



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Diversidad y estructura genética de *Anolis
uniformis* (Dactyloidae) en Los Tuxtlas,
Veracruz”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

SANDRA ITZEL VERA PAZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. DENISE ARROYO LAMBAER

Instituto de Biología



Ciudad Universitaria, CD. MX. septiembre 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Vera

Paz

Sandra Itzel

51 12 11 52

Universidad Nacional Autónoma de México

México

Facultad de Ciencias

Biología

311298116

2. Datos del tutor

Dra.

Denise

Arroyo

Lambaer

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Víctor Hugo

Reynoso

Rosales

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Juan Servando

Núñez

Farfán

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Hibraim Adán

Pérez

Mendoza

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Fabiola

Ramírez

Corona

7. Datos de la tesis

"Diversidad y estructura genética de *Anolis uniformis* (Dactyloidae) en Los Tuxtlas Veracruz"

80 p

2018

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mis papás Judith Paz y Juan Vera, quienes me han apoyado siempre. Gracias por orientarme, por los consejos de vida, porque gracias a ello me he formado como persona. Gracias por financiar siempre mi educación, ustedes me han dado el regalo más grande en la vida, el estudio de la biología que sin duda es lo que me llena y forma parte de mí.

A mi hermano, Alan U. Vera, has sido mi cómplice incondicional, sabes mis secretos, mis debilidades, mis fortalezas y eres testigo de todo el esfuerzo que he puesto en este proyecto. Gracias por el apoyo, por las desveladas y por ser esa persona que al llegar a casa después de un mal día, siempre tiene un abrazo para mí. Siempre nos vamos a tener el uno al otro.

A mis tres abuelos por ser mis segundos padres, me han orientado en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor Hugo Reynoso por la oportunidad que me brindó de trabajar en este proyecto. Por el apoyo a lo largo de toda la estancia y el financiamiento a través de Instituto de Biología (IB), UNAM.

A La Secretaría de Atención a la Comunidad Universitaria, a través del Programa de Vinculación con los Egresados de la UNAM con el apoyo de la Dirección General de Orientación y Atención Educativa, y a la Facultad de Ciencias por la Beca para la titulación, egresados de alto rendimiento.

A la Colección Nacional de Anfibios y Reptiles (CNAR) por el acceso a las muestras de Los Tuxtlas colectadas por la Dra. Arroyo en 2005 y al Dr. Omar Hernández por la colecta de muestras de la Selva Lacandona.

A mi tutora la Dra. Denise Arroyo Lambaer, por siempre creer en mí, por asesorarme en todo momento, defenderme y guiarme no sólo en el proyecto *Anolis*, también personal y académicamente. Siempre pude contar tu apoyo.

Al M. en C. Canek Rivera, por enseñarme todo de la biología molecular y confiar siempre en mis habilidades. Mi primer maestro.

A la M. en C. Andrea Rubí Jiménez Marín, por adoptarme con mucho cariño en el Laboratorio de Biología Molecular de Zoología, IB-UNAM, por el apoyo y la asesoría siempre disponible. A la M. en C. Laura Márquez Valdelamar del Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, IB-UNAM, por el procesamiento de las muestras. Al M. en C. Leopoldo Andrade y al Laboratorio de Helmintología por el acceso a los programas de edición de secuencias.

A mi comité tutorial: Dr. Víctor Hugo Reynoso, Dra. Denise Arroyo Lambaer, Dr. Juan S. Núñez Farfán, Dr. Hibraim A. Pérez Mendoza, M. en C. Fabiola Ramírez Corona.

A mis amigos Rubí, Carolina, Pablo, Sandy, Frida, se convirtieron en mi familia y como tal, siempre nos hemos apoyado aún en los momentos más difíciles. A Daniel Carmona mi psicólogo, a Francisco y a todas las personas que me han impulsado a concluir esta tesis. ¡Lo logré amigos!

Al M. en C. Oscar Pérez Flores por la asesoría constante en el laboratorio, en la parte bioinformática y en la edición de secuencias. Por ser mi confidente, uno de los pilares más grandes de esta tesis, eres mi familia y siempre pude contar contigo. Por levantarme, obligarme a ser perseverante y no dejar que me rindiera jamás. Por enseñarme lo maravilloso de la vida y la biología. Gracias escarabajo.

Al laboratorio de Herpetología 3 del IBUNAM, gracias a todos por siempre escucharme y asesorarme. Ustedes son testigos de todo el empeño que he puesto y lo que me ha costado.

Nada tiene sentido en la biología si no es a la luz de la evolución. Dobzhansky, 1973.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Problemática: Transformación del hábitat y sus consecuencias	3
1.2 Evaluación de la composición genética de las poblaciones	4
1.3 ADN mitocondrial	5
1.4 Especie de interés	6
II. ANTECEDENTES	8
2.1 Hábitat fragmentado y genética de poblaciones en lagartijas	8
2.2 Efectos de fragmentación del hábitat en <i>Anolis</i>	9
III. OBJETIVOS	11
3.1 Objetivo general	11
3.2 Objetivos particulares	11
IV. JUSTIFICACIÓN	12
V. HIPÓTESIS GENERAL.....	13
VI. HIPÓTESIS PARTICULARES	13
VII. MÉTODO	14
7.1 Sitios de estudio.....	14
7.2 Trabajo de laboratorio.....	17
7.3 Procesamiento de secuencias	18

7.4	Análisis de datos	20
VIII.	RESULTADOS	24
8.1	Trabajo de laboratorio.....	24
8.2	Genética poblacional	24
8.2.1	Análisis poblacional en Los Tuxtlas	24
8.2.2	Análisis por tamaño de fragmento.....	29
IX.	DISCUSIÓN.....	37
9.1	Análisis por población	38
9.2	Análisis por tamaño de fragmento.....	42
9.3	Análisis por región	43
9.4	Estado de conservación de la especie en el paisaje fragmentado	46
X.	CONCLUSIONES.....	47
XI.	PERSPECTIVAS A FUTURO	49
XII.	REFERENCIAS	50
XIII.	ANEXOS	64
ANEXO I	Protocolo de extracción de ADN	64
ANEXO II.	Protocolo de amplificación de genes.	66
ANEXO III	Información complementaria	68

RESUMEN

La modificación estructural del hábitat es una de las principales causas del declive de poblaciones en vida silvestre y tiene graves implicaciones en términos genéticos. Estudios en genética poblacional han demostrado que la perturbación de poblaciones a causa de la fragmentación influye en la pérdida de variación genética e interviene en la estructuración genética. En México la región de Los Tuxtlas ha sido fuertemente afectada por el proceso de fragmentación desde hace al menos 50 años y como resultado, presenta remanentes de selva nativa de diferente tamaño aislados por una matriz de área perturbada. En esta región, una de las especies con mayor abundancia es una lagartija del género *Anolis*, que es dependiente de zonas de bosque conservado, presenta ciclos de vida cortos y mantiene baja o nula dispersión. Lo cual las hace un buen modelo de estudio para evaluar la genética de poblaciones habitando paisajes modificados antropogénicamente, sin embargo la mayor cantidad de investigaciones se ha enfocado en islas como sitio de estudio y se tiene poca información sobre las poblaciones continentales de *Anolis*.

Algunos métodos genéticos permiten establecer patrones de variación genética e inferir la estructura de una población. En este estudio se emplearon dos genes mitocondriales ND4 y CytB para evaluar la composición y diferenciación genética en poblaciones de *Anolis uniformis* en Los Tuxtlas, Veracruz, a tres escalas: poblacional, por tamaño de fragmento y entre regiones (Los Tuxtlas contra una zona conservada en Lacandona). Se buscó determinar si el tamaño del fragmento y el aislamiento repercuten en la composición genética de las poblaciones y si además presentan diferencias con respecto a una población no perturbada.

Al analizar la diversidad genética para cada población, los resultados muestran en general alta diversidad haplotípica, baja diversidad nucleotídica y un elevado número de haplotipos únicos. Se detectó baja a moderada estructura genética y los resultados del AMOVA muestran la mayor cantidad de variación dentro de las poblaciones. De acuerdo con la prueba de Mantel la distancia geográfica entre remanentes impide el flujo genético y aumenta la tendencia de las poblaciones a la estructuración. Es decir, debido a que las poblaciones de *Anolis* han sido aisladas, la composición genética dentro de cada fragmento se ha modificado y comienzan a diferenciarse entre ellas. En un segundo enfoque se encontró que en Los Tuxtlas, el tamaño del fragmento no mantiene una relación directa con la variación genética poblacional. Esto puede ser explicado por la gran abundancia de organismos en los fragmentos de todos los tamaños. Finalmente, al comparar poblaciones de *Anolis uniformis* en Los Tuxtlas y la selva Lacandona se encontraron diferencias significativas en la composición genética, es decir, se comportan como poblaciones genéticamente diferentes (ND4, $F_{st} = 0.96216$; CytB $F_{st} = 0.9506$; ND4 + CytB, $F_{st} = 0.95499$). Sin embargo, al agrupar todos los fragmentos de Los Tuxtlas no se agrupan de manera diferente con respecto a la población en el continuo conservado de la selva Lacandona. Es probable que no haya pasado el suficiente tiempo de aislamiento entre las poblaciones de *Anolis uniformis* en Los Tuxtlas como para observar pérdida de diversidad genética y estructura poblacional bien definida. No obstante que debido al deterioro de la selva de Los Tuxtlas, se podrían perder algunas poblaciones antes de encontrar efectos genéticos. Debido a la ausencia de flujo genético entre las poblaciones los principales factores del declive genético podrían ser la distancia de aislamiento y el tiempo de fragmentación. Es necesario implementar análisis moleculares con marcadores nucleares para complementar la información obtenida y ampliar el muestreo.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Problemática: Transformación del hábitat y sus consecuencias

Una de las principales causas del declive de poblaciones en vida silvestre y la pérdida de diversidad biológica, es la modificación estructural del hábitat (Fahrig y Merriam, 1993; Suazo, 2009). La división y transformación de un hábitat continuo en un conjunto de remanentes aislados entre sí por una matriz de suelo distinta a la original (agrícola, ganadera, urbana, entre otras variantes del uso de suelo), generan un paisaje fragmentado (Saunders, 1991; Fahrig, 2003; Galindo, 2007; Rotem *et al.*, 2013). Los remanentes de vegetación nativa resultantes presentan distintos tamaños, formas, conectividad y grado de aislamiento con respecto a la zona continua (Wilcove, 1985; Saunders, *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 2006; Galindo, 2007; Moreno y Urbina, 2013).

Cuando una población es fragmentada, por ejemplo, por actividades antropogénicas, las subpoblaciones resultantes se modifican. Entre cada fragmento se presentan variaciones en la disponibilidad de recursos (alimento, espacio, estructura vegetal), en la variación fenotípica, en la estructura demográfica, e intervienen diferentes factores de restricción genética y procesos estocásticos como la mutación y la deriva genética (González, 1998; Ord y Martins, 2006). Para conocer la respuesta de los organismos a la modificación del hábitat se deben tomar en cuenta una serie de factores críticos que influyen directamente en su distribución y modifican la diversidad y estructura genética de las poblaciones (Saunders *et al.*, 1991; Suazo, 2009; Cabrera y Reynoso, 2012; Rivera *et al.*, 2015).

Cada especie responde de manera diferente a la fragmentación del hábitat dependiendo de su biología y comportamiento (Opdam, 1991; Fahrig y Merriam, 1993;

Galindo, 2007; Suazo, 2009; Cabrera y Reynoso, 2012; Moreno y Urbina, 2013). La matriz agrícola que rodea los remanentes representa, para algunos organismos, una barrera geográfica que aísla en cada fragmento subpoblaciones de una población original (Wilcove, 1985; Saunders *et al.*, 1991; Opdam, 1991; Santos *et al.*, 2006; Moreno y Urbina, 2013). Especies con un alto grado de especialización ecológica y dispersión limitada son más susceptibles a la fragmentación del hábitat (Chan y Zamudio, 2009), así por ejemplo, serán más propensas a la extinción aquellas especies que dependan de vegetación nativa, que tengan un ámbito hogareño limitado o que existan en bajas densidades poblacionales (Saunders *et al.*, 1991).

La fragmentación del hábitat tiene graves implicaciones en términos genéticos. Una población que ha sido fragmentada puede enfrentar pérdida de diversidad genética, disminución del flujo genético y por tanto aumento en la diferenciación poblacional (Cushman, 2006); las poblaciones pequeñas y aisladas usualmente pierden variación genética más rápidamente que las poblaciones grandes y continuas debido a deriva génica (Lacy 1987), y pueden experimentar disminución en la adecuación debido a un incremento en la expresión de alelos deletéreos, depresión endogámica y pérdida de potencial adaptativo (Frankham *et al.*, 2002).

1.2 Evaluación de la composición genética de las poblaciones

Los estudios de genética de poblaciones permiten explicar cómo se modifican los patrones de variación genética dentro y entre las poblaciones por diversas fuerzas evolutivas (Eguiarte *et al.*, 2013; Millistein, 2013; Garrido y Vázquez, 2013; Rivera, 2015). Por medio de métodos genéticos se pueden establecer patrones de variación genética e inferir la estructura de una población (Hedrick, 2011). Diferentes marcadores moleculares pueden

ser utilizados para detectar diversidad genética, por ejemplo, secuencias homólogas de ADN pueden ser comparadas para documentar dicha variación (Hedrick, 2011).

La tasa de evolución de un marcador molecular está en función de la frecuencia con la cual surgen nuevas mutaciones en una molécula y la probabilidad de fijarse en la población (Santos *et al.*, 2008). Mientras más importante sea la función de un gen, más lenta es la tasa de evolución o la modificación de la estructura primaria (Brown *et al.*, 1979).

Por lo tanto, la elección del marcador molecular que se utilice en un estudio dependerá de la pregunta de investigación que se requiere responder.

1.3 ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial (ADNmt) es un marcador molecular neutral utilizado frecuentemente en reconstrucciones filogeográficas, resolución de problemas taxonómicos y genética de poblaciones (Hedrick y Miller, 1992; Thorpe *et al.*, 2005; Eguiarte *et al.*, 2007; Martínez y González, 2008). En poblaciones naturales es altamente variable debido a su elevada tasa de mutación, por lo cual puede dar información acerca de la historia de una población en un tiempo corto (Galtier *et al.*, 2009).

Se encuentra enrollado en un cromosoma circular y en animales está compuesto por 37 genes (Taanman, 1999). Es heredado vía materna, por lo que no se modifica por procesos de recombinación, siendo susceptible a los eventos de deriva génica, y evoluciona bajo el modelo de neutralidad al intervenir en funciones metabólicas básicas de óxido-reducción (Brown *et al.*, 1979; Wan *et al.*, 2004; Koumoundouros *et al.*, 2009; Botham y Mayers, 2010). El genoma mitocondrial presenta una elevada tasa de divergencia de 2% por Ma (Brown *et al.*, 1979; Galtier *et al.*, 2009), resultado del ineficiente mecanismo de reparación en los

errores de replicación, la ausencia de histonas y la exposición a la acción de los radicales libres generados en el metabolismo oxidativo (Wilson *et al.*, 1985).

En reptiles los genes mitocondriales más utilizados son ND2 (NADH deshidrogenasa subunidad 2), ND4 (NADH deshidrogenasa subunidad 4) y CytB (Citocromo b) (Poe, 2004), los cuales participan en procesos fundamentales de transporte y bombeo de electrones a través de las membranas mitocondriales (Botham y Mayers, 2010). El gen ND4 codifica para la subunidad del complejo I NADH- ubiquinona (CoQ oxidoreductasa) y el gen CytB da origen a la subunidad del complejo III ubiquinol, QH2 citocromo c oxidoreductasa (Botham y Mayers, 2010). En lagartijas el ADNmt exhibe una tasa de sustitución rápida, (5.29×10^{-9} por Ma) (Eo y DeWoody, 2010), por lo que son un sistema de estudio útil en genética de poblaciones.

1.4 Especie de interés

El abaniquillo de selva *Anolis uniformis* (Cope, 1885) es una lagartija pequeña (> 100 mm) que pertenece a la familia Dactyloidae que distribuye a través de la franja neotropical desde Tamaulipas, Veracruz, Tabasco y Chiapas en México y al sur en Belice, Guatemala y Honduras (Arroyo, 2008; Reynoso *et al.*, 2017).

