pérez, H.C. 1996. Composición y distribución de peces continentales en el sur de Quintana Roo, México. *Revista de Biología Tropical*, 44(1):199-212
- Scholz, T., Vargas-Vázquez, J., Moravec, F., Vivas-Rodríguez, C., Mendoza-Franco, E. 1995. Cenotes (sinkholes) of the Yucatan Peninsula, Mexico, as a habitat of trematodes of fish. *Folia Parasitologica*, 42: 32-37.
- Secretaría de la Convención de Ramsar, 2006. Manual de la Convención de Ramsar: Guía a la Convención sobre los Humedales (Ramsar, Irán, 1971), 4a. edición. Secretaría de la Convención de Ramsar, Gland (Suiza)
- Semarnap, 1996, Programa de Manejo de la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an, Publicaciones Instituto Nacional de Ecología - Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca No. 3, México, D. F.
- Shields, G.F., Kocher, T.D. 1991. Phylogenetic relationships of North American ursids based on analysis of mitochondrial DNA. *Evolution*, 45:218-221.
- Shikano, T., Chiyokubo, T., Taniguchi, N. 2001. Temporal changes in allele frequency, genetic variation and inbreeding depression in small populations of the guppy, *Poecilia reticulata*. *Heredity* 86: 153-160.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139:457-462; 1995
- Soucy, S., Travis, J. 2003. Multiple paternity and population genetic structure in natural populations of the poeciliid fish, *Heterandria formosa*. *Journal of Evolutionary Biology*, 16:1328-1336.
- Spencer, C.C., Chlan, C.A., Neigel, J.E., Scribner, K.T., Wooten M.C., Leberg, P.L. 1999. Polymorphic microsatellite markers in the western mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Molecular Ecology*, 8: 157-168
- Suárez-Morales, E., Rivera-Arriaga, E. 1998. Hidrología y Fauna Acuática de los Cenotes de la Península de Yucatán. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Nacional*, 48:37-47
- Suk, H.Y., Neff, B.D. 2009. Microsatellite genetic differentiation among populations of the Trinidadian guppy. *Heredity*, 102:425-434
- Templeton, A. 2006. Population genetics and microevolutionary theory. John Wiley and Sons. Washington University, MI
- Templeton, A.R. 2006. Population genetics and microevolutionary theory. John Wiley and Sons. New Jersey.

- Trexler, J.C., Loftus, W.F., Perry, S.A. 2005. Disturbance frequency and community structure in a twenty-five year intervention study. *Oecologia*, 145(1): 140-152
- van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M, Shipley, P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4:535–538
- van Oosterhout, C., Joyce D.A., Cummings, S.M., Blais J., Barson N.J., Ramnarine I.W., Mohammed, R.S., Persad, N., Cable J. 2006. Balancing selection, random genetic drift, and genetic variation at the major histocompatibility complex in two wild populations of guppies (*Poecilia reticulata*). *Evolution*, 60:2562-74.
- Vázquez, E., Hernández-Valdés, A., Rojas-Santoyo, A., Zambrano, L. 2009. Contrasting genetic structure in two codistributed freshwater fish species inhabiting highly seasonal systems. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 80:181-192.
- Vázquez-Domínguez, E., Arita, H.T. 2010. The Yucatan Peninsula: Biogeographical history 65 million years in the making. *Ecography*, 33:212-219
- Watanabe, T., Yoshida, M., Nakajima, M., Taniguchi, N. 2003. Isolation and characterization of 43 microsatellite DNA markers for guppy (*Poecilia reticulata*). *Molecular Ecology Notes*, 3(4): 487-490
- Willing, E.M., Bentzen, P., van Oosterhout, C., Hoffmann, M., Cable, J., Breden, F., Weigel, D., Dreyer, C. 2010. Genome-wide single nucleotide polymorphisms reveal population history and adaptive divergence in wild guppies. *Molecular Ecology*, 19:968–984
- Wright, S. 1969. *Evolution and the Genetics of Populations*, vol. 2. Chicago, University of Chicago Press
- Zambrano, L., Vázquez-Domínguez, E., García-Bedoya, D., Loftus, W.F., Trexler, J.C. 2006. Fish community structure in freshwater karstic wetlands of the Yucatan peninsula, Mexico. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 17: 193-206

ANEXO 1

Frecuencias alélicas por locus por población

Cenotes

Población	Locus	N	n_a	H_o	H_E
CE	Pret69	29	6	0.379	0.736
	Pr39		2	0.276	0.366
	Pr80		1	0.000	0.000
	Pr92		1	0.000	0.000
	Pr46		1	0.000	0.000
	Pret77		1	0.000	0.000
	Pr40		1	0.000	0.000
	Pret39		1	0.000	0.000
ST	Pret69	30	1	0.000	0.000
	Pr39		1	0.000	0.000
	Pr80		1	0.000	0.000
	Pr92		1	0.000	0.000
	Pr46		1	0.000	0.000
	Pret77		1	0.000	0.000
	Pr40		1	0.000	0.000
	Pret39		1	0.000	0.000
TM	Pret69	33	1	0.000	0.000
	Pr39		1	0.000	0.000
	Pr80		1	0.000	0.000
	Pr92		1	0.000	0.000
	Pr46		1	0.000	0.000
	Pret77		1	0.000	0.000
	Pr40		1	0.000	0.000
	Pret39		1	0.000	0.000
AH	Pret69	29	1	0.000	0.000
	Pr39		1	0.000	0.000
	Pr80		2	0.379	0.383
	Pr92		1	0.000	0.000
	Pr46		1	0.000	0.000
	Pret77		1	0.000	0.000
	Pr40		1	0.000	0.000
	Pret39		1	0.000	0.000
GC	Pret69	8	1	0.000	0.000
	Pr39		2	0.625	0.492
	Pr80		1	0.000	0.000
	Pr92		1	0.000	0.000
	Pr46		1	0.000	0.000

	Pret77		1	0.000	0.000
	Pr40		1	0.000	0.000
	Pret39		1	0.000	0.000

Humedales

Vc1	Pret69	30	15	0.867	0.885
	Pr39		6	0.600	0.595
	Pr80		3	0.600	0.509
	Pr92		1	0.000	0.000
	Pr46		2	0.033	0.033
	Pret77		2	0.033	0.033
	Pr40		2	0.167	0.153
	Pret39		1	0.000	0.000
Vc2	Pret69	30	14	0.933	0.899
	Pr39		7	0.433	0.698
	Pr80		4	0.400	0.527
	Pr92		1	0.000	0.000
	Pr46		1	0.000	0.000
	Pret77		2	0.033	0.033
	Pr40		2	0.067	0.064
	Pret39		3	0.233	0.209
Mh	Pret69	40	6	0.275	0.292
	Pr39		18	0.575	0.858
	Pr80		15	0.475	0.838
	Pr92		6	0.600	0.706
	Pr46		2	0.150	0.139
	Pret77		3	0.275	0.245
	Pr40		3	0.100	0.142
	Pret39		2	0.250	0.255
Pt	Pret69	12	1	0.000	0.000
	Pr39		4	0.417	0.670
	Pr80		6	0.333	0.688
	Pr92		4	0.333	0.622
	Pr46		2	0.083	0.080
	Pret77		2	0.083	0.080
	Pr40		3	0.417	0.559
	Pret39		2	0.750	0.497