



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Estructura mitocondrial (d-loop) de  
*Poecilia orri* en cenotes y humedales de la  
Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an,  
Quintana Roo**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A :**

***ALIET ROJAS SANTOYO***

**TUTORA:**

***Dra. ELLA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ***



2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Estructura mitocondrial (d-loop) de *Poecilia orri* en cenotes y humedales de la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an, Quintana Roo**

### **Reconocimientos**

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Ella Vázquez Domínguez en el laboratorio de Macroecología y en el laboratorio de Dinámica de Poblaciones y Evolución de Historias de Vida, del Departamento de Ecología de la Biodiversidad del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se reconoce al jurado por la evaluación, revisión y comentarios al presente trabajo, el cual estuvo constituido por:

Dr. Daniel Piñero Dalmau	Instituto de Ecología
Dra. Ella Vázquez Domínguez	Instituto de Ecología
M. en C. Martha Elena Esteva García	Instituto de Biología
Biól. Alejandra Vázquez Lobo Yurén	Instituto de Ecología
Biól. Tania Anaid Gutiérrez García	Instituto de Ecología

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Ecología, por ser parte indispensable en mi formación profesional, por otorgarme los conocimientos que me ayudaron a conformar la base de mi carrera científica, por otorgarme una visión integral de lo que significa ser científico, mexicano y un mejor ser humano. Y por que dentro de ellas he conocido a personas que ahora forman parte importante de mi vida.

A la Dra. Ella Vázquez Domínguez por su infinita paciencia, guía y apoyo constante en la realización de este trabajo; por su amistad y por compartir sus conocimientos para mi formación profesional.

Al la Dra. María del Carmen Mandujano Sánchez a cargo del laboratorio de Dinámica de Poblaciones y Evolución de Historias de Vida por las facilidades prestadas en el uso de las instalaciones.

Al Biól. Gerardo Rodríguez, técnico del laboratorio de Macroecología, así como a la M. en C. Mariana Rojas técnica del laboratorio de Dinámica de Poblaciones y Evolución de Historias de Vida por la siempre buena disposición en el apoyo a este trabajo.

A la Biól. Alejandra Vázquez Lobo, por su guía constante y por la buena disposición que siempre mostró en ofrecerme su ayuda para la realización de mi tesis.

Al laboratorio de Genética y Evolución que dirige el Dr. Daniel Piñero por el apoyo otorgado y por facilitarme sus instalaciones cuando mi trabajo lo requería.

A la Biól. Martha Eteva por sus enseñanzas y su guía constante.

Al Dr. Omar Domínguez Domínguez (Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo) por la revisión y los valiosos comentarios hechos a mi trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Macroecología: Biól. Angélica Hernández Valdés, M. en C. Rodrigo Vega Bernal y Biól. Tania A. Gutiérrez; por todas sus enseñanzas, por su guía y apoyo, por su amistad y por hacer siempre amigable mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeras y amigas Susette Castañeda, Tania Garrido y Rebeca Hernández por su compañía y buenos deseos y por regalarme también siempre una sonrisa y una buena conversación.

A mis compañeros del laboratorio de Dinámica de Poblaciones y Evolución de Historias de Vida: Erick, Israel, Lucy, Laura, Connie, Violeta, Gisela, Belinda, Hugo y Mariana, por su apoyo y compañía.

A todos y cada uno de los maestros que me transmitieron sus conocimientos durante mi estancia en la Facultad de Ciencias y que por mi escasa memoria ahora no podría mencionarlos a todos, pero a cada uno de ellos, Gracias.

## Agradecimientos Personales

A mi padre Miguel Rojas Lara, por hacer de mí lo que soy, por su apoyo constante en los buenos y malos momentos de mi vida, por su amor interminable, por permanecer siempre a mi lado y velar por mi salud, seguridad y felicidad. Por cuidar con amor lo que más he querido y regalarme los mejores momentos de mi vida. Por todo ello y por ser mi columna vertebral te dedico este trabajo.

A mi familia; Teresa Lara<sup>†</sup>, Lorenzo Rojas, por ser parte fundamental en mi formación personal, por su cariño y cuidados constantes.

A Paloma<sup>†</sup>, Sansona, Zyanya y Canela por su compañía y amor infinitos. Por iluminar cada día de mi vida.

A Alonso Carmona, quién me enseñó a ver la vida de una manera diferente, y me mostró un camino lleno de luz cuando todo parecía oscuro. Por darme innumerables momentos de felicidad. Por su apoyo y amor incondicional, por permanecer conmigo siempre con una sonrisa y por soñar su vida a mi lado.

A mis amigos Alonso Carmona, Alejandro Monroy y Eva Vega, por su amistad y apoyo incondicional. Por iluminar mis días más grises y por regalarme miles de sonrisas y buenos momentos cuando más lo necesité.

A mi hermana Julieta Rojas, por ser como eres, por entender lo que siento y lo que soy, por tu sonrisa y por ser mi hermana.

A mi amiga y hermana Perla Villegas por su cariño y lealtad, por los buenos momentos y por elegirnos como su familia.

A Omar Barrera, por su amistad y por acompañarme en buena parte de mi camino recorrido.

A la Familia Carmona por hacerme sentir parte de su familia y por hacerme sonreír todo el tiempo.

A Paloma

---

*A mi padre*

---

1. RESUMEN	I
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1. Estructuración genética de las poblaciones naturales	1
2.2. Marcadores Moleculares	2
2.3. El ADN mitocondrial (ADNmt)	2
2.4. La región control o d-loop	3
2.5. Peces poecílicos	5
2.6. <i>Poecilia orri</i>	5
2.7. Reserva de la Biosfera Sian Ka'an	6
2.8. Cuerpos de agua (cenotes, humedales y marismas)	9
3. ANTECEDENTES	10
4. OBJETIVOS	12
5. MATERIALES Y MÉTODO	13
5.1. Sitio de estudio y colecta	13
5.2. Trabajo de Laboratorio	15
5.3. Análisis Genéticos	17
5.4. Red mínima de haplotipos	19
5.5. Análisis filogenéticos	20
6. RESULTADOS	21
6.1. Diversidad genética	21
6.2. Estructuración genética	22
6.3. Descripción de la red mínima de haplotipos y de la reconstrucción filogenética	25
6.4. Red mínima de haplotipos	26
6.5. Reconstrucción filogenética	27
7. DISCUSIÓN	28
8. BIBLIOGRAFÍA	37
9. ANEXOS	43

## Estructura mitocondrial (d-loop) de *Poecilia orri* en cenotes y humedales de la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an, Quintana Roo

### 1. RESUMEN

Evalué la estructura genética poblacional y el aislamiento de seis poblaciones del pez dulceacuícola *Poecilia orri*, mediante secuencias de la región control (d-loop) del genoma mitocondrial (508 pb) de individuos que habitan en cuerpos de agua permanentes (cenotes) y temporales (humedales) de la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an. Los resultados mostraron una diversidad genética intermedia en términos de diversidad haplotípica y baja diversidad nucleotídica (0.638 y 0.021, respectivamente) en las seis poblaciones estudiadas, probablemente asociado a que dichas poblaciones están sujetas a regímenes hídricos fuertemente estacionales, donde los cuerpos de agua temporales tienden a secarse durante la temporada de sequía y las poblaciones de peces disminuyen drásticamente su tamaño efectivo, mientras que durante la temporada de lluvias los humedales se inundan nuevamente, dando lugar a la expansión de las poblaciones. Estos sucesivos cuellos de botella por los que atraviesa *P. orri* y la consecuente deriva génica tienden a homogenizar las subpoblaciones dentro de ellas, originando pérdida de variación genética y aumentando la diferenciación entre estas. Esta dinámica de extinción y expansión de las poblaciones se ajusta a un modelo de estructuración metapoblacional. Los resultados de estructura y flujo génico mostraron que la migración entre los cenotes y los humedales es escasa o nula, por lo que existe aislamiento por distancia entre los cuerpos de agua más alejados. La red mínima de haplotipos y los modelos de reconstrucción filogenéticos, también mostraron una profunda separación entre cenotes y humedales, lo que sugiere que la separación entre ellos ocurrió hace mucho tiempo. La marcada estructura poblacional de *P. orri* entre los cuerpos de agua permanentes y temporales obedece también a características biológicas propias de la especie, pues los individuos podrían no ser capaces de resistir cambios drásticos de ciertos factores abióticos, en particular de concentración de oxígeno disuelto y salinidad. Por ello, los dos grupos de poblaciones (linajes) pueden considerarse unidades evolutivamente independientes, sobre todo por los altos valores de divergencia que presentan, los cuales fueron incluso mayores que los de su especie hermana, *Poecilia gilli*.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Estructuración genética de poblaciones naturales

En términos de genética poblacional, el concepto de población se refiere a un grupo de individuos pertenecientes a la misma especie, viviendo en un área geográfica restringida en la que cualquier miembro de la población puede cruzarse con otro. A menudo, la distribución geográfica de las poblaciones no es homogénea, pues su distribución geográfica se encuentra condicionada por factores ambientales favorables para la supervivencia, o bien pueden llegar a ser fragmentadas a causa de algún fenómeno natural (Hartl y Clark, 1997; Hedrick, 2000). De acuerdo a su distribución geográfica, se reconocen cuatro modelos básicos en los que las poblaciones pueden llegar a estructurarse: como una población entera que consiste en una sola unidad panmíctica (modelo panmíctico); en una serie de pequeñas subpoblaciones, cada una aislada de otras subpoblaciones y con cierto número de migrantes entre cada una de ellas (modelo de steppinig-stone o modelo de islas); constituir una población continua en donde los individuos sólo intercambian genes con los individuos geográficamente más cercanos (modelo de aislamiento por distancia) (Hillis y Moritz, 1990); o bien en una población con diferentes subdivisiones en un hábitat fragmentado, en el cual la ausencia de una población es determinada por extinción y cuya presencia es determinada por recolonización de otra subpoblación (Metapoblación) (Hedrick, 2000). Estos cuatro diferentes modelos de estructuración poblacional resultan en diferentes patrones de diferenciación genética dentro y entre localidades geográficas (Hillis y Moritz, 1990). La diferenciación o estructuración genética se refiere a la adquisición de frecuencias alélicas que difieren entre las subpoblaciones (Hartl y Clark, 1997). Así, la estructura génica (alélica) de una población se define como las diferencias en las frecuencias de los alelos en cada locus evaluado dentro de las poblaciones de una especie; las frecuencias genotípicas, es decir la frecuencia con la que se presenten genotipos homocigos o heterocigos en la población, definen la estructura genotípica de la población (Jaquard, 1974).

El análisis de la variación de secuencias de ADN provee información sobre los procesos genéticos que ocurren dentro de las poblaciones de una especie. Así, la distribución de las diferencias entre las secuencias muestreadas de una población permite reconstruir la estructura filogenética, la cual representa la historia de dichos genes dentro de las poblaciones de una especie (Slatkin y Hudson, 1991).

Existen métodos indirectos con los que, por medio de caracteres cuantitativos de marcadores moleculares, es posible evaluar la estructura genética de las poblaciones; los estimadores más comúnmente usados son la  $F_{ST}$  (Wright, 1951), como medida de las diferencias genéticas entre

subpoblaciones, y la  $G_{ST}$  (Nei, 1973) que es un coeficiente de diferenciación genética para múltiples loci (Hedrick, 2000); otros estimadores son los estadísticos de secuencia, como  $Y_{ST}$  (Nei, 1982) y  $N_{ST}$  (Lynch y Crease, 1990) los cuales se basan en el número de diferencias entre secuencias (Hudson et al., 1992 a).

## **2.2. Marcadores moleculares**

Los marcadores moleculares son secuencias de ADN heredables con múltiples estados de carácter. Dichas diferencias genéticas están influenciadas por la biología de los individuos y por circunstancias externas que afectan a los individuos de una población, tales como patrones de reproducción, migración, tamaño de población y eventos históricos, todo lo cual se relaciona con la adecuación y la divergencia de las especies (Parker et al., 1998; Sunnucks, 2000). Los marcadores moleculares han sido usados para el estudio de la estructura genética de poblaciones, de relaciones filogenéticas entre taxa, en estudios taxonómicos, en el estudio de relaciones de parentesco y de identidad individual; han sido también ampliamente utilizados en el estudio de conservación de especies y en análisis de tipo conductual (Hillis y Moritz, 1990; Avise, 1992, 1994, 1995; Taberlet, 1996; Parker et al., 1998). A la fecha se han descrito y estudiado un gran número de marcadores moleculares, siendo los más usados las enzimas de restricción, los RFLP's, los minisatélites, los microsátélites y la secuenciación de diferentes genes pertenecientes al ADN mitocondrial (ADNmt) (Avise, 1994; Parker et al., 1998; Sunnucks, 2000).

Los análisis de polimorfismos del ADNmt han sido usados comúnmente como marcadores moleculares para evaluar las relaciones filogenéticas entre especies cercanamente relacionadas y entre poblaciones, así como en la estimación de tiempos de divergencia entre especies y entre poblaciones; en la estimación de flujo génico y en la estructuración poblacional de las especies (Hillis y Moritz, 1990; Avise, 1994, 1995; Taberlet, 1996; Sunnucks, 2000).

## **2.3. El ADN mitocondrial (ADNmt)**

EL ADNmt está conformado por una cadena doble circular y cerrada. Cada mitocondria tiene de cinco a 10 copias, con 15-20 kilobases de largo, compuesto por 37 genes codificantes, de los cuales 22 codifican para ARNs de transferencia (tARNs), 2 para ARNs ribosomales (rARNs) y 13 para ARNs mensajeros (mARNs), específicamente para proteínas involucradas en el transporte de electrones y fosforilación oxidativa. Además de una "región control", con cerca de 1 kb de largo, región en la cual se inicia la replicación y la transcripción. En vertebrados y equinodermos, el d-loop (porción más pequeña dentro de la región control) es el fragmento más variable del genoma mitocondrial (Avise, 1994; Taberlet, 1996; Parker et al., 1998).

La mayor parte del genoma mitocondrial son secuencias codificantes (ca. 90-95%), mientras que las secuencias no codificantes como intrones, familias de DNA repetitivo, pseudogenes y secuencias espaciadoras pueden llegar a ser raras o ausentes (Awise, 1994). El ADNmt evoluciona rápidamente a nivel de secuencias (con una tasa mutacional  $\mu = 5-10$ ), debido a la ausencia de algunos mecanismos reparadores conocidos para mutaciones que puedan surgir durante la replicación. Algunas secuencias en la región control evolucionan con excepcional rapidez y su utilidad ha sido probada en análisis de alta resolución de estructura poblacional (Awise, 1994; Taberlet, 1996).

El ADNmt es transmitido a través del linaje materno en muchas especies, ya que es un genoma no recombinante, es decir, que es transmitido asexualmente a través de la madre y su linaje. Por ello el genotipo del ADNmt es referido como *clones o haplotipos*, y sus interrelaciones evolutivas se interpretan como estimados de *filogenia matriarcal*. Desde una perspectiva filogenética, la molécula de ADNmt representa una unidad genealógica no recombinante con múltiples alelos (Awise et al., 1987; Awise, 1994; Taberlet, 1996).

#### **2.4. La región control o d-loop**

La región control, con 1 kb de largo, es la región del genoma mitocondrial en la cual se inicia la replicación y la transcripción. Contiene además bloques de secuencias variables que evolucionan cerca de cuatro a cinco veces más rápido que la molécula completa de ADNmt. Estas secuencias se usan en el estudio de especies cercanamente relacionadas o en poblaciones coespecíficas (Awise, 1994; Taberlet, 1996).

En vertebrados, la región control se encuentra dividida en tres dominios: 1) el dominio izquierdo (o extremo 5') conteniendo una o más secuencias asociadas a la terminación, llamadas TAS (termination-associated sequences), en donde la síntesis de la "cadena pesada" (de 3' a 5') se detiene; 2) la región central conservada, rica en bases C-G, la cual se encuentra implicada en la regulación de la replicación de la "cadena pesada"; y 3) el dominio derecho (o extremo 3') que contiene el sitio de iniciación de replicación de la "cadena pesada" ( $O_H$ ) y de dos a tres bloques de secuencias cortas conservadas.