Generalmente presenta una coloración dorsal café rojiza y en la parte ventral verdosa, la cual en hembras muestra un patrón de polimorfismo. Existe dimorfismo sexual con la presencia de un pliegue gular en los machos de color magenta rojizo, con un lunar azul en la parte central (Figura 1), carácter de importancia taxonómica. La extensión del pliegue en combinación con movimientos corporales representa una aparente comunicación de intereses territoriales, de apareamiento y disuasión para depredadores (Campbell *et al.*,

1989; Heras y Villarreal, 2000; Nicholson, *et al.*, 2007; Ord y Martins, 2006; Paemelaere, 2011).

La especie mantiene hábitos arborícolas e insectívoros y se encuentra en grupos de aproximadamente 12 individuos con un macho alfa, algunos juveniles reproductivos, dos o tres hembras adultas y el resto son organismos juveniles (Heras y Villarreal, 2000). La madurez sexual comienza antes del año. Ponen un solo huevo en cada evento reproductivo y aproximadamente 2 huevos al año (Campbell *et al.*, 1989) por lo que el reemplazo generacional es constante (Heras y Villarreal, 2000).

En el sur de México *Anolis uniformis* es una de las especies de lagartijas con mayor abundancia (Cabrera y Garrido, 2014), es dependiente de zonas de bosque conservado (Urbina *et al.*, 2006), presenta ciclos de vida cortos (Heras y Villarreal, 2000) y mantiene baja o nula dispersión entre fragmentos (Urbina *et al.*, 2006; Arroyo, 2008) lo que la hace un buen modelo de estudio para evaluar los efectos de la fragmentación del hábitat.



Figura 1. *Anolis uniformis*. Imágenes: Elisa Cabrera Guzmán; Denise Arroyo Lambaer; Brayan J. Torres Lemus.

II. ANTECEDENTES

2.1 Hábitat fragmentado y genética de poblaciones en lagartijas

Lin *et al.* (2010) evaluaron la diversidad y estructura genética en poblaciones aisladas de la lagartija mariposa (*Leiolepis reevesii*) en 28 localidades a lo largo de China, Hainan y Vietnam por medio del gen mitocondrial CytB. Los valores altos de diversidad haplotípica total ($h = 1.0$), además del nulo flujo genético se atribuyeron a la acumulación de variaciones genéticas posteriores a la separación de las poblaciones. En este estudio la desviación a los modelos de neutralidad (D y F) y la expansión demográfica que encontraron son explicados a partir del tamaño de la isla y la distancia de aislamiento.

Existen estudios similares sobre fragmentación del hábitat, por ejemplo, Semple y colaboradores (2010) evaluaron los patrones de variación genética en cuatro especies de vertebrados pequeños, las lagartijas: *Uta stansburiana* (Phrynosomatidae), *Plestiodon skiltonianus* (Scincidae) y *Sceloporus occidentalis* (Phrynosomatidae) y el ave: *Chamaea fasciata* (Sylviidae) en el sur de California, lugar altamente fragmentado debido a la urbanización. Utilizaron parches con tiempos relativamente cortos de fragmentación (13 - 33 años) y de tres tamaños: pequeños (75 - 450 ha), grandes (3200 - 4400 ha) y una zona núcleo con un área que va de 78.2 - 121014.2 ha. Emplearon para las cuatro especies de 6 a 8 microsatélites y los resultados obtenidos muestran estructura genética ($F_{st} = 0.095$) significativa entre parches, debido al limitado flujo genético.

De igual manera en California, Vandergast y colaboradores (2016) estudiaron la diversidad y estructura genética de la lagartija *Uma inornata* (Phrynosomatidae), en un hábitat con más de 50 años de fragmentación al tiempo de colecta en un periodo severo de sequía en el Valle de Coachella, California. Mediante el uso de once microsatélites compararon muestras de 1996 y 2008. Comprobaron que la fragmentación del hábitat

reduce la diversidad genética al interior de las poblaciones e incrementa la diferenciación genética explicada por la distancia geográfica entre los fragmentos.

Otros trabajos que analizan la fragmentación en poblaciones de lagartijas con las mismas características que los abaniquillos utilizan islas como sistema de estudio. Por ejemplo, Hurtson (*et al.*, 2009) estudiaron el efecto de la fragmentación en poblaciones de lagartijas isleñas de la especie *Podarcis erhardii* (Lacertidae) con el gen de ADNmt CytB y 13 microsatélites. Encontraron que las islas grandes y de formación geológica reciente presentaron mayor diversidad genética ($dh = 0.9$) con respecto a las islas viejas y pequeñas, así como una relación inversa entre la estructura genética y el área de la isla, debido a que las poblaciones pequeñas son más susceptibles a los efectos de deriva.

Koumoundouros (*et al.*, 2009) realizaron un estudio demográfico y analizaron la estructura genética histórica y reciente en poblaciones aisladas de *Cyclodomorphus praealtus*, lagartijas restringidas a “islas del cielo” en la región alpina de Australia. Utilizaron el gen mitocondrial ND4 y siete microsatélites. Los resultados con ADNmt mostraron una baja diversidad nucleotídica (promedio, $\pi = 0.0050$) y alta diversidad haplotípica (promedio, $dh = 0.9$) contenida entre poblaciones, así como una conectividad histórica con una reciente divergencia entre las poblaciones debida a la baja dispersión de las lagartijas entre los sitios.

2.2 Efectos de fragmentación del hábitat en *Anolis*

Los abaniquillos del género *Anolis* son un grupo de lagartijas ampliamente estudiadas a nivel molecular con trabajos enfocados en ecología y evolución, principalmente, relaciones filogenéticas, filogeografía de especies y genética de poblaciones (Pratos *et al.*, 2015). Sin embargo, se han realizado pocos análisis con poblaciones continentales para evaluar el impacto de la fragmentación del hábitat (Sugawara *et al.*, 2015).

Vargas y Moreno (2014) analizaron las relaciones filogenéticas entre individuos de *A. heterodermus* en diferentes puntos de las Cordilleras Oriental y Central de Colombia y realizaron la caracterización genética de los organismos usando genes mitocondriales (COI, ND2) y nucleares (Rag1). Los resultados obtenidos muestran alta diversidad haplotípica ($dh = 0.46-0.86$), baja diversidad nucleotídica ($\pi = 0.0008-0.008$) y estructura genética ($F_{st} = 0.54$) con tres linajes evolutivos independientes debido a la acelerada destrucción de su hábitat natural.

Sugawara (*et al.*, 2015) estudiaron la genética de poblaciones de *Anolis carolinensis* introducidas en tres islas utilizando microsatélites. Los resultados del AMOVA mostraron una composición genética (H_o) homogénea dentro de las poblaciones de las islas pero tendencia a la estructura ($F_{st} = 0.029$, promedio) entre las poblaciones.

Arroyo (2008) analizó poblaciones de *Anolis uniformis* en fragmentos con diferente tamaño y grado de aislamiento utilizando un gen mitocondrial (ND4) y siete microsatélites como marcadores moleculares. El estudio presentó valores altos de diversidad haplotípica y bajos de diversidad nucleotídica y no encontró evidencia de modificación genética a causa de la fragmentación de la selva. Sin embargo, el tamaño de muestra analizado con el gen mitocondrial pudo no ser suficiente para detectar diferencias genéticas.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la composición y estructura genética de *Anolis uniformis* a partir de genes mitocondriales en un paisaje fragmentado en la selva de Los Tuxtlas, Veracruz y en una zona continua al sur de la selva Lacandona, Chiapas.

3.2 Objetivos particulares

1. Obtener la diversidad genética de la población fragmentada de *Anolis uniformis* en Los Tuxtlas, Veracruz.
2. Estimar la diferenciación genética entre las poblaciones de los fragmentos.
3. Realizar un análisis comparativo entre el tamaño del fragmento y la variación genética de las poblaciones en Los Tuxtlas.
4. Obtener la diversidad genética de una población en un continuo de la selva al sur de Lacandona, Chiapas.
5. Comparar la composición genética de las poblaciones de *Anolis uniformis* en Los Tuxtlas, y en un continuo de selva al sur de Lacandona, Chiapas.
6. Determinar el estado de conservación de la especie en el paisaje fragmentado y proponer alternativas para la población.

IV. JUSTIFICACIÓN

La fragmentación y deforestación del hábitat en los bosques tropicales de México representan las principales amenazas para la pérdida de diversidad y riqueza biológica (Hernández *et al.*, 2014). Especies con vagilidad reducida y una limitada tolerancia fisiológica, como los reptiles, son clave en los estudios sobre el impacto de la fragmentación del hábitat (Suazo, 2009; Moreno y Urbina, 2013; Rivera *et al.*, 2015).

De acuerdo con Flores y García (2014), el mayor número de especies de reptiles en México se encuentra en los bosques tropicales de Oaxaca (262 spp.), Chiapas (220 spp.) y Veracruz (200 spp.) siendo las lagartijas el grupo más diverso. Las lagartijas del género *Anolis* son de las más numerosas con aproximadamente 48 especies; sin embargo, se tienen pocos estudios sobre ecología y genética de poblaciones (Heras y Villarreal, 2000; Cabrera y Garrido, 2014; Hernández *et al.*, 2015; Pratos *et al.*, 2015) y muchas de las especies mexicanas no son incluidas en las filogenias propuestas debido a que no se tiene suficiente información o muestras disponibles (Nicholson *et al.*, 2012). La mayor parte de los trabajos de estructura genética con *Anolis* se han realizado en poblaciones isleñas en Las Antillas (Sugawara *et al.*, 2015), por lo cual es necesario generar más información en especies del continente y llenar vacíos en el conocimiento de este género en México.

V. HIPÓTESIS GENERAL

El proceso de fragmentación de la selva de Los Tuxtlas en Veracruz, genera parches con diferente grado de aislamiento y diferentes tamaños (chicos, medianos y grandes). Existe baja conectividad entre las poblaciones y como consecuencia la migración y el flujo génico son limitados, reduciendo así los niveles de diversidad genética dentro de las poblaciones y aumentando la diferenciación genética entre ellas. Las poblaciones contenidas en los remanentes, al permanecer aisladas durante varias generaciones, serán genéticamente diferentes entre sí y presentarán una disposición genética diferente a una población continua en la selva Lacandona.

VI. HIPÓTESIS PARTICULARES

- La matriz de pastizales y potreros que rodea los fragmentos de selva en Los Tuxtlas producirá el aislamiento de las poblaciones de *Anolis uniformis* debido a que los individuos tienen escasa probabilidad de cruzar, se espera baja diversidad genética dentro de los remanentes y la ausencia de flujo génico.
- La diferenciación genética aumentará a medida que los fragmentos estén más alejados geográficamente dada la baja dispersión de individuos y el reducido flujo genético entre las poblaciones en Los Tuxtlas.
- En poblaciones pequeñas el aislamiento eleva la intensidad de la deriva genética y por tanto el riesgo a la extinción local.
- Las poblaciones que habitan fragmentos grandes de selva contendrán mayor diversidad que aquellas en fragmentos pequeños.
- La composición genética de la población fragmentada en Los Tuxtlas es diferente a la composición genética de la población en el continuo de la selva Lacandona.

VII. MÉTODO

7.1 Sitios de estudio

Los Tuxtlas. La región de Los Tuxtlas se localiza en la costa sur del estado de Veracruz entre los 18°01' - 18°45' N y 94°42' - 95°25' O con aproximadamente 40 km de largo por 18 km de ancho (Figura 2). Al oeste de la región se localiza el volcán San Martín Tuxtla (1780 m snm) y al sureste los volcanes Santa Marta (1660 m snm) y San Martín Pajapan (1245 m snm) (Heras y Villarreal, 2000; Reynoso *et al.*, 2017).

El área ha sido fuertemente afectada por el proceso de fragmentación desde hace al menos 50 años (Cabrera y Reynoso, 2012). La estructura actual de Los Tuxtlas consiste en zonas conservadas de selva alta perenifolia y selva húmeda en aproximadamente 1005 fragmentos de entre 0.5 y 9.356 ha, inmersos en una matriz de vegetación secundaria, acahuales, zonas urbanas, así como campos agrícolas y ganaderos (Mendoza *et al.*, 2005). El 84 % de los fragmentos se encuentran aislados por más de 500 m de distancia al parche más grande de bosque y su tamaño disminuye con la distancia (Heras y Villarreal, 2000; Mendoza *et al.*, 2005; Urbina *et al.*, 2006; Galindo, 2007; Figueroa, 2009; Matías, 2016).

Selva Lacandona. Se encuentra ubicada al sur de Chiapas entre los 16° 31' 40.4" N y 91° 03' 07.6" O, limita al sur con Guatemala y al este con Tabasco (Figura 2). Cuenta con una extensión aproximada de 13000 km², considerada como el remanente de selva con mayor tamaño en México y presenta alta diversidad herpetofaunística con 89 spp. de reptiles y 35 spp. de anfibios (Hernández *et al.*, 2014; Hernández *et al.*, 2015).

A pesar de que Lacandona es considerada la segunda región tropical más diversa de México después de Los Tuxtlas y es reconocida como área prioritaria para la

conservación (Conabio-Conanp-TNC-Pronatura-FCF, UANL, 2007; Hernández *et al.*, 2014; Hernández *et al.*, 2015) la tasa de deforestación aumentó de 1% al 4.3% en la última década (De Jong *et al.*, 2009). Debido a su importancia y a la poca información herpetológica se eligió analizar muestras de *A. uniformis* en un continuo de selva al sur de Lacandona en los poblados Las ruinas y el siete.

En este estudio se utilizaron 120 muestras de tejido (puntas de cola) de *Anolis uniformis*, de las cuales 90 pertenecen a la región de Los Tuxtlas (LT) y fueron colectadas en 2005 por D. Arroyo (Arroyo, 2008) y 30 son de la selva Lacandona (LC) colectadas por O. Hernández en julio del 2017 (Tabla 1). Todas las muestras se encuentran almacenadas en etanol absoluto (OH 100%) y depositadas en la Colección Nacional de Anfibios y Reptiles (CNAR), del Instituto de Biología, UNAM.

Tabla 1. Sitios muestreados. Modificado de Cabrera, (2005) y Arroyo (2008).

Categoría	Tamaño (ha)	Sitio	Latitud (N)	Longitud (O)	
Fragmentos Chicos (CH)	10-20	Fragmento 3	F3	18° 36' 6.72''	95° 08' 18.76''
		Fragmento 4	F4	18° 36' 58.19''	95° 07' 46.47''
		Fragmento 6	F6	18° 36' 41.63''	95° 08' 21.12''
Fragmentos Medianos (MD)	20-90	Cerro del Borrego	CB	18° 38' 23.33''	95° 05' 11.38''
		Playa Escondida	PE	18° 35' 34.20''	95° 03' 17.10''
		La Perla	LP	18° 32' 23.60''	95° 03' 18.20''
Fragmentos Grandes (GD)	<100	Los Hubber	LH	18° 36' 45.30''	95° 05' 46.60''
		Selva alta Estación de biología "Los Tuxtlas"	SA	18° 35' 07.10''	95° 07' 45.10''
		Parte alta de la Estación de biología "Los Tuxtlas"	SE	18° 34' 56.60''	95° 04' 52.10''
Continuo (C)	<100	Selva Lacandona	LC	16° 06' 37.18''	91° 00' 30.88''

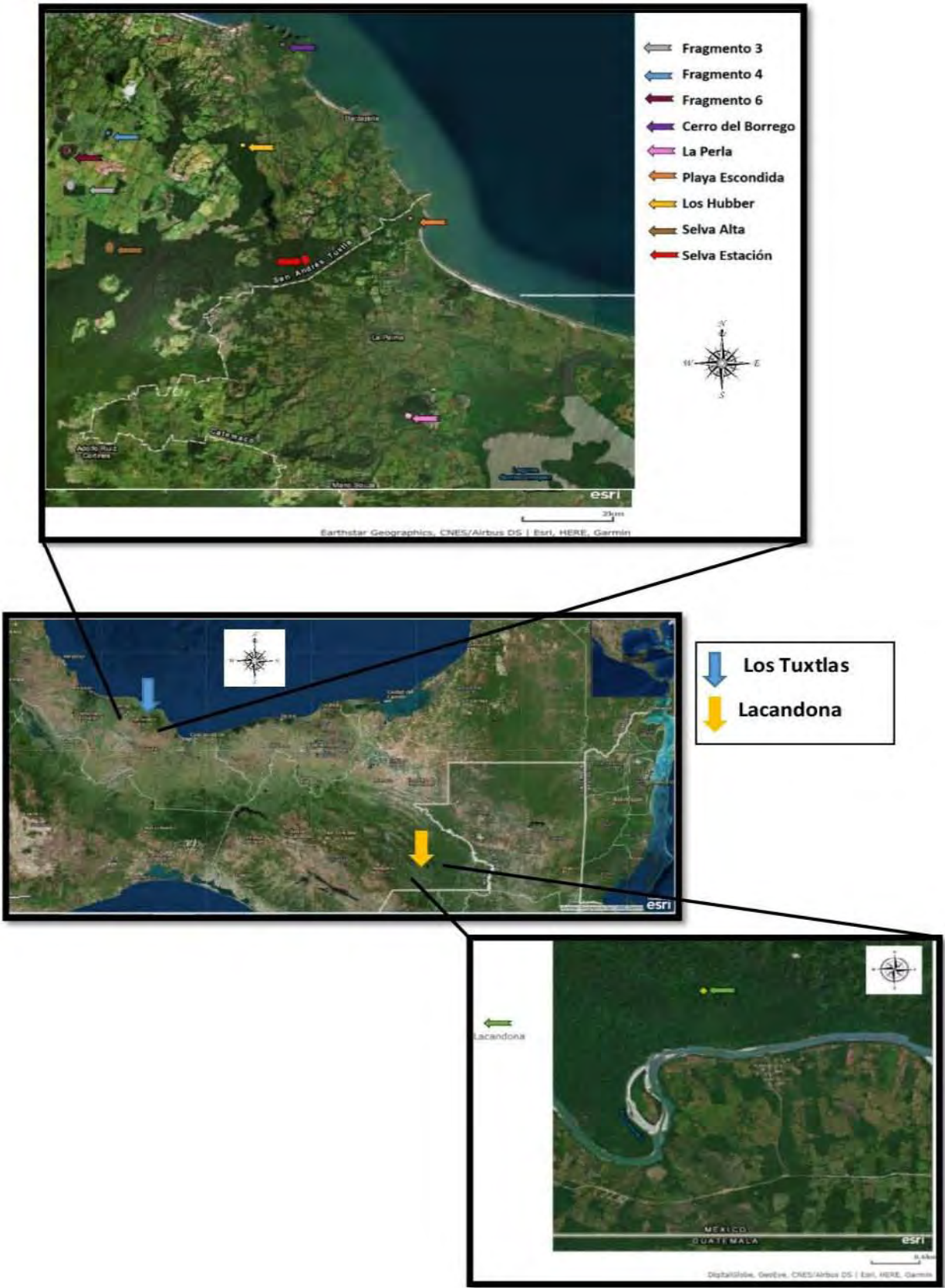


Figura 2. Sitios de colecta.

