

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

MAESTRIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

"Análisis de la variabilidad genética de una población de
Ambystoma mexicanum
en el Centro de Investigaciones Biológicas y
Acuícolas de Cuernavaca (CIBAC)"

Para obtener el título de :

Maestra en Ciencias Agropecuarias

Presenta:

Biol. Nancy Mariana Ayala Angulo

Director:

Dr. Daniel Martínez Gómez

Co- Directora:

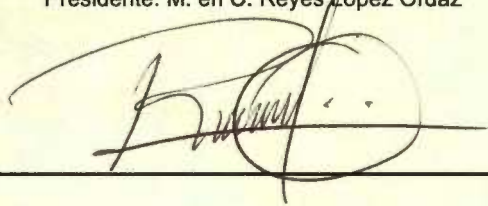
M. en C. Estela T. Méndez Olvera

Asesor:

Dr. Armando Sunny García Aguilar

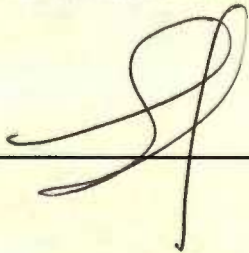
Ciudad de México, 2017

Presidente: M. en C. Reyes López Ordaz



Secretaria: Rocío del Pilar Rueda Zozaya

Vocal: M. en C. Estela Teresita Méndez Olvera



Comité tutorial

Dr. Daniel Martínez Gómez
Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Producción Agrícola y Animal
dmartin@correo.xoc.uam.mx

M. en C. Estela Teresita Méndez Olvera
Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Producción Agrícola y Animal
etmendez@correo.xoc.uam.mx

Dr. Armando Sunny García Aguilar
Universidad autónoma del Estado de México
Facultad de Ciencias
sunny.biologia@gmail.com

AGRADECIMIENTOS



Esta tesis ha sido producto de trabajo de muchos años, de la gran ayuda y apoyo de mucha gente como mis compañeros, amigos y familia.

Agradezco a mis compañeros del laboratorio de Microbiología Agropecuaria que me ayudaron en la toma de muestras en el CIBAC.

Al maestro Fernando Arana que todo este tiempo ha estado apoyando este gran proyecto con los ajolotes y la toma de muestras.

Gracias infinitas a "mi querido Dr. Daniel Martínez" y "mi querida Dra. Estela" por su apoyo incondicional durante todos estos años que llevamos de conocernos, por su gran apoyo y amistad durante todos estos años. Incluso por esas veces que me tocaban regaños, por esas grandes lecciones que me han formado en el ámbito personal y académico. A mi Champi por sus ánimos, por su cariño y por ser una parte esencial del laboratorio.

A mi querido maestro Reyes que ha sido un gran guía durante todo este tiempo, por su confianza desde el inicio de mi maestría, gracias por sus consejos, su cariño, orientación y gran ayuda.

A mi asesor Sunny por haberme ayudado tanto en este trabajo de investigación, con revisiones y tu ayuda en el procesamiento de los datos, por tus comentarios y tu amistad. A mi amiguita Pily por todos estos años de amistad en los que me has apoyado, por esos comentarios constructivos hacia mi tesis, Angie por sus ánimos, apoyo, comentarios y su amistad.

También necesito agradecer a todos mis amigos por su comprensión durante la presión que involucra la realización de esta investigación e incluso por comentarios

(Angie, Pily, Alice, Misfits, Dafne). Así como a todas las personas que hicieron revisión de esta tesis, por sus comentarios para mejorarla. A Junuen Mondragón por su ayuda y apoyo que aunque no tiene nada que ver con genética, me ayudó en la revisión de esta tesis.

Un agradecimiento especial a mis padres y hermanos por el cariño y gran apoyo durante toda mi vida, en mis mejores momentos e incluso en los más difíciles, por su ayuda, sus consejos y sabias palabras durante todo el proceso de mi maestría, por ser mi razón de ser y mi guía. A mi abuelita por ser un gran apoyo, sus consejos y palabras emotivas. A mis abuelos, que aunque ya no están físicamente, viven en mi como símbolo de fortaleza.

