



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE ECOLOGÍA**

**ECOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE LA ESTRUCTURA Y DIVERSIDAD GENÉTICA DEL MAPACHE  
(*Procyon pygmaeus*) Y COATÍ (*Nasua nelsoni*) DEL CARIBE MEXICANO**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**ALEJANDRO FLORES MANZANERO**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:**

**DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. MARÍA DEL CARMEN MANDUJANO SÁNCHEZ  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM**

**DR. DAVID VALENZUELA GALVÁN  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**MÉXICO, D.F., Mayo, 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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





# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE ECOLOGÍA**

**ECOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE LA ESTRUCTURA Y DIVERSIDAD GENÉTICA DEL MAPACHE  
(*Procyon pygmaeus*) Y COATÍ (*Nasua nelsoni*) DEL CARIBE MEXICANO**

## **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**ALEJANDRO FLORES MANZANERO**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:**

**DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. MARÍA DEL CARMEN MANDUJANO SÁNCHEZ  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM**

**DR. DAVID VALENZUELA GALVÁN  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**MÉXICO, D.F., Mayo, 2014**

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas, celebrada el día 03 de marzo de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **FLORES MANZANERO ALEJANDRO** con número de cuenta 512026738 con la tesis titulada : **"Evaluación de la estructura y diversidad genética del mapache (*Procyon pygmaeus*) y coati (*Nasua nelsoni*) del Caribe Mexicano."**, bajo la dirección de la DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ

Presidente: DR. ARTURO FLORES MARTÍNEZ  
Vocal: DR. JUAN PABLO JARAMILLO CORREA  
Secretario: DR. DAVID VALENZUELA GALVÁN  
Suplente: M. EN C. ENRIQUE SCHEINVAR GOTTDIENER  
Suplente: DRA. MARÍA DEL CARMEN MANDUJANO SÁNCHEZ

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 25 de abril de 2014.

*M. del Coro Arizmendi*  
**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por los conocimientos y apoyo proporcionados que ayudaron a continuar mi formación académica y profesional. Es un honor y orgullo haber formado parte de este programa.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca de Maestría otorgada para realizar y concluir en el tiempo establecido mis estudios (CONACyT-271066); de igual manera, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el proyecto de investigación (CONACyT-101861). Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica por el financiamiento del proyecto (PAPIIT-IN217910).

A la constante asesoría de mi Comité tutor: Dra. Ella Gloria Vázquez Domínguez, Dra. María del Carmen Mandujano Sánchez y Dr. David Valenzuela Galván.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

Son muchos los actores que han participado en la realización de esta obra, muchos a quienes quiero agradecerles porque, sin ellos, no habría sido posible culminarla.

Comienzo por agradecerle a la Dra. Ella, por aceptarme en su laboratorio y permitirme formar parte de su equipo de trabajo; por brindarme su confianza para adoptar y realizar este proyecto; por todos sus comentarios que me ayudaron a mejorar académica y personalmente; por su apoyo, amistad y guía durante la maestría. Gracias porque, a pesar de ser un completo extraño, me diste una oportunidad. Gracias Ella.

En seguida, agradezco a los miembros de mi Comité tutor: a Meli Mandujano y David Valenzuela, por enriquecer y mejorar este trabajo con sus atinados comentarios, así como por el apoyo e interés mostrados en todo momento. Especialmente, gracias a Meli por la amistad que desde hace unos años tengo el agrado de compartir. Agradezco a los miembros del jurado: los doctores Arturo Flores Martínez y Juan Pablo Jaramillo Correa, así como al maestro Enrique Scheinvar Gottdiener, quienes en conjunto revisaron y mejoraron este trabajo; gracias por su tiempo, dedicación y comprensión. Especialmente, gracias al Dr. Arturo.

A todos los investigadores con quienes tuve la oportunidad de tomar clases; gracias a ellos conozco un poco más del apasionante mundo de la biología.

A todos mis compañeros y amigos del Instituto: Susette, Marco, Sayra, Tania, Juan Carlos, Coni, Evis, Azalea, Óscar, Gual, Nancy, Laura, Myriam y Mariana, por hacer de las horas de trabajo un ambiente agradable, por atender mis dudas y ayudarme a resolverlas, y por los ratos de convivencia fuera del laboratorio. También quiero agradecer a Sergio (Guatemala), por haberme iniciado en el trabajo de laboratorio, así como a Ariadna por ayudarme en esa etapa de principiante. Extiendo el agradecimiento a todos los integrantes del Laboratorio de Genética y Ecología (investigadores, técnicos y alumnos), quienes de alguna manera han estado presentes en mi formación personal y académica.

A Christopher González y a las autoridades de Cozumel, por el apoyo y facilidades durante el trabajo de campo; de igual manera a Gual, Hugo, Adrián y Jorge, por su ayuda y enseñanzas en campo. Adicionalmente, gracias a Gual por la colaboración y apoyo en el laboratorio.

A toda mi familia, especialmente a mis padres y hermana; gracias por darme la vida y a una amiga para siempre; por su confianza, cariño y apoyo incondicionales; gracias a todos por impulsarme hacia adelante.

Gracias a todos mis amigos (un “grupo surtido” conformado por colegas, cuates de la prepa, profesores... ¡TODOS!) porque me han brindado su compañía y ánimo para seguir adelante; por los recuerdos y amistad que siempre nos unirán a pesar de la distancia. A Izchel Gabriela Vargas Jiménez, por el cariño y ánimo brindados para realizar este proyecto; gracias por la compañía y los momentos llenos de felicidad a tu lado.

Finalmente, agradezco a los mapaches y coatís por haberse metido en las trampas; sin ellos, no habría sido posible realizar este trabajo.



*¡GRACIAS A TODOS!*



## DEDICATORIA

*A mí padres, por ser mi ejemplo a seguir en todos los ámbitos:*

*A mi papá, el mejor y más grande maestro que jamás tendré en la vida. Por demostrarme que con perseverancia, dedicación, respeto y cariño, se alcanzan el éxito y la inmortalidad. Por guiarme en todo momento; por brindar con cada copa de vino; porque siempre estás conmigo.*

*A mi mamá, gran mujer y ejemplo de fortaleza ante cualquier circunstancia. Por darme ánimos para continuar a pesar de las adversidades; por recordarme que en unidad se alcanzan los objetivos.*

*Para ellos este trabajo.*

## ÍNDICE

	Página
<b>Resumen</b> .....	vi
<b>Abstract</b> .....	viii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Diversidad genética	1
1.2 Medición de la diversidad genética	3
1.3 Genética de poblaciones	4
1.4 Divergencia y estructura genética	7
1.5 Marcadores moleculares	9
1.5.1 ADN mitocondrial- el citocromo <i>b</i>	10
1.5.2 Microsatélites (SSR, STR)	11
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	12
2.1 Las islas y sus poblaciones	12
2.2 Carnívoros endémicos de Isla Cozumel, Quintana Roo	13
2.2.1 <i>Procyon pygmaeus</i> Merriam, 1901	14
2.2.2 <i>Nasua nelsoni</i> Merriam, 1901	15
<b>3. Hipótesis</b> .....	17
<b>4. Objetivos</b> .....	17
<b>5. MÉTODOS</b> .....	18
5.1 Área de estudio	18
5.2 Trabajo de campo y obtención de muestras	18
5.3 Trabajo de laboratorio	19
5.3.1 Extracción de ADN	19
5.3.2 ADN mitocondrial (ADNmt) – gen citocromo <i>b</i> ( <i>cyt b</i> ): amplificación y secuenciación	21
5.3.3 Microsatélites: amplificación y secuenciación	23
5.3.3.1 <i>Procyon pygmaeus</i>	23
5.3.3.2 <i>Nasua nelsoni</i>	24
5.4 Análisis para las secuencias	27
5.4.1 Alineamiento	27
5.4.2 Pruebas de neutralidad	27

5.4.3 Diversidad y estructura genética	27
5.4.4 Divergencia y demografía	28
5.5 Análisis para los microsatélites	29
5.5.1 Alelos nulos y “ <i>stuttering</i> ”	29
5.5.2 Definición de grupos en la población y asignación de individuos	29
5.5.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento	30
5.5.4 Diversidad genética	30
5.5.5 Diferenciación alélica y genotípica	30
5.5.6 Estructura genética	31
5.5.7 Pruebas de parentesco, cuello de botella y tamaño efectivo	31
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
6.1 <i>Procyon pygmaeus</i> y <i>P. lotor</i> – citocromo <i>b</i>	33
6.1.1 Neutralidad y diversidad genética	33
6.1.2 Divergencia y demografía	33
6.2 <i>Procyon pygmaeus</i> – microsatélites	36
6.2.1 Definición de grupos y asignación de individuos	36
6.2.2 Equilibrio y diversidad genética	37
6.2.3 Estructura genética, relación de parentesco, cuello de botella y tamaño efectivo	38
6.3 <i>Nasua nelsoni</i> y <i>N. narica</i> – citocromo <i>b</i>	42
6.3.1 Neutralidad y diversidad genética	42
6.3.2 Divergencia y demografía	43
6.4 <i>Nasua nelsoni</i> - microsatélites	47
6.4.1 Definición de grupos y asignación de individuos	47
6.4.2 Equilibrio y diversidad genética	48
6.4.3 Estructura genética, relación de parentesco, cuello de botella y tamaño efectivo	49
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>52</b>
7.1 <i>Procyon pygmaeus</i>	52
7.2 <i>Nasua nelsoni</i>	54
7.3 Origen y divergencia respecto a las poblaciones continentales	57
7.4 Sugerencias de conservación	58
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>61</b>

**LITERATURA CITADA..... 62**  
**ANEXOS..... 73**

## FIGURAS Y CUADROS

FIGURAS	Página
<b>Figura 1.</b> Mapa de México y Cozumel indicando las localidades de donde se obtuvieron las muestras	20
<b>Figura 2.</b> Esquema del gen <i>cyt b</i> con los genes de ARNt que lo flanquean	21
<b>Figura 3.</b> Árbol de NJ de <i>Procyon pygmaeus</i> y <i>P. lotor</i> obtenido con la distancia genética $p$ y a partir de secuencias del <i>cyt b</i>	35
<b>Figura 4.</b> Red de haplotipos de las poblaciones de <i>Procyon</i> construida con el algoritmo MJ a partir de la variación del gen <i>cyt b</i>	36
<b>Figura 5.</b> Asignación de individuos de <i>P. pygmaeus</i> con STRUCTURE	37
<b>Figura 6.</b> Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) de <i>P. pygmaeus</i> , con base en los genotipos	37
<b>Figura 7.</b> Árbol de NJ de <i>Nasua nelsoni</i> y <i>N. narica</i> obtenido con la distancia genética $p$ y a partir de secuencias del <i>cyt b</i>	45
<b>Figura 8.</b> Red de haplotipos de las poblaciones de <i>Nasua</i> construida con el algoritmo MJ para la variación observada en el <i>cyt b</i>	46
<b>Figura 9.</b> Asignación de individuos de <i>N. nelsoni</i> con el programa STRUCTURE	48
<b>Figura 10.</b> Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) de <i>N. nelsoni</i> , con base en los genotipos	48
<b>CUADROS</b>	
<b>Cuadro 1.</b> Primers utilizados para la amplificación del gen citocromo <i>b</i> ( <i>cytb</i> ) de las muestras de <i>Procyon</i> y <i>Nasua</i>	21
<b>Cuadro 2.</b> Condiciones de PCR empleadas para amplificar el <i>cyt b</i> para <i>Nasua</i> y <i>Procyon</i>	22
<b>Cuadro 3.</b> Primers utilizados en este estudio para amplificar muestras de <i>P. pygmaeus</i>	25
<b>Cuadro 4.</b> Primers utilizados en este estudio para amplificar muestras de <i>N. nelsoni</i> .	26
<b>Cuadro 5.</b> Valores de divergencia entre las poblaciones de <i>Procyon pygmaeus</i> y <i>P. lotor</i> obtenidas a partir de la variación del <i>cyt b</i>	34
<b>Cuadro 6.</b> Valores de diversidad genética por locus y por grupos para <i>P. pygmaeus</i> ,	

incluyendo a la isla en su conjunto	39
<b>Cuadro 7.</b> Resultados del AMOVA de <i>P. pygmaeus</i> con base a los estimados de $F_{ST}$ y $R_{ST}$	40
<b>Cuadro 8.</b> Porcentajes de los tipos de relaciones entre individuos para los grupos y Cozumel de <i>P. pygmaeus</i>	41
<b>Cuadro 9.</b> Pruebas de cuello de botella en <i>P. pygmaeus</i>	42
<b>Cuadro 10.</b> Pruebas de neutralidad y valores de diversidad genética en las poblaciones de <i>Nasua</i> obtenidos con el <i>cyt b</i>	44
<b>Cuadro 11.</b> Valores de divergencia entre las poblaciones de <i>Nasua nelsoni</i> y <i>N. narica</i> obtenidos con el <i>cyt b</i>	44
<b>Cuadro 12.</b> Valores de diversidad genética para los microsatélites retenidos en la población de <i>N. nelsoni</i>	49
<b>Cuadro 13.</b> Resultados del AMOVA de <i>N. nelsoni</i> con base a los estimados de $F_{ST}$ y $R_{ST}$	50
<b>Cuadro 14.</b> Porcentajes de los tipos de relaciones entre individuos para la población de <i>N. nelsoni</i>	50
<b>Cuadro 15.</b> Pruebas de cuello de botella en la población de <i>N. nelsoni</i>	51

## RESUMEN

La diversidad genética constituye una parte integral de la biodiversidad y se refiere a la variación que existe en el material genético de los individuos de una especie. Las islas presentan comúnmente tamaños poblacionales pequeños, aislamiento geográfico, área limitada y procesos únicos de dispersión y colonización, aunado a características genéticas particulares como depresión por endogamia, pérdida de variación genética, y acumulación de mutaciones deletéreas. Ello hace que las poblaciones isleñas sean más susceptibles a pérdida de diversidad genética y extinción. Isla Cozumel, en Quintana Roo, México, alberga una diversidad biológica única que incluye al menos 31 taxa endémicos, de los cuales el grupo de vertebrados menos representado son los mamíferos, destacando dos carnívoros prociónidos: el mapache enano y el coatí enano. Dado que son endémicos y susceptibles a los efectos antes mencionados, es necesario recabar información poblacional y genética de sus poblaciones. Así, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la diversidad y estructura genética de *Procyon pygmaeus* y *Nasua nelsoni*, considerando la distribución genética y geográfica de los individuos en la isla. Las muestras de ambas especies se obtuvieron de trabajo de campo en 2012, así como de colectas previas (2003 y 2006); el trabajo de laboratorio consistió en la extracción de ADN, amplificación de loci de microsatélites específicos para cada especie y amplificación del gen citocromo b (*cyt b*). Los análisis de las secuencias de *cyt b* consistieron en la alineación manual, estimación de pruebas de neutralidad, valores de diversidad y de distancia genética entre las especies insulares y su contraparte continental; construcción de árboles filogenéticos, redes de haplotipos y análisis demográficos y tamaño efectivo. Para los loci de microsatélites, se evaluaron alelos nulos, se estimaron valores de diversidad y estructura genética y se definieron grupos genéticos. Finalmente, se realizaron pruebas de parentesco, cuello de botella y tamaño efectivo. Se encontró un único haplotipo (*cyt b*) para *P. pygmaeus*; para microsatélites éste mostró valores moderados de número de alelos (2 a 5) y de heterocigosidad ( $H_o = 0.490$  y  $H_e = 0.525$ ). La población en la isla está diferenciada en dos grupos genéticos ( $F_{ST} = 0.109$  y  $R_{ST} = 0.144$ ). Se detectó cierto desequilibrio de ligamiento, que puede ser producto de presencia de alelos exclusivos y cierto grado de endogamia, apoyado por los análisis de parentesco que mostraron que uno de los grupos tiene más individuos emparentados. Se detectó señal de cuello de botella con todos los estimadores, lo cual se respalda con el tamaño efectivo que fue bajo (21.4 individuos), resultados que en conjunto indican que *P. pygmaeus* ha sufrido un cuello de botella crónico a lo largo de muchas generaciones. Para *N. nelsoni*, se encontraron valores de diversidad genética moderados tanto para secuencias: cuatro haplotipos

y diversidad haplotípica  $h = 0.674 \pm 0.054$ , como para microsatélites: 2 a 7 alelos;  $H_o = 0.476$  y  $H_e = 0.537$ . Se detectaron cuatro grupos con *cyt b* y un grupo con microsatélites. Se sugiere que la población de *N. nelsoni* ha mantenido históricamente una diferenciación a nivel de cuatro linajes, mientras que la conducta y movilidad que presentan los individuos en la isla ha prevenido una diferenciación en escala temporal más reciente. Se encontró señal de cuello de botella con ambos marcadores, que sugiere una reducción del tamaño poblacional, mientras que el tamaño efectivo fue bajo (17.1 individuos), por lo que se hipotetiza que la población no se ha recuperado del o los cuellos de botella históricos. Los resultados del presente trabajo son importantes en términos de conservación, ya que exhiben los niveles bajos y moderados de diversidad genética del mapache y coatí, respectivamente, además de la estructura presente en la isla y los tamaños poblacionales pequeños. Diversos factores pueden estar asociados, destacando los fenómenos naturales como huracanes y la alteración del hábitat debido a las actividades humanas. Los dos prociénidos están en riesgo y es urgente la implementación de estrategias de conservación en la isla, que les permitan a estas especies endémicas persistir a mediano y largo plazo.



## ABSTRACT

Genetic diversity is an integral part of biodiversity and encompasses all the variation extant in the genetic material of individuals of a species. Islands commonly exhibit small population sizes, geographic isolation, limited area and unique dispersion and colonization processes, in addition to particular genetic characteristics such as inbreeding depression, loss of genetic variation and accumulation of deleterious mutations. These factors make island populations more susceptible to lose genetic diversity and extinction. Cozumel Island, Quintana Roo, Mexico, harbors a unique biological diversity that includes at least 31 endemic taxa, from which the more sub-represented group of vertebrates is mammals. From these, two carnivore procyonids are highlighted: the dwarf raccoon and the dwarf coati. Since both are endemic and susceptible to the factors enlisted above, information about their populations and genetics is needed. So, the objective of the present work was to evaluate the genetic diversity and structure of *Procyon pygmaeus* and *Nasua nelsoni*, considering the geographic and genetic distribution of the individuals on the island. Samples from both species were obtained from field work on 2012 and previous collecting works (2003 and 2006); lab work involved DNA extraction, the amplification of species-specific microsatellite loci and the amplification of cytochrome *b* gene (*cyt b*). Analysis of *cyt b* sequences consisted of manual alignment, estimates of neutrality tests, diversity measures and genetic distances between insular species and their continental counterpart; construction of phylogenetic trees, haplotype networks, demographic analysis and effective population size estimates. For microsatellite loci, the presence of null alleles was evaluated, genetic diversity and structure measurements were estimated and genetic groups (clusters) were defined. Finally, relatedness calculations, bottleneck tests and effective population size estimates were performed. A unique haplotype (*cyt b*) was found in *P. pygmaeus*; moderate values for both, allele richness (2-5) and heterozygosity ( $H_o = 0.490$  and  $H_e = 0.525$ ) were exhibited for microsatellite loci. Population on the island is differentiated in two genetic clusters ( $F_{ST} = 0.109$  and  $R_{ST} = 0.144$ ). Certain linkage of disequilibrium was detected, which can be attributed to the presence of exclusive alleles and certain inbreeding degree, supported by relatedness calculations which indicated that one cluster possess more inter-related individuals. Bottleneck signal was detected with all of the estimators, which is supported by the small effective population size (24.1 individuals). Altogether, results indicate that *P. pygmaeus* has suffered a chronic bottleneck through many generations. For *N. nelsoni*, values of moderate genetic diversity were found for both, sequences: four haplotypes and haplotypic diversity  $h = 0.674 \pm 0.054$ ; and for microsatellite loci: 2-7 alleles,  $H_o = 0.476$  and  $H_e = 0.537$ . Four clusters

were detected with *cyt b*, and only one with microsatellite loci. It's suggested that *N. nelsoni* population has historically maintained a level of differentiation at four lineages, but behavioral and dispersal capabilities of individuals has prevented a more recently degree of differentiation. Bottleneck signal was detected with both molecular markers, which suggests a reduction of population size, while effective population size was small (17.1 individuals), for all which can be hypothesized that the population hasn't been recovered yet from the historical bottleneck events. The results of the present work are very important on conservation terms because the low and moderate levels of genetic diversity for the raccoon and coati, respectively, are highlighted, in addition to the structure on the island and the small population sizes. Diverse factors may be associated to this, such as natural phenomena (hurricanes) and habitat alteration by human activities. For all the facts enlisted above, both procyonids are in risk and it's urgent the implementation of conservation strategies on the island, which permit these procyonids to persist in a medium and long term.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Diversidad genética

El término biodiversidad o diversidad biológica se refiere a todas las especies de plantas, animales y microorganismos que habitan el planeta, así como a los ecosistemas y procesos ecológicos de los que forman parte (McNeely *et al.* 1990). Esta diversidad se considera en tres niveles fundamentales: ecosistemas, especies y genes (McNeely *et al.* 1990). Los genes son secuencias de nucleótidos que se localizan en un segmento particular (*locus*) de una molécula de ADN; las distintas variantes que puede tener este segmento de ADN en ese lugar del cromosoma corresponden a las *formas alélicas* o *alelos* (Frankham *et al.* 2010; Hedrick 2011). Es precisamente al nivel de genes al que corresponde la diversidad genética dentro de las especies, constituyendo una parte integral de la biodiversidad (McNeely *et al.* 1990).

La diversidad genética (o variación genética) es toda la variación que existe en el material genético de los individuos de una especie, incluyendo el núcleo y organelos celulares como la mitocondria y el cloroplasto (Hedrick 2011). Esta diversidad es originada por mutaciones (Griffiths *et al.* 2004; Frankham *et al.* 2010), mismas que se consideran la materia prima para la evolución y adaptación de las poblaciones naturales (Frankham 1996, 1997; Frankham *et al.* 2010). La disminución o pérdida de la variación genética normalmente se relacionan con una disminución en la sobrevivencia de las especies (McNeely *et al.* 1990), lo que afecta directamente su adecuación y persistencia (Frankham *et al.* 2010). El enfoque teórico supone que tener niveles altos de diversidad genética confiere a los organismos la capacidad para responder a cambios ambientales (Frankham *et al.* 2010), así como a enfermedades, parásitos y depredadores (Frankham 1996), lo que se relaciona directamente con procesos de adaptación, adecuación y especiación (Hedrick 2001).

En el caso particular de las poblaciones insulares, generalmente se reconoce que poseen niveles bajos de diversidad genética debido a las condiciones que presentan las islas como aislamiento, tamaño pequeño, baja inmigración, entre otras (Frankham 1997, 1998). Ejemplos de mamíferos isleños en particular con baja diversidad genética están el zorro isleño (*Urocyon littoralis*; Wayne *et al.* 1991), el tejón euroasiático (*Meles meles*; Kurose *et al.* 2001), marsupiales endémicos (Eldridge *et al.* 2004), roedores (Almeida *et al.* 2005; Hinten *et al.* 2003), entre otros. Por ello, es primordial el estudio de la diversidad genética para garantizar la conservación de la biodiversidad, ya que permite entender mejor los procesos temporales,

espaciales y evolutivos de la diversidad biológica con el fin de garantizar su viabilidad a largo plazo (Vázquez-Domínguez y Vega 2006), particularmente en las poblaciones insulares.

La variación genética en las poblaciones naturales está determinada por factores y procesos como mutación, selección, deriva génica, flujo génico, eventos de endogamia y recombinación (Hedrick 2011), los cuales se describen brevemente a continuación:

- **Mutación:** se refiere a una variedad de eventos que conllevan a alteraciones en el material genético de los individuos. El proceso de mutación abarca varios niveles, desde cambios al nivel de alelos y en secuencias de ADN (Hamilton 2009). Cuando ocurre una mutación en una población y surge un nuevo alelo, es muy probable que en la siguiente generación se pierda, debido a que su frecuencia ( $1/\text{número de alelos en la población}$ ) es baja (Hedrick 2011). Es necesaria la acumulación de los alelos a lo largo de las generaciones para incrementar su frecuencia y que se fijen en la población (Freeman & Herron 2002). Al respecto, se han propuesto diferentes modelos para ilustrar los cambios genéticos que producen las mutaciones; los más utilizados son el modelo de alelos infinitos (IAM, por sus siglas en inglés) y el modelo de mutación paso a paso (SMM) (Hamilton 2009). El modelo IAM asume un número infinito de sitios o alelos en los que puede ocurrir un cambio, de manera que en cada evento surgirán nuevos alelos y no ocurrirán dos mutaciones en el mismo sitio. En cambio, el modelo SMM considera el estado (tamaño) inicial del alelo, lo que provoca que los alelos más diferentes entre sí en estado se encuentran separados por más eventos mutacionales (Hamilton 2009).
- **Migración (flujo génico):** en un sentido evolutivo, se refiere al movimiento de alelos entre poblaciones (Freeman y Herron 2002), mediante los individuos (migración) o gametos (Slatkin 1985; Hamilton 2009; Hedrick 2011).
- **Deriva génica:** es el cambio aleatorio (o fluctuación) de las frecuencias alélicas a lo largo de las generaciones en una población; depende directamente del tamaño de ésta: entre más pequeña sea la población, mayor efecto tiene el azar (Hamilton 2009; Hedrick 2011).
- **Selección natural:** es la reproducción y/o sobrevivencia diferencial de los genotipos que, al presentar ciertas características, les permiten pasar sus alelos de una generación a otra (Futuyma 2009; Hedrick 2011).
- **Endogamia:** ocurre cuando los apareamientos en una población se dan entre individuos emparentados. Una generalidad de la endogamia es que promueve un cambio en las

frecuencias genotípicas con el paso de generaciones, pero las frecuencias alélicas permanecen sin cambios (Hedrick 2011).

- Recombinación: es el proceso mediante el cual se generan nuevas combinaciones alélicas durante la formación de gametos en la reproducción sexual (Freeman y Herron 2002), por lo que bien puede considerarse un factor que promueve la variación genética (Griffiths *et al.* 2004).

Los factores anteriormente mencionados tienen efectos particulares, siendo la deriva génica y la endogamia las directamente relacionadas con la disminución de variación genética (Frankham 1996; Griffiths *et al.* 2004; Hedrick 2011). El flujo génico y la selección pueden aumentar o disminuir dicha variación según sea el caso (Futuyma 2009; Hedrick 2011)

## 1.2 Medición de la diversidad genética

Existen diferentes estimadores para cuantificar la diversidad genética, los cuales dependen del marcador molecular que se utilice (ver capítulo 1.5). Estas medidas son importantes y necesarias para documentar la pérdida o ganancia de la variación genética, así como de los cambios evolutivos y la diferenciación de poblaciones (Frankham *et al.* 2010). A continuación se describen algunos estimadores de diversidad genética:

- Número de haplotipos ( $Nh$ ): los haplotipos son las diferentes versiones o formas genéticas de una secuencia de ADN (Tajima 1983); es decir, es el arreglo particular de nucleótidos en un gen, que caracteriza a un individuo en la población. Así, el número de diferentes versiones de secuencias que están presentes en la población, constituye el número de haplotipos.
- Diversidad haplotípica ( $h$ ): se refiere a la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar de una población sean diferentes (Tajima 1983).
- Número de sitios segregantes ( $S$ ): se refiere al número de lugares que son ocupados por diferentes nucleótidos cuando se compara un conjunto de secuencias homólogas (población). Esta medida puede representarse como la proporción de sitios segregantes respecto al total de sitios nucleotídicos ( $p_S$ ; Hamilton 2009).
- Promedio de diferencias nucleotídicas ( $K$ ): es el promedio de diferencias pareadas en un conjunto de secuencias de ADN. Para obtenerla, se analiza un conjunto de secuencias de ADN por pares; esto es, se suman los sitios segregantes presentes en cada par de secuencias, y se promedia con el total de comparaciones efectuadas. (Hamilton 2009).

- Diversidad nucleotídica ( $\pi$ ): esta medida es equivalente a la heterocigosis promedio ( $H$ ). Se obtiene mediante la división del promedio de diferencias nucleotídicas ( $K$ ) entre el total de nucleótidos presentes en las secuencias de ADN. Así, esta medida es a nivel de sitios nucleotídicos (Hamilton 2009; Hedrick 2011).
- Diversidad alélica ( $A$ ): se refiere al número promedio de alelos por locus en la población (Frankham *et al.* 2010, Hedrick 2011).
- Proporción de loci polimórficos ( $P$ ): se refiere a la presencia de diferentes formas genéticas de un locus en una población (Hedrick 2011). Dicho de otra manera, se refiere al número de loci distintos dividido por el número total de loci. Si se tienen 50 loci y de éstos 10 presentan más de una forma genética, la proporción de loci polimórficos es  $10/50 = 0.2$  (Hedrick 2011).
- Heterocigosis promedio ( $H$ ): en organismos diploides, la heterocigosis se refiere a la existencia de dos formas alélicas distintas en un locus particular (Hedrick 2011), por lo que la heterocigosis promedio ( $H$ ) hace referencia a la proporción de loci que son heterocigos a nivel de la población (Futuyma 2009). Así, ésta se define como la sumatoria de las proporciones de heterocigosis por locus dividido por el total de loci (Frankham *et al.* 2010). Esta medida se puede determinar en forma de heterocigosis esperada ( $H_E$ ), que es aquella que se esperaría encontrar en una población en EHW (Hedrick 2011), o en heterocigosis observada ( $H_O$ ), que corresponde a la heterocigosis presente en una población real (Frankham *et al.* 2010).
- Número de alelos observados ( $n_o$ ): también llamado riqueza alélica, se refiere a cuántos alelos hay por locus en una población. Esta medida depende del tamaño de muestra y es más susceptible a la pérdida de diversidad genética que la heterocigosis.
- Número efectivo de alelos ( $n_e$ ): es el número de alelos igualmente frecuentes en una población "ideal" que producirían el mismo valor de heterocigosis observada (Allendorf y Luikart 2007); por ello, se calcula como el valor inverso de la homocigosis esperada (Hedrick 2011).

### 1.3 Genética de poblaciones

Para estudiar la variación genética en las poblaciones naturales existe una disciplina llamada genética de poblaciones, que estudia la variación heredada en los seres vivos y la forma en que ésta se modifica en el tiempo y el espacio, mediante la medición de las frecuencias alélicas y genotípicas (Freeman y Herron 2002). El marco teórico de la genética de poblaciones se

fundamenta en el principio del equilibrio Hardy-Weinberg (EHW), que permite describir el contenido genético de poblaciones diploides en términos de frecuencias alélicas, asumiendo que no actúa ningún proceso biológico que las cambie de una generación a otra (Allendorf y Luikart 2007; Hedrick 2011). El EHW asume lo siguiente: 1) la población de organismos es diploide, con reproducción sexual y generaciones discretas (no se sobrelapan en el tiempo); 2) el tamaño de la población es muy grande (infinito), lo que da lugar a 3) apareamientos aleatorios y ausencia de deriva génica; 4) no surgen alelos nuevos dentro de la población ni hay cambios en los ya existentes (es decir, no hay mutación); 5) no llegan alelos de otras poblaciones (no hay migración); y 6) todos los genotipos tienen la misma probabilidad de sobrevivir y pasar sus alelos a la siguiente generación (es decir, no hay selección) (Freeman y Herron 2002; Allendorf y Luikart 2007; Hamilton 2009; Frankham *et al.* 2010; Hedrick 2011). Asimismo, el desequilibrio de ligamiento (DL) es la asociación no aleatoria entre alelos de diferentes pares de loci (Slatkin 2008; Hedrick 2011); si existen alelos ligados entre diferentes loci podría indicar, por ejemplo, que no existe recombinación.

