



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA
SISTEMÁTICA

Filogeografía de la tortuga chopontil (*Claudius angustatus*) a
partir de genes mitocondriales y nucleares

TESIS

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

RIVERA ARROYO RICARDO CANEK

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

Dr. Víctor Hugo Reynoso Rosales, Instituto de Biología, UNAM.

COMITÉ TUTORAL:

Dr. Alejandro Zaldívar Riverón, Instituto de Biología, UNAM.

Dr. Óscar Flores Villela, Facultad de Ciencias, UNAM.

MÉXICO, D.F.

Marzo 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 19 de octubre de 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **RIVERA ARROYO RICARDO CANEK** con número de cuenta **302018994** con la tesis titulada "**Filogeografía de la tortuga chopontil (*Claudius angustatus*) a partir de genes mitocondriales y nucleares**", realizada bajo la dirección del **DR. VÍCTOR HUGO REYNOSO ROSALES**:

Presidente: DR. JORGE ORTEGA REYES
Vocal: DRA. BERTHA PATRICIA ESCALANTE PLIEGO
Secretario: DR. ALEJANDRO FRANCISCO OCEGUERA FIGUEROA
Suplente: M. EN C. LAURA MARGARITA MARQUEZ VALDELAMAR
Suplente: DR. MARCO ALEJANDRO SUÁREZ ATILANO

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 5 de febrero de 2016.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



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

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Antes que nada quisiera agradecer al Dr. Víctor Hugo Reynoso por haberme permitido trabajar en su laboratorio y participar en su proyecto sobre filogeografía y genética de poblaciones de especies prioritarias para la conservación: las tortugas mexicanas. Agradezco también a mi comité tutorial por haberme acompañado durante dos años y ayudar a mi formación, en las buenas y en las malas.

Un agradecimiento a las personas que con su esfuerzo hicieron posible la colecta de los ejemplares: Arq. Ixek Violeta Rivera Arroyo, Saúl García Rivera, Leopoldo Cruz Arroyo, familia Álvarez Romero, familia Romero Terán, Plácido Ledesma Romero, Víctor Rosales Pérez “Pantera”, Germán Cabrera Moreno y familia Cabrera Romero.

A la Dra. Claudia Elena Zenteno Ruiz, investigadora de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, por su incondicional apoyo, en los momentos más complicados de la colecta, por sus recomendaciones y contactos que fueron de valiosa utilidad.

A la granja de tortugas La Encantada del estado de Tabasco y el Ing. Basilio Sánchez, responsable de la Unidad de Ecosistemas Acuícolas “SAGRADO”, por permitirme utilizar sus ejemplares georreferenciados para este estudio.

A la M. en C. Fabiola Ramírez Corona, por su adiestramiento en los procedimientos de laboratorio para la extracción de ADN y las técnicas de PCR.

A la M. en C. Andrea Rubí Jiménez Marín, encargada del Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Zoología, por su aporte y apoyo en la estandarización de las técnicas de laboratorio.

Para la Dra. Patricia Escalante, encargada de la Colección Nacional de Aves, por su cooperación de espacios requeridos para realizar técnicas de extracción y préstamos de material.

A la Biól. Alejandra Cavazos por su invaluable ayuda en el manejo de conocimientos científicos y de programas, y por su gran amistad.

Al M. en C. José Alberto Cruz Silva, por su apoyo en la elaboración de las proyecciones de distribución de la especie, y su valiosa amistad. A la Biol. Zeltzin Corina Rodríguez Ortiz por su apoyo en la edición de imágenes y comentarios de la tesis.

Para la Q.F.B. Schehrezada Monserrat Cruz Arroyo, una mención especial, ya que gracias a su diseño de los primers para Cyt b se logró una exitosa amplificación del gen. De igual manera, a la Dra. Gabriela Parra por su donación de primers, para la amplificación del gen ND4.

Al M. en Historia Ricardo Rivera Cortes y la M. en Historia del Arte Ana Julia Arroyo Urióstegui por su correcciones en el formato y redacción del escrito.

***El secreto de la vida:
Las personas cambian a las personas.***

Índice

CARTA DE AUTORIZACIÓN	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE CUADROS.....	vi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	5
ANTECEDENTES	15
Especie de estudio	15
Uso de genes mitocondriales como marcador molecular.....	17
Coalescencia	21
Distribución potencial	23
JUSTIFICACIÓN	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	25
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
MÉTODO.....	27
Captura de tortugas y obtención de muestras.....	27
Procedimiento de laboratorio.....	29
Electroforesis en gel de agarosa	29
Edición de secuencias.....	32
Diversidad genética	33
Distribución de diferencias pareadas (distribución mismatch)	34
Diferencias entre y dentro de las poblaciones.....	34
Aislamiento por distancia.....	34
Análisis filogenéticos	35
Redes de haplotipos.....	36

Análisis de estructura genética.....	37
Distribución potencial	38
RESULTADOS	39
Composición nucleotídica.....	39
Diversidad genética	39
Análisis filogenéticos	40
Redes de haplotipos.....	47
Distribución de diferencias pareadas (distribución mismatch)	54
Diferencias entre y dentro de las poblaciones.....	55
Aislamiento por distancia.....	56
Estructura poblacional	57
Distribución potencial	58
DISCUSIÓN.....	63
Diversidad genética y estructura poblacional	63
Variación y estructura genética	64
Filogeografía.....	67
Distribución genética y clima	70
Implicaciones de conservación.....	74
CONCLUSIONES.....	75
LITERATURA CITADA	77
ANEXO 1	92
ANEXO 2.....	93
ANEXO 3.....	94

Lista de figuras

Figura 1. Distribución geográfica de <i>Claudius angustatus</i>	11
Figura 2. Vista dorsal y ventral de la tortuga chopontil <i>Claudius angustatus</i>	12
Figura 3. Vista frontal de la tortuga chopontil <i>Claudius angustatus</i>	13
Figura 4. Configuración esquemática de la mitocondria de <i>Cyclemys atripons</i>	18
Figura 5. Localidades de colecta de la tortuga chopontil (<i>Claudius angustatus</i>)	28
Figura 6. Gel de las extracciones con el método de fenol	29
Figura 8. Geles mostrando PCR de ND4	31
Figura 9. Gel mostrando PCR de intrón R35	31
Figura 10. Sección de un electroferograma, de una secuencia de ND4.....	32
Figura 11. Filograma consenso para Cyt b	41
Figura 12. Filograma consenso para ND4	43
Figura 13. Filograma consenso para intrón R35	45
Figura 14. Filograma consenso para el análisis concatenado	47
Figura 15. Red de haplotipos con el marcador Cyt b	48
Figura 16. Mapa que muestra la proporción de haplotipos de Cyt b.....	49
Figura 17. Red de haplotipos con el marcador ND4	50
Figura 18. Mapa que muestra la proporción de haplotipos de ND4.....	50
Figura 19. Red de haplotipos con el marcador intrón R35.....	51
Figura 20. Mapa que muestra la proporción de haplotipos de intrón R35	52
Figura 21. Red de haplotipos mediante análisis concatenado.....	53
Figura 22. Mapa que muestra la proporción de haplotipos concatenados.....	54
Figura 23. Distribuciones pareadas o “mismatch distributions”	55
Figura 24. Gráfico obtenido a partir de las matrices de distancias geográficas y distancias genéticas.....	57
Figura 25. Estimación de la estructura poblacional.....	58
Figura 26. Distribución potencial de los linajes de <i>Claudius angustatus</i>	59
Figura 27. Distribución potencial actual de la tortuga chopontil	61
Figura 28. Distribución potencial hace aproximadamente 20,000 años.....	62

Lista de cuadros

Cuadro 1. Estados, municipios y el numero de tortugas colectadas.....	27
Cuadro 2. Composición nucleotídica de los diferentes marcadores	39
Cuadro 3. Diversidad genética	40
Cuadro 4. Análisis jerárquico de la varianza molecular (AMOVA)	56

RESUMEN

La tortuga chopontil *Claudius angustatus* se encuentra distribuida en los humedales del centro y sur de Veracruz, Tabasco, norte de Oaxaca y Chiapas, sur de Campeche y Quintana Roo y norte de Guatemala y Belice. La norma mexicana NOM-ECOL-059 (SEMARNAT, 2010) la cataloga como especie en peligro de extinción. No existen trabajos sobre estructura genética de su población. Con la investigación realizada, se analizó la variación genética de la especie a lo largo de su distribución geográfica.

El presente estudio analizó un total de 91 individuos de la especie *Claudius angustatus*, de los cuales se obtuvieron 88 secuencias de Cyt b, 67 de ND4, 74 secuencias para el intrón R35. De estas secuencias, 62 se trabajaron de forma concatenada. Los análisis filogenéticos de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana, junto con un análisis de redes de haplotipos, apoyaron la existencia de dos linajes mitocondriales; sin embargo, con el intrón R35 no se encontró esta estructura. El análisis concatenado de estructura genética se recuperaron los dos linajes. El primer linaje incluye 33 ejemplares presentes en toda las zonas de muestreo, mientras que el segundo lo forman 29 ejemplares distribuidos solamente al oeste del río Coatzacoalcos. Los linajes presentan una distancia genética entre 0.9 y 0.8% entre ellos. Se encontró una diversidad nucleotídica (π) de 0.003, un número de diferencias pareadas (k) de 6.508, la D de Tajima de $D = -2.459$ ($P < 0.001$), los estadísticos F de Fu y Li de $F = -5.096$ ($P < 0.02$) y la F_s de Fu de $F_s = 4.874$ ($P < 0.02$). Los resultados de la prueba de Mantel a nivel de los genes mitocondriales y nuclear sugieren que en *C. angustatus* no existe correlación positiva y significativa entre la distancia genética y la distancia geográfica, pero si existe una débil estructura genética. Los resultados de

AMOVA indicaron mayor variación dentro de las poblaciones (97%), que entre poblaciones (3%) que corresponde a un modelo de divergencia reciente o un flujo persistente entre grupos.

El modelo de distribución potencial de *Claudius angustatus* es concordante con la estructura genética de la especie translapándose el linaje 1 sobre el linaje 2. El modelo global para la especie predice una distribución restringida a la región comprendida por la provincia herpetofaunística del Golfo de México, desde la cuenca del Río Fernando hasta el Río Candelaria al sur. La Reserva de la Biosfera Ría Celestún es una zona predicha por el modelo de distribución potencial, la especie nunca se ha encontrado. El resto de la península de Yucatán, incluyendo la Reserva de la Biosfera de Calakmul, queda descartada en el modelo de distribución potencial de la especie.

ABSTRACT

The Narrow-bridged musk turtle *Claudius angustatus* is distributed in wetlands from central Veracruz, Tabasco, northern Oaxaca and Chiapas, southern Campeche and Quintana Roo, and northern Guatemala and Belize. The Mexican Red List NOM-ECOL-059 (SEMARNAT, 2010) ranks it as an endangered species. To date there are no studies about the genetic variation of its populations. This thesis pretends to analyze the genetic variation of Narrow-bridged musk turtle over its geographic distribution.

We sampled 91 organisms of *Claudius angustatus*, resulting in 88 sequences of Cyt b, 67 of ND4 and 74 of R35 intron. Sixty two of this sequences were analyzed concatenated. The Maximum Likelihood, Bayesian Inference and haplotype networks analyses showed the presences of two mitochondrial lineages; however R35 intron did not found this structure. The concatenated analysis recovered the two lineages. The first included 33 organisms distributed al along the sampling zone, and the second lineage with 29 organisms restricted to the west of Coatzacoalcos River. The genetic distance between both lineages was between 0.9 to 0.8%. We found a mitochondrial diversity (π) of 0.003, the number of paired differences (k) was 6.508, the Tajima D was $D = -2.459$ ($P < 0.001$), the F statistics of Fu and Li was $F = -5.096.013$ ($P < 0.02$) and F_s of Fu was $F_s = 4.874$ ($P < 0.02$). The Mantel test with mitochondrial and nuclear genes suggests that *Claudius angustatus* do not have a positive significant relationship between the genetic distance and the geographic distance, although there is a weak genetic structure. AMOVA show more variation within populations (97%) than between populations (3%) that corresponds to a recent divergence model or a persistent genetic flow among groups.

The potential distribution model predicted the distribution of *Claudius angustatus* along the Gulf of Mexico herpetofaunistic province, which extends from Fernando River, south to the Candelaria River where the Yucatan Peninsula begins. The model predicted the distribution of the species in the “Reserva de la Biosfera Ria Celestun” where no collecting data exists. The rest of the Yucatan Peninsula, including the “Reserva de la Biosfera Calakmul”, resulted outside the predicted distribution.

INTRODUCCIÓN

En años recientes estudios de variación genética y de filogeografía han resuelto problemas taxonómicos. La filogeografía se define, en sentido estricto, como el análisis espacial de la variación genética. Este análisis se aplica a niveles infraespecíficos o de especies cercanamente emparentadas. El análisis de genealogías genéticas se aplicó por primera vez al estudio de la evolución de las poblaciones y permite deducir procesos de colonización, diversificación y extinción de los linajes genéticos. Además, el estudio comparado de los patrones filogeográficos de varias especies codistribuidas contribuye a plantear hipótesis sobre posibles eventos comunes de vicarianza o dispersión y a identificar las causas geológicas, ecológicas o etológicas que pudieran haber influido en ellos (Avice, 1998). Por eso, se considera que la filogeografía ha tendido un puente entre la genética de poblaciones y la sistemática, entre genealogías genéticas y filogenia de especies y entre micro y macroevolución (Avice *et al.* 1988).

El análisis filogeográfico en su nivel más fino permite analizar el grado de estructura (diferenciación) entre las poblaciones. Para obtener estos resultados tiene que analizar información tanto espacial como temporal en las escalas históricas (evolutivas) y ecológicas. Las unidades operativas taxonómicas del árbol filogenético son los haplotipos. Con el análisis de haplotipos se obtienen árboles de genes que son un diagrama ramificado que describe el patrón de ancestría-descendencia entre secuencias homólogas de ADN proveniente de diferentes individuos de una población o una especie (Hey y Machado, 2003). En filogeografía se aplican los algoritmos típicos de inferencia filogenética como Máxima Verosimilitud y métodos Bayesianos (Soltis *et al.* 1998; Swofford, 1996). En estos métodos en particular el resultado es un

cladograma denominado filograma, dado que en las diferentes longitudes de las ramas se expresa la cantidad de cambio evolutivo. Las variantes únicas de secuencias de ADN o haplotipos registran la historia de eventos mutacionales y pueden conectarse filogenéticamente en un filograma. El filograma puede a su vez sobreponerse a la distribución geográfica del grupo de estudio, a fin de tener una primera aproximación a los procesos evolutivos responsables de la distribución actual de la especie o grupo de especies (Avice, 2000).

Las separaciones filogeográficas profundas son evidenciadas por diferencias genéticas que tienden a ser concordantes a través de múltiples marcadores dentro de un gen. Entre múltiples genes dentro de una especie, esta estructura poblacional profunda reflejaría las influencias históricas biogeográficas de largo plazo. De esta manera es posible establecer la importancia estadística para supuestos clados de árboles de genes con base en la concordancia entre caracteres dentro de un gen. Más aún, se podrán determinar las divisiones filogenéticas de los árboles de genes en distintos niveles con base en la concordancia entre genes de una misma especie (Avice, 1996).

Las inferencias filogeográficas se derivan por lo general del estudio de la historia genealógica reconstituida para un gen, por lo tanto, no necesariamente reflejan la historia evolutiva del taxón en investigación. En la historia de una especie, muchos eventos pudieron haber ocurrido, como expansión poblacional, efectos cuello de botella, procesos de vicarianza y migración. Del mismo modo, muchos linajes pudieron perderse por efectos estocásticos (extinción). Por esto, no siempre la historia de una especie se puede inferir a partir de una genealogía de un solo gen. El principal reto de

los estudios filogeográficos lo constituye, entonces, poder presentar una inferencia filogeográfica consistente con otros elementos biológicos y biogeográficos. Es así que un árbol genético puede emplearse directamente para hacer una inferencia o simplemente como una etapa intermedia hacia la inferencia de un estimado histórico (Torrice, 2004).

La aplicación de métodos de análisis filogeográficos es una herramienta muy poderosa en estudios de biología de la conservación. Permite evaluar el potencial evolutivo de las especies, probar hipótesis biogeográficas y describir procesos demográficos y evolutivos que dan como resultado unidades poblacionales diferenciadas. También permite inferir procesos que han determinado el origen, distribución y mantenimiento de la biodiversidad, información indispensable en taxonomía y conservación (Pertoldi *et al.* 2007). Estudios de genética de poblaciones nos proporcionan datos medibles de como se distribuye la variación genética entre las poblaciones estudiadas. Entre estos valores están la distancia genética, la diversidad nucleotídica (π), un número de diferencias pareadas (k), la D de Tajima, y los estadísticos F de Fu y Li y F_s de Fu.

La distancia genética se define como el número de sustituciones nucleotídicas existentes entre pares de poblaciones y pretende describir el grado de diferencia genética entre estas dos poblaciones. Diversidad haplotípica (h) es la probabilidad de que dos secuencias de ADN tomadas al azar sean diferentes (Nei 1987). La diversidad nucleotídica (π) es número de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias de ADN tomadas al azar (Nei y Li, 1979). El número de diferencias pareadas (k) es el número medio de diferencias de nucleótidos entre pares de secuencia (Fu y Li, 1993).

La D de Tajima mide la diferencia entre el número esperado de sitios segregantes y la expectativa del número promedio de diferencias nucleotídicas entre secuencias de ADN muestreadas al azar de una población. Finalmente, los estadísticos F_s de Fu y Li se refiere a las diferencias que existen entre el número de mutaciones que aparecen una sola vez entre las secuencias y el número total de mutaciones; y la F de Fu se basa en las diferencias del número de mutaciones que sólo aparecen una vez en las secuencias y el número medio de diferencias de nucleótidos entre pares de secuencia. Un valor negativo de F_s evidencia un exceso en el número de alelos que se espera en una reciente expansión de la población o por ligamiento de genes. Un valor positivo de F_s es evidencia de una deficiencia de alelos, como sería de esperar de un reciente cuello de botella de la población (Fu y Li, 1993).

El análisis espacial de la variación genética se puede establecer la correspondencia entre distancia genética y geográfica entre las distintas pares de poblaciones con la prueba de Mantel, esperando que entre mayor distancia geográfica existirá mayor distancia genética (Wright, 1943). Se utiliza asimismo el AMOVA que es un análisis de varianza molecular (Excoffier *et al.* 1992) en el que se incorpora información de divergencia haplotípica para estimar la distancia genética entre todos los pares de haplotipos entre y dentro de las poblaciones.

Los análisis genéticos son una herramienta útil para esclarecer algunas incógnitas en la vida de las tortugas. Los trabajos de filogeografía en tortugas de la familia Kinosternidae se remontan al trabajo relacionado con la tortuga del almizcle *Stenrotherus minor*, analizando ADNmt de 52 especímenes recolectados en su área de distribución en el sureste de los Estados Unidos. En esta especie se observaron niveles

medios de variación en cada población, una alta estructura genética, con una separación filogenética altamente significativa y con menor variabilidad genética en el clado noroccidental (Walker *et al.* 1995). Otro estudio en las tortugas casquito *Kinosternon subrubrum* y *K. Aburrí* se reporta que *K. subrubrum* tiene cuatro linajes: a) Missouri y Luisiana; b) costa del Golfo de México; c) costa del Atlántico; y, d) Florida. Este último grupo parece dar origen a *K. baurii* (Walker *et al.* 1996). Las poblaciones continentales de *K. baurii* no presentan estructura genética, mientras que para la población de los cayos de Florida se reporta un aislamiento reciente (Karl y Wilson 2001).

En un estudio filogeográfico de la tortuga blanca (*Dermatemys mawii*), especie en peligro crítico de extinción, restringida a cuerpos de agua del sur de Veracruz, Tabasco, parte sur de la península de Yucatán, en México, y en Guatemala y Belice, se analizaron las secuencias de 238 individuos de 15 localidades con los genes Cyt b y ND4, identificando 16 haplotipos diferentes. Las cuencas hidrológicas del Papaloapan, Coatzacoalcos y Grijalva-Usumacinta actúan como barreras geográficas para las poblaciones. Los tiempos de divergencia de los haplotipos de ADNmt sugieren que los tres linajes genéticos se separaron durante el Plioceno-Pleistoceno, hace 3.7-0.23 millones de años. La población del río Papaloapan muestra varios alelos únicos, además de tener los niveles menores de flujo génico. Es probable que la dinámica poblacional esté mediada por la explotación intensiva de los seres humanos, e incluso que la existencia de cuellos de botella sea resultado de la sobreexplotación actual de la especie (González-Porter *et al.* 2011).

Claudius angustatus se encuentra catalogada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) como especie casi amenazada y en México como en peligro de extinción por la NOM-ECOL-059 (SEMARNAT, 2010). No existen investigaciones sobre genética de poblaciones, por lo que se desconoce la existencia de linajes genéticos; la diferenciación genética, la historia evolutiva de la especie o la existencia de barreras entre sus poblaciones.

Al igual que *Dermatemys mawii*, la tortuga *Claudius angustatus* se distribuye en la vertiente del golfo de México desde el centro de Veracruz, norte de Oaxaca y Chiapas, Tabasco y el sur de Campeche y Quintana Roo, al norte de Guatemala y Belice. Tiene preferencia por los pantanos, pastizales inundables y orillas de lagos (Vogt, 1997) de climas cálidos húmedos y semiáridos del tipo Am, Amf, Aw2, Aw0 y Bs (García, 1988). *C. angustatus* puede hallarse en distintos tipos de vegetación, que referidos al esquema de Rzedowski (1978) incluyen principalmente selva mediana, selva alta y pastizal-humedales dentro de una altitud de 0 a 300 m snm (Figura 1). La situación del hábitat en las zonas bajas inundables del golfo de México es notablemente homogénea a lo largo de su distribución.

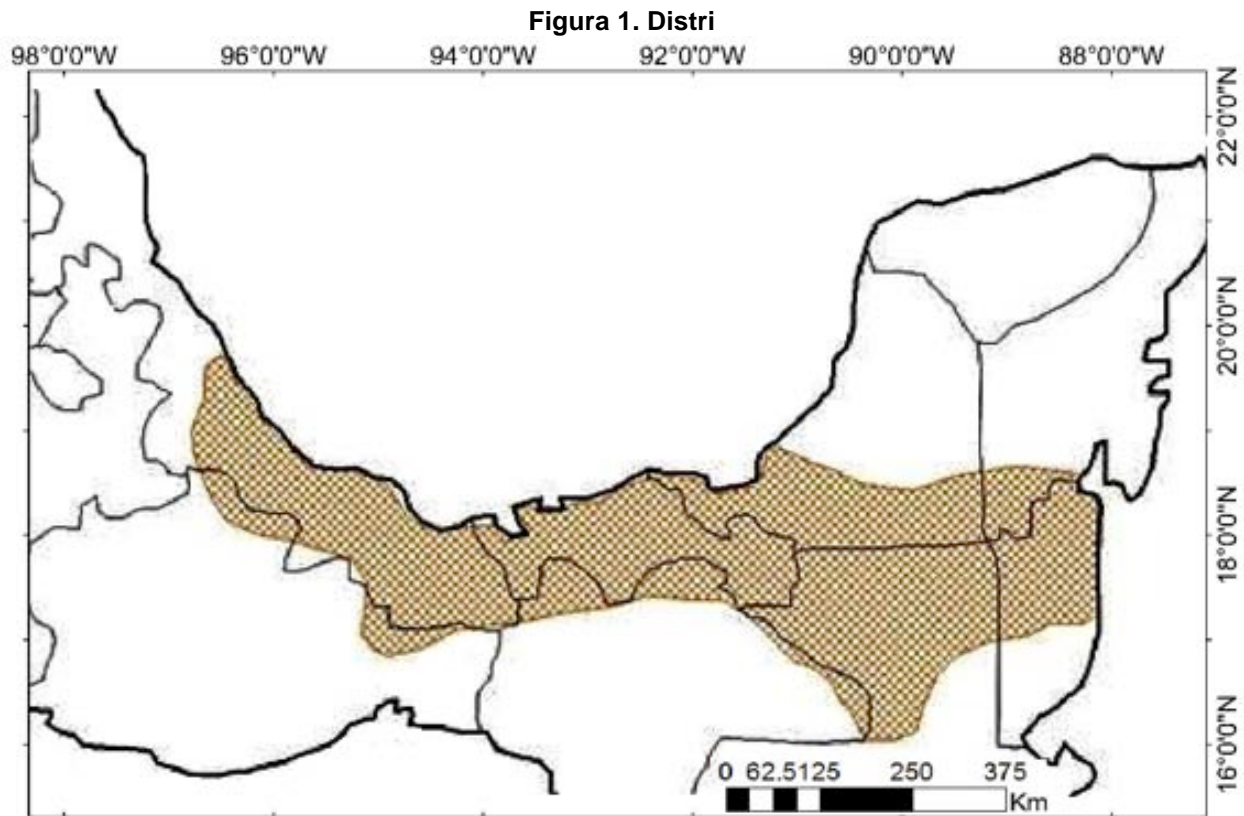


Figura 1. Ubicación geográfica de *C. angustatus* en México y Guatemala y Belice (Smith y Smith, 1979).

