



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Diversidad y estructura genética de la iguana Nguio
(*Ctenosaura oaxacana*: Iguanidae) en un bosque continuo
y uno fragmentado del istmo de Tehuantepec, Oaxaca,
México”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

CARMINA MARTÍNEZ GONZÁLEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. VÍCTOR HUGO REYNOSO ROSALES
CIUDAD UNIVERSITARIA, D.F. 2015**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno
Martínez
González
Carmina
5522577487
Universidad Nacional Autónoma de México
México
Facultad de Ciencias
Biología
308168736
2. Datos del tutor
Dr.
Víctor Hugo
Reynoso
Rosales
3. Datos sinodal 1
Dr.
Luis Enrique
Eguiarte
Fruns
4. Datos sinodal 2
M. en C.
Andrea Rubí
Jiménez
Marín
5. Datos sinodal 3
Biól.
Jaime
Gasca
Pineda
6. Datos sinodal 4
Biól.
Erick
García
Morales
7. Datos del trabajo escrito
Diversidad y estructura genética de la iguana Nguio (*Ctenosaura oaxacana*:
Iguanidae) en un bosque continuo y uno fragmentado del istmo de
Tehuantepec, Oaxaca, México
79 p
2015

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Irma González Luna y Juan Manuel Martínez Villegas por brindarme su apoyo incondicional, guiarme y acompañarme en todas las decisiones de mi vida. He aquí la primera meta cumplida.

A mis hermanos Alejandro y Aranza porque siempre me motivaron a seguir adelante, no rendirme y a demostrarme a mí misma y a los demás que sin importar la adversidad, yo sería capaz de superarla.

A mi abuelita, Guadalupe Luna, por enseñarme las cosas más importantes de la vida, por cuidarme, criarme y acompañarme durante toda mi vida. Sé que siempre creíste en mí, que me veías crecer y avanzar hacia mis metas. Te amo mucho abuelita, y me alegra que sigas aquí para ver este logro cumplido.

A mi tutor, el doctor Víctor Hugo Reynoso Rosales por darme la oportunidad de trabajar con él, además de su inmejorable dirección e invaluable apoyo en los muestreos y la elaboración de esta tesis. Gracias por todos esos consejos, y los gratos momentos.

A Sally, Nancy, Itzell y Atzin por soportar todos mis múltiples estados de ánimo y faltas de tiempo durante la realización de ese proyecto, los quiero mucho a todos.

A Jefferey Corneil por haberme facilitado las muestras de Paja Blanca.

A Nancy Santos y Canek Rivera por enseñarme todas las técnicas de laboratorio requeridas para este trabajo. Gracias por su tiempo, paciencia, compañía y amistad durante estos años.

A Andrea Rubí Jiménez Marín por prestarme los servicios del laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Zoología del Instituto de Biología. Además de todo el tiempo que dedico en ayudarme a resolver dudas sobre las técnicas de laboratorio.

Al Dr. Víctor Hugo Reynoso Rosales, el Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns, la M. en C. Andrea Rubí Jiménez Marín, el Biól. Jaime Gasca Pineda y el Biól. Erick García Morales por aceptar ser mis sinodales. Un agradecimiento especial a Jaime Gasca por sus asesorías en el procesamiento y entendimiento de los resultados obtenidos.

A Fauno (M. en C. José Alberto Cruz Silva) por hacer el mapa de mis zonas de estudio. Gracias por ser mi amigo, apoyarme cuando más lo necesite y nunca perder la fe en mí.

A Paco Ríos Moya por ser mi guía en el campo, además de brindarme su hospitalidad, apoyo y paciencia. A la familia Reyes Manuel (Clau, Dino, Don Malaquías y Norma), a la familia Ríos Moya (Doña María, Don Mario (Q.E.P.D.), Doña Eva, Don Julián y Carlos), a Rocío y familia, y Doña Florida por brindarme su hospitalidad.

Un agradecimiento especial al proyecto PAPIIT UNAM IN210315 y al Buro de Investigaciones y Soluciones Biológicas A.C. (ISBio) proyecto 2014/001a, por su financiamiento parcial a este proyecto.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Resumen..... | 13 |
| I. Introducción..... | 14 |
| II. Antecedentes | 18 |
| 2.1 Estudios previos de genética de iguanas | 18 |
| 2.2 Especie de estudio | 25 |
| III. Objetivos | 28 |
| 3.1 Objetivos generales..... | 28 |
| 3.2 Objetivos particulares | 28 |
| IV. Justificación..... | 29 |
| V. Hipótesis | 30 |
| VI. Predicciones..... | 31 |
| VII. Método | 32 |
| 7.1 Localidades | 32 |
| 7.2 Obtención de muestras..... | 33 |
| 7.3 Extracción de DNA | 33 |
| 7.4 Visualización de DNA | 34 |
| 7.5 Amplificación de microsatélites..... | 34 |
| 7.6 Análisis de datos | 35 |
| 7.6.1 Equilibrio Hardy-Weinberg..... | 36 |
| 7.6.2 Alelos nulos | 36 |
| 7.6.3 Estructuración genética | 37 |
| 7.6.4 Desequilibrio de ligamiento..... | 38 |
| 7.6.5 Cuello de Botella..... | 39 |

| | |
|---|----|
| VIII. Resultados | 40 |
| 8.1 Frecuencias alélicas y polimorfismo | 40 |
| 8.2 Alelos nulos | 43 |
| 8.3 Heterocigosis y equilibrio de Hardy-Weinberg..... | 43 |
| 8.4 Análisis de varianza molecular (AMOVA)..... | 46 |
| 8.5 Desequilibrio de ligamiento..... | 47 |
| 8.6 Cuello de Botella | 49 |
| 8.7 Estructura genética de las poblaciones | 50 |
| IX. Discusión..... | 52 |
| 9.1 Variación genética | 52 |
| 9.2 Estructura y flujo genético | 56 |
| 9.3 Efectos de la fragmentación en las poblaciones..... | 57 |
| 9.4 ¿Por qué existe una segunda población en Nizanda? | 60 |
| X. Conclusiones..... | 65 |
| XI. Bibliografía | 67 |
| Apéndice I | 77 |
| Apéndice II | 78 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 | 19 |
| Filogenia de la familia Iguanidae (Pyron et al., 2013) y distribución geográfica de las especies de iguanas mencionadas en los antecedentes, debajo de esas especies se muestra el estado de conservación según la UICN. CR (critico), (EN) (En peligro), VU (Vulnerable), LC (Preocupación menor). | |
| Figura 2 | 26 |
| Iguana Nguio (<i>Ctenosaura oaxacana</i>). | |
| Figura 3 | 32 |
| Mapa de zonas de colecta de <i>Ctenosaura oaxacana</i> . Las zonas rojas indican los municipios donde se encuentran las localidades. | |
| Figura 4 | 42 |
| Frecuencias alélicas por localidad y por locus, se representa a Nizanda de color azul y a Paja Blanca de color verde, en el eje de las X están los alelos para cada marcador, y en el eje de las Y está el porcentaje de individuos que presentan ese alelo en cada población. | |
| Figura 5 | 44 |
| Grafica de análisis de rarefacción de cómo cambia la heterocigosis observada (H_o) conforme cambia el tamaño de la muestra. | |

| | |
|--|----|
| Figura 6 | 51 |
| Tres poblaciones (Población 1 en azul, población 2 en verde y población 3 en rojo). | |
| Figura 7 | 51 |
| Dos poblaciones (Población 1 en verde y población 2 en rojo). | |
| Figura 8 | 55 |
| Filogenia de la familia Iguanidae, obtenida de Pyron <i>et al.</i> (2013). | |
| Figura 9 | 62 |
| Esquema de migración de individuos por destrucción de hábitat. | |
| Figura 10 | 63 |
| Esquemmatización de cómo se distribuirían los genotipos serranos y costeros a lo largo de toda la distribución de <i>Ctenosaura oaxacana</i> . | |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1..... | 23 |
| Secuencias de los primers, repeticiones de motivos y tamaño de estos primer en número de pares de bases (pb). Los marcadores fluorescentes se indican como [H] (5HEX), [F] (6FAM). | |
| Cuadro 2..... | 35 |
| Fluorescencia que marca a cada uno de los loci, motivos de repetición que los forman, temperaturas de los gradientes (Tg) y temperatura de amplificación (Ta). | |
| Cuadro 3..... | 44 |
| Numero de alelos encontrado en cada marcador para cada localidad y su promedio alélico. | |
| Cuadro 4..... | 44 |
| Heterocigosis observada y heterocigosis esperada para cada marcador en las dos localidades. (*) Valores con una diferencia significativa ($p < 0.05$). | |
| Cuadro 5..... | 45 |
| Estadísticos F obtenidos con el programa Genpop. Del lado izquierdo están los resultados obtenidos con los siete marcadores, del lado derecho están los resultados obtenidos al sacar a Pec25. | |

| | |
|--|----|
| Cuadro 6..... | 46 |
| <p>Estadísticos R obtenidos con el programa Genpop. Del lado izquierdo están los resultados obtenidos con los siete marcadores, del lado derecho están los resultados obtenidos al sacar a Pec25.</p> | |
| Cuadro 7..... | 47 |
| <p>Análisis de varianza molecular (AMOVA) hecho para siete y seis marcadores, para estadísticos <i>F</i> y <i>R</i>.</p> | |
| Cuadro 8..... | 48 |
| <p>Desequilibrio de ligamiento encontrado en la localidad de Nizanda.</p> | |
| Cuadro 9..... | 48 |
| <p>Desequilibrio de ligamiento encontrado en la localidad de Paja Blanca.</p> | |
| Cuadro 10..... | 49 |
| <p>Desequilibrio de ligamiento encontrado en la localidad de Nizanda sin incluir al marcador <i>Pec 25</i>.</p> | |
| Cuadro 11..... | 49 |
| <p>Desequilibrio de ligamiento encontrado en la localidad de Paja Blanca sin incluir al marcador <i>Pec 25</i>.</p> | |
| Cuadro 12..... | 53 |
| <p>Diversidad genética reportada por varios autores para otras especies de iguanas del género <i>Cyclura</i>, <i>Sauromalus</i> y <i>Ctenosaura</i>. De todas se reporta la localidad donde se realizó</p> | |

el estudio, el número de individuos analizados (N), el número de marcadores usados (loci) y la heterocigosis observada (H_O) y esperada (H_E).

Cuadro 13.....54

Comparación de la diversidad alélica de los siete marcadores en *C. pectinata* y *C. oaxacana*.

Cuadro 14.....57

Valores de F_{ST} (sobre la diagonal) y R_{ST} (debajo de la diagonal) obtenidos por Tzika *et al.* (2008).

RESUMEN

Actualmente la diversidad de los seres vivos atraviesa por una crisis. Muchas especies se encuentran amenazadas o en peligro y en el peor de los casos, ya se han extinto por efecto de las actividades del hombre. Entre las especies de reptiles con mayor amenaza de extinción está *Ctenosaura oaxacana*, especie endémica de México que se distribuye en la vertiente pacífica del istmo de Tehuantepec, Oaxaca y habita en tierras bajas de selva baja caducifolia a altitudes que van de los 0 a 250 m snm. Existen trabajos sobre su ecología, pero sólo dos tocan de alguna forma su genética; uno prueba si algunos marcadores microsatelitales amplifican en la especie y el otro analiza la diversidad genética de sólo nueve individuos de una localidad.

En este trabajo se evaluó el efecto de la fragmentación del hábitat en la diversidad genética de *C. oaxacana* comparando un bosque continuo y un área fragmentada. Las muestras del bosque continuo se obtuvieron en tres distintos muestreos en los años 2011, 2013 y 2014 en la localidad de Nizanda. Las muestras del bosque fragmentado se obtuvieron en un solo muestreo en la localidad de Paja Blanca en el año 2014. Se colectó un total de 65 muestras, 37 de Nizanda y 28 de Paja Blanca.

Las muestras se analizaron con siete marcadores microsatelitales. Los datos moleculares arrojaron que existe diferencia en la variación genética de la especie entre el bosque fragmentado y el continuo, lo que sugieren que la fragmentación si tiene consecuencias sobre la diversidad genética de esta especie. Paja Blanca cuenta con $H_O = 0.217$, y una $H_E = 0.244$. Nizanda cuenta con $H_O = 0.519$, y una $H_E = 0.521$. Ambas localidades se encuentran en un equilibrio Hardy-Weimberg, pero Paja Blanca tiene un menor número de heterócigos que Nizanda, y ambas localidades tienen menor diversidad genética en comparación con otras especies de iguanas, pero similar a la reportada para especies insulares. El $F_{ST} = 0.292$ y el $R_{ST} = 0.801$, indican que existe una estructuración genética entre las dos localidades. Cada una presenta su propia identidad genética, con alelos compartidos y alelos propios, en especial con *Pec 25* en la que todos los alelos son únicos para cada localidad. Además, la diferencia entre el F_{ST} y el R_{ST} sugieren que la principal fuente de variación es la mutación. En Paja Blanca solo existe una población genética. Nizanda está estructurada en dos poblaciones genéticas perfectamente diferenciadas. Esta estructura puede deberse a un efecto Wahlund, efecto metapoblacional, o un efecto migratorio.

Los resultados indican que la fragmentación de hábitat si tiene efectos sobre la variación genética de *C. oaxacana*, un hábitat pequeño causa una disminución en la variación genética, en comparación a un hábitat mas grande. Además, el aumento en las distancias geográficas entre las poblaciones y la poca vagilidad de *C. oaxacana* causa aislamiento entre las poblaciones, similar a la observada en poblaciones insulares, por lo que la variación genética depende en su mayoría de la mutación.

I. INTRODUCCIÓN

La diversidad biológica puede clasificarse en tres distintos niveles, el genético, la riqueza y abundancia de especies y la diversidad ecosistémica, siendo la diversidad genética uno de los niveles más básicos de la diversidad biológica (Eguiarte y González, 2007). Es en el nivel genético donde se genera la variación que permite a las poblaciones evolucionar y adaptarse a su medio. Si no existe variación genética, las poblaciones no pueden adaptarse a las nuevas y diferentes condiciones ambientales que ocurren a lo largo del tiempo. Tampoco cambiarán y aparecerán nuevas especies, por lo tanto no habría evolución (Eguiarte y González, 2007; Molina-Freaner *et al.*, 2010). Actualmente la diversidad de los seres vivos atraviesan por una crisis. Muchas especies se encuentran amenazadas o en peligro y en el peor de los casos, ya se han extinto por efecto de las actividades del hombre (Rocha y Gasca, 2007).

La pérdida y fragmentación del hábitat está considerada como una de las causas principales de la actual crisis de biodiversidad (Santos y Tellería, 2006). La expansión y degradación ambiental causada por las actividades humanas han dado como resultado cambios en la estructura y configuración de hábitats dentro del paisaje. Esto conlleva a la transformación de un hábitat inicialmente dominante y relativamente continuo a un conjunto de parches pequeños (García, 2011), produciendo un aislamiento geográfico de los ecosistemas naturales y restricciones en la movilidad natural de las especies. Como consecuencia, habrá una reducción de intercambio genético aumentando el riesgo de extinción (Morera *et al.*, 2007; García, 2011).

El incremento de las actividades humanas trae consigo un detrimento de las

áreas naturales, lo que significa una disminución de la cantidad y diversidad de hábitat para todas las especies (Morera *et al.*, 2007). Las especies de los hábitats en deterioro ven mermado el territorio disponible a la vez que se enfrentan a una disminución de sus poblaciones (Santos y Tellería, 2006). Cuanto más pequeños sean los remanentes de hábitat, menor será la densidad de la población (Santos y Tellería, 2006; Morera *et al.*, 2007; García, 2011), y mientras más aislados aumentará su dificultad de dispersión. En casos extremos las poblaciones quedan totalmente aisladas, exponiéndolas a la degradación genética y a la extinción (Morera *et al.*, 2007; García, 2011). La extinción o disminución de poblaciones trae consigo varios problemas, reduce el número de individuos, hay una pérdida del potencial adaptativo asociada a la pérdida de diversidad genética, y una disminución de eficacia biológica promedio resultante de la acumulación de alelos deletéreos (Godoy, 2009).