7.2 Trabajo de laboratorio

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Zoología del Instituto de Biología, UNAM.

Extracción de ADN. El ADN fue extraído a partir de tejido (puntas de cola) en etanol absoluto (OH 100%), utilizando el protocolo de sales modificado de Sunnucks y Hales (1996) y Aljanabi y Martinez (1997). Para comprobar la extracción de ADN, se corrió un gel de agarosa al 1%, usando TAE 1X e incluyendo un marcador referencia de 1000 pb (HyperLadder™) (ANEXO I).

Amplificación de ADN. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se amplificó para cada muestra las regiones seleccionadas de ADNmt: ND4 (Arévalo *et al.*, 1994) y CytB (Burbrink *et al.*, 2000 y De Queiroz *et al.*, 2002).

El volumen total de las reacciones de PCR fue de 15 µL para ND4 y 14 µL para CytB. Para cada mezcla se empleó: My Taq Reaction Buffer 5X (BIOLINE), dNTPs 5 mM, MgCl₂ 15 mM (BIOLINE), MyTaq DNA Polymerase 5 ^v/µl (BIOLINE), DMSO al 0.3%, 10 µM de los oligonucleótidos específicos para cada marcador ND4 (Nd4F / LeuR) y CytB (L14910F / H16064R) y 1 µL de ADN (ANEXO II).

Se utilizaron los termocicladores Mastercycler® ep gradient S, de la marca EPPENDORF para elegir la mejor temperatura de amplificación y el Termociclador Arktik™ Dual block (2 x 48 wells) de Thermo Scientific™ para el procesamiento final de las muestras (ANEXO II). Se verificó la amplificación de todas las muestras por electroforesis en gels de agarosa al 1.5 % en TAE 1X incluyendo un marcador de peso molecular de 100 pb (HyperLadder™) y un control negativo.

Secuenciación. Los productos de PCR fueron enviados al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, Instituto de Biología, UNAM, el cual cuenta con un secuenciador 3500xl (de 96 capilares) Life Technology, para ser secuenciados por electroforesis capilar (Sanger) en ambas direcciones.

7.3 Procesamiento de secuencias

Visualización de secuencias. Los cromatogramas fueron visualizados en el software, FinchTV 1.4.0 (Geospiza, Inc.; Seattle, WA, USA) para determinar la calidad de cada secuencia. El criterio utilizado para considerar de buena calidad a una secuencia fue la presencia de picos únicos bien definidos y separados entre sí (Figura 3).

Posteriormente, las secuencias obtenidas se compararon con secuencias del banco de genes (GenBank) para confirmar la identidad de la especie a través de la herramienta bioinformática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul *et al.*, 1990) en el servidor del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

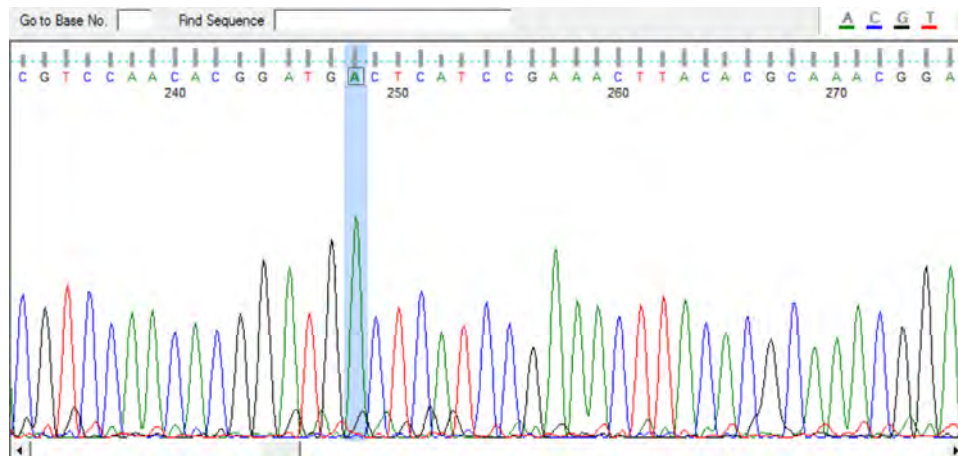


Figura 3. Visualización de los cromatogramas de las secuencias. Se muestra un ejemplo de una buena amplitud de lectura para Adenina.

Alineamiento y edición de secuencias. Las secuencias consenso (conting) de cada muestra para cada uno de los genes utilizados se editaron con los programas: Codoncode

Aligner v. 5.0.2 (Codoncode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA) y Geneious v.10.2.5 (Kearse *et al.*, 2012) los cuales seleccionan automáticamente la mejor secuencia consenso y al final se ajusta manualmente (Figuras 4 y 5).



Figura 4. Edición de secuencias con el programa Codoncode Aligner. A) Secuencia de nucleótidos en ambas direcciones, B) edición secuencia consenso, C) Cromatograma de la secuencia en dirección (5'-3') y D) Cromatograma de la secuencia en dirección inversa (3'-5').



Figura 5. Edición de secuencias con el programa Geneious (Kearse *et al.*, 2012).

Finalmente se realizó el alineamiento múltiple de la región homóloga de las secuencias para cada marcador (Figura 6) y un concatenado (ND4 + CytB) con el algoritmo iterativo Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE) mediante el software MEGA v.6.0 (Tamura *et al.*, 2011).



Figura 6. Alineamiento de secuencias para los dos genes de ADNmt empleados. Las flechas señalan variaciones de pares de bases a lo largo de las secuencias.

7.4 Análisis de datos

De acuerdo con los objetivos del estudio se analizaron las matrices de secuencias de ADN individualmente y concatenadas (ND4 + CytB) en tres niveles utilizando los mismos parámetros y supuestos. Primero se hizo un análisis a nivel poblacional en Los Tuxtlas (comparando todos los fragmentos entre sí), seguido de un análisis agrupando a los fragmentos por tamaño (CH, MD, GD) y finalmente un análisis por región entre Los Tuxtlas (LT = todos los fragmentos en conjunto) y Lacandona (LC).

Diversidad genética. Para analizar la variación genética se utilizaron estadísticos que comparan las frecuencias de cada alelo en cada locus (dentro y entre las poblaciones), obtenida a través de los genes mitocondriales (Eguiarte *et al.*, 2007; Garrido y Vázquez, 2013).

En el programa DnaSP v.5 (Librado y Rozas, 2009) se calculó la diversidad genética contenida, dentro de las poblaciones a partir de: la diversidad haplotípica (dh), la diversidad nucleotídica (π) y el número de sitios segregantes (S). Los parámetros utilizados fueron:

para una sola especie, ADNmt en organismos haploides, exclusión de gaps y conjuntos de secuencias definidos (población, tamaño o región). El programa supone un modelo de sitios infinitos (dos nucleótidos diferentes por sitio) y el número total de mutaciones como sitios segregantes. La dh calcula la probabilidad de que dos haplotipos seleccionados al azar en una población sean diferentes (Nei, 1987) y π la distancia que hay entre dos secuencias de ADN (nucleótidos diferentes) y la corrige multiplicándola por la suma de las frecuencias para todas las combinaciones posibles. S corresponde a los sitios en los cuales difieren un conjunto de secuencias de ADN tomadas al azar.

En GenAIEx v.6.5 (Peakall y Smouse, 2012) se calculó el número de haplotipos (h) determinado mediante la divergencia entre dos secuencias al azar y la frecuencia con la cual se presenten en la población. Se empleó Arlequín v.3.5. (Excoffier *et al.*, 2010) para estimar la composición nucleotídica de cada población para ambos genes, ND4 y CytB.

Para determinar si la variación molecular se explica bajo un modelo de evolución neutral se obtuvieron también en Arlequin los índices D de Tajima (Tajima, 1998) y F de Fu y Li (Fu y Li, 1993) basados en el modelo de alelos infinitos, bajo un algoritmo de coalescencia con 1000 repeticiones y un nivel de significancia ($P > 0.05$). La D de Tajima analiza la relación entre la diversidad nucleotídica y el número de sitios segregantes esperado. Mientras la F de Fu hace una comparación entre el número de mutaciones simples derivadas y la diferencia pareada media entre las secuencias (Fu y Li, 1993; Eguiarte *et al.*, 2007, Ramírez *et al.*, 2008). Los valores positivos en ambos estadísticos sugieren procesos de selección balanceadora o reducción del tamaño poblacional y valores negativos muestran poblaciones bajo expansión demográfica reciente o efectos de la selección purificadora.

Para saber si existe alguna relación entre los valores de diversidad genética con respecto al tamaño del fragmento se realizó en Excel un Análisis de Varianza (ANOVA) con un valor de significancia $P > 0.05$, a partir de la diversidad haplotípica y nucleotídica (ANEXO III).

Para analizar cómo se agrupan las poblaciones con base en la relación haplotípica, se realizó un red sin enraizar con el programa Splits Tree 4 (Huson y Bryant, 2006) para cada marcador molecular, con el método de NeighborNet. Los modelos de sustitución nucleotídica se escogieron por medio de JModeltest 2 v 0.1.10 (Darriba *et al.*, 2012) usando el criterio de información Akaike (AIC) y 10000 repeticiones (Posada y Buckley, 2004). El modelo de sustitución nucleotídica utilizado fue HKY85 de 6 parámetros (Hasekawa, *et al.*, 1985), que supone frecuencia desigual en el recambio de bases nucleotídicas y toma en cuenta la diferencia entre las transiciones y las transversiones.

Diferenciación genética. Para comparar la variación genética entre las poblaciones se empleó la medida de diferenciación genética F_{st} de Wright (1951) la cual permite obtener la divergencia entre secuencias. Las F_{st} pareadas se calcularon en Arlequín (por población, por tamaño de fragmento y por región) con base en el número de diferencias observadas entre haplotipos, se utilizaron 10000 repeticiones y un valor de significancia ($P > 0.05$). Valores cercanos a 1 se interpretan como poblaciones totalmente distintas, mientras que valores cercanos a 0 representan poblaciones similares genéticamente.

Para conocer el grado de estructura genética se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) en Arlequín, utilizando 100 repeticiones y un valor de significancia $P > 0.05$. Este análisis se realizó entre poblaciones, por tamaño de fragmento y por región. El AMOVA mediante una serie de simulaciones calcula la correlación entre la diversidad haplotípica y la estructura genética de una población, con base en el contenido alélico de

los haplotipos y sus frecuencias entre poblaciones, bajo una matriz de distancias cuadradas euclidianas (Excoffier *et al.*, 1992).

Finalmente debido a que las poblaciones de estudio se encuentran aisladas, se llevó a cabo una prueba de Mantel para evaluar si existe aislamiento por distancia, es decir, si la acumulación de diferencias genéticas locales se explica por la distancia geográfica limitando la dispersión entre grandes extensiones de área (Wright, 1951; Slatkin, 1993; Garrido y Vázquez, 2013). El análisis se realizó a partir de las matrices de F_{st} calculadas, en el programa R-Studio v.1.0.143 con las paqueterías "ade4" (Dray y Dufour, 2007) y "fossil" (Vavrek, 2010) usando 1000 repeticiones y un valor de significancia $P > 0.05$. Mediante la "paquetería fossil" se creó una matriz de distancias geográficas a partir de la ubicación de los fragmentos (longitud, latitud) que se contrastó con las matrices de diferenciación genética con la "paquetería ade4". Los resultados de la prueba de mantel son interpretados a través del índice de correlación "r" de Peterson. Un resultado cercano a 1 explica que la distancia geográfica que existe entre poblaciones está relacionada con la distancia genética, mientras que $r = -1$ muestra un patrón opuesto y los resultados cercanos a cero explican que no existe relación entre las dos matrices.

VIII. RESULTADOS

8.1 Trabajo de laboratorio

Extracción y amplificación de ADN. Se extrajeron en total 120 muestras de ADN, 10 para cada fragmento de Los Tuxtlas y 30 para la región sureste de la selva Lacandona. Para todas las muestras se amplificaron los dos genes y se obtuvo un amplicón de 761 pb para ND4 y 934 pb para CytB.

8.2 Genética poblacional

Los resultados se presentan en tres niveles: análisis a nivel poblacional en Los Tuxtlas, por tamaño de fragmento y finalmente comparando las regiones de Los Tuxtlas y Lacandona.

8.2.1 Análisis poblacional en Los Tuxtlas

Diversidad genética. La composición nucleotídica de ND4 se compone en mayor parte por adenina (A) y timina (T), mientras que para CytB de citocina (C) y timina (T) (ver ANEXO III).

La diversidad haplotípica dentro de las poblaciones fué alta mientras que la diversidad nucleotípica baja, resultando CytB más variable que ND4 (Tabla 2). Los valores más altos de diversidad para ND4 se encontraron en el fragmento chico F6 ($dh = 0.8667$, $\pi = 0.00476$) y en los fragmentos medianos La Perla (LP) y Cerro de Borrego (CB) ($dh = 0.8$). Mientras que para CytB los fragmentos más variables fueron el Fragmento 3 (F3), la parte alta de la selva (SA) ($dh = 0.956$) y CB ($\pi = 0.0049$). El análisis concatenado (ND4 + CytB) mostró que el fragmento F6 presentó en su conjunto una mayor variación haplotípica y nucleotídica ($dh = 0.978$, $\pi = 0.00379$). Los estimadores de neutralidad D de Tajima (Tajima, 1998) y F de Fu y Li (Fu y Li, 1993) mostraron valores significativos en el fragmento

PE ($D = -1.79631$, $F = -2.25642$) y SE ($D = -1.83913$, $F = -2.474$) con ND4. Los marcadores CytB y ND4 + CytB fueron significativos para F6 ($D = -1.98865$, $F = -2.53317$ y $D = -1.8937$, $F = -2.39314$ respectivamente).

Tabla 2. Caracterización genética de los fragmentos en Los Tuxtlas. Número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (dh), diversidad nucleotídica (π), sitios polimórficos (S), prueba de neutralidad de Tajima (D) y prueba de Fu y Li (F). Chicos (CH), medianos (MD), grandes (GD). En negritas se muestran los valores más altos, los valores positivos para D y F subrayados y con asterisco (*) los valores significativos.