C. angustatus presenta un caparazón oval con tres quillas longitudinales someras (Figura 2A). El promedio de la de longitud recta del caparazón (LC) es de 116 mm en machos y 106 mm para las hembras, el peso es de 600 g y 350 g respectivamente (Legler y Vogt 2013). Presenta el plastrón con el puente más reducido que cualquier otro Kinosternidae y no presenta bisagras como las de *Kinosternon*; en cambio, el plastrón se encuentra notoriamente reducido en forma de cruz, con el puente extremadamente delgado y con el resto del plastrón conectado al caparazón por un ligamento (Figura 2B). En el plastrón, los escudos axilares, inguinales, gulares y humerales están ausentes. El plastrón y el puente son de color amarillo, pero en los

ejemplares jóvenes tienen una mancha oscura en la zona media, que se extiende hacia fuera de las uniones (Legler y Vogt 2013).

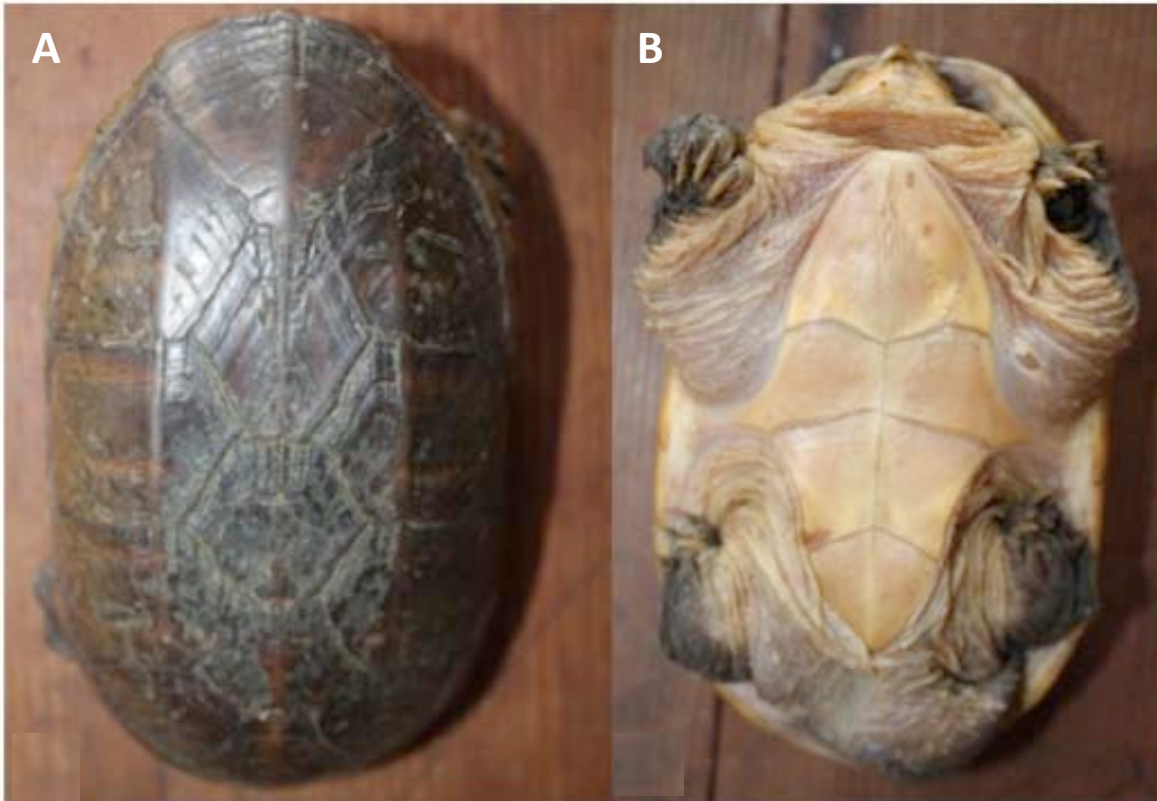


Figura 2. Vista dorsal (A) y ventral (B) de la tortuga chopontil *Claudius angustatus*.

La cabeza es grande y de color café amarillento. Tiene el rostro proyectado, la maxila en forma de gancho filoso y un par de picos en la parte marginal de la maxila. La mandíbula tiene un gancho medio. El cuello exhibe varios tubérculos y es gris con manchas oscuras. Las extremidades son café grisáceas con dedos palmeados (Vogt, 1997) (Figura 3). La cabeza del macho es más grande en proporción al cuerpo y la cola es más gruesa y grande que en las hembras. Las patas traseras de los machos presentan parches de escamas tuberculadas.



Figura 3. Vista frontal de la tortuga chopontil *Claudius angustatus*.

El tamaño de las poblaciones alcanza varios cientos durante la época de lluvias (Vogt *et al.* 1997). Algunos estudios sugieren un tamaño poblacional de 250 individuos a partir de muestreos mensuales realizados durante los años de 1982 a 1984 en Lerdo de Tejada, Veracruz, en la zona del río Papaloapan (Flores-Villela y Zug, 1995). En el municipio de Alvarado y en las instalaciones de la Unidad de Ecosistemas Acuícolas “SAGARO” S. A. de C. V., ubicada en La Florida, municipio de Ángel R. Cabada, se reportó la captura de 254 individuos en un periodo de 14 meses (Espejel, 2004).

La mayor amenaza a esta especie es la sobreexplotación de sus poblaciones. Se colecta ampliamente al principio y al final de la época de lluvias, sobre todo para el consumo de carne y en menor medida como mascotas. El proceso acelerado del deterioro de humedales en las costas del Golfo de México, debido al incremento en las tasas de deforestación, rellenado, drenado y contaminación, también es una amenaza para la especie (Cervantes, 1998).

Las amenazas que enfrenta la especie han llevado a la reducción del número de sus individuos e incluso algunas poblaciones han sido extirpadas o se encuentran muy reducidas; como consecuencia, en la NOM-ECOL-059 (SEMARNAT,-2010) se indica como en peligro de extinción, mientras que la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) la cataloga como casi amenazada. Aguirre *et al.* (2002) establecen que existen niveles considerables de extracción de las poblaciones en Veracruz, entre Lerdo de Tejada, Tlacotalpan, Saltabarraca y Alvarado, en la cuenca del Río Papaloapan, así como en el área de Coatzacoalcos y Minatitlán; en Tabasco, en las lagunas de Villahermosa.

Son pocos los trabajos sobre *C. angustatus* y en su mayoría se refieren a la biología y ecología (Bickham y Carr, 1983; Aguirre *et al.* 2002; Morón, 2002; Segura, 2002; Espejel, 2004; Flores-Villela y Zug 1995 y Flores, 2009). Los trabajos de filogeografía y genética de poblaciones son inexistentes, por lo que se desconoce información sobre linajes genéticos, diferenciación genética, la historia evolutiva de la especie o la influencia de barreras geográficas entre sus poblaciones. Esta información es importante ya que podría ser usada en la toma de decisiones que impactarán en la elaboración de programas de conservación de las poblaciones de la especie y sus hábitats, así como en su aprovechamiento.

ANTECEDENTES

Especie de estudio

La tortuga dulceacuícola *Claudius angustatus* (Cope, 1865) fue descrita dentro de la familia Kinosternidae. Las revisiones taxonómicas realizadas por Smith y Smith (1979), e Iverson y Berry (1979) la situaron dentro de la subfamilia Staurotypinae, por lo que la familia Kinosternidae se compone de dos subfamilias: Kinosterninae con dos géneros (*Kinosternon* y *Sternotherus*) y Staurotypinae que incluye dos géneros (*Staurotypus* y *Claudius*). Las tortugas Staurotypidae se distinguen fácilmente de los Kinosternidae por el número de escudos del plastrón, puesto que éstos presentan siete escudos, en comparación con los entre 10 u o 11 de los Kinosternidae. A diferencia de Staurotypidae, en Kinosternidae los escudos anteriores y posteriores del plastrón presentan movilidad, lo cual les permite proteger todo su cuerpo dentro del plastrón y el caparazón (Legler y Vogt 2013).

Por medio de las técnicas de tinción de cromosomas se han examinado los cariotipos de las especies de los cuatro géneros (Bickham y Carr, 1983). Staurotypinae se caracteriza por un número diploide de 54, mientras que todos los miembros de Kinosterninae examinados tienen 56 pares de cromosomas, por lo que se propuso elevar la subfamilia Staurotypinae a familia Staurotypidae.

Iverson *et al.* (2013) realizaron una filogenia molecular de la familia Kinosternidae, incluyendo muestras de tejidos de todas las especies reconocidas y la mayoría de las subespecies, utilizando tres marcadores mitocondriales (Cyt b, 12S y 16S) y tres marcadores nucleares (C-mos, RAG1, RAG2). El análisis agrupó a los Staurotypinae como un clado separado del resto de los Kinosternidae (*Sternotherus*, *Kinosternon* y el nuevo género *Cryptochelys* que incluye a las especies *C.*

leucostomun, *C. angustipons*, *C. dunni*, *C. herrerae*, *C. creaseri* y *C. acutum*), con una divergencia datada de 22 millones de años. Spinks *et al.* (2014) no compartieron esta nueva hipótesis taxonómica argumentando que el trabajo de Iverson *et al.* (2013) se basa casi exclusivamente en caracteres de ADN mitocondrial, mientras que los genes nucleares eran virtualmente no informativos. Con datos de 14 loci nucleares de 49 individuos de toda las especies de Kinosternidae (excepto *K. alamosa* y *K. angustipons*), Spink *et al.* (2014) establecieron que la parafilia encontrada por Iverson *et al.* (2013) no es consistente, ya que el nuevo género *Cryptochelys* sólo resulta monofilético con el gen Cyt b pero no en la mitad de los loci nucleares. Por lo tanto, el nombre de *Cryptochelys* debe ser rechazado y se debe retener el *Kinosternon* para todos los taxa.

Spinks *et al.* (2014) tampoco concordaron con la idea de Iverson *et al.* (2013) de elevar a Staurotypidae a nivel de familia, ya que la actual taxonomía con dos subfamilias se ve fuertemente soportada por la filogenia. La justificación de Iverson *et al.* (2013) para elevar a familia Staurotypidae está basada en los tiempos de divergencia, los caracteres morfológicos y que en las tres especies existe determinación del sexo por cromosomas; mientras que en el resto de la Kinosternidae existe regulación del sexo dependiente de la temperatura. Para Spinks *et al.* (2014), no es válido que la determinación de sexo se use como mecanismo para definir el clado, puesto que esto se utiliza para definir subfamilias o familias, por lo tanto sugieren mantener el estatus taxonómico de Staurotypinae como subfamilia de Kinosternidae.

Uso de genes mitocondriales como marcadores moleculares

Actualmente dentro de los marcadores genéticos que podemos utilizar encontramos el genoma nuclear y los genomas de organelos (cloroplastos y mitocondrias). Estos tres genomas difieren en sus características evolutivas (herencia y tasas de mutación). En cada uno, las regiones no codificantes y codificantes evolucionan a un ritmo diferente (Lowe *et al.* 2004). Más de 70% de los artículos publicados en ecología molecular o filogeografía en animales se basan en marcadores de ADN mitocondrial (ADNmt), ya que posee regiones con diferentes tasas de evolución y, por lo tanto, se puede utilizar en análisis inter e intraespecíficos.

El genoma mitocondrial tipo de amniotas codifica 37 genes, dentro de los cuales se incluyen tres subunidades de la proteína citocromo oxidasa (COI, COII y COIII), siete subunidades del dinucleótido de nicotinamida y adenina (ND1 a ND6 y ND4L), el citocromo b reductasa (Cyt *b*) y las subunidades 6 y 8 del componente de la ATP sintetasa. Además, por 13 ARN mensajeros, 2 ARN ribosomales y 22 ARN de transferencia (Figura 4) (Lunt *et al.* 1998). Además, contiene la región control o región hipervariable, la cual contiene sitios de información para el control de los procesos de transcripción y replicación con una tasa excepcionalmente alta de sustitución (Douzery y Randi, 1997; Yokobory *et al.* 2004).

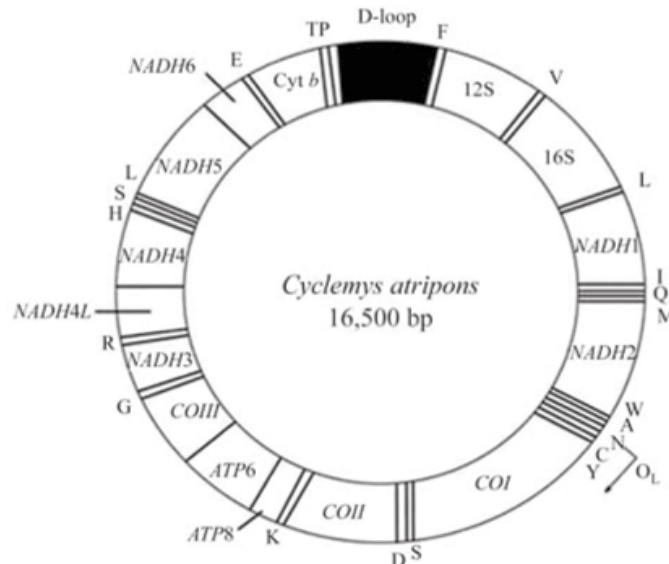


Figura 4. Configuración esquemática de la mitocondria de *Cyclomys atripons* Zhang *et al.* 2008.

El gen mitocondrial Cyt b codifica para una proteína transmembranal que se localiza en la membrana interna de la mitocondria. Es una de las 9 o 10 proteínas que forman el complejo III del sistema de fosforilación oxidativa I. Éste contiene ocho hélices transmembranales conectadas por dominios intra o extramembranales y es el único Cyt b codificado por el genoma mitocondrial. El complejo III transfiere electrones de la ubiquinona al Cyt b, con lo que se permite el paso de protones a través de la membrana interna de la mitocondria.

El gen Cyt b tiene regiones muy conservadas y otras con distintas tasas evolutivas en la tercera posición de los codones, donde muestran las tasas más altas de sustitución (Fairbairn *et al.* 1998; Farías *et al.* 2001; Palkovacs *et al.* 2002; Van der Meij *et al.* 2005), produciendo con mayor frecuencia las mutaciones silenciosas. Las mutaciones silenciosas en la tercera posición pueden utilizarse para determinar líneas de separación dentro de una especie relativamente reciente (Graybeal, 1993). Más del 80% del número de cambios que tienen lugar en la tercera posición de cada codón son

en su mayoría de transiciones. Por lo tanto, las transiciones en la tercera posición pueden saturarse después de unos pocos millones de años. En la primera y segunda posiciones la tasa de mutación es más baja y lleva mucho más tiempo a la saturación, permitiendo estimar fácilmente los tiempos de divergencia entre los diferentes linajes, así como examinar la variación intraespecífica. Debido a esto, el Cyt b es el marcador más usado en filogeografía molecular de vertebrados.

El ADNmt en animales acumula sustituciones de nucleótidos varias veces más rápido que el ADN nuclear. Algunos de los factores que probablemente contribuyen al rápido ritmo de evolución del ADNmt son los mecanismos relativamente ineficientes de reparación del ADN en mitocondrias, al ambiente rico en oxígeno corrosivo al que las moléculas de ADNmt están expuestas en la mitocondria, a una relajación de las restricciones funcionales resultantes de que el ADNmt que codifica sólo unos pocos tipos de polipéptidos y no produce proteínas que participan directamente en su propia replicación, transcripción o traducción, y que el ADNmt está desnudo, es decir, no ligado fuertemente a las proteínas histonas que son conservadoras y puede limitar las tasas de evolución del ADN nuclear (Brown *et al.* 1979). La rápida evolución de ADNmt también se refleja en su alta variación en la secuencia de nucleótidos en la mayoría de las especies animales. Los estudios a nivel de los genes mitocondriales han demostrado que evolucionan de 5 a 10 veces más rápido que un gen de copia simple del ADN nuclear. Los genes mitocondriales y regiones distintas difieren en las tasas de mutación, proporcionando información adecuada del tiempo de la divergencia de los linajes (Avice, 2009).

Las propiedades que hacen que al ADNmt sea un marcador con un alto grado de resolución para abordar los patrones de variabilidad genética, constituyen herramienta excelente para la reconstrucción de la historia de las poblaciones y especies. En especies animales, el ADN mitocondrial tiene una mayor tasa de mutación que el ADN nuclear (Avice, 1994). Por ejemplo, en las tortugas de Galápagos, la tasa de mutación en el ADNmt es 30 veces mayor que la del ADN nuclear (Mindell *et al.* 1996, Moritz, 1994a).

El ADNmt es exclusivamente de herencia materna. Al no recombinarse, las diferencias que se encuentren se deberán exclusivamente a fenómenos de mutación. La mayoría de los individuos son homoplásmicos para un ADNmt prevalente (Moritz, 1994b). En comparación con la herencia diploide biparental, el número efectivo de genes mitocondriales será cuatro veces menor. Este efecto incrementará la deriva génica (Birky *et al.* 2001), aumentando la posibilidad de fijación de alelos a nivel intrapoblacional, lo que producirá variabilidad interpoblacional. El ADNmt actuaría como una “marca” para caracterizar linajes.

El ADNmt también nos puede dar información valiosa acerca de los procesos de demografía como fragmentación de las poblaciones, aislamiento y efectos de cuello de botella (Wilson *et al.* 1985). También funciona para determinar la estructura de las poblaciones, el flujo de genes y las relaciones filogenéticas entre los grupos de diferentes niveles taxonómicos, sobre todo en grupos filogenéticamente cercanos (Bernatchez y Osinov, 1995, Ballard y Whitlock, 2004). La existencia de poca divergencia en ADNmt de dos poblaciones puede indicar una separación reciente o incluso pueden existir casos de poca divergencia entre las especies reproductivamente

aisladas, sin que presenten mayores diferencias en el ADNmt (Rocha-Olivares *et al.* 1999).

En principio, los genes nucleares también podría proporcionar gran cantidad de datos de secuencias para las evaluaciones filogeográficas en el nivel intraespecífico; sin embargo, existen problemas técnicos y biológicos inherentes al ADN nuclear como son el ritmo relativamente lento de evolución de muchos loci nucleares, la dificultad de aislar haplotipos nucleares a partir de organismos diploides y la recombinación. La primera complicación puede ser superada mediante la identificación y seguimiento de secuencias que evolucionan más rápidamente que el promedio. Tal es el caso de las secuencias de intrón en la codificación de proteínas que evolucionan más rápido que los exones adyacentes. El segundo obstáculo se puede superar mediante el uso natural o artificial de sistemas de aislamiento de haplotipos (Avice, 2009).

A menudo se puede optar por una estrategia mixta de analizar genes mitocondriales y nucleares, puesto que para determinar mejor la variabilidad intraespecífica los marcadores mitocondriales son los más adecuados, mientras que la variabilidad entre especies (grandes tiempos de divergencia) se determina mejor con marcadores nucleares (Zhang y Hewitt, 2003).

Coalescencia

La teoría de coalescencia se generó como una alternativa para estudiar la variación genética, partiendo de que todos los miembros de una población están genealógicamente relacionados, en una población de tamaño constante a lo largo de las sucesivas generaciones, y de que en forma permanente surgen nuevos alelos por

mutación, mientras que otros se pierden por deriva génica (asumiendo neutralidad). En otras palabras, las secuencias de los individuos de una población tienen una historia que permite inferir procesos y tiempo en el que se reducen a un solo ancestro (Vázquez *et al.* 2009).

Aunque muchos linajes genéticos distintos pueden estar actualmente presentes en una población, existe un rastro que respalda a determinados ancestros comunes en algún momento de la historia. Esto se debe a la historia matrilineal de los individuos existentes en una determinada especie. Si se conociera la historia genealógico de una población silvestre, se podrían trazar los linajes maternos a través del tiempo y las generaciones que finalmente nos llevan a un ancestro compartido por los individuos vivos (Avise, 2000).

Las historias genealógicas nunca se conocen directamente para las especies silvestres, pero se pueden estimar a partir de comparaciones de secuencias de ADN. Algunos genomas citoplasmáticos pueden proporcionar información en historias matrilineales, y el cromosoma Y de mamíferos así como el Z o W en aves y reptiles pueden proporcionar información sobre los historiales patrilineales.

La teoría de coalescencia ha pasado a ser una parte fundamental de la genética de poblaciones, la filogeografía, la demografía histórica y la evolución. La capacidad de generar secuencias de ADN en forma más rápida y confiable ha permitido también generar genealogías de haplotipos que han mostrado tener una gran utilidad para hacer inferencias en diferentes campos de la biología, la medicina y la evolución (Avise, 1998).

La coalescencia permite no sólo detectar los procesos evolutivos que afectaron a la población, también inferir parámetros que pudieron dar lugar a la misma como las tasa de mutación, número de migrantes por generación entre las diferentes poblaciones y tiempo de divergencia, tiempo del encuentro coalescente (Avice, 2000).

Distribución potencial

La distribución de las especies responde a los factores climáticos y geográficos en la que estas se encuentran y son las variables que se usan en el modelado de presencia de especies (Guisan y Hofer, 2003; McCain, 2010). La forma en que las distintas especies se distribuyen en determinado espacio está determinada por múltiples causas, entre las principales se consideran las glaciaciones pleistocénicas, factores tectónicos y el vulcanismo. Los cambios climáticos severos, producen cambios en la distribución de las especies, provocando la extinción en parte de su distribución, la dispersión a nuevos territorios o la sobrevivencia en refugios desde los cuales posteriormente se habrían expandido (Hewitt 2000). En cualquier caso, estos cambios en la distribución habrían tenido consecuencias directas sobre la biodiversidad, incluyendo cambios en la variación y estructura genética de muchas especies.

El uso de modelos de distribución potencial de especies nos permite realizar análisis de los patrones espaciales de presencia y ausencia de especies, así como comprender cuales son las variable climáticas que influyeron en la distribución en el pleistoceno y la actual de una especie en particular, permitiendo explicar los patrones de diversidad genética actuales (Canestrelli et al. 2010).

JUSTIFICACIÓN

Las tortuga *Claudius angustatus* se encuentra catalogada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) como especie casi amenazada y en México como en peligro de extinción por la NOM-ECOL-059 (SEMARNAT, 2010). No existen investigaciones sobre filogeografía y genética de poblaciones, por lo que se desconoce la variación y diferenciación genética, la existencia de linajes genéticos, la historia evolutiva de la especie o el efecto de las barreras entre sus poblaciones. Al conocer esta información se podría usar para tomar decisiones que impactarán en la elaboración de programas de conservación de las poblaciones de la especie y sus hábitats, así como su aprovechamiento.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

No existen trabajos que incluyan análisis genéticos y son escasos los trabajos ecológicos, tanto en México como en los países vecinos (Guatemala y Belice). El presente trabajo propone conocer la variación genética de esta especie en peligro de extinción a lo largo de su distribución. Este trabajo es paralelo a los estudios genéticos realizados para la especie de tortuga acuática *Dermatemys mawii* que presenta un área de distribución similar.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las poblaciones de *Claudius angustatus* son una sola unidad genética a lo largo de su distribución?