La diversidad genética es importante para que pueda haber evolución. La teoría predice que los niveles de heterocigosidad se relacionan con los niveles de diversidad y adaptabilidad de las especies (Reed y Frankham, 2003). Por eso la heterocigosidad es una de las medidas más usadas para determinar si una población tiene una buena adaptabilidad o no. La adaptabilidad de los organismos se relaciona entre un 15 – 20% con la heterocigosidad, el tamaño de la población, y la variación genética cuantitativa, por lo que estas medidas son buenos indicadores (Reed y Frankham, 2003).

Para medir la diversidad genética se han desarrollado varias herramientas moleculares que permiten describir patrones genéticos en las poblaciones naturales a escalas que van desde individuos a especies (Godoy, 2009), una de

ellas son los marcadores de tipo SSR (Simple Sequence Repeats), que son secuencias denominadas microsatélite, muy abundantes en los genomas de eucariotas y algunos procariotas. Están constituidas por unidades cortas (motivos básicos) de 1 a 6 pares de bases, que se repiten en tándem un elevado número de veces (Bruford y Wayne, 1993; Demarchi, 2009; Hedrick, 2011; Pico y Esteras, 2012).

Las secuencias microsatelitales se distribuyen en regiones codificantes y no codificantes del DNA y se caracterizan por ser altamente polimórficos en cuanto a su longitud (Vásquez y Morales, 2014). Muchos loci microsatelitales tienen altas tasas de mutación que causan pérdida o ganancia de repeticiones (Bruford y Wayne, 1993; Ellegren, 2004). Esto explica porque estas secuencias son altamente variables entre y dentro de individuos, cambiando la longitud entre los distintos alelos del mismo locus, debido a un número diferente de repeticiones del motivo básico en cada caso (Pico y Esteras, 2012). Su elevado nivel de polimorfismo es resultado de dos mecanismos de mutación, el deslizamiento en el apareamiento de las hebras de ADN (slippage misspairing) y el entrecruzamiento desigual (unequal crossing over) (Vásquez y Morales, 2014). Por su abundancia en el genoma de los organismos, sus altos niveles de polimorfismo y que son fundamentalmente neutros (es decir no suelen estar bajo influencia de la selección), los microsatélites son muy usados en estudios de genética de poblaciones.

Evaluar el estado genético de las poblaciones y proponer medidas que ayuden a preservar la diversidad genética para la permanencia de las poblaciones han sido los objetivos centrales de la genética de la conservación (Godoy, 2009).

Para lograr una conservación a largo plazo es necesario permitir que sigan los procesos naturales microevolutivos y la especiación (Eguiarte y González, 2007). En términos evolutivos también es importante considerar la variación cuantitativa, la cual no presenta una segregación clara, sino que se encuentra en un continuo de la población y esta codificada por muchos genes que se afectan por las condiciones ambientales (Eguiarte y Piñero, 1990).

II. ANTECEDENTES

2.1 Estudios previos de genética de iguanas

Anteriormente se pensaba que lograr tener muchos individuos de una especie hacía que esta perdurara y actualmente sabemos que la diversidad genética es un componente clave para la conservación exitosa de las especies. Para desarrollar buenas estrategias de conservación, es importante relacionar el aspecto biológico, ambiental y genético de las especies, de ahí la relevancia de los estudios de genética de poblaciones.

En la actualidad, la gran mayoría de las especies de iguanas se encuentran bajo algún grado de amenaza según la IUCN. Es por eso que durante los últimos años se han desarrollado varios estudios sobre la genética de iguanas con miras a la conservación. Algunos de los estudios con marcadores microsatelitales hablan de la caracterización de nuevos marcadores, otros van más a fondo y hablan sobre la diversidad y la estructuración genética de poblaciones que directa o indirectamente han sido afectadas por el hombre. En la Figura 1 se observa la filogenia de la familia Iguanidae, y la distribución geográfica de algunas de las especies selectas en las que se han desarrollado estudios de genética.

En las islas Galápagos desde siglo XVII las poblaciones de iguanas se han visto afectadas por las actividades antropogénicas (Tzika *et al.*, 2008). En los últimos años se ha estudiado la diversidad genética de estas iguanas para optimizar los planes de conservación. Steinfartz y Caccone (2006) aislaron y caracterizaron 12 microsatélites, además de probar un microsatélite recientemente obtenido para la especie *Amblyrhynchus cristatus*. Los 13 marcadores son

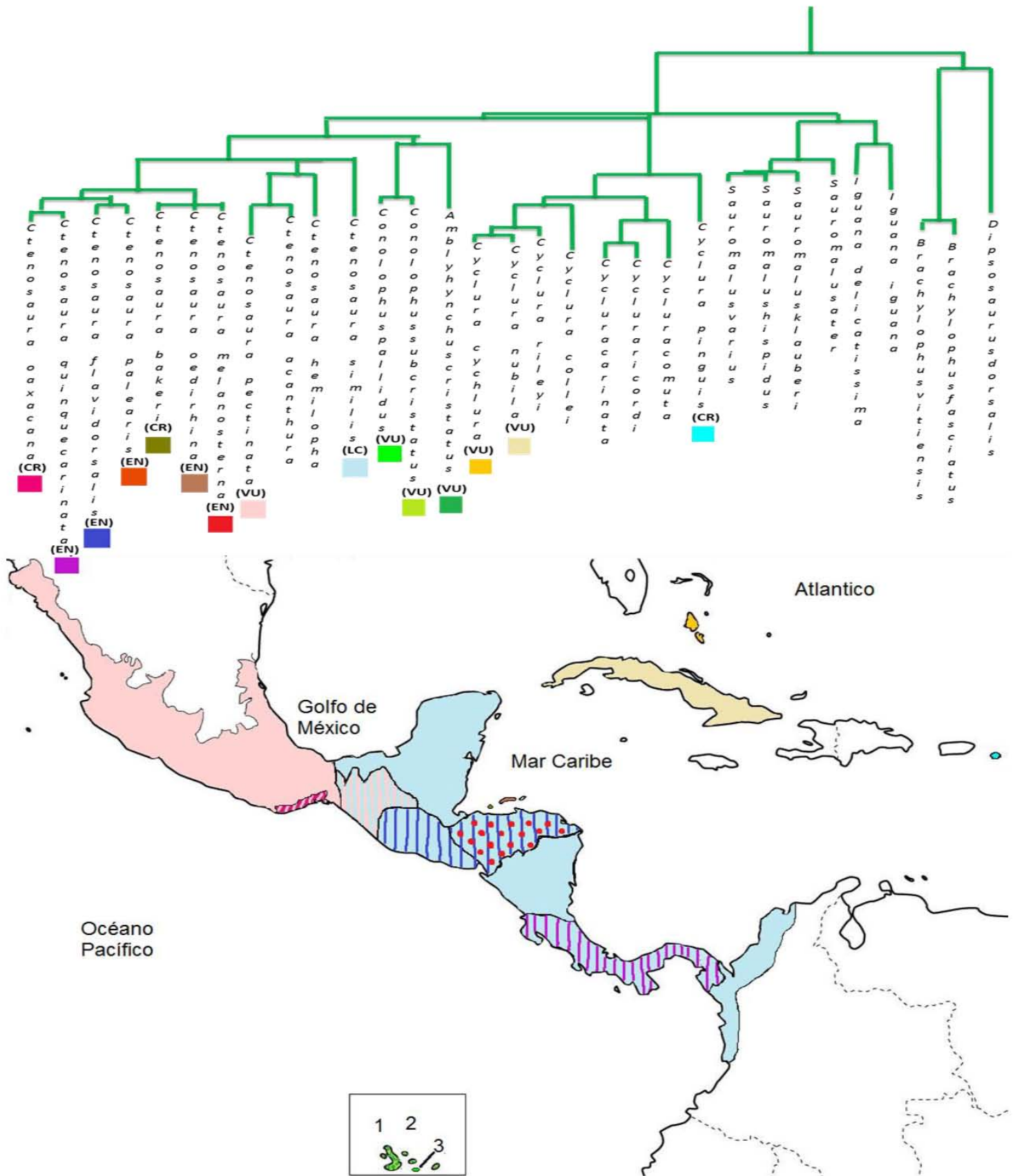


Figura 1. Filogenia de la familia Iguanidae (Pyron *et al.*, 2013) y distribución geográfica de las especies de iguanas mencionadas en los antecedentes, debajo de esas especies se muestra el estado de conservación según la UICN. CR (crítico), (EN) (En peligro), VU (Vulnerable), LC (Preocupación menor).

capaces de asignar individuos de forma fiable a su isla de origen, logrando discriminar entre los individuos residentes y migrantes entre islas.

Steinfartz *et al.* (2009) usaron los mismos marcadores para analizar la estructura genética de *Amblyrhynchus cristatus*. Muestran que las iguanas marinas ocupan tres clados generales. El primero que se encuentra ampliamente distribuido en todo el archipiélago norte; el segundo que se encuentra sobre todo en las islas orientales y centrales de mayor edad; y el tercero que se limita a las islas más jóvenes del norte y del oeste.

Las iguanas terrestres de las islas Galápagos también se han visto afectadas por las actividades antropogénicas. En el 2008, Tzika, utilizó nueve microsatélites específicos para el género *Conolophus* en 703 iguanas del mismo género. Las muestras se obtuvieron de las islas de Isabela + Fernandina, Baltra, Santa Cruz, Plaza Sur, Seymour Norte y Santa Fe, que son las seis islas donde actualmente se distribuye la especie. Con este análisis se caracterizó la diversidad genética dentro de las poblaciones y los niveles de diferenciación genética entre poblaciones. Determinaron que cinco poblaciones de iguanas representan unidades de conservación distintas y que algunos individuos procedentes de Seymour Norte, supuestamente originados a partir de la población natural de Baltra, están relacionados con las poblaciones de Isabela y Santa Cruz. Además, encontraron cinco grupos con diferentes niveles de diversidad genética intrapoblacional de las que Plaza Sur y Santa Fe tienen una diversidad particularmente baja.

En el género *Cyclura*, que se distribuye en varias islas a lo largo del Caribe, han aumentado los estudios genéticos ya que la mayoría de sus especies se

encuentran en un grave peligro de extinción. An *et al.* (2003) caracterizaron 20 marcadores microsatélites de ADN nuclear en las tres subespecies *Cyclura nubila*, (*C. n. caymanensis*, *C. n. lewisi* y *C. n. nubila*). Al analizar los marcadores en conjunto para las tres subespecies, dos de los marcadores se mostraron fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg, pero para el análisis de cada subespecie todos los marcadores presentaban un equilibrio dentro de Hardy-Weinberg.

También Lau *et al.* (2009) aislaron y caracterizaron 23 marcadores microsatélites polimórficos para *Cyclura pinguis*, una especie endémica catalogada en peligro crítico de la isla de Anegada, en las Islas Vírgenes Británicas. Mitchell *et al.* (2011) usaron estos marcadores para analizar la relación de parentesco de los individuos de *C. pinguis* criados en cautiverio en el Instituto Zoológico de San Diego para la Conservación, y los compararon con 33 individuos adultos de la isla de Anegada. Determinaron que existen tres pares de individuos estrechamente relacionados entre los seis fundadores cautivos, pero cada par no está estrechamente relacionado con los otros dos pares.

Knapp y Malone (2003) hicieron un análisis de microsatélites para determinar el éxito reproductivo y la estructura genética de una colonia trasladada de la iguana de las Bahamas (*Cyclura cychlura inornata*) después de 10 años de introducción. Sus datos indicaron que las posibles contribuciones de los padres son iguales para los machos fundadores y para los machos subsecuentes. Aun cuando tienen un nivel de variación genética bajo, no parece tener efectos negativos a corto plazo sobre las poblaciones trasladadas y hace a estos individuos excelentes candidatos para programas de translocación y repatriación.

Para el género *Ctenosaura* son pocos los estudios sobre variabilidad genética, y la mayoría de ellos se hicieron para *C. pectinata*. Zarza *et al.* (2008), utilizando datos de secuencias mitocondriales y nucleares, de *C. pectinata*, y especies relacionadas, demostraron la existencia de linajes crípticos con fuerte divergencia mitocondrial (> 4%) entre ellos. La estimación de divergencia sugiere que *C. pectinata* se originó durante el Plioceno, y que los primeros linajes de mtDNA comenzaron a divergir geográficamente durante el Plioceno con subsecuentes divergencias durante el Pleistoceno. Las poblaciones más ancestrales de *C. pectinata* son las que habitan en el norte y sur de las regiones costeras de México, mientras que las más nuevas se encuentran tierra adentro como resultado de procesos de extinción y recolonización. Zarza *et al.* (2009), aislaron y caracterizaron 10 loci microsatélites polimórficos para iguana negra (*C. pectinata*). Probaron que siete de estos marcadores amplificaban en loci polimórficos para *C. similis* y tres para *C. oaxacana* (Cuadro 1). Esto facilitó futuros estudios sobre la composición genética de estas iguanas, principalmente de *C. pectinata*.

Zarza *et al.* (2011) usando marcadores mitocondriales y los microsatelitales desarrollados por Zarza *et al.* (2009) ponen a prueba la concordancia geográfica en la estructuración de líneas maternas con respecto a la estructuración genética en todo el genoma nuclear de *C. pectinata*, para los estados de Nayarit, Jalisco, Colima y Michoacán. Encontraron que si bien hay estructura y zona de contacto para ambos tipos de marcadores, estas no son geográficamente concordantes. Existen cuatro líneas maternas en el área, mientras que se producen sólo dos grupos nucleares. No hay barreras geográficas, ambientales o ecológicas

evidentes, que den razón a estas subdivisiones genéticas, por lo que la estructura mtADN puede ser el resultado de los cambios climáticos del pasado, y la estructuración genética nuclear es consistente con el efecto de homogeneización de la dispersión de machos.

Cuadro 1. Secuencias de los primers, repeticiones de motivos y tamaño en número de pares de bases (pb). Los marcadores fluorescentes se indican como [H] (5HEX), [F] (6FAM).

| Locus | Secuencia del Primer | Repeticiones (motivo) | Amplificado <i>Ctenosaura</i> (pb) | Amplificado <i>C. oaxacana</i> (pb) |
|---------------------|--|---|------------------------------------|-------------------------------------|
| Pec01 FEU878555R | F: [H]GGGTCTGTGAAGTAGATGC R: GCAGTATATCCCCTCAAAGAC | (AC) ₁₂ | 93 - 101 | - |
| Pec03 EU878556 | F: [H]CCAGAGCAAATTCACAGATC R: GGTCAGATGTAGTCCAGCATAG | (CACG) ₄ + (AC) ₅ | 219–221 | 268 |
| Pec16 EU878557 | F: [H]GGCCTGGTAAAAATACTTCAG R: GTTTCGGGAAAAAGATTGTTGTG | (AC) ₁₈ | 214 - 239 | 226 |
| Pec20 EU878558 | F: [F]CTGGACAAAACCTCTCACTCATC R: GTTTCGGCACAAACACTACAGATC | (AC) ₁₀ | 226 - 228 | - |
| Pec25 EU878561 | F: [H]GGCTGTATATGTGATGAGAG R: CTGTGTTTGTGGGTATTG | (AC) ₁₁ | 186 - 194 | 190 - 203 |
| Pec89 EU878563 | F: [F]TCTTCCCTGACTTCCATTC R: GCTGACTGCCATCTGTAAG | (AC) ₁₂ AT(AC) ₄ | 246 - 254 | 243 - 247 |
| PecTN1 EU878564 | F: [F]ATGGGTGACTGTAATGCC R: GTTCCCTTTACGAAGATCC | (CA) ₂ (CG) ₄ (CA) ₇ + (CAG) ₅ A(TGA) ₅ | 219 - 221 | - |

Faria *et al.* (2010) usaron los marcadores determinados por Zarza *et al.* (2009) y registraron que en la población de *C. pectinata* en Nizanda, Oaxaca, solo el 11% de las hembras de la muestra tienen camadas con varios machos. Afirman que las hembras son en su mayoría monógamas, en contraste con otras especies de iguanas que presentan altos niveles de paternidad. Además encontraron que existe una alta presión de caza, por lo que se tienen implicaciones directas en la pérdida de la variación y diversidad genética en la población.