El loop de desplazamiento o d-loop (Fig. 1) representa la parte de la región control que gira el sitio de iniciación de replicación de la cadena pesada ( $O_H$ ) a las secuencias asociadas a la terminación (TAS), y corresponde a una estructura de tres cadenas que involucra las dos cadenas preexistentes más la cadena pesada que se está replicando. La importancia funcional de los dominios izquierdo y derecho es que ambos evolucionan rápidamente, por mutaciones en su longitud y por sustitución de bases. La distribución de inserciones y deleciones en la región control pueden cambiar entre especies (Fumagalli et al., 1996; Taberlet, 1996).

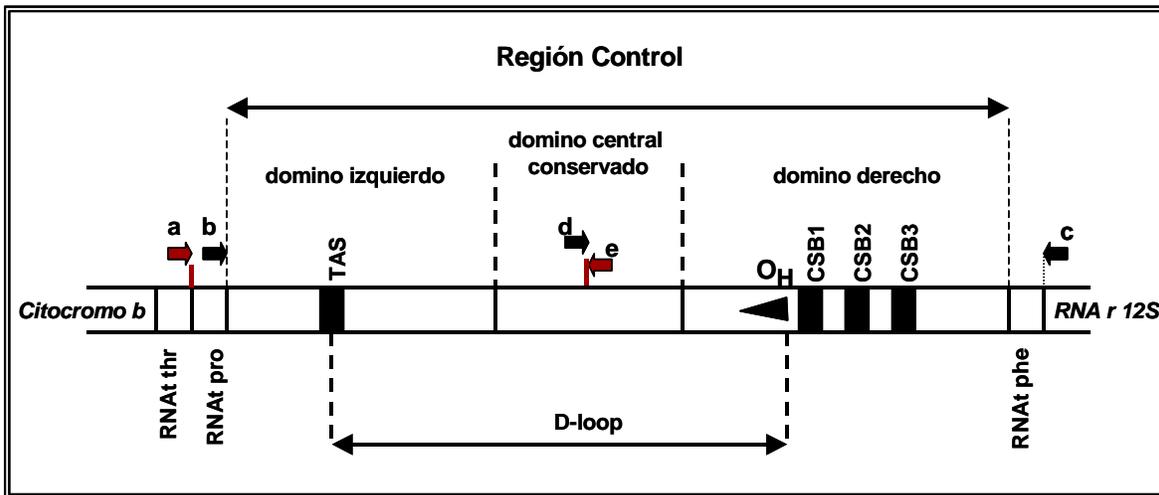


Fig. 1. Diagrama esquemático de la región control y d-loop del ADN mitocondrial en mamíferos y ubicación de primers universales para vertebrados. a) L15926, b) L16007, c) H00651, d) L16517 y e) H16498 (Taberlet, 1996). Las flechas rojas representan los primers usados para amplificar el fragmento de d-loop en este trabajo.

Los genes mitocondriales tienen un tamaño efectivo de población ( $N_e$ ) menor (aproximadamente una cuarta parte) respecto de los genes nucleares; esta media de genes mitocondriales se encuentran más afectados por deriva génica que los genes nucleares, resultando en una pérdida más rápida de diversidad en subpoblaciones aisladas pequeñas y una tasa más rápida de diferenciación entre subpoblaciones (Hughes et al., 1999; Sunnucks, 2000). Es por esto que los genes mitocondriales pueden ser más sensibles que los marcadores de ADN nuclear para la detección de dispersión limitada entre subpoblaciones (Hughes et al., 1999). Los estudios de secuenciación del ADNmt y en este caso de la región control pueden revelar la distribución geográfica de la variación genética de los haplotipos encontrados en diferentes poblaciones, y así permitir la construcción de filogenias de haplotipos, las cuales nos dan una aproximación de la filogeografía molecular de las poblaciones (Newton et al., 1999; Taberlet, 1996; Sunnucks, 2000). El ADNmt ha sido usado para examinar la estructura poblacional de diversas especies, infiriendo el nivel y patrón de dispersión entre subpoblaciones y su grado de aislamiento. En particular, los peces han sido ampliamente estudiados con ADNmt, mayormente sobre estructuración genética (Baer, 1998; Breden et al., 1999; Hughes et al., 1999; Hamilton, 2001; Hulseley et al., 2004; López-Fernández et al., 2005).

## 2.5. Peces poecílicos

La familia Poeciliidae (guayacones, topotes, livebearers) incluye a uno de los grupos de peces más dominantes en las tierras bajas y en aguas salobres de América Central y del oeste de la India. Se distribuyen desde el este de los Estados Unidos hasta el noreste de Argentina e incluye aproximadamente a 22 géneros y 180 especies. Son peces pequeños cuya longitud va de 30 a 70 mm, 200 mm es la talla máxima. Presentan fertilización interna por medio de un gonopodio masculino (espinas anales 3-5 modificadas); los caracteres gonopodiales son usados con propósitos taxonómicos, y en algunas especies es indispensable examinar a los machos para su identificación. Las hembras permanecen aisladas de los machos por más de 10 meses, produciendo camadas sucesivas, en el proceso llamado superfetación, en el que dos o más camadas de diferentes estados se desarrollan en una misma hembra, la cual pare a sus crías vivas (Miller, 2005).

## 2.6. *Poecilia orri* Fowler, 1943

*P. orri* es la especie más pequeña de la familia, con longitud máxima de 90 mm (Miller, 2005). Presentan un gonopodio con una prominencia membranosa a manera de prepucio; de éste, el tercer radio lleva un gancho muy pequeño y presenta procesos largos más o menos espinosos que semejan una sierra bien definida en el margen posterior. La aleta dorsal es equidistante de la parte post-orbital de la cabeza y de la base caudal (Fig. 2). Los dientes mandibulares de la serie externa son pequeños y cónicos (Gamboa-Pérez, 1992). Son de origen neotropical y se distribuyen, en México, en la provincia íctica del Usumacinta, en las costas del Caribe en Quintana Roo (Gamboa-Pérez, 1992; Miller, 2005). En Centro América, al sur y al este de la Laguna de Brus, al noreste de Honduras, incluyendo las Islas Bay; al norte de Honduras, Colombia y este de Nicaragua (Miller, 2005) (Fig. 3).

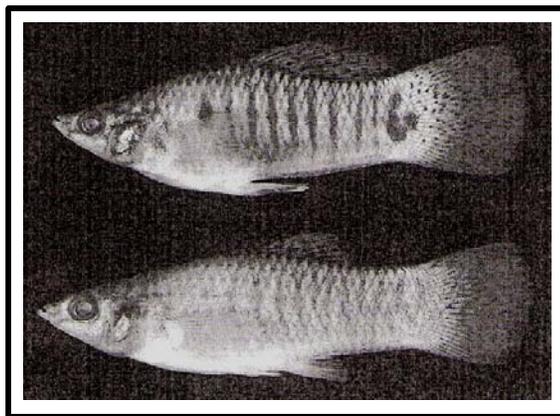


Fig. 2. *Poecilia orri*, Fowler, 1973. Macho (superior) 41 mm y hembra (inferior) 43 mm. Río Belice (Miller, 2005).

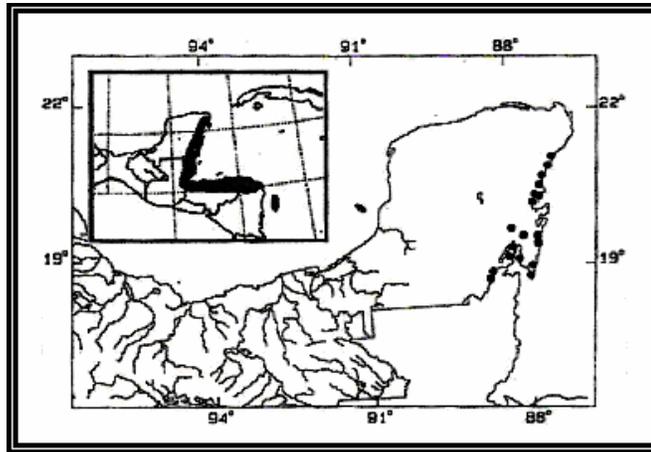


Fig. 3. Distribución en México y total (recuadro) de *Poecilia orri*, (Miller, 2005)

Esta especie habita playas arenosas, arrecifes de coral, lagunas costeras, estuarios, cenotes, marismas de mangle, en las corrientes de ríos desde donde se desplazan a pequeños arroyos y riachuelos de agua dulce, aunque también habitan en agua salobre a salada, de clara a turbia y en fondos arenosos, rocosos, lodosos, con limo, con pequeñas conchas o residuos de hojas; así como sitios con algas y lirios como vegetación y en manglares. Se encuentran comúnmente por debajo de un metro de profundidad (Miller, 2005). Presentan fecundación interna, son ovovivíparos y comen desde algas microscópicas hasta pequeños crustáceos e insectos (Gamboa-Pérez, 1992).

Sus hábitos de alimentación son muy similares a los de *Gambusia yucatanana*, especie con la cual frecuentemente se encuentra en simpatria (Miller, 2005). Asimismo, *P. orri* y *G. yucatanana* son de las especies más ampliamente distribuidas en el estado de Quintana Roo, y son capaces de colonizar favorablemente ambientes extremos (Meffe y Snelson, 1989; Gamboa-Pérez, 1992; García-Bedolla, 2004).

## 2.7. Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

El estado de Quintana Roo se localiza en la porción nororiental de la península de Yucatán, con una superficie de 50,840 km<sup>2</sup>, ubicado en una planicie de origen marino formada por rocas sedimentarias del cenozoico (Mioceno y Pleistoceno), con predominio de calizas, por lo que el relieve cárstico es característico. No existen corrientes de agua superficiales relevantes en el estado.

En toda la península de Yucatán el agua se infiltra y da origen a desplazamientos subterráneos, que se manifiestan en una gran diversidad de cuerpos de agua como cenotes, lagunas, charcas, marismas y petenes; además de la larga fractura que origina el Río Hondo, cuyo cauce natural constituye la línea fronteriza entre México y Belice (López, 1983; Gamboa-Pérez, 1992).

Quintana Roo se encuentra dentro de la provincia Ictio-limnológica del Usumacinta, la cual está ubicada completamente en la vertiente atlántica, con límite noroccidental en la cuenca del Río Papaloapan en México y el límite meridional entre las cuencas del Río Coco y Prinzapolka en el norte de Nicaragua. La provincia se caracteriza por contener un gran número de especies endémicas y derivados marinos que penetran en aguas continentales. La provincia contiene 145 especies de peces de agua dulce, pertenecientes a 34 géneros y 10 familias (Gamboa-Pérez, 1992).

La Reserva de Sian Ka'an (Fig. 4) se localiza en el litoral central del estado de Quintana Roo, en los municipios de Felipe Carrillo Puerto, Cozumel y Solidaridad, entre los 20°07'48" y 18°54'00" de latitud norte y los 88°12'12" y 87°24'36" de longitud oeste (García-Bedolla, 2004). Su superficie es de 528,147 ha, de las cuales 120,000 son marinas (INE, 1996a) y sus límites coinciden con fronteras naturales, donde el límite oriental es el mar Caribe y abarca las dos grandes bahías y la barrera de arrecifes hasta los 50 m de profundidad en la plataforma continental. Al suroeste los límites son las marismas con las selvas subperinifolias, al sur la línea divisoria de los municipios de Felipe Carrillo Puerto y Othón P. Blanco (19°05'00") y al noroeste los límites son políticos, marcados por los linderos de los ejidos Pino Suárez y Chunyaxche (López, 1983; INE, 1996a, 1996b). Cuenta con diversos ambientes marinos representativos de las costas de Quintana Roo, incluyendo playas arenosas, manglares, bahías someras, playas rocosas, marismas y arrecifes con una alta diversidad de especies. Los cenotes, humedales y pozas temporales son ambientes que se encuentran sujetos a la marcada temporalidad del ciclo hídrico de la región. En temporada de lluvias la mayor parte del terreno se encuentra inundado, mientras que en temporada de secas el agua acumulada se evapora. El clima es de tipo cálido-subhúmedo con lluvias en verano; la precipitación anual fluctúa entre 1100 y 1200 mm, 70% ocurre entre los meses de mayo a octubre y el restante durante el periodo de sequía. Presenta un periodo de ciclones de junio a noviembre (López, 1983; INE, 1995).

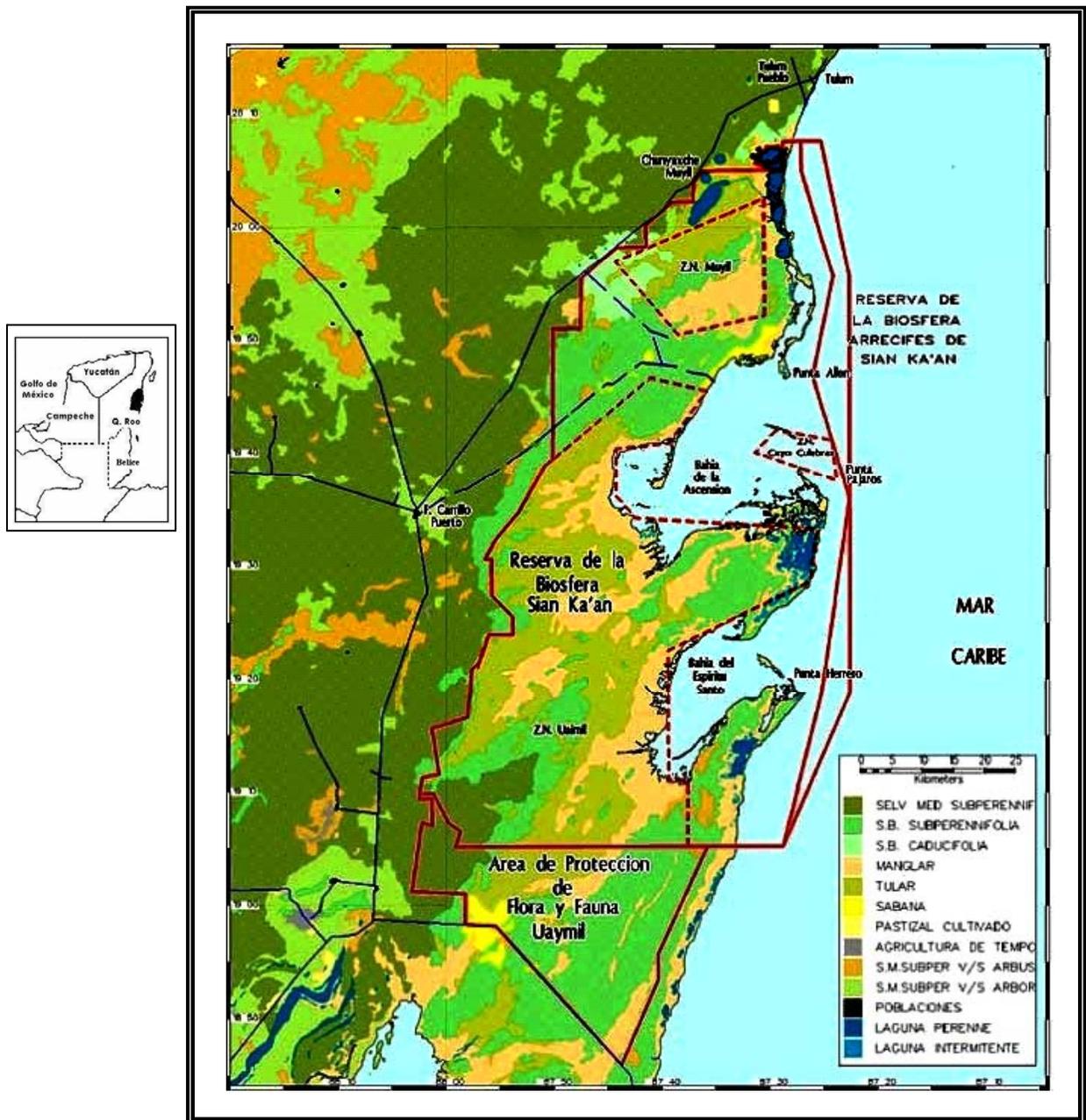


Fig. 4. La Reserva de la Biosfera Sian Ka'an ubicada en el estado de Quintana Roo, entre los 20°07'48" y 18°54'00" de latitud norte y entre los 88°12'12" y 87°24'36" de longitud oeste.