HIPÓTESIS

Las tortugas al ser un grupo con baja capacidad de migración, se espera presenten baja variación genética, estructura genética, bajo flujo genético entre las poblaciones que causaría baja relación genética con la distancia geográfica y baja estructuración filogeográfica.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo es analizar cómo se estructura geográficamente la variación genética en las poblaciones de la tortuga chopontil (*Claudius angustatus*) en los humedales del Golfo de México.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar la variación genética intraespecífica de *Claudius angustatus* con base en marcadores mitocondriales Cyt b y ND4 y el marcador nuclear intrón R35.

Estimar el grado de estructuración genética y niveles de flujo génico entre las poblaciones.

Determinar discontinuidades geográficas que expliquen la estructura y origen de los linajes.

Evaluar la afinidad genética y el estatus de conservación de las poblaciones existentes en la región de estudio.

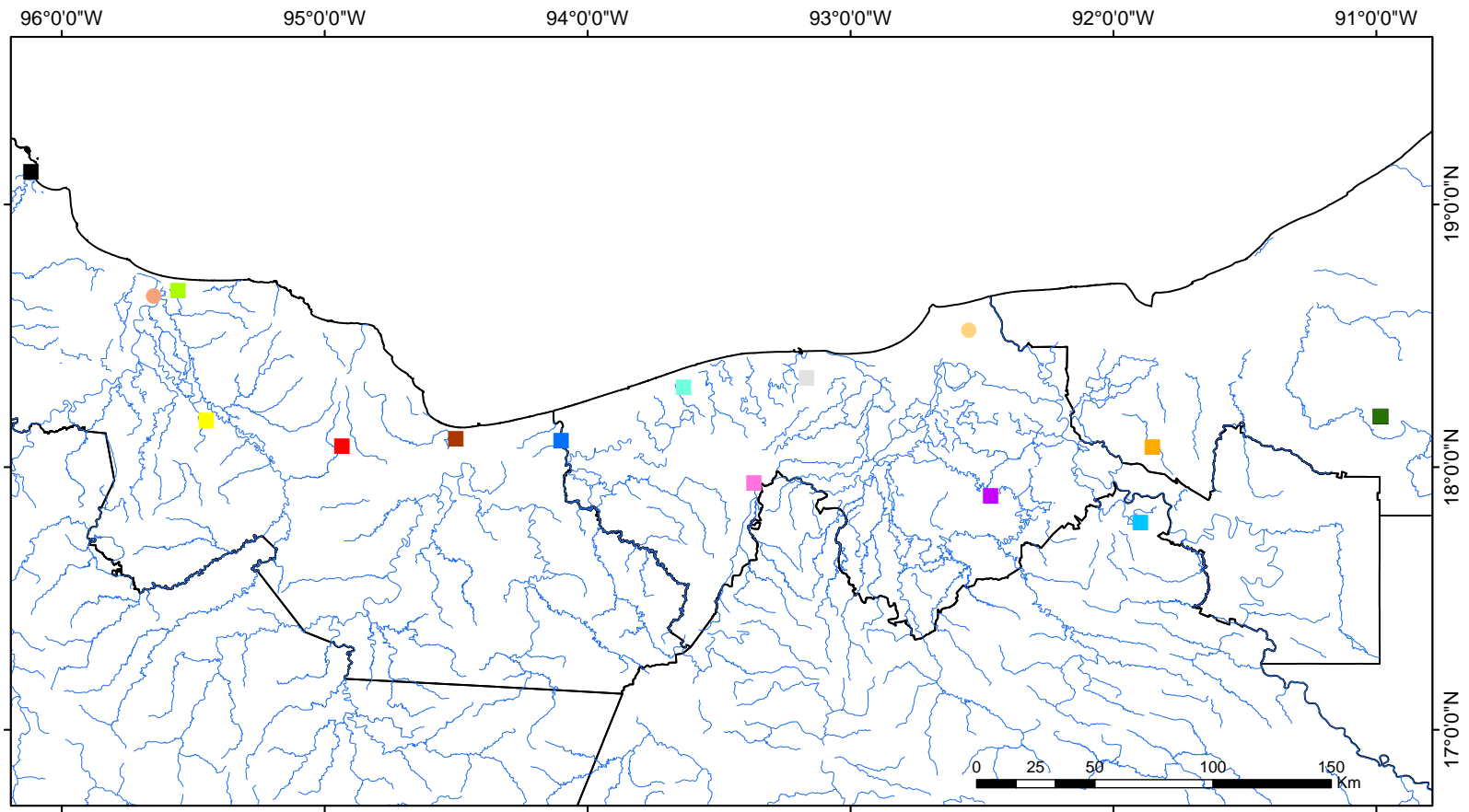
MÉTODO

Captura de tortugas y obtención de muestras

Se recolectaron 91 ejemplares de *Claudius angustatus* en 15 localidades de Veracruz, Tabasco, Chiapas y Campeche (Cuadro 1, Figura 5). Los ambientes de recolecta fueron aguas someras, áreas próximas a cultivos inundados, ocasionalmente en casas de pobladores que las mantenían como mascotas o para ser consumidas. Las coordenadas geográficas de los sitios de captura se registraron con un sistema de posicionamiento global (GPS). De cada tortuga se tomó una muestra de sangre de 0.5 ml, la cual se conservó en 2.0 ml de etanol a 96% (Zarza *et al.* 2008). Secuencias de ADN de *Staurotypus triporcatus* obtenidas de GenBank sirvieron como grupo externo.

Cuadro 1. Estados, municipios y el número de tortugas colectadas

Estado	Localidad	Latitud	Longitud	No. de ejemplares
Veracruz	Boca del Río	19.124	-96.117	2
Veracruz	Tlacotalpan	18.651	-95.650	5
Veracruz	Lerdo de Tejada	18.773	-95.550	6
Veracruz	Acayucan	18.178	-94.450	8
Veracruz	Isla	18.081	-94.933	6
Veracruz	Minatitlán	18.108	-94.500	6
Veracruz	Las Choapas	18.099	-94.100	6
Tabasco	Cárdenas	18.397	-93.650	6
Tabasco	Huimanguillo	17.939	-93.367	6
Tabasco	Nacajuca	18.339	-93.167	6
Tabasco	Pantanos de Centla	18.520	-92.550	6
Tabasco	Macuspana	17.890	-92.467	8
Chiapas	Catazajá	17.795	-92.000	6
Campeche	Palizada	18.368	-92.050	6
Campeche	Candelaria	18.139	-90.983	6



Localidades

- | | | | | | | |
|----------------|--------------|----------------|---------------|--------------------------|--------------|----------------------|
| ■ Boca del Río | ■ Cárdenas | ■ Huimanguillo | ■ Las Choapas | ■ Miguel Ángel R. Cabada | ■ Nacajuca | ● Pantanos de Centla |
| ■ Acayucan | ■ Candelaria | ■ Catazaja | ■ Isla | ■ Macuspana | ■ Minatitlán | ■ Palizada |
| | | | | | | ● Tlacotalpan |

Figura 5. Localidades de recolecta de la tortuga chopontil (*Claudius angustatus*).

Procedimiento de laboratorio

Para la extracción del ADN genómico se utilizaron dos protocolos: a) protocolo de extracción de ADN modificado de Sunnucks y Hales (1996) y Aljanabi y Martínez (1997) (Anexo 1); y, b) la técnica de extracción de ADN de tejido animal con fenol-cloroformo modificada por la Dra. Gabriela Parra Olea.

Electroforesis en gel de agarosa

La extracción exitosa del ADN fue verificada mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa (0,01 g de agarosa/1 ml de tampón TAE 1X) y visualizadas en un transiluminador UV (Figura 6). Además, la concentración de ADN se determinó por espectrofotometría con NanoDroop (Thermo Fisher Scientific Inc, Wilmington DE, USA), para extracción.

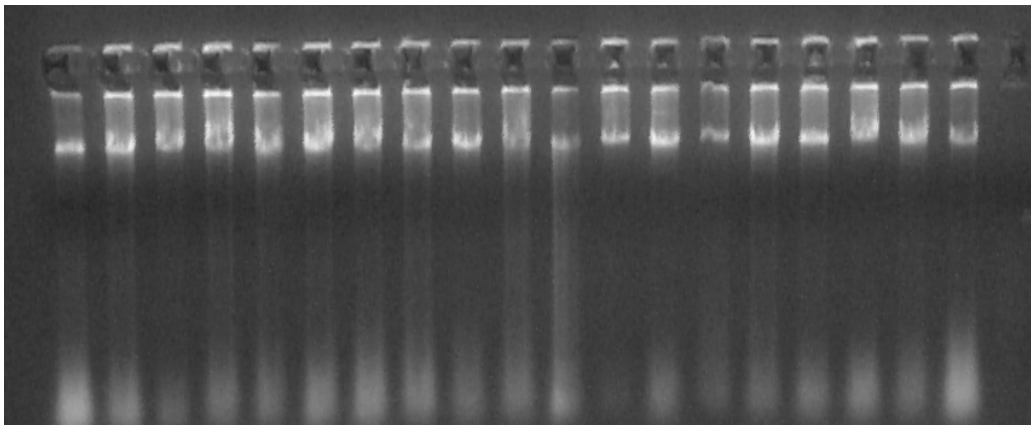


Figura 6. Gel de las extracciones por el método de fenol mostrando extracciones de ADN exitosas.

Las reacciones de amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (12.5 μ L) fueron preparadas con 10 mM de buffer de PCR; 0,2 mM de cada dNTP; 1,5 mM $MgCl_2$; 0,3 μ M de cada primer; 0,5 unidades de Taq

ADN polimerasa (Invitrogen) y aproximadamente 50 ng de ADN genómico. Los programas para la amplificación se detallan en el anexo 2.

Para la amplificación del fragmento del gen Cyt b, se probó con los primers L14724 y H15149; al no lograr una amplificación con éstos, se diseñaron otros con base en las secuencias obtenidas por Iverson *et al.* (2013). FD-Citb (TGA CCT ACC AAG CCC CTG AA) RW-Citb (TGC GTA GGC GAA AAG GAA GT). Se realizaron gradientes de alineación de 50 a 65 °C, y se obtuvo como mejor temperatura de alineamiento 50 °C (Figura 7).

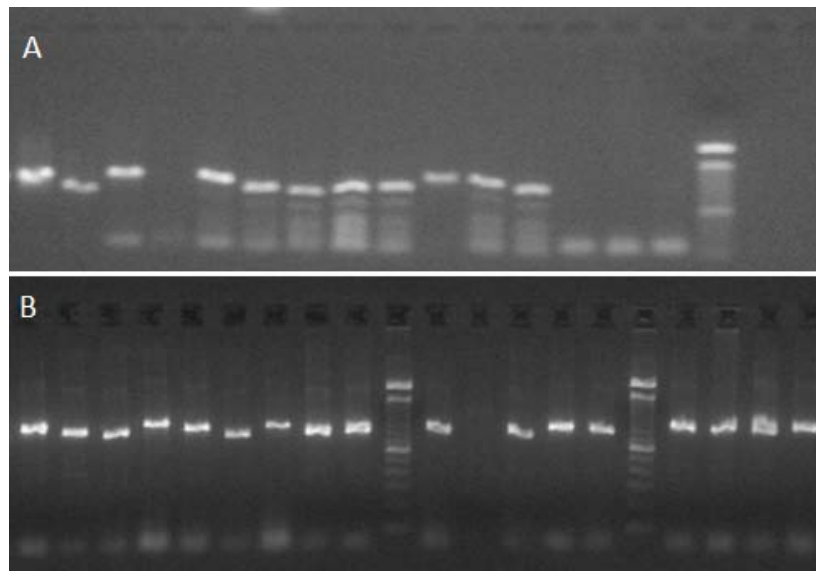


Figura 7. Geles mostrando PCR en (A) un gradiente de temperaturas de 50 a 65 °C; (B) amplificaciones del gen Cyt b.

En el caso de ND4 se usaron los primers GPND4-L y GPND4-H (Gonzalez-Porter *et al.* 2013); sin embargo, no hubo amplificación y se recurrió a utilizar los primers ND4 (CAC CTA TGA CTA CCA AAA GCT CAT GTA) y LEU (CAT TAC TTT TACT TGG ATT TGC ACC A) diseñados para este trabajo. Se

realizó un gradiente de temperaturas de entre 55 y 65 °C, obteniendo una temperatura de alineamiento de 58 °C (Figura 8).

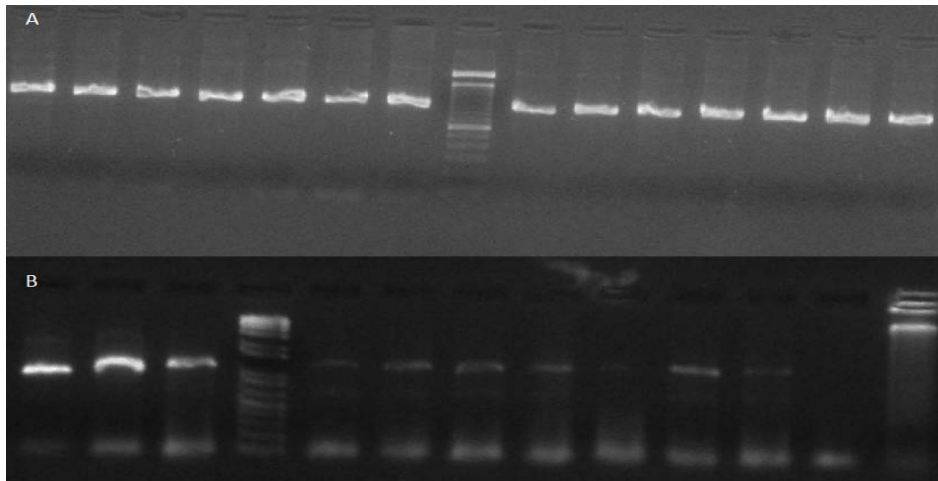


Figura 8. Geles mostrando PCR en (A) un gradiente de temperaturas 55 a 65 °C; B) amplificaciones de ND4.

Para las reacciones de amplificación para el intrón R35 se usaron los primers R35Ex1 ACGA TTC TCG CTG ATT CTT GC y R35Ex2 GCA GAA AAC TGA ATG TCT CAA AGG de (Figura 9).

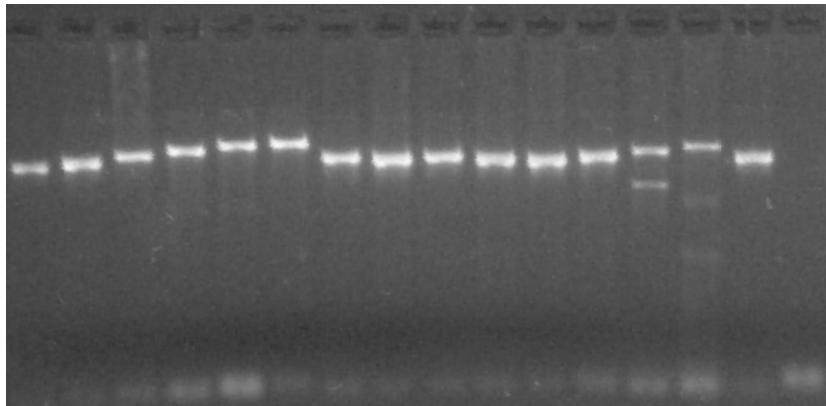


Figura 9. Gel mostrando PCR en R35.

La electroforesis en gel de agarosa al 1% (0.01 g de agarosa/1 ml de tampón TAE 1x), se realizó de acuerdo con la metodología descrita anteriormente. El gel fue fotografiado en el transiluminador con una cámara

digital. Con base en la presencia e intensidad de la banda de cada muestra se determinó cuál era la indicada para mandar a secuenciar.

Los productos de PCR se enviaron a secuenciar al Laboratorio de Biología Molecular y de la Salud del instituto de Biología de la UNAM, con la M. en C. Laura Márquez.

Edición de secuencias

Las secuencias fueron editadas con el programa BioEdit (Hall, 1999) y los cromatogramas fueron revisados manualmente con el programa FinchTV (Figura 10). Adicionalmente cada secuencia fue comparada con la información disponible en Genbank por medio de la herramienta de alineamiento local *Blast*, que permitió establecer en todos los casos una identidad de 96-99 % de las secuencias obtenidas.

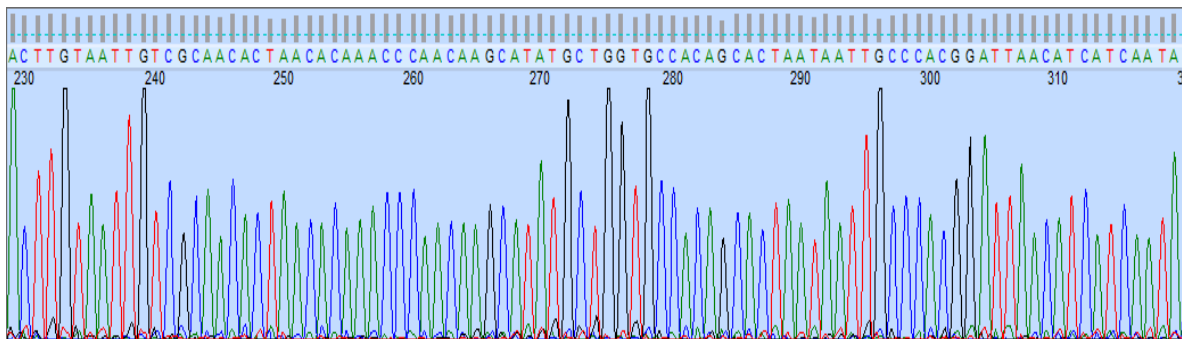


Figura 10. Sección de un espectrofotograma, entre 230 pb y 320 pb aproximadamente, de una secuencia de ND4.

Las secuencias fueron alineadas empleando el método de alineamiento global Clustal W (Thompson *et al.* 1994) implementado en el software MEGA 6 (Tamura *et al.* 2011). Se hizo la traducción a aminoácidos y las proporciones de bases para confirmar que no se amplificaron pseudogenes.

Diversidad genética

Indicadores de diversidad genética estándar tales como número de haplotipos mitocondriales (h), número de sitios polimórficos (S_n), diversidad genética (H), número promedio de diferencias entre pares de secuencias (π), así como diversidad nucleotídica (k), fueron estimados para *C. angustatus* de forma integral como especie con el programa DNAsp 10 (Rozas *et al.* 1999). En el caso del locus nuclear (intrón R35), los alelos en fase haploide fueron inferidos a partir de la identificación de individuos heterocigos (Moyle *et al.* 2012; Sangster *et al.* 2010), con el programa PHASE 2.1 (Rozas *et al.* 2003). En el caso de los loci haploides (Cyt b y ND4) se obtuvieron los haplotipos únicos con DNAsp (Swofford y Rozas. 2009). La saturación de nucleótidos fue analizada graficando el número absoluto de transiciones y transversiones contra los valores de distancia genética mediante el uso del programa DAMBE v.5.1.5 (Xia y Xie, 2001), del cual se obtuvo el valor del coeficiente R^2 que indica el grado de asociación entre las variables y el ajuste de los datos.

Se implementaron diferentes estadísticos para determinar si los marcadores utilizados asumen un modelo de evolución neutral: D de Tajima (Tajima, 1989), F (Fu y Li, 1993) y F_s (Fu, 1997). La significancia estadística de estos estimadores se obtuvo a partir de simulaciones de coalescencia con el programa DNAsp 5.10 (Librado y Rozas, 2009).

Distribución de diferencias pareadas (distribución mismatch)

Para evaluar si los datos son consistentes con la ocurrencia de selección a nivel molecular o de eventos de expansión demográfica en el pasado, utilizando el programa DNAsp 5.10 (Librado y Rozas, 2009) se calculó la distribución observada del número de diferencias entre pares de haplotipos.

Diferencias entre y dentro de las poblaciones

El grado de diferenciación de cada uno de los sitios de muestreo respecto al conjunto de las muestras se determinó por análisis jerárquicos de la varianza molecular (AMOVA), utilizando el programa GenAlEx 6.0 (Peakall y Smouse 2006). El análisis considera las distancias genéticas entre los haplotipos y sus frecuencias, definiendo grupos de poblaciones a fin de evaluar si la estructura genética planteada por el operador es significativa. El AMOVA descompone la varianza en: a) diferencias en la composición de haplotipos entre individuos de diferentes poblaciones (varianza dentro de una población); b) diferencias en la composición de haplotipos de individuos de diferentes poblaciones (varianza entre poblaciones) y c) diferencias en la composición de haplotipos entre grupos de poblaciones (varianza entre regiones F_{ST}).

Aislamiento por distancia

Con el fin de conocer si el flujo génico en una especie sigue un modelo de aislamiento por distancia; es decir, si existe una correlación entre las distancias geográficas y las distancias genéticas en los distintos pares de poblaciones, se realizó una prueba de Mantel con el software GenAlEX 6.0 (Peakall y Smouse,

2012). Este análisis supone que las diferencias genéticas se incrementan con la distancia geográfica. Se utilizaron dos matrices: una de distancias genéticas y otra de distancias geográficas.

Análisis filogenéticos

En este estudio, la reconstrucción filogenética de los marcadores amplificados se analizó por separado y de forma concatenada con los tres marcadores. Se analizaron mediante los métodos de Inferencia Bayesiana, implementada con el programa MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001) y de Máxima Verosimilitud, con el programa RAxML GUI (Silvestro y Michalak, 2001).

La reconstrucción a partir del método probabilístico bayesiano utilizó la información de los modelos de sustitución reportados por el programa JModeltest 3.7 (Posada y Crandall, 1998). El modelo sugerido por el programa en ambos marcadores fue GTR-G. Los análisis bayesianos utilizaron dos corridas independientes de 30,000,000 de generaciones, muestreando una de cada 1,000 y cuatro cadenas de Márkov (Márkov Chain Monte Carlo) y se eliminaron 300 árboles que corresponden al 30%.

Para el análisis de Máxima Verosimilitud se implementó una búsqueda con el algoritmo CNI y el apoyo de los nodos evaluados mediante bootstrap no paramétricos sobre 10,000 réplicas, incorporando un modelo de sustitución de GTR+GAMMA.

Redes de haplotipos

Una forma de representar las relaciones entre los haplotipos es por medio de redes de haplotipos o “networks”. Posada y Crandall (2001) argumentan que las redes definidas como gráficos conectados por círculos son las más apropiadas para representar las relaciones dentro de una especie, dado que las genealogías intraespecíficas no se disponen de manera jerárquica y muchos supuestos de los métodos tradicionales sobre construcción de árboles filogenéticos (e.g. árboles totalmente dicotómicos) no se cumplen cuando se realizan este tipo de estudios.

Las genealogías de genes trazan las relaciones evolutivas entre haplotipos (alelos en poblaciones); sin embargo, la selección, fluctuación en tamaño poblacional, deriva génica, aislamiento, afectan la topología de estas genealogías produciendo relaciones reticuladas que no siempre representan de forma adecuada los resultados de los análisis filogenéticos (Bandelt *et al.* 1999).

Las relaciones entre los haplotipos dentro de cada una de las localidades de muestreo fueron inferidas a partir de la red de haplotipos construida con el programa Network 4.2.0.0 g (Bandelt *et al.* 1999). Este instrumento introduce vectores medios que representan haplotipos intermedios ausentes a partir del número de sustituciones pareadas. Los mapas de distribución de los haplotipos para cada gen por separado se realizaron en el programa ArcMap 10.1 con base en los datos de georreferenciación de los sitios de colecta.