Pasachnik *et al.* (2009) determinaron que existe hibridación entre la iguana endémica de Honduras *C. bakeri* y *C. similis*, lo que pudiera afectar a la diferenciación genética de la primera, pero como la hibridación se encuentra en

niveles muy bajos no representan una amenaza para *C. bakeri*. Posteriormente Pasachnik *et al.* (2010) mediante el uso de un árbol de genes multilocus, elucidaron las relaciones entre el clado *C. palearis*, que incluye *C. palearis*, *C. melanosterna*, *C. bakeri* y *C. oedirthis*, utilizando a *C. similis* como grupo externo. Encontraron que las especies pasaron por una reciente y rápida especiación, dando como resultado cuatro especies endémicas altamente relacionadas. Asimismo, utilizando AFLPs y datos de secuencias de DNA, Pasachnik (2010) estudió las relaciones entre poblaciones de *C. melanosterna* que habitan en Honduras. Encontró que las poblaciones continentales e insulares estudiadas no compartieron ningún genotipo, indicando una separación evolutiva entre ellas, por lo que cada zona debe ser conservada de manera independiente.

Los estudios genéticos hechos con *C. oaxacana* o especies muy cercanas son muy escasos. Hasbún (2001) utilizó genes mitocondriales del citocromo b y de la NADH4 para elucidar relaciones filogenéticas entre los iguánidos, además de describir la diversidad de *Ctenosaura quinquecarinata*. Subsecuentemente Hasbún *et al.* (2005) usaron secuencias de DNA mitocondrial para investigar la diversidad genética y biogeográfica de los lagartos de cola espinosa mesoamericanos amenazados del complejo *Ctenosaura quinquecarinata*. Encontraron tres linajes monofiléticos alopátricos uno al norte que corresponde a México (*Ctenosaura oaxacana*); el segundo en el centro que corresponde a Guatemala, El Salvador y Honduras (*Ctenosaura flavidorsalis*); y el tercero al sur en lo que son Nicaragua y Costa Rica (*Ctenosaura quinquecarinata*). La secuencia de divergencia promedio observada entre linajes varió entre el 2% y el 3.7%, indicando que la divergencia entre las especies del complejo fue muy reciente.

Santos (2012) usando también los marcadores determinados por Zarza *et al.* (2009) describió la variabilidad genética intrapoblacional de tres especies del género *Ctenosaura* (*C. pectinata*, *C. similis* y *C. oaxacana*) presentes en la localidad de Montecillo Santa Cruz, Oaxaca, en la región del Istmo de Tehuantepec, con cinco marcadores microsatélites. Encontró que el uso para consumo humano de estas iguanas en la localidad de Motecillo Santa Cruz no afecta su variación genética. Este es el único estudio previo que trata sobre la diversidad genética de *C. oaxacana*.

2.2 Especie de estudio

La iguana Nguio *Cteosaura oaxacana* (Figura 2) es una especie endémica de México, separada de *Ctenosaura quinquecarinata* por Köhler y Hasbun (2001). *C. oaxacana* se distribuye en la vertiente pacífica del istmo de Tehuantepec en el estado de Oaxaca y habita en tierras de selva baja caducifolia en altitudes que van de los 0 a 250 m snm (Köhler y Hasbún, 2001).

Su conducta es principalmente arbórea y cuando se siente amenazada se esconde en huecos de árboles ubicados por lo general a una altura de 2 m por encima del suelo (Köhler y Hasbun, 2001). Es muy posible que *C. oaxacana* no sea especialista en el tipo de árbol que ocupa como hábitat, ya que se le puede encontrar en una gran diversidad de especies arbóreas. La única constante parece ser que requiere las oquedades de los árboles para vivir (Díaz, 2014).

La coloración en individuos adultos puede variar. Las bandas transversales laterales oscuras del tronco pueden terminar lateralmente o migrar a la parte ventral, y pueden variar en número, de cuatro a seis. Estas bandas pueden ser

completas, fragmentadas, bien definidas o apenas visibles. Las bandas caudales también pueden variar de bien definidas y completas a fragmentadas, difusas o ausentes. La división de color, entre la parte dorsal y la parte clara ventral en el cuello puede ser muy marcada o de manera difusa (Köhler y Hasbun, 2001).



Figura 2. Iguana Nguio (*Ctenosaura oaxacana*).

Presentan dimorfismo sexual. Los adultos machos comúnmente exhiben un patrón de coloración más contrastante que las hembras, la cresta dorsal media es más pronunciada y el tamaño del cuerpo es mayor en machos (Köhler y Hasbun, 2001). La época de reproducción se limita a la temporada seca, entre noviembre y mayo, la puesta de huevos se produce durante los dos primeros meses del año y las primeras crías se observaron en abril y mayo (Köhler y Hasbun, 2001).

Cada nidada tiene un promedio de 5.6 huevos (d.s. \pm 1.75), tardando aproximadamente 92 días en eclosionar (Díaz, 2014). La talla mínima al eclosionar

es de 5.4 cm (d.s. \pm 2.30) y la talla máxima de 17.50 cm (d.s. \pm 2.30), durante sus primeros tres años de vida presenta un rápido crecimiento, después de este tiempo el crecimiento es más lento (Díaz, 2014). La talla máxima en adultos machos es de 17 cm y de las hembras es de 12.4 cm (Köhler y Hasbun, 2001), pero pueden alcanzar la madurez sexual a los 11.2 cm, con aproximadamente 1.5 años de edad (Díaz, 2014).

Se estima que su densidad poblacional es más alta que las de otras iguanas, según Rioja *et al.* (2012) es de 33.75 ind/ha en San Francisco del Mar, mientras que Díaz (2014) la estima de 21.43 ind/ha en Nizanda.

Al mostrar preferencia por el hábitat de selva baja caducifolia, se cree que su distribución se limita a menos de 100 km² con seis a diez subpoblaciones sobrevivientes altamente aisladas debido a la deforestación, la quema de hábitat frecuente, y la caza furtiva (Rioja *et al.*, 2012). Actualmente está catalogada como especie Amenazada de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2010 y en Amenaza Crítica según la IUCN (2014).

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivos generales

Determinar el efecto que tiene el tamaño del fragmento de hábitat en la diversidad genética de *Ctenosaura oaxacana*.

3.2 Objetivos particulares

Comparar con el uso de marcadores microsatelitales la diversidad, estructura y flujo genético de *C. oaxacana* en dos localidades, una de bosque continuo (Nizanda) y un fragmento de bosque reducido (Paja Blanca).

IV. JUSTIFICACIÓN

La pérdida y fragmentación del hábitat está considerada como una de las causas principales de la actual crisis de biodiversidad (Santos y Tellería, 2006). En los últimos 20 años, el estudio de los efectos biológicos de la fragmentación de hábitats ha sido un tema de interés creciente en la investigación ecológica (García, 2011). Entre las especies de reptiles con mayor amenaza de extinción está *C. oaxacana*, especie endémica de México (IUCN, 2014; Semarnat, 2010).

Este trabajo pretende evaluar el efecto de la fragmentación del hábitat en la diversidad genética de *C. oaxacana* comparando en un bosque continuo y un área fragmentada, de tal forma que se aporte información nueva que permita crear mejores estrategias de conservación.

V. HIPÓTESIS

- La fragmentación del hábitat tendrá un efecto fuerte en la variación y estructura genética de la iguana Nguio (*Ctenosaura oaxacana*), debido a la baja movilidad, hábitos arbóreos y alta selectividad de microhábitat.

VI. PREDICCIONES

- La población del bosque continuo presenta una variabilidad genética alta y se encuentre en equilibrio Hardy-Weinberg.
- La población del bosque fragmentado presenta endogamia, menor número de heterocigos, menor variación genética y poca o nula estructuración genética.
- Por la distancia existente entre las dos localidades esperamos que sean dos poblaciones genéticas diferentes, cada una con sus propios alelos.

VII. MÉTODO

7.1 Localidades de estudio

La localidad Nizanda con aproximadamente 10,132.32 hectáreas ($16^{\circ}39'06.01''\text{N}$ $95^{\circ}00'31.82''\text{W}$; $16^{\circ}38'54.94''\text{N}$ $95^{\circ}00'34.27''\text{W}$; $16^{\circ}39'05.65''\text{N}$ $95^{\circ}00'00.87''\text{W}$; $16^{\circ}38'53.82''\text{N}$ $95^{\circ}00'02.50''\text{W}$) (Díaz, 2015), en el municipio de Asunción Ixtaltepec en el distrito de Juchitán del estado de Oaxaca (Figura 2). Presenta una vegetación de tipo selva baja caducifolia. Su clima es de tipo cálido subhúmedo con lluvias en verano (Aw) (INEGI, 2012).

La localidad de Paja Blanca ($15^{\circ}56'23.94''\text{N}$ $95^{\circ}45'27.80''\text{W}$; $15^{\circ}54'51.59''\text{N}$ $95^{\circ}43'49.91''\text{W}$), en el municipio de San Pedro Huamelula en el distrito de Tehuantepec del estado de Oaxaca (Figura 2). Presenta una vegetación fragmentada de tipo selva baja caducifolia. Su clima es de tipo cálido subhúmedo con lluvias en verano (Aw) (INEGI, 2012).



Figura 3. Mapa de zonas de colecta de *Ctenosaura oaxacana*. Las zonas rojas indican los municipios donde se encuentran las localidades.

7.2 Obtención de muestras

Se colectaron 37 muestras de tejido en la localidad de Nizanda, tres fueron colectadas durante el 2011, otras 15 fueron colectadas en octubre de 2013, y se completaron con 19 colectadas la primera semana de febrero de 2014. En Paja Blanca se colectaron 28 muestras de tejido en abril de 2014. Cada muestra se almacenó en un tubo eppendorf de 1.5 ml con etanol al 96% para conservar el DNA.

7.3 Extracción de DNA

Se utilizó el protocolo de extracción de ADN de Sunnucks y Hales (1996) y Aljanabi y Martínez (1997) modificado, para realizar las extracciones de tejido requeridas en este trabajo.

En tubos nuevos rotulados, se agregaron 500 μ l de buffer TEN + SDS 2%. (Apéndice I). Se tomaron aproximadamente 3 mm³ de muestra de tejido y se agregó a los tubos nuevos con buffer. Se añadieron 10 μ l de proteinasa K [20mg/ml] a cada tubo. Se dejó incubando durante dos días en bloque de calor a 56 °C, agregando al segundo día 10 μ l más de proteinasa K [20mg/ml]. Esto solo se realizó con las muestras que tenían un año o más de almacenamiento, para las muestras recientes se dejó incubando solo una noche con 10 μ l de proteinasa K [20mg/ml].

Para el tercer día se añadieron 100 μ l de NaCl 5 M. Se vortexearon durante 30 seg, para posteriormente centrifugar durante 7 min 30 seg a 14,000 rpm a 4 °C. Se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos rotulados. Se agregaron 800 μ l de

etanol al 100% a -20 °C, y se invirtieron los tubos suavemente de 4 a 7 veces, dejándose toda la noche a -20 °C.

El cuarto día se centrifugaron los tubos durante 20 min 30 seg a 14,000 rpm a 4 °C. Posteriormente se decantó el exceso de alcohol en un vaso de precipitado, cuidando de no tirar el pellet. Se añadieron 800 µl de etanol 70% a -20 °C. Se centrifugó durante 7 min 30 seg a 14,000 rpm a 4 °C; nuevamente se decantó el exceso de alcohol, y por último se secaron las muestras con ayuda de la vacuofaga durante 30 min a 45 °C.

Una vez secas las muestras se añadieron 50 µl de agua inyectable y se dejaron a -20 °C para uso posterior.

7.4 Visualización del DNA

Para determinar la presencia e integridad del DNA extraído, se tiñó 1µl de muestra con 3µl de buffer de carga, y se visualizó por electroforesis con gel de agarosa al 1% P/V en buffer TAE 1 X. Se corrió en una cámara de electroforesis con la fuente de poder a 100 volts durante 40 min. Una vez terminó de correr el gel, se fotodocumentó con la ayuda de un transiluminador con luz UV acoplado a una cámara digital con la ayuda del software Kodak 1d3.6.

Para saber de forma cuantitativa la concentración y pureza del DNA se cuantificó mediante el NanoDrop 2000.

7.5 Amplificación de microsatélites

Se utilizaron siete marcadores microsatelitales (Zarza *et al.*, 2009), los cuales se amplificaron con la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para la síntesis de DNA se utilizaron primers marcados con fluorescencia (Cuadro 2).

Las condiciones para cada reacción de la PCR fueron 9.6 µl de agua bidestilada, 1.5 µl Buffer 10X, 0.9 µl MgCl₂ 50 mM, 0.6 µl de primer F, 0.6 µl de primer R, 0.6 µl de DNTps, 0.2 µl de Taq polimerasa y 0.1 µl de muestra de DNA, para un volumen final de 15 µl.

Para determinar las temperaturas óptimas se realizó un gradiente para cada juego de primers (Cuadro 2). El programa utilizado para PCR de cada marcador, se puede consultar en el Apéndice II.

Cuadro 2. Fluorescencia que marca a cada uno de los loci, motivos de repetición que los forman, temperaturas de los gradientes (Tg) y temperatura de amplificación (Ta).

| Locus | Fluorescencia | Motivos de repetición | Tg (°C) | Ta (°C) |
|----------------------|---------------|---------------------------------|---------|---------|
| Pec01F EU878555R | 5HEX | (AC)12 | 46 - 62 | 49 |
| Pec03F EU878556R | 5HEX | (CACG)4 + (AC)5 | 55 - 65 | 59 |
| Pec16F EU878557R | 5HEX | (AC)18 | 46 - 62 | 49 |
| Pec20F EU878558R | 6FAM | (AC)10 | 46 - 62 | 49 |
| Pec25F EU878561R | 5HEX | (AC)11 | 50 - 60 | 52 |
| Pec89F EU878563R | 6FAM | (AC)12AT(AC)4 | 50 - 60 | 59 |
| PecTN1F EU878564R | 6FAM | (CA)2(CG)4(CA)7 + (CAG)5A(TGA)5 | 50 - 60 | 59 |

7.6. Análisis de datos

Los pesos moleculares de las amplificaciones se obtuvieron por lectura de fluorescencia en el secuenciador y los cromatogramas se visualizaron con el programa GeneMapper 4.0. Los alelos resultantes fueron codificados en una

matriz en Excel 2010, y convertida a distintos formatos con el programa GenAIEx6 (Peakall y Smouse, 2006).