(<http://effectivempa.noaa.gov/sites/siankaan.html>)

## **2.8. Cuerpos de agua (cenotes, humedales y marismas)**

Los cenotes, característicos de la península de Yucatán, son cuerpos de agua en forma de pozos, que se forman cuando el agua de lluvia se filtra a través del sustrato poroso, el cual, al colapsarse debido a procesos de disolución, forma cuerpos de agua subterráneos (Pearse, 1936; López, 1983; Zambrano et al., 2006). Son generalmente profundos con fondos rocosos o arenosos, algunos pueden estar interconectados subterráneamente o conectados con otros tipos de cuerpos de agua o con el mar (Pearse, 1936). Debido a su origen geológico los cenotes son sistemas estables en cuanto a sus características limnéticas y, dado que no se encuentran sujetos a la estacionalidad del régimen hídrico de la región, su aporte de agua puede ser estable durante todo el año con profundidad constante, excepto en cenotes con profundidades muy someras (Zambrano et al., 2006). Hall (1936) reconoce dos tipos de cenotes en cuanto a la estratificación de sus condiciones limnéticas: los cenotes estratificados son aquellos que presentan gradientes de temperatura y de oxígeno disuelto conforme la profundidad va aumentando, mientras que los cenotes no estratificados son aquellos donde la temperatura y el oxígeno disuelto son uniformes a cualquier profundidad. Dicha uniformidad se atribuye al contacto que tienen este tipo de cenotes con otros cuerpos de agua.

Los humedales son cuerpos de agua someros que usualmente se encuentran entre ecosistemas terrestres como bosques o pastizales y otros sistemas acuáticos, como lagos profundos y océanos, por lo que cada humedal posee características diferentes de acuerdo con el tipo de sistema terrestre y acuático de los que estén rodeados, por lo que se consideran como zonas de transición. Por ello, este tipo de ecosistemas presentan gran diversidad de especies, en los que se pueden encontrar organismos de agua dulce, salobre y salada (Mitsch y Gosselink, 1986). La composición de los humedales depende de factores tales como el sedimento, la vegetación, la temporalidad de la zona y de condiciones fisicoquímicas propias de cada sistema, como niveles de oxígeno, conductividad, temperaturas extremas y desecación (Ortega-Mayagoitia et al., 2002).

Los humedales son sistemas sujetos a la temporalidad de las zonas geográficas en donde se encuentran, por lo que dependen en gran medida del aporte de agua que les brinda la temporada de lluvias (Mitsch y Gosselink, 1986; Zambrano et al., 2006), en la cual los humedales pueden llegar a desbordarse, estableciendo conexiones temporales con otras pozas de agua, facilitando así la dispersión de poblaciones de peces dentro y entre los humedales (Snoodgrass et al., 1996).

### 3. ANTECEDENTES

En los estudios realizados por García-Bedolla (2004) y Zambrano et al. (2006) se evaluó la dinámica estacional de distintos cuerpos de agua dulce de la Reserva de Sian Ka'an (cenotes permanentes con y sin vegetación, cenotes temporales y humedales) y la relación entre las condiciones limnéticas (temperatura, profundidad, salinidad, oxígeno disuelto, turbidez y pH) y la estructura de la comunidad de los peces que los habitan (riqueza de especies, abundancia y talla individual). Sus resultados muestran que los sistemas acuáticos estudiados se dividen en relación directa con las características limnéticas, y que los humedales y los cenotes temporales son los cuerpos de agua cuya dinámica se encuentra más influenciada por la estacionalidad de la región. Los humedales y los cenotes temporales se inundan durante la temporada de lluvias y pueden llegar a conectarse con otros cuerpos de agua, mientras que los cenotes permanentes son sistemas acuáticos más estables, en los que las condiciones limnéticas permanecen relativamente sin cambio durante todo el año, dado su aporte de agua constante.

Los humedales y los cenotes con vegetación presentan una estructura mucho más compleja, ya que proveen diferentes tipos de microhábitat acuáticos, debido a que presentan mayor diversidad de plantas acuáticas. Los sistemas con mayor diversidad y riqueza específica de peces son los humedales, mientras que los menos diversos y con menor riqueza son los cenotes con y sin vegetación, respectivamente (García-Bedolla, 2004; Zambrano et al., 2006).

En cuanto a la comunidad de peces en la zona de estudio, la familia Poeciliidae es la mejor representada en cuanto a número de especies y número de organismos; asimismo, están mejor representados en los cuerpos de agua someros que en los cenotes de mayor profundidad (García-Bedolla, 2004).

La información sobre la estructura poblacional de las especies de peces en los cuerpos de agua de la Reserva de Sian Ka'an son particularmente escasos. En un estudio realizado por Hernández-Valdés (2006), en el cual analizó la diversidad y estructura genética de dos especies de poecílicos (*Poecilia orri* y *Gambusia yucatanana*) en cuerpos de agua permanentes (cenotes) y temporales (humedales) de dicha reserva, encontró poca diferenciación dentro y entre poblaciones (diferentes cuerpos de agua) para *G. yucatanana*, el número de migrantes fue alto y no hubo correlación entre distancia genética y geográfica. Por el contrario, respecto a *P. orri*, encontró valores altos y significativos de diferenciación genética entre poblaciones, un bajo número de migrantes y una correlación significativa entre distancia genética y geográfica.

Los resultados de dicho estudio se relacionan más con la biología de cada especie y a diferencias ecológicas que a las diferencias limnéticas entre los cuerpos de agua; esto es porque *Gambusia yucatanana* es la especie más vágil y eurihalina del género y es capaz de soportar condiciones ambientales extremas, a diferencia de *Poecilia orri*, la cual se sugiere es menos vágil y se sabe que no soporta condiciones ambientales extremas. Por ello, el propósito del presente trabajo es analizar la estructura genética poblacional de *P. orri* con ADNmt, un marcador que, en comparación con los microsatélites, presenta una tasa mutacional relativamente más baja, lo que nos permitirá evaluar las poblaciones de *P. orri* desde una escala temporal más amplia.

## 4. OBJETIVOS

### General

- Evaluar la diversidad genética y estructura poblacional de *Poecilia orri* en diferentes cuerpos de agua de la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an.

### Particulares

- Estimar los niveles de diversidad genética de *P. orri* por medio del ADNmt (d-loop).
- Estimar la estructuración genética y grado de aislamiento entre las poblaciones de *P. orri* de diferentes cuerpos de agua.
- Evaluar las diferencias en los patrones genéticos entre cuerpos de agua con características bióticas y abióticas contrastantes (cenotes con y sin vegetación y humedales).

## 5. MATERIALES Y MÉTODO

### 5.1. Sitio de estudio y colecta

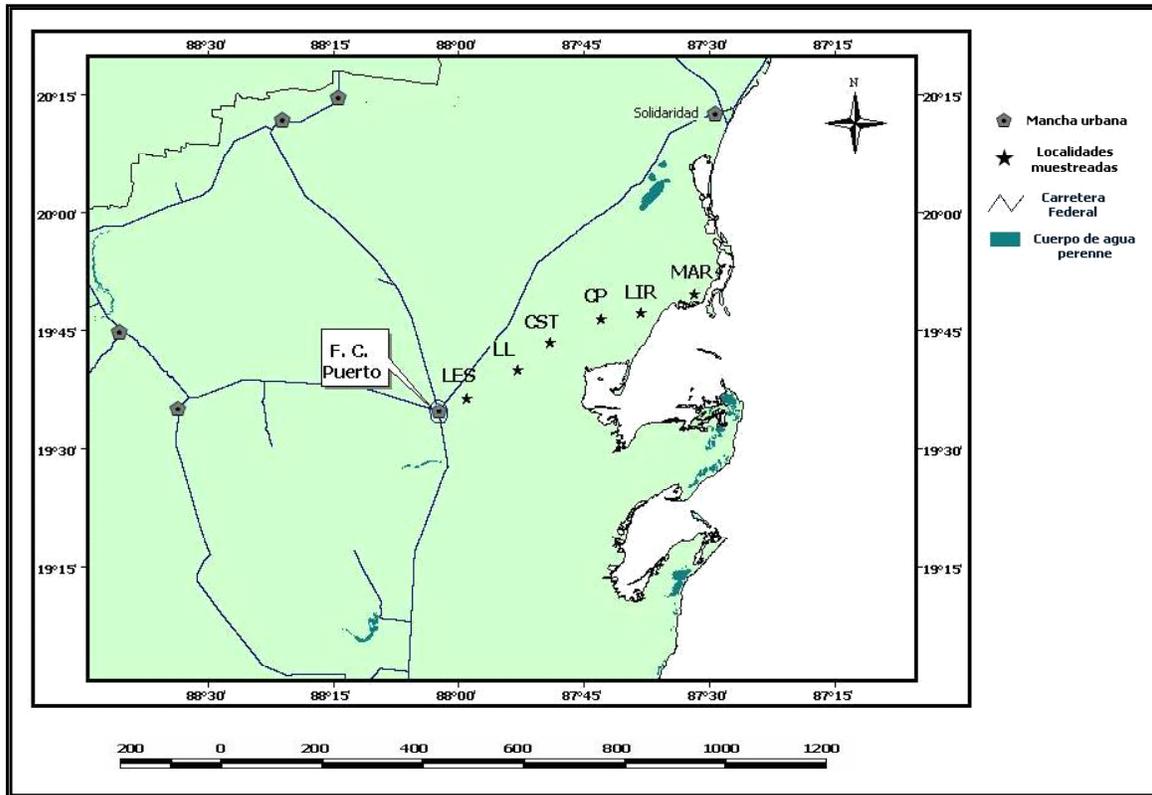
Los ejemplares de *Poecilia orri* usados en este estudio se colectaron en la zona central de la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an, como parte de otros estudios enfocados a evaluar la distribución de las especies dentro de la reserva y su relación con condiciones limnéticas de los cuerpos de agua colectados (García-Bedolla, 2004), así como la dinámica estacional de los cuerpos de agua y la estructura poblacional de las especies de peces que los habitan (Zambrano et al., 2006).

La colecta se realizó entre octubre del 2001 y abril del 2003, en seis cuerpos de agua, tres temporales (humedales) y tres perennes (cenotes). Los sitios de colecta se ubicaron a lo largo del camino que va del ejido de Felipe Carrillo Puerto a Vigía Chico y de la bifurcación de éste a Punta Allen (Fig. 5). Tres de los cuerpos de agua colectados se localizan dentro de la Reserva y tres en los límites entre el Ejido y la reserva (zona de amortiguamiento). Se realizaron dos colectas en temporada de lluvias (octubre-noviembre) y dos en temporada de secas (abril-mayo).

Para definir el tipo de cuerpo de agua se usó la nomenclatura de Pearse (1936) modificada por Zambrano et al., (2006) en: 1) Cenotes con vegetación (cenotes viejos), 2) Cenotes sin vegetación (cenotes jóvenes) y 3) Humedales (Tabla 1; Fig. 5). El humedal Cenote Petén es un caso especial, ya que cuando se seca, queda un pequeño cuerpo de agua remanente, el cual perdura durante la temporada de sequía.

**Tabla 1.** Sitios de estudio, con el nombre dado en campo y el tipo de cuerpo de agua.

<b>Nombre del Sitio</b>	<b>Tipo de cuerpo de agua</b>
Lago Exterior Sur	cenote con vegetación
Lago Limite	cenote con vegetación
Cenote Santa Teresa	cenote sin vegetación
Cenote Petén	humedal
Los Lirios	humedal
Marisma	humedal



**Fig. 5.** Localidades muestreadas en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an. LES (Lago Exterior Sur); LL (Lago Limite); CST (Cenote Santa Teresa); CP (Cenote Petén); LIR (Los Lirios), MAR (Marisma); F. C. Puerto (Felipe Carrillo Puerto)

Los ejemplares se colectaron por medio de tres diferentes artes de pesca: nasas, anzuelos y chinchorro. Las nasas son trampas de alambre o nylon con dos orificios a los lados, por los cuales los peces pueden entrar pero les es imposible salir. Las nasas se dejaron durante 24 horas en cada cuerpo de agua, con el fin de capturar a los peces que tienen diferentes hábitos durante el día. Las trampas se colocaron en lugares someros, pues son sitios ideales para colectar peces en lugares con vegetación. Los anzuelos fueron usados para capturar peces de mayor talla, para los cuales las nasas no son adecuadas; y el chinchorro se utilizó principalmente para asegurar que ninguna especie dejara de ser colectada (García-Bedolla, 2004).

Los ejemplares capturados fueron pesados en una balanza electrónica con precisión de 0.01 g. Se registró la longitud patrón para cada pez, que va de la punta del hocico hasta donde termina el pedúnculo caudal. Los peces colectados fueron identificados en campo y laboratorio siguiendo las claves taxonómicas especializadas en peces del sureste mexicano y de Centroamérica de Greenfield y Thomerson (1997) y Schmitter-Soto (1998).

Los peces colectados se fijaron en campo con formaldehído al 70% para su traslado al laboratorio, donde se lavaron con agua y se preservaron en alcohol al 70% para posteriormente ingresar los ejemplares a la Colección Nacional de Peces (CNPE) del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los sitios de colecta y el número total de individuos por cuerpo de agua usados en este estudio se muestran en la tabla 2.

De una submuestra de los individuos colectados de *Poecilia orri* se tomaron muestras de cola, escamas o músculo, las cuales se guardaron en tubos eppendorf de 1.5 ml y se preservaron en etanol al 97% y a una temperatura de -20°C para su posterior el análisis genético.

**Tabla 2.** Sitios de colecta, ubicación y número de ejemplares usados para obtener las secuencias del fragmento d-loop (ADNmt).

Sitio de colecta	Clave	Ubicación		No. de ejemplares
		Longitud Oeste	Latitud Norte	
Lago Exterior Sur	LES	87° 59' 17.20"	19° 36' 23.30"	2
Lago Límite	LL	87° 52' 51.47"	19° 40' 04.30"	3
Cenote Santa Teresa	CST	87° 48' 46.00"	19° 43' 23.77"	7
Cenote Petén	CP	87° 41' 83.00"	19° 46' 23.00"	4
Los Lirios	LIR	87° 37' 19.33"	19° 47' 08.95"	3
Marisma	MAR	87° 30' 40.36"	19° 49' 36.36"	5

## 5.2. Trabajo de laboratorio

### *Extracción de ADN*

Realicé la extracción de ADN a partir de tejido preservado en etanol al 97% (músculo, aletas y escamas) siguiendo el protocolo del Kit Aqua Pure Genomic DNA Tissue Kit (Laboratorios Biorad, Hercules, CA) (ver el Anexo 1 para una explicación detallada del procedimiento).