Análisis de estructura genética

Finalmente, se realizó un análisis bayesiano de agrupación genética sin considerar *a priori* las localidades de colecta, considerando la evidencia concatenada de los tres marcadores moleculares, con el programa Structure (Pritchard *et al.* 2000). El programa estima el número más apropiado de *clusters* o conglomerados (K), así como la asignación de cada individuo a determinado grupo genético a partir de su genotipo. En el modelo más simple, “*no-admixture model*”, se asume que cada individuo pertenece a un grupo simple; en el más general, “*admixture model*”, se estiman proporciones de mezcla para cada individuo. El software utiliza cadenas de Markov con un procedimiento de Monte Carlo (MCMC) y estima la probabilidad de que los datos concuerden con la hipótesis de K agrupamientos genéticos.

Este programa se diseñó para trabajar con marcadores codominantes como los microsátelites; sin embargo, es posible usarlo con secuencias (Poulakakis *et al.* 2008). Primero, la base de datos de secuencias se transforma con el programa fastStructure (Raj *et al.* 2014) el cual transforma las secuencias en un formato de números y deja sólo los sitios polimórficos para ser analizados. Para la corrida del programa se utilizaron los parámetros de modelo de mezcla y frecuencias correlacionadas. Sólo se especificó que los datos son haploides utilizando 7,000 pasos iniciales de calentamiento seguidos de 70,000 simulaciones. Se realizaron 16 corridas independientes para cada uno de los K supuestos y se utilizó un valor de $Q > 0.7$ como valor de corte para la asignación de individuos a poblaciones.

Distribución potencial

Para determinar si existieron o existen condiciones bioclimáticas que influyeron en la distribución de cada uno de los linajes de *Claudius angustatus* encontrados en el estudio filogeográfico, se implementó un análisis de distribución potencial separando ambos linajes. También se realizó un análisis global para evaluar la distribución potencial de la especie en la actualidad comparándola con la distribución esperada durante el Pleistoceno buscando evidencias sobre la existencia de algún refugio pleistocénico o barreras geográficas que impulsaron la separación de los linajes.

Este análisis se realizó con Software Maxent, incluyendo las 19 capas disponibles (Anexo 3 y 35 puntos de organismos georreferenciados (15 localidades de esta investigación y 20 de la literatura). Se hizo un muestreo con 15% de los puntos, con una regularización múltiple de 1 y número máximo de 10,000 puntos, y una sola réplica tipo bootstrap. Además se incluyeron las mismas capas, pero con la información de hace 20,000 años durante el Pleistoceno (Hijmans *et al.* 2005)

La información obtenida se analizó tomando como punto la descripción 10% de certeza de presencia con un valor de ocurrencia de 0.328. Las capas se corrieron en el programa ArcMap 10.1. Tanto la proyección de distribución actual como la del Pleistoceno, se reclasificaron con el factor de valor de ocurrencia 0-0.327 como ausencia y valores de ocurrencia mayores de 0.328 como presencia. Para la distribución actual se añadió la capa hidrológica de CONABIO.

RESULTADOS

Se logró la extracción de ADN de los 91 ejemplares colectados. La concentración de ADN obtenida de cada uno de ellos varió de 22 a 1150 nm. Se lograron amplificar 1,300 pb para el intrón R35, 990 pb para el Cyt b y 900 pb para ND4. Cada una de las secuencias obtenidas fueron comparadas en GenBank y en todos los casos la identidad estuvo entre el 96 y el 99%.

Composición nucleotídica

La composición de nucleótidos para los diferentes marcadores moleculares se observa de forma detallada en la Cuadro 2 así como la proporción de los tipos de sustituciones.

Cuadro 2. Composición nucleotídica de los diferentes marcadores.

	Adenina (%)	Citosina (%)	Guanina (%)	Timina (%)	Transiciones (%)	Transversiones (%)
Cyt b	30.41	29.84	11.98	27.74	57.14	42.56
ND4	34.71	25.44	11.81	28.04	56.14	43.56
R35	28.43	17.80	21.76	32.01	49.14	50.86
Concatenado	30.4	23.1	16.6	29.9	52.36	47.64

Diversidad genética

Los índices de diversidad haplotípica (h) fueron altos para los cuatros marcadores moleculares, pero presentaron una diversidad nucleotídica (π) baja. Las diferencias pareadas (k), la D de Tajima (D) y los estadísticos F (F de Fu y Li y Fs de Fu) en los marcadores mitocondriales no fueron significativos; mientras que para el intrón indican desviaciones significativas de la neutralidad (Cuadro 3).

Cuadro 3. Diversidad haplotípica (h), diversidad nucleotídica (π), diferencias pareadas (k), la D de Tajima (D) y los estadísticos F (F de Fu y Li y F_s de Fu).

	h	π	k	D de Tajima	F de Fu y Li	F_s de Fu
Cyt b	0.621	0.002	1.592	-2.144, $P < 0.05$	0.899, $P < 0.01$	-1.642, $P < 0.01$
ND4	0.726	0.004	1.991	-1.755, $P < 0.01$	-3.872, $P < 0.02$	-3.699, $P < 0.02$
R35	0.821	0.003	3.252 ^o	-2.773, $P < 0.001$	-5353, $P < 0.02$	-5.119, $P < 0.02$
Concatenado	0.905	0.003	6.508	-2.459, $P < 0.001$	-5.096, $P < 0.02$	-4.874, $P < 0.02$

Análisis filogenéticos

Ambos métodos de inferencia filogenética generaron topologías altamente concordantes. Las muestras analizadas se agruparon en dos clados con los análisis de marcadores mitocondriales. Pero para el marcador nuclear, estas agrupaciones se pierden. Los dos clados se recuperan en el análisis concatenado.

Los análisis filogenéticos de Cyt b (Figura 11) fueron similares usando Máxima Verosimilitud (ML) y análisis Bayesianos (IB). La topología resultante evidenció dos grupos: uno ancestral, parafilético aquí denominando linaje 1, mayoritariamente al este del Coatzacoalcos, y uno derivado, monofilético, mayoritariamente al oeste del río Coatzacoalcos. Dos ejemplares de Tlacotalpan y uno de Minatitlán del linaje 1 se encontraron geográficamente al oeste del río Coatzacoalcos, y los ejemplares de Cárdenas del linaje 2, se encontraron al este del río Coatzacoalcos, mostrando una zona geográfica de traslape entre ambos linajes, o bien translocación de ejemplares de un linaje a otra zona geográfica.

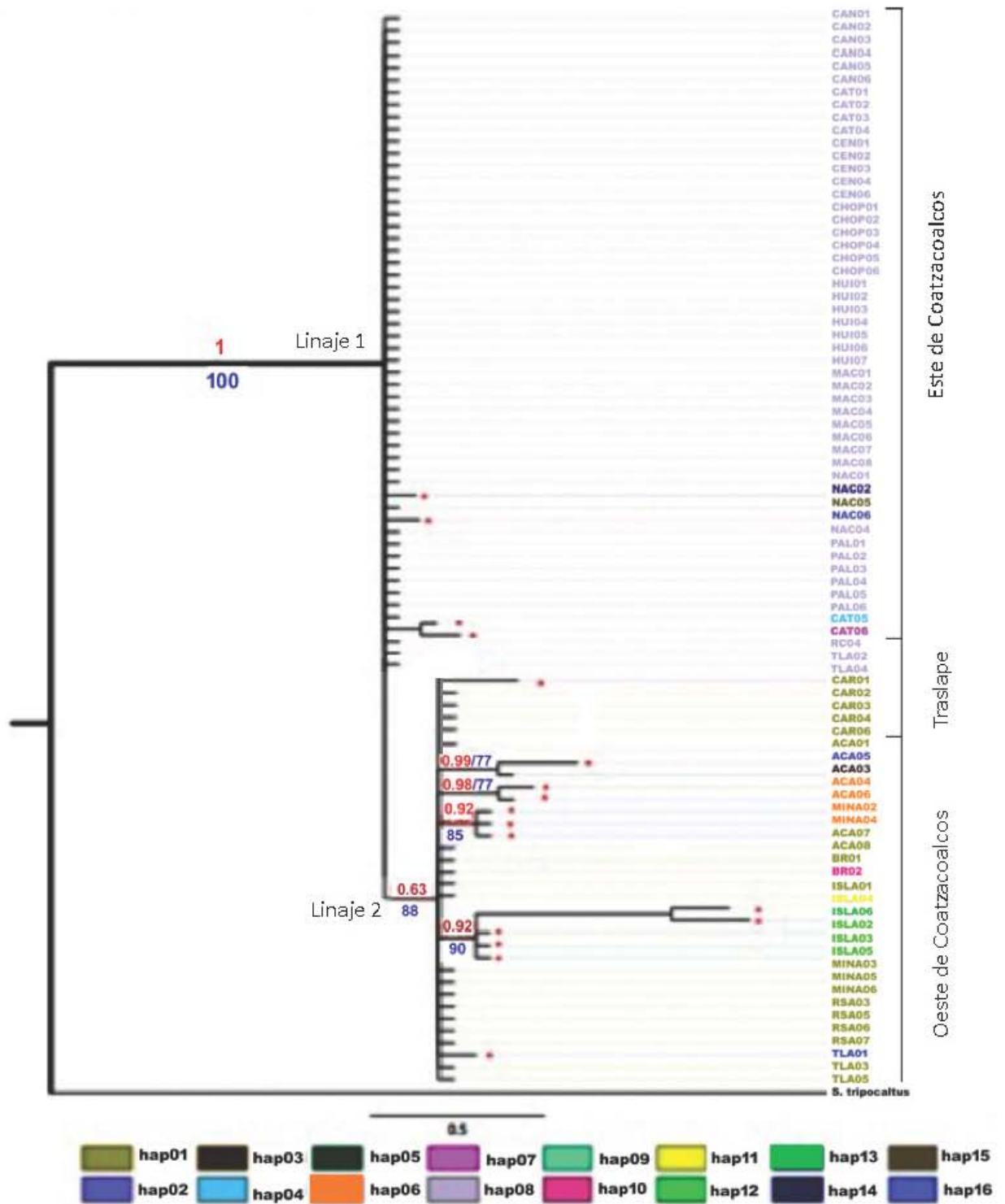


Figura 11. Filograma de consenso para Cyt b mostrando la misma topología con ML y BI. Los números adyacentes a los nodos son valores de probabilidad posterior (■) y bootstrap (■). Se muestran los valores de apoyo > 50% (*).

El linaje 1 está constituida mayoritariamente por el haplotipo 8. Dos ejemplares de Catazajá conforman una pequeño clado monofilético con los haplotipos únicos 4 y 7. El linaje 2 está dominado por el haplotipo 1. Existen cuatro clados: uno integrado exclusivamente por ejemplares del poblado de Isla, otro con dos individuos de Minatitlán y uno de Acayucan, y los otros dos con dos individuos de Acayucan cada uno. Las localidades de Acayucan y Minatitlán se encuentran próximas en el margen oeste del río Coatzacoalcos.

Existe congruencia en los resultados de los análisis filogenéticos de ND4 con respecto a los generados con Cyt b con ML y BI (Figura 12). Se recuperan los mismos agrupamientos. En linaje 1 de este grupo se desprende linaje 2 con soporte de bootstrap de 42% y de probabilidad posterior de 0.6 (Figura 12).

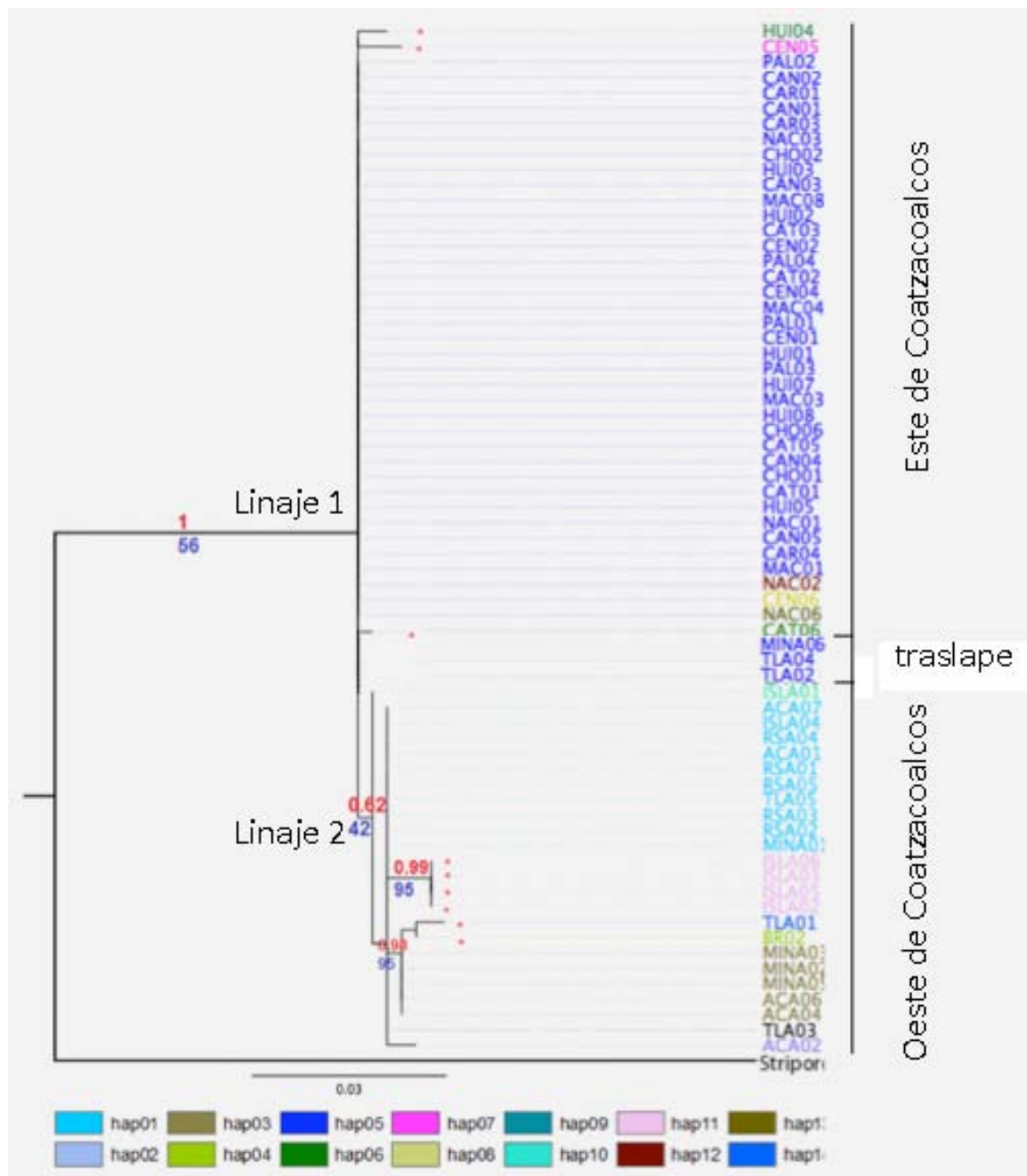


Figura 12. Filograma de consenso para ND4 mostrando la misma topología con ML y BI. Los números adyacentes a los nodos son valores de probabilidad posterior bayesiana (■) y bootstrap (■). Se muestran los valores de apoyo > 50% (*).

Al igual que con el Cyt b, el linaje 1 es parafilético y se distribuye mayoritariamente al este del río Coahuila de Zaragoza y está dominado por el haplotipo

5. El linaje 2, es monofilético y se distribuye mayoritariamente al oeste del río Coatzacoalcos y dominado por el haplotipo 1 y presenta mucha variación. Con este gen, solamente existe traslape de un organismo colectado en Minatitlán y dos de Tlacotalpan que pertenecen al linaje 1, pero geográficamente se encontraron al oeste del río Coatzacoalcos. A diferencia del Cyt b, los ejemplares colectados en Cárdenas, se agrupan de manera concordante con la geografía, al este del río Coatzacoalcos. Los dos ejemplares de Tlacotalpan siguen mostrando una distribución discordante y el ejemplar de Miguel Ángel R. Cabada no amplificó para este gen.

El linaje 1 engloba a 41 individuos de las localidades de Las Choapas, Cárdenas, Huimanguillo, Centla, Comalcalco, Macuspana, Catazajá, Palizada y Candelaria, un ejemplar de Tlacotalpan y otro de Minatitlán y no se estructura en clados. El linaje 2 contiene 24 ejemplares de las localidades de Boca del río, Isla, Tlacotalpan, Acayucan y Minatitlán. Dentro del linaje 2 existen dos clados; el primero agrupa cuatro individuos de la localidad de Isla y el segundo uno de Boca del Río, uno de Tlacotalpan, dos de Acayucan y dos de Minatitlán.

Las topologías resultantes con el intrón R35 no reflejan ningún patrón filogeográfico en particular y la distribución de los individuos se entremezclan a lo largo del área de distribución de *Claudius angustatus*. El haplotipo 8 es dominante en toda la distribución. Los árboles de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana son similares, generando un apoyo de bootstrap de 80% y una probabilidad posterior de 1 (Figura 13).

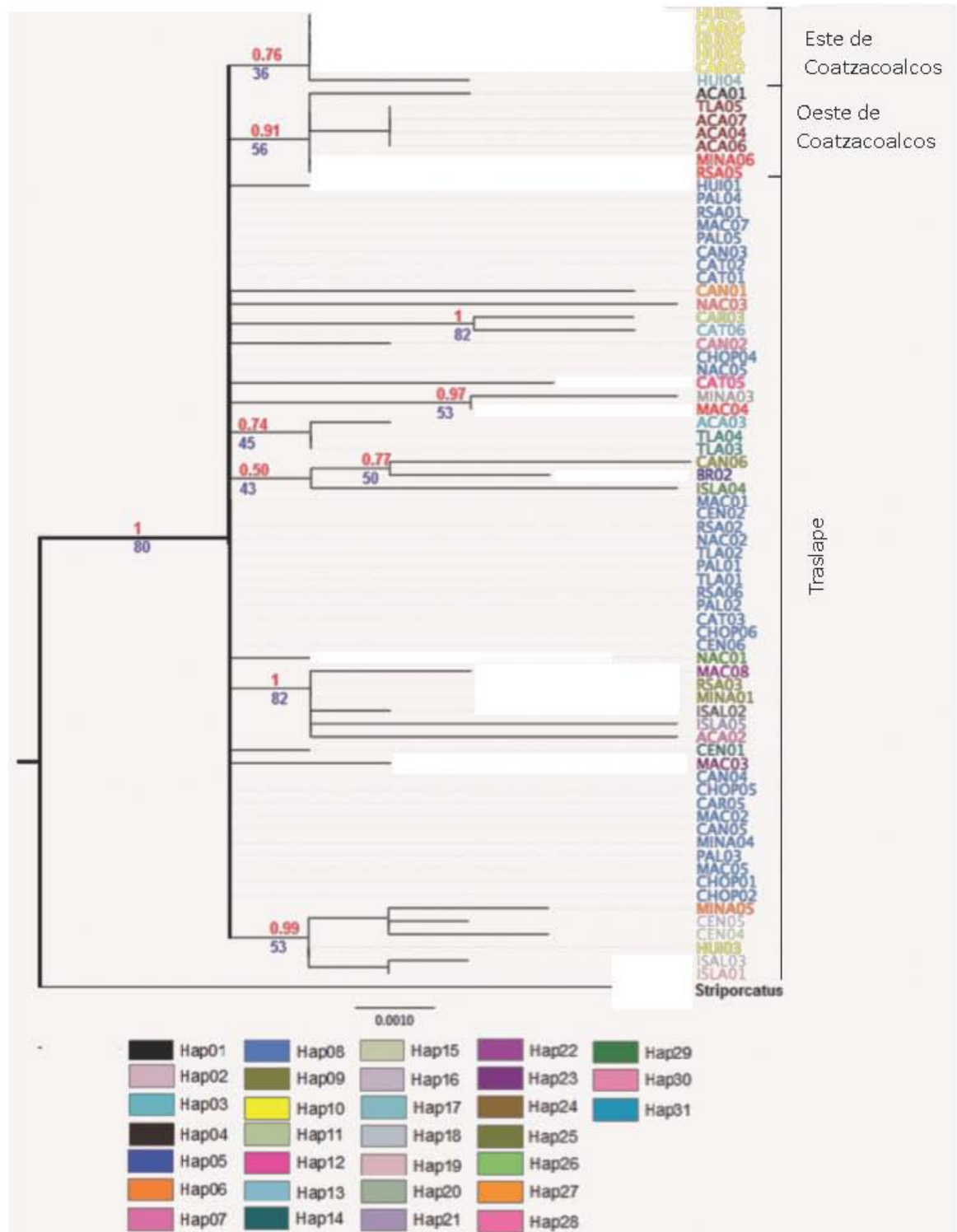


Figura 13. Filograma consenso para el intrón R35. Se obtuvo la misma topología con ML y BI. Los números adyacentes a los nodos son valores de probabilidad posterior bayesiana (■) y bootstrap (■). Se muestran los valores de apoyo > 50% (*).

Con este intrón se forman ocho clados. De estos, el primero está conformado por individuos de Cárdenas y Huimanguillo, definidos por los haplotipos 10 y 17, es la única agrupación restringida al este del río Coatzacoalcos; y el segundo está conformado por individuos de Talcotalpan, Acayucan y Minatitlán y Miguel Ángel R. Cabada, definidos por los haplotipos 01, 04, 24 y 28, es la única agrupación restringida al oeste del río Coatzacoalcos. Los demás grupos están constituidos por individuos provenientes de cualquiera de las dos regiones.

En el análisis concatenado resultó similar usando ML y BI con un apoyo de bootstrap de 56% y una probabilidad posterior de 1.0. En el árbol surge un clado que conforma al linaje 2, con apoyos de bootstrap de 50% y probabilidad posterior de 0.5. Este linaje se ve mejor soportado con los genes Cyt b (con 63% y 0.8) y ND4 (42% y 0.6).

La topología del análisis concatenado es concordante con las topologías encontradas con los genes mitocondriales Cyt b y ND4 recuperando los linajes 1 y 2 asociados al este y oeste del río Coatzacoalcos respectivamente. El linaje 1 se integra por 41 individuos colectados al este del río Coatzacoalcos, salvo dos ejemplares de Tlacotalpan y uno de Minatitlán al oeste del río (Figura 14). En cambio el linaje 2 se encuentra exclusivamente distribuido al oeste del río Coatzacoalcos desde Boca del Río a Minatitlán. El linaje 1, está dominado por el haplotipo 1 y no se aprecia ningún haplotipo dominante para el linaje 2.