A todos mis profesores de la maestría por ser una guía y apoyo durante todo este tiempo, por sus comentarios que ayudaron a enriquecer este trabajo de investigación, en especial por los comentarios de la Dra. Lupita Prado y el maestro Reyes.

Finalmente a la UAM-X que ha sido mi casa de estudios durante los últimos 8 años y al CONACYT por la beca brindada para la realización de este trabajo de investigación.

Resumen.....	8
Summary.....	9
Introducción.....	10
Marco teórico.....	12
4.1 Programas de conservación.....	12
4.2 Estructura genética y diversidad genética.....	15
4.3. Marcadores moleculares.....	17
OBJETIVO.....	23
I. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
6.1. Colecta y preservación de muestras.....	24
6.2. Condiciones de amplificación de microsatélites por PCR.....	25
6.3. Analizador de fragmentos.....	26
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	26
7.1 Estructura genética.....	26
7.2 Historia demográfica.....	27
7.3 Diversidad genética.....	27
RESULTADOS.....	27
8.1. Alelos nulos, errores de lectura y errores de amplificación.....	27
8.2. Estructura genética.....	28
8.3. Genotipificación.....	28
8.4. Estructura genética (STRUCTURE).....	28
8.5. Tamaño efectivo de la población.....	31
8.6. Frecuencias alélicas.....	31
VII DISCUSIÓN.....	35
VIII. CONCLUSIONES.....	37
X.LITERATURA CITADA.....	40
NEXOS.....	47
GLOSARIO.....	65

CE DE FIGURAS

umento en el uso de marcadores microsatélites frente a otros marcadores.....	18
ariación genética en otras especies.....	23
olecta de muestra de tejido.....	24
el de agarosa con ADN <i>Ambystoma mexicanum</i>	25
iclos con las condiciones de los ocho microsatélites.....	26
el de agarosa con muestras de ajolote y el locus At52.1.....	28
lúster de la población formado con STRUCTURE V.2.3.4.....	29
estructura poblacional de <i>A. mexicanum</i> con STRUCTURE HARVESTER.....	29
álisis de componentes principales.....	30
rbol filogenético.....	30
recuencia alélica de la población.....	31
recuencia alélica de Atig52.143.....	32
recuencia alélica de At52.1.....	32
recuencia alélica de At60.3.....	32
recuencia alélica de At52.20.....	33
recuencia alélica de At52.6.....	33
recuencia alélica de At52.10.....	33
recuencia alélica de Ama 2C2.....	34
recuencia alélica de AmaA.....	34

CE DE CUADROS

ondiciones de las secuencias microsatélites.....	25
eterocigosis observada y esperada de la población por locus.....	31
ndice de fijación de la población por locus.....	35

**álisis de la variabilidad genética de una población de *Ambystoma mexicanum* del
tro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernanco (CIBAC)"**

ncy Mariana Ayala Angulo, Daniel Martínez Gómez, Estela T. Méndez Olvera, Armando
Sunny
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
mariana.ayala.angulo@gmail.com