Para la reacción de secuenciación es importante que el ADN extraído se encuentre lo más puro posible, ya que de esto depende la calidad de la secuencia. Para comprobar la pureza y la concentración del ADN, cuantifiqué las muestras extraídas con un Biofotómetro Eppendorf, el cual proporciona la concentración del ADN extraído en nanogramos por microlitro (ng/μl), una medida de densidad óptica (A<sub>260/280</sub> nm) y una de pureza (A<sub>320</sub> nm) (ver Anexo 2), ambas presentan rangos ideales que nos

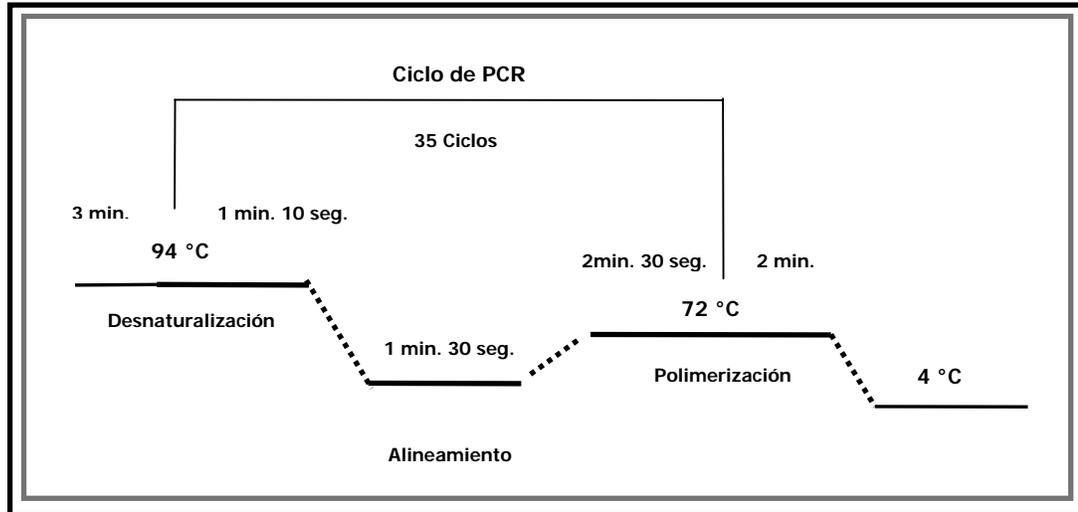
indican la pureza del ADN extraído. Cuando alguna muestra no se encontraba dentro de los rangos ideales fue necesario purificar el ADN nuevamente (Anexo 3).

*Amplificación del Fragmento de ADN mitocondrial (d-loop) por medio de PCR*

Amplifiqué el fragmento de ADN mitocondrial (d-loop) con los oligonucleótidos (primers) L15926 (Kocher et al., 1989) y H16498 (Meyer et al., 1990), ambos elaborados por los laboratorios Invitrogen (Brasil). La amplificación del fragmento d-loop se logró con las condiciones generales descritas en la tabla 3, con algunas variantes en cuanto a la concentración de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), las cuales oscilaron entre 3.0 y 3.3 mM; los primers tuvieron concentraciones de 0.4 y 0.6  $\mu M$  y la temperatura de alineación fue de 53 y 54°C. Trabajé el ADN con la concentración descrita en la tabla 3, sin embargo para algunas muestras fue necesario diluirlo (1:5, 1:10 y 1:20) para mejorar la calidad de la secuencia. Hice la amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en un Termociclador PTC-100 (M. J. Research, Waltham, MA), en un volumen de 50  $\mu l$ ; el procedimiento constó de 35 ciclos a 94°C por 70 segundos, 53°C por 90 segundos y 72°C por 120 segundos, como se describe en la figura 6.

**Tabla 3.** Condiciones generales para la amplificación del fragmento d-loop.

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>
Buffer	5.0 mM
$MgCl_2$	3.0 mM
dNTP´s	0.1 $\mu M$
Oligonucleótidos (Primers)	0.4 $\mu M$
Taq Platinum	0.03 U/ $\mu l$
DNA	~ 100 $\mu g/\mu l$



**Fig. 6.** Reacción de amplificación para el fragmento d-loop (ADNmt).

Visualicé la banda del ADN amplificado por medio de geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) (Anexo 4). Para algunas muestras realicé la purificación siguiendo el protocolo para el Kit de purificación de PCR, QUIAquick PCR Purification Kit (250) de los laboratorios QIAGEN (Anexo 5). Las muestras purificadas y de mejor calidad se enviaron a secuenciar en el Instituto de Biología, UNAM con un secuenciador Applied Biosystems 3100 Genetic Analyzer de 16 capilares, mientras que las muestras de menor calidad se enviaron a Macrogen Inc. (Corea, Japón) en un secuenciador Automático 3730xl.

### 5.3. Análisis genéticos

Con las secuencias obtenidas realicé un BLAST por medio del GenBank para asegurarme que el fragmento secuenciado perteneciera a la región d-loop de *Poecilia orri*. Hice la alineación de secuencias a ojo con el programa Bioedit v.7.0 (Hall, 1999) y comprobé su correcta alineación comparándolas con secuencias de la misma especie tomadas del GenBank; además hice un múltiple alineamiento en Bioedit v.7.0 implementando CLUSTALW para descartar errores de alineamiento a ojo.

Posteriormente, con el propósito de descartar procesos de selección natural, que pudieran afectar los patrones de polimorfismo dentro de las poblaciones, realicé pruebas de neutralidad utilizando los estadísticos  $D$  y  $F$  (Fu y Li, 1993); el primero se basa en las diferencias entre el número total de singletons ( $\pi_s$ ; mutaciones que aparecen sólo una vez entre las secuencias) y el número total de

mutaciones ( $\eta$ ), mientras que el segundo se basa en las diferencias entre el número total de singletons y la media del número de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias ( $k$ ). Otro índice que calculé para evaluar neutralidad fue la  $D$  de Tajima (Tajima, 1989), basada en las diferencias entre los sitios segregantes ( $S$ ) y la media del número de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias ( $\pi$ ). Estos análisis los realicé utilizando el programa DnaSP v.4.10 (Rozas et al., 2003).

### *Diversidad genética*

Para evaluar niveles de diversidad genética en las poblaciones de los diferentes cuerpos de agua, estimé la diversidad haplotípica ( $h$ ), que es considerada como una medida de heterocigosidad media (proporción de los heterócigos por locus en una población que se reproduce al azar; Nei, 1987) y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), definida como la media del número de cualquier diferencia nucleotídica o sustitución por sitio para un grupo de secuencias (alelos) de ADN muestreadas (Nei, 1987; Nei y Miller, 1990). Comúnmente se estima la diversidad nucleotídica con la corrección Jukes y Cantor (1969), donde las diferencias observadas son convertidas a la media del número de sustituciones nucleotídicas por sitio ( $\delta_{xy}$ ) entre dos secuencias (Lynch y Crease, 1990). Para ello utilicé también el programa DnaSP v.4.10.

### *Diferenciación entre poblaciones y estructura genética*

Para evaluar la diferenciación entre poblaciones, calculé la divergencia nucleotídica como la media del número de sustituciones nucleotídicas por sitio entre diferentes poblaciones ( $D_{X1}$ ) así como el número de sustituciones nucleotídicas netas por sitio entre poblaciones ( $D_a$ ), ambas con la corrección Jukes y Cantor (1969) (Nei, 1987). También estimé la diferenciación genética entre todas las localidades, basada en las frecuencias haplotípicas (Hs) de cada cuerpo de agua, en donde cada haplotipo es considerado como un alelo; ello a través de una de  $\chi^2$  (Nei, 1987; Hudson et al., 1992a), utilizando DnaSP v.4.10.

Como medidas de diferenciación genética entre subpoblaciones estimé la  $F_{ST}$  (Wright, 1951), la cual estima la frecuencia de los alelos en cada locus en diferentes subpoblaciones (en este caso entre cuerpos de agua). También estimé el estadístico de secuencia  $Y_{ST}$  (Nei, 1982), el cual toma en cuenta el número de diferencias entre secuencias, incluyendo comparaciones de las subpoblaciones con ellas mismas (Hudson et al., 1992a; Lynch y Crease, 1990). Con base en estos estimadores de divergencia

calculé la  $Nm$ , que determina el número efectivo de individuos migrantes por generación (Hudson et al., 1992b; Templeton et al., 1995), para lo cual utilicé DnaSP v.4.10.

Como otra forma de evaluar la diferenciación estimé las distancias genéticas entre los cuerpos de agua, con el programa MEGA v.3.1 (Kumar et al., 2004); ello con base en el modelo de distancia Kimura dos parámetros (Kimura, 1980), tomando en cuenta las transversiones y las transiciones y con 1 000 réplicas de bootstrap, calculadas según Nei y Kumar (2000).

Realicé una prueba de Mantel, con el propósito de evaluar aislamiento por distancia entre los cuerpos de agua; modelo de estructuración poblacional que supone que las subpoblaciones más alejadas geográficamente entre ellas presentarán mayor diferenciación, que entre aquellas que se encuentran más cercanas (Wright, 1943; Jensen et al., 2005; Templeton, 2006). Para dicha prueba utilicé una matriz de distancias genéticas (Nei y Kumar 2000) para ser correlacionada con la matriz de distancias geográficas en kilómetros, entre todos los cuerpos de agua. La prueba de Mantel la realicé con el programa IBD v. 1.52 (Bohonak, 2002), con 10 000 permutaciones.

Como una medida de subdivisión poblacional realicé un análisis de varianza molecular (AMOVA) basada en el estadístico  $\Phi$ , el cual está basado en las distancias pareadas entre todos los pares de haplotipos y refleja la correlación de diversidad haplotípica en diferentes niveles de jerarquía (Excoffier et al., 1992). Específicamente, calculé la AMOVA considerando los dos grupos formados filogenéticamente (ver resultados más adelante; Linaje. 1: CP, CST, LL y LES y Linaje. 2: LIR y MAR). Usé el modelo de distancia molecular de Kimura dos parámetros (Kimura, 1980), con un nivel de significancia de 0.05 y 10 000 permutaciones al azar, usando el programa ARLEQUÍN Ver 3.0 (Excoffier et al., 2005).

#### **5.4. Red mínima de haplotipos**

Realicé una red mínima de haplotipos por medio del programa TCS 1.21 (Clement et al., 2000), que estima las genealogías de genes de secuencias de ADN bajo los estadísticos de parsimonia implementados por Templeton (1992). El programa construye una red de haplotipos no enraizada usando un límite de parsimonia de 0.95. El número de diferencias mutacionales significativas asociadas con el límite de probabilidad del 95% conecta el número máximo de mutaciones entre pares de secuencias (Templeton et al., 1992; Templeton et al., 1995; Clement et al., 2000). El resultado es una red de haplotipos conectados por el número mínimo de pasos mutacionales entre ellos.

## 5.5. Análisis filogenéticos

Para elegir el modelo evolutivo que mejor se ajusta a las secuencias obtenidas utilicé el programa ModelTest V. 3.7 (Posada y Crandall, 1998) basándome en el criterio de información Akaike (AIC), el cual evalúa el mayor número de parámetros en el modelo para elegir el más adecuado para los datos; además toma en cuenta la varianza de los parámetros estimados. La hipótesis con el valor más pequeño de AIC es considerada la más probable (Posada y Crandall, 1998; Emerson et al., 2001).

Utilicé el programa PAUP v. 4.0b10 (Swofford, 2003) para realizar inferencias filogenéticas con tres métodos diferentes: Máxima Verosimilitud (MV), Neighbor joining (NJ) y Máxima Parsimonia (MP), considerando las secuencias de los 24 individuos de *Poecilia orri*. El análisis de MV lo realicé tomando en cuenta el modelo evolutivo obtenido con ModelTest (criterio AIC); tanto para MV como para NJ realicé búsqueda heurística y 1000 réplicas de bootstrap. La construcción de MP la realicé con búsqueda heurística con 100 adiciones al azar de las ramas y reconexión de las ramas por 'stepwise addition' y 1000 réplicas de bootstrap; los gaps los tomé en cuenta como quinto estado. Para los tres métodos consideré a *Poecilia butleri* y *Poecilia gilli* como grupos externos (Ptaeck y Breden, 1998; Breden et al., 1999; Mateos, 2005).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Diversidad genética

Las secuencias obtenidas fueron de 508 pb para los 24 individuos de *Poecilia orri* estudiados. Las pruebas de neutralidad mostraron desviaciones no significativas: el estadístico de Tajima (1989) fue  $D = 1.93$  ( $P > 0.05$ ), mientras que los estadísticos de Fu y Li (1993) fueron  $D = 0.746$  y  $F = 1.299$  (ambos  $P > 0.10$ ), lo que señala que los loci no están sujetos a procesos selectivos.

La composición nucleotídica media fue de: T (28.8), C (20.2), A (36.5), G (14.5). En cuanto a los índices de diversidad genética, el número de sitios polimórficos ( $S$ ) fue de 26 ( $26/508 = 5.1\%$ ) y el número de haplotipos fue bajo ( $H = 5$ ). La diversidad haplotípica tuvo un valor intermedio ( $h_{Total} = 0.638$ ;  $h_{Media} = 0.150$ ), mientras que la diversidad nucleotídica fue baja, ( $\pi_{Total} = 0.021$ ;  $\pi_{Media} = 0.001$ ) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Diversidad genética total y por localidad. N es el tamaño de muestra; S el número de sitios segregantes (polimórficos);  $h$  es la diversidad haplotípica con su desviación estándar ( $\pm$  d.s) y  $\pi$ , es la diversidad nucleotídica ( $\pm$  d.s). Humedal\*, Cenote \*\*

Localidad	N	# de haplotipos	Haplotipo	S	$h$ ( $\pm$ d.s)	$\pi$ ( $\pm$ d.s)
CP*	4	2	I, II	3	0.500 (0.265)	0.003 (0.002)
CST **	7	1	I	0	0	0
LL**	3	1	I	0	0	0
LES**	2	1	III	0	0	0
LIR*	3	1	IV	0	0	0
MAR*	5	2	IV, V	2	0.400 (0.237)	0.002 (0.001)
Total	24	5		26	0.638 (0.078)	0.021 (0.003)

## 6.2. Estructuración genética

Los valores de divergencia nucleotídica, como la media del número de diferencias nucleotídicas ( $D_{XY}$ ) entre los tres cuerpos de agua permanentes (cenotes) y un humedal (CST, LL, LES y CP, respectivamente) fueron bajos, con un intervalo de 0.15 a 0.35%, mientras que la divergencia entre estos cuatro cuerpos de agua y los dos humedales restantes (LIR y MAR) presentaron valores más altos (4.2 a 4.5%), y la divergencia entre LIR y MAR fue baja (0.1%) (Tabla 5.1).

Por otro lado, la divergencia nucleotídica entre los dos grupos o linajes de poblaciones definidas en la red mínima de haplotipos y en las estimaciones filogenéticas (ver resultados más adelante) fue de 4.4% (Tabla 5.2).

Los valores de divergencia calculados con la sustituciones nucleotídicas netas ( $D_a$ ) fueron similares: entre los tres cuerpos de agua permanentes y el humedal fueron bajos (0 a 0.2%), lo mismo que entre los dos humedales restantes (Tabla 5.1), mientras que los valores de divergencia neta entre los dos grupos de cuerpos de agua fueron altos (4.2 y 4.4%; tabla 5.1). La diferenciación del total de la población también fue significativa ( $\chi^2 = 57.41$ ;  $P < 0.001$ ).

Asimismo, estimé los valores de divergencia entre la secuencias de *Poecilia orri* muestreadas y las dos especies usadas como grupos externos en las estimaciones filogenéticas; así, la  $D_a$  entre *Poecilia butleri* y *P. orri* fue de 8.8% y respecto a *Poecilia gilli*, la especie filogenéticamente más cercana a *P. orri* (Ptaeck y Breden, 1998; Breden et al., 1999) fue de 2.4% (Tabla 5.2).

**Tabla 5.1** Valores de divergencia nucleotídica, como la media del número de sustituciones por sitio entre diferentes poblaciones ( $D_{XY}$ ) y el número de sustituciones nucleotídicas netas por sitio entre poblaciones ( $D_a$ ).

$D_{XY}$						$D_a$							
	CP	CST	LL	LES	LIR	MAR		CP	CST	LL	LES	LIR	MAR
CP		0.0015	0.0015	0.003	0.045	0.045	CP	0.0	0.0	0.002	0.044	0.043	
CST			0.0	0.002	0.044	0.044	CST		0.0	0.002	0.044	0.043	
LL				0.002	0.044	0.044	LL			0.002	0.044	0.043	
LES					0.042	0.043	LES				0.042	0.042	
LIR						0.001	LIR					0.0	

**Tabla 5.2.** Valores de divergencia entre los dos linajes de poblaciones y entre las poblaciones muestreadas de *P. orri* y dos especies usadas como grupos externos.