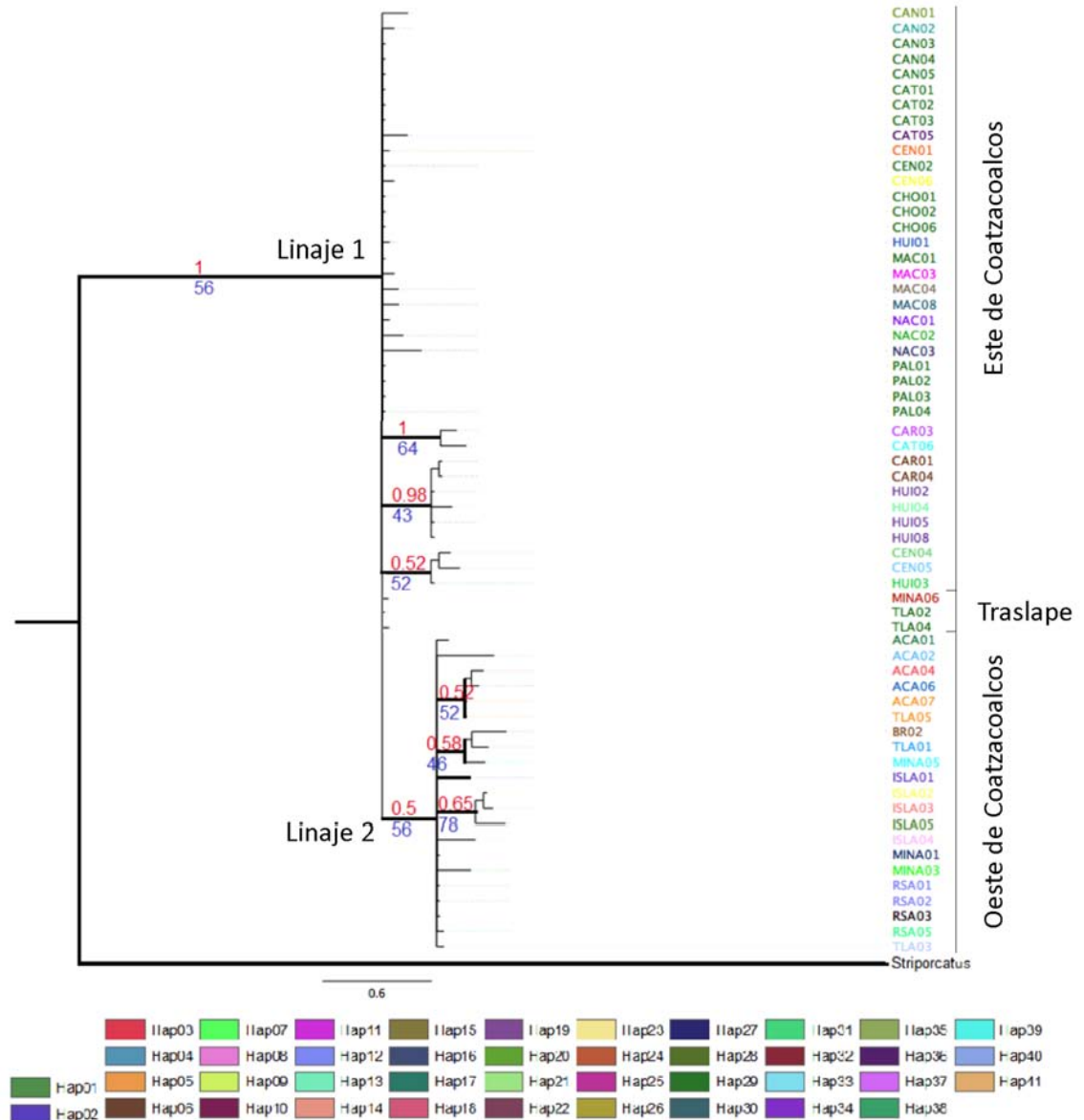


Figura 14. Filograma consenso para el análisis concatenado, obteniéndose la misma topología con ML y BI. Los números adyacentes a los nodos son valores de probabilidad posterior bayesiana (■) y bootstrap (■). Se muestran los valores de apoyo > 50% (*).

Redes de haplotipos

Para Cyt b se identificaron 16 haplotipos con un índice de diversidad haplotípica de $h = 0.621$. La red de haplotipos muestra dos grupos de haplotipos separados por una mutación. El grupo más grande lo integran cuatro haplotipos que tienen como centro el haplotipo 8. Estos individuos se encuentran principalmente al

este de río Coatzacoalcos. El segundo grupo lo integran 11 haplotipos, con el haplotipo 1 como centro, la mayoría de estos organismos se encontraron al oeste del río Coatzacoalcos, salvo los individuos de Cárdenas (Figura 15).

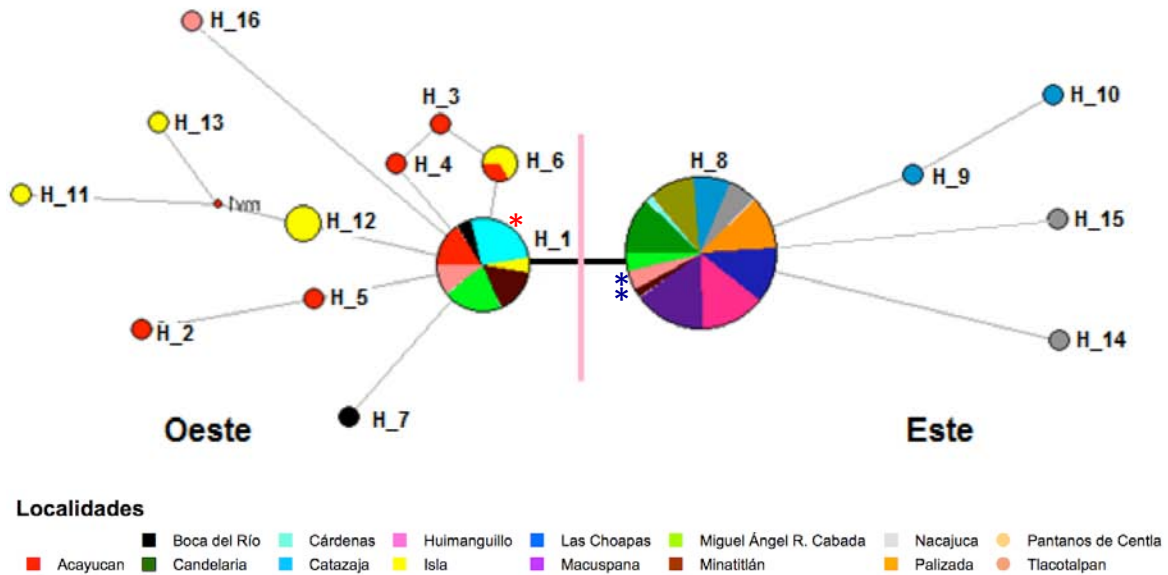


Figura 15. Red de haplotipos con el marcador Cyt b, que muestra las relaciones entre haplotipos de *Claudius angustatus*. Asteriscos rojos son individuos capturados en áreas que pertenecen al este del río Coatzacoalcos y asteriscos azules son individuos capturados en áreas que pertenecen al oeste del río Coatzacoalcos.

El haplotipo 8 fue el más común y se presentó en 57.9% de los individuos muestreados en 12 localidades, sobre todo al este del río Coatzacoalcos. El siguiente haplotipo común fue el 1 presente en 16.7% de las muestras y en siete localidades, principalmente al oeste del río Coatzacoalcos. Otros tres haplotipos se presentaron en más de un individuo. El haplotipo 6 se presentó en un individuo de Acayucan y dos de Minatitlán (2.46%), el haplotipo 12 fue exclusivo de Isla (2.46%), y el 16 fue exclusivo de Tlacotalpan 18 (3.4%). Los restantes 11 haplotipos se encontraron en un solo individuo que en conjunto representan 10.5% de los individuos.

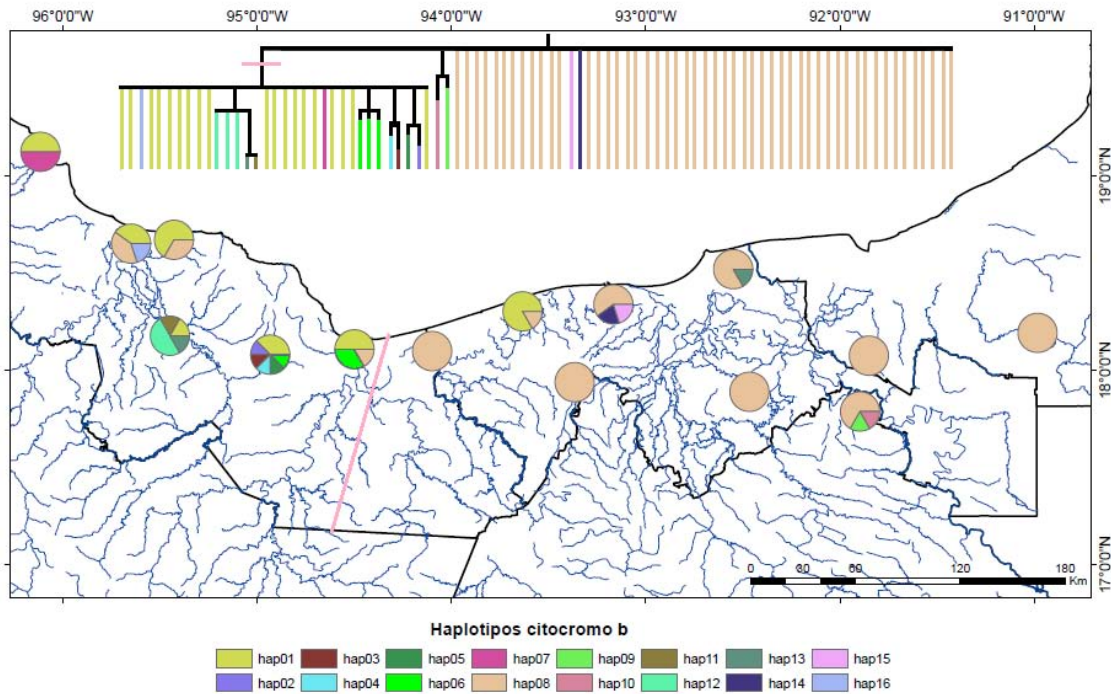


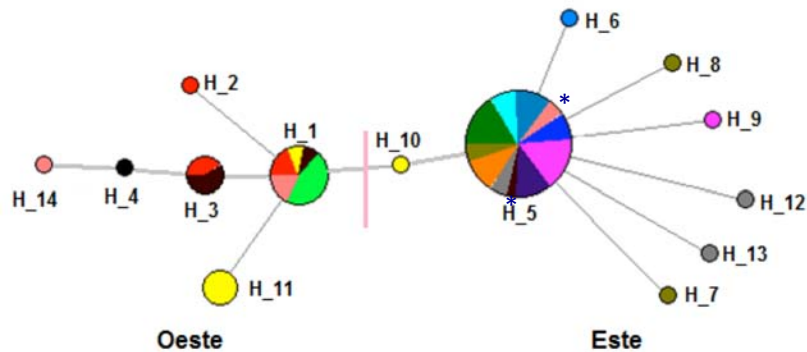
Figura 16. Mapa que muestra la proporción de haplotipos de Cyt b, en cada una de las localidades de *Claudius angustatus*, la línea rosa en el mapa y cladograma representan la división del río Coatzacoalcos.

Las localidades que mayor número de haplotipos presentaron fueron Acayucan con seis, Isla con cuatro, mientras Tlacotalpan, Comalcalco y Catazajá presentaron tres cada una. Existen cinco localidades con presencia única de del haplotipo 8 dominante (Figura 16).

El ND4 tiene 14 haplotipos con un índice de diversidad haplotípica $h = 0.726$. La red de haplotipos con ND4 es similar a la obtenida con Cyt b, recuperando dos grupos con una correspondencia geográfica similar. El primer grupo está conformado por individuos con el haplotipo 5 junto con otros seis haplotipos y el segundo grupo incluye al haplotipo 1 y otros cinco haplotipos.

El haplotipo 5 es el más frecuente y se presentó en 48.5% de los individuos muestreados en 11 localidades, principalmente al este del río Coatzacoalcos a excepción de dos colectados en Tlacotalpan y uno de

Minatitlán al oeste (Figura 17). El haplotipo 1 estuvo presente en 20.6% de las muestras y fue exclusivo de cinco localidades al oeste río Coatzacoalcos. Las poblaciones al oeste del río Coatzacoalcos tienen mayor número de haplotipos (Figura 18).



Localidades

- | | | | | | | |
|----------------|--------------|----------------|---------------|--------------------------|--------------|----------------------|
| ■ Boca del Río | ■ Cárdenas | ■ Huimanguillo | ■ Las Choapas | ■ Miguel Ángel R. Cabada | ■ Nacajuca | ■ Pantanos de Centla |
| ■ Acayucan | ■ Candelaria | ■ Catazaja | ■ Isla | ■ Macuspana | ■ Minatitlán | ■ Palizada |
| | | | | | | ■ Tlacotalpan |

Figura 17. Red de haplotipos con el marcador ND4, que muestra las relaciones entre haplotipos de *Claudius angustatus*. Asteriscos azules son individuos capturados en áreas que pertenecen al oeste del río Coatzacoalcos.

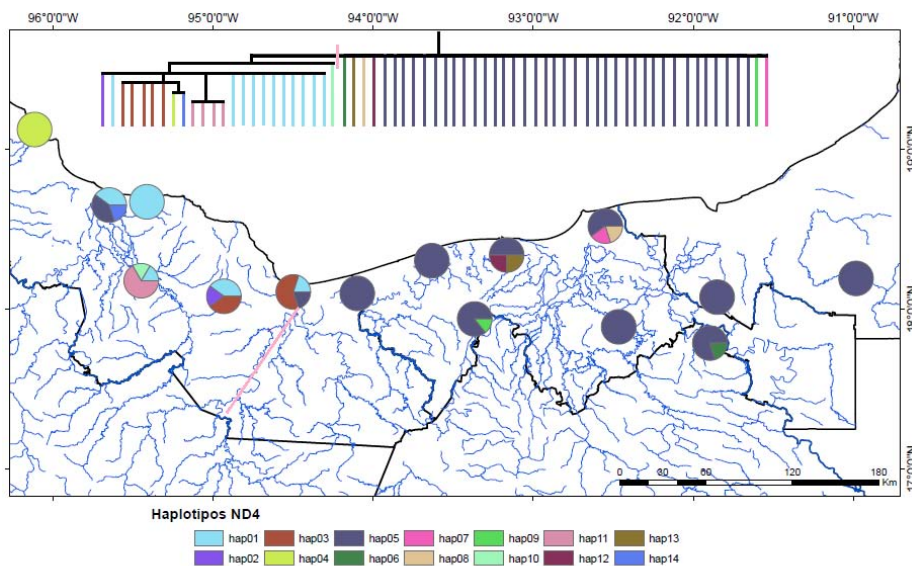


Figura 18. Mapa que muestra la proporción de haplotipos de ND4, en cada una de las localidades de *Claudius angustatus*, la línea rosa en el mapa y cladograma representa la división del río Coatzacoalcos.

Con el intrón R35 no se rescató una estructura similar a la encontrada con los genes mitocondriales y tampoco fue posible rescatar una estructura definida. Se identificaron 31 haplotipos con índice de diversidad haplotípica de $h = 0.821$. A diferencia con los marcadores mitocondriales, el haplotipo más común (haplotipo 8) se encontró en 43.05% de los individuos de 11 de las 16 localidades muestreadas a ambos lados del río Coatzacoalcos (Figura 19). El siguiente haplotipo más común fue el 10, presente en 7.4% de las muestras en dos localidades al oeste del río Coatzacoalcos. Con el intrón R35 las localidades tiene más de tres haplotipos a excepción de Las Choapas y Catazaja que presentan un solo haplotipo (Figura 20).

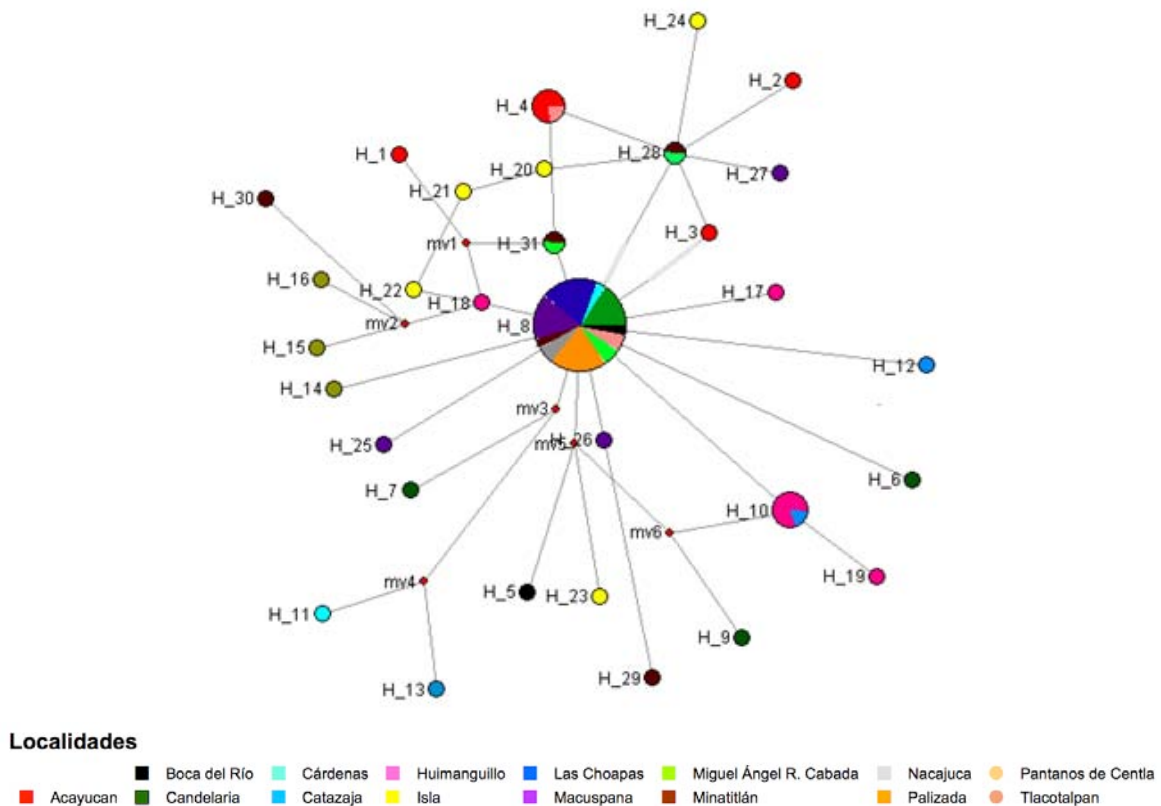


Figura 19. Red de haplotipos con el intrón R35, que muestra las relaciones entre los individuos de *Claudius angustatus*.

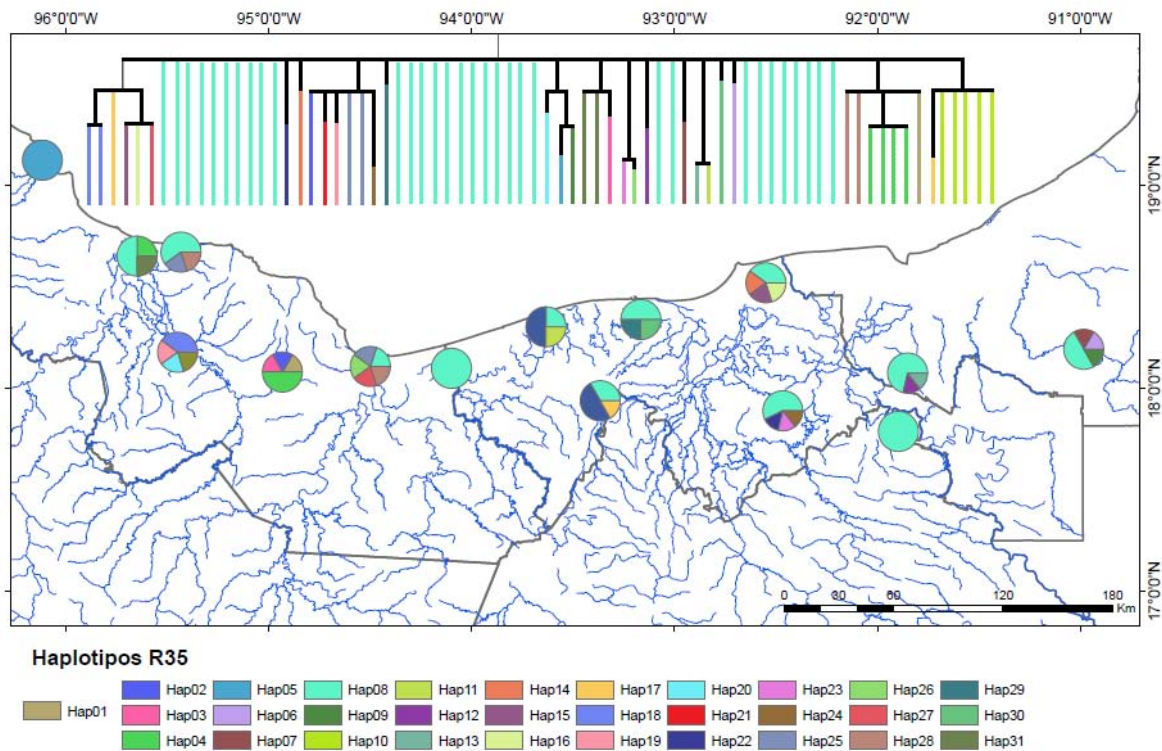


Figura 20. Mapa que muestra la proporción de haplotipos del intrón R35 en cada una de las poblaciones de *Claudius angustatus*.

En el análisis concatenado se identificaron 41 haplotipos, presentando una diversidad haplotípica de $h = 0.804$ y mostrando cierto grado de estructura. En éste se observa un grupo bien definido con el haplotipo 9 al centro y otros 20 haplotipos en forma de estrella. Dos haplotipos, el 11 y el 12 son el puente entre este grupo y el resto de haplotipos que no forman una estructura definida, pero presentan una tendencia a agruparse en torno del haplotipo 37 integrado por otros 18 haplotipos al oeste del río Coatzacoalcos.

El haplotipo 9 fue el más común presente en 30.6% de los individuos en siete localidades al este del río Coatzacoalcos (Figura 21) a excepción de dos individuos de Tlacotalpan y uno de Minatitlán. El siguiente haplotipo más común fue el 19, presente en 4.8% de las muestras en la localidad de Huimanguillo.

Otros cuatro haplotipos estuvieron presentes en 3.2% de los individuos cada uno; el haplotipo 5 en un ejemplar de Acayucan y otro de Tlacotalpan, el haplotipo 30 en un individuo de Minatitlán y otro de Lerdo de Tejada y el haplotipo 37 en dos ejemplares de Lerdo de Tejada. Todas las localidades presentaron más de tres haplotipos y sólo en las localidades de Las Choapas y Palizada se presentó un solo haplotipo (Figura 22).

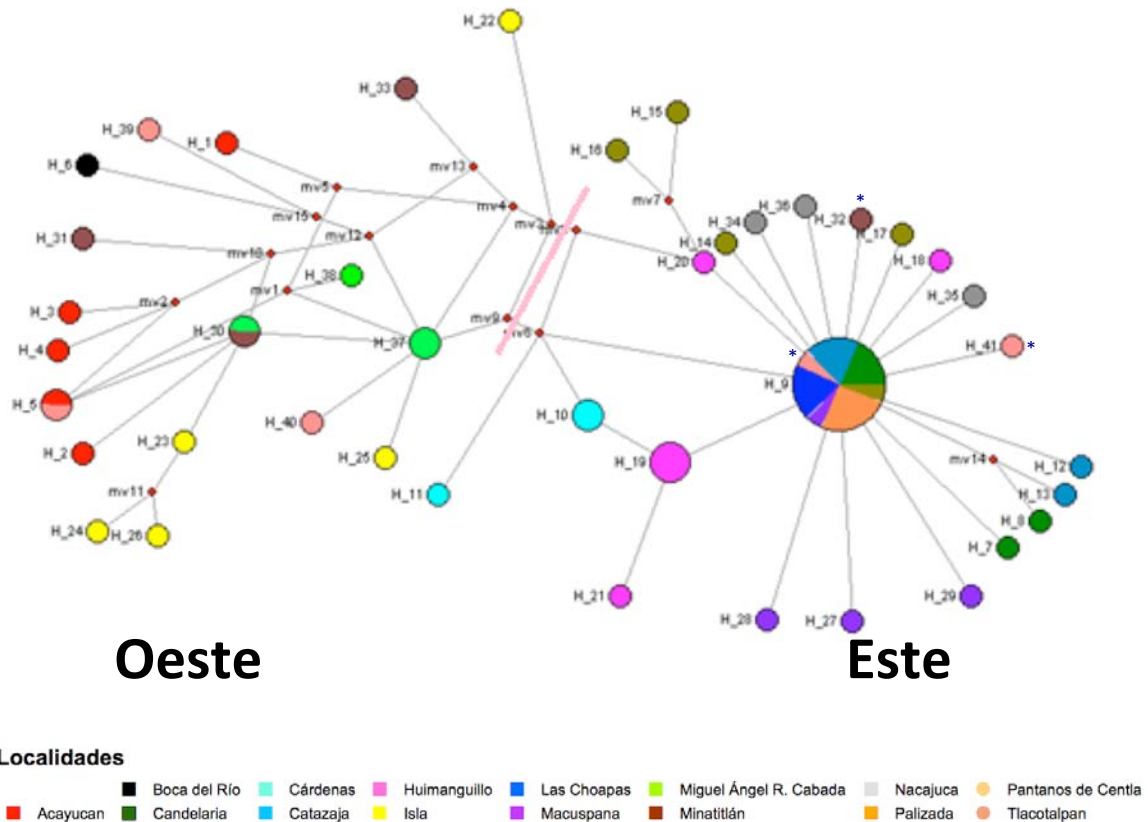


Figura 21. Red de haplotipos mediante un análisis concatenado. Asteriscos azules son individuos capturados en áreas que pertenecen al oeste del río Coatzacoalcos.