Tamaño	Población	Marcador	h	dh	π	S	D	F
CH	F3	ND4	2	0.200	0.00026	1	-1.11173	-1.34668
		CytB	8	0.956*	0.00340	10	-0.16910	-0.66971
		ND4 + CytB	8	0.956	0.00212	11	-1.24610	-0.28850
	F4	ND4	4	0.533	0.001781	6	-1.49284	-1.68930
		CytB	5	0.667	0.002970	10	-0.94931	-6.60024
		ND4 + CytB	8	0.933	0.00244	16	-1.24610	-1.11400
	F6	ND4	7	0.866*	0.00476*	16	-1.66440	-2.0558
		CytB	7	0.867	0.00300	14	-1.98865*	-2.53317*
		ND4 + CytB	9	0.978*	0.00379*	30	-1.89370*	-2.39314*
MD	LP	ND4	5	0.800*	0.002541	8	-1.36478	-1.84480
		CytB	5	0.800	0.00200	8	-1.46644	-1.87297
		ND4 + CytB	7	0.867	0.00161	12	-1.60625	-2.12690
	PE	ND4	3	0.377	0.00157	6	-1.79631*	-2.25642*
		CytB	3	0.378	0.00086	4	-1.66706	-2.07655
		ND4 + CytB	7	0.911	0.00194	13	-1.29367	-1.57800
	CB	ND4	4	0.800	0.01930	3	<u>1.37817</u>	<u>1.35059</u>
		CytB	6	0.889	0.0049	14	-0.34337	-0.44517
		ND4 + CytB	6	0.889	0.00357	17	<u>0.02733</u>	-0.05536
GD	LH	ND4	4	0.533	0.00099	3	-1.03446	-0.96179
		CytB	7	0.911	0.00224	7	-0.65991	-0.14550
		ND4 + CytB	7	0.867	0.00155	11	-1.45806	-1.75595
	SA	ND4	2	0.200	0.00052	2	-1.40008	-1.58600
		CytB	8	0.956	0.00324	12	-1.29886	-1.23987
		ND4 + CytB	8	0.956	0.00202	14	-1.41280	-1.44178
	SE	ND4	5	0.666	0.00184	7	-1.83913*	-2.47400*
		CytB	7	0.911	0.00385	14	-1.24827	-1.39580
		ND4 + CytB	9	0.978	0.00295	21	-1.53910	-1.83568

Con respecto al número de haplotipos el gen ND4 es más conservado, con el menor número de haplotipos, 27. Con el marcador CytB se obtuvieron 44 haplotipos. La población en el fragmento de Los Hubber (LH) comparte haplotipos con siete de las nueve poblaciones; sin embargo, ningún haplotipo está representado en todos los fragmentos. Al analizar los genes ND4 y CytB en concatenado se obtuvieron 60 haplotipos ningún haplotipo se presenta en todos los fragmentos y al igual que con CytB se presenta una ligera tendencia a la estructuración (ANEXO III).

Diferenciación genética. Para los dos genes y el concatenado se encontró de baja a moderada estructura genética al comparar las poblaciones en los fragmentos de Los Tuxtlas; sin embargo, los valores más altos se observan para CytB. Con el marcador molecular ND4 (Tabla 3) el valor más alto y significativo fue entre los pares de poblaciones F3 y LP ($F_{st} = 0.24242$) y entre F4 y CB para CytB (Tabla 4) y el concatenado con $F_{st} = 0.45126$ y $F_{st} = 0.32148$ respectivamente (Tabla 5).

Tabla 3. Valores de F_{st} entre fragmentos de Los Tuxtlas con ND4. En negritas se muestran los valores más altos y con asterisco (*) los valores significativos.

	F3	F4	F6	LP	PE	CB	LH	SA	***SE
F3	0.0000								
F4	0.0277	0.0000							
F6	0.0444	-0.0117	0.0000						
LP	0.2424*	0.1699*	0.1226*	0.0000					
PE	0.0444	0.0404	0.0399	0.2063*	0.0000				
CB	0.1111	0.0864*	0.0740*	0.1904*	0.1037*	0.0000			
LH	0.0000	0.0170	0.0355	0.1228	0.0222	0.0329	0.0000		
SA	0.0000	0.0246	0.0423	0.2222*	0.0370	0.1025	0.0000	0.0000	
SE	0.0000	0.0158	0.0267	0.1152	0.0202	0.0740	-0.015	0.0000	0.0000

Tabla 4. Valores de F_{st} entre fragmentos de Los Tuxtlas con CytB. En negritas se muestran los valores más altos y con asterisco (*) los valores significativos.

	F3	F4	F6	LP	PE	CB	LH	SA	SE
F3	0.0000								
F4	-0.0161	0.0000							
F6	0.0127	-0.032	0.0000						
LP	0.1135*	0.1116*	0.1258*	0.0000					
PE	0.2020*	0.2460*	0.2708*	0.1384*	0.0000				
CB	0.2808*	0.4512*	0.4375*	0.3277*	0.3939*	0.0000			
LH	0.1423*	0.1834*	0.1797*	0.0991	0.0758	0.3981*	0.0000		
SA	0.1459*	0.2162*	0.2132*	0.1203*	0.0451	0.2167*	0.0464	0.0000	
SE	0.1025*	0.2297*	0.2381*	0.1689*	0.1350*	0.0350	0.1483*	0.0374	0.0000

Tabla 5. Valores de F_{st} entre fragmentos de Los Tuxtlas, ND4 + CytB. En negritas se muestran los valores más altos y con asterisco (*) los valores significativos.

	F3	F4	F6	LP	PE	CB	LH	SA	SE
F3	0.0000								
F4	-0.007*	0.0000							
F6	0.0250*	-0.023*	0.0000						
LP	0.1388*	0.1286*	0.1245*	0.0000					
PE	0.1812*	0.1919*	0.1747*	0.1569*	0.0000				
CB	0.2313*	0.3214*	0.2616*	0.2805*	0.2762*	0.0000			
LH	0.1168*	0.1329*	0.1139*	0.1060*	0.0587*	0.2509*	0.0000		
SA	0.1351*	0.1787*	0.1513*	0.1425*	0.0436*	0.1770*	0.0357*	0.0000	
SE	0.0851*	0.1756*	0.1576*	0.1556*	0.1053*	0.0522*	0.1029*	0.0297*	0.0000

El AMOVA muestra que la mayor cantidad de variación se encuentra dentro de las poblaciones (Tabla 6). El valor más alto fue para ND4 con 92.80 %, mientras que para CytB y el análisis concatenado fue de 85.80 %.

Tabla 6. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de la variación haplotípica de ADNmt. entre las poblaciones en los fragmentos de Los Tuxtlas. En negritas se muestran los valores más altos.

Gen	Fuente de variación	Grados de libertad	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Índice de fijación (F_{st})
ND4	Entre poblaciones	8	0.05315	7.20	0.07198
	Dentro de poblaciones	81	0.68519	92.80	
CytB	Entre poblaciones	8	0.28954	17.29	0.17289
	Dentro de poblaciones	81	1.38519	85.80	
ND4 + CytB	Entre poblaciones	8	0.34269	14.20	0.14201
	Dentro de poblaciones	81	2.07037	85.80	

El análisis de aislamiento por distancia muestra una relación positiva entre la diferenciación genética y la distancia geográfica (Figura 10) pero significativa sólo para CytB y ND4 + CytB.

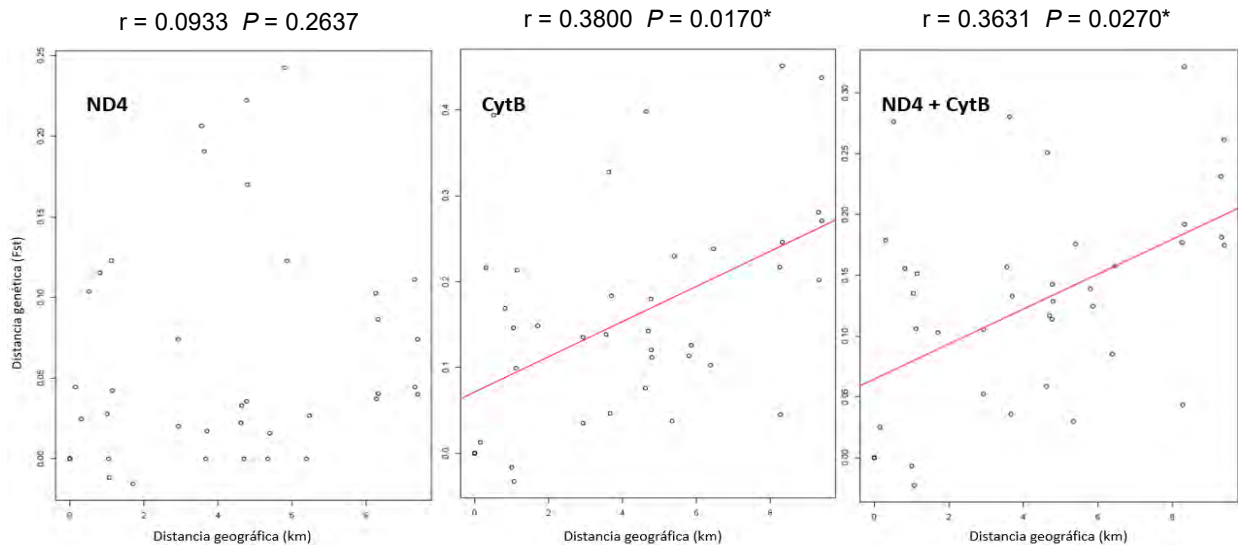


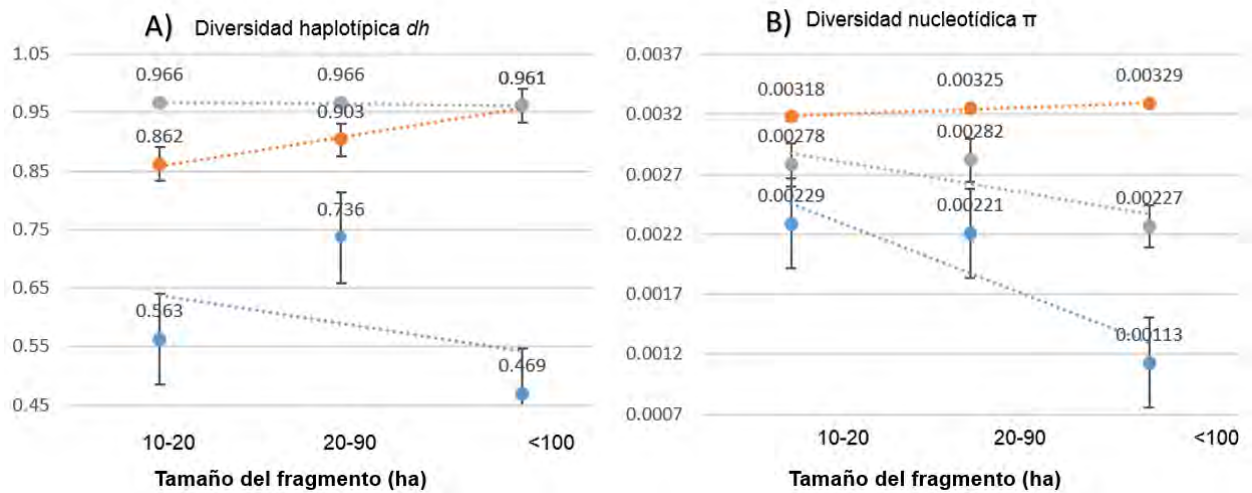
Figura 10. Análisis de aislamiento por distancia. Correlación entre la distancia genética y distancia geográfica en Los Tuxtlas para ND4, CytB y ND4 + CytB. Con asterisco (*) los valores significativos.

8.2.2 Análisis por tamaño de fragmento

Diversidad genética. Las gráficas de la figura 11 muestran alta diversidad haplotípica (dh) y baja diversidad nucleotídica (π), la composición genética por tamaño mantiene a CytB como el marcador más variable.

Con el marcador ND4 las poblaciones de los fragmentos medianos presentan una mayor diversidad haplotípica ($dh = 0.736$) y las de los fragmentos chicos el valor más alto de diversidad nucleotídica ($\pi = 0.00229$). Para CytB los fragmentos grandes obtuvieron los valores mayores de diversidad genética ($dh = 0.961$, $\pi = 0.00329$). De acuerdo con los resultados del concatenado ND4 + CytB, los fragmentos chicos y medianos son los más variables con una diversidad haplotípica de $dh = 0.96$ y una diversidad nucleotídica de $\pi = 0.00278$ y $\pi = 0.00282$ respectivamente.

La distribución del número de haplotipos totales muestra que para ND4, los fragmentos chicos presentan el mayor número de haplotipos ($h = 11$), mientras para CytB ($h = 19$) y ND4 + CytB el mayor número de haplotipos se encuentra en los fragmentos grandes ($h = 23$) (Figura 11C).



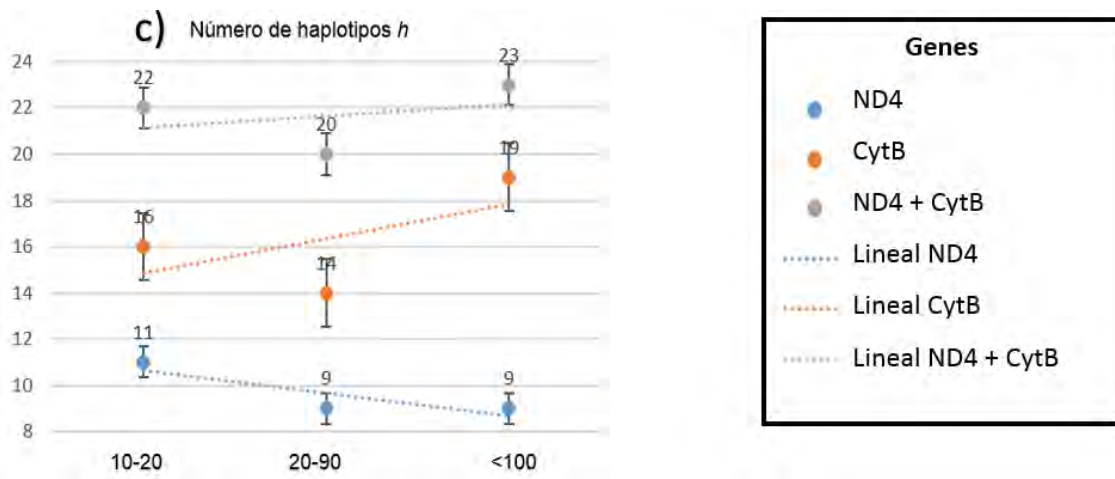


Figura 11. Variación en la diversidad haplotípica, diversidad nucleotídica y número de haplotipos con respecto al tamaño del fragmento. Las líneas punteadas representan la tendencia lineal para los resultados de cada gen.

Los valores de neutralidad de la D de Tajima y F de Fu (Tabla 7) resultaron negativos y significativos en todos los tamaños de fragmento, excepto en los medianos con ND4 y el concatenado.

Tabla 7. Valores de neutralidad de Tajima (D) y prueba de Fu y Li (F) dentro de fragmentos agrupados por tamaño. Con asterisco (*) los valores significativos.

Población	Marcador	D	F
CH	ND4	-2.20453*	-3.18100*
	CytB	-1.63649*	-2.74834*
	ND4 + CytB	-2.00821*	-3.20798*
MD	ND4	-1.45275	-0.85662
	CytB	-1.84815*	-2.65480*
	ND4 + CytB	-1.17490	-1.40962
GD	ND4	-2.33435*	-3.82866*
	CytB	-1.96618*	-2.66764*
	ND4 + CytB	-2.31794*	-3.59350*

El ANOVA para las medias de dh y π no mostró diferencias significativas de acuerdo con la categoría de tamaño para ninguno de los casos. Los valores para la diversidad haplotípica son: ND4, $F(2) = 0.3776$ $P = 0.7007$; CytB, $F(2) = 1.3178$ $P = 0.3355$; y ND4 + CytB, $F(2) = 0.4604$ $P = 0.6516$. Mientras que los valores para la diversidad nucleotídica son: ND4, $F(2) = 1.0951$ $P = 0.3931$; CytB, $F(2) = 0.0759$ $P = 0.9278$; y ND4 + CytB, $F(2) = 0.3634$ $P = 0.7096$ (ver ANEXO III).