7.6.1 Equilibrio Hardy-Weinberg

El equilibrio Hardy-Weinberg es un modelo en el que si tenemos una población de tamaño infinito, en donde no hay factores que puedan cambiar las frecuencias alélicas como selección, deriva genética, mutación y flujo genético, y que los apareamientos son al azar, las proporciones genotípicas no cambiarán en el tiempo (Hedrick, 2011). El equilibrio Hardy-Weinberg describe el genotipo de los organismos diploides en términos de frecuencias alélicas, basándose en el modelo de segregación mendeliana. Las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg se obtuvieron con el programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier y Lischer, 2011), que para detectar desviaciones significativas del equilibrio Hardy-Weinberg utiliza una prueba análoga a la prueba exacta de Fisher, usando una versión modificada del algoritmo de paseo aleatorio de la Cadena de Markov descrito Guo y Thompson (1992). Para saber que la diferencia en la heterocigosis observada entre Nizanda y Paja Blanca no se debe a las diferencias de los tamaños de muestra se hizo un análisis de rarefacción (Kalinowski, 2004).

7.6.2. Alelos nulos

Un alelo nulo es cualquier alelo en un locus de microsatélites que falla constantemente para amplificar a los niveles detectados a través del PCR (Dakin y Avise, 2004). Los alelos nulos pueden distorsionar los resultados reales, ya que estos disminuyen la heterocigosis aparente en una muestra, interfiriendo así con

los esfuerzos para medir la diversidad genética en las poblaciones y la estructura poblacional (Kalinowsk y Taper, 2006). Para saber si existía la posibilidad de presentar alelos nulos se empleó el programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004). Este programa indica la presencia de alelos nulos. El programa indica que una población podría no ser panmíctica cuando en la prueba de probabilidad combinada muestra que hay un exceso significativo de todos los homocigotos, y estos se distribuyen uniformemente a través de las clases homocigotos, o si todos los loci muestran un exceso de homocigotos. El programa calcula la frecuencia del alelo nulo (r), utilizando los métodos descritos por Chakraborty *et al.* (1992) y Brookfield (1996).

7.6.3 Estructuración genética

Una población puede presentar diferencias en la variación genética entre sus subpoblaciones dándole una estructura genética (Hedrick, 2011). Existen varios métodos para estimar la cantidad de diferenciación en las subdivisiones de una población. El más utilizado son los estadísticos F, que son parámetros que describen el grado de diferenciación genética y dan la probabilidad de que dos alelos en diferentes poblaciones sean idénticos por estado (Hardy *et al.*, 2003). Este modelo no es muy adecuado para los microsatélites, ya que presentan una tasa de mutación alta (Bruford y Wayne, 1993; Ellegren, 2004); para ellos se desarrollaron los estadísticos R, que se basan en el modelo de mutación paso a paso (SMM), y son análogos a los estadísticos F (Hardy *et al.*, 2003). Para obtener los estadísticos F y R se usó el programa Genepop 4.2 (Rousset, 2013) el cual los

estima mediante un análisis ponderado de varianza descrito por Weir y Cockerham (1984).

Para definir que individuos constituyen una población, se usó el programa Structure 2.3 (Pritchard *et al.*, 2010) el cual asigna probabilísticamente a los individuos con base en sus genotipos multilocus de uno a K diferentes poblaciones. El método que usa es computacionalmente intensivo y por inferencia de Monte Carlo vía Cadenas Markov (MCMC). Se probó una K de 1 a 9, con 500,000 MCMC de iteración y 250,000 repeticiones. Para saber cuál era la K más probable se usó el programa Structure Harvester (Earl, D. A. y von Holdt, B.M. 2012)

7.6.4 Desequilibrio de ligamiento

Cuando los alelos de una población se recombinan bajo lo esperado por Hardy-Weinberg, se dice que los alelos se encuentran en un equilibrio de ligamiento. Pero, cuando la tasa de recombinación de alelos se reduce por la cercanía que existe entre un locus con respecto a otros, se dice que existe desequilibrio de ligamiento (Hedrick, 2011). Las pruebas de desequilibrio de ligamiento se hicieron con el programa ARLEQUÍN 3.5 (Excoffier y Lischer, 2011), que para los datos genotípicos con fase gamética desconocida utiliza una prueba de la razón de verosimilitud, cuya distribución empírica se obtiene por un procedimiento de permutación (Slatkin y Excoffier, 1996). Esta prueba asume que los genotipos se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg; el rechazo de la prueba podría ser debido a que la población no esté en equilibrio Hardy-Weinberg (Excoffier y Slatkin, 1998).

7.6.5 Cuello de Botella

Se conoce como cuello de botella al evento durante el cual sólo pocos individuos sobreviven y continúan con la existencia de la población (Hedrick, 2011). Esto puede causar que las siguientes generaciones tengan poca variación genética, y en casos extremos pueden encontrarse al borde de la extinción. Para saber si en estas localidades habría ocurrido un cuello de botella se usó el programa BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet y Luikart, 1996), que calcula para cada muestra de la población y para cada locus la distribución de la heterocigosis esperada desde el número observado de alelos (k), dado el tamaño de la muestra (n) bajo el supuesto de equilibrio mutación - deriva. Esta distribución se obtiene a través de la simulación del proceso de coalescencia de n genes bajo tres posibles modelos de mutación, el modelo de alelos infinitos (IAM), el modelo de mutación paso a paso (SMM) y el modelo de dos fases (TPM) que permite mutaciones de varios pasos. Se calcula la heterocigosis promedio y se compara con la heterocigosis observada para establecer si hay un exceso o déficit de heterocigotos en cada locus. La desviación estándar de la distribución del equilibrio mutación-deriva de la heterocigosis se usa para calcular la diferencia estandarizada para cada locus. La distribución obtenida de la simulación permite el cálculo de un valor P para la heterocigosis observada (Piry *et al.*, 1999).

VIII. RESULTADOS

8.1 Frecuencias alélicas y polimorfismo

El promedio de número de alelos fue distinto en cada localidad (Cuadro 3). Para Nizanda existe un promedio de alelos de 4.71, mientras que, Paja Blanca tiene un promedio de alelos de 2.71, casi la mitad que Nizanda. El locus *Pec 25* es el que presenta más variación en ambas localidades con ocho alelos para Nizanda y cinco para Paja Blanca. Los loci con menos variación son distintos para ambas localidades, para Nizanda *Pec 89* y *Pec TN1* son los menos variables con solo tres alelos y para Paja Blanca *Pec TN1* es monomórfico.

Cuadro 3. Número de alelos encontrado en cada marcador para cada localidad y su promedio alélico.

| Locus | Alelos | |
|----------------|---------|-------------|
| | Nizanda | Paja Blanca |
| <i>Pec 01</i> | 7 | 2 |
| <i>Pec 03</i> | 4 | 2 |
| <i>Pec 16</i> | 4 | 3 |
| <i>Pec 20</i> | 4 | 3 |
| <i>Pec 25</i> | 8 | 5 |
| <i>Pec 89</i> | 3 | 3 |
| <i>Pec TN1</i> | 3 | 1 |
| Promedio | 4.71 | 2.71 |

En ambas localidades se presentan distintos alelos para cada locus y los alelos que se repiten lo hacen en distintas proporciones. Las frecuencias alélicas para todos los loci, además de los alelos propios y compartidos entre las dos localidades se muestran en la Figura 4.

Para Nizanda vemos que *Pec 01* es el segundo locus más variable con 7 alelos, pero en Paja Blanca es uno de los locus menos diversos con solo dos

alelos. Ambas localidades presentan alelos únicos, pero el alelo más frecuente es el alelo 90.

El locus *Pec 03* se tienen cuatro alelos distintos en Nizanda, el 217, 220 y 232 casi en las mismas proporciones, mientras que el 266 es muy raro. En Paja Blanca *Pec 03* solo presenta los alelos 266 y 270 en las mismas proporciones.

El locus *Pec 16* es representado por cuatro alelos en Nizanda, donde el más frecuente es el alelo 228, y los alelos 220 y 232 son los menos frecuentes pero exclusivos para la localidad. Paja Blanca presentó tres alelos, el 228 y 218, y el alelo 202 exclusivo para esta localidad.

Pec 20 tiene cuatro alelos para Nizanda, el más común es el 230 y los menos comunes son 232 y 220, los alelos 220 y 224 son exclusivos para la localidad. Paja Blanca solo hay tres alelos, 230 es el más común, 232 y 234 son muy raros, y este último es exclusivo para la localidad.

El locus *Pec 25* es el más diverso de todos los loci analizados y ninguno de los alelos se repite en las dos localidades, en Nizanda encontramos ocho alelos, de los cuales los más comunes son 186, 188 y 194. Paja Blanca tiene cinco alelos distintos, el más común es el 246.

En *Pec 89* se encontraron tres alelos distintos, el 252 y el 248 son únicos para Nizanda, siendo el 248 el más común. También Paja Blanca presenta tres alelos, el 230 y 234 son únicos para la localidad, y el 230 es el más frecuente.

Pec TN1 presenta tres alelos distintos en Nizanda del cual el más representativo es 202. En Paja Blanca *Pec TN1* es monomórfico con el alelo 202.

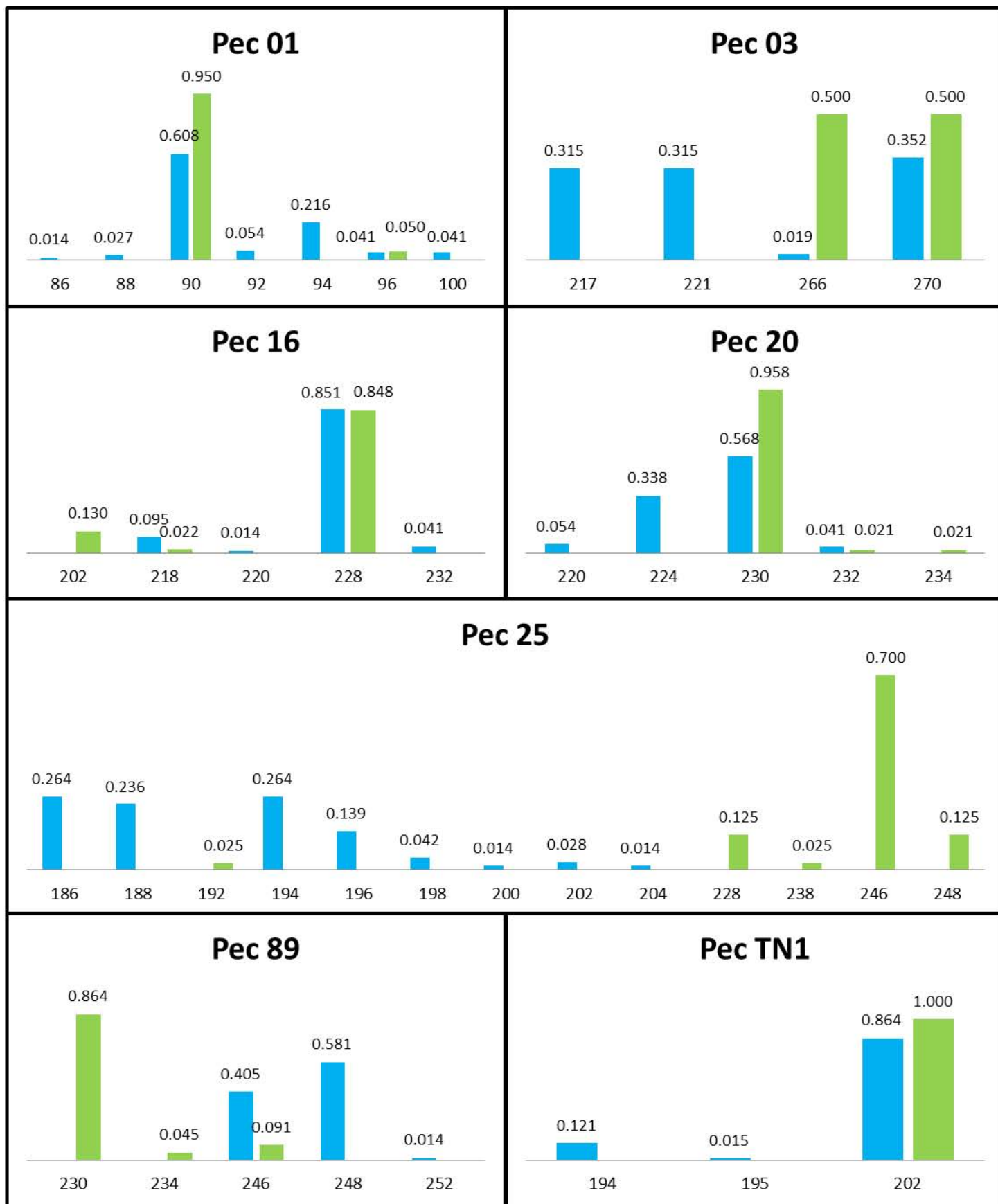


Figura 4. Frecuencias alélicas por localidad y por locus, se representa a Nizanda de color azul y a Paja Blanca de color verde, en el eje de las X están los alelos para cada marcador, y en el eje de las Y está el porcentaje de individuos que presentan ese alelo en cada población.

8.2 Alelos nulos

Sólo se encontró que podría haber alelos nulos para el locus *Pec 89* en Nizanda y el locus *Pec 25* en Paja Blanca. Aun cuando existen alelos nulos para cada población, estos locus son distintos en cada localidad. Esto indica que en realidad los alelos nulos podrían no ser en realidad nulos para la especie, y mas bien ser la variación alélica de los marcadores *Pec 89* y *Pec 25* ocasionada por la evolución independiente en cada población, posiblemente por efecto de la distancia geográfica y diferencias del tamaño de área entre localidades.

Aun así, es raro que todos los alelos de *Pec 25* sean tan distintos entre las dos localidades, y al salir positivo en las pruebas de alelos nulos, la variación de alelos puede ser causada por duplicaciones o deleciones en algunas regiones del DNA. Para así saber que tanto afecta *Pec 25* en la variación y estructura de las poblaciones, se hicieron las pruebas de los estadísticos F y R , desequilibrio de ligamiento, AMOVA y Structure, con y sin este marcador.

8.3 Heterocigosis y equilibrio de Hardy-Weinberg

Nizanda tiene cuatro de siete loci con una heterocigosis observada (H_O) distinta a la heterocigosis esperada (H_E) (Cuadro 4), pero el promedio de las H_O y H_E no muestra una diferencia significativa, lo que indica que la población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg. Para Paja Blanca dos de los siete loci muestran una H_O distinta a H_E , y uno de los loci (*Pec TN1*) es monomórfico (Cuadro 5). El promedio de las H_O y H_E tampoco muestra una diferencia significativa, indicando que también esta en equilibrio Hardy-Weinberg.

Cuadro 4. Heterocigosis observada y heterocigosis esperada para cada marcador en las dos localidades. (*) Valores con una diferencia significativa ($p < 0.05$).

| Locus | Nizanda | | Paja Blanca | |
|----------------|---------|--------|-------------|--------|
| | H_O | H_E | H_O | H_E |
| <i>Pec 01</i> | 0.621* | 0.584* | 0.100 | 0.097 |
| <i>Pec 03</i> | 0.666* | 0.69* | 0.578 | 0.513 |
| <i>Pec 16</i> | 0.297 | 0.268 | 0.304 | 0.269 |
| <i>Pec 20</i> | 0.729 | 0.566 | 0.083 | 0.082 |
| <i>Pec 25</i> | 0.888* | 0.793* | 0.150* | 0.489* |
| <i>Pec 89</i> | 0.162* | 0.504* | 0.090* | 0.255* |
| <i>Pec TN1</i> | 0.272 | 0.242 | - | - |
| Promedio | 0.519 | 0.521 | 0.217 | 0.244 |

El análisis de rarefacción (Figura 5), vemos que la diferencia en la heterocigosis observada entre Nizanda y Paja Blanca no se debe a las diferencias de los tamaños de muestra, sino que esa heterocigosis es intrínseca de cada población.