<b>Linaje 1</b>		
(CP, CST, LL, LES)		
	$D_{XY}$	$D_a$
<b>Linaje 2</b>	0.044	0.043
(LIR, MAR)		
<b><i>P. orri</i></b>		
	$D_{XY}$	$D_a$
<b><i>P. butleri</i></b>	0.098	0.088
<b><i>P. gilli</i></b>	0.035	0.024

Respecto a la diferenciación entre las subpoblaciones y al flujo génico, el valor de  $F_{ST}$  fue alto (0.969) y el valor de  $Nm$  fue bajo (0.020). Valores similares fueron el resultado del estadístico  $Y_{ST}$ , el cual fue alto (0.968) y con una  $Nm$  de 0.02, lo que indica que los individuos migrantes entre cada grupo de poblaciones (cuerpos de agua) es bajo, y por ello el nivel de diferenciación genética entre los dos grupos de poblaciones es alto.

Las distancias genéticas pareadas entre los diferentes cuerpos de agua se comportaron de forma similar a los valores de divergencia. Las distancias genéticas entre las poblaciones pertenecientes al primer linaje filogenético (tres cuerpos de agua permanentes y un humedal) fueron pequeñas (0 a 0.003), mientras que las distancias entre las poblaciones del primer linaje y el segundo fueron mayores (0.043 a 0.047).

Finalmente, la distancia entre las dos poblaciones pertenecientes al segundo linaje (humedales temporales) también fue pequeña (0.001) (Tabla 6). Las distancias genéticas dentro de cada población fueron cercanas a cero, ya que en cada población se presentó sólo un haplotipo, a excepción de CP y MAR, las únicas dos poblaciones que presentaron dos haplotipos.

**Tabla 6.** Matriz de distancias genéticas pareadas (arriba de la diagonal) y distancias geográficas en km (debajo de la diagonal). Valores de distancias genéticas dentro de las poblaciones (cuerpos de agua).

	Distancias entre poblaciones					Distancias dentro de los poblaciones		
	CP	CST	LL	LES	LIR		CP	0.003
CP	0	0.002	0.002	0.003	0.047	0.047	CST	0.000
CST	12.4	0	0.000	0.002	0.045	0.045	LL	0.000
LL	21.7	9.4	0	0.002	0.045	0.045	LES	0.000
LES	34.8	22.5	13.1	0	0.043	0.044	LIR	0.000
LIR	8.9	21.1	30.1	43.2	0	0.001	MAR	0.002
MAR	21.3	33.6	42.6	55.7	12.5	0		

Para evaluar aislamiento por distancia, realicé la prueba de Mantel por medio de la matriz de distancias genéticas y distancias geográficas entre todos los cuerpos de agua (Tabla 6). La correlación entre ellas resultó ser positiva ( $r = 0.576$ ) y significativa ( $P = 0.019$ ).

El análisis de varianza molecular (AMOVA) mostró que el 1.89% de la variación está distribuida dentro de las poblaciones (en cada cuerpo de agua), mientras que el 97.16% de la variación se encuentra distribuida entre los dos linajes encontrados o grupos de cuerpos de agua (Linaje 1: CST, LL, LES y CP vs. Linaje 2: LIR y MAR), y sólo el 0.95% de la variación se distribuyó entre las poblaciones dentro de cada grupo. La estructuración entre los dos linajes o grupos ( $\Phi_{CT}$ ) no fue significativa, y tampoco entre las poblaciones dentro de grupos ( $\Phi_{SC}$ ); por el contrario, la estructuración genética fue significativa dentro de las poblaciones ( $\Phi_{ST}$ ) (Tabla 7).

**Tabla 7.** Porcentaje de la variación y significancia de los valores de los índices de fijación.

Fuente de Variación	% de la variación	Índices de fijación	Significancia
<b>Entre linajes</b> (Linaje 1 y Linaje 2)	97.16	$\Phi_{CT} = 0.972$	$P = 0.069$
<b>Entre poblaciones dentro de los linajes</b>	0.95	$\Phi_{SC} = 0.336$	$P = 0.099$
<b>Dentro poblaciones</b>	1.89	$\Phi_{ST} = 0.981$	$P < 0.001$

### 6.3. Descripción de la red mínima de haplotipos y de la reconstrucción filogenética

La red mínima de haplotipos (Fig. 7) muestra, en general, la separación entre dos grupos de cuerpos de agua, uno que incluye a CP, CST, LL y LES y en el segundo se agrupan MAR y LIR, consistente con los dos linajes filogenéticos. El haplotipo 1 es el más común, presente en 13 individuos de CP, CST y LL; éste se separa del haplotipo 2 por dos pasos mutacionales y está presente en un individuo de CP. El haplotipo 1 también está separado del haplotipo 3 por un paso mutacional, el cual se encuentra presente en los dos individuos de LES; éste a su vez se separa por 24 pasos mutacionales del haplotipo 4, presente en los tres individuos muestreados de LIR y tres de MAR; éste último se separa del haplotipo 5 por un paso mutacional, presente en un solo individuo de MAR. En el caso de los dos individuos muestreados de LES presentan un haplotipo derivado del más común dentro del linaje 1 (haplotipo I) y es el cuerpo de agua distribuido más hacia el oeste y el más alejado de los demás cuerpos de agua muestreados.

El programa ModelTest eligió el modelo evolutivo HKY+I como el más adecuado para las secuencias analizadas (incluyendo las secuencias de *Poecilia gilli* y *Poecilia butleri* como grupos externos). Con un valor de likelihood de  $-lnL = 1048.2047$  e igual tasa de variación para todos los sitios variables.

El árbol de máxima parsimonia tuvo una longitud de ( $L = 68$ ), un índice de consistencia ( $IC = 0.959$ ) e índice de retención ( $IR = 0.980$ ), con *P. butleri* como grupo externo. Con *P. gilli* como grupo externo los valores fueron similares:  $L = 62$ ,  $IC = 0.984$  y  $IR = 0.995$ .

Los árboles filogenéticos generados con los tres métodos de construcción fueron consistentes entre sí, donde se observan dos linajes o grupos, uno que incluye los haplotipos pertenecientes a LES, CST, LL y CP (tres cuerpos de agua permanentes y un humedal, respectivamente), mientras que los haplotipos de LIR y MAR, los dos humedales más cercanos a la zona costera, formaron el segundo linaje (sólo se muestra el árbol de máxima verosimilitud; Fig. 8).

#### 6.4. Red mínima de haplotipos

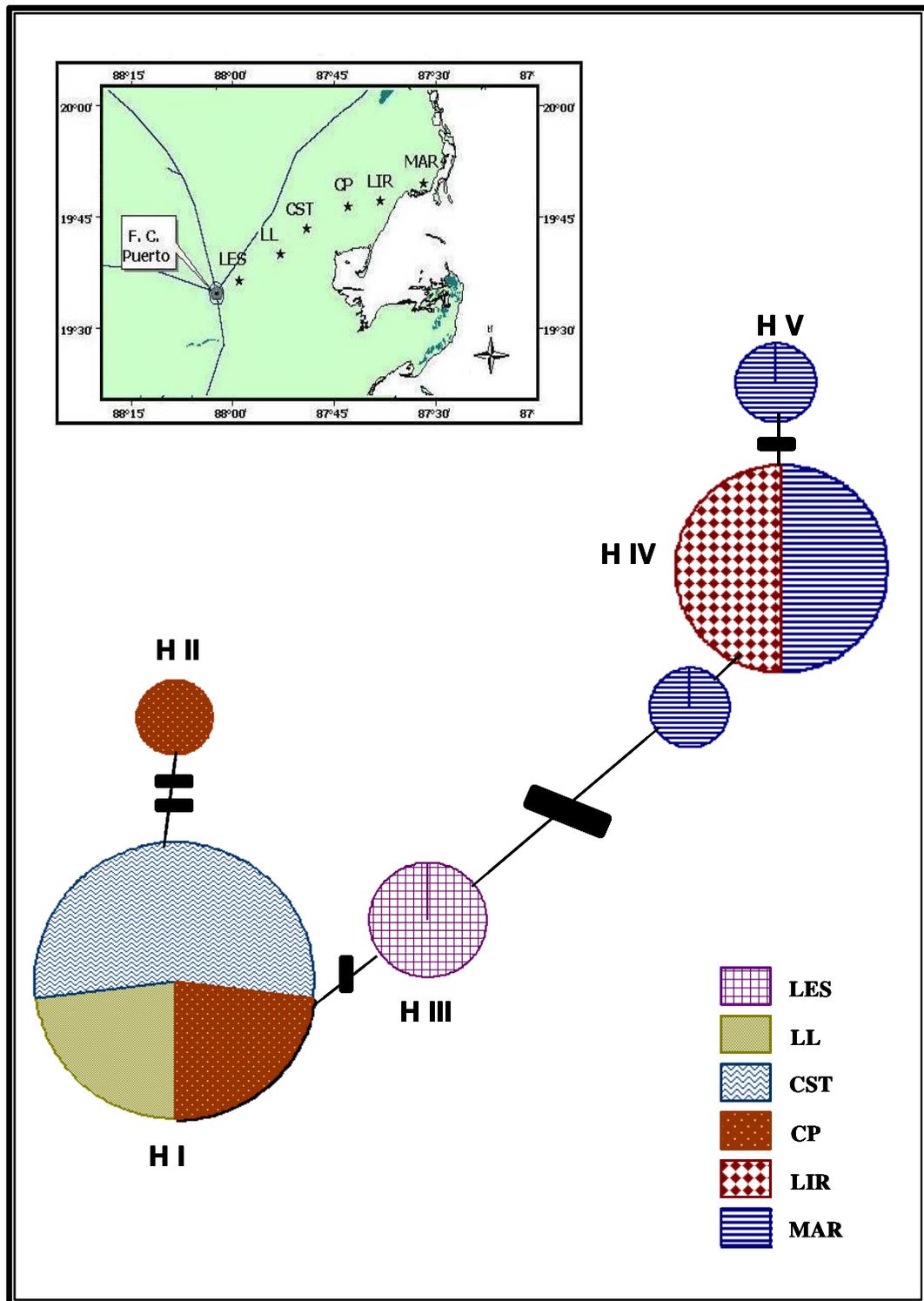


Fig. 7. Red mínima de haplotipos: muestra el número de haplotipos y sus conexiones (distribución) en los cuerpos de agua estudiados. El tamaño de los círculos representa la frecuencia con la que se presentó cada haplotipo, siendo H I y H V los más frecuentes dentro de cada linaje o grupo. Las líneas negras transversales representan los pasos mutacionales que separan un haplotipo de otro. La línea transversal central y más ancha representa la profunda separación entre los dos linajes por 24 pasos mutacionales.

## 6.5. Reconstrucción filogenética

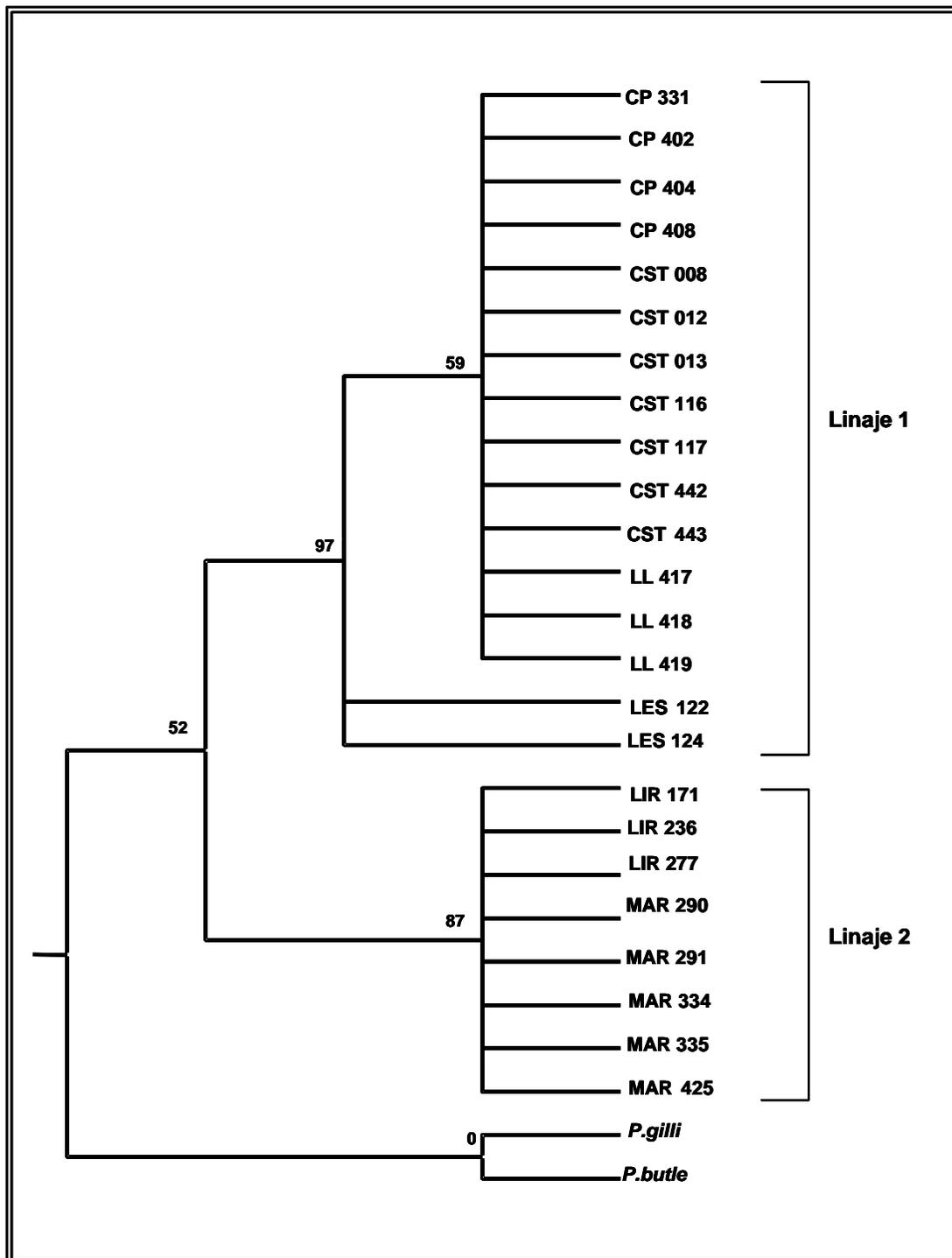


Fig. 8. Árbol de máxima verosimilitud de los haplotipos de *P. orri* de los seis cuerpos de agua estudiados. Se muestran los valores de bootstrap (> 50%) arriba de las ramas.

## 7. DISCUSIÓN

### *Estructura poblacional*

Dada la marcada estructuración y la poca variabilidad genética observada para las poblaciones de *Poecilia orri*, muy probablemente asociadas a los sucesivos cuellos de botella que ocurren durante cada temporada de sequía y el subsecuente crecimiento poblacional que tiene lugar durante la temporada de lluvias, podría pensarse en un sistema o modelo Metapoblacional. Un modelo de este tipo consiste en una serie de poblaciones locales con una limitada tasa de flujo génico y número de individuos; se caracteriza además por frecuentes extinciones y recolonizaciones locales (Hanski, 1999; Booy et al., 2000; Hedrick, 2000; Templeton, 2006). Este tipo de dinámica ocurre en las poblaciones estudiadas de *P. orri*, cuando los cuerpos de agua temporales (a excepción de CP) se secan durante la temporada de sequía, dando lugar a una tasa de mortalidad marcadamente alta. Sin embargo, los individuos que logran sobrevivir recolonizan de nuevo estos humedales dando lugar a la expansión de las poblaciones (Hernández-Valdés, 2006; Zambrano et al., 2006). Los cenotes, aunque no llegan a secarse por completo, sí presentan una disminución en el nivel de agua, con las consecuentes variaciones en sus factores abióticos (concentración de oxígeno disuelto, salinidad, temperatura, etc.) (Zambrano et al., 2006), lo que puede llegar a disminuir el número de individuos de las poblaciones que los habitan.