umen

cremento de la mancha urbana y las actividades antropogénicas no solo a nivel nacional
a nivel mundial han provocado una gran disminución de las poblaciones de animales
os en vida libre y con esto la reducción de diversidad genética de la población. La
sidad genética es la principal herramienta que tiene una población para poder
entarse y adaptarse a cambios en el ambiente, convirtiendo a las pequeñas poblaciones
as más susceptibles a eventos estocásticos que los pueden llevar a la extinción. Un
plo de esto, son las poblaciones de anfibios que han sido tomados como bioindicadores
i calidad del ambiente, así mismo son las poblaciones que han disminuido de manera
drástica. Estas fluctuaciones en el ambiente han provocado que el tamaño poblacional
istintas especies de anfibios disminuyan de tal manera que se encuentran en el estatus
amenazados" o en "peligro de extinción" según la IUCN. Un ejemplo de esto es el
ystoma mexicanum que es una especie endémica representativa del sistema lagunar de
imilco que ha disminuido notablemente el tamaño de su población a causa de factores
opogénicos. Sin embargo, uno de los esfuerzos de conservación que se han realizado
esta especie ha sido la reproducción en cautiverio, ya que representa un reservorio
tico que puede ser útil para mantener una reproducción por largo tiempo. Sin embargo,
sta población de *Ambystomas* no se han realizado estudios genéticos que muestren el
de variabilidad genética con la que cuenta la población. Por lo que este estudio tuvo
objetivo el analizar la diversidad genética del *Ambystoma mexicanum* del Centro de
stigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernanco que está registrado ante la
ARNAT como una UMA (Unidad de Manejo para la conservación de la vida silvestre) y
a su vez cuenta con el mayor número de organismos de *Ambystoma mexicanum* con
reproducción cautiva bajo condiciones seminaturales. Tomamos las muestras de la
ación reproductora del CIBAC que está conformada por 83 organismos con un
ochip, estos individuos fueron estudiados con 15 pares de loci de microsatélites
adas anteriormente para otros *Ambystomas*. Se hizo la genotipificación de la población,
le encontramos la presencia de alelos nulos en todos los loci, posteriormente se hizo
corrección en la cuál se observó que estos alelos nulos no representan una diferencia
ficativa que pueda afectar el análisis de la población. La población se encuentra
ormada por 3 subgrupos filogenéticos, se encontró una desviación del equilibrio de
y- Weinberg debido al nivel de homocigosidad de la población.

Palabras clave: variabilidad genética, microsatélites, *Ambystoma mexicanum*,
conservación, amenazadas, especies endémicas.

"Genetic variability analysis of the *Ambystoma mexicanum* population at Centro de Investigación Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca, CIBAC (Center of Biological and Aquaculture Research of Cuernavaca)"

Nancy Mariana Ayala Angulo, Daniel Martínez Gómez, Estela T. Méndez Olvera,

Armando Sunny

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

mariana.ayala.angulo@gmail.com

Summary.

The increase of the human activity not only in national but also in international level has caused a decrease of the native animals in wild life resulting a decline of genetic diversity in the population. The genetic diversity is a tool of populations to confront and to have an adaptation at environmental changes making small populations become more susceptible to stochastic events which can lead to extinction. A clear example of this are amphibian populations that have become bio-indicators of environmental quality. These populations have decreased in number drastically. Nowadays these fluctuations in the environment have caused a decrease in the population size in different organisms that, as a result, are in "threatened" or "endangered" status. A clear example of this problem is the *Ambystoma mexicanum* that is a representative and endemic species of Xochimilco lagoon system that has significantly reduced the size of its population due to anthropogenic factors. However one of the conservation efforts is captive breeding because it can be represented a genetic reservoir to continue with successful reproduction for a long time. However, in these *Ambystomas* genetic studies have not been conducted to show us the level of genetic variability that counts the population. Therefore, the aim of this study was to analyze the genetic diversity of *Ambystoma mexicanum* at CIBAC registered to SEMARNAT as UMA (Unit of Management for the Conservation of Wildlife) which has an important number of individuals in captivity under semi-natural conditions. We sampled the breeding population of CIBAC which consists of 83 individuals with microchips that were tested with 15 microsatellite sequences used previously in other *Ambystomas*. Genotyping the population, we found the presence of null alleles at all loci, and then we made a correction in which it was not observed that these null alleles do not represent a significant difference that could affect the analysis. We obtained three subgroups that conform this population and deviation of Hardy Weinberg equilibrium by increasing the homocygotes number.

Key words: genetic variability, *Ambystoma mexicanum*, conservation, endangered species, endemic species.