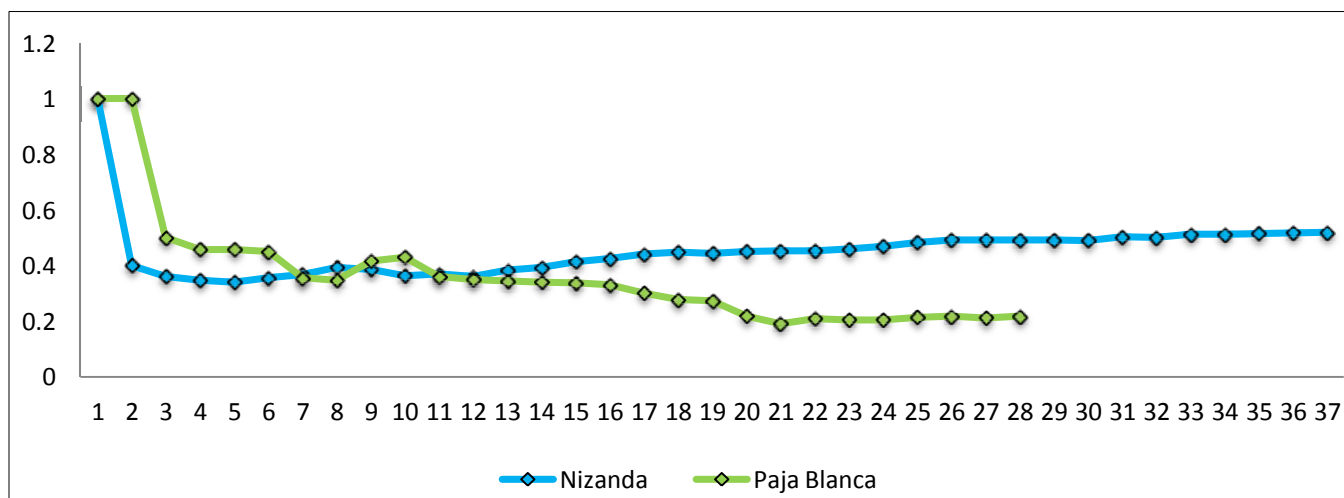


Figura 5. Grafica de análisis de rarefacción de cómo cambia la heterocigosis observada (H_O) conforme cambia el tamaño de la muestra.

Los estadísticos F tienen poca diferencia entre las pruebas usando siete marcadores y seis marcadores (Cuadro 5). Para la prueba con siete marcadores

obtuvimos un $F_{IT} = 0.308$, y para la prueba con seis marcadores el $F_{IT} = 0.276$, indicando en ambas pruebas que hay un déficit de heterocigotos en el total de la muestra. Los F_{ST} para la prueba con siete y seis marcadores fueron de 0.292 y 0.275 respectivamente; esto quiere decir que existe estructura genética entre las dos poblaciones. El F_{IS} obtenido para los siete marcadores fue de 0.022 y para seis marcadores fue de 0.0006, por lo que podemos inferir que las localidades se encuentran en un equilibrio Hardy-Weinberg.

Cuadro 5. Estadísticos F obtenidos con el programa Genpop. Del lado izquierdo están los resultados obtenidos con los siete marcadores, del lado derecho están los resultados obtenidos al sacar a Pec25. (*) Valores con una diferencia significativa ($p < 0.05$).

| Locus | Siete marcadores | | | Seis marcadores | | |
|----------------|------------------|----------|----------|-----------------|----------|----------|
| | F_{IS} | F_{ST} | F_{IT} | F_{IS} | F_{ST} | F_{IT} |
| <i>Pec 01</i> | - 0.058 | 0.156* | 0.107 | - 0.058 | 0.156* | 0.107 |
| <i>Pec 03</i> | - 0.021 | 0.256* | 0.240 | - 0.021 | 0.256* | 0.240 |
| <i>Pec 16</i> | - 0.119 | 0.028 | - 0.085 | - 0.119 | 0.028* | - 0.086 |
| <i>Pec 20</i> | - 0.266 | 0.258* | - 0.060 | - 0.266 | 0.258* | 0.060 |
| <i>Pec 25</i> | 0.090 | 0.340* | 0.400* | - | - | - |
| <i>Pec 89</i> | 0.679* | 0.555* | 0.857* | 0.679* | 0.555* | 0.857* |
| <i>Pec TN1</i> | - 0.122 | 0.093* | - 0.017 | - 0.122 | 0.093* | - 0.017 |
| Total | 0.022 | 0.292* | 0.308* | 0.0006 | 0.275* | 0.276* |

Los estadísticos R tienen valores muy distintos entre la prueba con seis y con siete marcadores (Cuadro 6). Para la prueba con siete marcadores se obtuvo que $R_{IS} = 0.725$, $R_{ST} = 0.801$ y $R_{IT} = 0.945$, indicando que hay mucha endogamia en las poblaciones, que existe una estructura genética entre ambas poblaciones y un déficit de individuos heterocigotos en toda la muestra. En cambio, la prueba con seis marcadores resultó que $R_{IS} = 0.192$, $R_{ST} = 0.422$ y $R_{IT} = 0.533$, indicando de igual manera que hay endogamia en las poblaciones, una estructuración

genética y déficit de heterocigotos, pero todo en mucho menor grado que en la prueba con siete marcadores.

Cuadro 6. Estadísticos R obtenidos con el programa Genpop. Del lado izquierdo están los resultados obtenidos con los siete marcadores, del lado derecho están los resultados obtenidos al sacar a Pec25. (*) Valores con una diferencia significativa ($p < 0.05$).

| Locus | Siete marcadores | | | Seis marcadores | | |
|----------------|------------------|----------|----------|-----------------|----------|----------|
| | R_{IS} | R_{ST} | R_{IT} | R_{IS} | R_{ST} | R_{IT} |
| <i>Pec 01</i> | 0.128 | 0.102* | 0.218 | 0.120 | 0.105 | 0.213 |
| <i>Pec 03</i> | 0.986* | 0.540* | 0.993* | 0.704* | 0.342* | 0.805* |
| <i>Pec 16</i> | - 0.136 | 0.079* | - 0.046 | - 0.117 | 0.038 | - 0.074 |
| <i>Pec 20</i> | - 0.372 | 0.315* | 0.060 | - 0.267 | 0.257* | 0.059 |
| <i>Pec 25</i> | 0.083 | 0.961* | 0.964* | - | - | - |
| <i>Pec 89</i> | 0.877* | 0.952* | 0.994* | 0.648* | 0.904* | 0.966* |
| <i>Pec TN1</i> | - 0.140 | 0.106* | - 0.019 | - 0.135 | 0.102* | - 0.018 |
| Total | 0.725* | 0.801* | 0.945* | 0.192* | 0.422* | 0.533* |

8.4 Análisis de varianza molecular (AMOVA)

Se realizaron dos análisis de AMOVA uno para F_{ST} y otro con R_{ST} , ambos para las pruebas con siete y seis marcadores (Cuadro 7). En los análisis para F_{ST} se observó que en las pruebas con siete marcadores la mayoría de la variación está dentro de los individuos ($F_{IT} = 64.10\%$), seguida por la variación entre las poblaciones ($F_{ST} = 31.61\%$), y por último entre los individuos ($F_{IS} = 4.28\%$). Por el contrario, para las pruebas con seis marcadores la mayoría de la variación también está dentro de los individuos ($F_{IT} = 65.41\%$), seguida por la variación entre los individuos ($F_{IS} = 30.82\%$), y por último la variación entre las poblaciones ($F_{ST} = 3.75\%$).

En los análisis con R_{ST} para siete marcadores se observó que la mayor diversidad se encuentra entre las poblaciones ($R_{ST} = 79.42\%$), seguida por la diversidad entre individuos ($R_{IS} = 15.68\%$), y por último la variación dentro de los

individuos ($R_{IT} = 4.88\%$). Al igual que en los F_{ST} , para las pruebas con seis marcadores los resultados fueron distintos y la mayor diversidad se encontró entre los individuos ($R_{IS} = 56.79\%$), seguida por la diversidad entre las poblaciones ($R_{ST} = 79.42\%$), y por último la diversidad dentro de los individuos ($R_{IT} = 6.67\%$).

Cuadro 7. Análisis de varianza molecular (AMOVA) hecho para siete y seis marcadores, para estadísticos F y R.

| F_{ST} | | | | | | |
|--------------------------|-------------------------|--------------|------|-------------------------|--------------|------|
| Fuente de variación | Siete marcadores | | | Seis marcadores | | |
| | Porcentaje de Variación | Coeficientes | | Porcentaje de Variación | Coeficientes | |
| Entre Poblaciones | 31.61 | F_{ST} | 0.31 | 3.75 | F_{ST} | 0.3 |
| Entre Individuos | 4.28 | F_{IS} | 0.06 | 30.82 | F_{IS} | 0.05 |
| Dentro de los Individuos | 64.10 | F_{IT} | 0.35 | 65.41 | F_{IT} | 0.34 |

| R_{ST} | | | | | | |
|--------------------------|-------------------------|--------------|------|-------------------------|--------------|------|
| Fuente de variación | Siete marcadores | | | Seis marcadores | | |
| | Porcentaje de Variación | Coeficientes | | Porcentaje de Variación | Coeficientes | |
| Entre Poblaciones | 79.42 | R_{ST} | 0.79 | 36.53 | R_{ST} | 0.56 |
| Entre Individuos | 15.68 | R_{IS} | 0.76 | 56.79 | R_{IS} | 0.84 |
| Dentro de los Individuos | 4.88 | R_{IT} | 0.95 | 6.67 | R_{IT} | 0.93 |

8.5 Desequilibrio de ligamiento

Para el análisis con los siete marcadores se encontró desequilibrio de ligamiento en ambas localidades. En Nizanda todos los loci presentan desequilibrio de ligamiento en al menos uno de sus locus (Cuadro 8). *Pec 89* muestra desequilibrio de ligamiento con todos los demás loci. Paja Blanca solo presenta desequilibrio de ligamiento en *Pec 03*, *Pec 20*, *Pec 25* y *Pec 89* (Cuadro 9).

Cuadro 8. Desequilibrio de ligamiento encontrado en la localidad de Nizanda.

| Nizanda | | | | | | | |
|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Locus | <i>Pec 01</i> | <i>Pec 03</i> | <i>Pec 16</i> | <i>Pec 20</i> | <i>Pec 25</i> | <i>Pec 89</i> | <i>Pec TN1</i> |
| <i>Pec 01</i> | * | + | - | - | - | + | - |
| <i>Pec 03</i> | + | * | - | + | + | + | + |
| <i>Pec 16</i> | - | - | * | - | + | - | - |
| <i>Pec 20</i> | - | + | - | * | + | + | - |
| <i>Pec 25</i> | - | + | + | + | * | + | + |
| <i>Pec 89</i> | + | + | - | + | + | * | + |
| <i>Pec TN1</i> | - | + | - | - | + | + | * |

Cuadro 9. Desequilibrio de ligamiento encontrado en la localidad de Paja Blanca.

| Paja Blanca | | | | | | | |
|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Locus | <i>Pec 01</i> | <i>Pec 03</i> | <i>Pec 16</i> | <i>Pec 20</i> | <i>Pec 25</i> | <i>Pec 89</i> | <i>Pec TN1</i> |
| <i>Pec 01</i> | * | - | - | - | - | - | - |
| <i>Pec 03</i> | - | * | - | + | + | - | - |
| <i>Pec 16</i> | - | - | * | - | - | - | - |
| <i>Pec 20</i> | - | + | - | * | + | - | - |
| <i>Pec 25</i> | - | + | - | + | * | + | - |
| <i>Pec 89</i> | - | - | - | - | + | * | - |
| <i>Pec TN1</i> | - | - | - | - | - | - | * |

En las pruebas sin el marcador *Pec 25*, vemos que para Nizanda aún hay mucho ligamiento entre los marcadores, excepto por *Pec 16* que no está ligado a ninguno (Cuadro 10). Paja Blanca solo presenta ligamiento entre *Pec 03* y *Pec 20* (Cuadro 11). Este resultado indica que en Nizanda y Paja Blanca existe alguna fuerza evolutiva o grado de endogamia que causa ligamiento entre los marcadores.

Cuadro 10. Desequilibrio de ligamiento encontrado en la localidad de Nizanda sin incluir al marcador *Pec 25*.

| Nizanda | | | | | | |
|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Locus | <i>Pec 01</i> | <i>Pec 03</i> | <i>Pec 16</i> | <i>Pec 20</i> | <i>Pec 89</i> | <i>Pec TN1</i> |
| <i>Pec 01</i> | * | + | - | + | + | - |
| <i>Pec 03</i> | + | * | - | + | + | + |
| <i>Pec 16</i> | - | - | * | - | - | - |
| <i>Pec 20</i> | + | + | - | * | + | - |
| <i>Pec 89</i> | + | + | - | + | * | + |
| <i>Pec TN1</i> | - | + | - | - | + | * |

Cuadro 11. Desequilibrio de ligamiento encontrado en la localidad de Paja Blanca sin incluir al marcador *Pec 25*.

| Paja Blanca | | | | | | |
|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Locus | <i>Pec 01</i> | <i>Pec 03</i> | <i>Pec 16</i> | <i>Pec 20</i> | <i>Pec 89</i> | <i>Pec TN1</i> |
| <i>Pec 01</i> | * | - | - | - | - | - |
| <i>Pec 03</i> | - | * | - | + | - | - |
| <i>Pec 16</i> | - | - | * | - | - | - |
| <i>Pec 20</i> | - | + | - | * | - | - |
| <i>Pec 89</i> | - | - | - | - | * | - |
| <i>Pec TN1</i> | - | - | - | - | - | * |

8.6 Cuello de Botella

En los análisis con los siete marcadores, para Nizanda los test de Sing y de Wilcoxon tanto para el IAM y el SMM muestra una $P > 0.05$, por lo que no hay pruebas de que esta localidad haya sufrido algún cuello de botella. En Paja Blanca obtuvimos en el test de Sing con ambos modelos mutacionales una $P > 0.05$, pero con el test de Wilcoxon para el IAM obtuvimos una $P > 0.05$, y para el SMM una $P < 0.05$, indicando que si es probable que en esta localidad haya estado sometida a cuello de botella.

En los análisis sin el marcador *Pec 25* para Nizanda tampoco hubo evidencias de que esta localidad pasara recientemente por un cuello de botella. En la prueba sin *Pec 25* para Paja Blanca, tampoco existen evidencias de que en la localidad ocurriera un cuello de botella.

8.7 Estructura genética de las poblaciones

La prueba con los siete marcadores indico que en Nizanda y Paja Blanca hay tres poblaciones representadas, una en la localidad de Paja Blanca y dos en la localidad de Nizanda (Figura 6). Del total de individuos analizados (N = 65), el 43.07% (28 individuos) provienen de la localidad de Paja Blanca, y el 56.93% (37 individuos) restante pertenecen a la localidad de Nizanda. En Nizanda, sin embargo, existen dos poblaciones, una población con el 36.92% del total de individuos (24 individuos) y la otra con el 20% del total de individuos (13 individuos), ambas están bien diferenciadas.