En cierto sentido, los supuestos anteriores definen los procesos biológicos que conforman el campo de la genética de poblaciones clásica, debido a que cada uno representa un área conceptual para que se elaboren predicciones comprobables acerca de los procesos que ocurren en las poblaciones (Hamilton 2009). Por ello, el EHW se considera un modelo nulo que describe la condición genética de las poblaciones cuando las frecuencias alélicas de éstas se mantienen sin cambios (en equilibrio) a través de las generaciones (Freeman y Herron 2002). Si una población no se encuentra en EHW, es indicador de que algún factor evolutivo está actuando (Freeman y Herron 2002; Allendorf y Luikart 2007; Hamilton 2009; Hedrick 2011).

Una teoría muy empleada en la genética de poblaciones clásica es la teoría neutral (Kimura 1968), que utiliza los modelos de alelos y sitios infinitos y se basa en la interacción de dos factores que determinan la variación genética: la mutación (que genera la variación) y la deriva génica (que la elimina). Se le considera una hipótesis nula para analizar la variación genética en los organismos, principalmente de sus secuencias de ADN (Hedrick 2011), y se reconoce que dicha teoría se relaciona más con los eventos demográficos que han ocurrido en las poblaciones (Nielsen 2001).

Una de las pruebas para determinar si la variación genética es consistente con la teoría neutral fue desarrollada por Tajima (1989), que usa el estadístico  $D$  basado en las diferencias que existen entre el número de sitios segregantes (polimórficos) y el número promedio de diferencias nucleotídicas apareadas (Tajima 1989). Otras pruebas de neutralidad que toman en

cuenta la distribución de las frecuencias de polimorfismos son la prueba de Fu y Li (estadísticos  $D$  y  $F$ ; 1993), y la prueba de Fu (estadístico  $F_s$ ; 1997), que se basan en el número de mutaciones existentes en las secuencias analizadas (Hedrick 2011). Estas pruebas se utilizan para detectar una desviación de la “neutralidad”, con lo que es posible sugerir qué mecanismos están asociados a los polimorfismos observados, principalmente a causa de cambios demográficos (Fu 1997): valores positivos indican un decremento poblacional mientras que los negativos indican crecimiento (Hedrick 2011).

Por lo anterior, también se pueden realizar análisis demográficos con base en el número de diferencias pareadas que existen entre secuencias, asumiendo ya sea un modelo de crecimiento constante o un modelo de crecimiento o decremento poblacional (Rogers y Harpending 1992), lo que se conoce como distribución mismatch. Este estadístico compara la distribución observada con los valores esperados bajo un modelo determinado. Los estadísticos calculados son: 1)  $r$  (estadístico de “raggedness” o irregularidad; Harpending 1994), que cuantifica el grado de ajuste (en inglés “smoothness”: suavidad) de la distribución de las frecuencias observadas (las “irregulares”) respecto a las esperadas (las “regulares”) bajo el modelo demográfico de crecimiento y 2) el estadístico  $R_2$  (Ramos-Onsins y Rozas 2002), el cual considera las mutaciones existentes en las secuencias, basándose en que el número promedio de diferencias nucleotídicas en una población, después de un evento de crecimiento demográfico “explosivo” (repentino), disminuye a la mitad. Así, bajo ese modelo de crecimiento explosivo,  $R_2$  tendría valores bajos y es sensible a tamaños de muestra pequeños. Los valores de significancia de estos estadísticos pueden ser comparados con las pruebas de Tajima (1989), Fu y Li (1993) y Fu (1997).

Por otro lado, las poblaciones que han experimentado recientemente alguna reducción en su tamaño (cuello de botella), pueden presentar un incremento en la probabilidad de identidad por descendencia (endogamia), mayor efecto de la deriva génica (factores estocásticos) y de manera general una disminución de la variación genética (Garza y Williamson 2001). Por ello, el número de alelos se pierde más rápido que la diversidad genética en conjunto (heterocigosis observada), que se aprecia como un exceso de heterocigos (mayor heterocigosis observada) en relación a lo que se esperaría en equilibrio mutación-deriva (menor heterocigosis esperada) (Cornuet y Luikart 1996). Aunado a lo anterior, Garza y Williamson (2001) demostraron que para los microsatélites (ver capítulo 1.5), la relación del número de alelos ( $k$ ) respecto al rango de los mismos ( $r$ ) en una población, puede utilizarse para detectar eventos de reducción en el tamaño poblacional. Dado que después de un evento de reducción en la población el número



de alelos se reducirá más rápido que el rango de los alelos, la proporción  $M$  (donde  $M = k/r$ ) será más pequeña en poblaciones que han experimentado una reducción. Este índice es análogo a la distribución mismatch, y sólo difiere en que examina la presencia o ausencia de alelos intermedios específicos. Además, establece que cualquier población con valor de  $M < 0.68$  ha sufrido una reducción en su tamaño (Garza y Williamson 2001). Asimismo, los autores señalan que el modelo de dos fases (two phases model: TPM, que incluye mutaciones IAM y SMM) está determinado por tres parámetros, que son theta ( $\Theta = 4 N_e \mu$ ), la proporción de mutaciones de un paso ( $P_s$ ) y el tamaño promedio de las mutaciones que no son de un paso ( $\Delta_g$ ) (Garza y Williamson 2001).

Con relación a lo anterior, también puede estimarse el tamaño efectivo de la población ( $N_e$ ). En sentido práctico, éste puede definirse como el número de individuos en etapa reproductiva que contribuyen a la siguiente generación con variantes genéticas, y la forma más simple de calcularlo es bajo el supuesto equilibrio entre dos factores que determinan la variación genética en las poblaciones: la mutación y la deriva génica (Hedrick 2011). Es importante destacar que estos análisis son sensibles al tipo de marcador molecular que se utilice: cuando se trabaja con secuencias de ADN se estima el tamaño efectivo evolutivo (a largo plazo), mismo que está determinado por los impactos acumulativos de la mutación y deriva génica a lo largo de muchas generaciones (Hedrick 2011).

#### **1.4 Divergencia y estructura genética**

Como medidas de diferenciación a nivel intrapoblacional (dentro de las poblaciones) e interpoblacional (entre poblaciones), se tienen los estimadores  $dx$  y  $dy$ , que definen el número promedio de diferencias nucleotídicas (sustituciones) que hay entre dos secuencias tomadas al azar dentro de la población  $X$  ( $dx$ ) y la población  $Y$  ( $dy$ ); es decir, son diferencias que se dan al interior de cada población. La medida interpoblacional  $D_{xy}$  se define como el número promedio de diferencias nucleotídicas entre una secuencia tomada al azar de la población  $X$  y otra de la población  $Y$  (Takahata y Nei 1985). Así, la relación de ambos niveles de diferenciación (dentro y entre poblaciones) permite conocer el grado de divergencia que existe entre ellas. Para estimar la divergencia, Nei y Li (1979) propusieron la medida  $D$  (también expresada como  $D_a$ ), que se refiere al número neto de sustituciones nucleotídicas que han ocurrido a partir de la separación (divergencia) de las poblaciones (Nei y Miller 1990), y constituye un buen cuantificador de la divergencia entre poblaciones porque mide si hay un exceso de sustituciones (Wakeley 1996).

Por otro lado, es posible que una población no se encuentre distribuida de forma continua o uniforme a lo largo de su hábitat, ya sea por factores geográficos, ecológicos o de comportamiento (Hedrick 2011). En estos casos se considera que la población original se encuentra dividida en pequeñas unidades denominadas subpoblaciones, lo que provoca que la conectividad y variación genética entre éstas difieran (Hedrick 2011). El hecho de que las probabilidades de apareamiento de los individuos de la población no sean iguales para todos debido a esta discontinuidad (heterogeneidad) espacial, se traduce en lo que se conoce como estructura poblacional, que a su vez provoca frecuencias alélicas distintas para cada subpoblación, afectando la variación genética al interior de cada una de ellas (Hamilton 2009).

El flujo génico es un factor que contrarresta la estructuración dado que permite el contacto entre subpoblaciones. Cuando existe flujo génico alto la variación genética se homogeniza, mientras que con bajo flujo las subpoblaciones tienden a diferenciarse, dado que el efecto de la deriva génica, la selección y/o de la mutación es diferente al interior de cada una (Hedrick 2011). Esto conduce al concepto de distancia genética ( $D_{Nei}$ ; Nei 1972), que se refiere al número acumulado de sustituciones genéticas por locus que determina el grado de similitud o disimilitud genética de una población respecto a otra. Así, se define como el valor inverso de la similitud genética (Anexo 1), donde un valor cercano a la unidad (1) indica mucha semejanza y uno cercano a cero indica alta diferencia (Hedrick 2011).

El flujo génico es un componente importante en la estructuración de las poblaciones, por lo que su estudio es vital en la biología evolutiva (Aguirre-Planter 2007). Para evaluarlo existen métodos directos e indirectos; los indirectos emplean marcadores moleculares para determinar la distribución espacial de alelos en las poblaciones, y posteriormente inferir los patrones de flujo génico que existen entre éstas (Slatkin 1985). El método más utilizado para medir el grado de estructuración entre subpoblaciones corresponde a los estadísticos  $F$  desarrollados por Sewall Wright, a partir de su coeficiente  $F$  que mide la correlación entre alelos (Wright 1951). De forma análoga a las poblaciones divididas, Wright subdividió su coeficiente  $F$  en tres componentes para asignar la varianza genética a tres niveles distintos: a nivel poblacional ( $F_{ST}$ ), de subpoblaciones ( $F_{IT}$ ) y de individuos ( $F_{IS}$ ) (Hedrick 2011).  $F_{ST}$  corresponde a la medida de diferenciación genética sobre todas las subpoblaciones, sus valores van de 0 a 1 y por lo general son positivos (algunos estimados son negativos), mientras que  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  son medidas de la desviación de proporciones del EHW dentro de las subpoblaciones y en toda la población, respectivamente, donde valores positivos indican deficiencia de heterócigos y valores negativos indican exceso de heterócigos (Hedrick 2011). El grado de estructuración entre poblaciones

también puede medirse por medio del flujo genético de manera indirecta, con base en el número de migrantes ( $Nm$ ) (Hedrick 2011).

La estructuración poblacional puede impedir, por ejemplo, la propagación de alelos nuevos o ventajosos hacia otras subpoblaciones, pero al mismo tiempo le permite a esa subpoblación evolucionar de manera independiente, conservando alelos únicos que potencialmente pueden favorecer la adaptación local (Hamilton 2009). Por ello, un paso crucial en los estudios de genética de poblaciones es precisamente definir las “poblaciones” a las cuales pertenecen los individuos muestreados, ya que muchas veces se hace la división de manera subjetiva (por ejemplo, por localidad de muestreo) o se desconoce el sitio o localidad de las muestras, que podría no corresponder con las poblaciones naturales y, a su vez, producir errores en la interpretación de los datos (Pritchard *et al.* 2000). Actualmente, uno de los métodos más utilizados para determinar el número de poblaciones “reales” es el propuesto por Pritchard *et al.* (2000), el cual parte de un número hipotético de poblaciones y utiliza un método de agrupación bayesiano para asignar individuos (por probabilidad) a alguna de esas poblaciones ( $K$ ), con base en sus genotipos. Es importante mencionar que, aun cuando no se especifica un procedimiento estadístico para escoger el número de grupos ( $K$ ) “verdadero”, existen métodos que permiten estimarlo. El más utilizado es el propuesto por Evanno *et al.* (2005), que consiste en obtener  $\Delta K$  (la tasa de cambio de la probabilidad entre los distintos valores de  $K$ ) para detectar el nivel jerárquico de estructura más alto. Así, ambos métodos se han utilizado de manera conjunta para inferir el número de poblaciones en diferentes estudios (Inoue *et al.* 2012; Fraser *et al.* 2013).

### **1.5 Marcadores moleculares**

Los marcadores moleculares son biomoléculas, principalmente ADN y proteínas (Avice 2004), que funcionan como caracteres distintivos en los individuos, entre los individuos de un grupo y entre diferentes taxa (McDonald, 2008). Poseen además múltiples estados (por ejemplo, alelos) para cada carácter (por ejemplo, locus), que ayudan a determinar diferencias en las secuencias de ADN de los organismos (Sunnucks 2000), por lo que se pueden evaluar, entre otros aspectos, la variabilidad genética y estructura de las poblaciones naturales, así como las relaciones filogenéticas y la historia evolutiva de las mismas (Avice 2004).

En las últimas décadas se han caracterizado numerosos marcadores moleculares, principalmente a partir de las diferencias en las secuencias del ADN mitocondrial (ADNmt) y de loci de microsatélites. Ambos marcadores se han usado para estudiar una gran variedad de

especies, y al complementarlos con estudios de tipo ecológico, de comportamiento, o de dinámicas poblacionales, aportan un mejor entendimiento respecto a la evolución de las mismas (Arias *et al.* 2006).

### **1.5.1 ADN mitocondrial- el citocromo *b***

El ADNmt es una molécula clave para entender las relaciones evolutivas entre los individuos, poblaciones y especies (Irwin *et al.* 1991). En vertebrados, es circular y de tamaño pequeño (16-20 kilobases) conformada por 37 genes, además de una región que controla la replicación y transcripción en la molécula. Esta región llamada apropiadamente “región control” es conocida en vertebrados y equinodermos como “D-loop” (Awise 2004). Las propiedades que hacen al ADNmt un buen marcador molecular son su elevada tasa de sustitución de nucleótidos, su gran variación intraespecífica y su herencia estrictamente materna, lo que provoca también que la recombinación esté prácticamente ausente (Awise *et al.* 1987; Vázquez-Domínguez 2007). Por lo anterior, las moléculas de ADNmt son marcadores que permiten conocer la evolución matrilineal de los organismos (Awise 2004). Al respecto, la tasa de sustitución de nucleótidos varía entre los diferentes genes o regiones que conforman el ADNmt (Brown 1983), por lo que puede seleccionarse la región apropiada (así como el grupo taxonómico) para los análisis que se vayan a realizar (Arias *et al.* 2006). De estas regiones y genes mitocondriales, los preferidos han sido la región control y el citocromo *b* (*cyt b*) (Vázquez-Domínguez 2007).

En particular, el gen citocromo *b* (*cyt b*) se ha usado de forma extensa en la investigación de las relaciones sistemáticas en vertebrados (Honeycutt *et al.* 1995; Farias *et al.* 2001), debido a que se encuentra en casi todos los organismos eucariontes y en varios procariontes, lo que indica una aparición temprana en el curso de la evolución (Howell 1989). Tiene un tamaño de 1,140 pares de bases (pb) y, para mamíferos, se ha reportado una tasa de mutación de  $2.0 \times 10^{-8}$  sustituciones por sitio por generación (Nabholz *et al.* 2008). El *cyt b* contiene tanto regiones conservadas como variables, así como posiciones de codones que evolucionan rápida y lentamente (Farias *et al.* 2001). Estas características lo han convertido en un gen valioso en la determinación de distancias filogenéticas entre especies. Un ejemplo representativo es el trabajo de Johns y Awise (1998), quienes utilizaron las secuencias del *cyt b* de varias especies de vertebrados para conocer las distancias genéticas entre los diferentes grupos y al interior de estos.

### 1.5.2 Microsatélites (SSR, STR)

Los microsatélites, conocidos también como SSR (por sus siglas en inglés de Simple Sequence Repeat) y STR (siglas en inglés de Short Tandem Repeats), son regiones de ADN no codificante, formadas por 1 a 6 nucleótidos repetidos en tándem (llamados “motivos”) y que se encuentran distribuidas ampliamente en los genomas procariontes y eucariontes (Ellegren 2000, 2004; Selkoe y Toonen 2006; Bhargava y Fuentes 2010). Dependiendo del número de nucleótidos que conforman los motivos, los microsatélites se clasifican como mono (cuando son repeticiones de un solo nucleótido), di (de dos nucleótidos), tri, tetra, penta y hexa (Ellegren 2000, 2004; Schlötterer y Harr 2001). También pueden clasificarse de acuerdo al tipo de secuencia repetida, existiendo microsatélites perfectos, cuando no existen bases que interrumpan la secuencia del motivo, por ejemplo AAAAAA; imperfectos, cuando ocurren sustituciones de bases, por ejemplo GTGTATGTGT; interrumpidos, cuando hay inserciones de bases en el motivo, por ejemplo GTGTGTCCCGTGT; o compuestos, cuando tienen más de un motivo repetido, por ejemplo GTGTGTCTCTCT (Schlötterer y Harr 2001; Oliviera *et al.* 2006; Bhargava y Fuentes 2010).

Los microsatélites son de herencia biparental y poseen las siguientes características: 1) son específicos a un locus particular; 2) son co-dominantes, es decir, se pueden identificar individuos con genotipos homócigos y heterócigos para cada locus (Selkoe y Toonen 2006); y 3) son regiones altamente variables debido a su tasa de mutación, que va de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  mutaciones por locus por generación (Ellegren 2000; Avise 2004; Selkoe y Toonen 2006). Sin embargo, durante la amplificación mediante PCR pueden ocurrir errores que resultan en la presencia de alelos nulos y de tartamudeos (*stutters*) (Van Oosterhout *et al.* 2004). Cuando ocurren mutaciones en las regiones que se unen los primers (oligonucleótidos diseñados para amplificar loci de microsatélites específicos), no se lleva a cabo la amplificación de ciertos alelos (alelos nulos), lo que provoca a su vez errores en la genotipificación, ya que se producen homócigos falsos. Por otro lado, durante la amplificación se pueden producir fragmentos más cortos (y en ocasiones más largos) que el alelo real (denominados *stutters*), lo que provoca también errores en la genotipificación, que en conjunto pueden causar desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg, principalmente un exceso de homócigos. La presencia de *stutters* es más común en loci que son dinucleótidos (Van Oosterhout *et al.* 2004).

A pesar de lo anterior, las características de los microsatélites permiten su utilización en estudios genéticos para evaluar procesos a una escala de tiempo ecológica y espacial fina. Por ejemplo, las relaciones genealógicas o de parentesco entre los individuos de una población

(Blouin 2003; Kalinowski *et al.* 2006), los patrones de dispersión, como el de los perros salvajes (*Lycaon pictus*) en África (Girman *et al.* 1997), los patrones de conectividad entre poblaciones, como en salamandras en el Parque Nacional de Yellowstone (Spear *et al.* 2005), la reducción en el tamaño poblacional de una especie (cuello de botella), como el caso del tigre siberiano (*Panthera tigris altaica*; Alasaad *et al.* 2011), entre otros.

Así, con las secuencias de ADNmt se pueden estimar eventos históricos (más antiguos), mientras que con los microsatélites se pueden estimar eventos más recientes. El uso conjunto de marcadores que abarcan diferentes escalas temporales (esto es, el linaje materno histórico del ADNmt y la herencia biparental más reciente de los microsatélites), ayudan a obtener un mejor entendimiento de la historia evolutiva de las especies bajo estudio.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Las islas y sus poblaciones**

Las islas se definen como fragmentos de tierra que se encuentran rodeadas completamente por agua, y pueden clasificarse de acuerdo a su origen en: oceánicas (aquellas que nunca han estado conectadas al continente, como las de origen volcánico), fragmentos continentales (formadas a partir de fragmentos que se separaron del continente), islas de la plataforma continental (aquellas que están o estuvieron conectadas al continente y posteriormente el nivel del mar las aisló), e islas dentro de cuerpos de agua, por ejemplo las que se encuentran en los lagos (Whittaker y Fernández-Palacios 2007). En este tipo de ecosistemas se han establecido, adaptado y evolucionado especies aisladas que constituyen una biota única en el mundo (Lara-Lara *et al.* 2008), con altos niveles de endemismos (Cuarón *et al.* 2004; Eldridge *et al.* 2004).

Las islas presentan condiciones particulares como un bajo número de especies (baja riqueza), tamaños poblacionales pequeños, aislamiento geográfico, área limitada y procesos únicos de dispersión y colonización (Frankham 1998; Grant 1998). Dichas condiciones propician que sus poblaciones y especies tengan mayor susceptibilidad a la extinción que sus contrapartes continentales, aunado a la sobreexplotación de recursos, la destrucción de los hábitats naturales, tanto por actividades humanas como por fenómenos naturales, y a la introducción de especies exóticas (Frankham 1997).

Dicha susceptibilidad también se atribuye a factores genéticos, los cuales incluyen la depresión por endogamia, la pérdida de variación genética, la acumulación de mutaciones deletéreas y la adaptación a ambientes insulares (Frankham 1997). En la mayoría de los casos,

la población inicialmente se establece a partir de pocos individuos, evento conocido como efecto fundador (Grant 1998). Esto se traduce en poca variación genética que, debido al tamaño pequeño de la población, puede continuar disminuyendo (Jaenike 1973), con lo que se incrementan los efectos de la deriva génica y pone en riesgo el potencial adaptativo de las poblaciones, al eliminar mutaciones favorables (Hinten *et al.* 2003). A su vez, se ha propuesto que la variación genética de cada población se relaciona con las propiedades geográficas de la isla en que la se encuentra, mismas que afectan los patrones de migración y las tasas de extinción (Iguchi y Nishida 2000). Así, las poblaciones insulares generalmente poseen niveles bajos de variación genética en comparación con las continentales (Frankham 1997, 1998), por lo cual los ecosistemas insulares han sido reconocidos como áreas importantes para la conservación (Eldridge *et al.* 2004; Vega *et al.* 2007). Un ejemplo de lo anterior es el trabajo de Wayne *et al.* (1991), quienes estudiaron al zorro isleño (*Urocyon littoralis*), un cánido con distribución restringida a seis de las ocho islas del Canal de California, en Estados Unidos. Ellos encontraron niveles de diversidad genética más bajos que los que posee la contraparte continental de la especie (*U. cinereoargenteus*), evidenciando que *U. littoralis*, y en general las poblaciones insulares, deben ser prioritarias en aspectos de conservación.

Por su parte, México es una de las cinco regiones más biodiversas del mundo, siendo las islas mexicanas una parte clave de esta riqueza natural (Vales *et al.* 2000). De ellas, las islas del Pacífico han sido reconocidos como sitios que albergan endemismos importantes de varios niveles taxonómicos (Lara-Lara *et al.* 2008). Sin embargo, muchas especies y subespecies insulares endémicas, particularmente mamíferos, han desaparecido o están en alguna categoría de riesgo (Vázquez-Domínguez *et al.* 2004). Las islas del Caribe mexicano son las menos estudiadas, sobre todo en términos genéticos, por lo que es necesario realizar estudios en esta región, para así tener un panorama más completo de los niveles de diversidad en las islas mexicanas.

## **2.2 Carnívoros endémicos de Isla Cozumel, Quintana Roo**

De las islas del Caribe mexicano, Isla Cozumel es la más grande con un área de 486 km<sup>2</sup>, y se localiza a 17.5 km al noreste de la costa de la península de Yucatán (Cuarón *et al.* 2004). Es una isla oceánica de origen coralino y se encuentra separada del continente por el canal de Cozumel (400 m de profundidad) (Cuarón 2009). La isla se formó hace aproximadamente 200,000 años, pero emergió completamente del fondo marino hace aproximadamente 121,000 años (margen de error de 6,000 años) (McFadden *et al.* 2008). Es hogar de un gran número de

especies y subespecies endémicas de vertebrados (Cuarón *et al.* 2004; Cuarón 2009). De ellas, 15 especies son mamíferos (Martínez-Morales y Cuarón 1999), cuatro de las cuales corresponden al grupo de los carnívoros y dos son prociónidos: el mapache enano (*Procyon pygmaeus*) y el coatí enano (*Nasua nelsoni*) (Cuarón *et al.* 2004). La presencia de ambos prociónidos en la isla continúa siendo un enigma; la mayoría de pruebas parecen indicar que *P. pygmaeus* colonizó Cozumel antes que *N. nelsoni* y que los pobladores mayas, mientras que *N. nelsoni* pudo haber llegado en asociación con la población humana (McFadden *et al.* 2008).

### **2.2.1 *Procyon pygmaeus* Merriam, 1901**

Endémico de Isla Cozumel, es la especie más pequeña del género y se distingue fácilmente de *P. lotor* por ser aproximadamente 18% más pequeña en su longitud total y 28-37% en la longitud de su cola (García-Vasco 2005). Su presencia en la isla se ha registrado en diferentes proyectos de investigación, desde 1987 y hasta 2006 (De Villa-Meza *et al.* 2011), abarcando diferentes localidades como la Isla de la Pasión en el noreste (Navarro y Suárez 1989), la parte noroeste de Cozumel (McFadden 2004), en el sitio arqueológico de San Gervasio (centro de la isla; Copa-Alvaro 2007) y en el Parque Ecológico Laguna Colombia al sur de la isla (antes Parque Punta Sur; Cuarón *et al.* 2004). Los datos anteriores sugieren que *P. pygmaeus* se distribuye ampliamente en la isla y es más abundante que otros carnívoros de Cozumel (De Villa-Meza *et al.* 2011), pero con números poblacionales muy pequeños. Se ha estimado un tamaño poblacional de 323 a 955 individuos como máximo en toda la isla (McFadden 2004; García-Vasco 2005; Copa-Alvaro 2007; De Villa-Meza *et al.* 2011). Por ello, está catalogado como especie en Peligro de extinción en la NOM-059 (Semarnat 2010), mientras que la IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, por sus siglas en inglés) lo cataloga como una especie en Peligro Crítico de Extinción (Critically Endangered, C2a(i)b; Cuarón *et al.* 2008).

*P. pygmaeus* es nocturno y, aunque a veces forma grupos familiares, es considerada una especie solitaria (Cuarón *et al.* 2004), además de formar grupos temporales en sitios provistos de alimento asociados a actividades humanas (De Villa-Meza *et al.* 2011). Su alimentación consta de hormigas, cangrejos, ranas y ocasionalmente otros vertebrados, así como de semillas y hojas (Navarro y Suárez 1989). Tiene dos periodos de reproducción, uno principal entre noviembre y enero, y otro en julio y agosto (García-Vasco 2005); su ámbito hogareño se ha estimado en 67 hectáreas (Cuarón *et al.* 2009).



Hay muy poca información genética de esta especie, aunque se ha señalado que presenta niveles bajos de variación genética (McFadden *et al.* 2008). Es importante mencionar que en dicho estudio se utilizó solamente un marcador molecular (ADN mitocondrial), el cual consistió en un fragmento de la región control (893 pb). Encontraron únicamente un haplotipo (o variante genética) en todos los individuos que analizaron, por lo que se hace énfasis en incluir más individuos e implementar otros marcadores moleculares (por ejemplo, microsatélites), que permitan obtener una mejor resolución del estado genético de sus poblaciones. Asimismo, sus resultados corroboran la división taxonómica, en cuanto a que *P. pygmaeus* es filogenéticamente distinta de *P. lotor*; además, sugieren la presencia de un cuello de botella reciente en la población, posiblemente relacionado con un efecto fundador.

En términos de conservación, *P. pygmaeus* presenta serias amenazas asociadas a fenómenos naturales como los huracanes (Copa-Alvaro 2007) y, sobre todo, a las actividades humanas, incluyendo la fragmentación del hábitat, el desarrollo turístico y económico en la isla, además de la introducción de depredadores como la boa (*Boa constrictor*; Vázquez-Domínguez *et al.* 2012) y de parásitos responsables de enfermedades como la sarna y el moquillo (Cuarón *et al.* 2004).

### **2.2.2 *Nasua nelsoni* Merriam, 1901**

El coatí enano, *Nasua nelsoni*, es también endémico de Isla Cozumel y es considerado distinto de su contraparte continental (*N. narica*) al ser más pequeño en tamaño corporal y craneal, aunque sólo al nivel de subespecie (*N. narica nelsoni*; Samudio *et al.* 2008). El coatí enano es aún más escaso en Cozumel que el mapache enano, ya que se estimó una población actual de 150 individuos, con un margen de error de 90 individuos (Cuarón *et al.* 2004), lo que sugiere una reducción de más del 80% durante los últimos 10 años (Cuarón *et al.* 2009). Sin embargo, dada su clasificación de subespecie, está catalogado por la NOM-059 como Amenazado (Semarnat 2010) y especie de Baja Consideración (Least Concern, Samudio *et al.* 2008) por la IUCN. Con base en las diferencias morfológicas anteriormente mencionadas, se ha propuesto la necesidad de su re-evaluación taxonómica a nivel de especie (Cuarón *et al.* 2009).

Esta especie tiene hábitos alimentarios similares a los de *N. narica* (Cuarón *et al.* 2004; 2009), con una dieta omnívora que consiste principalmente en invertebrados, frutas y algunos vertebrados (Gompper 1995). En este sentido, se especula que su ámbito hogareño también puede semejarse al de *N. narica*, cuyo rango es de 45 a 362 hectáreas y está determinado principalmente por un recurso: el agua (Valenzuela y Macdonald 2002). En cuanto a su estado

de conservación, presentan las mismas amenazas que *P. pygmaeus* por la introducción de depredadores, congéneres, fragmentación del hábitat y huracanes, además de que pueden ser potencialmente afectados por la sobreexplotación de mantos acuíferos (Cuarón *et al.* 2004; 2009).

Existen también pocos estudios en relación a su diversidad y estructura genética (McFadden 2004; McFadden *et al.* 2008), los cuales muestran de forma general que los niveles de variación genética son bajos, aunado a la limitante de que se realizaron sólo con dos individuos. Por ello, es evidente que tanto para el coatí enano como para el mapache enano, es urgente obtener información respecto a la genética de sus poblaciones (además de aspectos de ecología e historia de vida), para así poder plantear estrategias de conservación que permitan a estas especies endémicas persistir a mediano y largo plazo en Cozumel.

### 3. Hipótesis

Dado que *P. pygmaeus* y *N. nelsoni* son especies insulares, y a que la fragmentación del hábitat por actividades humanas afecta sus poblaciones (y en menor medida por fenómenos naturales), se espera que las poblaciones de cada especie presenten alta estructuración genética y alta diferenciación (bajo flujo génico). Además, éstas presentarán niveles bajos de variación genética tanto alélica (ADN nuclear) como haplotípica (ADN mitocondrial).

### 4. Objetivo general

Evaluar la diversidad y estructura genética del mapache enano (*Procyon pygmaeus*) y del coatí enano (*Nasua nelsoni*) en Isla Cozumel, con base en dos marcadores moleculares (microsatélites y ADN mitocondrial).

#### 4.1 Objetivos particulares

- Determinar los niveles de variación genética del mapache enano (*Procyon pygmaeus*) y del coatí enano (*Nasua nelsoni*) en Isla Cozumel, con base en secuencias del gen citocromo *b* y ADN nuclear (microsatélites).
- Evaluar si existe estructura y/o diferenciación genética entre las poblaciones de cada especie, considerando la distribución genética y geográfica de los individuos en la isla.
- Evaluar el flujo génico entre poblaciones y los niveles de endogamia.
- Con base en los resultados, hacer propuestas de conservación de ambas especies en la isla.