La dinámica de extinción y recolonización tiene una importante repercusión en el total de la diversidad genética de las subpoblaciones o parches, así como en la distribución de la variación dentro de estos (Hedrick, 2000). Después de un evento de extinción o de un cuello de botella, los individuos que recolonizan de nuevo un cuerpo de agua, provendrán de una muestra de la variación genética original, lo que resultará en una baja variación en la población recién expandida o colonizada (Booy et al., 2000; Hanski, 1999; Hedrick, 2000). Algunos factores pueden influenciar la pérdida de la variación genética de las poblaciones recién colonizadas, como el número de individuos fundadores, la fuente de la variación, las tasas de extinción y recolonización, el tamaño de la población del parche del que provienen los individuos fundadores y el total del flujo génico entre estos (Hedrick, 2000). Las poblaciones de *P. orri* presentan poca variación genética debido a factores que discutiré más adelante.

Otra característica que define el modelo metapoblacional es el aislamiento de las subpoblaciones o parches, lo que repercute directamente en los procesos de migración entre éstos (Hanski, 1999). En los cuerpos de agua estudiados, las poblaciones de *P. orri* presentan una alta estructuración genética entre los cenotes (incluyendo CP) y los dos humedales más cercanos a la costa (LIR y MAR), debido a que entre ellos existe bajo número de migrantes.

Una condición importante para que la estructura metapoblacional persista está ligada a condiciones ambientales, las cuales definen la extinción sincrónica de las subpoblaciones y la recolonización de éstas, lo cual permite la sobrevivencia de cada una, sin que las subpoblaciones con mayor talla y número de individuos afecten la diversidad genética de las subpoblaciones más pequeñas. Además, sucesos demográficos como la reproducción y el crecimiento de los individuos están sujetos a ciertos factores climáticos (como la estacionalidad de una región), que permiten la sobrevivencia de la especie (Hanski, 1999; Booy, 2000).

Otro modelo de estructuración poblacional que podría estar ocurriendo en estas poblaciones es el aislamiento por distancia, donde las poblaciones locales que se encuentran geográficamente más cercanas a otras presentan mayor flujo génico que con las poblaciones locales más distantes (Wright, 1943; Jensen et al., 2005; Templeton, 2006). Una implicación importante en este tipo de estructura poblacional es el grado de diferenciación genética entre dos poblaciones locales sobre un continuo geográfico, pues la diferenciación genética entre éstas es mayor conforme incrementa la distancia geográfica o la separación entre ellas (Templeton, 2006). Esto sucede en los cuerpos de agua en los que habitan las poblaciones de *P. orri*, en donde el aislamiento por distancia es soportado por la prueba de Mantel. Además, tanto los valores de divergencia como las distancias génicas son mayores entre los cuerpos de agua más alejados geográficamente, mientras que entre los cuerpos de agua más cercanos la divergencia y las distancias génicas son mucho menores.

### *Diversidad genética*

Los bajos valores de diversidad genética y haplotípica encontrados en las poblaciones estudiadas pueden ser resultado del bajo tamaño de muestra, sin embargo, dichos resultados son consistentes con estudios realizados con otros marcadores y otras medidas de variación genética, tal es el caso del estudio realizado con microsatélites de Hernández-Valdés (2006), quien encontró valores de heterocigocidad bajos en tres loci de microsatélites. Además, estudios realizados con otros poecílidos y otros peces de agua dulce, con diferentes marcadores genéticos, muestran la misma tendencia en cuanto a diversidad genética se refiere (Hernández-Matich y Smith, 1997; Baer, 1998; Schug et al., 1998; Hughes et al., 1999; Mamuris et al., 2005; Mesquita et al., 2001). DeWoody y Avise (2000) en su revisión con microsatélites como marcadores moleculares de variación genética, encuentran que los valores estimados de variación de diversidad alélica y heterocigocidad media son más altos en peces marinos ( $a = 20.6$  y  $h = 0.79$ , respectivamente), en comparación con especies de peces de agua dulce ( $a = 7.5$  y  $h = 0.46$ ); el segundo valor es comparable con la diversidad haplotípica calculada para este trabajo ( $h = 0.638$ ), por ser una proporción del número de individuos heterocígonos en una población. Ward et al. (1994) concluyen que, en general, las especies de peces marinos presentan bajos niveles

de variación genética entre subpoblaciones y altos niveles de variación dentro de éstas; por el contrario, las especies de peces de agua dulce presentan bajos niveles de variación dentro de subpoblaciones y altos niveles de divergencia entre ellas. Estos valores contrastantes de variación son el resultado del rango de dispersión que presentan los peces marinos en comparación con los peces de agua dulce, ya que estos últimos se encuentran restringidos a cuerpos de agua particulares, que a menudo están sujetos a cambios ambientales más drásticos, así como a barreras biogeográficas bien definidas, debido a que los cuerpos de agua dulce a menudo presentan cambios en los niveles de agua y pueden conectarse o quedar aislados. Así, la dispersión entre los cuerpos de agua dulce es restringida, por lo que las subpoblaciones se encuentran relativamente aisladas unas de otras, a diferencia del ambiente marino que permanece estable por largos periodos y donde las poblaciones de peces tienden a dispersarse ampliamente en estos ambientes estables y continuos (Ward et al., 1994; Hughes et al., 1999; DeWoody y Avise, 2000).

Los cuerpos de agua de Sian Ka'an en los que habitan las poblaciones de *Poecilia orri* presentan condiciones ambientales extremas, ya que durante la temporada de lluvias los cuerpos de agua temporales (humedales) se inundan, pero durante la temporada de sequía normalmente se secan. Debido a esta dinámica estacional, los tamaños poblacionales de las especies de peces tienden a reducirse y la mortalidad aumenta significativamente. Así, las poblaciones experimentan expansiones en su tamaño efectivo seguidas por disminuciones drásticas cuando los humedales se secan. Estos sucesivos cuellos de botella explican los bajos niveles de diversidad genética encontrados.

Los cenotes, catalogados como cuerpos de agua permanentes (Zambrano et al., 2006), pueden disminuir el nivel de agua; y con ello pueden modificarse los factores abióticos necesarios para la sobrevivencia de algunas especies, reduciendo el tamaño poblacional durante la temporada de sequía y aumentando de nuevo en la temporada de lluvias. Además, estos cuerpos de agua se encuentran aislados y de acuerdo con Zambrano et al. (2006) presentan tamaños poblacionales muy bajos, por lo que sólo un pequeño número de individuos son los que dan lugar a la expansión poblacional.

El CST es un caso especial, ya que es el único cuerpo de agua con *P. orri* como la única especie presente. Esta población presenta un único haplotipo (H I), por lo que no tiene diversidad haplotípica ni nucleotídica. Ello coincide con los valores más bajos de heterocigocidad encontrados con microsatélites (Hernández-Valdés, 2006), así como un alto índice de fijación, que indica altos valores de endogamia en esta población. Dichos resultados se deben a la dinámica particular que existe en este cenote, pues aunque es un cuerpo de agua permanente, durante la temporada de sequía disminuye drásticamente su profundidad, asociado ello a una alta mortalidad.

Los valores bajos de diversidad genética resultado de sucesivos cuellos de botella en poblaciones fragmentadas y aisladas han sido registrados en otras especies de peces de agua dulce. En *Gambusia hubbsi* se encontraron bajos niveles de diversidad en poblaciones de la isla Andros en Bahamas, donde habitan cuerpos de agua muy similares a los cenotes de Sian Ka'an y cuyas poblaciones se encuentran aisladas con bajos valores de heterocigocidad y altos niveles de divergencia genética (Schug et al., 1998). En las poblaciones de *Chondrosoma lusitanicum*, un pez de agua dulce endémico de Portugal, se observa baja variabilidad genética y altos niveles de divergencia entre poblaciones, resultado de la fragmentación que éstas presentan, aunado a la alta mortalidad estacional resultado de que los cuerpos de agua en los que habitan se secan en el verano, provocándose así sucesivos cuellos de botella y subsecuentes expansiones poblacionales (Mesquita et al., 2001). Las poblaciones de *Ladigesocypris ghigii* también se encuentran sujetas a regímenes hídricos estacionales y experimentan sucesivas reducciones y expansiones, por lo que muestran bajos niveles de variación genética intrapoblacional y altos niveles de divergencia genética entre poblaciones (Mamuris et al., 2005).

Un aspecto importante a considerar es el sistema de reproducción de *Poecilia orri*: tienen fertilización interna y son peces ovovivíparos, además de que presentan superfecundación, proceso en el cual dos o más camadas de diferentes estados de desarrollo ocurren en la misma hembra (Constantz, 1989; Dewoody y Avise, 2005; Miller, 2005). La ovoviviparidad ha sido relacionada con el proceso de desarrollo llamado lecitotrofia, en el que los embriones son alimentados a través de una yema que se origina en el huevo antes de la fertilización; este proceso de desarrollo no se asocia con altos números de camadas en una sola hembra (Constantz, 1989). Sin embargo, durante la reproducción, las hembras pueden llegar a aparearse con múltiples machos, almacenando el esperma por largos periodos, por lo que los huevos son fertilizados por espermias de diferentes machos. Esta múltiple paternidad ha sido relacionada con la estructura genética de las poblaciones de peces de agua dulce. Soucy y Travis (2003) mostraron que la heterocigocidad de las poblaciones de *Heterandria formosa* incrementa cuando la densidad poblacional aumenta y por lo tanto la tasa de múltiple paternidad. Además, altas tasas de paternidad múltiple suponen un incremento en el tamaño efectivo de la población, lo que permite la retención de variación genética en poblaciones expuestas a fuertes fluctuaciones en su abundancia (cuellos de botella) (Zane et al., 1999). En el caso de *P. orri*, estos procesos no han sido bien estudiados, pero es probable que ocurran, pues estudios con especies de la misma familia (Zane et al., 1999; Soucy y Travis, 2003; DeWoody y Avise, 2005), han demostrado que la múltiple paternidad es importante en la aportación de nuevos alelos a la población, disminuyendo la homogenización resultado de la deriva génica que induce la pérdida de variación genética a causa de sucesivos cuellos de botella (Mamuris et al., 2005). Pero al respecto, este estudio no puede ser concluyente, pues la variación genética medida con ADNmt es baja, lo cual no nos sugiere un aporte importante de nuevos alelos a las poblaciones de *P. orri*, las cuales pudieron haberse originado de un bajo número de alelos antiguos resultado del efecto fundador que tiene lugar cada vez que las

poblaciones crecen después de haber pasado por un cuello de botella. Sin embargo, éste tema podría ser ampliamente discutido en trabajos posteriores, con un marcador molecular que muestre la genealogía paterna, como genes ligados al cromosoma Y (Avice, 1995).

### *Estructura genética*

Las estimaciones filogenéticas así como la red mínima de haplotipos mostraron dos grupos de poblaciones de *Poecilia orri* bien diferenciadas (linajes): en uno se agrupan los tres cuerpos de agua permanentes (cenotes) y un humedal (LES LL, CST y CP, respectivamente) separados del segundo linaje por 24 pasos mutacionales, en el cual se agrupan el resto de los humedales temporales (LIR y MAR).

Se observó una marcada estructuración genética de las poblaciones estudiadas: los valores de divergencia entre los dos linajes fueron altos (4.2-4.5%), sin embargo, entre las poblaciones dentro de cada linaje no existió divergencia significativa. Los valores de las distancias genéticas apareadas se comportaron de la misma manera, teniendo los valores más altos entre los dos linajes (0.043-0.047). Estos resultados son apoyados por la evidencia de aislamiento por distancia (prueba de Mantel), en el que los cuerpos de agua más cercanos entre sí se encuentran menos diferenciados. Los índices de diferenciación genética también presentaron valores altos ( $F_{ST} = 0.969$  y  $Y_{ST} = 0.968$ ) y valores de  $Nm$  bajos (0.02), indicativo del nulo flujo génico que existe entre los dos linajes. El valor significativo de  $\chi^2$  también nos indica estructuración genética entre estos dos grupos. En cuanto a la distribución de la variación genética, el AMOVA mostró que el 97% de la variación genética está distribuida entre los dos linajes, con un 1.89% de la variación dentro de las poblaciones de cada linaje.

Es importante resaltar el caso de CP, el cual es un humedal pero que tiene en su centro un pequeño cenote que no se seca por completo durante la temporada de sequía, actuando como refugio para los peces durante este periodo cuando el resto del humedal se seca. Así, es interesante notar que este humedal y su 'pequeño cenote', se agrupa con los cuerpos de agua permanentes y comparte con LL y CST el haplotipo más frecuente dentro de este linaje (H I); presenta además otro haplotipo (H II), separado del primero por sólo dos pasos mutacionales, por lo que dentro de este linaje es el único cuerpo de agua que presenta mayor diversidad haplotípica y nucleotídica.

Dentro del segundo linaje, formado por LIR y MAR, el segundo es el más cercano a la costa y es el único que también presenta mayor diversidad haplotípica y nucleotídica, compartiendo un haplotipo con LIR (H IV) y un segundo haplotipo (H V) que es exclusivo de este humedal.

La ausencia de haplotipos compartidos entre los cenotes y humedales nos indica que es muy probable que no exista conexión entre ellos. Por otro lado, sí puede existir conexión entre LIR y MAR, los dos humedales más cercanos a la costa, cuando éstos se inundan en la temporada de lluvias, y por ello presentan un haplotipo en común. Los cenotes comparten el haplotipo H I, el más común en ese linaje, que sugiere que LL, CST y CP deben estar conectados durante la temporada de lluvias, cuando CP eleva su nivel de agua, conectándose con LL y CST que son los cuerpos de agua más cercanos, dando lugar a la dispersión de individuos entre ellos. En CST, el único cuerpo de agua que está habitado exclusivamente por *Poecilia orri*, y dado el haplotipo en común con el resto de los cenotes, es posible que la ausencia de otras especies puede haberse originado por sucesos de extinción, o bien, debido a la baja tolerancia de otras especies a ambientes extremos que no les permiten migrar a este cuerpo de agua, que presenta altos niveles de salinidad en temporada de sequía (Zambrano et al., 2006). El haplotipo exclusivo de LES, el cenote más alejado del resto, se separa de los otros haplotipos de su grupo por un solo paso mutacional, sin embargo el escaso tamaño de muestra en esta localidad no nos permite hacer conclusiones sobre su conexión (o no) con los otros cuerpos de agua. La variación haplotípica observada, sobre todo en los ambientes temporales, pudo haberse originado por mutación y disminuir por deriva génica después de los sucesivos cuellos de botella que tienen lugar durante la temporada de sequía, como lo muestran las pruebas de neutralidad (Hartl, 1997; Hedrick; 2000); los haplotipos únicos pueden ser resultado de retención de polimorfismos ancestrales o haber surgido a través de selección completa del linaje después de pocas generaciones, seguido del aislamiento poblacional (Mamuris et al., 2005);

El haplotipo más común (H I), presente en el grupo de los cenotes (linaje 1), puede ser el haplotipo ancestral más probable, y debido a que está separado por un alto número de mutaciones del haplotipo más común en humedales (linaje 2) nos sugiere que éstos divergieron hace mucho tiempo (Templeton, 2004). El tiempo de divergencia aproximado entre los dos linajes puede ser calculado por medio del estadístico llamado "reloj molecular" (Zuckerland y Pauling, 1965), el cual está basado en la tasa de sustitución nucleotídica y el porcentaje de sitios variables entre dos secuencias (Hartl, 1997; Hedrick; 2000). Sin embargo, es importante tomar en cuenta la alta tasa mutacional de la región control del ADNmt (Taberlet, 1996), pues esto podría disminuir el tiempo de divergencia de los dos linajes; además de que el ADNmt representa un cuarto del tamaño efectivo poblacional, por lo que tiende a ser más susceptible a cambios drásticos en el tamaño efectivo de las poblaciones, como sucede con los cuellos de botella y los procesos de deriva génica a los que están sujetas las poblaciones de peces estudiadas (Imsiridou et al., 1998; Hughes et al., 1999; Sunnucks, 2000). Asimismo, estos sucesos, que tienden a reducir el número de alelos en pocas generaciones, pueden también influir en el tiempo de divergencia (Hedrick, 2000).