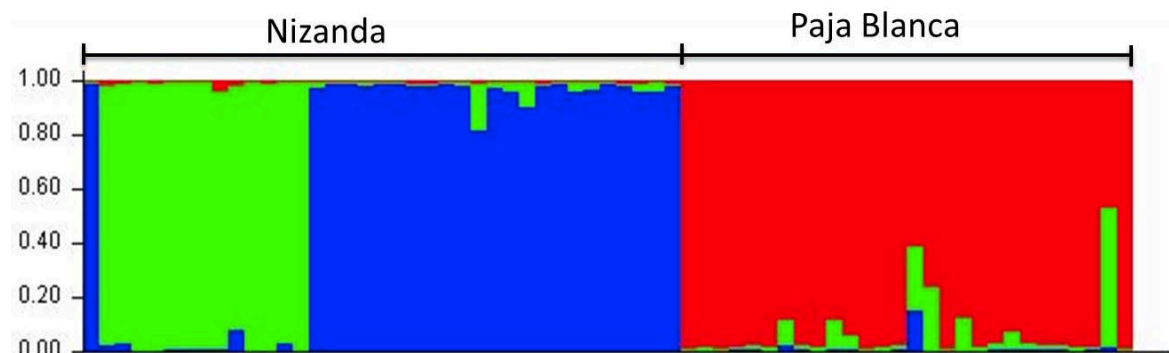


Figura 6. Tres poblaciones (Población 1 en azul, población 2 en verde y población 3 en rojo).

Las pruebas con seis marcadores indican que solo hay dos poblaciones. De los 65 individuos, el 63.07% (41 individuos) pertenecen a la población de Paja Blanca, mientras que el 36.93% (24 individuos) pertenecen a Nizanda (Figura 6).

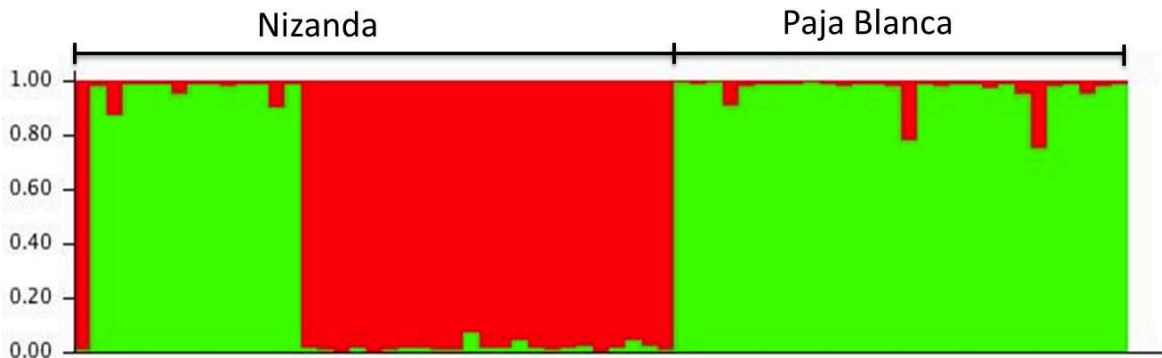


Figura 7. Dos poblaciones (Población 1 en verde y población 2 en rojo).

La localidad de Paja Blanca está conformada en su totalidad por una sola población. La localidad de Nizanda está conformada por individuos con genotipo de Paja Blanca y genotipo de Nizanda (Figura 7). Los 13 individuos colectados en Nizanda que están más relacionados a la población de Paja Blanca que a la de Nizanda, son los mismos 13 individuos que en la prueba con los siete marcadores indicaron ser una tercera población.

IX. DISCUSIÓN

9.1 Variación genética

En este estudio se encontró que existen diferencias en la diversidad alélica entre Nizanda y Paja Blanca, lo cual podría deberse a la distancia geográfica que existe entre estas dos localidades (Hedrick, 2011). Asimismo el hecho de que Nizanda presente mayor diversidad genética que Paja Blanca, puede deberse a que la primera se distribuye una área boscosa extensa mucho mayor que la segunda localizada en un pequeño remanente de selva. Esto cumple con la hipótesis de que cuanto más pequeños sean los remanentes de hábitat, menor será la densidad de la población (Santos y Tellería, 2006; Morera *et al.*, 2007; García, 2011). Entonces si hay más área con bosque, hay más árboles y por lo tanto más oquedades donde puedan encontrarse individuos y la población será más numerosa.

Los promedios de H_O y H_E para las dos localidades indican que estas están en un equilibrio Hardy-Weinberg; es decir, que parece que las fuerzas evolutivas (migración, mutación, deriva genética, selección natural y sistemas de apareamiento) no tienen un gran efecto sobre ellas. Sin embargo, hay que considerar que el promedio de estos valores es bajo. Para Nizanda es menor que la reportada para *C. pectinata* por Faria *et al.* (2010) en la zona, pero igual o mayor que la reportada en islas (Cuadro 12). Para Paja Blanca, la heterocigosis promedio es casi tan baja como los reportados para poblaciones de iguanas con muy poca variación como con *Sauromalus hispidus* en isla Alcatraz, donde Santos (en proceso) reporta una heterocigosis observada 0.24 (Cuadro 12). Además, los

F_{IT} y R_{IT} de las pruebas tanto con seis y siete marcadores en ambas localidades indican que existe un déficit de heterocigos en las dos poblaciones.

La variación genética es la clave de la evolución. Es en este nivel en donde se dan los cambios que permiten a las especies adaptarse a las nuevas y diferentes condiciones ambientales que ocurren a lo largo del tiempo (Eguiarte y González, 2007; Molina - Frenner *et al.*, 2010). Debido a que la H_O y H_E y el promedio de alelos son bajos comparadas a otras especies de iguanas, la variación genética de *C. oaxacana* puede considerarse como baja (Cuadro 12).

Cuadro 12. Diversidad genética reportada por varios autores para otras especies de iguanas del género *Cyclura*, *Sauromalus* y *Ctenosaura*. De todas se reporta la localidad donde se realizó el estudio, el número de individuos analizados (N), el número de marcadores usados (loci) y la heterocigosis observada (H_O) y esperada (H_E).

| Especie | Localidad | N | Loci | # Alelos | H_O | H_E | Fuente |
|--------------------------------|------------------|-----|------|----------|-------|-------|-------------------------------|
| <i>Cyclura pinguis</i> | Isla Anegada | 33 | 20 | 3.8 | 0.59 | 0.57 | Mitchell <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Ctenosaura hemilopha</i> | Sur de Sinaloa | 30 | 10 | 6.3 | 0.46 | 0.63 | Zarza <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Ctenosaura conspicuosa</i> | Isla San Esteban | 30 | 6 | - | 0.36 | 0.72 | Pacheco, en proceso |
| <i>Conolophus subcristatus</i> | Islas Galápagos | 722 | 9 | 6 | 0.47 | 0.77 | Tzika <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Ctenosaura pectinata</i> | Nizanda | 35 | 10 | 6.1 | 0.61 | 0.65 | Faria <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Sauromalus hispidus</i> | Isla Alcatraz | 30 | 8 | 3.2 | 0.24 | 0.25 | Santos, en proceso |
| <i>Sauromalus obesus</i> | Bahía Kino | 30 | 8 | 3.67 | 0.38 | 0.39 | Santos, en proceso |
| <i>Sauromalus varius</i> | Isla San Esteban | 30 | 8 | 3.00 | 0.18 | 0.22 | Santos, en proceso |
| <i>C. oaxacana</i> | Nizanda | 37 | 7 | 4.71 | 0.519 | 0.521 | En este trabajo |
| | Paja Blanca | 28 | 7 | 2.71 | 0.217 | 0.244 | En este trabajo |

La diversidad alélica de *C. oaxacana* puede considerarse como baja. En general todos los marcadores, presentaron menos diversidad alélica que la reportada por Faria *et al.* (2010) para *C. pectinata* en Nizanda, a excepción de *Pec 20* que es monomórfico en *C. pectinata* (Cuadro 13).

Cuadro 13. Comparación de la diversidad alélica de los siete marcadores en *C. pectinata* y *C. oaxacana*.

| Locus | # Alelos | | |
|----------------|-----------------------------|----------------------------|-------------|
| | <i>Ctenosaura pectinata</i> | <i>Ctenosaura oaxacana</i> | |
| | Nizanda | Nizanda | Paja Blanca |
| <i>Pec 01</i> | 11 | 7 | 2 |
| <i>Pec 03</i> | 4 | 4 | 2 |
| <i>Pec 16</i> | 6 | 4 | 3 |
| <i>Pec 20</i> | 1 | 4 | 3 |
| <i>Pec 25</i> | 11 | 8 | 5 |
| <i>Pec 89</i> | 5 | 3 | 3 |
| <i>Pec TN1</i> | 6 | 3 | 1 |

Comparando el promedio de alelos obtenido en este estudio con previos para otras especies de iguanas del género *Cyclura*, *Sauromalus* y *Ctenosaura* (Cuadro 12) podemos notar que el promedio de alelos encontrado para *C. oaxacana* en ambas localidades no es tan alto como lo reportado para otras especies de iguanas en continente. Sin embargo, el promedio de alelos si es más alto que lo reportado en iguanas de islas.

C. oaxacana es una especie con muy poca movilidad, lo que la hace muy vulnerable a los cambios en su ambiente. Las diferencias de diversidad genética entre Paja Blanca y Nizanda puede deberse a que Paja Blanca es un remanente de bosque aislado pequeño, mientras que Nizanda es un fragmento bosque virgen muy grande que se extiende a lo largo de la sierra Atravezada de Oaxaca.

Los marcadores usados fueron diseñados para *Ctenosaura pectinata*, que es filogenéticamente distante a *Ctenosaura oaxacana* (Figura 8). Esta distancia podría ser la causa de que se encontrara menor diversidad genética en *C. oaxacana*, ya que la retención de los sitios del primer y el número de alelos que puede tener, disminuyen a medida de que aumenta la distancia evolutiva entre la

especie para la que fue diseñado el marcador y la especie en la que se está usando (Moore *et al*, 1991; Primmer *et al.*, 1996; Selkoe y Toonen, 2006).

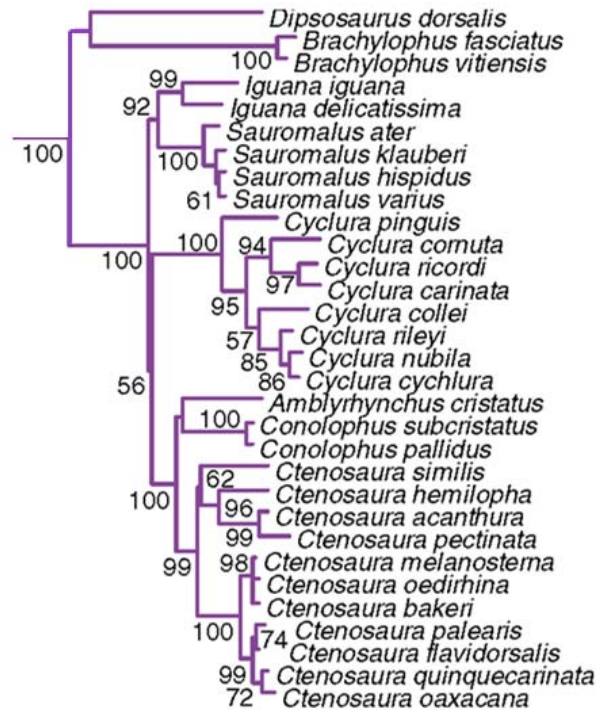


Figura 8. Filogenia de la familia Iguanidae, obtenida de Pyron *et al.*, 2013.

Además, usar marcadores diseñados para otra especie aumenta la probabilidad de presentar alelos nulos (Pico y Esteras, 2012), como la que se tienen en el marcador *Pec 89* para Nizanda y *Pec 25* para Paja Blanca. Pero como cada marcador resultó tener alelos nulos en una localidad y no en la otra, es posible que la diversidad de alelos de cada localidad sea causada por fuerzas evolutivas y no por artefactos.

9.2 Estructura y flujo genético

La estructura genética de las poblaciones está dada por la diferenciación en la variación genética entre sus subpoblaciones (Hedrick, 2011). Esta estructuración puede deberse a distintas razones; por ejemplo, la mutación y la migración. La mutación causa una diferenciación genética entre las distintas estructuras de la población, mientras que la migración causa una homogenización de ellas. La estructura genética es el resultado de ambos fenómenos que afectan de manera diferente a las subpoblaciones.

Los resultados de F_{ST} indican una estructuración poblacional, y ya que los R_{ST} son mayores a los F_{ST} , hace suponer que la mutación es más importante que la migración para mantener la variación entre las poblaciones (Hardy *et al.*, 2003). Los F_{ST} y R_{ST} son significativamente mayores que cero, lo que indica que existe diferencia en la variación genética de las dos localidades (Hedrick, 2011; Balloux y Lugon-Moulin, 2002). El F_{ST} en las pruebas con seis y siete marcadores dan valores superiores a 0.25, el cual se considera como que existe una gran diferenciación genética entre las dos localidades (Balloux y Lugon-Moulin, 2002). Igualmente, R_{ST} de las pruebas son mayores que 0.25, sugiriendo también que hay una clara estructura entre las dos localidades.

La diferenciación entre las dos poblaciones es muy similar a la reportada por MacAvoy *et al.* (2007) en su análisis de 232 individuos de tuátara (*Sphenodon* spp.) con seis marcadores donde obtuvo una $F_{ST} = 0.26$; pero es menor que la reportada por Ciofi y Brukoford (1999) para 110 individuos de dragones de Komodo (*Varanus komodoensis*) de seis localidades donde obtuvieron una $F_{ST} = 0.32$. Los F_{ST} y R_{ST} obtenidos en este estudio son también se encuentran dentro

del rango de los F_{ST} y R_{ST} obtenidos por Tzika *et al.* (2008) para 722 individuos de *Conolophus subcristatus* obtenidos en seis islas en Galápagos (Cuadro 14). Esto refleja que la estructura genética de *C. oaxacana* es similar a la de especies insulares de reptiles.

Cuadro 14. Valores de F_{ST} (sobre la diagonal) y R_{ST} (debajo de la diagonal) obtenidos por Tzika *et al.* (2008).

| | Isabela + Fernandina | Baltra | Santa Cruz | Plaza Sur | Santa Fe |
|----------------------|----------------------|--------|------------|-----------|----------|
| Isabela + Fernandina | - | 0.17 | 0.15 | 0.39 | 0.45 |
| Baltra | 0.18 | - | 0.18 | 0.5 | 0.69 |
| Santa Cruz | 0.13 | 0.15 | - | 0.33 | 0.45 |
| Plaza Sur | 0.54 | 0.59 | 0.37 | - | 0.76 |
| Santa Fe | 0.53 | 0.78 | 0.53 | 0.83 | - |

9.3 Efectos de la fragmentación en las poblaciones

Una pérdida regional en la cantidad de hábitat, trae una consiguiente reducción en el tamaño de las poblaciones de los organismos que ahí se encuentran (Santos y Tellería, 2006). La disminución y fragmentación de ambientes por acciones humanas conlleva a un deterioro progresivo de la calidad del ecosistema remanente (Morera *et al.*, 2007). Conforme aumenta las áreas modificadas disminuye el área de fragmentos con ecosistema original.

La fragmentación tiene un efecto en las especies similar al esperado bajo un modelo biogeográfico de isla-continente. Si cada fragmento es visto como una isla, y la matriz de área afectada es visto como la separación existente entre cada isla, veremos que mientras más alejado este un fragmento de otro, menor será el intercambio genético que exista entre ellos (Hedrick, 2011). Pero, no todas las especies reaccionan igual al efecto de la fragmentación, dependiendo de la las

características físicas y ecológicas de las especies será el grado de afectación que tendrán a la fragmentación (García, 2011).

C. oaxacana es una especie pequeña, que es consumida como alimento por la gente nativa de la zona, cuenta con un área de distribución pequeña, y solo habita en el tipo de vegetación de selva baja caducifolia (Rioja *et al.*, 2012; Santos, 2012; Díaz, 2014). Esta selva se encuentra seriamente amenazada por actividades antropogénicas como la agricultura y la ganadería, lo que la hace susceptible a la fragmentación. La fragmentación separará a las poblaciones de especies que la habitan, como es *C. oaxacana*.