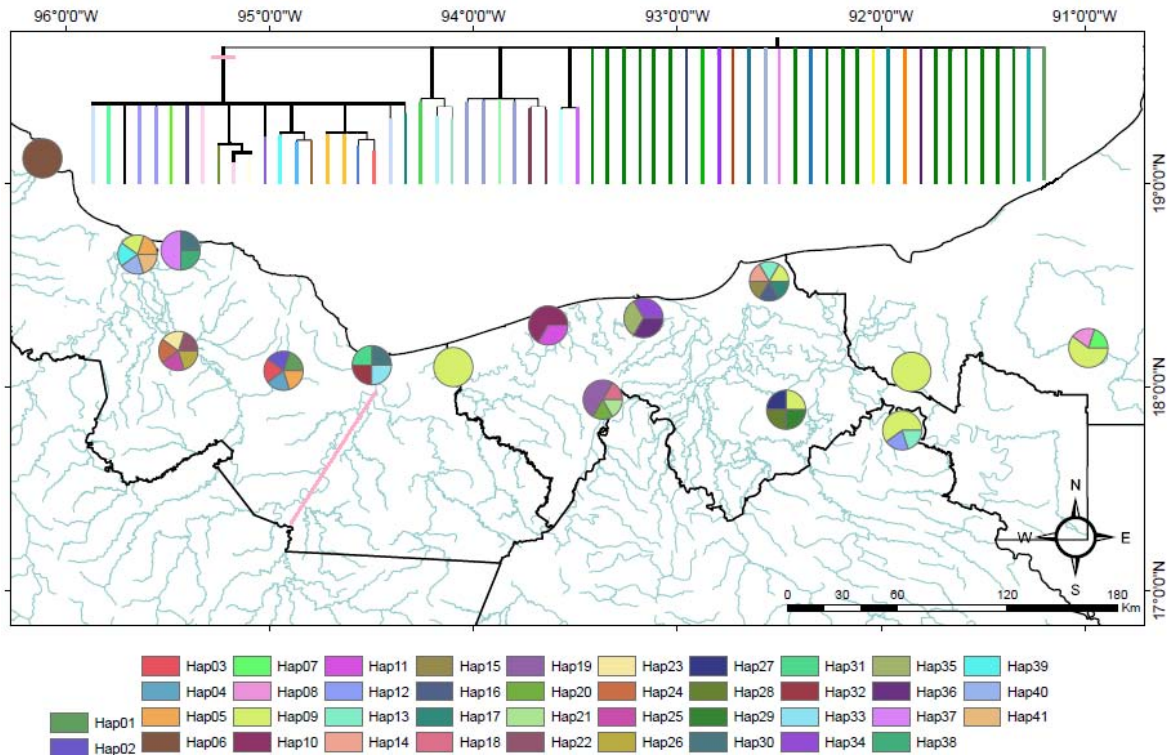


Figura 22. Mapa que muestra la proporción de haplotipos de forma concatenada en cada una de las poblaciones de *Claudius angustatus*.

Distribución de diferencias pareadas (distribución mismatch)

El análisis de distribuciones de diferencias pareadas con cada unos de los marcadores por separados y el análisis concatenado reflejan una historia demográfica estable, con distribuciones bimodales que no se ajustan a la hipótesis de expansión poblacional (Figura 23).

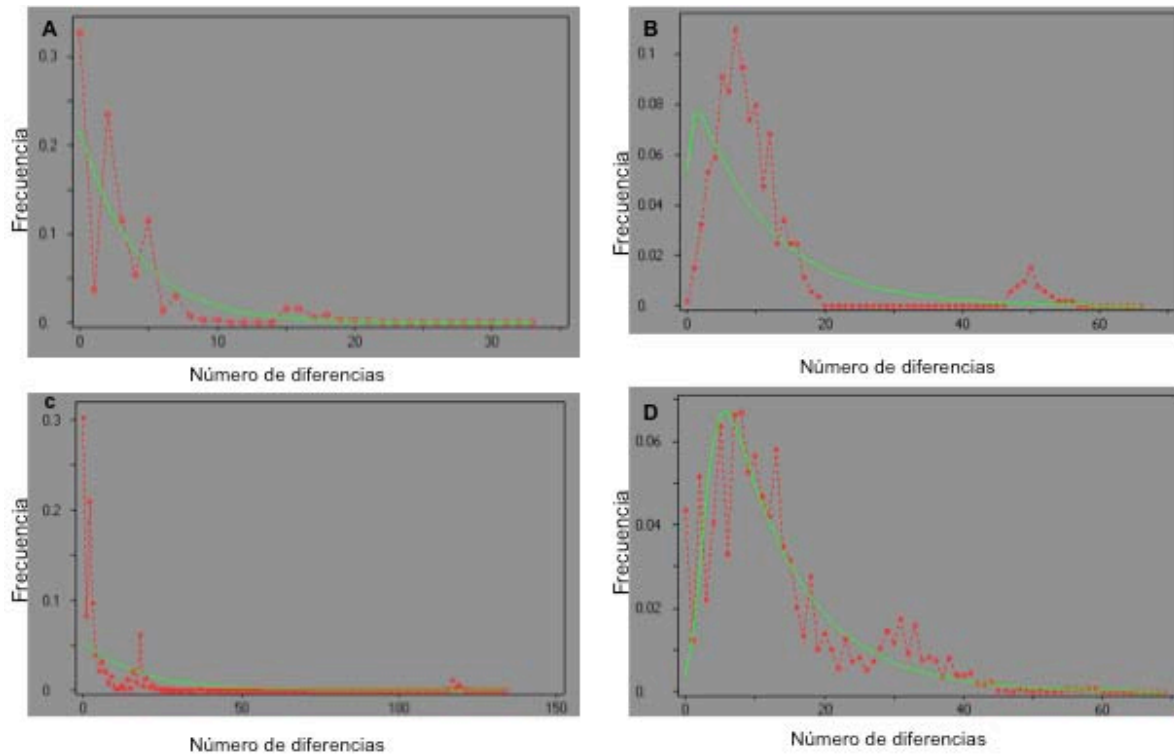


Figura 23. Distribuciones pareadas o “mismatch distributions”. A) Cyt b, B) ND4, C) Intrón R35 y D) Análisis concatenado.

Diferencias entre y dentro de las poblaciones

El análisis molecular de varianza (AMOVA) con el Cyt b mostró 97% de la variación estimada dentro de las poblaciones y el 3% entre las poblaciones. Para el caso de ND4 la variación dentro de las poblaciones fue de 98%, contra 2% de variación entre las poblaciones. En el Intrón R35 la variación dentro de las poblaciones fue de 99% y entre las poblaciones de 1%. Con los datos analizados de forma concatenada, la variación dentro de las poblaciones fue de 97%, mientras que entre poblaciones fue de 3% (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis jerárquico de la varianza molecular (AMOVA).

Marcador molecular	Dentro de las poblaciones (%)	Entre las poblaciones (%)
Cyt b	97	3
ND4	98	2
R35	99	1
Concatenado	97	3

Aislamiento por distancia

El coeficiente de correlación calculado con el test de Mantel entre las matrices de distancia genética y distancia geográfica resultó para Cyt b $r=0.199$ ($p=0.010$); para ND4 $r=0.138$ ($p=0.010$); para el intrón R35 $r=0.078$ ($p=0.020$) y para el análisis concatenado $r=0.260$ ($p=0.30$). En ninguno de los casos *C. angustatus* se ajusta a un modelo de aislamiento por distancia. No se observa una relación directa entre la distancia geográfica y la distancia genética (Figura 24).

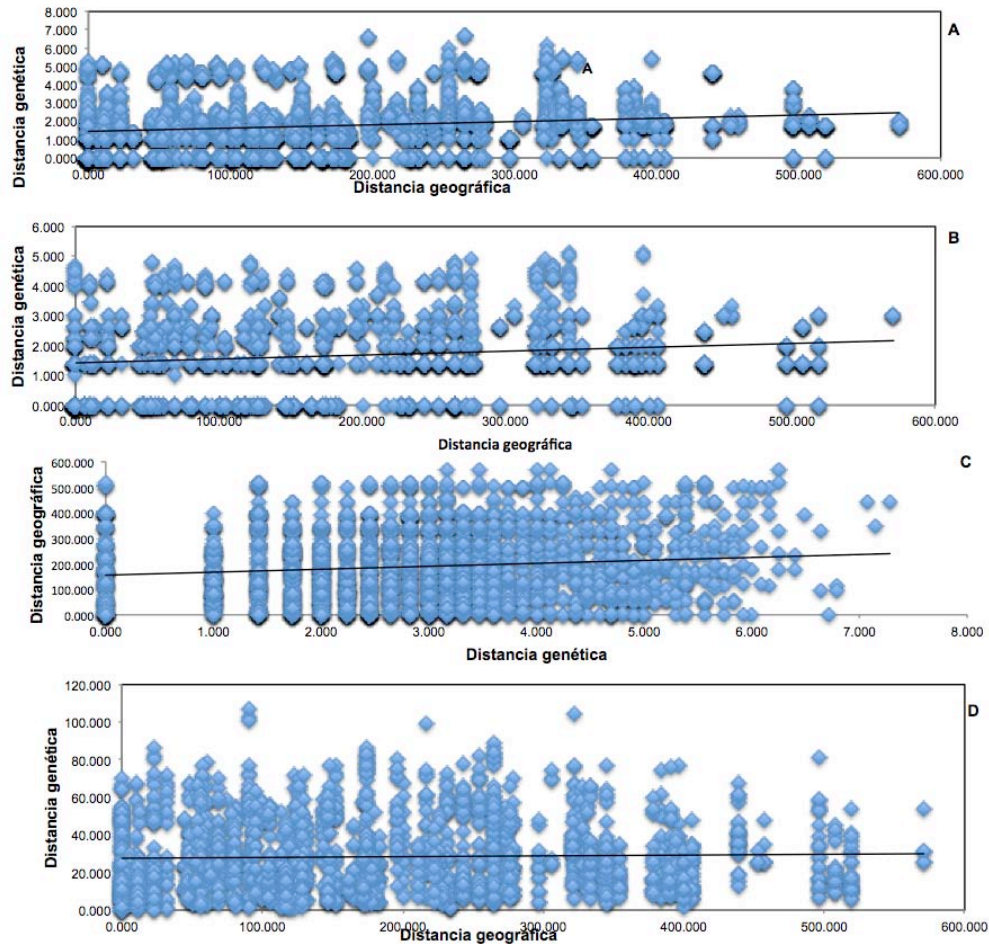


Figura 24. Gráfico obtenido a partir de las matrices de distancias geográficas y distancias genéticas. Correlación calculada a partir del test de Mantel. A) Cyt b, B) ND4, C) intrón R35 y D) Análisis concatenado.

Estructura poblacional

Con el programa STRUCTURE se identificó una estructuración poblacional con un valor máximo de grupos genéticos $K=2$ ($-\ln=3041.6$). Es importante destacar que las 15 corridas en $K=2$ mostraron idénticas soluciones de agrupamiento con valores similares de probabilidad de pertenencia (Q) para todos los individuos (Figura 25).

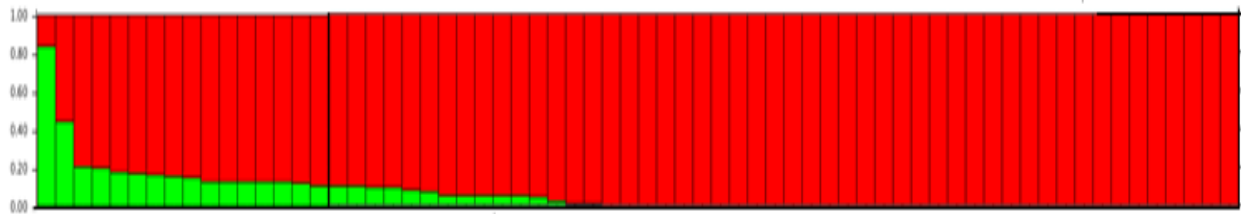


Figura 25. Estructura genética en la población de *C. angustatus* estimada el programa STRUCTURE considerando Cyt B, ND4 y R35 concatenado mostrando dos agrupamientos. Cada individuo es representado por una barra vertical. Los asteriscos representan los individuos colectados al oeste del río Coatzacoalcos.

El agrupamiento 1 (rojo) se compone por 33 individuos pertenecientes a ejemplares colectados en las localidades al este del río Coatzacoalcos y dos de Tlacotalpan, al oeste. Los 29 individuos del agrupamiento 2 se encontraron exclusivamente al oeste del Coatzacoalcos. Este análisis tiene concordancia con el análisis filogenético concatenado, en donde se rescató una topología que forma estas mismas agrupaciones.

Distribución potencial

Las variables bioclimática que tuvieron mayor contribución en la generación del modelo de distribución del linaje 1 fueron temperatura media del trimestre más seco (43.7%), temperatura mínima del período más frío (17.5%), temperatura media del trimestre más cálido (13.4%), precipitación del trimestre más frío (7.9%) e isothermalidad (5.7%). Para la generación del modelo del linaje 2 contribuyeron diferentes variables, temperatura media diurna (37.3%), temperatura media del trimestre más cálido (14%), isothermalidad (17.2%), temperatura mínima del período más frío (7.1%) y precipitación del período más seco (5.5%).

La distribución potencial de los dos linajes de *C. angustatus* (Figura 26) mostró que el linaje 1 presenta una distribución amplia que abarca la totalidad del área de distribución de la especie y potencialmente una franja entre Campeche y Yucatán. El linaje 2 posee una distribución más restringida en la cual sólo se incluye el estado de Veracruz y potencialmente el noroeste de la península de Yucatán (Ría Lagartos). Este linaje comparte su distribución con el linaje 1 y no contempla otras zonas en las regiones indudables del Golfo de México.

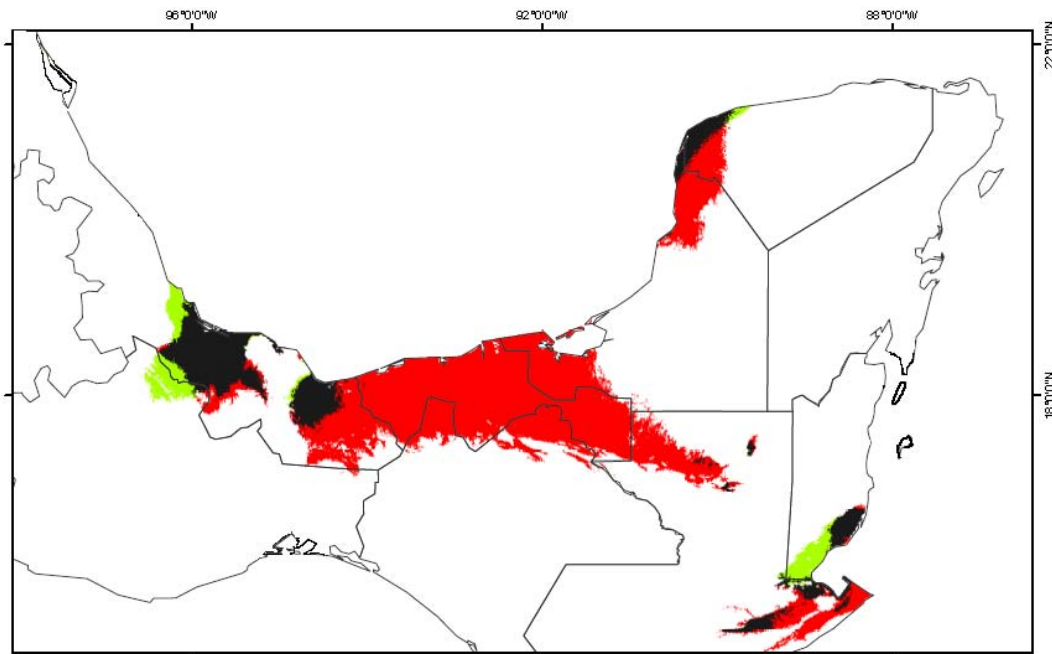


Figura 26. Distribución potencial de los grupos de *Claudius angustatus* este (rojo), oeste (verde) y donde se encuentran ambos linajes (negro).

Las condiciones bioclimáticas de ambos linajes varían moderadamente. En general el linaje 2 tolera temperaturas más bajas (20.4 °C), principalmente durante el trimestre más seco; comparado con el linaje 1 que soporta 24 °C. Durante este periodo las tortugas se encuentran en estivación, descienden los cuerpos de agua y las precipitaciones son muy escasas. También existe una

pequeña diferencia en la proporción de precipitación durante el periodo más seco. En las zonas del linaje 1 llueve 147 mm, mientras que en las del linaje 2 114 mm. En el trimestre más húmedo, en la zona del linaje 1 la precipitación llega a 2,014 mm, mientras que en la del linaje 2 de 2,279 mm como máximo. Dentro del área de distribución conocida, climáticamente el linaje 2 se traslapa sobre el linaje 1, del mismo modo como se traslapan la estructura genética de ambos grupos mostrando un patrón concordante (Figura 25).

Las variables bioclimáticas que presentaron mayor contribución al modelo de distribución potencial global de la especie (sin separar los linajes) fueron la temperatura media anual (20%), estacionalidad de la temperatura (19.8%), precipitación del periodo más húmedo (18.2%), temperatura mínima del periodo más frío (17%), precipitación del trimestre más húmedo (13.4%).

En el modelo de distribución para el Pleistoceno se mantienen cuatro variables del modelo actual, pero cambian su porcentaje de contribución de la siguiente manera: temperatura media anual (37.4%), estacionalidad de la temperatura (21.1%), precipitación del periodo más húmedo (18.4%), temperatura mínima del periodo más frío (10%). La quinta variable que contribuyó fue la temperatura media del trimestre más seco (5.6%).

El mapa de distribución potencial actual (Figura 27) proyecta las zonas en las cuales existen las condiciones ambientales donde podría habitar *C. angustatus*. Potencialmente esta especie habita en zonas inundables del Golfo de México, así como en la selva maya de Guatemala. Aun cuando ha sido registrada para la zona sur de la península de Yucatán, el modelo indica que

sólo una pequeña zona en el margen sur cumple con las condiciones para la especie. El único informe para la Reserva de la Biosfera de Calakmul, se registra en un sitio que no cumple las condiciones apropiadas para el establecimiento de la tortuga chopontil, por lo que se podría considerar un registro esporádico en la zona (SEMARNAT, 2000). Al noroeste de Campeche aparece una zona con potencial de distribución de *C. angustatus* que corresponde a la Reserva de la Biosfera Ría Celestún, en donde no hay registros de presencia de chopontil.

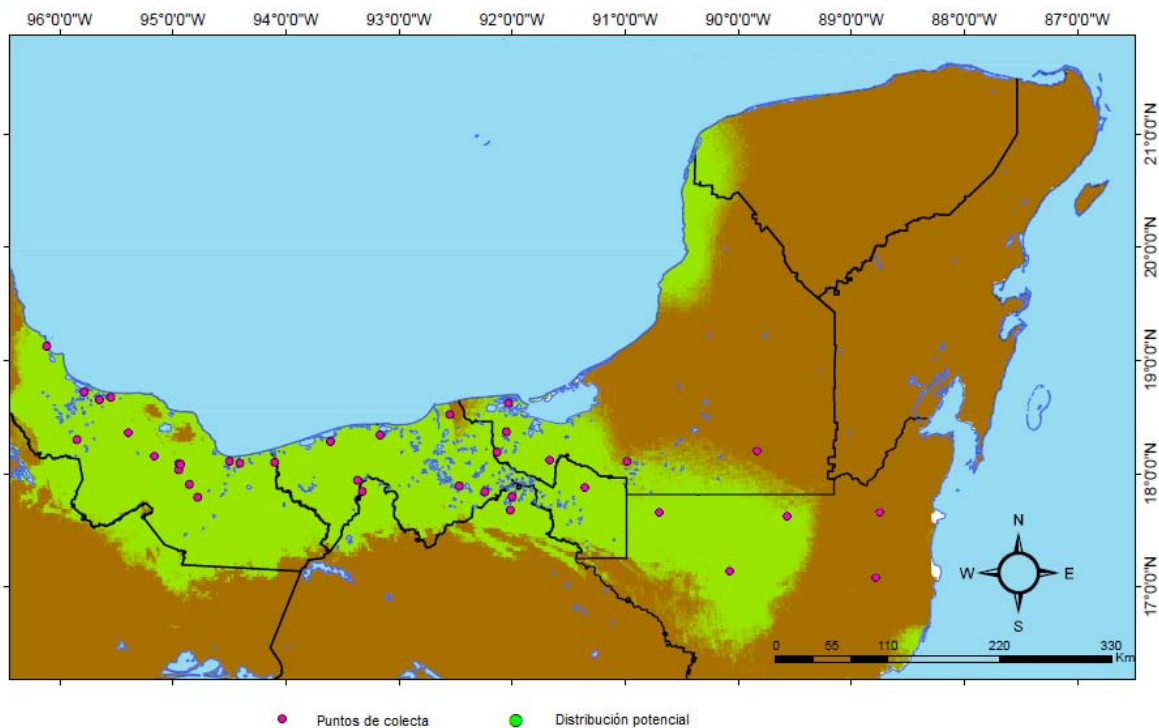


Figura 27. Distribución potencial actual de la tortuga chopontil, restringida a las zonas inundables del Golfo de México, la selva maya de Guatemala y los humedales de Celestún.

La distribución de la tortuga chopontil durante el Pleistoceno pudo haberse extendido por una franja norte del estado de Veracruz. En el oeste de la península de Yucatán también se presentaron condiciones adecuadas para su establecimiento. Si se tiene en cuenta que el nivel del mar se redujo aproximadamente 100 m y la fauna y la flora se desarrollaron de acuerdo con el

clima. En ese periodo geológico la zona este de la actual península de Yucatán tampoco presentaba condiciones necesarias para el establecimiento de *C. angustatus* (Figura 28).

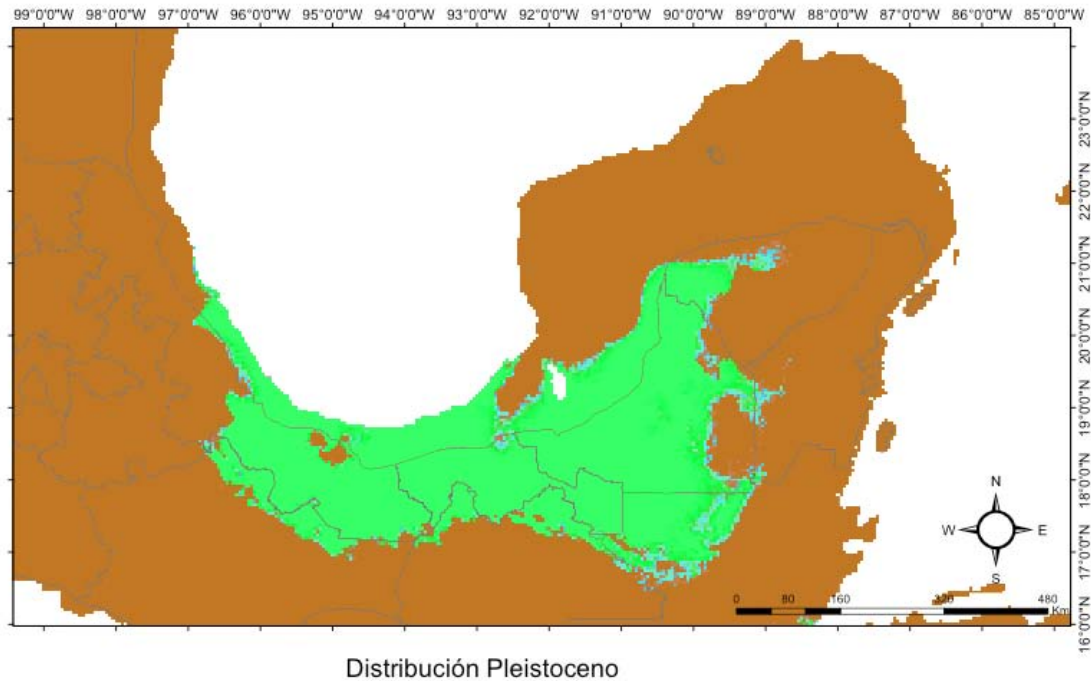


Figura 28. Distribución potencial de la tortuga chopontil hace aproximadamente 20,000 años (Pleistoceno) época en la cual el nivel del mar era aproximadamente 100 m menor que el actual.