I. INTRODUCCIÓN.

El *Ambystoma mexicanum*, ajolote, *Axolotl* o ajolote mexicano es una especie endémica, del sistema lagunar de Xochimilco, el cual se encuentra dividido en siete regiones, Lago de Zumpango, Xaltocan, San Cristóbal, Texcoco, Chalco, Xochimilco y Mixquic. Este sistema lagunar fue poblado antes de la colonización española por los aztecas que construyeron chinampas, donde explotaban los recursos pesqueros y agrícolas de esta zona (Bartra, 2011). La presencia de ajolotes en este sistema lagunar ha sido documentada desde la época de la conquista española, incluso se menciona la existencia de poblaciones de ajolote desde los primeros asentamientos humanos (CONABIO, 2011; Sciences- Hernández *et al.*, 2006). Los ajolotes son organismos robustos y su color es oscuro entre negro y café, con variaciones claras en distintas partes del cuerpo. La cabeza es más ancha que larga. El número de dientes maxilares y premaxilares es de 126. Los dedos son más o menos cortos y terminados en punta. La cola es mucho más corta que el cuerpo y termina en punta también, presenta una aleta caudal un poco detrás de la intersección de las branquias. Su piel es lisa en la mayoría del cuerpo, aunque puede presentar glándulas con poros en la cabeza. Son organismos completamente acuáticos y requieren condiciones adecuadas de oxigenación del agua y temperatura, incluso esta última condición ha influido en el desarrollo evolutivo de estos organismos, según un estudio realizado por Bruzgul y colaboradores, donde a partir del análisis de fósiles de *A. tigrinum*, se logró establecer correlaciones importantes entre individuos paedomorfos y metamorfos en los últimos tres mil años, evidenciando que los cambios climáticos acontecidos en este período de tiempo afectaron el desarrollo evolutivo de los Ambistómidos.

El ajolote es un anfibio que presenta neotenia, la cual es la capacidad de alcanzar la madurez sexual con una forma larvaria (Sciences-Hernández *et al.*, 2006). Como anfibio, el ajolote presenta dos tipos de respiración, sin embargo, debido a su neotenia mantiene ambos tipos en estado adulto, a diferencia de otras salamandras que después de la metamorfosis solo cuentan con pulmones. La causa por la cual los ajolotes no realizan metamorfosis en su ciclo de vida podría estar ligado a la pérdida de un fragmento en el cromosoma once. La pérdida de este segmento y una adaptación a un medio totalmente acuático ha sido considerado como un ejemplo de evolución (Voss *et al.*, 2011, CONABIO, 2011). Diversos estudios señalan que en el *A. mexicanum*, la paedomorfosis o neotenia que es una falla en la metamorfosis de este anfibio, la cual se generó como adaptación de esta especie a un ciclo de vida totalmente acuático. La paedomorfosis representa una modificación extrema en un ciclo de vida bifásico, en el cual los paedomorfos permanecen en el hábitat acuático y se reproducen en él, mientras mantienen la morfología de larvas. Dado que la evolución convergente sugiere un papel fundamental de la selección natural en delinear las variaciones entre especies y debido a que las historias de vida de los diferentes anfibios están asociadas con factores ecológicos específicos, la evolución de la paedomorfosis en el *A. mexicanum*, puede ser considerada como un ejemplo clásico de evolución adaptativa, lo cual lo hace a este anfibio un sujeto importante en el estudio de los mecanismos genéticos de evolución de las especies. Los resultados experimentales que soportan esta hipótesis están basados en el cruzamiento de ejemplares de *A. mexicanum* y *A. tigrinum tigrinum* (un metamorfo obligado) los cuales generaron en híbrido F1 metamorfo, el cual al ser cruzado nuevamente con ejemplares de *A. mexicanum* generó individuos metamorfos y paedomorfos en proporciones no Mendelianas. Si bien estos rangos de segregación no son consistentes con el modelo un solo gen, los datos si son compatibles con el efecto de

un locus principal controlando la mayor parte de las variaciones observadas en el ciclo de vida de estos anfibios.