Si tenemos una zona hipotética con 100 hectáreas de superficie, y esta tiene una capacidad de carga de 200,000 individuos de una especie, cuando dicha zona se ve afectada por la destrucción y fragmentación de hábitats, reduciendo su área a la mitad o menos, la capacidad de carga de la zona también se verá afectada. Es decir, que de esos 200,000 individuos que habitaban las 100 hectáreas, la mitad o más se verán desplazados, pero, ¿A dónde van los individuos desplazados?

En ambas pruebas de desequilibrio de ligamiento vemos que Nizanda tiene más loci ligados que Paja Blanca. El desequilibrio de ligamiento se da cuando dos o más loci se encuentran muy cercanos en el cromosoma, pero también puede deberse a diversos factores, como la deriva génica, mutación, flujo genético y endogamia (Hedrick, 2011). Al resultar las pruebas de cuello de botella no significativas, sabemos que el desequilibrio de ligamiento observado no se debe a la endogamia que causan los cuellos de botella. Se sabe que *C. pectinata* tiene seis pares de cromosomas con centrómero y 12 pares de microcromosomas

(Gorman et al., 1967), si existen tantos cromosomas en este género es poco probable que el desequilibrio de ligamiento se deba a que los loci se encuentren cercanos unos de otros. Zarza et al. (2009) reporta que los marcadores diseñados para *C. pectinata* y utilizados en este estudio no presentan evidencias de desequilibrio de ligamiento.

El desequilibrio de ligamiento observado en cada localidad puede tener orígenes diferentes. Es probable que en Paja Blanca se deba al hecho de que la población presenta una menor variación genética. Mientras que en Nizanda puede ser el resultado de la existencia de las dos poblaciones genéticas intermezcladas en una misma zona.

La presencia de dos poblaciones genéticas en Nizanda, una de ellas cercanamente emparentada o idéntica a Paja Blanca, sugiere que cuando el área de bosque que habitan las iguanas se ve reducida, estas migran a otro remanente de bosque donde puedan establecerse. En este caso, el área de Nizanda es más grande que el fragmento de Paja Blanca y que varios fragmentos de la zona, por lo que los 13 individuos encontrados podrían ser migrantes que recientemente llegaron a la zona y aún conservan su identidad genética. Se espera que en futuras generaciones se vayan mezclando generando una nueva identidad genética de la zona. Algunos alelos se perderán, otros se conservarán, pero en total se aumentaría la diversidad genética de Nizanda.

9. 4 ¿Por qué existe una segunda población en Nizanda?

Es extraño tener una localidad con dos poblaciones perfectamente diferenciadas en sus genotipos; pero es aun mas extraño que la segunda población de Nizanda presente un genotipo similar o idéntico a Paja Blanca, dependiendo del número de marcadores con el que se analice.

Sabemos que las dos poblaciones que se encuentran en Nizanda no se deben a una diferencia del genotipo entre sexos porque tenemos hembras y machos en ambas poblaciones. La diferencia podría deberse a los periodos de muestreo, ya que la población más chica está formada por individuos de las primeras colectas, exceptuando al individuo 14 que es de la última. Mientras que la población más grande solo se conforma por individuos de la última colecta. Este tipo de estructuración podría deberse a varios fenómenos: 1) el efecto Wahlund (Hedrick, 2011); 2) a que la localidad sea parte de una metapoblación; 3) a la migración de individuos de otras zonas por destrucción de hábitat; o, 4) que Nizanda sea una zona de contacto entre los dos genotipos.

El efecto Wahlund es la reducción en la heterocigosis esperada bajo Hardy-Weinberg. Es posible que existan barreras que no sean visibles a simple vista y causen de aislamiento reproductivo; un ejemplo puede ser la estructuración social. Estas barreras podrían explicar el porqué hay dos subpoblaciones genéticas, en una sola localidad; pero, al no haber diferencias significativas entre la H_O y H_E global de Nizanda bajo lo esperado en Hardy-Weinberg, hace que sea poco probable que tengamos un efecto Wahlund. Para que el efecto Wahlund sea posible debe existir una diferencia significativa entre las heterocigosis observada y esperada.

La presencia de las dos poblaciones en Nizanda por efecto metapoblacional, estaría relacionada con la migración entre las poblaciones que la conforman. Una metapoblación se da cuando los individuos que conforman la población están divididos en subpoblaciones, estas subpoblaciones pueden estar en distintos parches o dispuestos en hábitats propicios en un ambiente continuo. Estas subpoblaciones localmente sufren extinciones, invasiones y recolonizaciones que pudieran resultar en la mezcla de dos poblaciones genéticas como las presentes en Nizanda.

C. oaxacana se estructura naturalmente en subpoblaciones en el continuo de selva conservada a lo largo de la sierra atravezada, restringida por zonas secundarias abundantes en árboles formadores de oquedades, que le brindan refugio a la especie. La población de Nizanda sería uno de esos parches en los que la abundancia de la especie se incrementa, aun cuando existen individuos aislados dentro del resto de la selva. Así, la población de Nizanda podría estar conformada por la colonización de individuos procedentes de localidades vecinas que se movieron a través de la selva. En este escenario esperaríamos que las poblaciones muestren una oscilación en su genotipo, con periodos en los que tenemos individuos híbridos entre poblaciones que después se vuelve a colonizar con individuos de las localidades vecinas (Figura 9).

Un caso especial ocurriría si existiera algún efecto migratorio por destrucción de hábitat. De igual manera Nizanda sería una zona donde los individuos de dos poblaciones distintas convergen, pero la segunda población provendría de poblaciones de *C. oaxacana* vecinas al ser destruidas después de la tala del monte para agricultura o ganadería. Si este fenómeno ocurrió muy

recientemente a nuestro muestreo, no habría tiempo suficiente para que la convergencia de estas dos poblaciones empezara a formar organismos híbridos, lo que resultaría en dos poblaciones claramente diferenciadas.

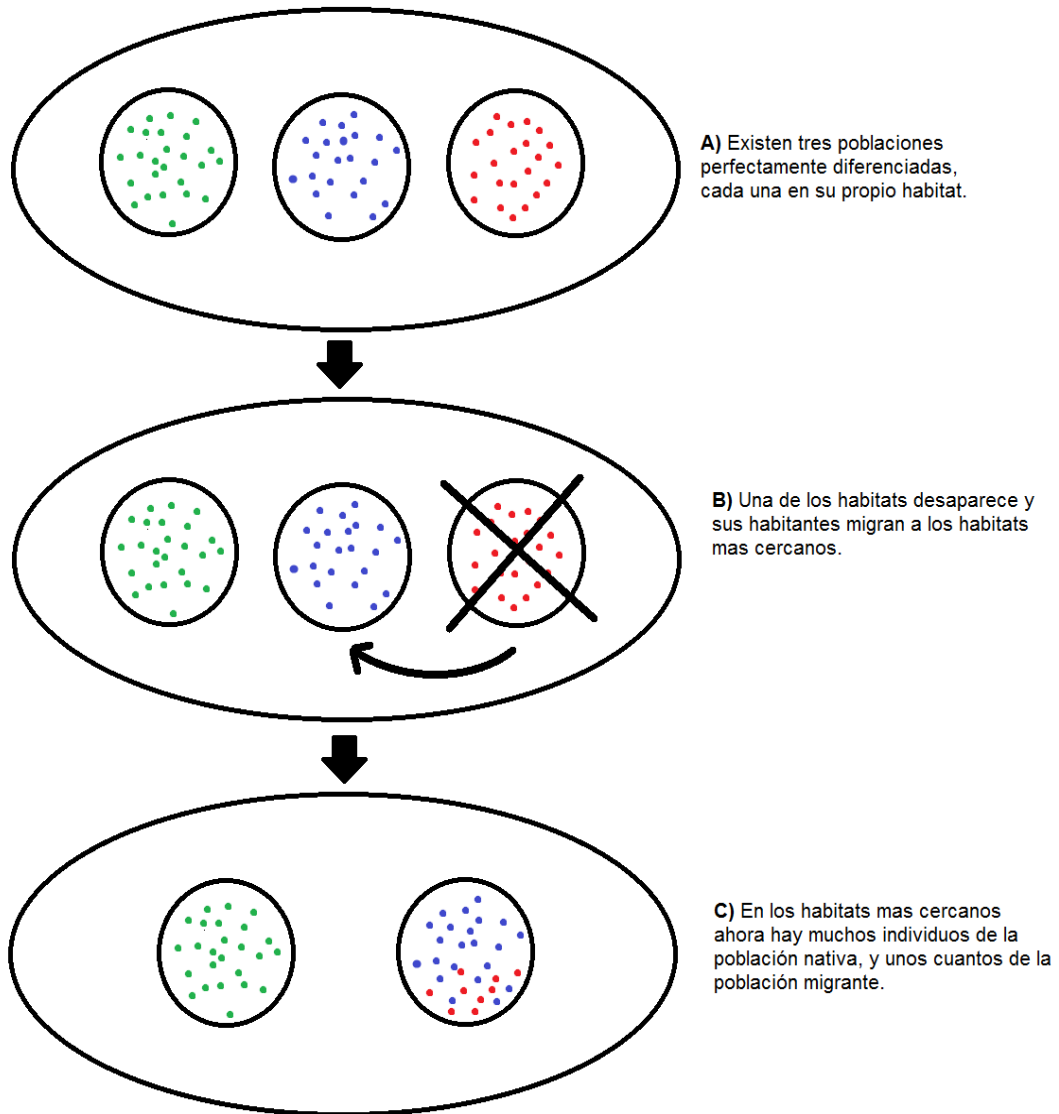


Figura 9. Esquema de migración de individuos por destrucción de hábitat.

La idea de que Nizanda sea una zona de contacto entre dos zonas con su propio genotipo no es absurda. Como podemos observar en la Figura 10, la distribución de *C. oaxacana* es en zonas costeras y en zonas serranas, y cada una

podría tener su propia identidad genética. El problema con esta explicación es que Paja Blanca está ubicada en la zona de costa, mientras que Nizanda está en las zonas serrana, ninguna de las dos está cercana a un punto de convergencia, por lo que la incógnita seguiría siendo la misma, ¿Por qué Nizanda tiene dos genotipos?

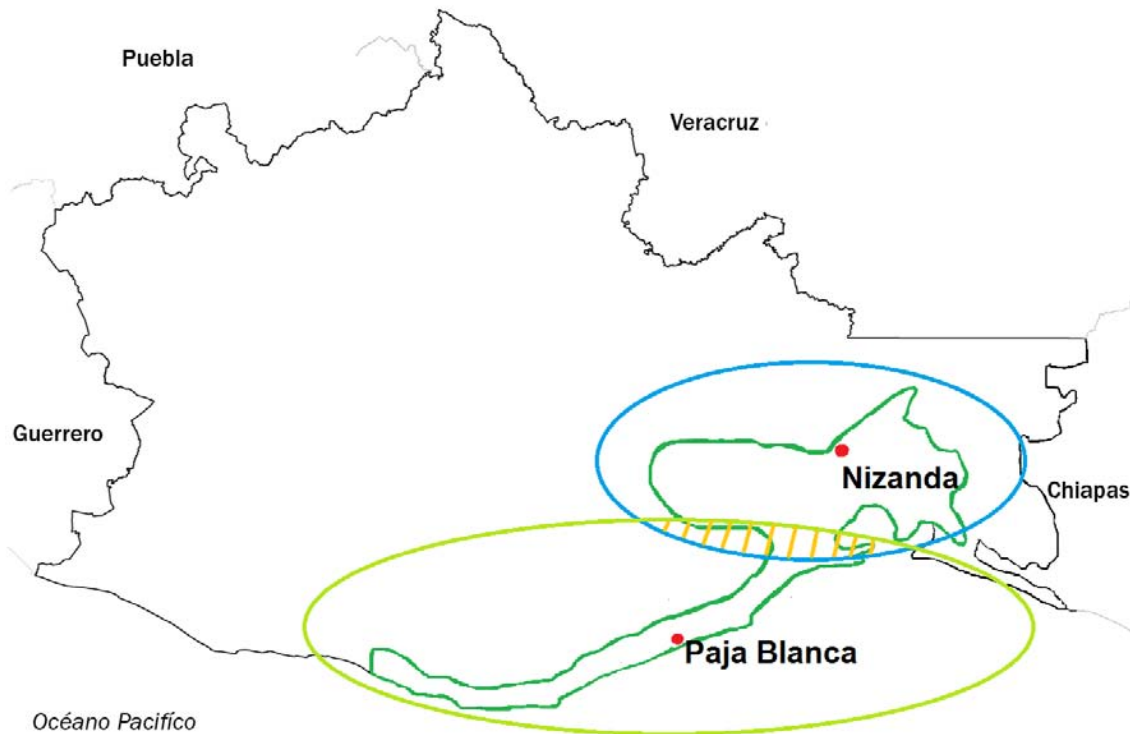


Figura 10. Esquemmatización de cómo se distribuirían los genotipos serranos y costeros a lo largo de toda la distribución de *Ctenosaura oaxacana*.

Para poder resolver a esta pregunta sería necesario hacer más muestreos en un futuro. Si muestreamos de dos a tres localidades entre Nizanda y Paja Blanca, 30 individuos en cada una de ellas, durante dos años, podríamos saber si es normal encontrar estas dos poblaciones en la zona a lo largo del tiempo o si son individuos que migran de una zona que se va fragmentando a otra con más vegetación.

También podríamos muestrear otras dos poblaciones en la zona de serranías y otras dos en la zona de costa, y comparar los genotipos resultantes. Esto nos diría si realmente existe un genotipo serrano y uno costero.

X. Conclusiones

Los estudios genéticos son sumamente importantes para descubrir patrones en la distribución y estructura de las poblaciones no observables a simple vista. Actualmente la fragmentación de hábitats es un fenómeno que amenaza gran cantidad de ecosistemas y a las especies que habitan en ellos. La selva baja caducifolia es un hábitat altamente amenazado por el cambio de uso de suelo, y es el tipo de vegetación donde habita *C. oaxacana*, haciéndola una especie propensa a verse afectada por la fragmentación. Este estudio permitió notar que la diversidad genética de *C. oaxacana* si se ve amenazada por la fragmentación de su hábitat, lo que pone en riesgo la sobrevivencia de la especie.

Encontramos que cada localidad presenta su propia identidad y estructura genética, y que la diversidad genética se ve afectada por la fragmentación de hábitat. Ambas localidades se encuentran en un equilibrio Hardy-Weimberg, pero existe una clara diferencia en la diversidad genética entre el fragmento y el bosque continuo. En el fragmento de Paja Blanca existe la mitad de diversidad de heterócigos y diversidad alélica que en el bosque continuo de Nizanda.

C. oaxacana presenta una diversidad menor a la de otras especies de iguanas continentales, y en el caso de Paja Blanca similar que la reportada para iguanas de islas. Además, presenta una estructura poblacional similar a la observada en especies insulares de reptiles. Esto indica que la fragmentación de hábitat y la poca vagilidad de *C. oaxacana* causa aislamiento entre las poblaciones, similar a lo que se observa en poblaciones insulares. El aislamiento de las poblaciones de *C. oaxacana* causa que en esta especie la mutación sea la fuente de variación más importante que la migración.

Un fenómeno interesante encontrado en este estudio es la presencia de dos poblaciones genéticas en la localidad de Nizanda. Sabemos que esto no se debe al muestreo porque todas las muestras fueron tomadas en la misma localidad. Podría ser que exista alguna estructuración social que cause estas diferencias genotípicas, que Nizanda sea una zona conformada por una estructura metapoblacional, o que sea una zona de contacto. Para poder resolver a esta pregunta sería necesario hacer más muestreos en un futuro.