Diferenciación genética. Se presentó tendencia a la estructura en todos los tamaños de fragmento (Tabla 8). Con el marcador ND4 el valor más alto fue entre los fragmentos medianos y grandes ($F_{st} = 0.03988$). Para CytB y el concatenado los valores más altos se presentan entre los fragmentos chicos y los grandes con $F_{st} = 0.16441$ y $F_{st} = 0.12410$ respectivamente. Para todos los marcadores se observaron valores significativos entre las poblaciones chicas con respecto a las medianas y grandes, el marcador molecular que presentó mayor estructura fue CytB (Tabla 8).

Tabla 8. Valores de F_{st} obtenidas con Arlequin entre poblaciones por tamaño de fragmento de Los Tuxtlas. En negritas se muestran los valores más altos y con asterisco (*) los valores significativos.

ND4			
Tamaño	CH	MD	GD
CH	0.0000	-	-
MD	0.0398*	0.0000	-
GD	0.0197*	0.0147	0.0000
CytB			
Tamaño	CH	MD	GD
CH	0.0000	-	-
MD	0.1508*	0.0000	-
GD	0.1644*	0.0151	0.0000
ND4 + CytB			
Tamaño	CH	MD	GD
CH	0.0000	-	-
MD	0.1143*	0.0000	-
GD	0.1241*	0.0150*	0.0000

El AMOVA entre fragmentos agrupados por tamaño (Tabla 9) muestra que el mayor porcentaje de variación se encontró dentro de los grupos; el porcentaje más alto fue para ND4 (97.38%), seguido del concatenado (91.21%) y el porcentaje más bajo fue para CytB (88.54%).

Tabla 9. Análisis de varianza molecular (AMOVA) entre las poblaciones agrupadas por tamaño de fragmento en Los Tuxtlas. En negritas se muestran los valores más altos.

Gen	Fuente de variación	Grados de libertad	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Índice de fijación (F_{st})
ND4	Entre grupos de poblaciones	2	0.01934	2.62	0.02616
	Dentro de grupos de poblaciones	87	0.71992	97.38	
CytB	Entre grupos de poblaciones	2	0.19585	11.46	0.11458
	Dentro de grupos de poblaciones	87	1.51341	88.54	
ND4 + CytB	Entre grupos de poblaciones	2	0.21519	8.79	0.08788
	Dentro de grupos de poblaciones	87	2.23333	91.21	

8.2.3 Análisis entre regiones

Diversidad. Al agrupar todos los fragmentos de Los Tuxtlas como una sola región (LT) y contrastarla contra el continuo de la selva Lacandona (LC) se observaron los valores más altos de dh y π en esta última región. Específicamente, $dh = 0.990$ con el concatenado y $\pi = 0.0039$ con CytB (Tabla 10).

Los valores de la D de Tajima y F de Fu fueron negativos y únicamente significativos en la región de Los Tuxtlas.

Tabla 10. Diversidad genética entre regiones. Número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (dh), diversidad nucleotídica (π), sitios polimórficos (S), prueba de neutralidad de Tajima (D) y prueba de Fu y Li (F). En negritas se muestran los valores más altos, los valores positivos para D y F subrayados y con asterisco (*) los valores significativos.

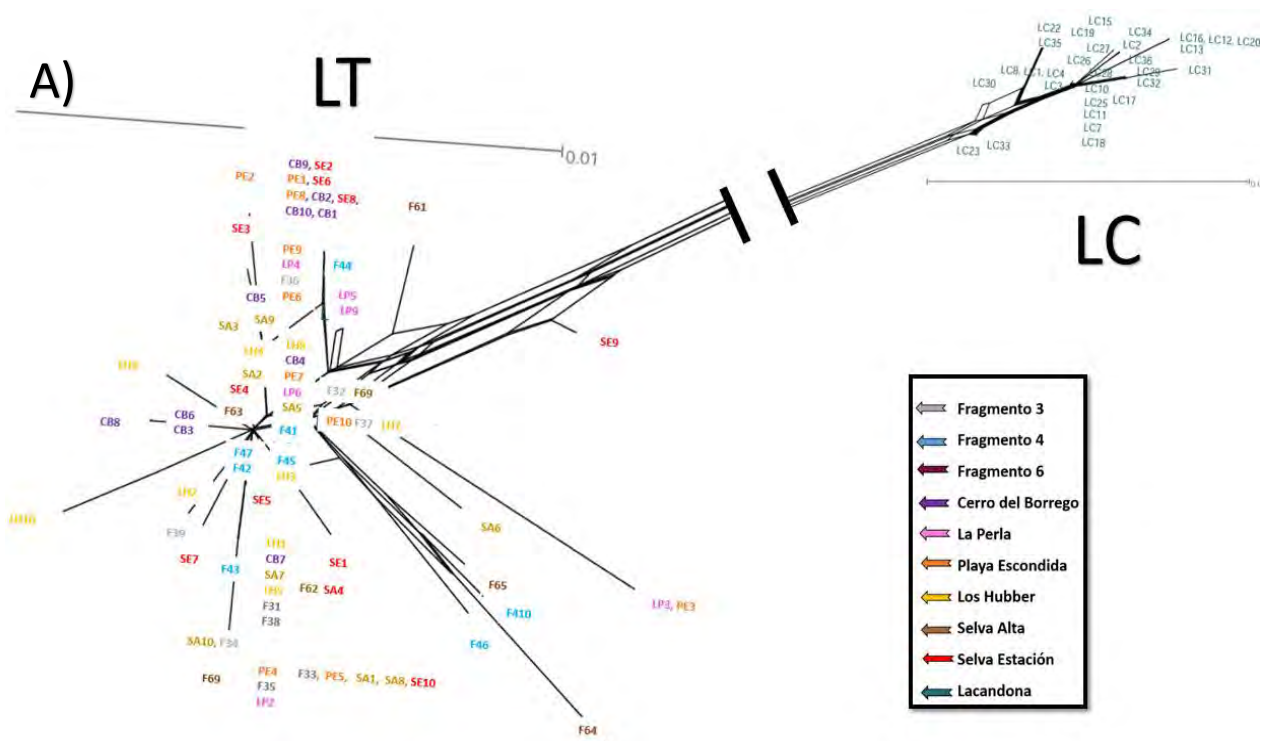
Población	Marcador	h	dh	π	S	D	F
LT	ND4	27	0.599	0.00193	40	-2.57403*	-4.21596*
	CytB	44	0.954	0.00352	59	-2.32849*	-5.18229*
	ND4 + CytB	60	0.982	0.00281	99	-2.51498*	-5.14365*
LC	ND4	12	0.841	0.00241	12	-1.14849	-0.83630
	CytB	19	0.933	0.00390	23	-1.16650	-0.75988
	ND4 + CytB	31	0.990	0.00324	35	-1.23792	-8.72670

La región de los Tuxtlas presenta el mayor número de haplotipos y para ninguno de los marcadores mitocondriales comparte haplotipos con Lacandona. El análisis concatenado obtuvo el mayor número de haplotipos que fue de 60. Las frecuencias haplotípicas pueden ser consultadas en el ANEXO III.

Las redes resultantes en Splits Tree4 para entender cómo se relacionan los haplotipos para todos los marcadores (Figura 12) muestran una clara división entre Los Tuxtlas y Lacandona, sin embargo, la disposición dentro de cada agrupamiento es similar. En la región de Los Tuxtlas no se muestran grupos definidos con ninguno de los genes ya que los organismos de todos los fragmentos se encuentran igualmente relacionados (ANEXO III).

Con el Gen ND4 (Figura 12.Ç-A) en haplotipo central tiene contenidas 57 secuencias, representantes de todos los fragmentos. El resto de los haplotipos en su mayoría está representado por una sola secuencia correspondiente a un solo fragmento. Para el gen CytB (Figura 12-B) y en análisis concatenado (ND4 + CytB, Figura 12-C) las redes muestran tendencia a la estructuración. Existe un haplotipo representativo de los fragmentos chicos

(haplotipo 4), la población en LH comparte haplotipos con fragmentos de los tres tamaños y las poblaciones de los fragmentos selva alta (SA) y selva estación (SE) no comparten haplotipos.



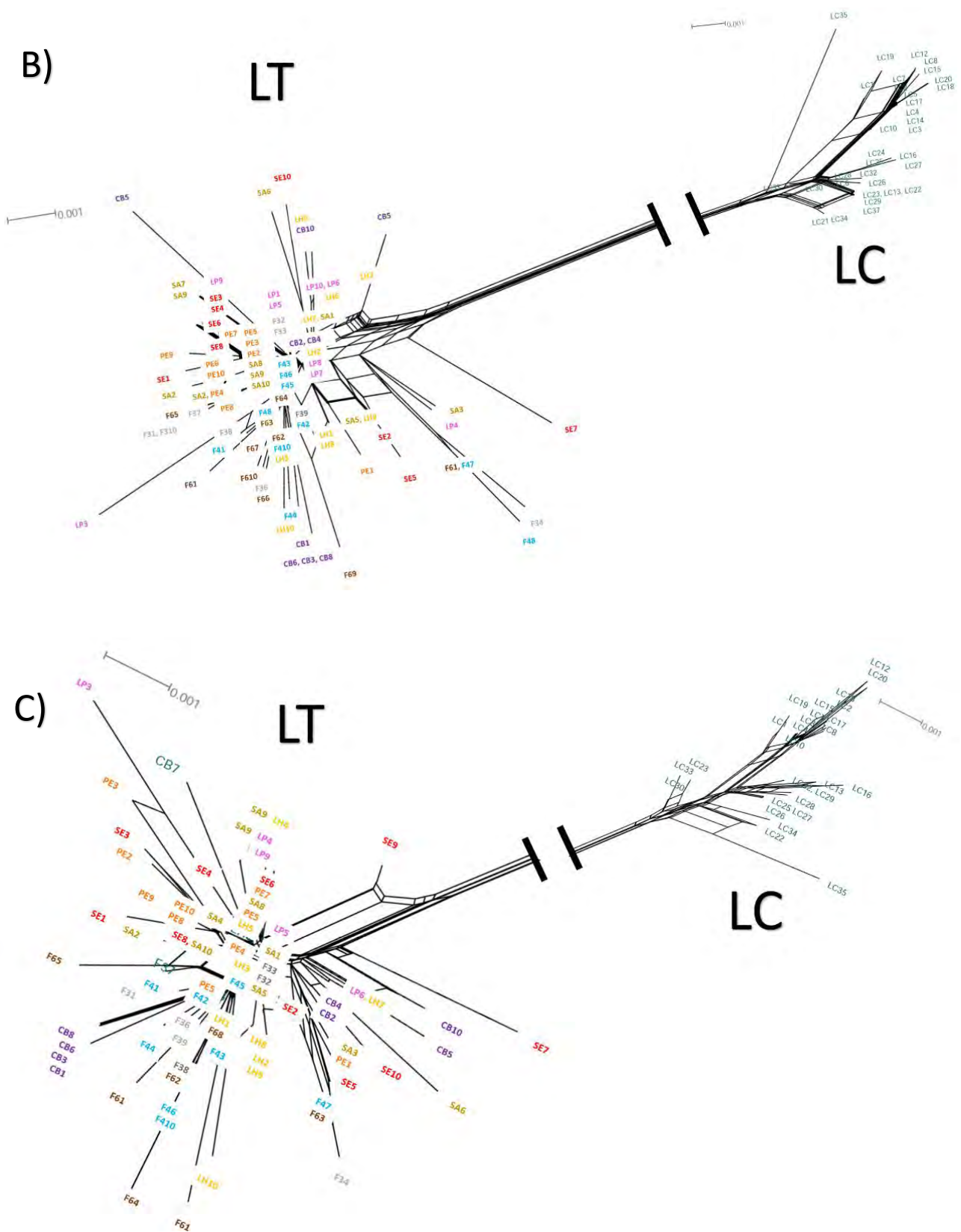


Figura 12. Redes de proximidad para las regiones de Los Tuxtlas y Lacandona. A)ND4; B)CytB; C)ND4 + CytB.

Diferenciación genética. Entre regiones se presenta alta estructura genética (Tabla 11). El valor más alto se obtuvo con ND4 ($F_{st} = 0.96210$) y todos los resultados fueron significativos.

Tabla 11. Valores de F_{st} entre LT y LC. En negritas se muestran los valores más altos y con asterisco (*) los valores significativos.

Gen	F_{st}
ND4	0.96216*
CytB	0.95066*
ND4 + CytB	0.95499*

En el AMOVA (Tabla 12), el mayor porcentaje de variación se encontró entre regiones. Para ND4 96.49%, mientras que para CytB y el concatenado fue de 95.07% y 95.50% respectivamente.

Tabla 12. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de la variación haplotípica de ADNmt. entre poblaciones por región. En negritas se muestran los valores más altos.

Gen	Fuente de variación	Grados de libertad	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Índice de fijación (F_{st})
ND4	Entre regiones	1	20.06901	96.49	0.96216
	Dentro de regiones	107	0.72909	3.51	
CytB	Entre regiones	1	32.68969	95.07	0.95066
	Dentro de regiones	124	1.69668	4.93	
ND4 + CytB	Entre regiones	1	52.65422	95.50	0.95499
	Dentro de regiones	124	2.48194	4.50	

IX. DISCUSIÓN

En la presente tesis se emplearon dos genes mitocondriales ND4 y CytB para evaluar la composición y estructura genética de poblaciones de *Anolis uniformis* en remanentes de selva de diferente tamaño y grado de aislamiento en Los Tuxtlas. Los resultados se compararon con una población en un continuo de selva en Lacandona. Las secuencias de ADN resultaron una herramienta muy útil para determinar la composición y estructura genética de estas poblaciones.

Se observó en todos los análisis que CytB fue un gen más variable que ND4. Generalmente CytB presenta una tasa ligeramente mayor de divergencia y evolución entre secuencias que ND4, consistente con los resultados obtenidos (Duan *et al.*, 2013). Estas variaciones pueden ser explicadas por la diferencia en la longitud de pares de bases de cada uno de los genes analizados, ND4 (761) y CytB (934). Otra explicación puede ser que aunque ambos genes participan en el proceso de respiración celular, codifican para subunidades distintas respondiendo a probabilidades de mutación distintas. Los genes se encuentran sujetos a selección o neutralidad, por ejemplo, de acuerdo con la importancia funcional del gen (Brown *et al.*, 1979; Wilson *et al.*, 1985; Botham y Mayers, 2010). Se sabe que diferentes genes e incluso diferentes alelos del mismo gen presentan distintas tasas de mutación debido a la diferencia en la composición de nucleótidos y su posición en el cromosoma (Curtis *et al.*, 2013). además los genes están sujetos a diferentes fuerzas evolutivas.

9.1 Análisis por población

Un modelo de alta diversidad haplotípica y baja diversidad nucleotídica, valores negativos en las pruebas de neutralidad y haplotipos únicos generalmente representan un patrón de población con un tamaño poblacional efectivo bajo en el pasado, seguido por una expansión poblacional reciente (Grant y Bowen 1998; Ramírez *et al.*, 2008; Arroyo, 2016; Rivera, 2015; Vandergast *et al.*, 2016; Llaven *et al.*, 2017). Al analizar la diversidad genética para cada población los resultados muestran en general alta diversidad haplotípica y baja diversidad nucleotídica, esto quiere decir que pocos cambios nucleotídicos generan haplotipos distintos. Los valores observados son consistentes con lo reportado en otros estudios con *Anolis* (Arroyo, 2008; Koumoundouros *et al.*, 2009; Vargas y Moreno 2014).

Los resultados de las pruebas de neutralidad D (Tajima, 1998) y F (Fu y Li, 1993) obtuvieron valores negativos que muestran niveles altos de polimorfismo donde los alelos raros son más numerosos de lo esperado. Los sitios polimórficos representan a las mutaciones que generan cambios en la secuencia de nucleótidos lo cual modifica la composición genética original de las poblaciones incrementando la tendencia a la estructura. La desviación negativa de las poblaciones de *Anolis uniformis* a los modelos de neutralidad puede estar dada por selección estabilizadora o una expansión poblacional reciente (Eguiarte, 2007; Perfectti *et al.*, 2009; Llaven *et al.*, 2017).

La caracterización genética de los fragmentos en Los Tuxtlas muestra menor divergencia entre secuencias con ND4 ($h = 27$). Para este gen todas las poblaciones comparten un haplotipo. Al igual que en el trabajo de Arroyo (2008) puede considerarse el haplotipo ancestral. Por el contrario los resultados con el gen CytB (44 haplotipos) y el análisis concatenado (60 haplotipos) no presentan ningún haplotipo compartido por todos

los fragmentos, sin embargo, para ambos la población LH presenta haplotipos de todos los fragmentos menos PE y SE. Es probable que debido a su disposición espacial central, fuera el último remanente conectado con el resto de las poblaciones en el proceso de aislamiento.