## 5. MÉTODOS

### 5.1 Área de estudio

Isla Cozumel en el estado de Quintana Roo, México (20°16'18.2" - 20°35'32.8"N; 86°43'23.3" - 87°01'31.1"W) tiene un clima tropical húmedo, con una temperatura anual promedio de 25.5°C y precipitación anual promedio de 1505 mm (Cuarón 2009). El tipo de vegetación más representado es el bosque tropical sub-caducifolio que cubre el 65% de la vegetación total en la isla, seguido por el manglar, la vegetación de dunas costeras y el bosque de palmas (Téllez *et al.* 1989; Cuarón *et al.* 2004).

Como ocurre con la mayoría de las islas y costas del Caribe, Isla Cozumel se encuentra expuesta de manera constante a los huracanes, mismos que constituyen uno de los factores ecológicos más importantes que afectan la estructura y composición de su vegetación (Cuarón *et al.* 2004). Además de lo anterior, la introducción de especies exóticas que depredan las especies nativas (Vázquez-Domínguez *et al.* 2012), la fragmentación del hábitat (Fuentes-Montemayor *et al.* 2009), la cacería y colección de especies como mascotas, la sobrexplotación de recursos como el agua, y la expansión de la población humana para el desarrollo turístico y urbano, también son factores que amenazan severamente la biodiversidad de la isla (Cuarón *et al.* 2009).

### 5.2 Trabajo de campo y obtención de muestras

Las muestras utilizadas en el presente trabajo provienen de tres periodos diferentes de colecta: 1) de febrero a marzo de 2003 se obtuvieron 38 muestras de mapache (*Procyon pygmaeus*); 2) en 2006 durante mayo, julio y agosto se obtuvieron 18 muestras de coatí (*Nasua nelsoni*); y 3) durante junio y julio de 2012, cuando se obtuvieron muestras de las especies insulares y de sus parientes continentales (*Nasua narica* y *Procyon lotor*), estas últimas pertenecientes a Quintana Roo (Anexo 2). Las muestras de continente se complementaron con 27 muestras más (18 de *N. narica* y 9 de *P. lotor*) proporcionadas por el Dr. David Valenzuela Galván (Universidad Autónoma del Estado de Morelos), así como otras seis de *P. lotor* facilitadas por el Dr. Alfredo Cuarón (Servicios Ambientales, Conservación Biológica y Educación) durante 2009-2010 (Anexo 2). Es importante aclarar que se utilizaron las muestras continentales para tener un marco comparativo para los niveles de variación genética de la isla.

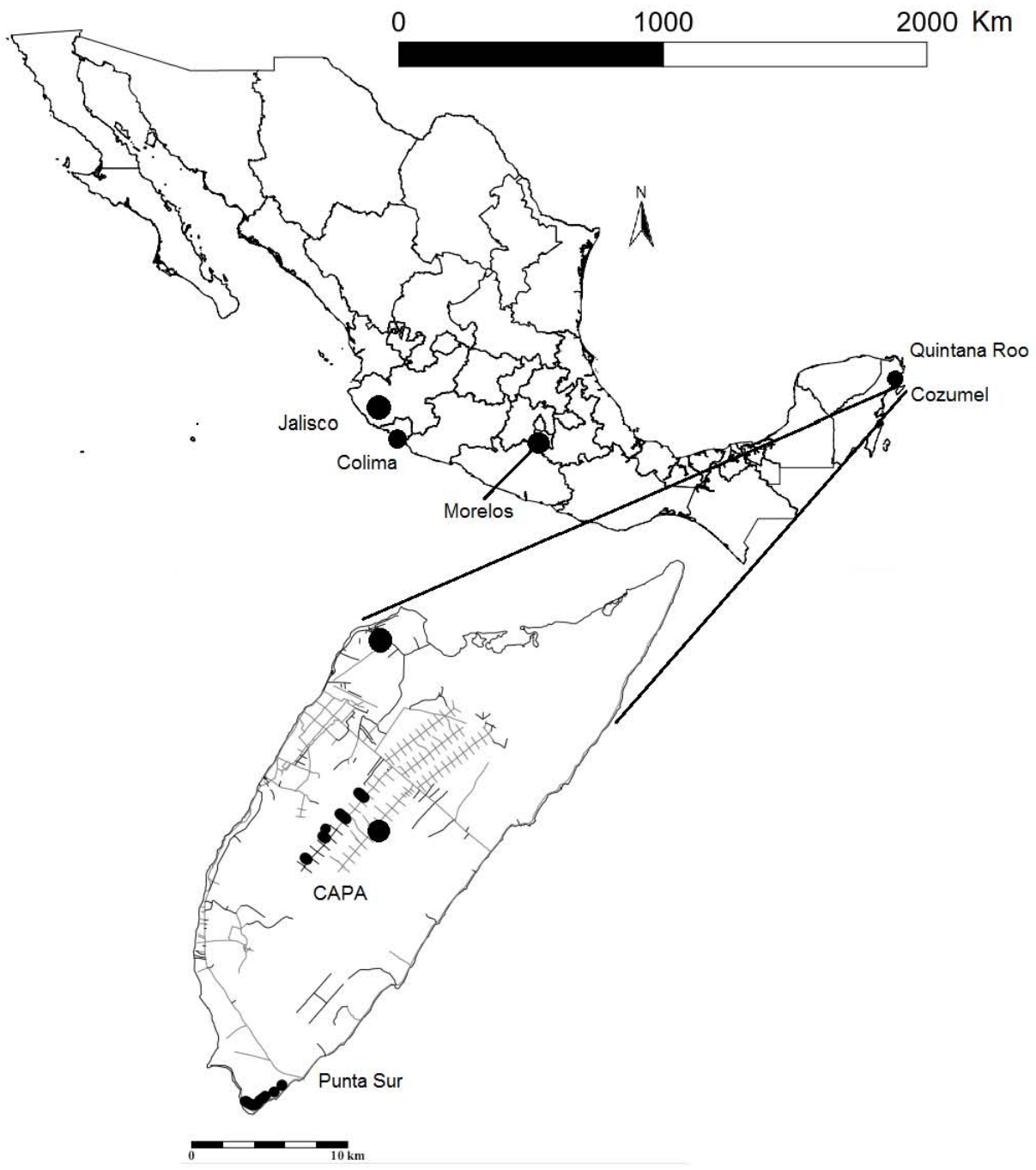
Para el trabajo de campo de 2012, el método de captura consistió en la colocación de trampas tipo Tomahawk, tomando como referencia los sitios donde previamente se habían

reportado capturas de individuos de ambas especies. Para *N. nelsoni*, se colocaron 30 trampas en la zona de captación y extracción de agua que es administrada por la Comisión de Agua Potable y Alcantarillado (CAPA) de Isla Cozumel, mientras que para *P. pygmaeus* se usaron 20 trampas en la zona de conservación ecológica Laguna Colombia ubicada al sur de la isla (Punta Sur) (Figura 1). CAPA se localiza en la parte central de la isla, cuya vegetación es selva mediana subperennifolia; la zona de CAPA está conformada por un sistema de caminos que se asemeja a un esqueleto de pescado, con caminos secundarios (ramales) que cruzan a los caminos principales o ejes (Figura 1). De éstos, se seleccionó el eje 6 para colocar las trampas debido a que anteriormente las capturas se realizaron en el eje adyacente (McFadden 2004; McFadden *et al.* 2008). Las trampas fueron cebadas con fruta (plátano y piña) y sardina, estuvieron activas durante la noche y se revisaron por la mañana. Los individuos capturados fueron sedados con Zoletil 100® (Virbac), con una dosis de 10 mg por kilogramo de peso (aproximado); se tomaron medidas estándar (peso, longitud total y de cola, longitud de pata trasera y de oreja), se determinó sexo y rango de edad (cría, juvenil o adulto) y se obtuvieron muestras de tejido para análisis genéticos (cortes pequeños de la oreja o de la punta de la cola), siguiendo las normas de manejo y cuidado de la fauna silvestre establecidas por la Sociedad Americana de Mastozoología (ASM) (Sikes *et al.* 2011). Las muestras fueron preservadas en tubos Eppendorf con etanol al 97% y llevadas al laboratorio.

## **5.3 Trabajo de laboratorio**

### **5.3.1 Extracción de ADN**

El ADN se extrajo con los kits QuickGene DNA Tissue Kit S-Mini 80 (FUJIFILM Life Sciences ®) y Zymo Research Genomic DNA™-Tissue MiniPrep D3050 (The Epigenetics Company) siguiendo las instrucciones del proveedor (Anexo 3). Para corroborar la calidad del ADN, se corrieron 2.5 µL de cada producto en geles de agarosa (1.5%) teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV; se utilizó una referencia de pesos moleculares específicos (lambdas de ADN de 5, 10 y 25 ng/µL).



**Figura 1.** Mapa de México y Cozumel indicando las localidades de donde se obtuvieron las muestras.

### 5.3.2 ADN mitocondrial (ADNmt) – gen citocromo *b* (*cyt b*): amplificación y secuenciación

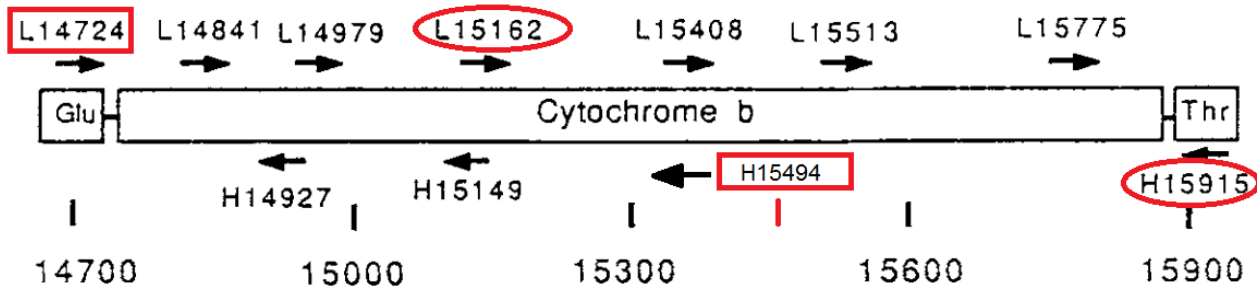
De los productos obtenidos se amplificó el *cyt b* de las especies insulares y continentales. Los oligonucleótidos (primers) utilizados fueron los descritos por Irwin *et al.* (1991) [L14724, L15162 y H15915] y Koepfli y Wayne (1998) [H15494], cuyas secuencias se muestran en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Primers utilizados para la amplificación del gen citocromo *b* (*cyt b*) de las muestras de *Procyon* y *Nasua*.

Primer <sup>a</sup>	Secuencia	Fuente
L14724-F	5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3'	Irwin <i>et al.</i> 1991
L15162-F	5'-GCAAGCTTCTACCATGAGGACAAATATC-3'	Irwin <i>et al.</i> 1991
H15494-R	5'-TAGTTGTCAGGGTCTCCTAG-3'	Koepfli y Wayne 1998
H15915-R	5'-GGAATTCATCTCTCCGTTTACAAGAC-3'	Irwin <i>et al.</i> 1991

<sup>a</sup> Los números de los primers se refieren a la posición de la terminación 3' de las hebras ligera (L) y pesada (H) del primer en la secuencia del ADN mitocondrial en humanos (Anderson *et al.* 1981). F: dirección Forward; R: dirección Reverse.

La amplificación se realizó con base en la metodología de Tsuchiya-Jerep (2009), que consistió en subdividir el gen de interés (*cyt b*) en dos segmentos de aproximadamente 750 pb cada uno, con una superposición de ca. 300 pb entre ambos, para amplificar el gen completo. El par de primers utilizados para amplificar la primera parte del gen fueron L14724-H15494, y la segunda con el par L15162-H15915 (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema del gen *cyt b* con los genes de ARNt que lo flanquean. El par de primers que amplifica la primera parte del gen se indican por los rectángulos; los óvalos indican el otro par de primers. Las flechas indican la dirección de cada primer (ver Cuadro 1; modificado de Irwin *et al.* 1991).

Las condiciones generales de amplificación (PCR) fueron las siguientes: 10X de Buffer (Vivantis), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTPs, 0.2 μM de cada primer, 0.2 μL de Taq Polimerasa (Vivantis), y ca. 30 ng de ADN, con un volumen final de reacción de 20 μL (Cuadro 2). Sin embargo, para las amplificaciones de *Nasua* con los primers L14724-H15494 la concentración de MgCl<sub>2</sub> fue de 2.8 mM. El protocolo para PCR (Termociclador PTC-100; MJ Research) fue: desnaturalización inicial por 3 min a 94°C, 10 ciclos *touchdown* (es decir, una temperatura de alineación decreciente en un grado por cada ciclo: 45 seg a 94°C, 45 seg a 60-51°C y 90 seg de extensión a 72°C), seguido por 30 ciclos adicionales (45 seg a 94°C, 45 seg a 50°C y 90 seg a 72°C), con una extensión final por 3 min a 72°C. Las amplificaciones fueron corroboradas mediante geles de agarosa (1%) teñidos con bromuro de etidio, utilizando una referencia de pesos moleculares específicos (VC 100bp Plus DNA Ladder, Vivantis). Los productos de PCR fueron analizados en un secuenciador ABI Prism 3730xl Analyzer (Applied Biosystems®), con el servicio de secuenciación Sanger del High Throughput Genomics Center en Seattle.

**Cuadro 2.** Condiciones de PCR empleadas para amplificar el *cyt b* para *Nasua* y *Procyon*.

Par de primers	L14724-H15494 L15162-H15915	L14724-H15494 *Sólo para <i>Nasua</i>
Concentración de MgCl <sub>2</sub>	2.0 mM	2.8 mM
H <sub>2</sub> O	13.2 μL	12.88 μL
MgCl <sub>2</sub>	0.8 μL	1.12 μL
Buffer (10X)	2 μL	2 μL
dNTP's (2mM)	2 μL	2 μL
Primer F (10μM)	0.4 μL	0.4 μL
Primer R (10 μM)	0.4 μL	0.4 μL
Taq	0.2 μL	0.2 μL
ADN	1 μL	1 μL
Volumen final	20 μL	20 μL



### 5.3.3 Microsatélites: amplificación y secuenciación

#### 5.3.3.1 *Procyon pygmaeus*

Se probaron los primers fluorescentes (FAM y HEX) para 12 microsatélites específicos de *P. lotor* (Cuadro 3) reportados en tres diferentes fuentes (Cullingham *et al.* 2006, Fike *et al.* 2007 y Siripunkaw *et al.* 2008); las condiciones de PCR de los primers se muestran en el Anexo 4. En todas las reacciones de PCR se utilizó 10X de Buffer (Vivantis), 0.2  $\mu$ L de Taq Polimerasa (Vivantis) y ca. 30 ng de ADN, con un volumen final de reacción de 7  $\mu$ L. Se realizaron controles negativos en todos los casos, para asegurar que no hubiera contaminación. Las reacciones de PCR fueron: para los loci PLO-M15, PLO2-117, PLO2-14 y PLO3-71, una desnaturalización inicial por 5 min a 95°C, 30 ciclos de 30 seg a 95°C, 1 min a la temperatura de alineamiento de cada primer (Ta, Anexo 4), 1 min a 72°C, extensión de 45 min a 65°C; la Ta fue de 60°C para PLO-M15 y PLO2-117, y de 56°C para PLO2-14 y PLO3-71. Para los loci PLOT-04 y PLOT-09, desnaturalización 2 min a 94°C, 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a Ta, 30 seg a 72°C, seguido de 10 min a 72°C y una extensión final de 45 min a 60°C; la Ta fue de 61°C para PLOT-04 y 64°C para PLOT-09. Para los loci PLM06, PLM09, PLM10, PLM13, PLM14 y PLM17, desnaturalización 10 min a 95°C, 35 ciclos de 25 seg a 95°C, 45 seg a 58°C, 2 min a 72°C, y extensión de 10 min a 72°C. La corroboración en gel fue igual que la explicada para el *cytb*.

Los productos de PCR fueron analizados en un secuenciador ABI Prism 3730xl Analyzer (Applied Biosystems®), con el servicio de secuenciación de la Universidad de Illinois, con el marcador de peso molecular ROX 500 Size Standar (Applied Biosystems®). Los productos fueron mezclados (multiplex), de acuerdo con la fluorescencia de cada par de primers para la secuenciación; es decir, se combinaron productos de primers con fluorescencia FAM con aquellos de fluorescencia HEX. Cabe mencionar que, aunque las reacciones de PCR se realizaron de manera individual para cada locus, se probaron reacciones de PCR multiplex para cuatro microsatélites (Anexo 5), obteniendo amplificaciones exitosas.

La lectura de los cromatogramas se realizó con el programa GeneMarker v2.2.0 (SoftGenetics), mediante la comparación directa del tamaño de los alelos de cada producto de PCR con la escalera del programa (GS500) y tomando como referencia los tamaños reportados por Sánchez-Garibay *et al.* (2012) para cada microsatélite. Los alelos se identificaron como el(los) pico(s) más alto(s) de los cromatogramas que se encontraron en el rango reportado para cada marcador o cercano a él (Anexo 5).

### **5.3.3.2 *Nasua nelsoni***

Se probaron los primers fluorescentes (FAM y HEX) para 12 microsatélites específicos de *N. narica* (Cuadro 4) diseñados por Sánchez-Garibay *et al.* (2012). Las condiciones generales de amplificación fueron: 10X de Buffer (Vivantis), 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTPs, 0.8 μM de cada primer, 0.2 μL de Taq Polimerasa (Vivantis), y ca. 30 ng de ADN, con un volumen final de reacción de 10 μL (Anexo 7). El protocolo de PCR consistió en: una desnaturalización inicial por 5 min a 94°C, seguida por 30 ciclos consistentes de 30 seg a 94°C, 46 seg a 61°C y 2 min a 72°C, y una extensión de 5 min a 72°C. En todas las reacciones de PCR se realizaron controles negativos para asegurarse que no hubiera contaminación. El análisis de los productos de PCR y la identificación y lectura de los alelos se realizaron de la misma forma que para *Procyon*.

**Cuadro 3.** Primers utilizados en este estudio para amplificar muestras de *P. pygmaeus*. Se indica número de acceso (GeneBank), motivo y secuencia. El tamaño de los alelos corresponde a los obtenidos en este estudio. F: dirección Forward; R: dirección Reverse. Tipos de fluorescencia: FAM/ HEX.

Locus	Motivo	Tamaño de los alelos (pb)	Número de alelos	Número de acceso de GenBank	Secuencia de los primers (5' - 3')
PLO-M15 <sup>1</sup>	AGAT <sub>(13)</sub>	152-160	13	DQ388432	F: FAM-ACTGAGACCACTGAGC R: CAGATTTTCAGTTCGATCGATG
PLO2-117 <sup>1</sup>	GATA <sub>(13)</sub> GT <sub>(16)</sub>	266-278	25	DQ388433 DQ388434	F: HEX-ATATGCCGGGTCTAGGACAACACTG R: CTAGTAATATCATGAGAAGCG
PLO2-14 <sup>1</sup>	GAAA <sub>(21)</sub>	230-246	17	DQ388438	F: FAM-AAGAGCGTAATAAAAAGCTTAC R: CAAATAACAAGTTTCAATTTGG
PLO3-71 <sup>1</sup>	ATCT <sub>(14)</sub>	158-166	12	DQ388436	F: GCTTCCTTTAATTTTAACTAATGG R: HEX-CAATCCTGTATCAGGTTTCC
PLOT-04 <sup>2</sup>	GT <sub>(20)</sub>	350-360	13	DQ786783	F: FAM-TGGAGGAGATAATGAGACATCC R: GATAGCCATATAGCCTTAACTTCG
PLOT-09 <sup>2</sup>	GT <sub>(27)</sub>	278-280	18	DQ786788	F: HEX-ATAATTAGTGACTTGGACATCTTGG R: TGAAAGGAAGATAAATGATGTGG
PLM06 <sup>3</sup>	GT <sub>(24)</sub>	94-114	8	EF569609	F: HEX-AAAGTGTGCCTTTGATTACGG R: ATACACTGGGTGGGGAATGT
PLM09 <sup>3</sup>	GT <sub>(11)</sub>	112-126	12	EF569612	F: FAM-AATTTTGCAGCCCCTCCT R: GCACGCTGTACCCATCAAGT
PLM10 <sup>3</sup>	GT <sub>(22)</sub>	107-123	8	EF569613	F: FAM-ACATACCTCCACCCCTACCC R: AAGTCCCATAGGCACACCAG
PLM13 <sup>3</sup>	CA <sub>(15)</sub> TA(CA) <sub>3</sub>	116-122	13	EF569616	F: HEX-CATTCCTTAACTGGTTTGCTGA R: TCACTTTTGTGAGGATCACAGC
PLM14 <sup>3</sup>	GT <sub>(18)</sub>	147-151	9	EF569617	F: FAM-TGACCTTCCAGTTCCAGCTT R: TGCAGGATGAACAATGAATGA
PLM17 <sup>3</sup>	GT <sub>(23)</sub>	92-106	9	EF569620	F: HEX-TGTAACACAGTGAACCTGAATGC R: TGTAGAGCCCCTGACTTCT

<sup>1</sup> Cullingham *et al.* 2006; <sup>2</sup> Fike *et al.* 2007; <sup>3</sup> Siripunkaw *et al.* 2008

**Cuadro 4.** Primers utilizados en este estudio para amplificar muestras de *N. nelsoni*. Se indica número de acceso (GeneBank), motivo y secuencia según Sánchez-Garibay *et al.* (2012). El tamaño de los alelos corresponde a los obtenidos en este estudio. F: dirección Forward; R: dirección Reverse. Tipos de fluorescencia: FAM/ HEX.

Locus	Número de acceso de GenBank	Motivo	Tamaño de los alelos (pb)	Secuencia y fluorescencia de los primers (5' - 3')
Nasua1757	JQ513568	AC <sub>(14)</sub>	-	F: <b>FAM</b> -GTCCGAACCAACTGAAAGAAC R: CATTGACCGTGCTCTAGACC
Nasua931	JQ513569	AAC <sub>(7)</sub>	185-212	F: <b>FAM</b> -ACTTCCTTGACTTCTCTGAACC R: GATCCACAAAGCATGCCCTG
Nasua1050	JQ513582	AGAT <sub>(10)</sub>	105-121	F: <b>FAM</b> -TTTGAAAGGGAAGAGGCGATG R: CCTGCCACTCAAATGCAAATG
Nasua193	JQ513583	AGAT <sub>(10)</sub>	244-248	F: <b>FAM</b> -TGAGATCCTGCTTTCTTGTCAC R: TGTCTTCATGGCACCAACAC
Nasua1251	JQ513573	AAC <sub>(9)</sub>	139	F: <b>FAM</b> -TCTCATTACCCGAACCAGAGG R: TGCAACCCTCTGAGTTCATG
Nasua71	JQ513578	AGAT <sub>(10)</sub>	266-298	F: <b>FAM</b> -GGAGCTCCCTAATATCACACAG R: AATCCTCACTTGAAGCAGGC
Nasua833	JQ513562	AG <sub>(11)</sub>	214-218	F: <b>HEX</b> -TTTGGGTGCGAGTGATGGAGG R: CTCGCACCTCTAGCTTCTGG
Nasua504	JQ513563	AC <sub>(11)</sub>	246-248	F: <b>HEX</b> -AGAAGGAGAACAGAGTGCAGG R: ACCATACTTTCTGCCCTGGG
Nasua2841	JQ513577	AAAG <sub>(12)</sub>	161-177	F: <b>HEX</b> -CCTCTCCCTCTGCTGATCC R: AGACCAAGATCAGCCATTGG
Nasua1990	JQ513575	AAG <sub>(9)</sub>	245-254	F: <b>HEX</b> -GATCCCAAGGCTCTCATCCC R: GCTTTCACATCACTGCCAAG
Nasua1785	JQ513565	AC <sub>(15)</sub>	-	F: <b>HEX</b> -TCCTCCTTTCTTCCAACCC R: AGCATGTGGAGATAATGGGC
Nasua895	JQ513566	AC <sub>(14)</sub>	-	F: <b>HEX</b> -GGTTCCTATCCACTCTTGTC R: TCTGTACGCCCATGTTCCC

## 5.4 Análisis para las secuencias

### 5.4.1 Alineamiento

Las secuencias de *cyt b* de ambas especies fueron alineadas con el programa BioEdit (Hall 1999) con el algoritmo CLUSTAL W; como referencia se usaron las secuencias del *cyt b* completo de *N. narica* (Número de acceso: DQ660302) y *P. lotor* (GU175439) del GeneBank.

### 5.4.2 Pruebas de neutralidad

Se realizaron las pruebas de neutralidad  $D$  de Tajima (Tajima 1989) y se calcularon los estadísticos  $D$  y  $F$  de Fu y Li (1993) y  $F_s$  de Fu (1997), para analizar la neutralidad de las secuencias en los individuos de las especies insulares, con el programa DNAsp (Librado y Rozas 2009).

### 5.4.3 Diversidad y estructura genética

Para conocer los niveles de diversidad genética se calcularon el número de haplotipos ( $Nh$ ), la diversidad haplotípica ( $h$ ), la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), el número promedio de diferencias nucleotídicas ( $K$ ) y el número de sitios segregantes ( $S$ ) con el programa DNAsp. Los análisis se hicieron por localidad (sitios de colecta), incluyendo las del continente para tener un comparativo con la isla. Así, para *P. lotor* se consideraron cinco poblaciones dadas las localidades de muestreo: Quintana Roo ( $n = 9$ ), Puerto Vallarta ( $n = 3$ ), Colima ( $n = 3$ ), Cuixmala ( $n = 7$ ) y Morelos ( $n = 1$ ); mientras que para *N. narica* se consideraron dos poblaciones, Jalisco y Morelos, dadas las localidades de muestreo, cada una con nueve individuos.

Para conocer las relaciones entre genes se recurre a los métodos de reconstrucción filogenética, de los cuales el más utilizado es Neighbour Joining (NJ) (Saitou y Nei 1987). Este método es útil para analizar grandes juegos de datos (secuencias) que tengan niveles de divergencia bajos (Yang y Rannala 2012). Así, con el objetivo de evaluar las relaciones en las especies insulares (*P. pygmaeus*, *N. nelsoni*) dentro de Cozumel y sus hermanas continentales, se construyeron los árboles filogenéticos con el método NJ, utilizando la distancia genética  $p$  (diferencias nucleotídicas; Hamilton 2009), en el programa MEGA (Tamura *et al.* 2011). Para evaluar la significancia se utilizaron 10,000 réplicas Bootstrap, considerando todas las sustituciones (transiciones + transversiones). Los árboles se editaron con el programa FigTree v1.4.0. Cabe destacar que estos análisis son apenas una aproximación de la filogenia debido al pequeño número de muestras de las poblaciones continentales. Sin embargo, esta aporta

información relevante para la conservación de las especies insulares porque respalda su endemismo.

#### 5.4.4 Divergencia y demografía

Los análisis de divergencia ( $D_a$ ) entre las poblaciones de *P. pygmaeus* y *P. lotor*, así como entre *N. nelsoni* y *N. narica*, se realizaron con el programa DNAsp. Para esto, se tomó como referencia el árbol de NJ obtenido previamente, considerando como poblaciones a los grupos (clados) del árbol.

Es importante mencionar que las relaciones intraespecíficas (al interior de la especie) no siempre pueden ser representadas en un árbol filogenético, ya que pueden existir haplotipos que sólo difieren en un sitio o incluso ser todos iguales. Por esta razón, se recurre a la construcción de una red de haplotipos para representar mejor la relación que existe entre éstos e ilustrando el número de mutaciones que los separan. Estas redes se construyeron para cada especie con el programa Network, utilizando el algoritmo Median Joining (MJ). El uso de éste implica la adición de “vectores medios” para unificar todos los haplotipos, lo que en sentido biológico se interpreta como haplotipos no muestreados (pero que existen) o haplotipos ancestrales (ya extintos) (Bandelt *et al.* 1999).

Los análisis demográficos consistieron en el cálculo de los estadísticos  $r$  (Harpending 1994) y  $R_2$  (Ramos-Onsins y Rozas 2002), complementándolos con las pruebas de Tajima (1989), Fu y Li (1993) y Fu (1997) previamente estimadas. Los análisis se efectuaron únicamente para las especies insulares (*Nasua nelsoni* y *Procyon pygmaeus*).

Finalmente, se realizó un estimado del tamaño efectivo ( $N_e$ ) para las poblaciones insulares. La ecuación para calcularlo es:

$$N_e = \frac{\Theta}{2 uT}$$

donde  $u$  se refiere a la tasa de mutación del gen que se está analizando (número de sustituciones por sitio por generación), y “ $T$ ” es el tiempo generacional en años del organismo (Hedrick 2011). El denominador  $2uT$  es utilizado cuando se trabaja con secuencias de ADNmt (haploides). Sin embargo, es necesario ajustar la fórmula a los datos que se tienen mediante la consideración del número de nucleótidos en las secuencias analizadas, y utilizar tasas de mutación lo más precisas posibles para la especie en cuestión; dichos componentes se agregan a la fórmula para el valor de  $u$  en la ecuación siguiente:

$$u = mT.\mu$$

donde  $mT$  es el número de nucleótidos que tienen las secuencias y  $\mu$  es la tasa de mutación del gen (número de sustituciones por sitio por generación). Para el *cyt b* de mamíferos se ha reportado una tasa de mutación de  $2.0 \times 10^{-8}$  sustituciones por sitio por generación, la cual recientemente se encontró como valor aproximado en el orden Carnivora (Fig. 2, Nabholz *et al.* 2008), por lo que se empleó para realizar el cálculo del tamaño efectivo.

## 5.5. Análisis para los microsatélites

### 5.5.1 Alelos nulos y “stuttering”

Para descartar los problemas de alelos nulos y *stuttering*, se utilizó el programa MICRO-CHECKER v2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004), el cual detecta y corrige los errores en la genotipificación debido a la presencia de estos problemas; los análisis se hicieron para cada locus por población y la población en conjunto, considerando como población a cada localidad de muestreo, con un intervalo de confianza de 95% y 1,000 aleatorizaciones.

### 5.5.2 Definición de grupos en la población y asignación de individuos

Para determinar el número de poblaciones ( $K$ ) en cada especie y los individuos pertenecientes a cada una, se utilizó el programa STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000), con los siguientes parámetros: 150,000 de periodo burn-in, 1,000,000 de corridas de Cadenas de Markov, un modelo ancestral “*admixture model*” y un modelo de frecuencias alélicas “*correlated allele frequencies model*”. Para *P. pygmaeus* se probó un rango de  $K$  entre 1 y 5, dado que solamente se tenía información correspondiente a dos zonas de colecta (norte y sur de la isla), con la posibilidad de que existieran más de dos poblaciones. Para *N. nelsoni* se probaron valores de  $K$  entre 1 y 4, debido al mismo número de zonas de colecta (en este caso, centro y sur de la isla). En ambas especies y para cada valor de  $K$  se realizaron 20 repeticiones independientes. Posteriormente, se utilizó el programa STRUCTURE HARVESTER (Earl y vonHoldt 2012; <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>), el cual realiza la prueba de Evanno *et al.* (2005). De manera complementaria, se utilizó el programa GENETIX v4.05.2 (Belkhir *et al.* 2004) para realizar un análisis factorial de correspondencia (AFC), con la finalidad de obtener una representación gráfica de la pertenencia de cada individuo a una población dada. A partir de los grupos obtenidos con STRUCTURE (de aquí en adelante, poblaciones), se realizaron todos los análisis subsecuentes.