La distribución de *C. angustatus* durante el Pleistoceno fue más amplia y siempre continua, salvo en la Sierra de Los Tuxtlas, cuya topografía y clima más templado son factores limitantes para el establecimiento de la especie. El límite oeste se encontraba establecido mas al norte por la Faja Volcánica Transmexicana, excepto una franja al norte de Veracruz, que actualmente está sumergida. La distribución potencial al pasado durante el Pleistoceno no muestra ninguna evidencia de barrera geográfica anterior que pudiera haber separado los linajes 1 y 2.

DISCUSIÓN

Este trabajo evaluó la estructuración genética y geográfica de 15 poblaciones de la tortuga chopontil con el fin de conocer su diversidad genética y los procesos históricos que influyeron en su distribución.

Diversidad genética y estructura poblacional de *Claudius angustatus*

En estudios genéticos en tortugas los genes mitocondriales Cyt b y ND4, y en menor grado el nuclear R35 han sido utilizados en forma concatenada o como fragmentos en diversos trabajos sobre sistemática molecular y genética.

Con marcadores mitocondriales se detectaron 16 haplotipos para Cyt b y 14 haplotipos para ND4 y con el intrón R35 se encontraron 31 haplotipos. Las poblaciones de *C. angustatus* presentaron baja diversidad nucleotídica pero alta diversidad haplotípica (Cuadro 3) lo que indica baja diferenciación en muchos haplotipos.

Un patrón de baja diversidad nucleotídica y alta diversidad haplotípica es consistente con un tamaño efectivo poblacional histórico bajo seguido por una expansión poblacional (Grant y Bowen 1998). Valores negativos y significativos para la F de Fu y Li y la F_s de Fu han sido descritos para poblaciones bajo expansión poblacional (Ramos-Onsins y Rozas, 2002). Los valores negativos y no significativos obtenidos en la prueba de neutralidad de Tajima muestran que las poblaciones de chopontil podrían estar en expansión (Ramos-Onsins y Rozas, 2002).

Variación y estructura genética

El análisis filogenético identifica una estructura en dos linajes en la secuencias de genes mitocondriales Cyt b y ND4; sin embargo, ésta se pierde con el intrón R35. El análisis concatenado recupera la existencia de dos linajes, que también se evidencian con el análisis de estructura poblacional en Structure. La divergencia genética entre ambos grupos fue de 0.9% para los genes mitocondriales y 0.8% para el intrón. Los dos linajes recuperados corresponden geográficamente a al este y oeste del río Coatzacoalcos respectivamente, aunque existe una porción de área en la que se entremezclan ejemplares de ambos linajes.

El estudio también obtuvo topologías similares en las redes de haplotipos construidas a partir de Cyt b, ND4 y concatenado con ML y BI. La red obtenida a partir de Cyt b mostró mayor número de haplotipos que el análisis de ND4 (16 y 14, respectivamente). Para Cyt b el haplotipo 8 fue el más frecuente y ampliamente distribuido y el haplotipo 1 el segundo más frecuente con una distribución más restringida. Para ND4 el haplotipo 5 fue el único más frecuente y ampliamente distribuido. De acuerdo con la información aportada por las redes de haplotipos, el más frecuente y más ampliamente distribuido se considera el haplotipo central. La red de haplotipos obtenida con el intrón R35 fue diferente a las obtenidas con los marcadores mitocondriales siendo el haplotipo 8 el central, distribuido en 11 localidades. Con la red de haplotipos de forma concatenada se identificaron 41 haplotipos, mostrando una estructura en donde se forma una estrella con el haplotipo 9 al centro.

Se han registrado diferentes valores de distancia genética a nivel poblacional para diferentes especies de tortugas; aunque sería ideal una comparación únicamente sobre sitios homólogos por lo que se tomará como referencia valores totales de diferentes genes mitocondriales (Cyt b, ND2, etc.), que fueron estudiados en algunos casos en forma concatenada en otras tortugas. En su mayoría han demostrado niveles inusualmente bajos de variabilidad genética y de divergencia entre los linajes con ADNmt (Avice *et al.* 1992). Ennen *et al.* (2012) registraron una divergencia del gen mitocondrial ND4 de 1.5% en la tortuga *Gopherus polyphemus*, distribuida en el sureste de Estados Unidos. Esta separación está marcada por el río Apalachicola, el cual sirvió como límite geográfico en el Pleistoceno, aunque actualmente no actúa necesariamente como barrera para el flujo de genes.

Para la tortuga *Glyptemys insculpa* se encontraron niveles bajos de variación en la región control de 2%, 0.25-0.81% en el genes ND2, y ND4 no presentó variación (Amato *et al.* 2008). Similares resultados se reportaron para *Glyptemys muhlenbergii*, con variación de 0.28% para la región control y sin variación el ND4 (Rosenbaum *et al.* 2007). Para la tortuga de concha blanda se reportó para Cyt b una divergencia de 0-1.46% entre las subespecies *Apalone spinifera spinifera* y *A. s. hartwegi* (Weisrock y Janzen, 1999). Esta divergencia se ve apoyada por los análisis del intrón R35, para el grupo formado por *A. s. emoryi*, *A. s. atra* y *A. s. pallida* que mostraron una diferencia de 0.86%-1.62% con respecto a los otros grupos (McGaugh *et al.* 2008). La diversidad nucleotídica y de haplotipos de Cyt b para la tortuga mediterránea *Mauremys*

leprosa fue de 0.57 y 0.81% respectivamente (Fritz *et al.* 2006). Para *Mauremys japonica* la diversidad nucleotídica y haplotípica fue de 0.67 y 0.54% respectivamente (Suzuki y Hikida, 2009). Las especies de tortugas, en las cuales sus poblaciones presentan fuertes señales filogenéticas, son aquellas donde la variación de sus genes en conjunto presentan una variación mayor de 1.5%. Para el caso de la chopontil el estudio encontró valores máximos de 0.9 %, asociado a una débil estructura filogenética.

Los resultados del análisis molecular de varianza (AMOVA) también sugieren una débil estructura genética poblacional para *C. angustatus*. El análisis molecular arrojó que existe mayor variación dentro de las poblaciones, que entre las poblaciones.

Niveles similares de variabilidad genética han sido registrados para la tortuga *Podocnemis sextubercula* (Silva *et al.* 2011), en la cual se encontró que los niveles de variabilidad genética fue de 99.12% dentro de sus poblaciones y 0.88% entre ellas. La falta de estructura genética entre grandes distancias geográficas y el extenso flujo de genes entre las localidades es congruente con la ecología de la especie.

En casos distintos, para otras especies de tortugas se ha detectado una fuerte estructuración, como en *Mauremys caspica* (Vamberger *et al.* 2012). En esta especie la variación genética con marcadores nucleares fue de 78% dentro de las poblaciones y 22% entre poblaciones. Con datos mitocondriales, la diferencia 37% dentro de las poblaciones y 63% entre ellas, por lo que las poblaciones de *M. caspica* se dividieron en tres subespecies. Fritz *et al.* (2009)

estudiaron *Testudo graeca* usando Cyt b y 12S rRNA encontrando una variación de 86.8% entre poblaciones y 13.2% dentro de las poblaciones. La comparación de estos datos con los del presente estudio (Cuadro 4), corroboran una débil estructura genética para las poblaciones de *C. angustatus*.

Filogeografía

El linaje 1 de la tortuga chopontil tiene una distribución que abarca casi la totalidad del área de distribución, siendo exclusivo en el área al este del río Coatzacoalcos, mientras que el linaje 2 es exclusivo al oeste del mismo río. La boca del río Coatzacoalcos demarca el punto mas estrecho del istmo de Tehuantepec en el golfo de México. Existe evidencia de que el istmo de Tehuantepec es una barrera geográfica que influye en la distribución de las especies y en la estructura genética de varias especies. González-Porter *et al.* (2011) registraron tres linajes filogénicos divergentes en la distribución de la tortuga blanca *Dermatemys mawii*. El primer linaje referido para Salinas y Sarstun (Guatemala) tuvo una divergencia genética de 2.47% con el resto. El segundo linaje abarcó la totalidad del área de distribución y presentó una divergencia de hasta 1% con el tercer linaje, que incluye haplotipos únicamente encontrados en el río Papaloapan. Aunque los individuos del linaje 3 cohabitan con individuos del linaje 2, este linaje es exclusivo al oeste del río Coatzacoalcos. Los sapos bufónidos muestra un patrón similar para el cual existen diferentes linajes al oeste y este del istmo de Tehuantepec y de la sierra de Santa Marta (Mulcahy *et al.* 2006). En concreto, *Incilius valliceps* (Mulcahy *et*

al. 2006) muestra que los tres individuos de la localidad de Catemaco (al oeste del río Coatzacoalcos) tuvieron una diferencia de 1.9% de los del resto del clado sur. En los murciélagos, datos de diversidad genética indican que tanto *Pteronotus davyi* (Guevara-Chumacero *et al.* 2013) como *Pteronotus personatus* (Zárate- Martínez, 2013) tienen poblaciones con un alto grado de diferenciación genética al nivel del istmo de Tehuantepec. Por su parte, Suárez-Atilano *et al.* (2014) en un estudio filogeográfico de *Boa constrictor* en México y Centro América encontraron una fuerte estructura genética y geográfica diferenciando dos linajes con 4% de diferencia en el Cyt b. Dentro del segundo linaje se encontraron seis haplogrupos. Dentro de estos seis haplogrupos, los grupos I y J separan a la población de la península de Yucatán con la del Golfo de México hace unos 800,000 años, de manera coincidente con la separación de las provincias biogeográficas del Golfo de México y Yucatán (CONABIO 1998).

En concordancia con los datos para otras especies, las poblaciones de la tortuga chopontil presentan diferencias genéticas entre linajes al nivel del istmo de Tehuantepec, sugiriendo que éste actúa como barrera para la especie.

La distribución de *C. angustatus* presenta una concordancia importante respecto a la historia geológica de la región en la que la separación de los dos linajes puede estar vinculada a un aislamiento histórico en el que la sierra de Los Tuxtlas funcionó como barrera geográfica fracturando un linaje ancestral al elevarse los niveles del mar. La llanura del Golfo está bordeada por la Sierra Madre Oriental desde el Eoceno (Galloway *et al.* 1991), mientras que la Faja Volcánica Transmexicana la divide en dos desde el Plioceno (Byerly, 1991) y los

volcanes de Los Tuxtlas son el punto más alto de la zona. En ese momento, los niveles del mar eran más altos porque el clima era más cálido, por lo tanto, la Faja Volcánica Transmexicana se extendió en el este hasta el nivel del mar, y actuó como barrera geográfica entre las biotas aisladas a cada lado (Perez-Higareda y Navarro, 1980). En el Mioceno medio se produjo una deformación de la corteza que formó las cuencas de Macuspana, Comalcalco-Istmo y la franja del Reforma (Perez-Higareda y Navarro, 1980). Durante el Pleistoceno, en asociación con los eventos de glaciación, el nivel del mar en la costa del Golfo se extendió hasta niveles de exposición de la plataforma continental a unos 50 km de los actuales, presentando climas bastante más fríos y más secos que los actuales (Figura 26) (Ludlow-Wiechers *et al.* 2005). Consecuentemente, en este lapso penetraba menos humedad al interior del continente debido a la menor evaporación de los mares adyacentes. Una investigación sobre sedimentos y restos de organismo en la planicie costera realizada por Sirkin (1985) arroja como resultado que hace 8,000 años las temperaturas empezaron a aumentar; sin embargo, las condiciones prevalecieron secas y los lagos se encontraban en un nivel muy bajo e incluso algunos presentaron salinización (Metcalf *et al.* 2000). A pesar de estas condiciones más secas, los modelos predictivos sugieren que la distribución de la tortuga chopontil durante el Pleistoceno fue más amplia, pues abarcaba la distribución actual, el oeste de la península de Yucatán y una pequeña franja al norte de Veracruz.

La distribución potencial al pasado de *C. angustatus* no refleja ninguna posible causa de la separación de los linajes de la especie. La predicción refleja

una mayor extensión del área de distribución que incluye a la parte occidental de la península de Yucatán y mas al norte hasta los humedales de la Mancha, donde posiblemente haya un registro para la especie (Zenteno C., com. pers.). Esta distribución también incluye Calakmul donde hay un solo registro histórico para la especie, aun cuando en búsquedas activas mas recientes no se ha encontrado.

Distribución genética y clima

El mapa de distribución potencial de *C. angustatus* incluye las planicies del centro-sur del Golfo de México y el sur de la península de Yucatán, las cuales de acuerdo con CONABIO (1997) están referidas a zonas húmedas (f y m) y subhúmedas (W0, W1 y W2), con climas cálidos y muy cálidos. Radachowsky (2002) indica que existen especies que revelan un patrón de distribución que agrupa los bosques bajos y los humedales del norte de Guatemala, Belice, el sur de Yucatán y se extienden hacia el oeste hasta Veracruz. A diferencia de las especies de la península de Yucatán, que están adaptadas a climas con menos agua o zonas más áridas, fuera de la península existen áreas con más humedad y cuerpos de agua más estables o permanentes. El clima mas árido de la península de Yucatán actúa como una barrera al norte de la distribución de la especie. Hacia el sur la distribución está restringida por las montañas de la sierra Oriental de la Sierra Madre del Sur; y al oeste por cambios climáticos importantes para la especie, resultado de las mayores altitudes. Cabe notar que para el norte del estado de Veracruz las zonas pantanosas extensas dejan de

existir.

De acuerdo con los resultados de la investigación se puede establecer que la tortuga chopontil coincide con la provincia del Golfo de México referida por CONABIO (1998). La provincia del Golfo de México se extiende hacia el sur de la cuenca del Río Fernando, poco mas al norte de Boca del río, registro mas occidental de la especie, y llega hasta el Río Candelaria, lugar donde empieza la península de Yucatán y último punto donde fue posible recolectar chopontiles.

Por otra parte, hay gran relación biogeográfica entre el sur de la costa del Golfo de México y el Petén (Espinosa, 2008). Esta relación es altamente concordante con la manifestada en el mapa de distribución potencial actual de *C. angustatus*, que se distribuye en estas mismas zonas. Ippi y Flores (2001) en su trabajo de tortugas neotropicales, proponen un área de endemismo 2, que abarca la península de Yucatán y se extiende sobre la costa hacia el norte y las tierras bajas del Golfo de México. Indican que dicha área se encuentra delimitada por la presencia de siete especies de tortugas, *Chelydra rossignoni*, *Dermatemys mawii*, *Rhinoclemys aerolata*, *Kinosternon acutum*, *Kinosternon creaseri*, *Staurotypus triporcatus* y *Claudius angustatus*. Sin embargo, 5 de estas tortugas (*Chelydra rossignoni*, *Dermatemys mawii*, *Kinosternon acutum*, *Staurotypus triporcatus* y *Claudius angustatus*) no se distribuyen en la península de Yucatán sino están restringidas para la provincia del Golfo de México.

La distribución de los dos linajes es consistente con diferencia en el clima en las zonas donde se distribuye cada uno. La distribución del linaje 2 se sobrelapa climáticamente a la del linaje 1 en la geografía. La distribución

potencial del linaje 1 se extiende dentro del área de distribución del linaje 2, pero no al revés. Este patrón es concordante con la estructura genética de la especie de acuerdo al Structure. La distribución potencial de los linajes de *C. angustatus* indican que ambos se encuentran en las zonas de isothermalidad de 24 a 26 (cálido) y de 26 a 28 (muy cálido) (García y CONABIO, 1998a). Dentro de la distribución potencial del linaje 1 podemos encontrar los climas Am, Aw2, Aw 1, Am(f) y Awo, mientras que para el linaje 2 presenta todos los climas excepto Awo (García y CONABIO, 1998b). La precipitación anual en ambos grupos se encuentran dentro de las precipitaciones mínimas de 800 mm a 1000 mm, pero el linaje 1 se encuentra en zonas donde hay precipitaciones máximas de hasta 4000 mm a 4500 mm, mas altas que para el linaje 2 que van de 2500 mm a 3000 mm (García y CONABIO, 1998c). El linaje 1 se encuentra presente en zonas húmedas (f y m) así como subhúmedas (W0, W1, W2); sin embargo, el linaje 2 se encuentra principalmente en las zonas subhúmedas (W0, W1, W2) (García, 1990). En el área de distribución del linaje 1 podemos encontrar las categorías de humedad del suelo ústico (180 a 270 días de humedad), ústico I (270 a 330 días de humedad), ústico II (330 a 365 días de humedad) y ácuico (permanentemente húmedo); mientras que el linaje 2 se encuentra en zonas donde el suelo cuenta con menos días de humedad al año ústico y ústico II (Maples-Vermeersch, 1992).

Los climas húmedos (f y m) así como subhúmedos (W0, W1, W2), presentan una temperatura media anual entre 12 °C y 18 °C, la temperatura del mes más frío entre – 3 °C y 18 °C, mientras que la temperatura del mes más

caliente bajo 22 °C. Con una precipitación en el mes más seco mayor de 40 mm. El linaje 2 prefiere climas que presenta índices de humedad más bajos W0 (menor de 43.2), W2 (43.2-55) W1 (55.3), mientras que las tortugas del linaje 1 soportan climas con índice de humedad mayores a 60 (f y m) al sur (García y CONABIO, 1998c).

Implicaciones de conservación

Las poblaciones de *C. angustatus* están en riesgo de desaparecer a lo largo de toda su área de distribución natural. Ya se han mermado en alguna poblaciones como las de Minatitlán y Villahermosa. Si bien existe bastante hábitat que tiene condiciones adecuadas, sus poblaciones son diezmadas por cacería y recolecta ilegal de ejemplares. En 2012, a un ciudadano ruso le confiscaron 108 chopontiles en el Aeropuerto Internacional de la Ciudad de México (El Universal, 2012) y en Minatitlán se decomisaron otras cinco (Notimex, 2012). Dentro del área de distribución existen áreas naturales protegidas: La Reserva de la Biosfera de Los Tuxtlas, en Veracruz, la Reserva de la Biosfera Pantanos de Centla y la reserva ecológica Cañón del Usumacinta en Tabasco, el Área de Protección de Flora y Fauna de Laguna de Términos y la Reserva de la Biosfera de Calakmul en Campeche; y el sitio RAMSAR Sistema Lagunar Catazajá en Chiapas. A pesar de esto, la mayoría de las poblaciones de chopontil no están dentro de alguno de estos polígonos y aun las poblaciones dentro de las reservas, son cazadas. El consumo de esta especie es muy frecuente y sus poblaciones, al igual que las de otras especies de tortugas, se ven sometidas a

una fuerte presión de caza.

La estructuración de la *C. angustatus* en dos linajes independientes, obliga a la creación de estrategias para la conservación de ambos linajes. Cada linaje debe considerarse un ESU (Unidad significativa de evolución) y deben ser considerados como unidades de manejo independientes. Las poblaciones del linaje 2 (mayoritariamente al oeste del río Coatzacoalcos) se encuentran sumamente vulnerables y poseen una gran diversidad genética al encontrarse varios haplotipos mitocondriales únicos. Esta zona carece de reservas y su uso es extremo. Para verificar las condiciones de las poblaciones, necesario hacer un estudio de ADN nuclear por microsatélites, que permita ver el número de diferencias entre localidades y la existencia de alelos únicos entre ellas así como el flujo genético entre cada una de las poblaciones, así como sus niveles de endogamia y la presencia de cuellos de botella que la puedan llevar a la extinción.

Todas las poblaciones de *Claudius angustatus* requieren de protección especial. Deben generarse programas de manejo en cautiverio que mantenga estándares estrictos en el manejo de sus individuos, que impida el intercambio entre sitios geográficos de cada linaje para mantener la identidad genética de las poblaciones. Los individuos criados en cautiverio deben tener un estricto control genético para eventuales proyectos de reintroducción de ejemplares dentro del área histórica de distribución de la especie.

CONCLUSIONES

Este trabajo constituye el primer estudio filogeográfico de la especie *Claudius angustatus*. El uso de ADN mitocondrial permitió recuperar 16 haplotipos con Cyt b y 14 con ND4 en las 15 localidades y mostró la existencia de dos linajes. Con el intrón R35 se observaron 31 haplotipos pero no se recuperó la estructura mostrada con los genes mitocondriales. El análisis concatenado de los tres marcadores mostró 41 haplotipos, recuperando los dos linajes obtenidos con Cyt B y ND4 por separado.

Se encontró correspondencia entre los linajes y la geografía. El linaje 1, parafiético, se distribuyó mayoritariamente al este del río Coatzacoalcos; y el linaje 2, monofilético, mayoritariamente al oeste del río Coatzacoalcos, presentando haplotipos únicos por localidad. La separación de los dos linajes puede estar vinculado a la elevación de los mares durante los periodos calientes del Eoceno en las que los Tuxtlas funcionó como barrera geográfica.

El análisis de estructura genética con datos concatenados mostró que la especie está estructurada en $K=2$ con dos grupos coincidentes con la distribución geográfica al este y oeste del río Coatzacoalcos. La divergencia genética entre ambos linajes es de 0.9% para mitocondrial y 0.8% para nuclear.

De acuerdo con las proyecciones de distribución potencial el linaje 2 presenta tolerancias climáticas diferentes a las del linaje 1 que limitan su distribución. Estas proyecciones también indican que la especie está restringida a las zonas de inundación del Golfo de México y la selva maya de Guatemala,

indicando que los registros de Calakmul, Campeche, y la posible presencia de la especie en la Mancha, Veracruz, son registros casuales.

El área de distribución en el Pleistoceno indicó que el límite norte de su distribución fue a la altura del eje Transversal volcánico y que se distribuía ampliamente el este de la península de Yucatán.

Los dos linajes de chopontiles encontrados deben ser considerados Unidades Evolutivas Significativas y deben generarse planes de manejo específicos para el mantenimiento de su identidad genética. Deben ser considerados como unidades de manejo independiente evitando la translocación de individuos de una zona a la otra, especialmente de aquellas poblaciones con haplotipos únicos. El manejo en cautiverio debe mantener cuidadosamente la estructura genética para poder implementar liberaciones en sitios donde la especie se ha extirpado.

Por último, es necesario evaluar el estado de conservación de las poblaciones con ADN nuclear a partir de microsatélites para detectar los patrones de estructura genética en una escala más fina independientemente para cada linaje.

También es necesario realizar colectas en la selva maya de Guatemala para tener la estructura completa de la especie y hacer exploraciones en las zonas donde potencialmente se pueda encontrar la especie. De encontrarse nuevos registros es importante ver la diferencia genética de estas poblaciones.