El ajolote constituye también un modelo ideal para diferentes áreas de la medicina, principalmente por su regeneración celular tan eficiente. Estos organismos son capaces de regenerar cualquier tejido incluso el cerebro y el corazón (Sciences-Hernández *et al.*, 2006; Zambrano *et al.*, 2003). *A. mexicanum* es un modelo ideal para el estudio experimental de la biología del desarrollo y regeneración. Incluso ha sido considerada como la especie "modelo" para este tipo de trabajos.

A nivel internacional distintos centros de investigación realizan trabajos para comprender la biología de este anfibio, principalmente se desarrollan trabajos para comprender la capacidad de regeneración que presentan. Las universidades que participan en estas investigaciones son entre otras, la Universidad de Indiana, la Universidad de Nottingham, la Universidad de Kentucky, el Instituto de Biología Molecular de la Universidad de Texas y la Universidad de California (Sciences-Hernández *et al.*, 2006).

En el año 2011, el Departamento de Defensa de los Estados Unidos de América, invirtió alrededor de 6.25 millones de dólares en estudios relacionados con la regeneración celular de extremidades del ajolote mexicano (CONABIO, 2011). Así mismo otras instituciones han comenzado un trabajo de secuenciación de bancos o librerías de expresión, EST por sus siglas del inglés "*expressed sequence tag*". A la fecha dos librerías han sido desarrolladas, la primera a partir de regiones dorsales de embriones de ajolote, específicamente tubos neurales y la notocorda. La segunda fue construida a partir de blastemas de seis días de regeneración. Con estas librerías de expresión se ha podido establecer genes ortólogos en el ajolote relacionados con diversos vertebrados, como ciclinas, keratina, transferrina, fibrinógeno, entre otras. También se ha podido establecer genes con alta homología entre las especies *A. mexicanum* y *A. tigrinum*, y genes que no muestran homologías con ningún otro gen, lo que teóricamente los hace específicos del ajolote. En este aspecto un estudio llevado a cabo por Smith y colaboradores mostró una situación particular en los genes del *A. mexicanum*, estos investigadores trabajando con una biblioteca genómica encontraron que existe un 2% más de genes de linajes específicos en el ajolote en comparación que el humano y una buena cantidad de genes ortólogos entre estas dos especies (86%).

Sin embargo, aunque el análisis de las secuencias codificantes mostró esta relación de genes ortólogos alta, un análisis más detallado mostró que en el ajolote algunos genes eran cinco veces más grandes, que en el humano. La diferencia de tamaño básicamente radicó en los intrones, lo que ha generado un gran interés, pues actualmente se sabe que varias secuencias reguladoras de genes en el humano se encuentran justamente en los intrones. Sin embargo, a pesar de ser una especie altamente importante tanto evolutivamente y medicamente, las actividades como la extracción ilegal para su uso como mascotas, su explotación como remedio medicinal, la introducción de especies exóticas como la carpa y la tilapia, pero principalmente la pérdida, contaminación y fragmentación de su hábitat, han ocasionado una disminución considerable en la población de *A. mexicanum* en vida libre (Christie *et al.*, 2012). Ante este escenario, las poblaciones en cautiverio se han convertido en un reservorio genético para esta especie que se encuentra en peligro de extinción (Gascon *et al.*, 2007; IUCN, 2010).

El éxito de esta estrategia de conservación depende de que las poblaciones cautivas o aisladas mantengan una variabilidad y estructura genética apropiada, en poblaciones cautivas pequeñas esto es difícil de lograr. El incremento de los niveles de endogamia puede disminuir la tasa de reproducción o incrementar la tasa de mortalidad. De igual forma puede llevar a la pérdida de la variabilidad genética, un elemento fundamental para la adaptación a los cambios en el medio ambiente (Hedrick y Fredrickson, 2009). El Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca alberga una población grande de ajolotes, con fines de conservación de la especie. Este centro ha hecho esfuerzos para la conservación del ajolote mexicano, estableciendo programas de reproducción en cautiverio, con el fin de evitar la extinción de la especie. En este trabajo se analiza la diversidad y estructura genética de la población de reproductores con el fin de apoyar los esfuerzos de conservación de esta especie endémica de México.