### 5.5.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento

Se analizaron la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) y el desequilibrio de ligamiento (DL) entre loci con el programa GENEPOP v4.1 (Rousset 2008). Se obtuvo también el coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) con el método de Weir y Cockerham (1984) para cada locus por población y para la isla completa, que es una medida de la desviación del EHW definido como la probabilidad de que dos alelos presentes en un individuo sean idénticos por descendencia; si el valor es positivo indica un déficit de heterocigos, mientras que si es negativo indica un exceso (Hedrick 2011). La significancia se determinó a partir del método de Cadenas de Markov (Guo y Thompson 1992), implementando 10,000 demorizaciones, 1,000 “batches” y 10,000 iteraciones por “batch”. Debido a que en el análisis de EHW y DL se realizan pruebas simultáneas, debe hacerse un ajuste a los valores de probabilidad ( $P \leq 0.05$ ) con la finalidad de no rechazar de manera incorrecta la hipótesis nula; para ajustar esta probabilidad se empleó la corrección secuencial de Bonferroni (Anexo 8; Rice 1989).

### 5.5.4 Diversidad genética

Se utilizaron los programas GenAlex v6.5 (Peakall y Smouse 2012) y Arlequin v3.0 (Excoffier y Schneider 2005) para estimar los siguientes parámetros de diversidad genética para cada población y para la población en conjunto de ambas especies: número observado de alelos ( $n_o$ ), número efectivo de alelos ( $n_e$ ), heterocigosis observada ( $H_o$ ), heterocigosis esperada ( $H_e$ ) y la heterocigosidad de Nei ( $H_{NEI}$ ). Al respecto, la heterocigosidad de Nei ( $H_{NEI}$ ; Nei y Roychoudhury 1974) es una corrección que se realiza cuando el tamaño de muestra es pequeño, para obtener valores más adecuados de diversidad.

### 5.5.5 Diferenciación alélica y genotípica

Se evaluó la diferenciación alélica y genotípica entre las poblaciones para cada especie, por locus y para todos los loci en conjunto, con el programa GENEPOP v4.1. Lo mismo que las pruebas de EHW y DL, se parte de la hipótesis nula de que “la distribución alélica y genotípica es la misma en las diferentes poblaciones”. Los valores de probabilidad se obtuvieron mediante la prueba de Fisher para la diferenciación alélica (Raymond y Rousset 1995) y mediante la prueba de G para la diferenciación genotípica (Goudet *et al.* 1996), aplicando la corrección secuencial de Bonferroni.



### 5.5.6 Estructura genética

Se utilizaron los estadísticos  $F$  de Wright en sus tres componentes ( $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$ ,  $F_{ST}$ ; Weir y Cockerham 1984) para evaluar el grado de estructura en ambas especies, con el programa FSTAT v2.9.3.2 (Goudet 1995). También se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA; Excoffier *et al.* 1992) con los estimadores  $F_{ST}$  (basado en los alelos diferentes entre las poblaciones) y  $R_{ST}$  (basado en las varianzas de los tamaños de los alelos) en el programa Arlequin v3.0, con 30,000 permutaciones. Dicho análisis emplea métodos permutacionales no paramétricos para conocer la distribución de la variación genética entre los diferentes niveles de agrupación (al interior de los individuos, entre individuos, entre poblaciones y entre grupos de poblaciones), mediante la partición de la varianza en componentes de covarianza, a partir de las diferencias que existen entre los individuos y poblaciones (Excoffier y Schneider 2005). Cabe señalar que los dos estimadores son adecuados para analizar información de microsatélites, y aunque  $R_{ST}$  se ha propuesto como el más adecuado por considerar un modelo de mutación “paso a paso” (stepwise mutation model: SMM) que involucra directamente el tamaño de los alelos (Slatkin 1995), también se ha aceptado que cuando los tamaños de muestra y el número de loci son pequeños ( $N < 50$  y  $< 20$ , respectivamente), es conveniente utilizar  $F_{ST}$  para evitar resultados erróneos (Gaggiotti *et al.* 1999).

Asimismo, se estimó el  $Nm$  a partir de las diferencias alélicas entre las poblaciones con base en los estimadores  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$  con el programa Arlequin v3.0. En adición, se estimó la distancia genética de Nei ( $D_N$ ; Nei 1972) en el programa GenAlex v6.5.

### 5.5.7 Pruebas de parentesco, cuello de botella y tamaño efectivo

Las relaciones de parentesco entre dos individuos se representan como la probabilidad de que dos individuos (es decir, dos genotipos) compartan cero, uno o dos alelos idénticos por descendencia (Blouin 2003). Se estimó esta relación mediante pruebas de máxima verosimilitud con el programa ML-RELATE (Kalinowski *et al.* 2006).

Es importante recordar que, como sucede con las secuencias de ADNmt, también se pueden evaluar aspectos demográficos con microsatélites. Así, para determinar si las poblaciones de ambas especies presentaban una señal de cuello de botella se utilizó el programa BOTTLENECK v5.1.26 (Cornuet y Luikart 1996). Para los microsatélites, en este programa se propone un modelo de dos fases (TPM), con valores de 90% SMM, 10% IAM y 10% de varianza, así como los valores “default” del programa (70% SMM, 30% IAM y 10% de varianza); se utilizaron 10,000 réplicas. En el mismo análisis se realizó una prueba de Wilcoxon

para determinar la significancia del exceso de heterocigos, ya que esta prueba puede usarse para un número de loci pequeño (Luikart y Cornuet 1998). También se llevó a cabo una prueba “*mode-shift*”, con la cual se obtienen valores de la proporción de los alelos que existe en alguna clase de frecuencias alélicas, cuyo rango va de 0.0 a 1.0 (Luikart *et al.* 1998). Estos valores se graficaron para obtener una representación de la distribución de alelos en las diferentes clases de frecuencias (frecuencia baja = 0-0.100; frecuencia intermedia = 0.101-0.900; frecuencia alta = 0.901-1.00). La idea de esta gráfica es que, si hubo un cuello de botella reciente en la población, debería haber una menor proporción de alelos en la clase de frecuencia baja, ya que estos alelos son los primeros que se pierden en un evento de cuello de botella (Luikart *et al.* 2008). En la gráfica, un evento de cuello de botella se caracteriza por una distribución sesgada, mientras que una distribución con forma “L” (“normal L-shifted mode”) indica que no ha habido un cuello de botella reciente.

Aunado a lo anterior, se estimó el valor de  $M$  para las poblaciones de ambas especies con el programa Arlequin v3.0, y para probar la significancia de los estimados se empleó el programa M\_P\_Val (Garza y Williamson 2001). Con este se obtuvo un valor crítico ( $M_c$ ), y para cualquier valor  $M$  que resultó menor ( $M < M_c$ ), se consideró que la población había sufrido una reducción en su tamaño (Garza y Williamson 2001). Asimismo, los autores sugieren utilizar los valores  $P_s = 0.8$  y  $\Delta_g = 2.8$ , por lo que se emplearon dichos parámetros y un valor de theta ( $\Theta$ ) para una población pequeña en equilibrio ( $\Theta = 1$ ) (Garza y Williamson 2001).

Finalmente, se realizó una estimación del tamaño efectivo ( $N_e$ ) de ambas especies insulares, con el programa NESTIMATOR v2 (Do *et al.* 2013) y considerando a la población en conjunto. Se utilizó el método de desequilibrio de ligamiento (DL), que se basa en el hecho de que el cambio de las frecuencias alélicas de una generación a otra es una función directa del tamaño de la población (Hill 1981). Los cálculos incluyeron un intervalo de confianza de 95% (CI 95%) determinado con el método no paramétrico de Jackknife, el cual se recomienda para estimar  $N_e$  con el método de DL y considerando un valor crítico ( $P_{crit}$ ) de 0.05 (Waples y Do 2010).

## 6. RESULTADOS

Durante 2012 se capturaron nueve individuos de *Procyon pygmaeus*, 13 de *Nasua nelsoni* y siete de *P. lotor*, y se obtuvo ADN para un total de 47 individuos de *P. pygmaeus*, 31 individuos de *N. nelsoni*, 22 de *P. lotor* y 18 de *N. narica* (Anexo 2).

### 6.1 *Procyon pygmaeus* y *P. lotor* – citocromo *b*

#### 6.1.1 Neutralidad y diversidad genética

Se amplificaron 1022 pb del cyt *b* para todos los individuos. Los resultados para Cozumel no mostraron desviación significativa para ninguna de las pruebas ( $P > 0.10$ ): con Tajima ( $D = -1.52$ ), Fu y Li ( $D = 1.110$ ;  $F = 0.353$ ) y Fu ( $F_s = 1.651$ ).

Se encontraron dos haplotipos en 43 individuos de Cozumel y los siguientes valores de diversidad genética: diversidad haplotípica de 0.091 (desviación estándar de 0.058), diversidad nucleotídica de 0.0004 (desviación estándar de 0.0003), promedio de diferencias nucleotídicas de 0.454 y 5 sitios polimórficos. Por su parte, *P. lotor* mostró un haplotipo por población.

Al considerar las cinco localidades de *P. lotor* como población continental, teniendo en cuenta que se trata meramente de una aproximación comparativa, se encontraron cinco haplotipos, diversidad haplotípica de 0.751 (desviación estándar de 0.055), diversidad nucleotídica de 0.009 (desviación estándar de 0.0012), promedio de diferencias nucleotídicas de 8.96 y 30 sitios polimórficos.

#### 6.1.2 Divergencia y demografía

En el árbol NJ basado en distancia (Figura 3) se aprecia un grupo con un soporte del 96% que incluye exclusivamente a los individuos de Cozumel. Los individuos del continente forman cinco grupos acordes a la localidad de muestreo: Quintana Roo, Puerto Vallarta, Colima, Cuixmala y Morelos. El grupo Quintana Roo es el más cercano al grupo Cozumel y ambos se encuentran separados de los demás con un valor bajo de soporte (BS=37).

Sin embargo, es interesante que los individuos Pyg3 y Pyg7 se ubican dentro de este grupo, el cual posee un alto valor de soporte (BS=88; Figura 3). Por otro lado, se aprecian los grupos bien definidos de Cuixmala, Puerto Vallarta y Colima (BS=99 en todos los casos), mientras que el grupo Morelos (representado sólo por un individuo) se agrupó con Cuixmala (BS=75). Cada grupo mostró además haplotipos únicos.

Los valores de divergencia entre las diferentes poblaciones ( $D_{xy}$  y  $D_a$ ) son iguales en todas las comparaciones, por lo que sólo se muestran los de  $D_a$  (Cuadro 5): las poblaciones de Cozumel y Quintana Roo tienen el menor valor (0.5%) y Colima es la población más divergente respecto a Cozumel (1.6%). Sin embargo, resulta interesante que las localidades más distantes geográficamente no corresponden a las más divergentes (Cozumel-Puerto Vallarta). Así, Colima es la población más divergente de todas las analizadas con valores del 1.5% respecto a Quintana Roo y del 1.9% respecto a Puerto Vallarta y Morelos.

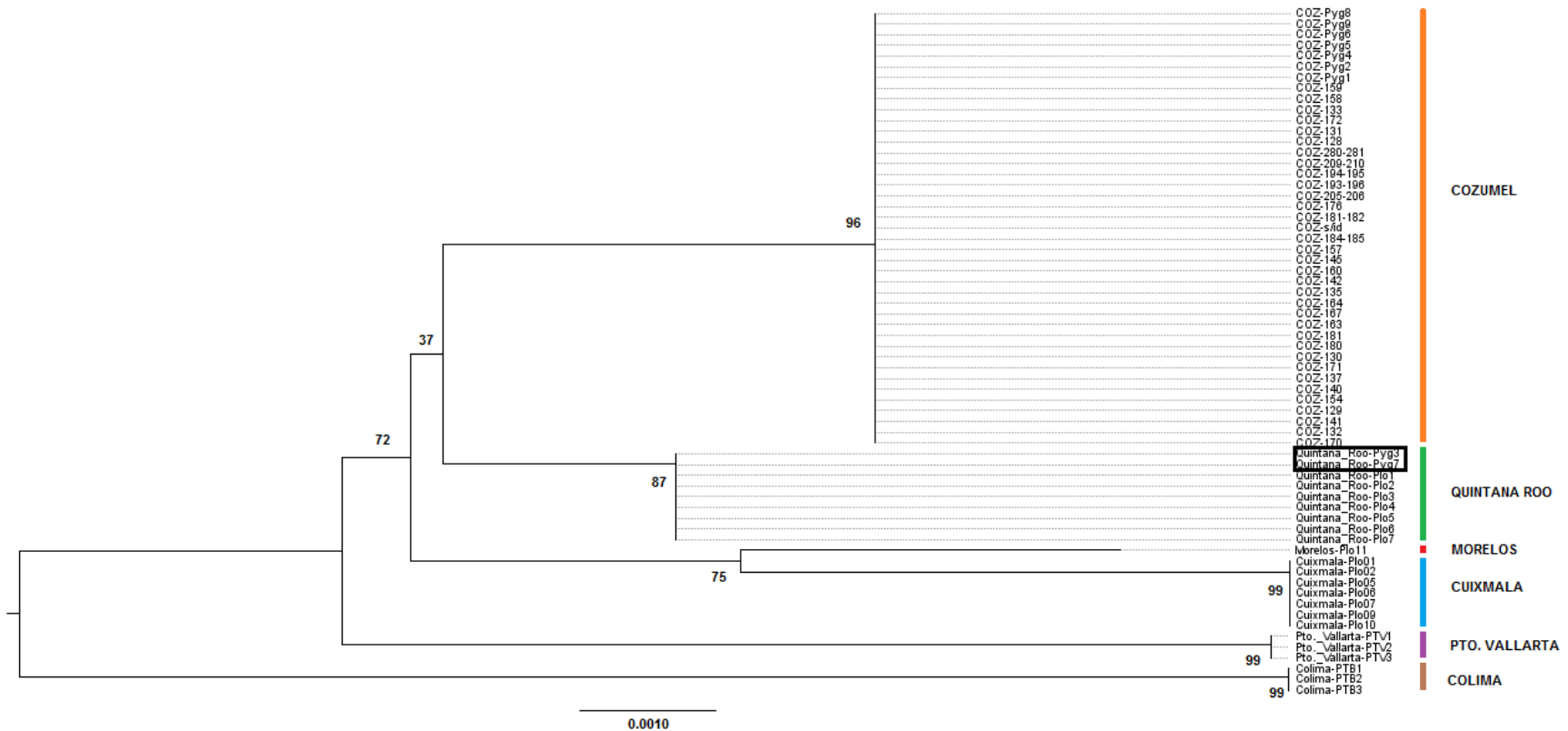
**Cuadro 5.** Valores de divergencia ( $D_a$ ) entre las poblaciones de *Procyon pygmaeus* (Cozumel) y *P. lotor* (Quintana Roo, Pto. Vallarta, Colima, Cuixmala y Morelos) obtenidas a partir de la variación del *cyt b*. Debajo de la diagonal se muestran los valores de divergencia ( $D_a$ ); arriba de la diagonal se muestra el error estándar de cada comparación.

Poblaciones	Cozumel	Quintana Roo	Pto. Vallarta	Colima	Cuixmala	Morelos
<b>Cozumel</b>		0.002	0.003	0.004	0.003	0.003
<b>Quintana Roo</b>	0.005		0.003	0.004	0.003	0.002
<b>Pto. Vallarta</b>	0.011	0.010		0.004	0.004	0.004
<b>Colima</b>	0.016	0.015	0.019		0.004	0.004
<b>Cuixmala</b>	0.010	0.009	0.013	0.018		0.002
<b>Morelos</b>	0.009	0.006	0.014	0.019	0.007	

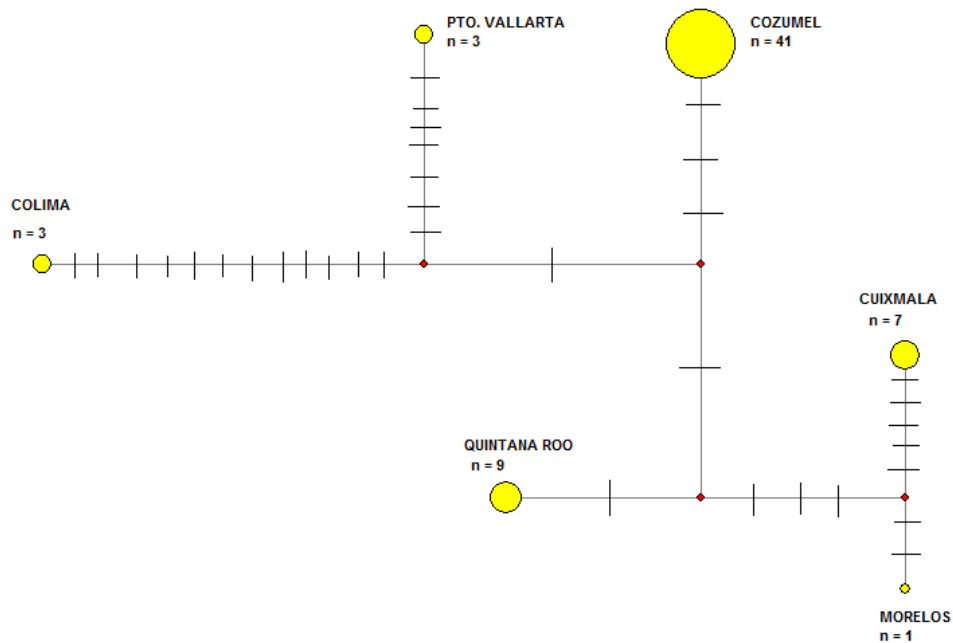
La red de haplotipos muestra una clara separación entre la población insular (*P. pygmaeus*) y las de continente (*P. lotor*), además de la presencia de un haplotipo no muestreado que está relacionado con todas las poblaciones (Figura 4). Lo anterior sugiere que este haplotipo dio origen a otros dos; uno de ellos se relaciona más a los haplotipos de Colima y Puerto Vallarta, mientras que el otro con los haplotipos de Quintana Roo, Morelos y Cuixmala. La red permite apreciar que posiblemente faltan cuatro haplotipos para poder resolver las relaciones entre las poblaciones de *Procyon*.

Es importante destacar que entre las poblaciones de *P. lotor* no se comparten haplotipos, que Cozumel conforma un grupo diferente, y que los individuos Pyg3 y Pyg7 representan a un haplotipo de Quintana Roo que fue registrado en Cozumel.

Para la distribución mismatch se obtuvieron los índices  $r$  y  $R_2$  ( $r = 0.843$ ,  $P > 0.10$ ;  $R_2 = 0.045$ ,  $P < 0.05$ ).



**Figura 3.** Árbol de NJ de *Procyon pygmaeus* y *P. lotor* obtenido con la distancia genética  $p$  y a partir de secuencias del *cyt b*. Los números en los nodos corresponden a valores de soporte Bootstrap (BS). Los nombres están conformados por la localidad seguida del individuo (ejemplo: COZ-Pyg5, Cuixmala-Plo01. Ver Anexo 2). Los individuos Pyg3 y Pyg7 se enmarcan con un rectángulo, y se agrupan con individuos de *P. lotor* en el grupo Quintana Roo.



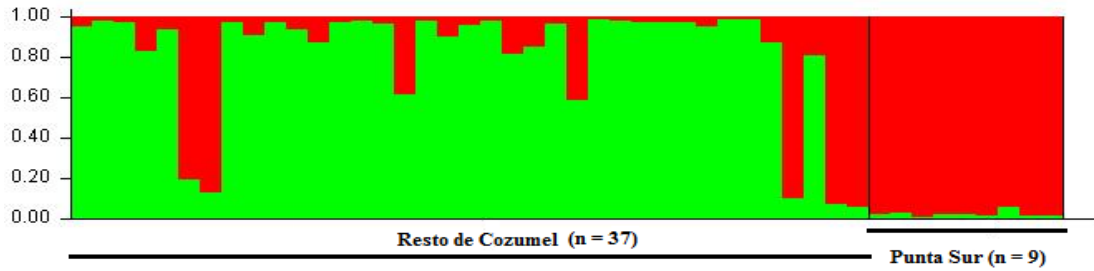
**Figura 4.** Red de haplotipos de las poblaciones de *Procyon* construida con el algoritmo MJ a partir de la variación del gen *cyt b*. Los círculos amarillos corresponden a los haplotipos y su tamaño es proporcional al tamaño de muestra (n). Los puntos rojos son los haplotipos no muestreados. Las rayas perpendiculares a las líneas indican un paso mutacional entre las poblaciones.

## 6.2 *Procyon pygmaeus* – microsatélites

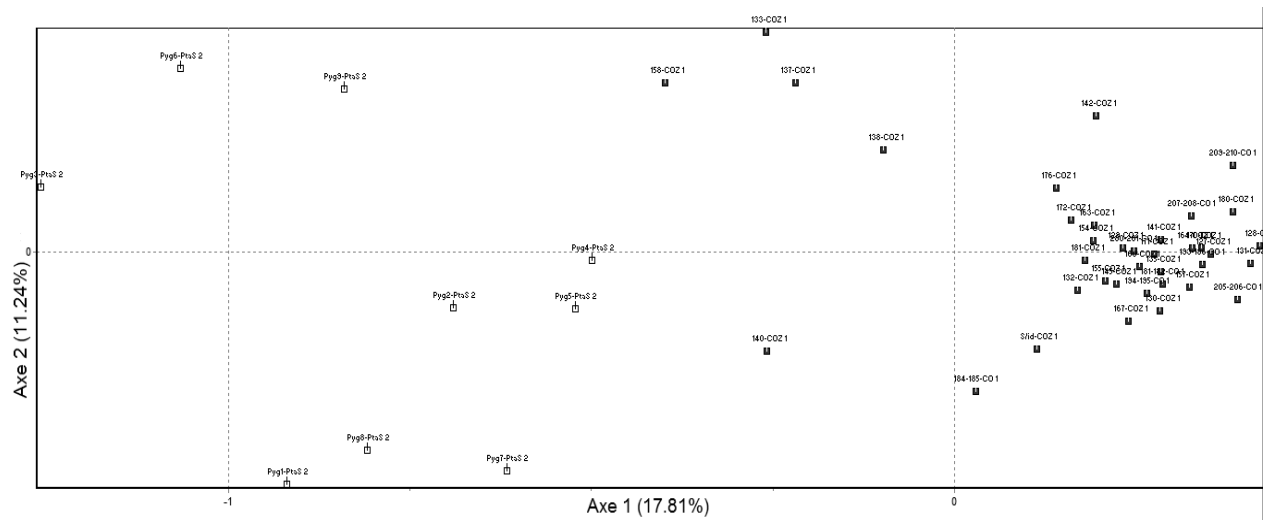
Para esta especie se lograron amplificar los 12 microsatélites. A nivel de cada sitio de muestreo se encontraron alelos nulos para Punta Sur en el locus PLOT-09, mientras que en el otro sitio se observaron en los loci PLM-15 y PLOT-09. Al analizar la población en conjunto, sólo el locus PLOT-09 presentó dichos alelos.

### 6.2.1 Definición de grupos y asignación de individuos

La definición de grupos con STRUCTURE (Figura 5) y con el AFC (Figura 6) mostró dos *clusters*. En el primer análisis, los individuos asignados al grupo 1 (color verde, figura 5) mostraron valores de pertenencia del 59 al 98%, mientras que los asignados al grupo 2 tuvieron valores del 80 al 98% (color rojo, figura 5). Con base en estos análisis, se consideraron dos grupos genéticos para todos los análisis subsecuentes.



**Figura 5.** Asignación de individuos de *P. pygmaeus* con STRUCTURE. Se detectó la presencia de dos grupos en Cozumel. El eje “y” representa el porcentaje de asignación de cada individuo a cada grupo.



**Figura 6.** Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) de *P. pygmaeus*, con base en los genotipos. El Eje 1 explica el mayor porcentaje de varianza (17.81%).

### 6.2.2 Equilibrio y diversidad genética

Es importante mencionar que el locus PLOT-09 resultó ser monomórfico en el grupo 1, mientras que en el grupo 2 presentó dos alelos. Para este grupo y para la isla en conjunto (Cozumel), el PLOT-09 tuvo señal de desviación del EHW significativa ( $F_{IS} = 1$ ,  $P = 0.0001$ ), indicando un déficit de heterocigos probablemente debido al efecto Wahlund (Wahlund 1928). Por ello, el locus PLOT-09 se descartó del resto de los análisis. Con los 11 loci restantes, el desequilibrio

de ligamiento fue significativo sólo a nivel de Cozumel en dos pares de loci (PLM14-PLM17 y PLM06-PLO2-117) (Anexo 9).

El número de alelos observados en el grupo 1 varió entre 2 y 4 con una media de 2.5 y un número promedio de alelos efectivos de 1.9. El locus que presentó mayor número de alelos fue el PLO2-14 con 4. Los valores de heterocigosis observada variaron de 0.219 a 0.688, con una media de 0.443, mientras que la heterocigosis esperada tuvo valores similares (0.242 - 0.594; media de 0.462), así como la heterocigosis de Nei ( $H_{NEI} = 0.246 - 0.604$ ; media de 0.47). No se observaron alelos exclusivos (privados;  $ae$ ) para ningún locus (Cuadro 6). En el grupo 2 el número de alelos observados y de alelos efectivos fue mayor (2-5, media de 3.2 y 2.4 respectivamente). El locus que presentó mayor número de alelos fue el PLM17 con 5, mientras que el locus PLM13 presentó el menor (2). Los valores de heterocigosis observada variaron de 0.357 a 0.929, con una media de 0.597, mientras que la heterocigosis esperada fue menor (0.311 - 0.763; media de 0.546), así como la heterocigosis de Nei ( $H_{NEI} = 0.323 - 0.791$ ; media de 0.567). En este grupo se observó un alelo exclusivo ( $ae$ ) en seis loci (PLM06, PLM09, PLM14, PLM17, PLOT-04 y PLO-M15), y dos en el locus PLM17 (Anexo 10). Para la población total se observaron valores promedios similares a los del grupo 2 ( $n_o = 3.182$ ;  $n_e = 2$ ;  $H_o = 0.49$ ;  $H_E = 0.519$ ;  $H_{NEI} = 0.525$ ) (Cuadro 6).

### 6.2.3 Estructura genética, relación de parentesco, cuello de botella y tamaño efectivo

Los análisis de diferenciación alélica y genotípica mostraron que cinco loci (PLM06, PLM09, PLM14, PLM17 y PLO2-117) no presentan una distribución homogénea en el caso de las poblaciones (Anexo 11), ni en el caso de todos los loci en conjunto ( $P < 0.001$ ). También se obtuvo un valor promedio de  $F_{IS}$  de 0.018, el cual indica un déficit de heterocigos, y una  $F_{ST}$  de 0.109; el valor de  $F_{IT}$  fue de 0.125, que evidencia nuevamente un déficit de heterocigos (Anexo 12).



**Cuadro 6.** Valores de diversidad genética por locus y por grupos para *P. pygmaeus*, incluyendo a la isla en su conjunto. Número de alelos observados ( $n_o$ ), número de alelos efectivos ( $n_e$ ), alelos exclusivos o privados ( $ae$ ), heterocigosis observada ( $H_o$ ), heterocigosis esperada ( $H_e$ ) y heterocigosidad de Nei ( $H_{NEI}$ ).

	<b>Locus</b>	<b><math>n</math></b>	<b><math>n_o</math></b>	<b><math>n_e</math></b>	<b><math>ae</math></b>	<b><math>H_o</math></b>	<b><math>H_e</math></b>	<b><math>H_{NEI}</math></b>
<b>Grupo 1</b>	PLM06	32	2	1.319	0	0.219	0.242	0.246
	PLM09	32	2	1.969	0	0.438	0.492	0.500
	PLM10	32	3	2.256	0	0.688	0.557	0.565
	PLM13	32	2	1.822	0	0.438	0.451	0.458
	PLM14	32	2	1.853	0	0.406	0.460	0.468
	PLM17	32	3	1.683	0	0.375	0.406	0.412
	PLOT-04	32	2	2.000	0	0.563	0.500	0.508
	PLO-M15	32	2	1.992	0	0.375	0.498	0.506
	PLO2-117	32	3	1.891	0	0.469	0.471	0.479
	PLO2-14	32	4	2.465	0	0.625	0.594	0.604
	PLO3-71	32	3	1.711	0	0.281	0.416	0.422
	<b>Promedio</b>	<b>32</b>	<b>2.5</b>	<b>1.905</b>	<b>0</b>	<b>0.443</b>	<b>0.462</b>	<b>0.470</b>
<b>Grupo 2</b>	PLM06	14	3	2.703	1	0.786	0.630	0.653
	PLM09	14	3	1.562	1	0.429	0.360	0.373
	PLM10	14	3	2.333	0	0.571	0.571	0.593
	PLM13	14	2	2.000	0	0.429	0.500	0.519
	PLM14	14	3	2.667	1	0.714	0.625	0.648
	PLM17	14	5	4.215	2	0.929	0.763	0.791
	PLOT-04	14	3	2.010	1	0.500	0.503	0.521
	PLO-M15	14	3	2.292	1	0.429	0.564	0.585
	PLO2-117	14	3	2.861	0	0.857	0.651	0.675
	PLO2-14	14	4	1.452	0	0.357	0.311	0.323
	PLO3-71	14	3	2.142	0	0.571	0.533	0.553
	<b>Promedio</b>	<b>14</b>	<b>3.2</b>	<b>2.385</b>	<b>1</b>	<b>0.597</b>	<b>0.546</b>	<b>0.567</b>
<b>Cozumel</b>	PLM06	46	3	1.755	-	0.391	0.430	0.435
	PLM09	46	3	1.953	-	0.435	0.488	0.493
	PLM10	46	3	2.336	-	0.652	0.572	0.578
	PLM13	46	2	1.910	-	0.435	0.476	0.482
	PLM14	46	3	2.382	-	0.500	0.580	0.586
	PLM17	46	5	2.352	-	0.543	0.575	0.581
	PLOT-04	46	3	2.032	-	0.543	0.508	0.513
	PLO-M15	46	3	2.084	-	0.391	0.520	0.526
	PLO2-117	46	3	2.208	-	0.587	0.547	0.553
	PLO2-14	46	4	2.134	-	0.543	0.531	0.537
	PLO3-71	46	3	1.944	-	0.370	0.486	0.491
	<b>Promedio</b>	<b>46</b>	<b>3.2</b>	<b>2.099</b>	<b>-</b>	<b>0.490</b>	<b>0.519</b>	<b>0.525</b>

El análisis de varianza molecular (AMOVA), con base en los estimados de  $F_{ST}$ , mostró que el 87.5% de la variación se encuentra dentro de los individuos, el 11% de la variación se encuentra entre las poblaciones (grupos) y el 1.6% entre los individuos de las poblaciones (Cuadro 7a). Los resultados fueron similares para el  $R_{ST}$ , con porcentajes de 86.6% y 14.4% para el interior de los individuos y los grupos, respectivamente (Cuadro 7b). El número estimado de migrantes fue de 4.06 y 2.98, con base en  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$ , respectivamente. La distancia genética fue de 0.159 ( $I_N = 0.853$ ).