Para CytB y ND4 + CytB los fragmentos chicos se encuentran altamente relacionados debido a que comparten un mayor número de haplotipos, lo cual podría indicar un menor tiempo de aislamiento entre ellos. Es notorio encontrar que la parte alta de la selva y la parte baja localizados en un continuo de selva no se comparten haplotipos. A diferencia del resto de las poblaciones que se encuentran aisladas, la porción alta de la selva y la porción de selva cerca de la Estación permiten observar el comportamiento altamente territorial de la especie. Los individuos de *A. uniformis* habitan en pequeños grupos con un macho alfa de por medio (Losos, 1994; Heras y Villarreal, 2000; Reynoso *et al.*, 2017). En general, en lagartijas la competencia entre machos es la principal fuente de presión evolutiva, debido a que restringe el intercambio genético (Ord y Martins, 2006).

En Los Tuxtlas, para los dos genes existen haplotipos únicos (exclusivos de una población) en todos los fragmentos generados por un único paso mutacional, la mayoría representados por un solo individuo. El resultado habla sobre el reducido flujo genético entre las poblaciones, es muy probable que las mutaciones que dieron origen a nuevos haplotipos surgieran posterior a la fragmentación y cuando las poblaciones quedaron aisladas se redujo el intercambio de individuos, de esta manera los haplotipos se presentan solo en las poblaciones en donde se originaron. Esto sucede en las poblaciones de la lagartija mariposa (*Leiolepis reevesii*) donde el aislamiento de poblaciones reduce el flujo genético (Lin *et al.*, 2010).

El proceso de fragmentación de una población, como es el caso de Los Tuxtlas, implica cuellos de botella sobre las poblaciones en donde se reduce el tamaño poblacional y se pueden perder por completo alelos ancestrales (Hedrick, 2011). Posteriormente, cuando las poblaciones quedaron aisladas implidiendo el flujo de genes y aumentaron de tamaño, el reservorio genético fue diferente a la población original (Ramírez *et al.*, 2008; Perfetti *et al.*, 2009; Curtis *et al.*, 2013). Las diferencias genéticas encontradas con valores moderados de F_{st} , sin embargo, no son suficientes para establecer grupos definidos en las redes de similitud haplotípica para ninguno de los genes. A pesar del elevado número de haplotipos encontrados, estos difieren en pocos cambios nucleotídicos.

A pesar de que las poblaciones de *Anolis uniformis* han estado bajo presiones ecológicas distintas, de acuerdo con la disponibilidad de recursos en cada remanente y han pasado *ca.* 50 generaciones a partir de la fragmentación de la selva, es probable que no haya pasado el suficiente tiempo de aislamiento entre las poblaciones y por tanto la distancia entre las secuencias no sea tan grande.

Contrario a los resultados obtenidos por Arroyo (2008) en esta tesis se detectó de baja a moderada estructura genética en Los Tuxtlas con valores significativos en todos los casos, confirmando ausencia de flujo genético entre las poblaciones, una de las predicciones iniciales de este estudio. Los valores más altos de diferenciación se encuentran entre poblaciones en fragmentos pequeños comparado con poblaciones en fragmentos medianos. Este resultado es consistente con la mayor distancia geográfica que hay entre estos fragmentos. Está comprobado que la interrupción del flujo genético en poblaciones de lagartijas puede generar diferenciación genética (Semple *et al.*, 2010; Hurtson *et al.*, 2009; Koumoundouros *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2010; Vargas y Moreno, 2014; Sugawara *et al.*, 2015; Vandergast *et al.*, 2016).

Los resultados de diferenciación genética F_{st} son apoyados por el AMOVA, el cual sugiere una débil estructura genética con un mayor porcentaje de variación genética dentro de las poblaciones. Con el gen ND4, la divergencia entre poblaciones es explicada únicamente por el 7.2% de la variación encontrada. Para CytB y el concatenado la variación interpoblacional es casi el doble (ca. 18%).

Las lagartijas del género *Anolis* son un buen modelo de estudio en modelos poblacionales debido a su corto tiempo de vida y bajo número de descendiente por individuo (1- 2 huevos en *A. uniformis*) por lo que un tiempo de aislamiento poblacional con ca. de 50 generaciones constituyen un tiempo suficiente para que la composición genética comience a modificarse generando estructura. Sin embargo, de acuerdo con Rivera *et al.* (2015) debido a que reptiles como las lagartijas existen en altas densidades poblacionales incluso en ambientes fragmentados, los efectos genéticos drásticos de poblaciones en sistemas fragmentados son observables con mayor facilidad en un tiempo mayor a 100 años de perturbación.

El análisis de la prueba de Mantel entre los fragmentos de Los Tuxlas sugiere que la distancia geográfica influye ligeramente sobre la estructura genética de *A. uniformis* para CytB y ND4 + CytB, sin embargo, solo para ND4 no existe tal relación. Además de la distancia entre los fragmentos la disposición espacial aleatoria en zonas totalmente aisladas entre sí ha evitado el flujo de genes entre las poblaciones, para las lagartijas de la especie *Anolis uniformis* el área perturbada entre los fragmentos representa una verdadera barrera geográfica (Arroyo, 2008). De acuerdo con Chávez *et al.*, (2014) quienes estudiaron poblaciones de (*Carica papaya*) en poblaciones zonas de bosque continuo y fragmentos

aislados entre sí en Los Tuxtlas, la configuración espacial y conectividad de los fragmentos puede explicar cambios genéticos en las poblaciones.

9.2 Análisis por tamaño de fragmento

En la agrupación de poblaciones por tamaño de fragmento, se obtuvieron valores similares de diversidad haplotípica y nucleotídica para todos los grupos. Contrario a los que se esperaba, los resultados de la ANOVA muestran que no existen diferencias significativas en la variación genética con respecto al tamaño del fragmento, es decir, independientemente del tamaño, las poblaciones poseen alelos privados y alta diversidad genética. Rivera (*et al.*, 2015) sugieren que en poblaciones de lagartijas la fragmentación no genera una disminución significativa en la diversidad genética debido a la alta densidad de organismos. Se sabe que el tamaño del fragmento influye en la diversidad de especies de lagartijas, pero no mantiene una relación directa con el número de organismos (abundancia) a menos que se trate de una especie que dependa de la vegetación nativa (López, 2012). De esta manera, es probable que la fragmentación aún no ha reducido el área de los remanentes lo suficiente como para detectar un impacto en la diversidad genética y la especie mantenga una población grande y estable aún dentro de los remanentes pequeños (Hurtson *et al.*, 2009).

El análisis de diferenciación genética por tamaño de fragmento presentó baja estructura genética, los valores más altos se encontraron al comparar fragmentos chicos con medianos y grandes, lo cual implica que los fragmentos chicos que además presentan un mayor grado de aislamiento difieren genéticamente del resto. El resultado es consistente con el trabajo de Hurtson (*et al.*, 2009), poblaciones pequeñas y aisladas son ligeramente más susceptibles a la modificación de la composición genética debido a procesos

estocásticos como la mutación y la deriva genética (Ord y Martins, 2006; Eguiarte *et al.*, 2007).

El AMOVA comprobó que el mayor porcentaje de variación se encuentra dentro de los grupos y no entre ellos. Poblaciones en fragmentos pequeños mantienen valores de diversidad genética similares a poblaciones en fragmentos grandes de acuerdo con la historia de vida de la especie. Poblaciones de lagartijas con tiempos generacionales cortos y generaciones superpuestas, amortiguan el impacto de la endogamia mantienen un alto tamaño efectivo y evitando que las poblaciones pierdan variación genética (Suárez *et al.*, 2016).

Moreno y Urbina (2013) analizaron el efecto de la fragmentación del hábitat y la dinámica poblacional de *Anolis heterodermus*, en parches grandes y pequeños en tres paisajes en la sabana de Bogotá, Colombia. Obtuvieron que los paisajes altamente fragmentados presentan hiperdinamismo aumentando las tasas de supervivencia y crecimiento poblacional en juveniles. En este estudio, la abundancia de *Anolis* en los fragmentos no permite ver diferencias en la cantidad de variación genética entre los fragmentos.

9.3 Análisis por región

En conjunto los fragmentos de Los Tuxtlas (LT) presentaron ligeramente menor variación genética (d_h y π) con respecto al continuo de selva en Lacandona (LC) como se esperaba. Este patrón se ha encontrado en otros estudios con lagartijas (Cunningham y Moritz 1998; Sumner *et al.*, 2014). A pesar de que se ha comprobado que existe un impacto en la pérdida de diversidad genética en poblaciones perturbadas con respecto a poblaciones en zonas

conservadas (González, 1998; Frankham 2004; Hurtson *et al.*, 2009), la respuesta de los organismos depende de su biología y comportamiento (Opdam, 1991; Fahrig y Merriam, 1993; Galindo, 2007; Suazo, 2009; Cabrera y Reynoso, 2012; Moreno y Urbina, 2013). En este caso, los *Anolis* son conocidos por su capacidad de adaptación a los microhabitats disponibles (Rengifo *et al.*, 2015) y se han encontrado en abundancia tanto en zonas conservadas como en lugares perturbados (Urbina *et al.*, 2006).

La población en la región de Los Tuxtlas presenta mayor número de sitios segregantes resultando en un mayor número de haplotipos con respecto a la población en Lacandona. Como se esperaba, LT se desvía del modelo de neutralidad, con un mayor número de sitios polimórficos de los esperado resultado de una población con una elevada cantidad de mutaciones (Eguiarte, 2007). Esto quiere decir que se ejercen presiones diferentes sobre una población fragmentada con respecto a una población en un continuo.

La red de similitud de haplotipos aísla en dos grupos a LT y LC y dentro de cada grupo la partición de las poblaciones es similar. La disposición de haplotipos dentro de cada región no muestra un patrón claro entre los individuos en los fragmentos, se esperaba que la agrupación de individuos igualmente relacionados en el continuo de selva en Lacandona fuera distinta de Los Tuxtlas donde y que los individuos de Los Tuxtlas se agruparan conforme al fragmento de selva de origen. Sin embargo, la topología de la red mostró que todas las poblaciones formaron una única red interconectada al igual que en Lacandona.

Los valores de F_{st} cercanos a 1 obtenidos en el análisis de diferenciación genética, comprueban que Los Tuxtlas y Lacandona son grupos genéticos distintos. Adicionalmente los resultados de AMOVA muestran el mayor porcentaje de variación entre las regiones. En este caso, el tiempo de aislamiento entre ambas regiones has sido mayor que ca. 50 años

de fragmentación en Los Tuxtlas permitiendo ver claras diferencias en la composición genética como en los estudios de lagartijas en sistemas de estudio con mayor tiempo de aislamiento (Hurtson *et al.*, 2009; Koumoundouros *et al.*, 2009; Vargas y Moreno, 2014). La probabilidad de intercambio de genes entre Los Tuxtlas y Lacandona es nula debido a las barreras existentes y la distancia entre las regiones

9.4 Estado de conservación de la especie en el paisaje fragmentado

El presente estudio muestra que a pesar de la reducción del hábitat por la fragmentación, las poblaciones de *Anolis uniformis* se han mantenido lo suficientemente estables para mantener la variación genética de la especie.

A pesar de que el tamaño del fragmento no muestra diferencias significativas en la composición genética, la estructura heterogénea de un bosque conservado ofrece mejores condiciones ambientales, físicas y bióticas en las cuales las poblaciones de *Anolis* pueden vivir y perpetuarse ecológicamente y es consistente su morfología adaptada a zonas con elevada estructura vegetativa. Es importante por tanto mantener en resguardo el continuo de selva en la Estación de Biología Tropical en Los Tuxtlas Veracruz, así como otras reservas.

Finalmente, el muestreo fue realizado en 2005 (Arroyo, 2008) por tanto si la reducción del área en los fragmentos pequeños continúa las poblaciones serán severamente afectadas por efectos antropogénicos y es probable que la información genética se pierda eventualmente.

X. CONCLUSIONES

- El uso de secuencias de ADN es un poderoso enfoque para determinar aspectos relevantes en estudios de genética poblacional.
- El patrón de diversidad genética en las poblaciones de *Anolis uniformis* en Los Tuxtlas es consistente con una población de un tamaño efectivo bajo en el pasado, seguido por una expansión poblacional reciente.
- *Anolis uniformis* es una especie con baja capacidad de dispersión y la matriz entre los remanentes de selva en la región de Los Tuxtlas, representa una verdadera barrera geográfica, lo que podría representar una tendencia a la estructuración.
- La fragmentación del hábitat no ha disminuido la diversidad genética ni aumentado la diferenciación genética de *Anolis uniformis* en Los Tuxtlas.
- En Los Tuxtlas, el tamaño del fragmento no está relacionado con la diversidad genética.
- En la selva de Los Tuxtlas, la distancia geográfica entre remanentes impide el flujo genético entre las poblaciones y aumenta la tendencia de las poblaciones a la estructuración.
- Las regiones de Los Tuxtlas y Lacandona presentan poblaciones de *A. uniformis* cuya composición genética es distinta. Habría que localizar poblaciones intermedias para ver cómo se comporta el aislamiento por distancia.
- Debido a que *Anolis uniformis* es una especie con vagilidad reducida y reemplazo generacional constante, el tiempo de aislamiento entre poblaciones en Los Tuxtlas es relevante para observar diferencias genéticas.

- Debido a la continua reducción de selva en Los Tuxtlas es probable que las poblaciones de *A. uniformis* en fragmentos pequeños se pierda antes de encontrar efectos genéticos.
- Mantener la conectividad entre poblaciones es primordial para el mantenimiento de la diversidad genética de *A. uniformis* en paisajes modificados antropogénicamente como es la selva de Los Tuxtlas.

XI. PERSPECTIVAS A FUTURO

- En el futuro se propone complementar el análisis genético con marcadores nucleares como microsatélites, que permiten estimar a una escala geográfica más fina la variación genética reciente en las poblaciones.
- Se propone contrastar los datos obtenidos con un estudio similar con muestras actuales, es decir, una década después, para encontrar efectos significativos en la genética de las poblaciones.
- El estudio sugiere que la abundancia de *A. uniformis* y su dinámica poblacional tienen una gran influencia en el mantenimiento genético. Se podría completar el análisis de los *A. uniformis* con estudios demográficos y variables ambientales y así se ampliará el conocimiento de la especie y de la dinámica de los parches.
- Al comparar poblaciones de *A. uniformis* en Los Tuxtlas y la selva Lacandona se encontró que son grupos genéticamente diferentes. Para explicar esta diferencia, sería necesario ampliar el muestreo de las poblaciones de *A. uniformis* a lo largo de toda su distribución y establecer sus patrones biogeográficos en México.

XII. REFERENCIAS

- Aljanabi, S. y Martinez, I. (1997) Universal and rapid Salt-Extraction of High Quality Genomic DNA for PCR-Based Techniques. *Nucleic Acids Research*, 25: 4692-4693.
- Allendorf, F. (2017) Genetics and the conservation of natural populations: allozymes to genomes. *Molecular Ecology*, 26: 420-430.
- Altschul, S., Gidh, W., Miller, W., Myers, E. y Lipman, D. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 3: 403-10. CodonCode Aligner version 3.5.
- Arévalo, E., Davis, S. y Sites, J. (1994). Mitochondrial DNA Sequence Divergence and Phylogenetic Relationships among Eight Chromosome Races of the *Sceloporus grammicus* Complex (Phrynosomatidae) in Central Mexico. *Systematic Biology*, 43: 387-418.
- Arroyo, D. (2008) Estructura genética en poblaciones fragmentadas de *Anolis uniformis* (Reptilia: Squamata) usando secuencias mitocondriales y microsatélites. Tesis de Maestra en Ciencias Biológicas, Instituto d Biología, UNAM. CDMX. 90 pp.
- Bell, K. y Donnelly, M. (2006) Influence of forest fragmentation on community structure of frogs and lizards in northeastern Costa Rica. *Conservation Biology*, 20(6): 1750-1760.
- Botham, K. y Mayers, P. (2010) Cadena respiratoria y fosforilación oxidativa. Págs. 99-103 en (Murray, R., Bender, D., Botham, K., Kennelly, P., Rodwelly, V. y Rodwell, V.) *Harper. Bioquímica ilustrada*, 28º edición. McGraw-Hill Companies, Inc. México.
- Brown, W., George, M. y Wilson, A. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Genetics*, 76(4): 1967-1971.