LITERATURA CITADA

- Aguirre G., E. Cazares y B. Sánchez. 2002. Conservación y aprovechamiento del Chopontil (*Claudius angustatus*). Instituto de Ecología, Xalapa. 22 pp.
- Aljanabi SM. y I. Martínez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucleic Acids Research*. 25: 4692-4693.
- Amato ML., JR. Brooks y J. Fu. 2008. A phylogeographic analysis of populations of the wood turtle (*Glyptemys insculpta*) throughout its range. *Molecular Ecology*. 17: 570-581.
- Avise JC, BW. Bowen, T. Lamb, AB. Meylan y E. Bermingham. 1992. Mitochondrial DNA evolution at a turtle's pace: Evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the Testudines. *Molecular Biology and Evolution*. 9: 457-473.
- Avise JC. 1996. Toward a regional conservation genetics perspective: phylogeography of faunas in the southeastern United States. En Avise JC y JL. Hamrick. *Case Histories from Nature Conservation Genetics*. pp. 431-470.
- Avise JC. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA. Chapman and Hall, New York.
- Avise JC., J. Arnold, RM. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, JE. Neigel, CA. Reeb y NC. Saunders. 1987. Intraespecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 18: 489-522.
- Avise JC. 1998. The history and purview of phylogeography: A personal

- reflection. *Molecular Ecology*. 7: 371-379.
- Avice JC. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*. 36 (1): 3-15.
- Ballard J. y M. Whitlock. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*. 13: 729-744.
- Bandelt HJ., P. Forster y A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16: 37-48.
- Bernatchez L. y A. Osinov. 1995. Genetic diversity of trout (genus *Salmo*) from its most eastern native range based on mitochondrial DNA and nuclear gene variation. *Molecular Ecology*. 4: 285-297.
- Bickham JW. y JL. Carr. 1983. Taxonomy and phylogeny of the higher categories of Cryptodiran turtles based on a cladistic analysis of chromosomal data. *Copeia*. 4: 918- 932.
- Birky CW. 2001. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annual Review of Genetics*. 35: 125-148.
- Bradley TM., NP. Bernstein, RD. Birkhead, JF. Koukl, SM. Musmann, JS. Placyk. 2013. Sequence-based molecular phylogenetics and phylogeography of the American box turtles (*Terrapene* spp.) with support from DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 68: 119-134.
- Brown WM, M. George y AC. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 76: 1967-1971.
- Byerly GR. 1991. Igneous activity. En A. Salvador, *The Gulf of Mexico Basin:*

- The Geology of North America. The Geological Society of America. 91-108.
- Canestrelli D., G. Aloise, S. Cecchetti y G. Nascetti. 2010. Birth of a hotspot of intraspecific genetic diversity: notes from the underground. *Molecular Ecology*. 19: 5432-51.
- Casas-Andreu G., y T. Reyna-Trujillo. 1990. Provincias herpetofaunísticas. Mapa IV.8.6, en *Atlas Nacional de México*, Vol. III, Instituto de Geografía, UNAM, México.
- Cervantes MA. 1998. Programa nacional de zonas húmedas. En Abarca FJ. y M. Cervantes Manual para el manejo y conservación de los humedales de México. Cap. 7. Publicación especial bajo colaboración de la Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, U.S. Fish and Wildlife Service, Arizona Game and Fish Department y Wetlands International the Americas-Programa México. México, D. F.
- Conabio. 1997. Provincias biogeográficas de México. Escala 1: 4 000 000. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- Douzery E. y E. Randi. 1997. The mitochondrial control region of cervidae: Evolutionary patterns and phylogenetic content. *Molecular Biology and Evolution*. 14(1): 1154-1166.
- Dutton PH., SK. Davis, T. Guerra, y DW. Owens. 1996. Molecular phylogeny for marine turtles based on sequences of the ND4- leucine tRNA and control regions of mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 5: 511-521.
- Ennen JR., BR. Kreiser, CP. Qualls, D. Gaillard, M. Aresco, R. Birkhead, TD.

- Tuberville, ED. McCoy, H. Mushinsky, TW. Hentges y A. Schrey. 2012. Mitochondrial DNA assessment of the phylogeography of the gopher tortoise. *Journal of Fish and Wildlife Management*. 3 (1): 110-120.
- Espejel GVE. 2004. Aspectos biológicos del manejo del chopontil, *Claudius angustatus*, (Testudines: Staurotypidae). Tesis de Maestría, Instituto de Ecología A. C. 61 pp.
- Espinosa OD., J. Llorente y JJ. Morrone. 2006. Historical biogeographical patterns of species of *Bursera* (Burseraceae) and their taxonomic implications. *Journal of Biogeography*. 33: 1945-1958.
- Fairbairn J., R. Shine, C. Moritz, y M. Frommer. 1998. Phylogenetic relationships between oviparous and viviparous populations of an Australian lizard (*Lerista bougainvillii*, Scincidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 10: 95-103.
- Farias I., G. Ortí, I. Sampaio, H. Schneider, y A. Meyer. 2001. The cytochrome *b* gene as a phylogenetic marker: The limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *Journal of Molecular Evolution*. 53: 89-103.
- Flores-Villela OA. y GR. Zug. 1995. Reproductive biology of the Chopontil, *Claudius angustatus* (Testudines: Kinosternidae), in southern Veracruz, México. *Chelonian Conservation and Biology*. 1 (3): 181-186.
- Flores L. 2009. Valoración y uso de tortugas dulce acuícolas en la cuenca baja del Papaloapan, Veracruz. Tesis Maestría en Ciencias Instituto de Ecología, A. C. 117 pp.
- Fritz U., M. Barata, SD. Busack, G. Frittsch y R. Castilho. 2006. Impact of mountain chains, sea straits and peripheral populations on genetic and

- taxonomic structure of a freshwater turtle, *Mauremys leprosa* (Reptilia, Testudines, Geoemydidae). *Zoology Scribb.* 35: 97-108.
- Fritz U., SR. Daniels, MD. Hofmeyr, J. González, CL. Barrio-Amorós, P. Siroky, A.K. Hundsdörfer y H. Stuckas. 2010. Mitochondrial phylogeography and subspecies of the wide-ranging sub-Saharan leopard tortoise *Stigmochelys pardalis* (Testudines: Testudinidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research.* 1-12.
- Fu Y. y W. Li. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics.* 133: 693-709.
- Fu, Y. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics.* 147: 915-925.
- Galloway W., D. Bebout, W. Fisher, J. Dunlap, R. Cabrera-Castro, J. Lugo-Rivera, y T. Scott. 1991, Cenozoic. En Salvador A. *The Gulf of Mexico Basin: Boulder, Colorado, Geological Society of America, The Geology of North America.* 245-324.
- García E. 1990. Rangos de humedad, escala 1: 4000000. En *Climas. Tomo II, Sección IV 4.10 Atlas Nacional de México (1990-1992).* Instituto de Geografía, UNAM, México.
- García E. y CONABIO. 1998a. Isotermas medias anuales, escala 1: 1000000. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- García E. y CONABIO. 1998b. *Climas, escala 1: 1000000.* Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- García, E. y CONABIO. 1998c. Precipitación total anual, escala 1: 1000000.

- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- González-Porter G., F. Hailer, O. Flores-Villela, R. García-Anleu y JE. Maldonado. 2011. Patterns of genetics diversity in critically endangered Central American river turtle: human influence since the Mayan age? *Conservation Genetics*. 12: 1229-1242.
- Graybeal A. 1993. The phylogenetic utility of cytochrome b: lessons from bufonid frogs. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2: 256-269.
- Guevara-Chumacero LM., R. López-Wilchis, J. Juste, C. Ibañez, LA. Martínez-Méndez y IDLA. Barriga-Sosa, 2013. Conservation units of *Pteronotus davyi* (Chiroptera: Mormoopidae) in México base phylogeographical analysis. *Acta Chiropterológica*. 15(2): 353-363.
- Guisan A. y U. Hofer. 2003. Predicting reptile distributions at the mesoscale: relation to climate and topography. *Journal of Biogeography*. 30: 1233-1243.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98
- Harris DJ. 2002. Reassessment of comparative genetic distance in reptiles from mitochondrial cytochrome b gene. *Herpetological Journal*. 12: 85-86.
- Harrison RG. 1989. Animal mitochondrial DNA as a tool in systematic and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution*. 5: 6-11.
- Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*. 405: 907-13.

- Hey J. y CA. Machado. 2003. The study of structured populations-new hope for a difficult and divided science. *Genetic* 4: 535-543.
- Hijmans RJ., SE. Cameron, JL. Parra, PG. Jones y A. Jarvis. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*. 25: 1965-1978.
- Huelsenbeck JP. y F. Ronquist, 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 17 (8): 754-755.
- Ippi S. y V. Flores. 2001. Las tortugas neotropicales y sus áreas de endemismo. *Acta Zoológica Mexicana*. 84: 49-63.
- Iverson JB y JF. Berry. 1979. The mud turtle genus *Kinosternon* in northeastern Mexico. *Herpetological*. 35: 318-324.
- Iverson JB., M. Le y C. Ingram. 2013. Molecular phylogenetics of the mud and musk turtle family Kinosternidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 69: 929-939.
- Karl SA. y DS. Wilson. 2001. Phylogeography and systematics of the Mud Turtle, *Kinosternon baurii*. *Copeia*. 3: 797-801.
- Knowles L. y W. Madison. 2002. Statistical phylogeography. *Molecular Ecology*. 11: 2623-2635.
- Librado P. y J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*: 10. 1093/bioinformatics/btp187.
- Lowe A., S. Harris, S y P. Ashton. 2004. *Ecological Genetics: design, analysis and application*. Blackwell Publishing. 326 pp.
- Ludlow-Wiechers B., L. Almeida-Leñero y G. Islebe. 2005. Paleoecological and

- climatic changes of the Upper Lerma Basin, Central Mexico during the Holocene. *Quaternary Research*. 64 (3): 318-332.
- Lunt DH., LE. Whipple y BC. Hyman. 1998. Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): utility and problems in molecular ecology. *Molecular Ecology*. 7: 1441-1455.
- Maples-Vermeersch M. 1992. Regímenes de humedad del suelo, escala 1: 4000000. En Regímenes de humedad del suelo. Tomo II. Sección IV, 6.2. Atlas Nacional de México (1991-1992). Instituto de Geografía, UNAM, México.
- McCain C. 2010. Global analysis of reptile elevational diversity. *Global Ecology and Biogeography*. 19: 541-553.
- McGaugh SE., CM. Eckerman y FJ. Janzen. 2008. Molecular phylogeography of *Apalone spinifera* (Reptilia, Trionychidae). *Zoologica Scripta*. 37: 289-304.
- Metcalf SE., SL. O'Hara, M Caballero y SJ. Davies. 2000. Records of Late Pleistocene-Holocene climatic change in Mexico: a review. *Quaternary Science Reviews*. 19: 699-721.
- Mindell D., A. Knight, C. Baer y C. Huddleston. 1996. Slow rates of molecular evolution in birds and the metabolic rate and body temperature hypothesis. *Molecular Biology and Evolution*. 13: 422-426.
- Moritz C. 1994. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Molecular Ecology*. 3: 401-411.
- Moritz C. 1994. Defining "Evolutionary significant units" for conservation. *Trends in Ecology & Evolution*. 9: 373-375.

- Morón TN. 2002. Eficiencia digestiva del chopontil *Claudius angustatus* Cope, 1865, en cautiverio. Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana. 53 pp.
- Moyle RG., MJ. Andersen, CH. Oliveros, F. Steinheimer, y S. Reddy. 2012. Phylogeny and biogeography of the core babblers (Aves: Timaliidae). *Systematic Biology*. 61: 631-651.
- Mulcahy DG., BH. Morrill y JR. Mendelson. 2006. Historical biogeography of lowland species of toads (*Bufo*) across the Trans-Mexican Neovolcanic Belt and the Isthmus of Tehuantepec. *Journal of Biogeography*. 33: 1889-1904.
- Palkovacs E., J Gerlach y A. Caccone. 2002. The evolutionary origin of Indian Ocean tortoises (*Dipsochelys*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 24: 216-227.
- Peakall R. y P. Smouse. 2012. GenAIEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and researchan update. *Bioinformatics*. 28: 2537-2539.
- Pérez-Higareda G. y DL. Navarro. 1980. The Faunistic Districts of the Low Plains of Veracruz, México. Based on Reptilian and Mammalian Data. *Bull. Maryland. Herpetology Society*. 16(2): 54-69.
- Pertoldi C., R. Bijlsma y V. Loeschcke. 2007. Conservation genetics in a globally changing environment: present problems, paradoxes and future challenges. *Biodiversity and Conservation*. 16: 4147-4163.
- Posada D., y KA. Crandall. 1998. JModeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 14: 817-818.
- Pritchard JK., M. Stephens y P. Donnelly. 2000. Inference of Population Structure

- Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*. 155: 945-959.
- Radachowsky J. 2002. Endemism in the Maya Forest. A report prepared by Wildlife Conservation Society for FIPA and USAID. 1-19.
- Raj A., M. Stephens y JK. Pritchard 2014. fastSTRUCTURE: variational inference of population structure in large SNP data sets. *Genetics*. 197: 573-589.
- Ramos-Onsins SE. y J. Rozas. 2002. Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. *Molecular Biology Evolution*. 19 (12): 2092-2100.
- Rocha-Olivares A., C. Kimbrell, B. Eitner, y T. Vetter. 1999a. Evolution of a mitochondrial cytochrome b gene sequence in the species-rich genus *Sebastes* (Teleostei, Scorpaenidae) and its utility in testing the monophyly of the subgenus *Sebastomus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 11: 426-440.
- Roizas J., JC. Sanches-DelBarrio, X. Messeguer y R. Rozas. 2003. Dnasp, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 19: 2496-2497.
- Rosenbaum PA., JM, Robertson y KR Zamudio. 2007. Unexpectedly low genetic divergences among populations of the threatened bog turtle (*Glyptemys muhlenbergii*). *Conservation Genetics*. 8: 331-342.
- Rozas J. y R. Rozas. 1999. DnaSP versión3: and integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analyses. *Bioinformatics*. 15(2): 174-175.

- Rozas J., JC. Sánchez-Del Barrio, X. Messenguer y R. Rozas. 2003. DNASP, DNA polymorphism analyses by coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Sangster G., P. Alström, E. Forsmark, y U. Olsson. 2010. Multi-locus phylogenetic analysis of Old World chats and flycatchers reveals extensive paraphyly at family, subfamily and genus level (Aves: Muscicapidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 57: 380-392.
- Segura NM. 2002. Ámbito hogareño del chopontil, *Claudius angustatus* Cope, 1865 en el Jobo, Mpio. de Alvarado, Veracruz. Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana. 46 pp.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, 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. Publicada el 6 de marzo. Diario Oficial de la Federación.
- Silva TJ., LA. Monjeló, MN. Viana, JC. Pezzuti, PC. Andrade, RC. Vogt y IP. Farias. 2011. Population genetics analysis of *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Podocnemidae): lack of population structure in the central Amazon Basin. *Genetics and Molecular Research*. 10(3): 1393-402.
- Silvestro DF. y I. Michalak. 2012. RaxmlGUI: a graphical front-end for RaxML. *Organisms Diversity & Evolution*. 12: 335-337.
- Sirkin L. 1985. Late Quaternary stratigraphy and environments of the west coastal plain. *Palynology*. 9: 3-25.

- Smith HM. y RB. Smith 1979. Synopsis of the Herpetofauna of Mexico. Vol. VI. Guide to Mexican Turtles Bibliographic. Addendum III. North Bennington. 1044 pp.
- Spinks PQ., CR. Thomson, M. Gidis y HB. Shaffer. 2014. Multilocus phylogeny of the New-World mud turtles (Kinosternidae) supports the traditional classification of the group. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 76: 254-260.
- Soltis DE., AB. Morris, JS. McLachlan, PS. Manos y PS Soltis. 2006. Comparative phylogeography of unglaciated eastern North America. *Molecular Ecology*. 15: 4261-4293.
- Starkey AE., B. Shaffer, RL. Burke, MR. Forstner, JB. Iverson, FJ. Janzen, AG. Rhodi, y GR. Ultsch. 2003. Molecular systematics, phylogeography, and the effects of pleistocene glaciation in the painted turtle (*Chrysemys picta*) complex. *Evolution*. 57(1): 119-128.
- Suárez-Atilano M., F. Burbrink y E. Vázquez-Domínguez. 2014. Phylogeographical structure within *Boa constrictor imperator* across the lowlands and mountains of Central America and Mexico. *Journal of Biogeography*. 1-14.
- Sunnucks P. y FH. Hales. 1996. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Molecular Biology*. 13 (3): 510-524.
- Suzuki D. y T. Hikida. 2010. Mitochondrial phylogeography of the Japanese pond turtle, *Mauremys japonica* (Testudines, Geoemydidae). *Journal of Zoological*

- Systematics and Evolutionary Research. 49(2): 141-147.
- Swofford P. y J. Rozas. 2009. DnasSP v.5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25: 1451-1542.
- Swofford DL. 1996. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods), version 4.0. Sinauer, Sunderland. Massachusetts. 147 pp.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123: 585-595.
- Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei y S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731-2739.
- Thompson JD., DG. Higgins, y TJ. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673-4680.
- Tiemann-Boege I., CW. Kilpatrick, DJ. Schmidly y RD. Bradley. 2000. Molecular Phylogenetics of the *Peromyscus boylii* Species Group (Rodentia: Muridae) Based on Mitochondrial Cytochrome b Sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 16 (3): 366-378.
- Torrice JP. 2004. Filogeografía comparada de siete especies de peces de agua dulce del Alto Madera (Amazonía Boliviana)". Tesis Maestría en ciencias biológicas y biomédicas. Universidad Mayor de San Andrés. 95 pp.
- Vamberger M., H. Stuckas y U. Fritz. 2011. Fifteen microsatellite markers for the

stripe-necked terrapin *Mauremys caspica* (Testudines: Geoemydidae) and cross-amplification tests in *M. rivulata*. Conservation Genetics Resources. 3: 87-89.

Van der Meij M. Bakker, M. y Bout, R. 2005. Phylogenetic relationships of finches and allies based on nuclear and mitochondrial DNA. Molecular Phylogenetics and Evolution. 34: 97-105.

Vogt RC. 1997. *Claudius angustatus*. En Dirzo R., E. González y RC. Vogt Historia Natural de los Tuxtlas. Instituto de Biología, UNAM. Pp. 480-481.

Walker D., J. Burke, J. Barák y JC. Avise. 1995. A comparison of mtDNA restriction sites vs. control region sequences in phylogeographic assessment of the musk turtle (*Sternotherus minor*). Molecular Ecology. 4: 365-373.

Walker D., PE. Moler, KA. Buhlmann y JC. Avise. 1996. Phylogeographic patterns in *Kinosternon subrubrum* and *K. baurii* based on mitochondrial DNA restriction analyses. Herpetological. 54(2): 174-184.

Welsrock DW. y FJ. Janzen. 2000. Comparative molecular phylogeography of North American softshell turtles (*Apalone*): implications for regional and Wide-Scale historical evolutionary forces. Molecular Phylogenetics and Evolution. 14 (1): 152-164.

Wilson A., R. Cann, S. Carr, M. George, U. Gyllensten, K. Helm-Bychowski, R. Higuchi, S. Palumbi, E. Prager, R. Sage y M. Stoneking. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. Biological Journal of Linnaean Society. 26: 375-400.

Xia X. y Z. Xie. 2001 DAMBE: data analysis in molecular biology and evolution.

Journal of Heredity. 92: 371-373.

Yokobori S., N. Fukuda, M. Nakamura, T. Aoyama y T. Oshima. 2004. Long-term conservation of six duplicated structural genes in cephalopod mitochondrial genomes. *Molecular Biology and Evolution*. 21(11): 2034- 2046.

Zarate-Martínez D. 2013. Variación genética entre poblaciones de *Pteronotus personatus* (Chiroptera: Mormoopidae) en México. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. Tesis de Maestría. 96 pp.

Zarza E., VH. Reynoso y BC. Emerson. 2008. Diversification in the northern neotropic: mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of the iguana *Ctenosaura pectinata* and related species. *Molecular Ecology*. 17: 3259-3275.

Zhang D. y G. Hewitt. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*. 12: 563-584.

Zhang L., L. Nie, Y. Zhang, J. Rui y Y. Zhang. 2008. Complete sequence and organization of the mitochondrial genome of *Cyclemys atripons* (Testudines, Geoemydidae). *Genetics and Molecular Biology*. 31 (3): 783-788.

Anexo 1

Protocolo de extracción de ADN modificado de Sunnucks y Hales (1996) y Aljanabi y Martínez (1997)

Las muestras de tejido sanguíneo son preservadas en etanol absoluto; volumen total de 1.5 ml, mantenidas en refrigeración.

En tubos nuevos rotulados, añadir 300 µl de buffer TEN + SDS 2%. Resuspender cada tubo con tejido sanguíneo en vortex, tomar 25 µl y pasar a los tubos nuevos con buffer. Añadir 20 µl de proteinasa K a cada tubo. Dejar incubando toda la noche en bloque de calor a 56°C.

Añadir 100 µl de NaCl 5M. Usar el vortex durante 30 segundos. Centrifugar durante 7 min 30 seg. a 14,000 rpm a 4°C. Transferir el sobrenadante a tubos nuevos rotulados. Añadir 800 µl de etanol al 100% frío (-20°C). Invertir gentilmente de 4-7 veces por tubo. Dejar toda la noche a -20°C.

Centrifugar durante 20 minutos 30 seg. a 14,000 rpm a 4°C. Decantar el exceso de alcohol en un vaso de precipitado, cuidando de no tirar el pellet. Añadir 800 µl de etanol 70% frío (-20°C). Centrifugar durante 7 min 30 seg. a 14,000 rpm a 4°C. Decantar el exceso de alcohol. Dejar secando en cajita de unicel con tapa a temperatura ambiente, toda la noche.

Una vez secas las muestras, añadir 200 µl de agua inyectable (o agua MQ; o buffer TE) y dejar a -20°C para uso posterior. Muestras listas para electroforesis.

Anexo 2

Programas utilizados para la amplificación de los diferentes marcadores moleculares

	Cyt b		ND4		Intrón R35	
	°C	Tiempo	°C	Tiempo	°C	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	07:00	94	05:00	94	05:00
Ciclos		35		30		30
Desnaturalización	94	01:00	94	00:30	94	00:30
Alineación	50	01:00	57	02:00	52	01:30
Extensión	72	01:00	72	02:00	72	02:00
Extensión final	72	10:00	72	07:00	72	7:00

ANEXO 3

Variables bioclimáticas usadas en los modelos de distribución potencial

	Variable bioclimática	Descripción
Bio-1	Temperatura media anual	La media de todas las temperaturas medias semanales.
Bio-2	Media diurna	La media de todos los rangos de temperatura diurnas semanales.
Bio-3	Isotermalidad 2/7	La gama media diurna (Bio-2) dividido por el Rango de temperatura anual (Bio-7).
Bio-4	Estacionalidad de la temperatura	La desviación estándar de las temperaturas medias semanales expresadas como porcentaje de la media de esas temperaturas (es decir, la media anual).
Bio-5	Temperatura máxima del período más cálido	La temperatura más alta de cualquier temperatura máxima semanal.
Bio-6	Temperatura mínima del período más frío	La temperatura más baja de cualquier temperatura mínima semanal.
Bio-7	Rango de temperatura anual	La diferencia entre la temperatura máxima del período más cálido y la temperatura mínima del período más frío.
Bio-8	La temperatura media del trimestre más húmedo	El trimestre más lluvioso del año se determina, y se calcula la temperatura media de este período.
Bio-9	La temperatura media del trimestre más seco	El trimestre más seco del año se determina, y se calcula la temperatura media de este período.
Bio-10	La temperatura media del trimestre más cálido	El trimestre más cálido del año se determina, y se calcula la temperatura media de este período.
Bio-11	La temperatura media del trimestre más frío	El trimestre más frío del año se determina, y se calcula la temperatura media de este período.
Bio-12	Precipitación anual	La suma de todas las estimaciones de precipitación mensuales.
Bio-13	Precipitación del período más húmedo	La precipitación de la semana o mes más húmedo
Bio-14	Precipitación del período más seco	La precipitación de la semana o mes más seco.

Bio-15	Precipitación Estacional	Desviación estándar de las estimaciones de precipitación semanales expresadas como porcentaje de la media anual.
Bio-16	Precipitación del trimestre más húmedo	El trimestre más lluvioso del año es determinado, y la precipitación total durante este periodo se calcula.
Bio-17	Precipitación del trimestre más seco	El trimestre más seco del año es determinado, y la precipitación total durante este periodo se calcula.
Bio-18	Precipitación del trimestre más cálido	El trimestre más cálido del año es determinado, y la precipitación total durante este periodo se calcula.
Bio-19	Precipitación del trimestre más frío	El trimestre más frío del año es determinado, y la precipitación total durante este periodo se calcula.