**Cuadro 7.** Resultados del AMOVA con base a los estimados de  $F_{ST}$  (a) y  $R_{ST}$  (b).

(a)

Fuente de variación	Grados de libertad (g. l.)	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación (%)	P
Entre poblaciones (grupos)	1	15.891	0.3362	10.9	<b>0.0000*</b>
Entre individuos dentro de las poblaciones	44	122.924	0.049	1.6	0.3334
Al interior de los individuos	46	124	2.6957	87.5	<b>0.0406*</b>
Total		262.815	3.0809	100	

Índice de fijación  $F_{ST} = 0.1091$

\*  $P \leq 0.05$

(b)

Fuente de variación	Grados de libertad (g. l.)	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación (%)	P
Entre poblaciones (grupos)	1	2006.946	44.7653	14.3957	<b>0.0000*</b>
Entre individuos dentro de las poblaciones	44	11574.054	-3.1506	-1.0132	0.5759
Al interior de los individuos	46	12390	269.3479	86.6175	0.1699
Total		25971	310.9626	100	

Índice de fijación  $R_{ST} = 0.1439$

\*  $P \leq 0.05$

El análisis de parentesco mostró en el grupo 1 que el 73.38% de los individuos no están relacionados, el 10.49% tienen una relación padre-hijo, el 11.69% son medios hermanos y el 4.44% son hermanos (Cuadro 8). Dichas proporciones son muy similares para el total de la isla (1,035 combinaciones), pero en el grupo 2 (91 combinaciones) hay una mayor cantidad de individuos sin parentesco (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Porcentajes de los tipos de relaciones entre individuos para los grupos y Cozumel de *P. pygmaeus*.

Parentesco	(%) en Grupo 1	(%) en Grupo 2	(%) en Cozumel
Padres-hijos	10.49	2.2	9.18
Hermanos	4.44	3.3	4.44
Medios hermanos	11.69	11	13.14
Sin relación	73.38	83.5	73.24

En ambos grupos se encontró evidencia de una reducción poblacional con el método de Luikart: para el grupo 1 esta señal se observó bajo todos los modelos y en el grupo 2 sólo para el modelo IAM; para la población total el SMM fue el único que no resultó significativo (Cuadro 9). La representación gráfica de la distribución de las proporciones alélicas entre las clases de frecuencias (baja, media, alta) para cada grupo se muestra en el anexo 13. Destaca la distribución de tipo sesgada para el grupo 1, que indican una señal de cuello de botella para ese grupo y que es la misma para todos los modelos.

Asimismo, con el índice de Garza y Williamson (2001) se obtuvo un valor  $M$  de 0.274 para el grupo 1,  $M$  de 0.286 para el grupo 2 y  $M$  de 0.286 para el total de la isla; siendo todos estos valores menores a su valor crítico respectivo ( $M_c$  de 0.604 para el grupo 1,  $M_c$  de 0.650 para el grupo 2 y  $M_c$  de 0.650 para la isla). Finalmente, el tamaño efectivo estimado con base en el desequilibrio de ligamiento en un momento en el tiempo para la población de *P. pygmaeus* fue de 21.4 individuos (CI 95% = 11 a 47.5) para toda la isla.

**Cuadro 9.** Pruebas de cuello de botella en las poblaciones de *P. pygmaeus*, con base en un exceso de heterocigosis, bajo diferentes modelos de mutación.

<b>Grupo</b>	<b>Modelo de mutación</b>	<b>P</b>
1	IAM	<b>0.0002*</b>
	SMM	<b>0.0105*</b>
	TPM (SMM: 70%; IAM: 30%)	<b>0.0005*</b>
	TPM (SMM: 90%; IAM: 10%)	<b>0.0046*</b>
2	IAM	<b>0.0105*</b>
	SMM	0.103
	TPM (SMM: 70%; IAM: 30%)	0.0507
	TPM (SMM: 90%; IAM: 10%)	0.0737
Cozumel	IAM	<b>0.0002*</b>
	SMM	0.0737
	TPM (SMM: 70%; IAM: 30%)	<b>0.0012*</b>
	TPM (SMM: 90%; IAM: 10%)	<b>0.0105*</b>

\*  $P \leq 0.05$

### 6.3 *Nasua nelsoni* y *N. narica* - citocromo *b*

#### 6.3.1 Neutralidad y diversidad genética

Se amplificaron 1097 pb del cyt *b* para todos los individuos con excepción de un individuo de *N. nelsoni* (ID95), del cual solamente se logró amplificar un segmento del cyt *b*.

Los resultados para *N. nelsoni* mostraron una desviación significativa ( $P < 0.05$ ) con Tajima ( $D=2.46$ ), Fu y Li ( $D=1.405$ ;  $F=2.026$ ) y Fu ( $F_s=6.502$ ) (Cuadro 10). Por el contrario, las poblaciones de *N. narica* no mostraron desviación significativa con ninguna de las pruebas.

Los resultados de diversidad genética para *N. nelsoni* revelaron cuatro haplotipos (COZ1-4), diversidad haplotípica moderada de 0.674 (desviación estándar de 0.054), diversidad nucleotídica de 0.0041 (desviación estándar de 0.0002), promedio de diferencias nucleotídicas de 4.5 y 10 sitios polimórficos (Cuadro 10). Para Jalisco hubo dos haplotipos (JAL1 y 2), diversidad haplotípica de 0.556 (desviación estándar de 0.090), diversidad nucleotídica de 0.0005 (desviación estándar de 0.0001), promedio de diferencias nucleotídicas de 0.6 y 1 sitio polimórfico. En Morelos hubo también dos haplotipos (MOR1 y 2), diversidad haplotípica de 0.389 (desviación estándar de 0.164), diversidad nucleotídica de 0.00035 (desviación estándar de 0.00015), promedio de diferencias nucleotídicas de 0.4 y 1 sitio polimórfico. Al considerar las dos localidades de *N. narica* como una única población continental, teniendo en cuenta que se

trata meramente de una aproximación comparativa, se encontraron los siguientes valores: cuatro haplotipos, diversidad haplotípica de 0.752 (desviación estándar de 0.056), diversidad nucleotídica de 0.0213 (desviación estándar de 0.0016), promedio de diferencias nucleotídicas de 23.4 y 45 sitios polimórficos.

### 6.3.2 Divergencia y demografía

En el árbol NJ basado en distancia (Figura 7), se aprecia un grupo con un soporte del 100% que incluye exclusivamente a individuos de la isla Cozumel, que se separan a su vez en dos grupos con altos valor de soporte (BS 99 y 98). Los individuos de continente se agrupan en dos clados diferentes al isleño y acordes a la localidad de muestreo: Jalisco y Morelos (BS=100 en ambos casos).

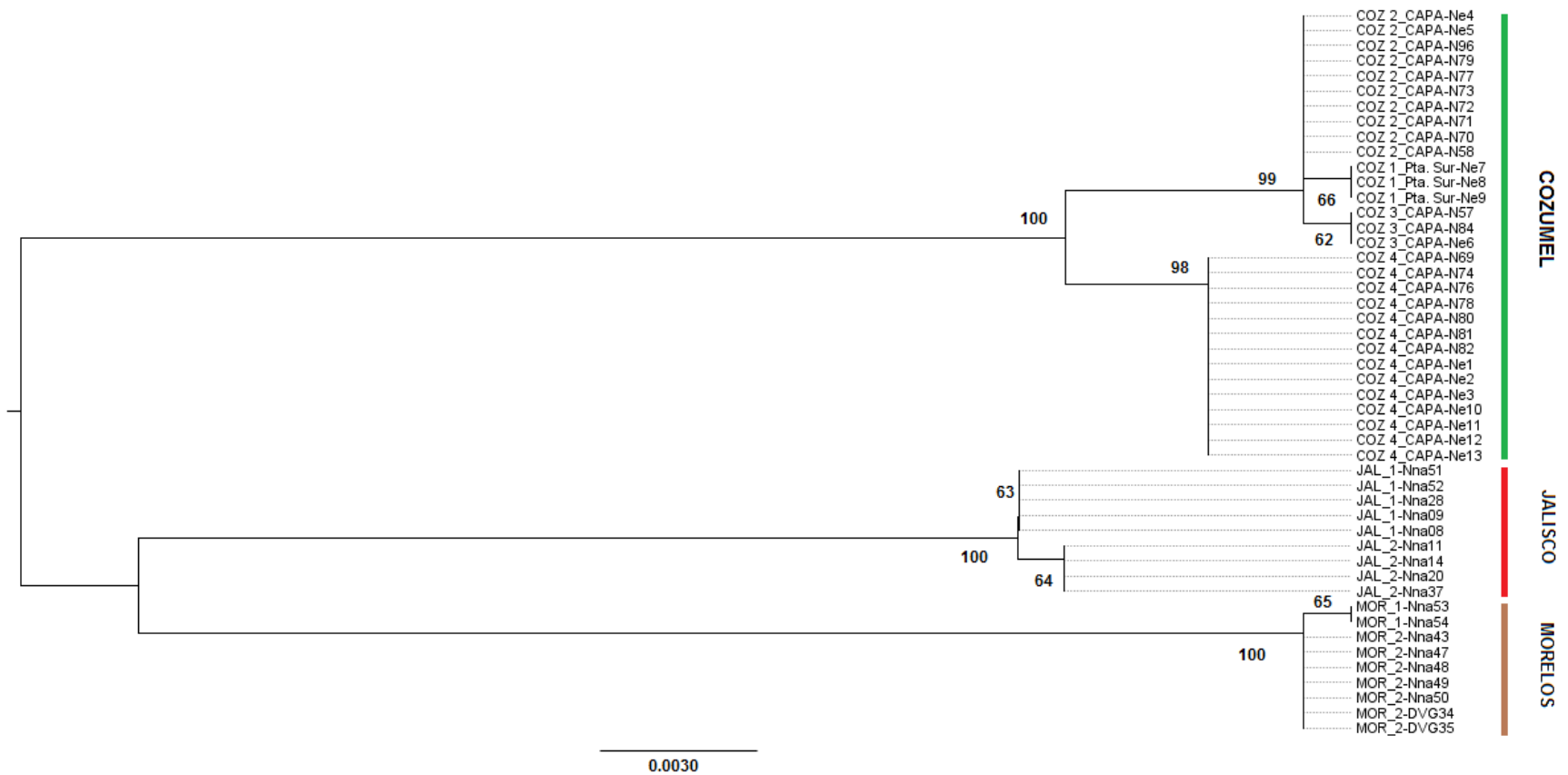
Los valores de divergencia entre las poblaciones ( $D_{xy}$  y  $D_a$ ) son iguales en todas las comparaciones, por lo que sólo se muestran los de  $D_a$  (Cuadro 11): las poblaciones de Cozumel tienen valores menores entre ellas (de 0.1 a 0.8%); en contraste, los valores son mayores para las comparaciones entre Cozumel y las poblaciones de continente (de 4.2% a 5.1%), con mayor divergencia entre la población COZ 1 (Punta Sur) y MOR 1 (Figura 3; Anexo 5, Quilamula), así como COZ 3 (Punta Sur) y MOR 1 (5.1% en ambos casos) (Cuadro 6). Resulta interesante que las localidades más distantes geográficamente no corresponden a las más divergentes (COZ-JAL), sino de Morelos (MOR) y Cozumel (valores de 4.7% a 5.1%, respectivamente).

**Cuadro 10.** Pruebas neutralidad y valores de diversidad genética en las poblaciones de *Nasua* obtenidos con el cyt *b*. n: número de muestras; *Nh*: haplotipos; *h*: diversidad haplotípica;  $\pi$ : diversidad nucleotídica; *K*: número promedio de diferencias nucleotídicas; y *S*: sitios variables. DE: desviación estándar. Niveles de significancia: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.02$

Localidad	n	<i>Nh</i>	<i>h</i> ( $\pm$ DE)	$\pi$ ( $\pm$ DE)	<i>K</i>	<i>S</i>	<i>D</i> de Tajima	<i>D</i> de Fu y Li	<i>F</i> de Fu y Li	<i>F</i> s de Fu	<i>r</i>	<i>R</i> <sub>2</sub>
Cozumel	30	4	0.674 (0.054)	0.00409 (0.00020)	4.49195	10	2.46891*	1.40570*	2.02648**	6.502*	0.207	0.225
Jalisco	9	2	0.556 (0.090)	0.00051 (0.00008)	0.556	1	1.40117	0.8404	1.06911	1.015		
Morelos	9	2	0.389 (0.164)	0.00035 (0.00015)	0.389	1	0.15647	0.08404	0.74837	0.477		
Continente (Jalisco + Morelos)	18	4	0.752 (0.056)	0.02133 (0.0016)	23.399	45						

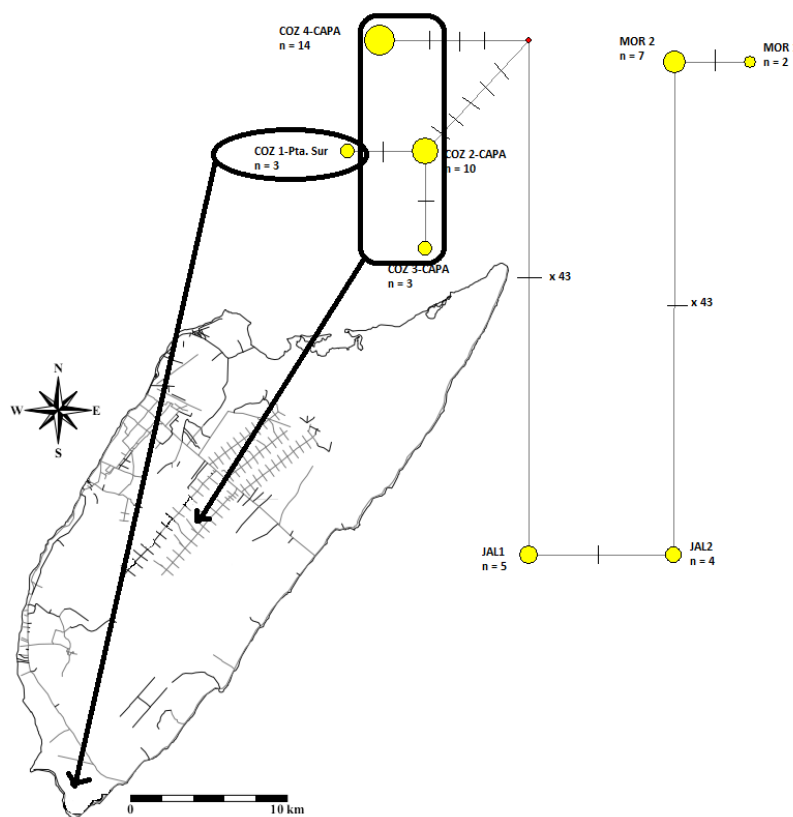
**Cuadro 11.** Valores de divergencia (*Da*) entre las poblaciones de *Nasua nelsoni* (COZ) y *N. narica* (JAL, MOR) obtenidos con el cyt *b*. Debajo de la diagonal se muestran los valores de divergencia (*Da*); arriba de la diagonal se muestra el error estándar de cada comparación. Todas las poblaciones fueron definidas con base en los diferentes haplotipos.

Poblaciones	COZ 1-Pta. Sur	COZ 2-CAPA	COZ 3-CAPA	COZ 4-CAPA	JAL 1	JAL 2	MOR 1	MOR 2
COZ 1-Pta. Sur		0.001	0.001	0.003	0.006	0.006	0.006	0.006
COZ 2-CAPA	0.001		0.001	0.003	0.006	0.006	0.006	0.006
COZ 3-CAPA	0.002	0.001		0.003	0.006	0.006	0.006	0.006
COZ 4-CAPA	0.008	0.007	0.008		0.006	0.006	0.006	0.006
JAL 1	0.045	0.044	0.045	0.042		0.001	0.006	0.006
JAL 2	0.046	0.045	0.046	0.043	0.001		0.006	0.006
MOR 1	0.051	0.050	0.051	0.048	0.041	0.040		0.001
MOR 2	0.050	0.049	0.050	0.047	0.040	0.039	0.001	



**Figura 7.** Árbol de NJ de *Nasua nelsoni* y *N. narica* obtenido con la distancia genética  $p$  y a partir de secuencias del cyt  $b$ . Los números en los nodos se refieren a valores de soporte Bootstrap (BS). Los nombres de las muestras están conformados por la localidad, seguida del número de haplotipo al interior de ésta (ejemplo: COZ 1 Pta. Sur-Ne7. Ver Anexo 2).

La red de haplotipos muestra la misma separación entre las poblaciones insulares (*N. nelsoni*) y las de continente (*N. narica*) observada previamente, además de la presencia de un haplotipo no muestreado directamente relacionado con los haplotipos de la isla (Figura 8, punto rojo). Esto sugiere que el haplotipo COZ 4-CAPA, de Cozumel, está más relacionado con JAL 1 del continente, lo cual también es evidente con los valores de divergencia cuando se comparan los haplotipos de Cozumel con los de continente (Cuadro 11). También es interesante que los haplotipos COZ 1-Pta. Sur y COZ 3-CAPA derivan de COZ 2-CAPA (Figura 8), lo cual sugiere una separación relativamente reciente de ambos linajes dado que hay un paso mutacional entre ellas y valores de divergencia pequeños (0.1% en ambos casos).



**Figura 8.** Red de haplotipos de las poblaciones de *Nasua* construida con el algoritmo MJ para la variación observada en el *cyt b*. Los círculos amarillos corresponden a los haplotipos y su tamaño es proporcional al tamaño de muestra (*n*) en cada una. El punto rojo es el haplotipo no muestreado. Las rayas perpendiculares a las líneas indican un paso mutacional entre las poblaciones, excepto donde se muestra “x 43”, que son 43 pasos.



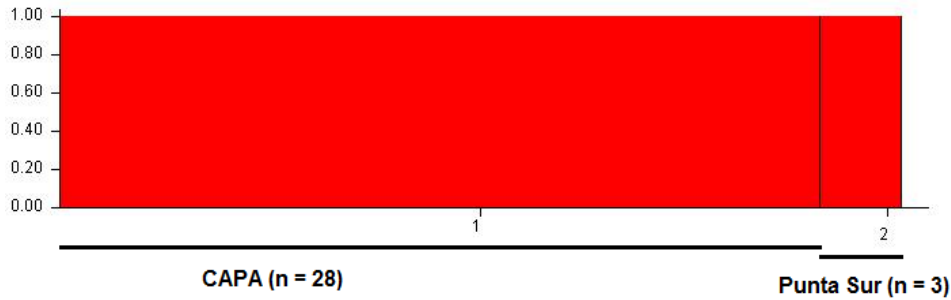
Para la distribución mismatch se obtuvieron los índices  $r$  y  $R_2$  ( $r = 0.207$ ,  $P > 0.10$ ;  $R_2 = 0.225$ ,  $P > 0.10$ ), que junto con los valores positivos y significativos de los estadísticos  $D$  y  $F_s$  (Cuadro 10), indican un decremento en la población de *N. nelsoni*. Por último, el estimado de tamaño efectivo ( $N_e$ ) de *N. nelsoni*, considerando un tiempo generacional (edad promedio a la cual las hembras alcanzan la madurez sexual; Nabholz *et al.* 2008) de 2 años (Gompper 1995; para *N. narica*), fue de 39,186 individuos.

#### **6.4 *Nasua nelsoni* – microsatélites**

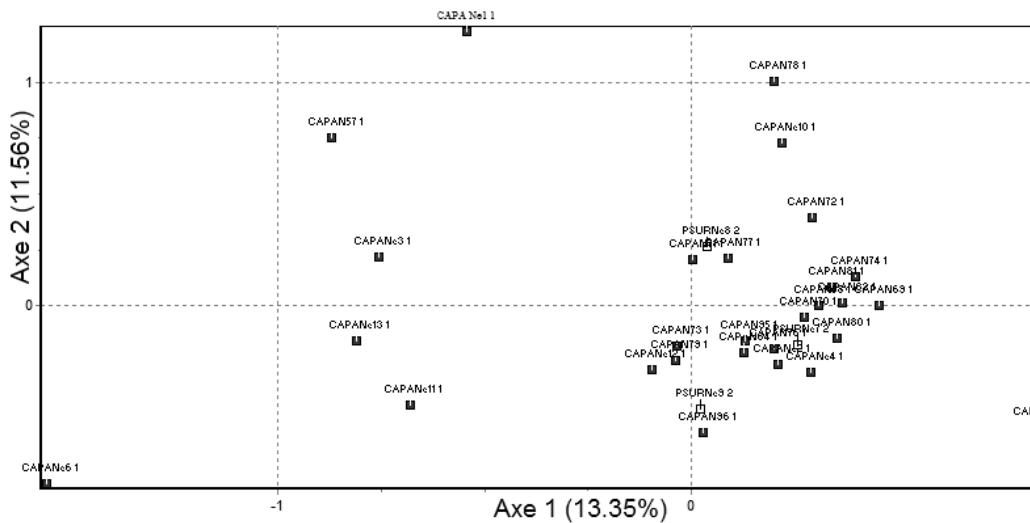
De los 12 microsatélites para *N. nelsoni* que se probaron, no se logró la amplificación de tres (Nasua895, Nasua1757 y Nasua1785), mientras que el locus Nasua1251 resultó monomórfico. A nivel de los sitios de muestreo no se encontraron alelos nulos ni “*stuttering*” para CAPA ( $n = 28$ ) en ninguno de los ocho loci retenidos, mientras que este análisis no se pudo realizar Punta Sur ( $n = 3$ ) debido al tamaño de muestra. Al analizar la población en conjunto ( $n = 31$ ), sólo el locus N931 tuvo señal de alelos nulos.

##### **6.4.1 Definición de grupos y asignación de individuos**

La definición de grupos con STRUCTURE mostró un único grupo o *cluster* para *N. nelsoni* (Figura 9), con un valor de asignación para cada individuo del 100%, lo que concuerda con los resultados del AFC, que mostraron que no existe una separación o agrupación clara de los individuos (puntos en el hiperespacio) (Figura 10). Con la corrección de Evanno *et al.* (2005) para los resultados de STRUCTURE se obtuvo un valor de  $K = 2$ ; sin embargo, este algoritmo no considera valores extremos de  $K$ , en este caso  $K = 1$ . Por ello, y aunado a lo obtenido con el AFC, se consideró una única población para *N. nelsoni* para todos los análisis subsecuentes.



**Figura 9.** Asignación de individuos de *N. nelsoni* con el programa STRUCTURE. Las localidades muestreadas conforman un único *cluster* (n = 31.)



**Figura 10.** Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) de *N. nelsoni*, con base en los genotipos.

#### 6.4.2 Equilibrio y diversidad genética

Los análisis del coeficiente de fijación o endogamia con la corrección secuencial de Bonferroni indican que sólo el locus N931 tuvo señal de desviación del EHW significativa ( $F_{IS} = 0.3361$ ,  $P = 0.005$ ), indicando un déficit de heterocigos probablemente debido a la presencia de alelos nulos. Asimismo, ninguna comparación entre pares de loci presentó desequilibrio de ligamiento significativo.

En cuanto a diversidad genética para *N. nelsoni*, el número de alelos observados en la población fue de dos a siete alelos con una media de 4.25; el número promedio de alelos efectivos fue de 2.4. El locus que presentó mayor número de alelos fue el N71 (7), mientras que los loci N833 y N504 presentaron el menor (2). Los valores de heterocigosis observada variaron

de 0.258 a 0.742, con una media de 0.476, mientras que la heterocigosis esperada fue mayor (0.380-0.744; media de 0.528). La heterocigosis de Nei presentó valores más altos ( $H_{NEI} = 0.387$  a 0.756; media de 0.537) (Cuadro 12).

**Cuadro 12.** Valores de diversidad genética para los microsatélites retenidos en la población de *N. nelsoni* (n = 31): número de alelos observados ( $n_o$ ), número de alelos efectivos ( $n_e$ ), heterocigosis observada ( $H_o$ ), heterocigosis esperada ( $H_e$ ) y heterocigosis de Nei ( $H_{NEI}$ ).

Locus	$n_o$	$n_e$	$H_o$	$H_e$	$H_{NEI}$
<b>N931</b>	4	1.614	0.258	0.38	0.387
<b>N1050</b>	5	2.794	0.71	0.642	0.653
<b>N193</b>	3	1.75	0.387	0.429	0.436
<b>N71</b>	7	3.907	0.71	0.744	0.756
<b>N833</b>	2	1.661	0.29	0.398	0.405
<b>N504</b>	2	1.621	0.323	0.383	0.389
<b>N2841</b>	6	3.907	0.742	0.744	0.756
<b>N1990</b>	5	2.021	0.387	0.505	0.513
<b>Promedio</b>	<b>4.25</b>	<b>2.409</b>	<b>0.476</b>	<b>0.528</b>	<b>0.537</b>

#### 6.4.3 Estructura genética, relación de parentesco, cuello de botella y tamaño efectivo

Al haberse detectado una única población, el análisis de varianza molecular (AMOVA) se efectuó para conocer el porcentaje de variación al interior de la misma. Así, con base a los estimados de  $F_{ST}$ , el AMOVA mostró que el 88.5% de la variación genética se encuentra dentro de los individuos, mientras que el 11.5% restante se encuentra entre los individuos (Cuadro 13A). Los resultados fueron similares para  $R_{ST}$  (Cuadro 13B). De los anteriores, solamente fueron significativos los estimados con  $F_{ST}$ . No fue posible estimar número de migrantes ( $Nm$ ) ni distancia genética.

El análisis de parentesco mostró que el 78% de los individuos no tienen relación cercana, mientras que solamente el 2% son hermanos, el 8% tienen una relación padre-hijo y casi el 12% son medios hermanos (Cuadro 14).

**Cuadro 13.** Resultados del AMOVA con base a los estimados de  $F_{ST}$  (A) y  $R_{ST}$  (B).

<b>(A)</b>					
Fuente de variación	Grados de libertad (g. l.)	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación (%)	<i>P</i>
Entre los individuos	30	71.984	0.2481 Va	11.5	<b>0.00704*</b>
Al interior de los individuos	31	59	1.9032 Vb	88.5	
Total		130.984	2.1513		

Índice de fijación  $F_{IS} = 0.11533$

**\* $P \leq 0.05$**

<b>(B)</b>					
Fuente de variación	Grados de libertad (g. l.)	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación (%)	<i>P</i>
Entre los individuos	30	7030.677	31.2102 Va	15.3635	0.06461
Al interior de los individuos	31	5330	171.9355 Vb	84.6365	
Total		12360.677	203.1457		

Índice de fijación  $F_{IS} = 0.15363$

**\* $P \leq 0.05$**

**Cuadro 14.** Porcentajes de los tipos de relaciones entre individuos para la población de *N. nelsoni*.

Parentesco	Porcentaje en la población (%)
Padres-hijos	7.96
Hermanos	2.15
Medios hermanos	11.61
Sin relación	78.28

Los análisis de cuellos de botella mostraron evidencia de señal de reducción poblacional asociado a un exceso de heterocigosis bajo el modelo IAM. Sin embargo, para el modelo de dos fases (TPM) y el SMM, los resultados no fueron significativos (Cuadro 15). La representación gráfica de la distribución de las proporciones alélicas entre las clases de frecuencias (baja, media, alta) está en el anexo 14. Esta mostró una distribución en forma de “L”, lo cual coincide con los dos modelos de TPM y SMM, que indican que no hay cuellos de

botella en la población. Sin embargo, con el índice de Garza y Williamson (2001), se obtuvo un valor  $M$  de 0.385, siendo menor que su valor crítico  $M_c$  de 0.855. Finalmente, el tamaño efectivo estimado con base en el desequilibrio de ligamiento en un momento en el tiempo para la población de *N. nelsoni* en Cozumel fue de 17.1 individuos (CI 95% = 4 a 119.4).

**Cuadro 15.** Pruebas de cuello de botella en la población de *N. nelsoni*, con base en un exceso de heterocigosis, bajo diferentes modelos de mutación. Solamente el IAM fue significativo ( $*P \leq 0.05$ ).

<b>Modelo de mutación</b>	<b><i>P</i></b>
IAM	<b>0.0059*</b>
TPM (SMM: 70%; IAM: 30%)	0.2305
TPM (SMM: 90%, IAM: 10%)	0.5781
SMM	0.7266

## 7. DISCUSIÓN

El presente trabajo representa el primer estudio que analiza la diversidad y estructura genética de las poblaciones de dos prociónidos endémicos de Isla Cozumel, con base en marcadores moleculares de herencia materna (secuencias de citocromo *b*) y biparental (microsatélites). Asimismo, incluye una evaluación preliminar sobre las relaciones que existen entre las especies insulares y su contraparte continental, considerando sólo algunas localidades del centro y sur de México, con base en secuencias mitocondriales.

### 7.1 *Procyon pygmaeus*

La diversidad genética basada en el citocromo *b* fue baja. Sin embargo, se debe resaltar que dos individuos capturados en 2012 mostraron, con base en los diferentes análisis, un haplotipo que se encuentra exclusivamente en Quintana Roo. Lo anterior es evidencia de la introducción de individuos de *P. lotor* a la isla, y peor aún, demuestra que la variación genética de *P. pygmaeus* en el citocromo *b* es nula, representada por un único haplotipo en toda la isla. La presencia de un único haplotipo coincide asimismo con lo reportado para otras poblaciones de mamíferos cuyas poblaciones se comportan como islas, por ejemplo los búfalos acuáticos (Lau *et al.* 1998) y leones marinos (Maldonado *et al.* 1995). Sin embargo, el caso de *P. pygmaeus* es crucial debido a que se trata de una especie endémica y a que existen pocos trabajos antecedentes: uno es el de McFadden *et al.* (2008), quienes amplificaron la región control del ADNmt para *P. pygmaeus* (893 pb,  $n = 21$ ), y encontraron también un único haplotipo, evidenciando la situación crítica de la especie.

En cuanto a diversidad genética con microsatélites, la especie mostró valores moderados tanto de número de alelos (2 a 5) como de heterocigosidad observada y esperada ( $H_o = 0.490$  y  $H_e = 0.525$ ). Se tienen estudios para la especie continental, *P. lotor*, que mostró valores comparativamente más altos (4 a 29 alelos;  $H_o = 0.589-0.910$ ;  $H_e = 0.542-0.940$ ) (Alda *et al.* 2013; Cullingham *et al.* 2009; Dharmarajan *et al.* 2009; Root *et al.* 2009; Roy-Nielsen y Nielsen 2007; Santonastaso *et al.* 2012) que la especie isleña. Los valores de diversidad de *P. pygmaeus* concuerdan con otros estudios de mamíferos insulares, como marsupiales endémicos (Eldridge *et al.* 2004), roedores (Almeida *et al.* 2005; Hinten *et al.* 2003) y carnívoros (Paetkau *et al.* 1998; Fraser *et al.* 2013), que exhibieron niveles de diversidad genética más bajos que sus contrapartes del continente. Coincide también con lo reportado para otros carnívoros como el tejón euroasiático (*Meles meles*; Kurose *et al.* 2001), que exhibe niveles de

diversidad genética comparativamente más bajos en las poblaciones de Japón que en las continentales de Asia.