El bajo flujo génico entre las poblaciones (bajos valores de  $Nm$ ) y la profunda separación entre los linajes, pueden también estar relacionados con las características biológicas propias de la especie, como la vagilidad limitada a causa de la poca tolerancia a ambientes extremos, la cual actúa como barrera para la dispersión de los individuos de *Poecilia orri* hacia otros ambientes, teniendo un efecto significativo en la diferenciación genética de estas (Slatkin, 1977).

Los factores ambientales asociados con la estructuración genética de las poblaciones silvestres han sido poco estudiados. Sin embargo, en el trabajo de Vázquez-Domínguez et al. (en revisión), por medio del método Bayesiano jerárquico, evaluaron las variables ambientales que más se asocian a la estructuración genética ( $F_{ST}$ ) de las poblaciones de *Poecilia orri*, y concluyeron que la concentración de oxígeno disuelto fue el factor ambiental más importante asociado con la estructuración genética, en donde ésta fue más pronunciada en los cuerpos de agua con concentraciones de oxígeno más altas. El cenote LES presentó concentraciones mayores de oxígeno disuelto, siendo este el sitio genéticamente más diferenciado. En el presente estudio los individuos de este cenote presentaron un haplotipo exclusivo (H III), además de tener los valores de divergencia más altos (0.002 – 0.003) con el resto de los cuerpos de agua pertenecientes al linaje 1. Por otro lado, los humedales presentaron concentraciones menores de oxígeno disuelto (Zambrano et al., 2006), en este caso MAR y PREM, dos humedales muy cercanos y con los valores de divergencia más bajos (Vázquez-Domínguez et al., en revisión). En este estudio, aunque no se tomó en cuenta el humedal PREM, los humedales LIR y MAR fueron los sitios con valores de divergencia más bajos entre ellos.

Los factores abióticos propios de cada cuerpo de agua se encuentran influenciados por los fuertes regímenes hídricos de la zona (Zambrano et al., 2006), que repercuten directamente sobre las especies que los habitan, influenciando de manera importante la posibilidad de migración de los individuos de un cuerpo de agua a otro. En general, los peces poecílidos presentan alta tolerancia a condiciones ambientales extremas (Meffe y Snelson, 1989; Hrbek et al., 2007). En particular, en los cuerpos de agua estudiados en Sian Ka'an, *Gambusia yucatanana* y *P. orri* fueron las especies más abundantes y mejor distribuidas (García-Bedolla, 2004; Zambrano et al., 2006); sin embargo, los resultados con microsatélites (Hernández-Valdés, 2006; Vázquez-Domínguez et al., en revisión) y con ADNmt sugieren que *P. orri* –a diferencia de *G. yucatanana*– es menos tolerante a ciertos factores ambientales como bajas concentraciones de oxígeno y alta salinidad presentes en estos cuerpos de agua. Por ello, las poblaciones de *P. orri* se encuentran significativamente estructuradas, diferenciando a los cenotes (incluyendo a CP) de los humedales temporales, mientras que las poblaciones de *G. yucatanana* presentes en los mismos cuerpos de agua (a excepción de CST) presentan altos niveles de flujo génico y no están significativamente estructuradas (Hernández-Valdés, 2006; Vázquez-Domínguez et al., en revisión).

Análisis ecológicos realizados para evaluar la importancia de factores abióticos en la composición de las poblaciones de peces de agua dulce, muestran que los procesos ambientales de gran escala como inundaciones son determinantes en el ensamblaje de las poblaciones y comunidades de peces en humedales, ya que cuando ocurren, los individuos tienden a migrar hacia otros humedales a través de las conexiones que se forman entre éstos en ausencia de barreras geográficas (e.g. elevaciones topográficas). Los factores abióticos locales también determinan el ensamblaje de las poblaciones, sin embargo, la capacidad de dispersión de los individuos y su tolerancia a las variaciones en los factores abióticos (salinidad, oxígeno disuelto) característicos de cada humedal son de mayor importancia en los procesos de colonización en cuerpos de agua temporales (Magoulick, 2000; Baber et al., 2002). Así, los resultados indican que la fuerte estructuración genética de las poblaciones de *Poecilia orri* obedece a la capacidad de dispersión de esta especie, la cual a diferencia de *Gambusia yucatanana* muestra ser menos tolerante a las condiciones ambientales extremas de la zona y a la ausencia de conexiones entre los cenotes y humedales.

Otro aspecto biológico importante a considerar en la definición de la estructura genética de las poblaciones de *P. orri* es el sistema de maduración de los individuos. Como ya he mencionado, los miembros de la familia Poeciliidae son especies con alta tolerancia a ambientes extremos y por ello pueden ser considerados como especies pioneras en los cuerpos de agua temporales al sobrevivir a largos periodos de sequía (García-Bedolla, 2004). Durante la temporada de lluvias los individuos de *P. orri* se encuentran en fase de alimentación y crecimiento para alcanzar la madurez en la temporada de sequía con tallas mayores a las de *G. yucatanana* (Vázquez-Domínguez et al., en revisión). La posibilidad de sobrevivencia disminuye en ambientes reducidos en su área al no proveer suficiente espacio ni recursos a los peces de tallas más grandes, como es el caso de *P. orri*, causando mayor mortalidad (García-Bedolla, 2004; Vázquez-Domínguez et al., en revisión)

Las poblaciones estudiadas de *P. orri* se encuentran sujetas año con año a efectos fundadores, debido a los regímenes hídricos de la región. En temporada de sequía experimentan cuellos de botella perdiendo variabilidad genética por deriva génica. Durante la temporada de lluvias las poblaciones crecen; pero descienden de un pequeño número de individuos que han sobrevivido de la generación anterior, por lo que las frecuencias alélicas representan sólo una parte de la población original (Hartl, 1997; Hedrick, 2000). La pérdida de la variabilidad puede recuperarse si la población crece continuamente (Booy, 2000; Hedrick, 2000); sin embargo, en estas poblaciones la recuperación puede llegar a ser lenta e incluso no alcanzarla, ya que estarán sujetos a un nuevo cuello de botella en la siguiente temporada de sequía; esta dinámica de reducción y expansión sucesiva de las poblaciones puede adecuarse a un modelo de estructuración metapoblacional.

Los bajos valores de  $Nm$  y la profunda divergencia entre las poblaciones que habitan los cenotes (linaje 1) y las que habitan los humedales (linaje 2) nos muestra el escaso flujo génico que existe entre ellas, el cual puede deberse a factores biológicos propios de la especie, aunados a la dinámica ambiental. Sin embargo, los altos valores de divergencia entre los dos linajes (4.4%), incluso más altos que los de *P. orri* con su especie hermana, *Poecilia gilli* (Ptaeck y Breden, 1998; Breden et al., 1999) (3.5%), nos sugiere que podrían ser linajes evolutivamente independientes e incluso especies diferentes. Tal es el caso del estudio de Mateos (2005), en el que las poblaciones de *Poecilia butleri* se encuentran separadas por barreras geográficas y encuentra altos valores de divergencia entre poblaciones del sur y del norte, proponiendo especies potencialmente diferentes. En el caso de *Poecilia orri*, para sustentar el grado de subespecies o especies, es necesario profundizar en estudios genéticos y morfológicos aumentando el tamaño de muestra.

Finalmente, debido a la marcada estructuración genética de las poblaciones de *P. orri*, es posible considerar a cada grupo de poblaciones (cenotes y humedales) como "Unidades Evolutivamente Significativas" (ESU), pues cumplen los criterios propuestos por la National Marine Fisheries Service (NMFS): están substancialmente aisladas unas de otras (criterio 1) y representan un componente importante en el legado evolutivo de las especies (criterio 2) (Primmer, 2005), lo que las hace susceptibles de manejo para conservar la diversidad natural de la especie.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Avise, J.C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Niegel, C. A. Reeb y N. C. Saunders.** (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Avise, J. C.** (1992). Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. *Oikos* 63: 62-76.
- Avise, J. C.** (1994). *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall. Nueva York.
- Avise, J. C.** (1995). Mitochondrial DNA polymorphism and the connection between genetics and demography of relevance to conservation. *Conservation Biology* 9: 686-690.
- Baber, J. M., D. L. Childers, K. J. Babbitt y D. H. Anderson.** (2002). Controls of fish distribution and abundance in temporary wetlands. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59: 1441-1450.
- Baer, F.E.** (1998). Population structure in a south-eastern US freshwater fish *Heterandria formosa*. II. Gene flow and biogeography within the St. Johns river drainage. *Heredity* 81: 404-411.
- Bohonak, A. J.** (2002). IBD (Isolation By Distance): a program for analyses of isolation by distance. *Journal of Heredity* 93: 153-154.
- Booy, G., R. J. J. Hendriks, M. J. M. Smulders, J. M. Van Groenendael y B. Vosman.** (2000). Genetic diversity and the survival of populations. *Plant Biology* 2: 379-395.
- Breden, F., M. B. Ptacek, M. Rashed, D. Taphorn y C. A. Figueiredo.** (1999). Molecular phylogeny of the live-bearing fish genus *Poecilia* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 95-104.
- Clement, M., D. Posada y K. A. Krandall.** (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9 (10): 1657-1660.
- Constantz., D. G.** (1989). Reproductive biology of Poeciliid fishes. En Meffe, K. G., F. F. Snelson. Eds. (1989). *Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliidae)*. Prentice Hall, Nueva Jersey. Págs. 33-50.
- DeWoody, A. J. y J. C. Avise.** (2000). Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology* 56: 461-473.
- DeWoody, A. J. y J. C. Avise.** (2001). Genetic perspectives on the natural history of fish mating systems. *The American Genetic Association* 92: 167-172.
- Emerson, C. B., E. Paradis y C. Thébaud.** (2001). Revealing the demographic histories of species using DNA sequences. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 707-716.

- Excoffier, L.; P. E. Smouse y J. M. Quattro.** (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Excoffier, L., G. Laval y S. Schneider.** (2005). ARLEQUIN Ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Informatics Online* 1: 47-50.
- Fu, Yun-Xin y Wen-Hsiung Li.** (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics Society of America* 133: 693-709.
- Fumagalli, L., P. Taberlet, L. Favre y J. Hausser.** (1996). Origin and evolution of homologous repeated sequences in the Mitochondrial DNA Control Region of shrews. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13: 31-46.
- Gamboa-Pérez, H.,** (1992). Peces Continentales de Quintana Roo. En Navarro L y Suárez-Morales. (1992) *Diversidad Biológica en la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an Quintana Roo, México* Vol. II. Centro de Investigaciones de Quintana Roo. Chetumal, Quintana Roo, México. Pp. 305-333.
- García-Bedolla, D.** (2004). Distribución de la familia Poeciliidae a nivel regional en la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an. Tesis de Maestría, Instituto de Biología, UNAM.
- Greenfield, D.M. y Thomerson, J.E.** (1997). *Fishes of the continental waters of Belize.* University Press of Florida, Gransville, Florida.
- Hall, G. F.** (1936). Physical and chemical survey of cenotes of Yucatan. En *The Cenotes of Yucatan. A Zoological and Hydrographic Survey.* Pearse, A. S., Creaser, A. P. & Hall, F. G., eds. Carnegie Institution of Washington, Washington, D.C., USA. Pp. 5-16.
- Hall, T. A.** (1999). BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hamilton, A.** (2001). Phylogeny of *Limia* (Teleostei: Poeciliidae) based on NADH dehydrogenase subunit 2 sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19: 277-289.
- Hanski, I.** (1999). *Metapopulation Ecology.* Oxford University Press, Reino Unido.
- Hartl, L. D. y A. G. Clark.** (1997). *Principles of Population Genetics.* Sinauer Associates, Massachusetts. EUA.
- Hedrick, W. P.** (2000). *Genetics of Populations.* 2nd ed. Jones and Bartlett Publishers. Massachusetts. EUA.
- Hernández-Matich, D. J. y M. M. Smith.** (1997). Downstream gene flow and genetic structure of *Gambusia holbrooki* (eastern mosquitofish) populations. *Heredity* 79: 295-301.
- Hernández-Valdés, A.** (2006). Estructuración genética de *Poecilia orri* y *Gambusia yucatanana* en cenotes y humedales de Sian Ka'an, Quintana Roo, México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Hillis M. D y C. Moritz.** (1990). *Molecular Systematics.* Sinaur Associates, Inc, Publishers. Massachusetts, EUA.

- Hudson, R. R., D. D. Boos y N. L. Kaplan.** (1992 a). A statistical test for detecting geographic subdivision. *Molecular Biology and Evolution* 9: 138–151.
- Hudson R. R., M. Slatkin y W. P. Maddison.** (1992 b). Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132: 583 – 589.
- Hughes, J., M. Ponniah, D. Hurwood, S. Chenoweth y A. Arthington.** (1999). Strong genetic structuring in a habitat specialist, the Oxleyan Pygmy Perch *Nannoperca oxleyana*. *Heredity* 83: 5–14.
- Hulsey, D. C., F. J. García de León, Y. Sanchez Johnson, D. A. Hendrickson y T. J. Near.** (2004). Temporal diversification of Mesoamerican cichlid fishes across a major biogeographic boundary. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 754-764.
- Hrbek, T., J. Seckinger y A. Meyer.** (2007). A phylogenetic and biogeographic perspective on the evolution of poeciliid fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 986–998.
- INE.** (1995). Atlas de Reservas de la Biosfera y otras áreas naturales protegidas. 1ª edición SEMARNAP.
- INE.** (1996a). Programa de manejo de Áreas Naturales Protegidas #3. Reserva de la Biosfera Sian Ka'an. 1ª edición. SEMARNAP.
- INE.** (1996b). Reserva de la Biosfera Sian Ka'an. Anexo. 1ª edición SEMARNAP.
- Imsiridou, A., A.P. Apostolidis, J.D. Durand, J. Briolay, Y. Bouvet y C. Triantaphyllidis.** (1998). Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Greek chub *Leuciscus cephalus* L. (Pisces, Cyprinidae) populations as revealed by RFLP analysis of mitochondrial DNA. *Biochemical Systematics and Ecology* 26: 415-429.
- Jaquard, A.** (1974). The genetic structure of populations. Springer, Nueva York.
- Jensen, L. J., A. J. Bohonak y S. T. Kelley.** (2005). Isolation by distance. *Web Service. BioMed Central Genetics* 6:13.
- Jukes, T. H., y C. R. Cantor.** (1969). Evolution of protein molecules, pp. 21-132. In H. N. Munro (ed.), *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, Nueva York.
- Kocher, T.D., W.K. Thomas, A. Meyer, S.V. Edwards, S. Pääbo, F.X. Villablanca y A.C. Wilson.** (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings Of the National Academy of Science of the United States of America* 89: 6196–6200.
- Kimura, M.** (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Kumar, S., K. Tamura y M. Nei.** (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150-163.
- López-Fernández, H., R. L. Honeycutt y K. O. Winemiller.** (2005). Molecular phylogeny and evidence for an adaptive radiation of geophagine cichlids from South American (Perciformes: Labroidei). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 227 – 244.