XI. Bibliografía

- Aljanabi S. M., e I. Martinez. 1997. Universal and rapid salt - extraction of high quality genomic DNA for PCR - based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25: 4692 - 4693.
- An, J., Sommer, J. A., Shore, G. D., Williamson, J. E., Brennehan, R. A., y E. E. Louis. 2003. Characterization of 20 microsatellite marker loci in the West Indian Rock Iguana (*Cyclura nubila*). *Conservation Genetics* 5: 121 - 125.
- Balloux, F., y N. Ligon - Moulin. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11: 155 - 165.
- Brookfield J. F. Y. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*. 5: 4534 - 4555.
- Bruford, M. W., y R. K. Wayne. 1993. Microsatellites and their application to population-genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development*, 3: 939 - 943.
- Chakraborty R., De Andrade M., Daiger S. P. y B. Budowle. 1992. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing and their implications in forensic applications. *Annals of Human Genetics*. 56: 455–457
- Ciofi, C., y M.W. Bruford. 1999. Genetic structure and gene flow among Komodo dragon populations inferred by microsatellite loci analysis. *Molecular Ecology*, 8: S17 - S30.
- Cornuet, J. M., G. Luikart. 1996. Bottleneck 1.2.02. Windows XP, 7, 8.
- Dakin, E. E., y J. C. Avise. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93: 504 - 509.

- Demarchi, D. 2009. Microsatélites, distancias genéticas y estructura de poblaciones nativas sudamericanas. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 11(1): 73 - 88.
- Diario Oficial de la Federación (2010): NORMA Oficial Mexicana NOM - 059 - SEMARNAT - 2010, Protección ambiental - Especies nativas de México de flora y fauna silvestres - Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Mexico: Diario Oficial de la Federación.
- Díaz, J.G. 2014. Demografía e historia de vida de la iguana Nguio (*Ctenosaura oaxacana*: Iguanidae), para su conservación y manejo en la región de Nizanda, Oaxaca. Tesis de Maestría, Instituto de Biología, UNAM, México D.F. 107 pp.
- Eguiarte, L., y A. G. González. 2007. De genes y magueyes estudio y conservación de los recursos genéticos del tequila y el mezcal. *Ciencias*, 87: 28 - 35.
- Eguiarte, L. E. y D. Piñero. 1990. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. *Ciencias*. Número especial 4. Ecología y conservación en México: 34 -47.
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5: 435 - 445.
- Excoffier, L. y H. E. L. Lischer. 2011. Arlequin 3.5. Linux y Windows.
- Excoffier, L., y M. Slatkin. 1998. Incorporating genotypes of relatives into a test of linkage disequilibrium. *The American Journal of Human Genetics*, 62: 171-180.

- Faria, C., Zarza E., Reynoso V. H., y B. C. Emerson. 2010. Predominance of single paternity in the black spiny - tailed iguana: conservation genetic concerns for female-biased hunting. *Conservation Genetics*, 11: 1645 - 1652.
- García, D. 2011. Efectos biológicos de la fragmentación de hábitats: nuevas aproximaciones para resolver un viejo problema. *Ecosistemas*, 20(2 - 3): 1 - 10.
- Godoy, J.A. 2009. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas* 18(1): 23 - 33
- Gorman G. C., Atkins L. y T. Holzinger. 1967. New karyotypic data on 15 genera of lizards in the family Iguanidae, with a discussion of taxonomic and cytological implications. *Cytogenetics*, 6: 286 - 299.
- Hardy, O. J., Charbonnel, N., Fréville, H., y M. Heuertz. 2003. Microsatellite allele sizes: A simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics*, 163: 1467 - 1482.
- Hasbún-Rose, C. R. 2001. Herpetofaunal biodiversity of the endangered spiny-tailed lizards of the *Ctenosaura quinquecarinata* / *flavidorsalis* complex: geographic variation, mtDNA phylogeography and systematics. Tesis Doctoral. The University of Hull.
- Hasbún, C. R., Gómez, A., Köhler, G., y D. H. Lunt. 2005. Mitochondrial DNA phylogeography of the Mesoamerican spiny - tailed lizards (*Ctenosaura quinquecarinata* complex): historical biogeography, species status and conservation, *Molecular Ecology*, 14, 3095 - 3107.
- Hedrick, P.W. 2011. *Genetics of populations*. Cuarta edición. Jones and Bartlett publishers. Sudbury, Massachusetts. 553 págs

- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). 2012. Sistema para la consulta del anuario de Oaxaca, edición 2012. <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/ae12/info/oax/mapas.pdf>
- IUCN. 2015. The IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2015-3. <<http://www.iucnredlist.org>>. Visto en septiembre 9 del 2015.
- Kalinowski, S. T. 2004. Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical. *Conservation Genetics*, 5: 539 - 543.
- Kalinowski S. T. y M. L. Taper. 2006. Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. *Conservation Genetics*, 7:991-995.
- Knapp, C. R., y C. L. Malone. 2003. Patterns of reproductive success and genetic variability in a translocated iguana population. *Herpetologica*, 59(2): 195 - 202.
- Köhler, G. 2004. *Ctenosaura oaxacana*. The IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2014.3, www.iucnredlist.org (Consultado el 14 de diciembre de 2014)
- Köhler, G., y C. Hasbun. 2001. A new species of spiny - tailed iguana from México formerly referred to *Ctenosaura quinquecarinata* (Gray 1982). *Senckenbergiana biológica*, 81: 257 - 267.
- Lau, J., Chemnick, L. G., Gerber, G. P., Jones, K. C., Mitchell, A. A., Alberts, A. C., y O. A. Ryder. 2009. Isolation and characterization of 23 polymorphic microsatellite loci for a West Indian iguana (*Cyclura pinguis*) from the British Virgin Islands. *Molecular Ecology Resources*, 9: 1412 - 1414

- MacAvoy, E. S., McGibbon, L. M., Sainsbury, J. P., Lawrence, H., Wilson, C.A., Daugherty, C. H., y G. K. Chambers, G.K. 2007. Genetic variation in island populations of tuatara (*Sphenodon* spp.) inferred from microsatellite markers. *Conservation Genetic*, 8: 305 - 318.
- Mitchell A. A., Lau J., Chemnick L. G., Thompson E. A., Alberts, A. C., Ryder, O. A., y G. P. Gerber. 2011. Using microsatellite diversity in wild Anegada iguanas (*Cyclura pinguis*) to establish relatedness in a captive breeding group of this critically endangered species. *Conservation Genetics*, 12: 771 - 781.
- Molina-Freaner, F. E., Markow, T. A., Pfeiler, E. J., Rojas - Soto R. O., Varela - Romero, A., Quijada - Mascareñas, A., Esqueda, M., y G. Yépez - Plascencia. 2010. Diversidad Genética de la Biota. Págs. 97 - 128 en (Molina - Freaner, F. E., y T. R. Van Devender, eds.) *Diversidad biológica de Sonora*. UNAM - CONABIO (Universidad Nacional Autónoma de México / Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). México.
- Moore, S. S., Sargeant, L. L., King, T. J., Mattick, J. S., Georges, M., y D. J. Hetzel. 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use for heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, 103: 654 - 660.
- Morera, C., Pintó, J., y M. Romero. 2007. Paisaje, procesos de fragmentación y redes ecológicas: aproximación conceptual. Págs. 11 - 32 en (Chassot, O., y C. Morera, eds.) *Corredores biológicos: Acercamiento conceptual y experiencias en América*. Centro Científico, San José, Costa Rica. Tropical/Universidad Nacional de Costa Rica.

- Pacheco Hoyos, N.G. En proceso. Flujo genético entre las poblaciones de iguanas insulares y continentales en el golfo de California. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México
- Pasachnik, S. 2010. Population genetics of *Ctenosaura melanosterna*; implications for conservation and management. Tesis doctoral. Universidad de Tennessee. E.U.A. 84 - 130 pp.
- Pasachnik, S., Echternacht, A., y B. Fitzpatrick. 2010. Gene trees, species and species trees in the *Ctenosaura palearis* clade. *Conservation Genetics*, 11: 1767 - 1781.
- Pasachnik, S., Fitzpatrick, B., Near, T., y A. Echternacht. 2009. Gene flow between an endangered endemic iguana, and its wide spread relative, on the island of Utila, Honduras: When is hybridization a threat?. *Conservation Genetics*, 10: 1247 - 1254.
- Peakall, R., and P. E. Smouse 2006. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel: population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288 - 295.
- Piry, S., Luikart, G., y J. M. Cornuet. 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, 90: 502 - 503.
- Pico S. M.B. y C. G. Esteras. 2012. Marcadores moleculares basados en PCR: Marcadores SSR o STR (Simple Sequence Repeats or Short Tandem Repeats) Microsatélites. Universidad Politécnica de Valencia.

- Primmer, C. R., Moller, A. P., y H. Ellegren. 1996. A wide - range survey of cross - species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, 5(3): 365 - 378.
- Pritchard J. K., Wen X., D. Falush. 2010. Structure 2.3. Mac, Windows, Linux, Sun.
- Pyron R. A., Burbrink F. T y J. J. Wiens. 2013. A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evolutionary Biology*, 13:93.
- Reed, D. H., y R. Frankham. 2003. Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology*, 17: 230 - 237.
- Rioja, T., Carrillo-Reyes, A., Espinoza-Medinilla, E. y S. López-Mendoza. 2012. Basic ecology of the Oaxacan Spiny - tailed Iguana *Ctenosaura oaxacana* (Squamata: Iguanidae), in Oaxaca, Mexico. *Revista de Biología Tropical*, 60(4): 1613 - 1619.
- Rocha M. y J. Gasca. 2007. Ecología molecular de la conservación. Págs. 251 - 272 en (Eguiarte L., Souza V. y Aguirre X, eds.) *Ecología Molecular*, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Instituto Nacional de Ecología (INE), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), México.
- Rousset F. 2013. Genepop 4.3. Windows/Linux/Mac OS X.
- Santos Hernández N. G. 2012. Variabilidad genética del género *Ctenosaura* en el sur del Istmo de Tehuantepec. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 81 pp.

- Santos Hernández, N. G. En proceso. Flujo génico e hibridación de poblaciones de *Sauromalus* (Iguanidae) en isla Alcatraz, Sonora, México. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Santos, T., y J. L. Tellería. 2006. Pérdida y fragmentación del hábitat: efecto sobre la conservación de las especies. *Ecosistemas*, 2: 3 - 12.
- Schraml, E., y T. Lion. 2003. Interference of dye - associated fluorescence signals with quantitative analysis of chimerism by capillary electrophoresis. *Leukemia*, 17: 221 - 223.
- Selkoe, K. A., y R.J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9: 615 - 629.
- Slatkin, M., y L. Excoffier. 1996. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation - Maximization algorithm. *Heredity*, 76: 377 - 383.
- Steinfartz S., y A. Caccone. 2006. A set of highly discriminating microsatellite loci for the Galápagos marine iguana *Amblyrhynchus cristatus*. *Molecular Ecology Notes*, 6: 927 - 929.
- Steinfartz, S., Glaberman, S., Lanterbecq, D., Russello, M., Rosa, S., Hanley, T. C., Marquez, C., Snell, H. L., Snell, H. M., Gentile, G., dell'Olmo, G., Powell, A., y A. Caccone. 2009. Progressive colonization and restricted gene flow shape island - dependent population structure in Galápagos marine iguanas (*Amblyrhynchus cristatus*). *BMC Evolutionary Biology*, 9: 297.
- Sunnucks, P., y D. F. Hales. 1996. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Molecular Biology and Evolution*, 13: 510 - 524.

- Tzika A. C., Rosa, S. F. P., Fabiani, A., Snell, H. L., Snell, H. M., Marquez, C., Tapia, W., Rassmann, K., Gentile, G., y M. C. Milinkovitch. 2008. Population genetics of Galápagos land iguana (genus *Conolophus*) remnant populations. *Molecular Ecology*, 17: 4943 - 4952.
- 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.
- Vázquez L. Y. A., y A. E. Morales G. 2014. Microsatélites. Págs. 75 - 100 en (Cornejo R. A., Serrato D. A., Rendón A. B., y M.G. Rocha, eds.) *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC), Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa (UAM - I), México D. F.
- Weir B. S. y C. C. Cockerham. 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*. 38, 6: 1358 – 1370.
- Zarza, E., Pereyra, R., Reynoso V. H., y B. C. Emerson. 2009. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the black spiny tailed iguana (*Ctenosaura pectinata*) and their cross - utility in other *Ctenosaura*. *Molecular Ecology Resources*, 9: 117 - 119.
- Zarza E., Reynoso V. H., y B. C. Emerson. 2008. Diversification in the northern neotropics: mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of the iguana *Ctenosaura pectinata* and related species. *Molecular Ecology*, 17: 3259 - 3275

Zarza E., Reynoso V. H., y B. C. Emerson. 2011. Discordant patterns of geographic variation between mitochondrial and microsatellite markers in the Mexican black iguana (*Ctenosaura pectinata*) in a contact zone. *Journal of Biogeography*, 38: 1394 - 1405.

APÉNDICE I

Preparación de Solución de Lisis buffer TEN + SDS 2%

Reactivos

- EDTA 2.85 gr
- NaCl 0.8625 gr
- SDS 3.15 gr
- Tris HCl 150 ml
- Proteínasa K 26.25 ml

Preparación

- Colocar los 150 ml de Tris HCl 150 en un vaso de precipitado, y mantener en constante agitación. Agregar los 2.85 gr EDTA, una vez se diluya totalmente agregar los.8625 gr de NaCl, luego agregar 3.15 gr de SDS y por ultimo agregar los 26.25 ml de proteínasa K.
- Almacenar a 4°C.

APÉNDICE II

Programas y temperaturas de amplificación del PCR, para cada marcador.

| <i>Pec 01</i> | | |
|---------------|-------------|--------|
| Ciclos | Temperatura | Tiempo |
| 1 | 95°C | 5 min |
| | 94°C | 45 seg |
| 30 | 49°C | 45 seg |
| | 72°C | 45 seg |
| 1 | 72°C | 5 min |

| <i>Pec 03</i> | | |
|---------------|-------------|--------|
| Ciclos | Temperatura | Tiempo |
| 1 | 95°C | 5 min |
| | 94°C | 45 seg |
| 30 | 65°C | 45 seg |
| | 72°C | 45 seg |
| 1 | 72°C | 5 min |

| <i>Pec 16</i> | | |
|---------------|-------------|--------|
| Ciclos | Temperatura | Tiempo |
| 1 | 95°C | 5 min |
| | 94°C | 45 seg |
| 30 | 49°C | 45 seg |
| | 72°C | 45 seg |
| 1 | 72°C | 5 min |

| <i>Pec 20</i> | | |
|---------------|-------------|--------|
| Ciclos | Temperatura | Tiempo |
| 1 | 95°C | 5 min |
| | 94°C | 45 seg |
| 30 | 49°C | 45 seg |
| | 72°C | 45 seg |
| 1 | 72°C | 5 min |

| <i>Pec 25</i> | | |
|---------------|-------------|--------|
| Ciclos | Temperatura | Tiempo |
| 1 | 94°C | 5 min |
| 30 | 94°C | 45 seg |
| | 52°C | 45 seg |
| | 72°C | 45 seg |
| 1 | 72°C | 5 min |

| <i>Pec 89</i> | | |
|---------------|-------------|--------|
| Ciclos | Temperatura | Tiempo |
| 1 | 95°C | 5 min |
| 30 | 94°C | 45 seg |
| | 59°C | 45 seg |
| | 72°C | 45 seg |
| 1 | 72°C | 5 min |

| TN1 | | |
|--------|-------------|--------|
| Ciclos | Temperatura | Tiempo |
| 1 | 95°C | 5 min |
| 30 | 94°C | 45 seg |
| | 59°C | 45 seg |
| | 72°C | 45 seg |
| 1 | 72°C | 5 min |