Cabe mencionar que se detectó desequilibrio de ligamiento significativo para la población total de *P. pygmaeus* en dos pares de loci, aunque no al interior de cada grupo. La presencia de desequilibrio de ligamiento indica que pueden estar actuando factores como selección, deriva génica o endogamia (Hartl y Clark 1997). La deriva génica y los apareamientos no aleatorios (endogamia) pueden provocar la fijación y pérdida de alelos de manera aleatoria. La presencia de alelos exclusivos en *P. pygmaeus* y cierto grado de endogamia sugieren que el desequilibrio de ligamiento detectado puede estar asociado a estos factores, así como al efecto Wahlund (Wahlund 1928). Éste se presenta cuando se analiza en conjunto una población que en realidad está conformada por dos o más subpoblaciones; si son distintas las frecuencias alélicas al interior de éstas, se producirá un déficit de heterocigos aún cuando cada una se encuentre en EHW (Hedrick 2011).

Los resultados muestran que la población de *P. pygmaeus* está diferenciada en dos grupos genéticos (asignación con microsatélites), con un valor de diferenciación moderado ( $F_{ST} = 0.109$  y  $R_{ST} = 0.144$ ) (Balloux y Lugon-Moulin 2002) y cierta migración ( $Nm = 4.06$ ), evidenciado además por la presencia de alelos exclusivos en uno de los grupos. El valor de distancia genética entre los grupos ( $D_N = 0.159$ ) y su valor recíproco (identidad genética  $I_N = 0.853$ ), indican también una diferenciación moderada, que corresponde con la distribución de los individuos en la isla, un grupo al norte y otro al sur. Las relaciones de parentesco también son diferentes en ambos grupos: en el grupo 1, la mayor proporción fue de individuos sin relación, mientras que el 27% correspondió a relaciones entre individuos, destacando la de medios hermanos (12%) y padre-hijo (10%); en contraste, en el grupo 2 la proporción de individuos relacionados fue menor (16%), sobre todo la de padre-hijo (2%). Esto sugiere que en el grupo 1 hay grupos familiares más grandes, lo cual es característico de *P. pygmaeus* (Cuarón *et al.* 2004), sobre todo en sitios asociados a actividades humanas (De Villa-Meza *et al.* 2011). El grupo 1 está conformado por individuos del norte de Cozumel (Isla de la Pasión y Club de Golf Cozumel Country Club), sitios donde los individuos tienen acceso a alimento por parte de los pobladores (e.g. pescadores). Por su parte, los individuos del grupo 2 son de Punta Sur, una zona de conservación ecológica en Cozumel. Los asentamientos humanos asociados con las zonas de Isla de la Pasión y del Club de Golf Cozumel Country Club, sin duda han fomentado la formación de poblaciones de mapaches bien establecidas, lo que estaría propiciando el patrón de estructura y diferenciación genética observada. Existen ejemplos de estructura entre

poblaciones de la especie continental *P. lotor*, asociados con la presencia humana (Alda *et al.* 2013; Balkenhol *et al.* 2011; Cullingham *et al.* 2009; Dharmarajan *et al.* 2009), en las que los individuos reducen su área de desplazamiento y la ajustan a la presencia de recursos antropogénicos agregados. Por ejemplo, Prange *et al.* (2003) encontraron que las poblaciones de *P. lotor* en el noreste de Illinois, Estados Unidos, se asocian a la presencia de recursos alimenticios en zonas urbanas, teniendo mayor densidad poblacional que en las zonas rurales. Sin embargo, en poblaciones con densidades altas, es mayor la probabilidad de brotes de enfermedades y a su rápida transmisión, aunado a mayor mortandad de individuos (Prange *et al.* 2003). Lo anterior podría afectar significativamente a las poblaciones de *P. pygmaeus*, por lo que sería conveniente reducir de manera periódica las fuentes antropogénicas de alimento (por ejemplo, mediante la recolección de basura al menos dos veces al día para evitar los agregados de individuos), a la par de realizar un monitoreo constante tanto cerca como lejos de los asentamientos humanos. Ello permitiría evaluar de manera más precisa los factores de estructura y diferenciación genética de *P. pygmaeus* en Cozumel.

En cuanto a aspectos demográficos, se detectó señal de cuello de botella para *P. pygmaeus* en todos los estimadores con microsatélites, tanto para los grupos 1 y 2 como para la población completa: el modelo IAM lo evidenció asociado a exceso de heterocigotos, la representación gráfica de Luikart *et al.* (1998) mostró una distribución acorde con eventos de cuello de botella recientes (no para Cozumel en este caso) y el índice  $M$  confirma una reducción en el tamaño poblacional más antiguo. Si se considera además que solamente se encontró un haplotipo, asociado al bajo número de alelos por locus, nuestros resultados sugieren un cuello de botella crónico (histórico y reciente) a lo largo de muchas generaciones. Lo anterior se apoya además con el estimado de tamaño efectivo ( $N_e$ ) para la población de *P. pygmaeus* en Cozumel que fue de 21.4 individuos (intervalo de 11 a 47). McFadden *et al.* (2008) reportan asimismo un cuello de botella para esta especie.

## **7.2 *Nasua nelsoni***

*Nasua nelsoni* muestra valores de diversidad genética moderados tanto para secuencias, con cuatro haplotipos en la isla y diversidad haplotípica de 0.674 (desviación estándar de 0.054), como para microsatélites, con 2 a 7 alelos y valores de heterocigosis observada y de Nei de 0.476 y 0.537, respectivamente. McFadden *et al.* (2008) analizaron la región control de dos individuos de *N. nelsoni* (631 pb) y encontraron dos haplotipos; a este respecto, los niveles de diversidad son poco comparables con nuestros resultados, ya que el propósito de utilizar el



citocromo *b* como marcador fue para obtener una aproximación a las distancias genéticas entre la especie insular y la continental, dado que tiene mayor poder de resolución (Johns y Avise 1998). Sin embargo, este marcador reveló unos niveles moderados de diversidad genética que históricamente han existido en la isla, lo que constituye información relevante para la especie.

Asimismo, prácticamente no existe información sobre diversidad genética con microsatélites para especies del género *Nasua*. Por ejemplo, Sánchez-Garibay *et al.* (2012) desarrollaron los microsatélites para la especie continental *N. narica* y encontraron valores de diversidad más bajos que en *N. nelsoni*, con cinco alelos por locus y heterocigosis observada y esperada de 0.300 y 0.326, respectivamente. Hirsch y Maldonado (2011) estudiaron algunos aspectos genéticos de la otra especie del género (*N. nasua*), que se distribuye en Sudamérica, aunque utilizaron primers diseñados para otros carnívoros; ellos reportan el mismo número promedio de alelos y valores similares de heterocigosis (heterocigosis observada de 0.484 y esperada de 0.482). Con base en estos únicos dos estudios, y con las limitaciones que ello conlleva para plantear conclusiones, podemos mencionar que contrario a lo observado con *P. pygmaeus*, en *N. nelsoni* los valores de diversidad son mayores, o similares, a los de su contraparte continental. Lo anterior, aunque contrario a lo esperado, ya ha sido observado en otros casos de poblaciones insulares que exhiben niveles de diversidad genética mayores que las continentales. Por ejemplo, en el roedor endémico de Cozumel *Oryzomys couesi cozumelae* (Vega *et al.* 2007), en poblaciones del roedor *Habromys simulatus* endémicas de bosques mesófilos de alta montaña, las cuales se comportan como islas (Castañeda-Rico *et al.* 2011), y en la marta japonesa *Martes melampus*, endémica de Japón (Kamada *et al.* 2012). Al respecto, uno de los factores que podrían explicar los niveles de diversidad genética encontrados en *N. nelsoni* es el tamaño de Cozumel, ya que se ha observado que en las islas con áreas grandes, los niveles de diversidad genética son altos (Hinten *et al.* 2003). Particularmente en Cozumel (486 km<sup>2</sup>), ya se ha observado el mismo patrón con *Oryzomys couesi cozumelae* (Vega *et al.* 2007).

En *N. nelsoni* se detectaron cuatro grupos (clados) con el citocromo *b*, con valores de divergencia entre ellos de 0.1% a 0.8%. Se encontró además un haplotipo exclusivo a los tres individuos capturados en una localidad al sur (Punta Sur), que es el grupo más divergente respecto al centro de la isla (CAPA; 0.8%). Por otro lado, con los microsatélites se detectó una única población o grupo genético. Así, el marcador molecular de herencia materna (ADNmt) muestra una señal de estructura genética que no se refleja en los microsatélites. El hecho de que las hembras de coatí son fuertemente filopátricas (Gompper *et al.* 1998) indicaría que

existen al menos dos poblaciones de *N. nelsoni* en Cozumel. Un factor importante también es el hecho de que los machos adultos son los que se desplazan hacia diferentes grupos (tropas) en época reproductiva, aunque permanecen cerca de su tropa natal (rango superpuesto) el resto del año (Gompper *et al.* 1998; Valenzuela y Macdonald 2002). El número mayor de capturas de individuos machos (23) en comparación con hembras (8) sugiere que CAPA puede ser un área de paso que los machos utilizan para desplazarse entre grupos. Lo anterior puede tener un efecto homogeneizador de la variación genética (Hedrick 2011), la cual se refleja en la ausencia de diferenciación genética en la población en los resultados con microsatélites. CAPA puede ser además un sitio donde se sobrelapan las áreas de actividad de diversas tropas del coatí, compuestas por hembras y sus crías (Gompper 1995), y de los machos adultos solitarios, lo cual se apoya en los análisis de parentesco (alto porcentaje de individuos no relacionados) y en el bajo nivel de endogamia (Wang 2004). Los resultados de estructura muestran así dos perspectivas: con secuencias, se sugiere que la población de coatí en la isla históricamente ha mantenido una diferenciación a nivel de cuatro linajes, definidos por haplotipos diferentes, mientras que la conducta y movilidad previene una diferenciación a una escala más reciente.

También se encontró evidencia de cuello de botella para *N. nelsoni*. Las diferentes pruebas nos permiten detectar que estos eventos ocurrieron en diferentes tiempos, donde los resultados implican un cambio –disminución– del tamaño poblacional histórico (antiguo) (Mismatch y  $M$ ), pero no que la población haya tenido una reducción reciente de tamaño. Al respecto, en evaluaciones recientes donde se tienen datos demográficos previos, se ha argumentado que estas pruebas pueden fallar para detectar la disminución del tamaño poblacional, debido a que son muy sensibles a los parámetros y modelos de mutación que se asumen, lo que les confiere poco poder estadístico y consecuentemente poca validez (Peery *et al.* 2012). Un ejemplo es el caso de las ratas canguro (*Dipodomys spectabilis*), cuyas poblaciones se han estudiado por muchos años y para las que se tienen datos de una disminución poblacional, la cual no fue detectada con las pruebas genéticas (Busch *et al.* 2007). Existen muchos factores que pueden influir para no detectar los cuellos de botella, como la duración del mismo, eventos de inmigración y la cantidad de variación genética antes del cuello de botella; estos factores pueden “borrar” la señal genética de la reducción poblacional incluso para la prueba de exceso de heterocigosis, que se considera válida por ser menos susceptible al efecto de los parámetros utilizados (Peery *et al.* 2012).

Por lo anterior, es válido considerar que *N. nelsoni* haya sufrido una reducción reciente en su tamaño poblacional, sobre todo por el tamaño censal estimado que es de 150 individuos

(margen de error de 90 individuos; Cuarón *et al.* 2004). Importante también es el estimado de tamaño efectivo que fue significativamente bajo con microsatélites (17.1 individuos; intervalo de 4 a 119), aunque con secuencias fue de 39,186 individuos, lo que en conjunto implica que la población no se ha recuperado del o los cuellos de botella que ha sufrido históricamente.

### 7.3 Origen y divergencia respecto a las poblaciones continentales

En cuanto a los valores de divergencia con las secuencias, se obtuvo un valor de 0.5% entre *P. pygmaeus* y la población de *P. lotor* de Yucatán, lo cual corresponde con el 0.47% encontrado por McFadden *et al.* (2008). Aunado a lo anterior, la presencia de un solo haplotipo en *P. pygmaeus* y su alto valor de soporte, sugieren una alta diferenciación genética respecto a *P. lotor*, que se complementa con las claras diferencias morfológicas entre ambas especies (De Villa-Meza *et al.* 2011). Ello apoya la designación taxonómica de la población isleña como especie endémica, la cual ha sido reconocida en otros trabajos sobre el género *Procyon* (Pons *et al.* 1999; Helgen y Wilson 2003; Helgen *et al.* 2008). Los resultados, aunque preliminares por la falta de muestreo del continente, muestran que *P. pygmaeus* está más cercanamente relacionada con las poblaciones de Yucatán, lo cual sugiere que el origen de la especie isleña podría estar en la península.

En cuanto a los valores de divergencia entre *N. nelsoni* y *N. narica*, se observó una divergencia del 4.5% entre Cozumel y Jalisco y de 5% respecto a Morelos. La diversidad al interior de la población isleña representada por cuatro haplotipos, se asocia también con la alta diferenciación genética de *N. nelsoni* respecto a las poblaciones de continente.

Aunado a lo anterior, para las especies insulares se tienen tiempos estimados de divergencia que anteceden a la presencia humana (McFadden *et al.* 2008), lo que en conjunto con nuestros resultados hacen suponer que la divergencia entre Cozumel y Yucatán debe ser mayor para *N. nelsoni* que la reportada por McFadden *et al.* (2008; 0.51%), por lo que es necesario corroborarlo con muestras de ésta (y otras) región (es) del continente. Asimismo, diversos estudios concuerdan en que el citocromo *b* es adecuado para analizar la divergencia entre especies del mismo género, principalmente en carnívoros (Masuda *et al.* 1996; Hosoda *et al.* 1999; Kurose *et al.* 2001; Tomasik y Cook 2005), y específicamente en la familia Procyonidae (Koepfli *et al.* 2007). Sin embargo, se recomienda utilizar más de un marcador (por ejemplo, microsatélites) para estimar tiempos de divergencia de manera más adecuada, (McFadden *et al.* 2008). De igual modo, sería importante analizar la estructura genética entre

las poblaciones insulares y continentales con microsatélites, para tener una idea más reciente de la historia evolutiva de las mismas.

#### **7.4 Sugerencias de conservación**

Los resultados del presente trabajo exhiben el grado de diferenciación genética que existe entre las poblaciones insulares y continentales de los géneros *Nasua* y *Procyon*, así como la estructuración que existe en Cozumel para ambos prociónidos.

Los resultados también muestran algunos aspectos demográficos. Las poblaciones que han experimentado reducción de tamaño poblacional son más propensas a la extinción, sobre todo en ecosistemas insulares (Frankham 1997, 1998; Grant 1998). Estudios previos han estimado tamaños poblacionales bajos para ambos prociónidos: entre 323 y 955 para *P. pygmaeus*, llegando incluso a un mínimo de 105 individuos si tomamos en cuenta únicamente el número de capturas realizadas (McFadden 2004; García-Vasco 2005; Copa-Alvaro 2007), y para *N. nelsoni* se ha estimado en 150 (margen de error de 90) individuos (Cuarón *et al.* 2004). Considerando que el número de individuos es el aspecto demográfico más importante para determinar la viabilidad de una población, y que debe estar en un orden de miles de individuos (Allendorf y Luikart 2007), se sugiere que los dos prociónidos endémicos tienen comprometida su supervivencia a largo plazo. En cuanto a los aspectos genéticos, en Isla Cozumel existen diversos factores que pueden estar asociados a los cuellos de botella y valores nulos o bajos de diversidad mitocondrial detectados para ambas especies, así como a los tamaños poblacionales pequeños, de los que cabe destacar a los fenómenos naturales como los huracanes, los cuales impactan la isla periódicamente desde tiempos históricos y que pueden afectar las poblaciones de manera directa por mortandad, o indirecta por falta de alimento y cambio en la estructura de la vegetación posterior a los huracanes (García-Aguilar 2010; Espindola-Barrientos 2013). Las actividades humanas impactan también las poblaciones de forma directa por la caza de individuos e indirectamente por la transformación del hábitat.

Cabe mencionar que la estimación del  $N_e$  es uno de los parámetros evolutivos fundamentales de los sistemas biológicos, sobre todo en especies amenazadas como son los dos prociónidos endémicos de Cozumel. Sin embargo, su correcta estimación en poblaciones naturales es compleja debido a diferentes factores, principalmente al grado de estructura espacial (Waples 2002). Sin embargo, aunque los tamaños efectivos estimados no sean del todo precisos, son de tal magnitud bajos (Allendorf y Luikart 2007) que sin duda ambas especies pueden considerarse propensas a sufrir los problemas comunes de poblaciones

pequeñas, como pérdida de variación genética por la deriva génica, lo cual las pone en riesgo de extinción.

Dado lo anterior, una de las estrategias de conservación más importantes para ambas especies es el establecimiento de un área protegida que permita la conectividad entre los diferentes grupos (poblaciones), la cual debe abarcar los diferentes tipos de vegetación en la isla, permitiendo así que los tamaños poblacionales de cada grupo aumenten con el respectivo flujo genético entre ellos. Al mismo tiempo, otra estrategia es que algunas áreas privadas que mantienen buena cobertura vegetal se incorporen en los planes de conservación de forma que sirvan como sitios transitorios para los individuos de ambas especies y se refuerce la conectividad entre poblaciones. Este tipo de acciones se ha sugerido en trabajos previos llevados a cabo en Cozumel, específicamente para promover la conservación de ambos prociénidos (Cuarón *et al.* 2009), ya que impiden el desarrollo no planeado de asentamientos humanos que, como anteriormente se comentó, influyen en la estructura de *P. pygmaeus*. Dichas áreas protegidas deberían abarcar la isla principalmente en dirección norte-sur, cubriendo el área en que habita *N. nelsoni*.

Asimismo, se ha propuesto la creación de programas para criar en cautiverio algunas especies endémicas de Cozumel, destacando al mapache y coatí (Cuarón *et al.* 2009), aunque con la limitante de no contar con individuos adultos de *N. nelsoni* como fundadores para incluir esta especie. Afortunadamente, desde que comenzaron los trabajos de monitoreo de estas especies en la isla en el año 2001 (McFadden 2004; García-Vasco 2005; Copa-Alvaro 2007; Cuarón *et al.* 2004, 2009; el presente trabajo), se ha registrado un incremento en el número de avistamientos y de capturas, particularmente de *N. nelsoni*. Lo anterior, sin duda, favorece la implementación de esta medida de conservación (Cuarón *et al.* 2009).

Debe asimismo continuar el programa de control de especies exóticas que actualmente opera en la isla (Cuarón *et al.* 2009). Además del control de la fauna feral (perros y gatos) que se ha registrado en el hábitat de ambos prociénidos (McFadden 2004; García-Vasco 2005; Copa-Alvaro 2007), debe considerarse a la boa (*Boa constrictor*), la cual se ha convertido en el principal depredador en la isla (Vázquez-Domínguez *et al.* 2012). Al respecto, los bajos tamaños efectivos y poblacionales estimados de ambos carnívoros endémicos, pueden estar asociados a este depredador cuya presa principal serían las crías, así como a la fauna feral por la transmisión de enfermedades, que incide directamente en la mortandad de los individuos (Cuarón *et al.* 2004, 2009). Los congéneres introducidos (introgresión genética) amenazan a las poblaciones de los prociénidos endémicos afectando su variabilidad genética. Cuarón *et al.*

(2004) registraron la presencia de individuos congéneres de coatí (*N. narica*) en la parte sur de Cozumel (Punta Sur), e incluso mencionan la presencia de crías híbridas, producto de la cruce de una hembra de *N. nelsoni* con un macho *N. narica*. Sin embargo, no registraron individuos de *P. lotor* en Cozumel. En el presente trabajo se detectaron dos individuos de *P. lotor* en Cozumel, precisamente en Punta Sur, lo cual indica que la introducción de especies congéneres se ha llevado a cabo al menos desde el último registro. Las consecuencias de estas introducciones, sobre todo las genéticas, pueden comprometer la permanencia de las especies endémicas. En el caso particular de *P. pygmaeus*, cuya variación genética es nula en el citocromo *b*, puede provocar que eventualmente el haplotipo continental sea más frecuente en Cozumel, por lo cual es urgente se tomen medidas sobre el movimiento de especies continentales a la isla, así como la continuidad de monitoreos y muestreos para detectar estos individuos.

Finalmente, *P. pygmaeus* actualmente está catalogada como una especie endémica en Peligro de extinción (NOM-059; Semarnat 2010) y Críticamente en Peligro (IUCN; Cuarón *et al.* 2008). Tanto los datos morfométricos de la especie (De Villa-Meza *et al.* 2011), como los datos genéticos previos (McFadden 2004; McFadden *et al.* 2008) y los aportados en el presente trabajo, apoyan su designación taxonómica como especie. Por otro lado, *N. nelsoni* es actualmente considerada una subespecie (*N. narica nelsoni*; Samudio *et al.* 2008), catalogada como Amenazada (NOM-059; Semarnat 2010) y de Baja Consideración (IUCN, Samudio *et al.* 2008). Trabajos anteriores que analizaron aspectos morfométricos (Cuarón *et al.* 2004, 2009) y genéticos (McFadden *et al.* 2008), enfatizan la necesidad de un reevaluación taxonómica.

Los datos del presente trabajo, aunados a datos morfométricos previos (Valenzuela 1998; Copa-Alvaro 2007), corroboran que *N. nelsoni* es más pequeño que su contraparte continental *N. narica*, donde los individuos de Cozumel, sin importar el sexo, son en promedio 47% menos pesados y 26% menos largos. Además, se observaron cuatro haplotipos exclusivos de la población insular que presentan una divergencia de entre 4 y 5% con respecto a los haplotipos encontrados en el continente. A este respecto, Bradley y Baker (2001) proponen un marco de referencia para poder definir especies de mamíferos con datos moleculares, específicamente utilizando el citocromo *b*; ellos establecen que de existir datos morfométricos y valores de divergencia estándar entre las especies de interés, puede considerarse una reevaluación taxonómica de las mismas, bajo el entendido de que la variación genética fluctúa a tal magnitud en las poblaciones naturales que pueden existir procesos de especiación a diferentes valores de divergencia. Por ello, se puede proponer que el valor de divergencia encontrado entre las

especies del género *Nasua*, es característico para la especie insular. Así, considerando la divergencia respecto a su contraparte continental, diferencias morfométricas significativas, aislamiento geográfico y endemismo, se sugiere la urgencia de que se lleve a cabo una reevaluación taxonómica del coatí de Cozumel.

## 8. CONCLUSIONES

*P. pygmaeus* es una especie insular endémica con niveles de variación genética comparativamente bajos respecto a su contraparte continental (*P. lotor*). Aunado a lo anterior, se encontró una diferenciación genética moderada que estructura a la población en dos grupos, patrón que se asocia a las actividades humanas. Asimismo, se sugiere un cuello de botella crónico a lo largo de muchas generaciones. Aunado a lo anterior, se detectaron dos individuos de *P. lotor* en la isla, cuya presencia puede alterar la variación genética de *P. pygmaeus*. Por lo anterior, los resultados exhiben la situación crítica en la que se encuentra esta especie endémica.

Por el contrario, *Nasua nelsoni* mostró valores moderados de diversidad genética que son comparativamente similares a los de su contraparte continental (*N. narica*). Los resultados de estructura muestran dos perspectivas: se sugiere que la población en la isla ha mantenido una diferenciación a nivel de cuatro linajes, mientras que la conducta y movilidad previene una diferenciación a una escala más reciente. Sin embargo, se sugiere que la población no se ha recuperado del o los cuellos de botella que ha sufrido a lo largo de la historia.

Aunado a lo anterior, los tamaños poblacionales estimados para ambos prociénidos endémicos, son pequeños, por lo que los resultados en conjunto indican que tienen comprometida su supervivencia a largo plazo. Por ello, se sugiere el establecimiento de áreas protegidas, que abarquen la isla en dirección norte-sur, así como la crianza en cautiverio de ambos prociénidos, y la continuidad del programa de control de especies exóticas y ferales.

Finalmente, se sugiere una reevaluación taxonómica del coatí de Cozumel, considerando la divergencia que mostró respecto a su contraparte continental, las diferencias morfométricas y su aislamiento geográfico.

## LITERATURA CITADA

- Aguirre-Planter, E. 2007. Flujo génico: métodos para estimarlo y marcadores moleculares. En: Eguiarte, L. E., Souza, V. y Aguirre, X. (comps.). Ecología molecular. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pp. 49-61.
- Alasaad, S., Soriguer, R. C., Chelomina, G., Sushitsky, Y. P., Fickel, J. 2011. Siberian tiger's recent population bottleneck in the Russian Far East revealed by microsatellite markers. *Mammalian Biology*, 76:722-726.
- Alda, F., Ruiz-López, M. J., García, F. J., Gompper, M. E., Eggert, L. S., García, J. T. 2013. Genetic evidence for multiple introductions events of raccoons (*Procyon lotor*) in Spain. *Biological invasions*, 15:687-698.
- Allendorf, F. W. y Luikart, G. 2007. Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing. UK. 642 p.
- Almeida, F. C., Maroja, L. S., Moreira, M. A. M., Seuánez, H. N. and Cerqueira, R. 2005. Population structure and genetic variability of mainland and insular populations of the Neotropical water rat, *Nectomys squamipes* (Rodentia, Sigmodontinae). *Genetics and Molecular Biology*, 28:693-699.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., De Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R. & Young, I. G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290:457-465.
- Arias, M. C., Brito, R. T., Francisco, F., Moretto, G., De Oliveira, F. F., Silvestre, D., Sheppard, W. 2006. Molecular markers as tool for population and evolutionary studies of stingless bees. *Apidologie*, 37:259-274.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A., Saunders, N. C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. *Annual Reviews of Ecology and Systematic*, 18:489-522.
- Avise, J. C. 2000. Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. United States of America. 447 p.
- Avise, J. C. 2004. Molecular markers, natural history and evolution. Second edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. United States of America. 684 p.
- Balkenhol, N., Köhnemann, B. A., Gramlich, S., Michler, F. U. 2011. Genetic structure of a raccoon population (*Procyon lotor*) in Müritz National Park-a result of landscape resistance or space-use behavior?. *Beiträge zur Jagd & Wildforschung, Bd*, 36:531-537.
- Balloux, F. y Lugon-Moulin, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11:155-165.
- Bandelt, H. J., Forster, P., y Röhl, A. 1999. Median-Joining Networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16:37-48.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Arrufaste, N. & Bonhomme, F. 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000. Université de Montpellier II, Montpellier, France.



- Bhargava, A. y Fuentes, F. F. 2010. Mutational dynamics of microsatellites. *Molecular Biotechnology*, 44:250-266.
- Blouin, M. S. 2003. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 18:503-511.
- Bradley, R. D. y Baker, R. J. 2001. A test of the genetic species concept: cytochrome *b* sequences and mammals. *Journal of Mammalogy*, 82:960-973.
- Brown, W. M. 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA. In: Nei, M. and Koehn, R. K. (eds.). *Evolution of genes and proteins*. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts. United States of America. pp. 62-88.
- Busch, J. D., Waser, P. M., and DeWoody, A. 2007. Recent demographic bottlenecks are not accompanied by a genetic signature in banner-tailed kangaroo rats (*Dipodomys spectabilis*). *Molecular Ecology*, 16:2450-2462.
- Castañeda-Rico, S., León-Paniagua, L., Ruedas, L. A., y Vázquez-Domínguez, E. 2011. High genetic diversity and extreme differentiation in the two remaining populations of *Habromys simulatus*. *Journal of Mammalogy*, 92:963-973.
- Copa-Alvaro, M. E. 2007. Efectos de los huracanes Emily y Wilma en la abundancia de mamíferos medianos en la Isla Cozumel, México. Tesis Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Cornuet, J. M. y Luikart, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144:2001-2014.
- Cuarón, A. D. 2009. Cozumel. In: Gillespie, R. y Clague, D. A. (eds.). *Encyclopedia of Islands*. University of California Press. Berkeley, California. Pp. 203-206.
- Cuarón, A. D., Martínez-Morales, M. A., McFadenn, K. W., Valenzuela, D., y Gomper, M. E. 2004. The status of dwarf carnivores on Cozumel Island, Mexico. *Biodiversity and Conservation*, 13:317-331.
- Cuarón, A.D., de Grammont, P.C., Vázquez-Domínguez, E., Valenzuela-Galván, D., García-Vasco, D., Reid, F. & Helgen, K. 2008. *Procyon pygmaeus*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 24 November 2012.
- Cuarón, A. D., Valenzuela-Galván, D., García-Vasco, D., Copa, M. E., Bautista, S., Mena, H., Martínez-Godínez, D., González-Baca, C., Bojórquez-Tapia, L. A., Barraza, L., De Grammont, P.C., Galindo-Maldonado, F., Martínez-Morales, M. A., Vázquez-Domínguez, E., Andresen, E., Benítez-Malvido, J., Pérez-Salicrup, D., McFadden, K. W., Gompper, M. E. 2009. Conservation of the endemic dwarf carnivores of Cozumel Island, Mexico. *Small Carnivore Conservation*, 41:15-21.
- Cullingham, C. I., Kyle, C. J. y White, B. N. 2006. Isolation, characterization and multiplex genotyping of raccoon tetranucleotide microsatellite loci. *Molecular Ecology Notes*, 6:1030-1032.
- Cullingham, C. I., Kyle, C. J., Pond, B. A., Rees, E. E. y White, B. N. 2009. Differential permeability of rivers to raccoon gene flow corresponds to rabies incidence in Ontario, Canada. *Molecular Ecology*, 18:43-53.
- De Villa-Meza, A., Ávila-Flores, R., Cuarón, A., Valenzuela-Galván, D. 2011. *Procyon pygmaeus* (Carnivora: Procyonidae). *Mammalian species*, 43:87-93.

- Dharmarajan, G., Beasley, J. C., Fike, J. A., y Rhodes Jr., O. E. 2009. Population genetic structure of raccoons (*Procyon lotor*) inhabiting a highly fragmented landscape. *Canadian Journal of Zoology*, 87:814-824.
- Do, C., Waples, R. S., Peel, D., Macbeth, G. M., Tillett, B. J., y Ovenden, J. R. 2013. N<sub>E</sub>ESTIMATOR v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (Ne) from genetic data. *Molecular Ecology Resources*. doi: 10.1111/1755-0998.12157
- Earl, D. A. y vonHold, B. M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4:359-361.
- Eldridge, M.D.B., Kinnear, J.E., Zenger, K.R., McKenzie, L.M., Spencer, P.B.S. 2004. Genetic diversity in remnant mainland and "pristine" island populations of three endemic Australian macropodids (Marsupialia): *Macropus eugenii*, *Lagorchestes hirsutus* and *Petrogale lateralis*. *Conservation Genetics*, 5:325-338.
- Ellegren, H. 2000. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics*, 16:551-558.
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews. Genetics*, 5:435-445.
- Espindola-Barrientos, S. R. 2013. Estructura y variabilidad genética de dos especies de roedores endémicos de la Isla Cozumel, Quintana Roo. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ecología. México. 121 p.
- Esposti, M. D., De Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Patarnello, T., Meyer, A. 1993. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1143:243-271.
- Evanno, G., Regnaut, S., y Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.
- Excoffier, L. G. y Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1:47-50.
- Excoffier, L., Smouse, P., y Quattro, J. 1992. Analysis of Molecular Variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131:479-491.
- Farias, I. P., Ortí, G., Sampaio, I., Schneider, H., Meyer, A. 2001. The cytochrome b as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *Journal of Molecular Evolution*, 53:89-103.
- Fike, J. A., Drauch, A. M., Beasley, J. C., Dharmarajan, G., y Rhodes Jr, O. E. 2007. Development of 14 multiplexed microsatellite loci for raccoons *Procyon lotor*. *Molecular Ecology Notes*, 7:525-527.
- Frankham, R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology*, 10:1500-1508.
- Frankham, R. 1997. Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity*, 78:311-327.
- Frankham, R. 1998. Inbreeding and extinction: Islands populations. *Conservation Biology*, 12:665-675.

- Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A. 2010. Introduction to Conservation Genetics. Second edition. Cambridge University Press. New York, United States of America.
- Fraser, E. J., Macdonald, D. W., Oliver, M. K., Pieltney, S., Lambin, X. 2013. Using population genetic structure of an invasive mammal to target control efforts-An example of the American mink in Scotland. *Biological Conservation*, 167:35-42.
- Freeman, S. y Herron, J. C. 2002. Análisis evolutivo. Prentice Hall. España. 703 p.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutation against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147:915-925.
- Fu, Y. X., y Li, W. H. 1993. Maximum likelihood estimation of population parameters. *Genetics*, 134:1261-1270.
- Fuentes-Montemayor, E., Cuarón, A. D., Vázquez-Domínguez, E., Benítez-Malvido, J., Valenzuela-Galván, D., y Andresen, E. 2009. Living on the edge: roads and edge effects on small mammal populations. *Journal of Animal Ecology*, 78:857-865.
- Futuyma, D. J. 2009. Evolution. 2nd edition. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts. United States of America.
- Gaggiotti, O. E., Lange, O., Rassmann, K., y Gliddons, C. 1999. A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology*, 8:1513-1520.
- García-Aguilar, A. 2010. Evaluación de los cambios en la estructura genética de *Oryzomys couesi cozumelae* posterior a los huracanes Emily y Wilma en Cozumel, Quintana Roo. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. México. 97 p.
- García-Vasco, D. 2005. Distribución, abundancia y aspectos poblacionales del mapache enano (*Procyon pygmaeus*), un carnívoro insular endémico. B.S. Tesis de licenciatura. Universidad Veracruzana, Xalapa, México.
- Garza, J. C. y Williamson, E. G. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10:305-318.
- Girman, D. J., Mills, M. G. L., Geffen, E., Wayne, R. K. 1997. A molecular genetic analysis of social structure, dispersal, and interpack relationships of the African wild dog (*Lycaon pictus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 40:187-198.
- Gompper, M. E. 1995. *Nasua narica*. *Mammalian species*, 487:1-10.
- Gompper, M. E., Gittleman, J. L., y Wayne, R. K. 1998. Dispersal, philopatry, and genetic relatedness in a social carnivore: comparing males and females. *Molecular Ecology*, 7:157-163.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (v1.2): A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86:485-486. Última versión febrero 2002 (v2.9.3.2).
- Goudet, J., Raymond, M., de Meeüs, T., y Rousset, F. 1996. Testing differentiation in diploid populations. *Genetics*, 144:1933-1940.
- Grant, P. (Ed.). 1998. Evolution on islands. Oxford University Press. UK.
- Griffiths, A. J. F., Gelbart, W. M., Miller, J. H., Lewontin, R. C. 2004. Genética moderna. McGraw Hill Interamericana. España. 676 pp.

- Guo, S. W. y Thompson, E. A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weingberg Proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48:361-372.
- Hamilton, M. B. 2009. Population genetics. Wiley-Blackwell. United Kingdom.
- 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.
- Harpending, H. C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 6:591-600.
- Hartl, D. L. y Clark, A. G. 1997. Principles of population genetics. Sinauer Associates. United States of America. 682 p.
- Hedrick, P.W. 2001. Conservation genetics: where are we now? *Trends in Ecology & Evolution*, 16:629-636.
- Hedrick, P. W. 2011. Genetics of populations. 4<sup>th</sup> edition. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury, Massachusetts. United States of America.
- Helgen, K. M. y Wilson, D. E. 2003. Taxonomic status and conservation relevance of the raccoons (*Procyon* spp.) of the West Indies. *Journal of Zoology (London)*, 259:69-76.
- Helgen, K. M., Maldonado, J. E., Wilson, D. E., y Buckner, S. D. 2008. Molecular confirmation of the origin and invasive status of West Indian raccoons. *Journal of Mammalogy*, 89:282-291.
- Hill, W. G. 1981. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genetics Research*, 38:209-216.
- Hinten, G., Harris, F., Rossetto, M., y Braverstock, P. R. 2003. Genetic variation and island biogeography: microsatellite and mitochondrial DNA variation in island populations of the Australian bush rat, *Rattus fuscipes greyii*. *Conservation Genetics*, 4:759-778.
- Hirsch, B. T. y Maldonado, J. E. 2011. Familiarity breeds progeny: sociality increases reproductive success in adult male ring-tailed coatis (*Nasua nasua*). *Molecular Ecology*, 20:409-419.
- Honeycutt, R. L., Nedbal, M. A., Adkins, R. M., Janecek, L. L. 1995. Mammalian mitochondrial DNA evolution: a comparison of the cytochrome b and cytochrome c oxidase II genes. *Journal of Molecular Evolution*, 40:260-272.
- Hosoda, T., Suzuki, H., Iwasa, M. A., Hayashida, M., Watanabe, S., Tatara, M. y Tsuchiya, K. 1999. Genetic relationships within and between the Japanese marten *Martes melampus* and the sable *M. zibellina*, based on variation of mitochondrial DNA and nuclear ribosomal DNA. *Mammal Study*, 24:25-33.
- Howell, N. 1989. Evolutionary conservation of protein regions in the protonmotive cytochrome b and their possible roles in redox catalysis. *Journal of Molecular Evolution*, 29:157-169.
- Iguchi, K. y Nishida, M. 2000. Genetic biogeography among insular populations of the amphidromous fish *Plecoglossus altivelis* assessed from mitochondrial DNA analysis. *Conservation Genetics*, 1:147-156.
- Inoue, T., Kaneko, Y., Yamazaki, K., Anezaki, T., Yachimori, S., Ochiai, K., Lin, L-K., Pei, K. J-C., Chen, Y-J., Chang, S-W., Masuda, R. 2012. Genetic population structure of the masked palm civet *Paguma larvata*, (Carnivora: Viverridae) in Japan, revealed from analysis of newly identified compound microsatellites. *Conservation Genetics*, 13:1095-1107.

- Irwin, D. M., Kocher, T. D., Wilson, A. C. 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32:128-144.
- Jaenike, J. R. 1973. A steady state model of genetic polymorphism on islands. *The American Naturalist*, 107:793-795.
- Johns, G. C. y Avise, J. C. 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Molecular Biology and Evolution*, 15:1481-1490.
- Kalinowski, S. T., Wagner, A., y Taper, M. L. 2006. ML-RELATE. A computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*, 6:576-579.
- Kamada, S., Moteki, S., Baba, M., Ochiai, K., y Masuda, R. 2012. Genetic distinctness and variation in the Tsushima Islands population of the Japanese marten, *Martes melampus* (Carnivora: Mustelidae), revealed by microsatellite analysis. *Zoological Science*, 29:827-833.
- Kimura, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, 217:624-626.
- Koepfli, K. P. y Wayne, R. K. 1998. Phylogenetic relationships of otters (Carnivora: Mustelidae) based on mitochondrial cytochrome b sequences. *Journal of Zoology (London)*, 246:401-416.
- Koepfli, K. P., Gompfer, M. E., Eizirik, E., Ho, C. C., Linden, L., Maldonado, J. E., Wayne, R. K. 2007. Phylogeny of the Procyonidae (Mammalia: Carnivora): Molecules, morphology and the Great American Interchange. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43:1076-1095.
- Kurose, N., Kaneko, Y., Abramov, A. V., Siriarronrat, B., y Masuda, R. 2001. Low genetic diversity in Japanese populations of the Eurasian badger *Meles meles* (Mustelidae, Carnivora) revealed by mitochondrial cytochrome *b* gene sequences. *Zoological Science*, 18:1145-1151.
- Lara-Lara, J. R., et al. 2008. Los ecosistemas costeros, insulares y epicontinentales. En: Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México. pp. 109-134.
- Lau, C. H., Drinkwater, R. D., Yusoff, K., Tan, S. G., Hetzel, D. J. S., y Barker, J. S. F. 1998. Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): mitochondrial DNA D-loop and cytochrome b sequence variation. *Animal Genetics*, 29:253-264.
- Librado, P. y Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25:1451-1452.
- Luikart, G., y Cornuet, J.M. 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, 12:228-237.
- Luikart, G., Allendorf, F. W., Cornuet, J. M., y Sherwin, W. B. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *The American Genetics Association*, 89:238-247.
- MacDonald, D. 2008. Glossary of terms in population and molecular genetic, systematic, etc. En: <http://www.uwyo.edu/dbmcd/molmark/mcdgloss.html#GeneticMarker> (Fecha de consulta: 09/04/2013).
- Maldonado, J. E., Orta-Dávila, F., Stewart, B. S., Geffen, E., y Wayne, R. K. 1995. Intraspecific genetic differentiation in California sea lions (*Zalophus californicus*) from Southern California and the Gulf of California. *Marine Mammal Science*, 11:46-58.

- Martínez-Morales, M. A., Cuarón, A. D. 1999. *Boa constrictor*, an introduced predator threatening the endemic fauna on Cozumel Island, Mexico. *Biodiversity and Conservation*, 8:957-963.
- Masuda, R., López, J. V., Slattery, J. P., Yuhki, N., O'Brien, S. J. 1996. Molecular phylogeny of mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA sequences in the Felidae: ocelot and domestic cat lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 3:351-365.
- Matschiner, M. y Salzburger, W. 2009. TANDEM: integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows. *Bioinformatics*, 25:1982-1983.
- McFadden, K. W. 2004. The ecology, evolution and natural history of the endangered carnivores of Cozumel Island, Mexico. Columbia University (PhD thesis), New York, U.S.A.
- McFadden, K. W., Gompper, M. E., Valenzuela, D. G., y Morales, J. C. 2008. Evolutionary history of the critically endangered Cozumel dwarf carnivores inferred from mitochondrial DNA analyses. *Journal of Zoology (London)*, 276:176-186.
- McNeely, J. A., Miller, K. R., Reid, W., Mittermeier, R., Werner, T. B. 1990. Conserving the World's Biological Diversity. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN), World Resources Institute, Conservation International, World Wildlife Fund (WWF), World Bank. Washington DC, United States of America.
- Mendoza-Martínez, A. 2011. Variabilidad y estructura genética del murciélago zapotero *Artibeus jamaicensis* en tres tipos de vegetación de la isla Cozumel. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 68 p.
- Nabholz, B., Glémin, S., y Galtier, N. 2008. Strong variations of mitochondrial mutation rate across mammals-the longevity hypothesis. *Molecular Biology and Evolution*, 25:120-130.
- Navarro, D. y Suárez, M. 1989. A survey of the pygmy raccoon (*Procyon pygmaeus*) of Cozumel, Mexico. *Mammalia*, 53:458-461.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106:283-292.
- Nei, M. y Roychoudhury, A. K. 1974. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, 76:379-390.
- Nei, M. y Miller, J. C. 1990. A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. *Genetics*, 125:873-879.
- Nei, M. y Li, W-H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76:5269-5273.
- Nielsen, R. 2001. Statistical tests of selective neutrality in the age of genomics. *Heredity*, 86:641-647.
- Oliviera, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., Carneiro, M. L. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29:294-307.
- Paetkau, D., Shields, G. F. y Strobeck, C. 1998. Gene flow between insular, coastal and interior populations of brown bears in Alaska. *Molecular Ecology*, 7:1283-1292.
- Peakall, R. y Smouse, P. E. 2012. GenAlex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28:2537-2539.
- Peery, M. Z., Kirby, R., Reid, B. N., Stoelting, R., Doucet-Béer, E., Robinson, S., Vásquez-Carrillo, C., Pauli, J. N. and Palsboll, P. J. 2012. Reliability of genetic bottleneck tests for detecting recent population declines. *Molecular Ecology*, 21: 3403-3418.

- Pons, J. M., Volobouev, V., Ducroz, J. F., Tillier, A. y Reudet, D. 1999. Is the Guadeloupean raccoon (*Procyon minor*) really an endemic species? New insights from molecular and chromosomal analyses. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 37:101-108.
- Prange, S., Gehrt, S. D., Wiggers, E. P. 2003. Demographic factors contributing to high raccoon densities in urban landscapes. *Journal of Wildlife Management*, 67:324-333.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., y Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155:945-959.
- Ramos-Onsins, S. E. y Rozas, J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19:2092-2100.
- Raymond, M. y Rousset, F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49:1283-1286.
- Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43:223-225.
- Rogers, A. R. y Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9:552-569.
- Root, J. J., Puskas, R. B., Fischer, J. W., Swope, C. B., Neubaum, M. A., Reeder, S. A., y Piaggio, A. J. 2009. Landscape genetics of raccoons (*Procyon lotor*) associated with ridges and valleys of Pennsylvania: implications for oral rabies vaccination programs. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9:583-588.
- Rousset, F. 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8:103-106.
- Roy-Nielsen, C. L. y Nielsen, C. K. 2007. Multiple paternity and relatedness in southern Illinois raccoons (*Procyon lotor*). *Journal of Mammalogy*, 88:441-447.
- Saitou, N. y Nei, M. 1987. The Neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4:406-425.
- Samudio, R., Kays, R., Cuarón, A.D., Pino, J.L. & Helgen, K. 2008. *Nasua narica*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 24 November 2012.
- Sánchez Garibay, E., Silva-Caballero, A., Del Real-Monroy, M., Lance, S. L., Valenzuela-Galván, D. y Ortega, J. 2012. Development of 24 microsatellite markers for the White nosed coati (*Nasua narica*) using 454 sequencing. *Conservation Genetics Resources*. DOI 10.1007/s12686-012-96176.
- Santonastaso, T. T., Dubach, J., Hauver, S. A., Graser III, W. H., y Gehrt, S. D. 2012. Microsatellite analysis of raccoon (*Procyon lotor*) population structure across an extensive metropolitan landscape. *Journal of Mammalogy*, 93:447-455.
- Schlötterer, C. and Harr, B. 2001. Microsatellite instability. Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group. www.els.net
- Selkoe, K. A., y Toonen, R. J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters*, 9:615-629.
- Semarnat. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y

especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. 30 de diciembre de 2010.

- Siripunkaw, C., Kongrit, C., Faries, K. M., Monello, R. J., Gompper, M. E., y Eggert, L. S. 2008. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the raccoon (*Procyon lotor*). *Molecular Ecology Resources*, 8:199-201.
- Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Reviews of Ecology and Systematic*, 16:393-430.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139:457-462.
- Slatkin, M. 2008. Linkage disequilibrium-understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Reviews, Genetics* 9:477-485.
- Sikes, R. S., Gannon, W. L. y The Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists. 2011. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of mammalogy*, 92:235-253.
- Spear, S. F., Peterson, C. R., Matocq, M. D., Storfer, A. 2005. Landscape genetics of the blotched tiger salamander (*Ambystoma tigrinum melanostictum*). *Molecular Ecology*, 14:2553-2564.
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 15:199-203.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105:437-460.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123:585-595.
- Takahata, N. y Nei, M. 1985. Gene genealogy and variance of interpopulational nucleotide differences. *Genetics*, 110:325-344.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. y Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28:2731-2739.
- Téllez, O., Cabrera, E. F., Linares, E., Bye, R. 1989. Las plantas de Cozumel: guía botánico-turística de la Isla de Cozumel, Quintana Roo. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.
- Tsuchiya-Jerep, M. T. N. 2009. Phylogeography, demographic history and molecular diversity of two Neotropical species of family Procyonidae (Mammalia, Carnivora): *Nasua nasua* and *Procyon cancrivorus*. Pontificia Universidade Católica Do Rio Grande Do Sul (Master's thesis). Porto Alegre, Brazil.
- Tomasik, E. y Cook, J. A. 2005. Mitochondrial phylogeography and conservation genetics of wolverine (*Gulo gulo*) of northwestern North America. *Journal of Mammalogy*, 86:386-396.
- Valenzuela, D. 1998. Natural history of the white-nosed coati, *Nasua narica*, in a tropical dry forest of western Mexico. *Revista Mexicana de Mastozoología*, 3:26-44.
- Valenzuela, D. y Macdonald, D. W. 2002. Home-range use by white-nosed coatis (*Nasua narica*): limited water and test of the resource dispersion hypothesis. *Journal of Zoology (London)*, 258:247-256.



- Vales, G., Rodríguez, F., de la Maza, R., Gómez, M., Bretón, C. 2000. Áreas naturales protegidas de México. Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAP. México.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M. y Shipley, P. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4:535-538.
- Vázquez-Domínguez, E., Ceballos, G. y Cruzado, J. 2004. Extirpation of an insular subspecies by a single introduced cat: the case of the endemic deer mouse *Peromyscus guardia* on Estanque Island, Mexico. *Oryx*, 38:347-350.
- Vázquez-Domínguez, E. y Vega, R. 2006. ¿Dónde estamos y hacia dónde vamos en el conocimiento genético de los mamíferos mexicanos? En: E. Vázquez-Domínguez y D. J. Hafner (eds.). Genética y mamíferos mexicanos: presente y futuro. New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin No.32. Albuquerque, New Mexico, USA. Pp. 67-73.
- Vázquez-Domínguez, E. 2007. Filogeografía y vertebrados. En: Eguiarte, L. E., Souza, V. y Aguirre, X. (comps.). Ecología molecular. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pp. 441-466.
- Vázquez-Domínguez, E., Suárez-Atilano, M., Booth, W., González-Baca, C., Cuarón, A. D. 2012. Genetic evidence of a recent successful colonization of introduced species on islands: *Boa constrictor imperator* on Cozumel Island. *Biological Invasions*, DOI 10.1007/s10530-012-0217-x
- Vega, R., Vázquez-Domínguez, E., Mejía-Puente, A., Cuarón, A. D. 2007. Unexpected high levels of genetic variability and the population structure of an island endemic rodent (*Oryzomys couesi cozumelae*). *Biological Conservation*, 137:210-222.
- Wahlund, S. 1928. Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen von Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas*, 11:65-106.
- Wakeley, J. 1996. The variance of pairwise nucleotide differences in two populations with migration. *Theoretical Population Biology*, 49:39-57.
- Wang, J. 2004. Application of the One-Migrant-Per-Generation rule to conservation and management. *Conservation Biology*, 2:332-343.
- Waples, R. S. 2002. Definition and estimation of effective population size in the conservation of endangered species. In: Beissinger, S. R., and McCullough, D. R. (eds.). Population viability analysis. University of Chicago Press, Chicago. Pp. 147-168.
- Waples, R. S. y Do, C. 2010. Linkage disequilibrium estimates of contemporary  $N_e$  using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evolutionary Applications*, 3:244-262.
- Wayne, R. K., George, S., B., Gilbert, D., Collins, P. W., Kovach, S. D., Girman, D., Lehman, N. 1991. A morphologic and genetic study of the island fox, *Urocyon littoralis*. *Evolution*, 45:1849-1868.
- Weir, B. S. y Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38:1358-1370.
- Whittaker, R. J. y Fernández-Palacios, J. M. 2007. Island Biogeography: Ecology, Evolution and Conservation. 2<sup>nd</sup> edition. Oxford University Press. UK. 401 p.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15:323-354.

Yang, Z. y Rannala, B. 2012. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Reviews, Genetics*, 13:303-314.

## ANEXOS

### Anexo 1. Fórmula para calcular la distancia genética de Nei ( $D_N$ ; Nei 1972)

La distancia genética se define como el valor inverso de la similitud genética mediante la siguiente fórmula:

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

donde  $I_N$  es el índice de similitud de Nei (1972) por locus, definido por:

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

en la cual  $P_{ix}$  se refiere a frecuencia del alelo "i" en la población "x", y  $P_{iy}$  se refiere a la frecuencia del alelo "i" en la población "y"; "m" es el número total de alelos presentes en el locus (Hedrick 2011). Se estimaron los valores de distancia genética con dicha fórmula con GenAlex v6.5.

**Anexo 2.** Inventario de muestras utilizadas en el presente estudio. Para algunas muestras no se logró la amplificación de ambos marcadores moleculares (gen *cyt b* y microsatélites), mismas que se especifican en los campos correspondientes (Si, No).

#	ID	Especie	Sexo	Edad	Fecha de colecta	Localidad	Estado	Colector	<i>cyt b</i>	Microsatélites
1	57	<i>Nasua nelsoni</i>	M	∅	20/05/2006	Cozumel, CAPA, Eje 8	Quintana Roo	∅	Si	Si
2	58	<i>Nasua nelsoni</i>	M	∅	20/05/2006	Cozumel, CAPA, Eje 8	Quintana Roo	∅	Si	Si
3	69	<i>Nasua nelsoni</i>	M	∅	27/07/2006	Cozumel, CAPA, Eje 8	Quintana Roo	∅	Si	Si
4	70	<i>Nasua nelsoni</i>	M	∅	27/07/2006	Cozumel, CAPA, Eje 8	Quintana Roo	∅	Si	Si
5	71	<i>Nasua nelsoni</i>	M	∅	27/07/2006	Cozumel, CAPA, Eje 8	Quintana Roo	∅	Si	Si
6	72	<i>Nasua nelsoni</i>	H	∅	27/07/2006	Cozumel, CAPA, Eje 8	Quintana Roo	∅	Si	Si
7	73	<i>Nasua nelsoni</i>	H	∅	29/07/2006	Cozumel, CAPA, Eje 8	Quintana Roo	∅	Si	Si
8	74	<i>Nasua nelsoni</i>	H	∅	29/07/2006	Cozumel, CAPA, Eje 8	Quintana Roo	∅	Si	Si
9	76	<i>Nasua nelsoni</i>	M	∅	30/07/2006	Cozumel, CAPA, Eje 8	Quintana Roo	∅	Si	Si
10	77	<i>Nasua nelsoni</i>	H	∅	30/07/2006	Cozumel, CAPA, Eje 8	Quintana Roo	∅	Si	Si
11	78	<i>Nasua nelsoni</i>	M	∅	30/07/2006	Cozumel, CAPA, Eje 8	Quintana Roo	∅	Si	Si
12	79	<i>Nasua nelsoni</i>	M	∅	30/07/2006	Cozumel, CAPA, Eje 8	Quintana Roo	∅	Si	Si
13	80	<i>Nasua nelsoni</i>	M	∅	30/07/2006	Cozumel, CAPA, Eje 8	Quintana Roo	∅	Si	Si
14	81	<i>Nasua nelsoni</i>	H	∅	30/07/2006	Cozumel, CAPA, Eje 8	Quintana Roo	∅	Si	Si
15	82	<i>Nasua nelsoni</i>	H	∅	30/07/2006	Cozumel, CAPA, Eje 8	Quintana Roo	∅	Si	Si
16	84	<i>Nasua nelsoni</i>	H	∅	31/07/2006	Cozumel, CAPA, Eje 8	Quintana Roo	∅	Si	Si
17	95	<i>Nasua nelsoni</i>	M	∅	07/08/2006	Cozumel, Isla de la Pasión	Quintana Roo	∅	No	Si
18	96	<i>Nasua nelsoni</i>	M	∅	26/03/2006	Cozumel, CAPA, Eje 8	Quintana Roo	∅	Si	Si
19	Ne1	<i>Nasua nelsoni</i>	M	Adulto	02/07/2012	Cozumel, CAPA, Eje 6	Quintana Roo	AFM	Si	Si
20	Ne2	<i>Nasua nelsoni</i>	M	Adulto	02/07/2012	Cozumel, CAPA, Eje 6	Quintana Roo	AFM	Si	Si
21	Ne3	<i>Nasua nelsoni</i>	H	Adulto	03/07/2012	Cozumel, CAPA, Eje 6	Quintana Roo	AFM	Si	Si
22	Ne4	<i>Nasua nelsoni</i>	M	Adulto	04/07/2012	Cozumel, CAPA, Eje 6	Quintana Roo	AFM	Si	Si
23	Ne5	<i>Nasua nelsoni</i>	M	Adulto	04/07/2012	Cozumel, CAPA, Eje 6	Quintana Roo	AFM	Si	Si
24	Ne6	<i>Nasua nelsoni</i>	M	Adulto	05/07/2012	Cozumel, CAPA, Eje 6	Quintana Roo	AFM	Si	Si
25	Ne7	<i>Nasua nelsoni</i>	M	Adulto	05/07/2012	Cozumel, Parque Ecológico Punta Sur	Quintana Roo	AFM	Si	Si

26	Ne8	<i>Nasua nelsoni</i>	M	Adulto	06/07/2012	Cozumel, Parque Ecológico Punta Sur	Quintana Roo	AFM	Si	Si
27	Ne9	<i>Nasua nelsoni</i>	M	Adulto	06/07/2012	Cozumel, Parque Ecológico Punta Sur	Quintana Roo	AFM	Si	Si
28	Ne10	<i>Nasua nelsoni</i>	M	Adulto	07/07/2012	Cozumel, CAPA, Eje 6	Quintana Roo	AFM	Si	Si
29	Ne11	<i>Nasua nelsoni</i>	M	Adulto	08/07/2012	Cozumel, CAPA, Eje 6	Quintana Roo	AFM	Si	Si
30	Ne12	<i>Nasua nelsoni</i>	M	Adulto	08/07/2012	Cozumel, CAPA, Eje 6	Quintana Roo	AFM	Si	Si
31	Ne13	<i>Nasua nelsoni</i>	M	Cría	09/07/2012	Cozumel, CAPA, Eje 6	Quintana Roo	AFM	Si	Si
32	Nna08	<i>Nasua narica</i>	H	∅	27/02/2001	Caballerizas, Cuixmala	Jalisco	DVG	Si	N/A
33	Nna09	<i>Nasua narica</i>	M	Juvenil	27/02/2001	Caballerizas, Cuixmala	Jalisco	DVG	Si	N/A
34	Nna11	<i>Nasua narica</i>	H	Juvenil	28/02/2001	Canal, Cuixmala	Jalisco	DVG	Si	N/A
35	Nna14	<i>Nasua narica</i>	H	Adulto	28/02/2001	Canal, Cuixmala	Jalisco	DVG	Si	N/A
36	Nna20	<i>Nasua narica</i>	M	Cría	28/02/2001	Cuixmala	Jalisco	DVG	Si	N/A
37	Nna28	<i>Nasua narica</i>	H	∅	17/02/2002	Mojotera, Cuixmala	Jalisco	DVG	Si	N/A
38	Nna37	<i>Nasua narica</i>	M	Cría	13/02/2002	Cuixmala	Jalisco	DVG	Si	N/A
39	Nna43	<i>Nasua narica</i>	M	∅	19/05/2008	Jojutla	Morelos	DVG	Si	N/A
40	Nna51	<i>Nasua narica</i>	H	Adulto	16/02/2002	Cuixmala	Jalisco	DVG	Si	N/A
41	Nna52	<i>Nasua narica</i>	H	∅	14/02/2002	Caballerizas, Cuixmala	Jalisco	DVG	Si	N/A
42	Nna53	<i>Nasua narica</i>	H	∅	13/04/2009	Quilamula	Morelos	DVG	Si	N/A
43	Nna47	<i>Nasua narica</i>	H	∅	21/07/2011	Tepoztlán	Morelos	DVG	Si	N/A
44	Nna48	<i>Nasua narica</i>	M	∅	21/07/2011	Tepoztlán	Morelos	DVG	Si	N/A
45	Nna49	<i>Nasua narica</i>	M	∅	21/07/2011	Tepoztlán	Morelos	DVG	Si	N/A
46	Nna50	<i>Nasua narica</i>	H	∅	21/07/2011	Tepoztlán	Morelos	DVG	Si	N/A
47	Nna54	<i>Nasua narica</i>	∅	Juvenil	13/04/2009	Quilamula	Morelos	DVG	Si	N/A
48	DVG34	<i>Nasua narica</i>	H	∅	21/07/2011	Tepoztlán	Morelos	DVG	Si	N/A
49	DVG35	<i>Nasua narica</i>	M	∅	21/07/2011	Tepoztlán	Morelos	DVG	Si	N/A
50	132	<i>Procyon pygmaeus</i>	M	∅	14/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
51	170	<i>Procyon pygmaeus</i>	M	∅	23/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
52	141	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	17/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
53	129	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	14/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
54	154	<i>Procyon pygmaeus</i>	M	∅	20/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si

55	140	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	17/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
56	137	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	16/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
57	171	<i>Procyon pygmaeus</i>	M	∅	24/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
58	130	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	14/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
59	180	<i>Procyon pygmaeus</i>	M	∅	28/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
60	181	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	28/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
61	163	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	22/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
62	167	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	23/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
63	164	<i>Procyon pygmaeus</i>	M	∅	22/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
64	135	<i>Procyon pygmaeus</i>	M	∅	15/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
65	142	<i>Procyon pygmaeus</i>	M	∅	18/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
66	127	<i>Procyon pygmaeus</i>	M	∅	13/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	No	Si
67	160	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	22/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
68	145	<i>Procyon pygmaeus</i>	M	∅	18/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
69	157	<i>Procyon pygmaeus</i>	M	∅	21/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
70	184-185	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	25/03/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
71	S/id	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	25/03/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
72	181-182	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	18/03/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
73	176	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	27/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
74	205-206	<i>Procyon pygmaeus</i>	M	∅	15/03/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
75	193-196	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	18/03/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
76	207-208	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	17/03/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	No	Si
77	194-195	<i>Procyon pygmaeus</i>	∅	∅	17/03/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
78	209-210	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	17/03/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
79	280-281	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	14/03/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
80	128	<i>Procyon pygmaeus</i>	M	∅	13/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
81	159	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	21/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	No
82	131	<i>Procyon pygmaeus</i>	M	∅	14/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
83	172	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	24/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si

84	133	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	15/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
85	155	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	20/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	No	Si
86	158	<i>Procyon pygmaeus</i>	M	∅	21/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	Si	Si
87	138	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	15/02/2003	Club de Golf Cozumel Country Club	Quintana Roo	∅	No	Si
88	Pyg1	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	05/07/2012	Cozumel, Parque Ecológico Punta Sur	Quintana Roo	AFM	Si	Si
89	Pyg2	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	05/07/2012	Cozumel, Parque Ecológico Punta Sur	Quintana Roo	AFM	Si	Si
90	Pyg3	<i>Procyon lotor</i>	H	∅	07/07/2012	Cozumel, Parque Ecológico Punta Sur	Quintana Roo	AFM	Si	Si
91	Pyg4	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	07/07/2012	Cozumel, Parque Ecológico Punta Sur	Quintana Roo	AFM	Si	Si
92	Pyg5	<i>Procyon pygmaeus</i>	M	∅	07/07/2012	Cozumel, Parque Ecológico Punta Sur	Quintana Roo	AFM	Si	Si
93	Pyg6	<i>Procyon pygmaeus</i>	M	∅	07/07/2012	Cozumel, Parque Ecológico Punta Sur	Quintana Roo	AFM	Si	Si
94	Pyg7	<i>Procyon lotor</i>	M	∅	08/07/2012	Cozumel, Parque Ecológico Punta Sur	Quintana Roo	AFM	Si	Si
95	Pyg8	<i>Procyon pygmaeus</i>	∅	∅	09/07/2012	Cozumel, Parque Ecológico Punta Sur	Quintana Roo	AFM	Si	Si
96	Pyg9	<i>Procyon pygmaeus</i>	H	∅	09/07/2012	Cozumel, Parque Ecológico Punta Sur	Quintana Roo	AFM	Si	Si
97	Pl01	<i>Procyon lotor</i>	M	∅	16/02/2002	Mojotera, Cuixmala	Jalisco	DVG	Si	N/A
98	Pl02	<i>Procyon lotor</i>	H	Adulto	13/02/2002	Mojotera, Cuixmala	Jalisco	DVG	Si	N/A
99	Pl05	<i>Procyon lotor</i>	M	Adulto	16/02/2002	Cuixmala	Jalisco	DVG	Si	N/A
100	Pl06	<i>Procyon lotor</i>	H	∅	13/02/2002	Mojotera, Cuixmala	Jalisco	DVG	Si	N/A
101	Pl07	<i>Procyon lotor</i>	H	Juvenil	14/02/2002	Mojotera, Cuixmala	Jalisco	DVG	Si	N/A
102	Pl09	<i>Procyon lotor</i>	H	∅	25/08/2000	Cuixmala	Jalisco	DVG	Si	N/A
103	Pl010	<i>Procyon lotor</i>	M	∅	14/02/2002	Cuixmala	Jalisco	DVG	Si	N/A
104	Pl011	<i>Procyon lotor</i>	∅	∅	27/06/2007	La Tilapeña, Cuernavaca	Morelos	DVG	Si	N/A
105	Pl01	<i>Procyon lotor</i>	H	∅	27/06/2012	Playa del Carmen, Complejo hotelero Maya Koba	Quintana Roo	AFM	Si	N/A
106	Pl02	<i>Procyon lotor</i>	H	∅	27/06/2012	Playa del Carmen, Complejo hotelero Maya Koba	Quintana Roo	AFM	Si	N/A
107	Pl03	<i>Procyon lotor</i>	M	∅	27/06/2012	Playa del Carmen, Complejo hotelero Maya Koba	Quintana Roo	AFM	Si	N/A
108	Pl04	<i>Procyon lotor</i>	M	∅	28/06/2012	Playa del Carmen, Complejo hotelero Maya Koba	Quintana Roo	AFM	Si	N/A
109	Pl05	<i>Procyon lotor</i>	M	∅	28/06/2012	Playa del Carmen, Complejo hotelero Maya Koba	Quintana Roo	AFM	Si	N/A
110	Pl06	<i>Procyon lotor</i>	M	∅	28/06/2012	Playa del Carmen, Complejo hotelero Maya Koba	Quintana Roo	AFM	Si	N/A
111	Pl07	<i>Procyon lotor</i>	H	∅	28/06/2012	Playa del Carmen, Complejo hotelero Maya	Quintana Roo	AFM	Si	N/A

						Koba				
112	PTV1	<i>Procyon lotor</i>	∅	∅	∅	Puerto Vallarta	Jalisco	AC	Si	N/A
113	PTV2	<i>Procyon lotor</i>	∅	∅	∅	Puerto Vallarta	Jalisco	AC	Si	N/A
114	PTV3	<i>Procyon lotor</i>	∅	∅	∅	Puerto Vallarta	Jalisco	AC	Si	N/A
115	PTB1	<i>Procyon lotor</i>	∅	∅	∅	Colima	Colima	AC	Si	N/A
116	PTB2	<i>Procyon lotor</i>	∅	∅	∅	Colimao	Colima	AC	Si	N/A
117	PTB3	<i>Procyon lotor</i>	∅	∅	∅	Colimao	Colima	AC	Si	N/A

Sexo: H = hembra, M = macho; Colector: DVG = David Valenzuela Galván, AFM = Alejandro Flores Manzanero; AC = Alfredo Cuarón; ∅ = sin datos; N/A: No se Amplificó para el presente estudio.