- Burbrink, F., Lawson, R. y Slowinski, J. (2000). Mitochondrial DNA phylogeography of the polytypic North American rat snake (*Elaphe obsoleta*): a critique of the subspecies concept. *Evolution* 54: 2107-2118.
- Cabrera, E. y Garrido, L. (2014) Helminth parasites of Lesser Scaly Anole, *Anolis uniformis* (Squamata: Dactyloidae), from Los Tuxtlas, Southern Mexico: Evidence of Diet and Habitat Use. *South American Journal of Herpetology*, 9(3): 183-189.
- Cabrera, E. y Reynoso, V. (2012) Amphibian and reptile communities of rainforest fragments: minimum patch size to support high richness and abundance. *Biodiversity and Conservation*, 21(12): 3243-3265.
- Cabrera, G. (2005) Estructura de las comunidades de anfibios y reptiles en fragmentos pequeños del bosque tropical perennifolio de Los Tuxtlas, Veracruz. Tesis de Maestría. Instituto del Biología, UNAM,
- Campbell, J., Formanowicz, D. y Medley, P. (1989) The Reproductive Cycle of *Norops uniformis* (Sauria: Iguanidae) in Veracruz, México. *BIOTROPICA*, 21(3): 237-243.
- Chan, L. y Zamudio, K. (2009) Population differentiation of temperate amphibians in unpredictable environment. *Molecular Ecology*, 18: 3185-3200.
- Chávez, M., Suárez, P., Castillo, G. y Núñez, J. (2014) Habitat fragmentation threatens wild populations of *Cariaca papaya* (Caricaceae) in a lowland rainforest. *American Journal of Botany*, 101(7): 1-10.
- Conabio-Conanp-TNC-Pronatura-FCF, UANL. (2007). Análisis de vacíos y comisiones en conservación de la biodiversidad terrestre de México: espacios y especies. México, D.F.: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la

Biodiversidad, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, The Nature Conservancy-Programa México, Pronatura, A.C.

- Cope, E. (1885) A contribution to the herpetology of México. *Philos. society*, 2: 379-404.
- Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B. y Rocha, M. (2014) Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat), Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) y Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I), 274 pp.
- Cunningham, M. y Moritz, C. (1998) Genetic effects of forest fragmentation on a rainforest restricted lizard (Scincidae: *Gnypetoscincus queenslandiae*). *Biological Conservation*, 83(1): 19-30.
- Curtis, H., Barnes, N., Schnek, A., y Massarini, A. (2013) Curtis, Biología, Séptima edición, Editorial Médica Panamericana, 367-397
- Cushman, S. (2006) Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biological Conservation* 128(2): 231-240.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, y Posada D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8): 772.
- De Jong, B., Ochoa, S., Castillo, M., Ramírez, N. y Cairns, M. (2009) Carbon flux and patterns of Land-use/ Land-cover change in the selva Lacandona, México. *A Journal of the Human Environment*, 29(8): 504-511.
- De Queiroz, A., Lawson, R. y Lemos, J. (2002). Phylogenetic relationships of North American garter snakes: how much DNA is enough? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 315-329.

- Diniz, J., Soares, T., Lima, J., Dobrovolski, R., Lemes, V., Pires de Campos, M., Rangel, T. y Bini, L. (2013) Mantel test in population genetics. *Genetics and Molecular Biology*, 36(4): 475-485.
- Dray, S. y Dufour, A. (2007) The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologist. *Journal of Statistical Software*, 22: 1-20.
- Duan, Y., Wu, R., Jiang, Y., Li, T., Wu, Y. y Luo, L. (2013) Substitution Bias and Evolutionary Rate of Mitochondrial Protein-Encoding Genes in Four Species of Cecidomyiidae. *Russian Journal of Genetics*, 49(12): 1183-1189.
- Eguiarte, L., Aguirre, J., Jardón, L., Aguirre, E. y Souza, V., (2013) Genómica de poblaciones: Nada en evolución va a tener sentido si no es a la luz de la genómica, y Nada en genómica tendrá sentido si no es a la luz de la evolución. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(1): 42-56.
- Eguiarte, L., Souza, V., y Aguirre, X. (2007) *Ecología molecular*, Primera edición. Instituto Nacional de Ecología, Semarnat, 608pp.
- Eo, S. y DeWoody A. (2010) Evolutionary rates of mitochondrial genomes correspond to diversification rates and to contemporary species richness in birds and reptiles. *Proceedings of the Royal Society*, 277: 3587–3592.
- Excoffier, L. y Lischer, H. (2010) Arlequin suite v.3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- Excoffier, L., Smouse, P, and Quattro, J. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2): 479-91.

- Fahrig L. y Merriam, G. (1993) Conservation of fragmented Populations. *Conservation Biology*, 8(1): 50-59.
- Fahring, L. (2003) Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34: 487-515.
- Figueroa, E. (2009) Efecto de la fragmentación del hábitat en la dispersión y estructura genética de *Dendropanax Arboreus* (ARALIACEAE) en Los Tuxtlas Veracruz. Tesis de doctorado en ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 75 pp.
- Flores, O. y García, U. (2014) Biodiversity of reptiles in México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: 467-475.
- Frankham, R. (1997) Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity*, 78: 311-327.
- Frankham, R., Ballou, J. y Briscoe, D. (2002) *Introduction to conservation genetics*. Cambridge, Primera edición. Cambridge University Press, 619 pp.
- Fu, Y. y Li, W. (1993) Statistical test of neutrality of mutations. *Genetics*, 133: 693-709.
- Galindo, J. (2007) Efectos de la Fragmentación del paisaje sobre poblaciones de mamíferos; el caso de los murciélagos de Los Tuxtlas, Veracruz. *Tópicos en sistemática, biogeografía, ecología y conservación de mamíferos*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México, 97-114.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S. y Hurst, G. (2009) Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*, 18: 4541-4550.

- Garrido, T. y Vázquez, E. (2013) Métodos de análisis genéticos, espaciales y de conectividad en genética del paisaje. *Revista mexicana de Biodiversidad*, 84: 1031-1054.
- González, D. (1998) *Ecología y Sistemática*. *Revista Mexicana de Micología*, 14: 1-21.
- Grant, W. y Bowen, B. (1998) Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons of conservation. *The American Genetic Association*, 89: 415-226.
- Gurruxtaga, M. y Lozano, P. (2006) Efectos de la fragmentación de hábitats y pérdida de conectividad ecológica dentro de la dinámica territorial. *Revista de Geografía*, 16: 35-54.
- Hasegawa, M., Kishino, H. y Yano, T. (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22: 160-174.
- Hedrick, P. (2011) *Genetics of populations*, Cuarta edición. Jones and Bartlett Publishers. 663 pp.
- Hedrick, P. y Miller, P. (1992) Conservation Genetics: Techniques and fundamentals. *Ecological Applications*, 2(1): 30-46.
- Heras, L. y Villarreal, J. (2000) "La historia natural de un ensamblaje de *Anolis* en Los Tuxtlas, Veracruz", UNAM. ENEP Iztacala, *Biología*, 318 pp.
- Hernández, O., Arroyo, V., González, A., Russildi, G., Luna, R., Martínez, M. y Reynoso, V. (2015) Range extensions of amphibians and reptiles in the southern part of the Lacandona rainforest, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86: 457-468.

- Hernández, O., Martínez, M., Arroyo, V., Gonzáles, A., Zárate, D. y Reynoso, V. (2014) Distribution and conservation status of amphibian and reptile species in the Lacandona rainforest, México: an update after 20 years of research. *Tropical Conservation Science*, 7(1): 1-25.
- Hurtson, H., Voith, L., Bonanno, J. Foufopoulos, J., Pafilis, P., Valakos, E. y Anthony, N. (2009) Effects of fragmentation on genetic diversity in island populations of the Aegean wall lizard *Podarcis erhardii* (Lacertidae, Reptilia). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 395–405.
- Huson, D. y Bryant, D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23(2): 254-267.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., y Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12): 1647-1649.
- Koumoundouros, T., Sumner, J., Clemann, N. y Stuart-Fox, D. (2009) Current genetic isolation and fragmentation contrasts with historical connectivity in an alpine lizard threatened by climate change. *Biological Conservation*, 142: 992–1002.
- Lacy, R. (1987) Loss of Genetic Diversity from Managed Populations: Interacting Effects of Drift, Mutation, Immigration, Selection, and Population Subdivision. *Conservation Biology*, 1(2): 143-158.
- Librado, P., y J. Rozas. (2009) DnaSP versión 5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.

- Lin, L., Ji, X., Diong, C., Du, Y. y Lin, C. (2010) Phylogeography and population structure of the Reeves's Butterfly Lizard (*Leiolepis reevesii*) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56: 601–607.
- Llaven, V., Ruíz, L., García, M., Leshner, J. y Machkour, S. (2017) Genetic Diversity and Structure of *Artibeus Jamaicensis* (Chiroptera: phyllostomidae) in Chiapas, México. *Acta zoológica Mexicana*, 33(1): 55-66.
- López, T. Efecto de la fragmentación sobre especies relevantes de reptiles en el desierto de Baja California Sur. Tesis de Licenciatura en biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, 102 pp.
- Losos (1994) Integrative approaches to evolutionary ecology: *Anolis* lizards as Model systems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 25: 467- 493.
- Martínez, I. y González, E. (2008) Patterns of gene flow and source-sink dynamics in high altitude populations of the common toad *Bufo bufo* (Anura: Bufonidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 95: 824–839.
- Matías, N. (2016) Efecto de la fragmentación y perturbación del hábitat en dos especies de anuros del interior de la Selva de Los Tuxtlas, Veracruz. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, 102 pp.
- Mendoza, E., Fay, J. y Dirzo, R. (2005) A quantitative analysis of forest fragmentation in Los Tuxtlas, southeast Mexico: patterns and implications for conservation. *Revista Chilena de Historia Natural*, 78: 451-467.
- Millstein, R. (2013) Exploring the Status of Population Genetics: The Role of Ecology. *Biological Theory*, 7: 346–357.

- Moreno, R. y Urbina, N. (2013) Population Dynamics of the Andean Lizard *Anolis heterodermus*: Fast-slow Demographic Strategies in Fragmented Scrubland Landscapes. *Biotropica*, 45(2): 253–261.
- Nei, M. (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, Nueva York.
- Nicholson, K., Crother, B., Guyer, C. y Savage, J. (2012) It is time for a new classification of anoles (Squamata: Dactyloidae). *Zootaxa*, 3477: 1–108.
- Nicholson, K., Glor, R., Kolbe, J., Larson, A., Hedges, S. y Losos, J. (2005) Mainland colonization by island lizards. *Journal of Biogeography*, 32: 929-938.
- Nicholson, K., Horman, L. y Losos, J. (2007) Evolution of *Anolis* Lizard Dewlap Diversity. *Plos One*, 2(3): 274.
- Opdam, P. (1991) Metapopulation theory and habitat fragmentation: a review of holarctic breeding bird studies. *Landscape Ecology*, 5(2): 93-106.
- Ord, T. y Martins, E. (2006) Tracing the origin of signal diversity in anole lizards: phylogenetic approaches to inferring the evolution of complex behaviour. *The Association for the Study of Animal Behaviour*, 71 (6): 1411-1429.
- Ortuño, I. (2009) Efectos de la conversión del bosque tropical caducifolio a mosaicos agrícolas sobre ensamblajes herpetofaunísticos. Tesis de Doctorado en Ciencias. Instituto de Ecología, UNAM. 123 pp.
- Paemelaere, E., Guyer, C. y Dobson, S. (2011) A phylogenetic framework for the evolution of female polymorphism in andes. *Biological Journal of the Linnean Society*, 104: 303-317.

- Patterson, J., Chamberlain, B. y Thayer, D. (2004) Finch TV version 1.4.0. Publicado por los autores, Seattle.
- Peakall, R. y Smouse P. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*. 28, 2537-2539.
- Perfectti, F., Picó, F. y Gómez, J. (2009) La huella genética de la selección natural. *Ecosistemas*, 18(1): 1016.
- Phillips, J., Deitloff, J., Guyer, C., Huetteman, S. y Nicholson, K. (2015) Biogeography and evolution of a widespread Central American lizard species complex: *Norops humilis*, (Squamata: Dactyloidae. *Evolutionary Biology*, 15: 143.
- Poe (2004) Phylogeny of Anoles. *Herpetological Monographs*, 18:37–89.
- Posada, D. y Buckley, T. (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics: Advantages of the AIC and Bayesian approaches over likelihood ratio test. *Systematic Biology*, 53: 793-808.
- Pratos, I., Trefaut, M., Melo, P. y Carnaval, A. (2015) Phylogenetic relationships of Amazonian anole lizards (Dactyloidea): Taxonomic implications, new insights about phenotypic evolution and the timin of diversifications. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 82: 258-268.
- R Development Core Team. 2010. R: A language and environment for statistical computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- Ramírez, A., Ramos, S., Rozas, J., Calafell, F y Navarro, A. (2008) Statistical Power Analysis of Neutrality Tests Under Demographic Expansions, Contractions and Bottlenecks With Recombination. *Genetics*, 179: 555-567.

- Ramos, S. y Rozas, O. (2002) Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. *Molecular Biology Evolution*, 19(12): 2092-2100.
- Reed, D. y Frankham, R. (2003) Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology*, 17(1): 230-237.
- Rengifo, T., Castro, F. y Purroy, F. (2015) Uso de hábitat y relaciones ecomorfológicas de un ensamble de *Anolis* (Lacertilia: Dactyloidae) en la región natural Chocoana, Colombia. *Acta Zoológica Mexicana*, 31(2): 159-172.
- Reynoso, V., Coates, R. y Vázquez, M. (2017) Avances y perspectivas en la investigación de los bosques tropicales y sus alrededores: La región de Los Tuxtlas, UNAM. 347-423 pp.
- Rivera, F., Aguilar, R., Arizmendi, M., Quesada, M. y Oyama, K. (2015) Habitat fragmentation and genetic variability of tetrapod populations. *Animal Conservation*, 18: 249-258.
- Rotem, G., Ziv, Y., Giladi, I. y Bouskila, A. (2013) Wheat fields as an ecological trap for reptiles in a semiarid agroecosystem. *Biological Conservation* 167: 349–353.
- Ruiz, A., Gurrutxaga, M., Madeira, M., Lozano, P., Fernández, J. y Gómez, B. (2010) "Estudio de la conectividad ecológica en la CAPV. Genética del Paisaje aplicada sobre una especie-objetivo de la Red de Corredores Ecológicos: la marta europea (*Martes martes*)". 6-10 pp.
- Santos, C., Sierra, B., Álvarez, L., Ramos, A., Fernández, E., Nogués, R., Aluja, M. (2008) Frequency and pattern of Heteroplasmy in the control region of human mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 67: 191-200.

- Santos, T. y Tellería, L. (2006) Pérdida y fragmentación del hábitat: efectos sobre la conservación de las especies. *Ecosistemas*, 2: 3-12.
- Saunders, D., Hobbs, R., y Margules, C. (1991) Biological consequences of Ecosystem Fragmentation: A Review. *Conservation Biology*, 5(1): 18-32.
- Semple, K., Riley, S. y Fisher, R. (2010) A Rapid, Strong, and Convergent Genetic Response to Urban Habitat Fragmentation in Four Divergent and Widespread Vertebrates. *PLoS ONE*, 5(9): 1-11.
- Slatkin, M. (1993) Gene Flow and Population Structure. In: Real, L., Ed., *Ecological Genetics*, Princeton University Press, Princeton, 3-17.
- Suárez, P., Chávez, M. y Núñez, J. (2016) Life history and past demography maintain genetic structure, outcrossing rate, contemporary pollen gene flow of an understory herb in a highly fragmented rainforest. *Peer J*, 1-25.
- Suazo, I. (2009) Efectos de la conversión de bosque tropical caducifolio a mosaicos agrícolas sobre ensamblajes herpetofaunísticos. Tesis de Doctorado en Ciencias, Instituto de Ecología, UNAM, 117 pp.
- Sugawara, H., Takahashi, H. y Hayashi (2015) Microsatellite Analysis of the Population Genetic Structure of *Anolis carolinensis* Introduced to the Ogasawara Islands. *Zoological science*, 32: 47-52.
- Sumner, J., Jessop, T., Paetkau, D. y Moritz, C. (2004) Limited effect of anthropogenic habitat fragmentation on molecular diversity in a rain forest skink, *Gnypetoscincus queenslandiae*. *Molecular Ecology*, 13: 259-269.