- López, O. A.** (1983). Localización y medio físico de San Ka'an. En Sian Ka'an. Estudios preliminares de una zona de Quintana Roo propuesta como Reserva de la Biosfera. Centro de Investigaciones de Quintana Roo (CIQRO), Puerto Morelos., Quintana Roo, México. Pp. 23-49.
- Lynch, M. y T. J. Crease.** (1990). The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Molecular Biology and Evolution* 7(4): 377-394.
- Magoulick, D. D.** (2000). Spatial and temporal variation in fish assemblages of drying stream pools: The role of abiotic and biotic factors. *Aquatic Ecology* 34: 29-41.
- Mamuris, Z., M.T.H. Stoumboudi, C. Stamatis, R. Barbierai, y K.A. Moutou.** (2005). Genetic variation in populations of the endangered fish *Ladigesocypris ghigii* and its implications for conservation. *Freshwater Biology* 50: 1441-1453.
- Mateos, M.** (2005). Comparative phylogeography of livebearing fishes in the genera *Poeciliopsis* and *Poecilia* (Poeciliidae: Cyprinodontiformes) in Central Mexico. *Journal of Biogeography* 32: 775-780.
- Meffe, K. G. y F. F. Snelson. (1989).** An ecological overview of Poeciliid fishes. En Meffe, K. G., F. F. Snelson. Eds. (1989). *Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliidae)*. Prentice Hall, New Jersey. Págs. 13-31.
- Meyer, A ; T. D. Kocher; P. Basasibwaki y A. C. Wilson.** (1990). Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature* 347: 550-553.
- Mesquita, N., G. Carvalho, P. Shaw, E. Crespo y M. M. Coelho.** (2001). River basin-related genetic structuring in an endangered fish species, *Chondrostoma lusitanicum*, based on mtDNA sequencing and RFLP analysis. *Heredity* 86: 253-264.
- Miller, R. R.** (2005). *Freshwater fishes of Mexico*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Mitsch, J. W. y J. G. Gosselink.** (1986). *Wetlands*. Van Nostrand Reinhold. Nueva York.
- Nei, M.** (1973). Analysis in gene diversity of subdivided populations. *Proceedings Of the National Academy of Science of the United States of America*. 70: 3121-3323.
- Nei, M.** (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. Nueva York.
- Nei, M y J. C. Miller.** (1990). A simple method for estimating average number of nucleotide substitution within and between populations for restriction data. *Genetics*. 125: 873-879.
- Nei, M. y S. Kumar.** (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Nueva York.
- Newton, A. C., T. R. Allnutt, A. C. M. Gillies, A. J. Lowe y R. A. Ennos.** (1999). Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 140-145.
- Ortega-Mayagoitia, E., Rojo, E.C. y Rodrigo, M.A.** (2002). Factors masking the trophic cascade in shallow eutrophic wetlands: evidence from a microcosm study. *Archiv für Hydrobiology*. **155**: 43-63.

- Parker, P. G., A. A. Snow, M. D. Schug, G. C. Booton y P. A. Fuerst.** (1998). What molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79 (2): 361–382.
- Pearse, A. S.** (1936). Results of survey of the cenotes in Yucatan. In *The Cenotes of Yucatan. A Zoological and Hydrographic Survey*. pp. 17-28. In Pearse, A. S., Creaser, A. P. & Hall, F. G., eds. Washington, D.C. Carnegie Institution of Washington, EUA.
- Posada, D. y K. A. Crandall.** (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitutions. *Bioinformatics* 14: 817–818.
- Primmer, C. R.** (2005). Genetic characterization of populations and its use in conservation decision making in fish. *The Role of Biotechnology*: 137–141.
- Ptacek, B. M. y F. Breden.** (1998). Phylogenetic relationships among the mollies (Poeciliidae: *Poecilia*: Mollienesia group) based on mitochondrial DNA sequences. *Journal of Fish Biology* 53: 64–81.
- Rozas, J., Sánchez-Delbarrio, J. C., Messeguer, X. y Rozas, R.** (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Schug, D. M., J. F. Downhower, L. P. Brown, D. B. Sears y P. A. Fuerst.** (1998). Isolation and genetic diversity of *Gambusia hubbsi* (mosquitofish) population in blueholes on Andros Island, Bahamas. *Heredity* 80: 336–346.
- Slatkin, M.** (1977). Gene flow and genetic drift in a species subject to frequent local extinctions. *Theoretical Population Biology* 12: 253–262.
- Slatkin M. y R. Hudson.** (1991). Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129: 555-562.
- Schmitter-Soto, J.J.** (1998). *Catálogo de los peces continentales de Quintana Roo*. Colegio de la Frontera Sur, Chetumal, México.
- Snoodgrass, J.W., Bryan, A. L., Lide, R.F. y Smith, G.L.** (1996). Factors affecting the occurrence and structure of fish assemblages in isolated wetlands of the upper coastal plain. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53: 443-454.
- Soucy, S. y J. Travis.** (2003). Multiple paternity and population genetic structure in natural populations of the poeciliid fish, *Heterandria formosa*. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 1328 – 1336.
- Sunnucks P.** (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 199–203.
- Swofford, D. L.** (2003). PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). Ver. 4. Sinauer Associates Sunderland, Massachusetts, EUA.
- Taberlet, P.** (1996). The use of mitochondrial DNA control region sequencing in conservation genetics. Pp. 123–141. In Smith, T. B. and R. K. Wayne, eds. (1996) *Molecular genetics approaches*. Oxford University Press. Oxford, Reino Unido.

- Tajima, F.** (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123: 585-595.
- Templeton, R. A., K. A. Crandall y C. F. Sing.** (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619-633.
- Templeton, R. A., E. Routman y C. A. Phillips.** (1995). Separating population structure from populations history: A cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140: 767-782.
- Templeton, R. A.** (2004). Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*, 13: 789-809.
- Templeton, R. A.** (2006). *Population Genetics and Microevolutionary Theory*. Wiley – Liss, New Jersey EUA.
- Vázquez-Domínguez, E., A. Hernández-Valdés; A. Rojas-Santoyo y L. Zambrano.** (en revision). Contrasting genetic structure in two closely related freshwater fish species inhabiting highly seasonal systems. *Wetlands*.
- Ward, R., Woodwark, M. y Skibinski, D. O. F.** (1994). A comparison of genetic diversity levels, in marine, freshwater and andromous fishes. *Journal of Fish Biology*: 44: 213–232.
- Wright, S.** (1943). Isolation by Distance. *Genetics* 28: 114-138
- Wright, S.** (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenetics* 15: 323-366.
- Zambrano, L., Vázquez-Domínguez, E., García-Bedoya, D., Loftus W.F. y Trexler, J.C.** (2006). Fish community structure in freshwater karstic wetlands of the Yucatan peninsula, Mexico. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 17: 193-206.
- Zane, L., W. S. Nelson; A. G. Jones y J. C. Avise.** (1999). Microsatellite assessment of multiple paternity in natural populations of a live-bearing fish, *Gambusia holbrooki*. *Journal of Evolutionary Biology* 12: 61–69.
- Zuckerland, E. y L. Pauling.** (1962). Molecular disease, evolution and genetic heterogeneity. In Kasha, M. and B. Pullman (eds.) *Horizons in Biochemistry*, Academic Press, Nueva York.

## 9. ANEXOS

### Anexo 1

#### Extracción de ADN

#### AQUAPURE GENOMIC TISSUE KIT

##### Componentes del kit:

Genomic DNA Lysis Solution	35 ml	(temperatura ambiente)
Protein Precipitation Solution	12 ml	(temperatura ambiente)
DNA Hydration Solution	10 ml	(temperatura ambiente)
RNase A Solution	250 $\mu$ l	(temperatura ambiente)
Proteinase K Solution	175 $\mu$ l	(4 °C)

##### Reactivos necesarios y no incluidos en el kit.

Isopropanol 100%  
Etanol 70%

##### Protocolo de Extracción:

#### 1. Lisis celular

- Se corta un pequeño trozo (~ 2 mm<sup>2</sup>) de tejido (preservado en etanol 70%), se seca un poco sobre papel absorbente, y se coloca en un tubo de 1.5 ml dejándolo secar a la intemperie.
- Se añaden 300  $\mu$ l de Genomic DNA Lysis Solution, se voltea el tubo para mezclar y se agitan en Vortex un par de segundos.
- Se añaden 1.5  $\mu$ l de Proteinase K (20mg/ml) a la solución de lisis y se mezcla invirtiendo el tubo 25 veces. Se incuban a 55 °C por 3 hr., o durante toda la noche (hasta que el trozo del tejido este completamente degradado). Mientras están en incubación, se mezclan en Vortex periódicamente.
- Se dejan enfriar a temperatura ambiente.

#### 2. Tratamiento con RNase

- Se añaden 1.5  $\mu$ l de RNase A Solution (4mg/ml) a la solución de lisis.
- Las muestras se mezclan invirtiendo el tubo 25 veces y se incuban a 65 °C por 65 min.

#### 3. Precipitación de proteínas

- Las muestras se dejan enfriar a temperatura ambiente. Una vez frías se añaden 100  $\mu$ l de Protein Precipitation Solution uniformemente.
- Se mezclan en Vortex a alta velocidad durante 20 seg. para mezclar bien la solución de precipitación
- Se centrifuga a 14,000 rpm durante 3 min. Las proteínas precipitadas forman un pellet. Si el pellet no es visible y compacto, se repite el procedimiento desde el paso 2 seguido de incubación en hielo por 5 min. para después repetir el paso 3.

#### 4. Precipitación de ADN

- A. Se vierte el sobrenadante en un tubo de 1.5 ml nuevo y se agregan 300  $\mu$ l de isopropanol al 100% (2-propanol 100%). El pellet de proteínas se desecha.
- B. Se mezcla la muestra invirtiéndola gentilmente 50 veces.
- C. Se centrifuga a 14,000 rpm por 1 min., el ADN es visible en forma de un pellet blanco pequeño.
- D. Se retira el sobrenadante y se seca brevemente el tubo en un papel absorbente. Se añaden 300  $\mu$ l de etanol al 70%, se invierte el tubo varias veces para lavar el pellet.
- E. Se centrifuga a 14,000 rpm por 1 min. *Se retira el etanol cuidadosamente para no arrastrar el pellet y perderlo.*
- F. Se coloca el tubo inclinándolo boca abajo (sin que salga el pellet) sobre una papel absorbente y se deja secar durante 10-15 min., o hasta que el etanol se evapore. Se puede lavar el pellet cuantas veces se considere necesario.

#### 5. Hidratación del ADN

- A. Se añaden 75  $\mu$ l de DNA Hydration buffer.
- B. La muestra se incuba a 65 °C por 1 hr. para acelerar la hidratación, o bien a temperatura ambiente durante toda la noche.
- C. Se mezcla en Vortex a velocidad media por 5 seg.
- D. El ADN se almacena a -20 °C.

#### NOTAS:

Con este kit, la proporción esperada de  $A_{260}/A_{280}$  nm. es de 1.7-2.0. Valores menores pueden indicar contaminación por proteínas; sin embargo, valores menores de 1.4 generalmente pueden amplificarse sin problemas. Valores mayores de 2.0 pueden indicar contaminación por RNA. Para ello, se recomienda aumentar el tiempo de incubación con RNasa de la solución de lisis de 15 a 60 min. Para quitar contaminantes de RNA de una muestra ya pura, se añade la misma cantidad de RNasa a la muestra de ADN durante la etapa inicial del procedimiento de aislamiento de ADN; se incuba después a 37 °C durante 15 a 60 min. Después de incubar, se retira el RNA digerido y restos de RNasa y se reprecipita.

## Anexo 2

### Cuantificación en Biofotómetro

#### BIOPHOTOMETER EPPENDORF 6131

1. Los parámetros usados para la cuantificación fueron los siguientes:

- Factor 50. Para leer la concentración de DNA.
- El factor de corrección encendido.
- Las Unidades de concentración se dan en  $\text{ng}/\mu\text{l}$

2. Se indica el factor de Dilución:

muestra DNA	+	H <sub>2</sub> O dd
10 $\mu\text{l}$	+	50 $\mu\text{l}$

3. El Biofotómetro se calibra preparando un blanco, para este caso:

	10 $\mu\text{l}$	+	50 $\mu\text{l}$
solución de hidratación de DNA (Kit)		+	H <sub>2</sub> O dd

Se coloca la solución en el canal de la cubeta y se introduce en el biofotómetro, de tal manera que las paredes transparentes se encuentren frente al paso del rayo láser.

Los valores que se tomaron en cuenta para conocer la pureza de ADN extraído fueron:

- La concentración de ADN en  $\text{ng}/\mu\text{l}$
- La densidad óptica  $A_{260}/A_{280}$  nm. (el intervalo de valores apropiados está entre 1.7 y 2.0, un valor más alto indica contaminación por RNA y por debajo por proteínas)
- El Valor de corrección de longitud de onda  $A_{320}$ .

## Anexo 3

### Purificación de ADN

#### AQUAPURE GENOMIC TISSUE KIT

1. A las muestras a tratar se les agrega 1.5  $\mu$ l de Solution A RNase a 37°C por 60 min.
2. Se dejan enfriar a temperatura ambiente.
3. Se agregan Protein Precipitation Solution y Etanol al 100% de la siguiente manera:

Por cada 100  $\mu$ l de muestra:

Protein Precipitation Solution	50 $\mu$ l
Etanol al 100%	200 $\mu$ l

1. Se invierten 50 veces para mezclar y se incuban a temperatura ambiente durante 15 min.
2. Se centrifugan a 14,000 rpm durante 5 min.
3. Se tira el sobrenadante y se adicionan 300  $\mu$ l de Etanol al 70%. Las muestras se invierten para lavar el DNA.
4. Se centrifugan a 14,000 rpm durante 1 min.
5. Se tira el sobrenadante y se secan en papel absorbente durante 10 a 15 min.
6. Por último, se adicionan 100  $\mu$ l de Solución de Hidratación.

## Anexo 4

### Electroforesis de los fragmentos de ADN amplificados

#### GELES DE AGAROSA

##### Gel al 1% (Cámara electroforética pequeña)

- TBE 0.5 %     45 ml.
- Agarosa         0.45 grs.

El agarosa se mezcla con el buffer, se calientan para homogeneizarlos; la mezcla se deja enfriar y cuando ésta se encuentra tibia se vierte en la charola de la cámara, se deja solidificar y cuando el gel se encuentra firme se sumerge dentro de la cámara, la cual contiene Buffer TBE al 0.5X. En cada pozo se carga la muestra del amplificado a correr, y además se carga en un pozo la escalera de 100 pb, la cual nos indica el tamaño del fragmento amplificado.

La cámara electroforética se conecta a una fuente de poder y las muestras se corren a 100 V durante 1 hr.

Transcurrido ese tiempo el gel se tiñe con Bromuro de Etidio, el cual se encuentra diluido en agua destilada a una concentración de 0.5 µg/ml, el gel se deja sumergido en el bromuro durante 20 o 30 minutos; y posteriormente se enjuaga en agua destilada durante 10 min. para quitar el exceso de Bromuro.

Una vez teñido el gel, éste se visualiza en un transluminador de luz U.V y se toma una fotografía digital para el registro y lectura del fragmento amplificado.

Para preparar el Buffer TBE se siguen los siguientes pasos:

##### - *Buffer TBE*

	5x	10x	0.5x
Tris-base	54.0 g	108 g	100 ml TBE 5x + 900 ml agua.
Ac. Bórico	27.5 g	55 g	50 ml TBE 10x + 950 ml agua
EDTA 0.5 M (pH 8)	20.0 ml	40 ml	

Se disuelve en 700 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 8.0 y posteriormente se afora a 1 L. El buffer preparado se almacena a 4°C.

##### - EDTA 0.5 M pH 8

Se disuelven 18.61 grs. de EDTA en 70 ml de Agua destilada, el pH se ajusta con NaOH (hidróxido de sodio), el cual fue usado en presentación de lunetas, agregándolas lentamente; finalmente se afora a 100 ml.

## Anexo 5

### Purificación de ADN partir de producto de PCR

#### QUIAquick PCR PURIFICATION KIT (250)

1. Se agrega un volumen de Buffer PB por cada volumen de producto de PCR. Se mezcla gentilmente.
2. Se coloca la muestra en el centro de una columna QIAquick.
3. Se centrifuga a 13,000 rpm durante 1 minuto.
4. Se tirar el decantado del tubo colector.
5. Para lavar la muestra se agregan 750  $\mu$ l de buffer PE.
6. Se centrifuga a 13,000 rpm durante 1 minuto.
7. Se tira el decantado del tubo colector y se centrifuga a 13,000 rpm durante 1 minuto.
8. Se coloca la columna en un tubo limpio de 1.5  $\mu$ l.
9. Para eluir el ADN, se agrega 15  $\mu$ l de agua bidestilada dejándola caer en el centro de la columna.
10. Se deja reposar por 1 min. y se centrifuga a 13,000 rpm durante 1 minuto.
11. Se agrega nuevamente 15  $\mu$ l de agua bidestilada y se repiten los pasos 9 y 10.

En el decantado final (30  $\mu$ l) del tubo colector de 1.5  $\mu$ l se encuentra el ADN purificado.