### **Anexo 3. Extracción de ADN a partir de tejido animal fresco.**

#### **A) Extracción con el kit QuickGene DNA Tissue Kit S-Mini 80 (FUJIFILM Life Sciences ®).**

##### ***Protocolo***

1. Añadir en un tubo de 1.5 mL una solución que contenga: 180 µL de solución MDT (solución de lisis) y 20 µL de EDT (proteínasa). Agregar una muestra de tejido ( $\leq 20\text{mg}$ ) a la solución, de preferencia finamente cortado para acelerar el proceso de digestión.
2. Agitar con ayuda del vortex y dejar incubando a 55°C hasta que se degrade el tejido, lapso en el cual debe agitarse de manera periódica. Puede dejarse incubando toda la noche sin que se afecte la integridad del ADN (recomendado para tejidos no frescos o duros).
3. Centrifugar a 10,000 revs/min por 3 minutos a “temperatura ambiente” (la temperatura de la centrífuga puede variar) y rescatar el sobrenadante en un nuevo tubo de 1.5 mL.
4. Agregar 180 µL de solución LTD, agitar con el vortex e incubar a 70°C por 10 min. Posteriormente, añadir 240 µL de etanol (96%), vortexear brevemente y colocar unos segundos en el spin. Se ha obtenido el lisado.
5. Transferir el lisado a las columnas en el Mini 80, colocarlo en posición WASH (procurando que las columnas y cubetas de desecho se encuentren bien colocadas en los carriles) y realizar una primera presurización hasta que todo el líquido pase por la membrana de la columna.
6. Añadir 750 µL de WDB (solución de lavado) a la columna procurando no tocar la membrana y nuevamente presurizar hasta que pase todo el líquido por la membrana. Repetir este lavado dos veces más.
7. Colocar un nuevo tubo de 1.5 mL bajo la columna para recuperar el ADN de la membrana y adicionar de 50 a 100 µL de CDT (solución de elución) a la columna; esperar aproximadamente 2 minutos y presurizar nuevamente. El ADN puede ser utilizado inmediatamente para aplicaciones moleculares o almacenado a -20°C para usarse a futuro.

## **B) Extracción con el kit Zymo Research Genomic DNA™-Tissue MiniPrep D3050 (The Epigenetics Company).**

### ***Componentes del kit (50 preparaciones)***

Proteinase K & Storage Buffer\* 2x5mg, 2X Digestion Buffer 5 mL, Genomic Lysis Buffer 50 mL, DNA Pre-Wash Buffer 15 mL, g-DNA Wash Buffer 50 mL y DNA Elution Buffer 10 mL.

\*Previo a su uso se añaden 260 µL de Proteinase K Storage Buffer a cada tubo de Proteinase K (5 mg), obteniendo una concentración final de ~20 mg/mL.

### ***Material extra***

Centrífuga (*Multispeed Refrigerated Centrifuge* PK121R, ALC®).

### ***Protocolo***

1. Añadir en un tubo de 1.5 mL una solución que contenga: 95 µL de H<sub>2</sub>O, 95 µL de 2X Digestion Buffer y 10 µL de Proteinase K. Agregar una muestra de tejido (≤ 25mg) a la solución, de preferencia finamente cortado para acelerar el proceso de digestión.
2. Agitar con ayuda del vortex y dejar incubando a 55°C de 1 a 3 horas, lapso en el cual debe agitarse de manera periódica para “romper” el tejido. Puede dejarse incubando toda la noche sin que se afecte la integridad del ADN (recomendado para tejidos no frescos o duros).
3. Agregar 700 µL de Genomic Lysis Buffer al tubo y agitar exhaustivamente con el vortex. Posteriormente, centrifugar a 12,500 revoluciones durante un minuto (revs/min).
4. Transferir el sobrenadante a una Zymo-Spin™ IIC Column, y a su vez colocarla en un Collection Tube. Centrifugar a 12,500 revs por un minuto.
5. Añadir 200 µL de DNA Pre-Wash Buffer a la columna (Zymo-Spin™ IIC Column). Transferir ésta última a un nuevo tubo colector (Collection Tube) y centrifugar a 12,500 revs por un minuto.
6. Agregar 400 µL de g-DNA Wash Buffer a la columna, transferirla a un nuevo tubo colector y centrifugar a 12,500 revs por un minuto.
7. Como paso previo a la elución, se recomienda centrifugar nuevamente a 12,500 revs durante un minuto, sin adicionar reactivo alguno, con la finalidad de eliminar los residuos que pudieran quedar atrapados en la columna.
8. Finalmente, transferir la columna a un tubo de 1.5 mL en el cual se almacenará el ADN extraído. Agregar ≥50 µL de DNA Elution Buffer a la columna (aunque depende de la calidad del tejido para obtener buena concentración de ADN, la proporción de ejemplo es 200 µL por cada 25 mg de tejido) y dejar incubar de 2 a 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, centrifugar a 12,500 revs durante un minuto\* para obtener la elución de ADN. El ADN puede ser

utilizado inmediatamente para aplicaciones moleculares, o almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para usarse a futuro.

*\*Originalmente, el proveedor indica "máxima velocidad por 30 segundos". Sin embargo, éste dato depende de la marca de la centrífuga. En el presente trabajo, 14,000 revs por 30 segundos precipitaron la membrana de la columna, por lo cual se disminuyó la velocidad y se incrementó el tiempo.*

**Anexo 4.** Condiciones de PCR de los primers, optimizados para amplificar loci de microsatélites en *P. pygmaeus*. PCR Multiplex: N/A (No aplica), A (primers en grupo A), B (primers en grupo B).

<b>Locus</b>	<b>Fuente</b>	<b>Ta (°C)</b>	<b>Primer (µM)</b>	<b>MgCl<sub>2</sub> (mM)</b>	<b>dNTP's (mM)</b>	<b>PCR Multiplex</b>
PLO-M15	Cullingham <i>et al.</i> 2006	60	0.3	2	0.3	N/A
PLO2-117	Cullingham <i>et al.</i> 2006	60	0.3	2	0.3	N/A
PLO2-14	Cullingham <i>et al.</i> 2006	56	0.3	2	0.3	N/A
PLO3-71	Cullingham <i>et al.</i> 2006	56	0.3	3	0.3	N/A
PLOT-04	Fike <i>et al.</i> 2007	61	0.2	2	0.3	N/A
PLOT-09	Fike <i>et al.</i> 2007	64	0.3	3	0.3	N/A
PLM06	Siripunkaw <i>et al.</i> 2008	58	0.2	1.5	0.2	A
PLM09	Siripunkaw <i>et al.</i> 2008	58	0.2	1.5	0.2	N/A
PLM10	Siripunkaw <i>et al.</i> 2008	58	0.2	1.5	0.2	B
PLM13	Siripunkaw <i>et al.</i> 2008	58	0.2	2	0.2	N/A
PLM14	Siripunkaw <i>et al.</i> 2008	58	0.2	1.5	0.2	A
PLM17	Siripunkaw <i>et al.</i> 2008	58	0.2	1.5	0.2	B

**Anexo 5.** Condiciones de PCR multiplex para cuatro pares de primers en *P. pygmaeus*.

<b>Grupos multiplex</b>	<b>1</b>		<b>2</b>	
Par de Primers multiplex	<b>*PLM06</b>	<b>**PLM14</b>	<b>*PLM10</b>	<b>**PLM17</b>
Fluorescencia	<b>HEX</b>	<b>FAM</b>	<b>FAM</b>	<b>HEX</b>
Rango reportado de alelos (pb)	95-123	149-165	112-130	87-105
Condiciones PCR				
Concentración de MgCl <sub>2</sub>	<b>1.5 mM</b>		<b>1.5 mM</b>	
H <sub>2</sub> O	3.63 µL		3.63 µL	
MgCl <sub>2</sub>	0.21 µL		0.21 µL	
Buffer (10X)	0.7 µL		0.7 µL	
dNTP's (2mM)	0.7 µL		0.7 µL	
Primer F (10 µM)*	0.14 µL		0.14 µL	
Primer R (10 µM)*	0.14 µL		0.14 µL	
Primer F (10 µM)**	0.14 µL		0.14 µL	
Primer R (10 µM)**	0.14 µL		0.14 µL	
Taq	0.2 µL		0.2 µL	
ADN	1 µL		1 µL	
<b>Volumen final</b>	<b>7 µL</b>		<b>7 µL</b>	

## **Anexo 6. Lectura de alelos en los cromatogramas.**

Se tomó el criterio descrito por Mendoza-Martínez (2011), el cual indica considerar como alelo al pico más alto, siempre y cuando se encuentre en el rango reportado o cercano a él. Para distinguir homocigos (1 pico) de heterocigos (2 picos), se consideró el número de nucleótidos que conforman los motivos para hacer la separación entre alelos (por ejemplo, si se trata de un dinucleótido se consideran dos bases para definir el siguiente alelo). Las lecturas se obtienen en valores decimales (por ejemplo, 214.3), por lo que se redondean a números enteros para poder realizar los análisis genéticos. Para ello, primero se obtuvieron las lecturas originales de todos los individuos para cada locus y, con la base de datos completa, se revisaron “a ojo” todas las lecturas, se tomaron como referencia los valores extremos (el más pequeño o el más grande), a partir de los cuales y considerando si son di-, tri- o tetranucleótidos, se designa el tamaño final de los alelos redondeados, lo que no necesariamente correspondió a redondear al valor inferior o superior más cercano, ya que ello frecuentemente conduce a subestimaciones de riqueza alélica (Matschiner y Salzburger 2009). Así, suponiendo las lecturas 211.8, 212, 213.5, 214.3 y 214.9 pb para un locus dinucleótido, se toman los alelos 212 y 214 como los valores enteros, con rangos para el primero de 211 a 212.9 pb y para el segundo de 213 a 214.9 pb y las conversiones quedarían 212, 212, 214, 214 y 214 respectivamente.

Es importante aclarar que, incluso cuando se tratara de dinucleótidos o tetranucleótidos, no se tomaron como alelos los valores pares más cercanos, ya que en casos donde las lecturas arrojaron valores impares (por ejemplo 105.8, 109.9, 113.7 y 117.7 pb) se consideraron como alelos a los valores impares, siempre respetando el tamaño original del alelo (es decir, dos o cuatro pb). Para el ejemplo anterior, si se tratara de un locus tetranucleótido, los alelos serían 105, 109, 113 y 117 pb respectivamente, con rangos de 103-106.9, 107-110.9, 111-114.9 y 115-118.9 pb.

**Anexo 7.** Condiciones de PCR para amplificar loci de microsatélites en *N. nelsoni* (sólo se muestran los primers que se lograron amplificar).

<b>Primer</b>	<b>Nasua 931</b>	<b>Nasua 1050</b>	<b>Nasua 193</b>	<b>Nasua 1251</b>	<b>Nasua 71</b>	<b>Nasua 504</b>	<b>Nasua 2841</b>	<b>Nasua 1990</b>	<b>Nasua 833</b>
<b>Concentración de MgCl<sub>2</sub></b>	2.5 mM	3.0 mM	3.0 mM	3.0 mM	3.0 mM	3.0 mM	3.0 mM	3.0 mM	3.5 mM
H <sub>2</sub> O	3.7 µL	3.6 µL	3.6 µL	3.6 µL	3.6 µL	3.6 µL	3.6 µL	3.6 µL	3.5 µL
MgCl <sub>2</sub>	0.5 µL	0.6 µL	0.6 µL	0.6 µL	0.6 µL	0.6 µL	0.6 µL	0.6 µL	0.7 µL
Buffer (10X)	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
dNTP's (2mM)	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Primer F (10µM)	0.8 µL	0.8 µL	0.8 µL	0.8 µL	0.8 µL	0.8 µL	0.8 µL	0.8 µL	0.8 µL
Primer R (10µM)	0.8 µL	0.8 µL	0.8 µL	0.8 µL	0.8 µL	0.8 µL	0.8 µL	0.8 µL	0.8 µL
Taq	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL
ADN	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Volumen final	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL

## Anexo 8. Corrección secuencial de Bonferroni

La corrección secuencial de Bonferroni consiste en:

- 1) Determinar el nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ) y el número de comparaciones ( $k$ ).
- 2) Ordenar todas las probabilidades de menor a mayor ( $P_1 < P_2 < P_3 \dots < P_k$ ).
- 3) Proceder con la corrección secuencial. Si  $P_1 \leq \alpha/k$  se rechaza la hipótesis nula y se prosigue con el siguiente valor de probabilidad ( $P_2$ ), se aplica nuevamente la corrección pero esta vez disminuyendo en uno el valor para el número de comparaciones ( $k$ ), para tener  $P_2 \leq \alpha/(k - 1)$ . Si se cumple, nuevamente se rechaza la hipótesis nula y se prosigue con el siguiente valor de  $P$  ( $P_3$ ), disminuyendo ahora en dos el valor de  $k$  [ $P_3 \leq \alpha/(k - 2)$ ], procedimiento que continúa hasta que no se cumpla la regla, asumiendo que a partir de ese valor de probabilidad ( $P$ ) no serán significativos los restantes (por enumerarse de menor a mayor) (Rice 1989).

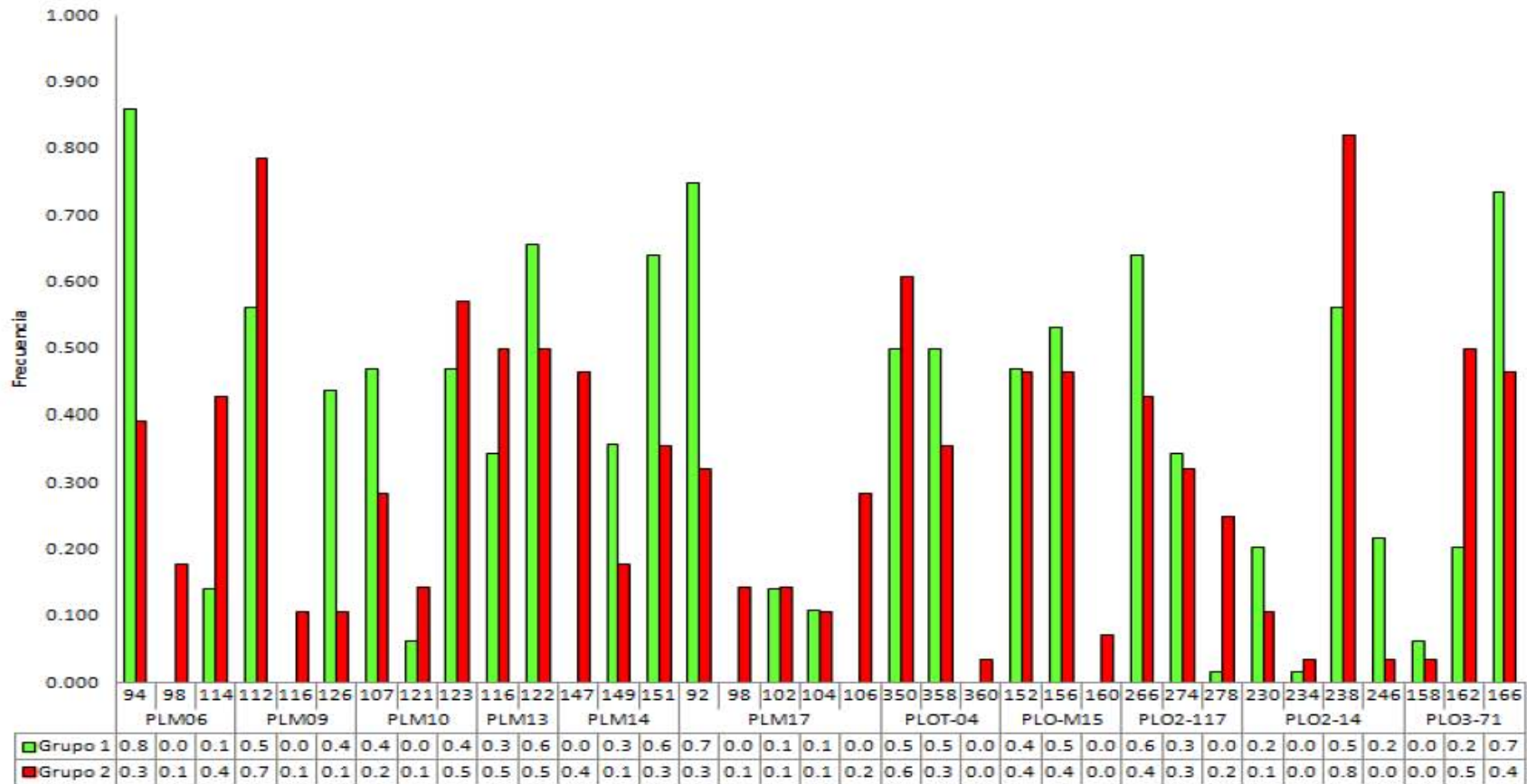


**Anexo 9.** Valores de *P* y *S. E.* para la prueba de DL entre pares de loci de *P. pygmaeus*, para cada grupo y para Cozumel (\**P* ≤ 0.05 con corrección secuencial de Bonferroni).

Pares de loci		Grupo 1		Grupo 2		Cozumel	
		<i>P</i>	<i>S. E.</i>	<i>P</i>	<i>S. E.</i>	<i>P</i>	<i>S. E.</i>
PLM06	PLM09	0.1273	0.0003	0.6907	0.0005	0.0209	0.0002
PLM06	PLM10	0.7103	0.0005	0.848	0.0005	0.432	0.0009
PLM09	PLM10	0.0027	0.00005	0.6257	0.0004	0.0299	0.0002
PLM06	PLM13	0.8613	0.0002	0.2673	0.0006	0.5781	0.0006
PLM09	PLM13	0.0522	0.0002	0.9278	0.0001	0.0924	0.0003
PLM10	PLM13	0.4413	0.0006	0.4363	0.0005	0.207	0.0005
PLM06	PLM14	0.2541	0.0004	0.9688	0.0002	0.0258	0.0003
PLM09	PLM14	0.0997	0.0003	0.6706	0.0006	0.0407	0.0003
PLM10	PLM14	1	0	0.2425	0.0007	0.3141	0.0009
PLM13	PLM14	0.2502	0.0004	0.3857	0.0006	0.1665	0.0005
PLM06	PLM17	0.6329	0.0006	0.5497	0.0013	0.0046	0.0001
PLM09	PLM17	0.8555	0.0003	0.9208	0.0003	0.3358	0.0013
PLM10	PLM17	0.9778	0.0001	0.5179	0.0009	0.231	0.0011
PLM13	PLM17	0.4331	0.0006	0.1556	0.0005	0.4888	0.001
<b>PLM14</b>	<b>PLM17</b>	0.3911	0.0005	0.1474	0.0009	<b>0.0004*</b>	<b>0.00006</b>
PLM06	PLOT-04	0.6498	0.0004	0.7278	0.0007	0.4892	0.001
PLM09	PLOT-04	0.8467	0.0002	0.8594	0.0003	0.8722	0.0004
PLM10	PLOT-04	0.7547	0.0004	0.8965	0.0003	0.4195	0.0008
PLM13	PLOT-04	0.3931	0.0004	0.6001	0.0005	0.5938	0.0008
PLM14	PLOT-04	0.149	0.0003	0.6765	0.0007	0.0929	0.0005
PLM17	PLOT-04	0.5448	0.0005	0.7341	0.0009	0.1689	0.001
PLM06	PLO-M15	0.1832	0.0004	0.3217	0.001	0.0188	0.0002
PLM09	PLO-M15	0.9575	0.0001	0.5252	0.0007	0.3554	0.001
PLM10	PLO-M15	0.3987	0.0005	0.4445	0.0008	0.7	0.0008
PLM13	PLO-M15	0.8115	0.0003	0.4042	0.0006	0.8252	0.0005
PLM14	PLO-M15	0.7487	0.0003	0.2975	0.0009	0.6686	0.001
PLM17	PLO-M15	0.7288	0.0004	0.8415	0.0008	0.2927	0.001
PLOT-04	PLO-M15	0.6054	0.0004	1	0	0.8358	0.0007
<b>PLM06</b>	<b>PLO2-117</b>	0.0428	0.0002	0.1449	0.0007	<b>0.0005*</b>	<b>0.00003</b>
PLM09	PLO2-117	0.1431	0.0004	0.3369	0.0006	0.2527	0.0008
PLM10	PLO2-117	0.7318	0.0006	0.6644	0.0007	0.8096	0.0005
PLM13	PLO2-117	0.0825	0.0003	0.2324	0.0005	0.1098	0.0004
PLM14	PLO2-117	0.298	0.0006	0.5672	0.001	0.1461	0.0008
PLM17	PLO2-117	0.3679	0.0007	0.2354	0.001	0.0262	0.0004
PLOT-04	PLO2-117	0.1268	0.0004	0.5208	0.0009	0.3994	0.0009
PLO-M15	PLO2-117	0.1504	0.0004	0.8742	0.0006	0.8101	0.0007
PLM06	PLO2-14	0.3908	0.0009	0.9638	0.0002	0.794	0.0009
PLM09	PLO2-14	0.9676	0.0001	1	0	0.9885	0.0001
PLM10	PLO2-14	0.9517	0.0003	0.1865	0.0006	0.8893	0.0004
PLM13	PLO2-14	0.0373	0.0002	0.6397	0.0005	0.329	0.0007
PLM14	PLO2-14	0.393	0.0007	0.7464	0.0007	0.52	0.0013
PLM17	PLO2-14	0.0986	0.0006	0.3318	0.001	0.1866	0.0015
PLOT-04	PLO2-14	0.2669	0.0007	0.2201	0.0007	0.5541	0.001
PLO-M15	PLO2-14	0.9553	0.0002	0.9139	0.0004	0.9533	0.0003
PLO2-117	PLO2-14	0.9313	0.0004	0.328	0.0009	0.5856	0.001
PLM06	PLO3-71	0.1025	0.0005	0.7128	0.0007	0.1539	0.0008
PLM09	PLO3-71	0.5374	0.0006	0.7856	0.0004	0.1706	0.0007

PLM10	PLO3-71	0.2386	0.0008	0.3854	0.0006	0.7375	0.0006
PLM13	PLO3-71	0.2375	0.0006	0.616	0.0005	0.4689	0.0006
PLM14	PLO3-71	0.7617	0.0005	0.9566	0.0002	0.5114	0.001
PLM17	PLO3-71	0.7055	0.0007	0.9801	0.0002	0.214	0.0015
PLOT-04	PLO3-71	0.911	0.0002	0.8088	0.0005	0.9463	0.0003
PLO-M15	PLO3-71	0.859	0.0003	0.7001	0.0007	0.2189	0.001
PLO2-117	PLO3-71	0.4798	0.0009	0.8253	0.0006	0.1635	0.0008
PLO2-14	PLO3-71	0.7877	0.0009	0.5827	0.0008	0.7324	0.001

**Anexo 10.** Frecuencia de los alelos encontrados en la población (Cozumel) de *P. pygmaeus*, por locus y por grupo. Destacan los alelos exclusivos para el Grupo 2 en los loci PLM06 (98), PLM09 (116), PLM14 (147), PLM17 (98, 106), PLOT-04 (360) y PLO-M15 (160).



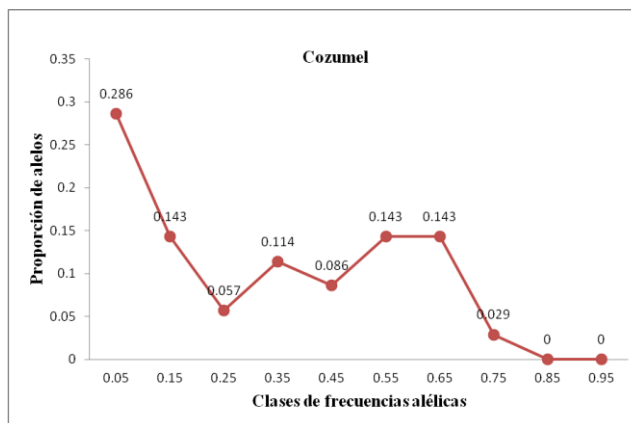
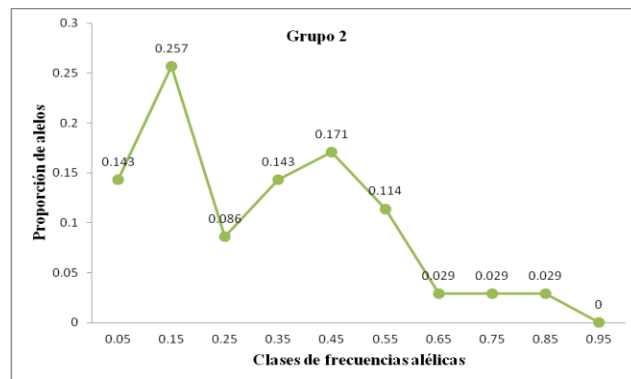
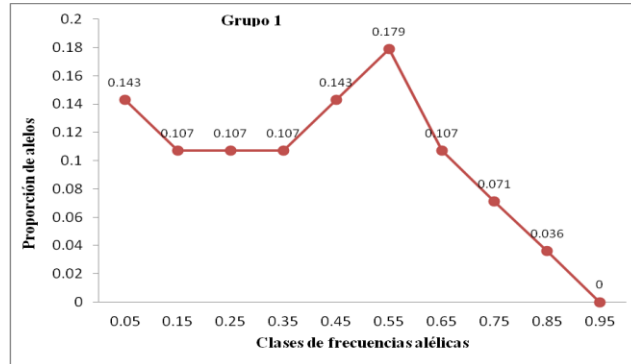
**Anexo 11.** Diferenciación alélica y genotípica entre poblaciones (grupo1 y grupo 2) ( $*P \leq 0.05$  con corrección secuencial de Bonferroni).

Locus	Diferenciación Alélica		Diferenciación Genotípica	
	<i>P</i>	S. E.	<i>P</i>	S. E.
PLM06	<b>0.00001*</b>	0.00000	<b>0.00000*</b>	0.00000
PLM09	<b>0.00026*</b>	0.00001	<b>0.00057*</b>	0.00002
PLM10	0.19542	0.00043	0.15863	0.00032
PLM13	0.17158	0.00037	0.19317	0.00032
PLM14	<b>0.00000*</b>	0.00000	<b>0.00000*</b>	0.00000
PLM17	<b>0.00000*</b>	0.00000	<b>0.00000*</b>	0.00000
PLOT-04	0.18534	0.00054	0.1744	0.00036
PLO-M15	0.12286	0.00034	0.15477	0.00041
PLO2-117	<b>0.00216*</b>	0.00004	<b>0.00115*</b>	0.00003
PLO2-14	0.03747	0.00023	0.03902	0.00020
PLO3-71	0.0208	0.00016	0.03466	0.00020

**Anexo 12.** Estadísticos *F* según Weir y Cockerham (1984).

Locus	$F_{IT}$	$F_{ST}$	$F_{IS}$
PLM06	0.254	0.3	-0.065
PLM09	0.188	0.136	0.06
PLM10	-0.116	0.022	-0.141
PLM13	0.11	0.023	0.089
PLM14	0.257	0.223	0.043
PLM17	0.171	0.198	-0.034
PLOT-04	-0.054	0.008	-0.063
PLO-M15	0.248	-0.024	0.265
PLO2-117	-0.022	0.066	-0.094
PLO2-14	0.032	0.076	-0.047
PLO3-71	0.303	0.126	0.203
TOTAL	0.125	0.109	0.018

**Anexo 13.** Distribución de las proporciones de alelos en las diferentes clases de frecuencias para evidenciar un evento de cuello de botella reciente en los grupos 1, 2 y Cozumel de *P. pygmaeus*.



**Anexo 14.** Distribución de las proporciones de alelos en las diferentes clases de frecuencias para evidenciar un evento de cuello de botella reciente en la población de *N. nelsoni*.