- Sunnucks, P. y Hales, D.F. (1996). Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Molecular Biology and Evolution*, 13: 510-524.
- Swofford, P. y Rozas (2009). DnaSP v.5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1542.
- Taanman, J. (1999) The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1410: 103-123.
- Tajima, F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.
- Tamura, K., Peterson, N., Peterson, G., Stecher, N. y Kumar, S. (2011) MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and MAXimum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.
- Thorpe, R., Leadbeater, D. y Pook, C. (2005) Molecular clocks and geological dates: cytochrome b of *Anolis extremus* substantially contradicts dating of Barbados emergence. *Molecular Ecology*, 14: 2087-2096.
- Urbina, N., Olivares, M. y Reynoso, V. (2006) Herpetofauna diversity and microenvironment correlates across a pasture–edge–interior ecotone in tropical rainforest fragments in the Los Tuxtlas Biosphere Reserve of Veracruz, Mexico. *Biological Conservation*, 132: 61-75.
- Vandsergast, A., Wood, D., Thompson, A., Fisher, M., Barrows, C. y Grant, T. (2016) Drifting to oblivion? Rapid genetic differentiation in an endangered lizard following habitat fragmentation and drought. *Diversity and Distributions*, 22: 344–357.

- Vargas, M. y Moreno, R. (2014) Unknown Evolutionary Lineages and Population Differentiation in *Anolis heterodermus* (Squamata: Dactyloidae) from the Eastern and Central Cordilleras of Colombia Revealed by DNA Sequence Data. *South American Journal of Herpetology*, 9(2): 131–141.
- Vavrek, M. (2010) fossil: Palaeocological and palaeographical analysis tools. *Palaeontologia Electronica*, 14(1): 11-16.
- Wan, Q., Wu, H., Fujihara, T. y Fang, S. (2004) Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis*, 25: 2165–2176.
- Wilcove, D. (1985) Nest Predation in Forest Tracts and the Decline of Migratory Songbirds. *Ecology*, 6(4): 1211-1214.
- Wilson, A., Cann, R., Carr, S., George, M., Gyllenstein, U., Helm-Bychowski, K., *et al.*, (1985) Mitochondrial DNA and tow perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 26: 375-400.
- Wright, S. (1951) Evolution in mendelian Populations. *Genetics*, 16(2): 97-159.

XIII. ANEXOS

ANEXO I Protocolo de extracción de ADN

Protocolo de extracción de ADN modificado de Sunnucks y Hales (1996); Aljanabi & Martinez (1997).

1. Cortar para cada muestra proximadamente 3 mm de tejido y colocarlo en un tubo eppendorf de 1.5 mL rotulado (# de muestra, fragmento).
2. Adicionar 400 μ L de buffer TEN+SDS 2% a cada tubo.y 15 μ L de Proteinasa K. Incubar con movimiento a 56°C toda la noche.
3. Revisar que se haya degradado la mayor cantidad de tejido.
4. Añadir 100 μ L de NaCl [5M] y vortexear 30 s.
5. Centrifugar 14 m 30 s 14000 rpm 4°C.
6. Transferir el sobrenadante \approx 300 μ L a tubos nuevos rotulados (# de muestra, fragmento) y añadir 800 μ L de etanol 98 % (-20°C). Mezclar por inversión y dejar toda la noche a -20°C.
7. Centrifugar 20 m 30 s a 14000 rpm 4°C. Decantar el exceso de alcohol sin tirar el pellet.
8. Adicionar 800 μ L de etanol 70 % (-20°C).
9. Centrifugar 7 m a 30 s 14000 rpm 4°C.Decantar el excesode alcohol.
10. Colocar los tubos en la vacuofuga 31m 45°C (opcional).
11. Añadir 100 μ L de ddH₂O y dejar a -20°C para uso posterior.
12. Para comprobar la extracción de ADN, se corrió por electroforesis cada muestra en gel de agarosa incluyendo un control negativo.

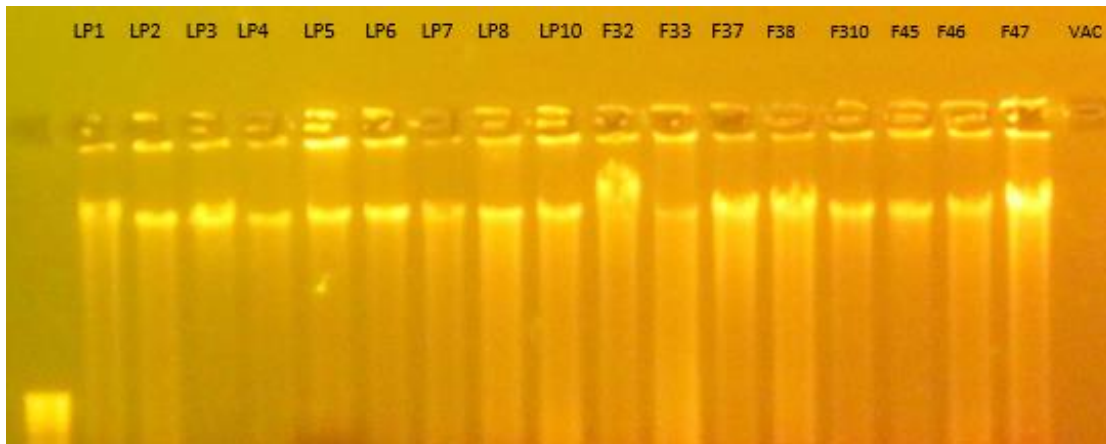


Figura 1. Gel de agarosa 1% para comprobar la extracción de ADN.

Electroforesis

Gel de agarosa 1.5% → 3 μ L de muestra + 1.0 μ L de red con buffer

100 V-400 A-30 m.

ANEXO II. Protocolo de amplificación de genes.

- **Oligonucleótidos utilizados en este estudio**

Tabla 1. Pares de primers utilizados en este estudio y condiciones de termociclador. ND4 (NADH dehidrogenase subunidad 4), CytB (Citocromo oxidasa B), pares bases amplificadas (pb).

Nombre oligonucleótidos	Tamaño (pb)	Secuencia (5'-3' / 3'-5')	Referencia
ND4/LEU	761	CACCTATGACTACCAAAAGCTCATGTA/ CATTACTTTTACTTGGATTTGCACCA	ND4 Arévalo et al. (1994)
L14910/ H16064	934	GACCTGTGATMTGAAAAACCA YCGTT GT/ CTTTGGTTTACAAGAACAATGCTTTA	CytB Burbrink et al. (2000), de Queiroz et al. (2002)

- **Selección de la temperatura de amplificación**

1. Se realizó un gradiente para elegir la mejor temperatura de amplificación para cada marcador, ND4 y CytB, tomando como mínimo 40°C y como máximo la Tm mayor de los oligonucleótidos: $T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$.

Tabla 2. Temperaturas de amplificación.

Gen	Oligonucleótido (5'-3' / 3'-5')	Tm	Gradiente	Mejor temperatura
ND4	ND4-F	76	40-76°	49°
	Leu-R	70		
CytB	L14910	74	40-74°	46.8°
	H16064	68		

2. Para cada marcador se seleccionó una muestra que se amplificó en cada temperatura, manteniendo constante el volumen total de reacción de PCR (Tabla 3).

Tabla 3. Mezcla de PCR.

Gen	Agua	Buffer	DMSO	Primer F	Primer R	Taq Polimerasa	ADN	Volumen Total de la mezcla
ND4	9.95 µL	3.00 µL	0.45 µL	0.24 µL	0.24 µL	0.12 µL	1.00 µL	15.0 µL
CytB	8.95 µL	3.00 µL	0.45 µL	0.24 µL	0.24 µL	0.12 µL	1.00 µL	14.0 µL

3. Se comprobó la amplificación con geles de agarosa al 1.5% en TAE 1X incluyendo un control negativo.

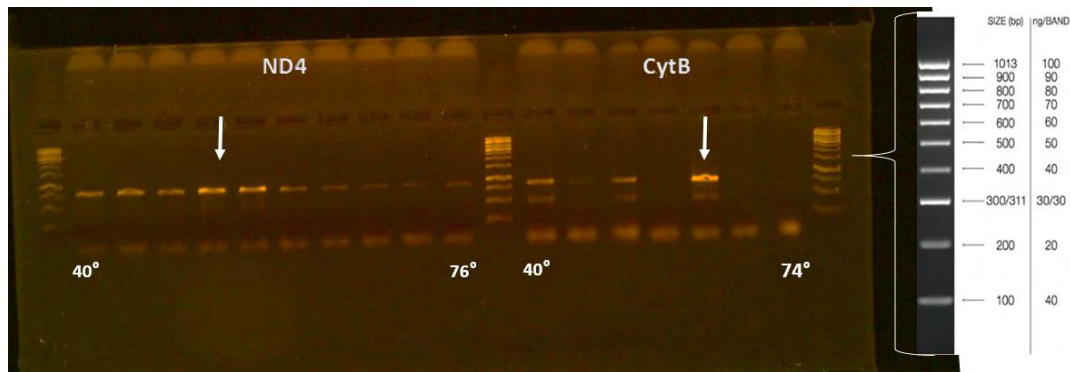


Figura 2. Gradiente de temperatura. El primer pozo para cada marcador contiene escalera HyperLadder™ 1000bp y las temperaturas incrementan a la derecha. La flecha indica la banda en la temperatura con la mejor amplificación.

4. Se eligieron las mejores condiciones de amplificación y se mantuvo el protocolo para todas las muestras restantes.

Tabla 4. Temperaturas finales de amplificación. Desnaturalización inicial (DI), ciclos (C), desnaturalización (D), amplificación (A), extensión (E), extensión final (EF).

Gen	Condiciones del termociclador					
	DI	C	D	A	E	EF
ND4	94°, 7min	35	94°, 1min	49°, 1min	72°, 7min	72°, 10min
CytB	94°, 3min	30	93°, 1min	46.8°, 2min	72°, 2min	72°, 7min

ANEXO III Información complementaria

- Composición nucleotídica obtenida con cada marcador

Tabla 5. Composición nucleotídica ND4. Citosina (C), timina (T), adenina (A), y guanina (G).

Subpoblación	C (%)	T (%)	A (%)	G (%)
F3	28.00	28.11	31.67	12.22
F4	27.95	28.15	31.64	12.26
F6	27.98	28.12	31.71	12.19
CB	27.94	28.17	31.75	12.14
LH	28.03	28.08	31.66	12.23
LP	27.98	28.13	31.72	12.17
PE	27.96	28.15	31.67	12.22
SA	27.98	28.13	31.68	12.21
SE	27.92	28.19	31.67	12.22
LC	26.66	29.18	31.00	13.16

Tabla 6. Composición nucleotídica CytB. Citosina (C), timina (T), adenina (A), y guanina (G).

Subpoblación	C (%)	T (%)	A (%)	G (%)
F3	28.29	28.79	27.59	15.33
F4	28.32	28.75	27.54	15.40
F6	28.30	28.74	27.55%	15.42
CB	28.40	28.68	27.53	15.39
LH	28.27	28.81	27.55	27.55
LP	28.28	28.80	27.58	15.35
PE	28.25	28.81	27.59	15.34
SA	28.24	28.82	27.54	15.40
SE	28.22	28.83	27.58	15.36
LC	27.33	30.06	28.32	28.32

- **Frecuencias haplotípicas**

Tabla 7. Haplotipos por sitio en LT para ND4.

Haplotipo	Número de secuencias	Frecuencia (%)	Sitios
1	57	0.6333	F3, F4, F6, CB, LH, LP, PE, SA, SE
2	1	0.0111	F3
3, 4, 5	1	0.0111	F4
6, 7, 8, 9, 10, 11	1	0.0111	F6
12, 13	3	0.0333	CB
14	1	0.0111	CB
15, 16, 17	1	0.0111	LH
18	3	0.0333	LP
19	2	0.0222	LP, PE
20, 21	1	0.0111	LP
22	1	0.0111	PE
23	1	0.0111	SA
24, 25, 26, 27	1	0.0111	SE
Total: 27	90	1.0000	-

Tabla 8. Haplotipos por sitio en LT para CytB

Haplotipo	Número de secuencias	Frecuencia (%)	Sitios
1	2	0.0222	F3
2	9	0.1000	F3, LP, LH, SA
3, 5, 6, 7	1	0.0111	F3
4	3	0.0333	F3, F4, F6
8	12	0.1333	F3, F4, F6, LH
9, 10, 11	1	0.0111	F4
12, 13, 14, 15, 16	1	0.0111	F6
17, 20, 21	1	0.0111	CB
18	2	0.0222	CB
19	3	0.0333	CB
22	2	0.0222	CB
23	4	0.0444	LP, LH
24, 25, 26	1	0.0111	LP
27, 29	1	0.0111	PE
28	11	0.1222	PE, SE
30	4	0.0444	LH, SA
31, 33	1	0.0111	LH

32	3	0.0333	LH, SA
34, 35, 36, 37	1	0.0111	SA
38	2	0.0222	SA
39, 40, 42, 43, 44	1	0.0111	SE
38, 41	2	0.0222	SE
Total:			
44	90	1.0000	-

Tabla 9. Haplotipos por sitio en LT para ND4_CytB.

Haplotipo	Número de secuencias	Frecuencia (%)	Sitios
1	2	0.0222	F3
2	8	0.0888	F3, LH, SA
3, 5, 6, 7, 8	1	0.0111	F3
4	3	0.0333	F3, F4, F6
9, 11, 12, 13, 14, 15	1	0.0111	F4
10	5	0.0555	F4, F6
16, 17, 18, 19, 20, 21, 22	1	0.0111	F6
23, 26, 27	1	0.0111	CB
24	2	0.0222	CB
25	3	0.0333	CB
28	2	0.0222	CB
29, 30, 31, 33, 34	1	0.0111	LH
32	2	0.0222	LH, PE
35, 37, 38, 39, 40, 41	1	0.0111	LP
36	6	0.0666	LP, SE
42	4	0.0444	PE, SA
43, 44, 45, 47	1	0.0111	PE
46	3	0.0333	PE, SA
48, 49, 50, 51	1	0.0111	SA
52	2	0.0222	SA
53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60	1	0.0111	SE
Total:			
60	90	1.0000	-

Tabla 10. Haplotipos de Lacandona.

Gen	Haplotipo	Secuencias	Frecuencia (%)
ND4	28	13	0.36111111
	29, 30, 31, 33, 3, 38	1	0.02777778
	32, 34, 36	4	0.11111111
	35	3	0.08333333
	39	2	0.05555556
	Total: 12	36	1.0
CytB	45, 48, 49, 50, 53, 55, 57, 59, 60, 61, 62	1	0.02777778
	46	7	0.19444444
	47, 51, 54, 56, 58, 63	2	0.05555556
	52	6	0.16666667
	Total: 19	36	1.0
ND4_CytB	61, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 83, 84, 86, 87, 89, 90, 91, 92, 93, 94	1	0.02777778
	63	3	0.08333333
	80, 82, 85, 88	2	0.05555556
	Total: 31	36	1.0

- Resultados ANOVA**

Análisis de varianza entre las medias de diversidad haplotípica (dh) y nucleotídica (π) de fragmentos agrupados por tamaño.

Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA) de la diversidad haplotípica para ND4

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0574	2	0.0287	0.3776	0.7006	5.1432
Dentro de los grupos	0.45637	6	0.0760			
Total	0.5137	8				

Tabla 12. Análisis de varianza (ANOVA) de la diversidad haplotípica para CytB

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0852	2	0.0426	1.3171	0.3355	5.1432
	0.1941	6	0.0323			
Dentro de los grupos	0.0852	2				
Total	0.2793	8				

Tabla 13. Análisis de varianza (ANOVA) de la diversidad haplotípica para ND4_CytB

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0014	2	0.0007	0.4604	0.6515	5.1432
Dentro de los grupos	0.0092	6	0.0015			
Total	0.01067	8				

Tabla 14. Análisis de varianza (ANOVA) de la diversidad nucleotídica para ND4

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2.448E-07	2	1.224E-07	0.0759	0.92777163	5.1432
Dentro de los grupos	9.6741E-06	6	1.6123E-06			
Total	9.9189E-06	8				

Tabla 15. Análisis de varianza (ANOVA) de la diversidad nucleotídica para CytB.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2.448E-07	2	1.224E-07	0.0759	0.9278	5.1432
Dentro de los grupos	9.6741E-06	6	1.6123E-06			
Total	9.9189E-06	8				

Tabla 16. Análisis de varianza (ANOVA) de la diversidad nucleotídica para ND4_CytB

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	5.802E-07	2	2.901E-07	0.3634	0.7096	5.1432
Dentro de los grupos	4.789E-06	6	7.9817E-07			
Total	5.3692E-06	8				