II. MARCO TEÓRICO

Situación actual del *Ambystoma mexicanum*

El ajolote mexicano (*Ambystoma mexicanum*) es una especie endémica representativa del sistema lagunar de Xochimilco, que se ha visto afectada por la contaminación y reducción de su hábitat natural. El crecimiento de la mancha urbana y otros procesos antropogénicos han disminuido el tamaño de las poblaciones de vida libre, colocándolas en riesgo. En el caso del ajolote no solo la contaminación ha sido un problema, el sistema lagunar de Xochimilco (su hábitat natural), en los últimos años ha disminuido considerablemente. En 1998 abarcaba una superficie de 240 km², en la actualidad solo se conserva un 1% de su tamaño original (Zambrano *et al.*, 2004). Consecuencia de estas alteraciones, las poblaciones de *A. mexicanum* en vida libre se han visto afectadas notablemente. En el año 1998 se reportaban 0.006 individuos/m² y para el año 2003 había solo 0.001 individuos/m², con alta probabilidad de extinción para el año 2019 (Zambrano *et al.*, 2004; Parra-Olea *et al.*, 2011).

El *A. mexicanum* ha perdido gran parte de su hábitat por la expansión de la mancha urbana y actividades antropogénicas. Diversas organizaciones tanto gubernamentales como no gubernamentales la han colocado en el estatus de "peligro de extinción" y trabajan para su protección. El CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres) ha colocado al ajolote mexicano dentro del Apéndice II (especies con comercio internacional controlado), con posibilidad de cambiarla al Apéndice I (especies amenazadas de extinción, cuyo comercio internacional sólo es posible bajo circunstancias excepcionales). En cuanto a la IUCN (Unión Internacional para la conservación de la Naturaleza) la ha catalogado en peligro crítico y la colocado en la Lista Roja de "especies en peligro de extinción" (IUCN, 2010). La SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales) por su parte la ha colocado dentro de la NOM 059, con el estatus de "especie bajo protección especial (Pr)", considerado moverla al estatus de "Amenazada (P)", que le proporciona la protección máxima bajo la legislación mexicana (Zambrano *et al.*, 2004; Sciences-Hernández *et al.*, 2006).

Hoy en día, los miembros del género *Ambystoma* se encuentran críticamente amenazados por la contaminación de su hábitat, tal es el caso de *A. dumerilli*, *A.*

andersonni, *A. leorae*, *A. lermaense*, *A. taylori*, entre otros.. Sin embargo, en el caso del *A. mexicanum* se ha convertido en la salamandra más amenazada de toda América Latina. Como se mencionó anteriormente, los lagos de Xochimilco que alguna vez fueron su hábitat natural, se encuentran eutrofizados, con altas concentraciones de contaminantes como metales pesados y agroquímicos que son utilizados en las chinampas para la producción de hortalizas (Parra-Olea *et al.*, 2011). Algunos de estos contaminantes como el nitrógeno y el amonio, ocasionan una interrupción en el desarrollo de las crías del ajolote y en casos graves, la muerte en estado larval (Zambrano *et al.*, 2003 ; Sciences-Hernández, 2006; Valiente, 2006). Las concentraciones de nitrógeno amoniacal, los trihalometanos y los metales pesados en el sistema lagunar de Xochimilco, están por arriba de lo estipulado en la NOM 127-SSA1-1994 (Contreras *et al.*, 2009; Alcaraz *et al.*, 2015) lo cual representa un problema serio para la sobrevivencia de los ajolotes. Es importante mencionar en este punto, que los ajolotes se caracterizan por tener la piel desprotegida y permeable, la cual utilizan principalmente para respirar e hidratarse, lo que implica una continua absorción de productos del ambiente incluyendo los contaminantes. Esta continua absorción representa un riesgo no solo para los organismos adultos, sino también para los huevos y juveniles. Aparte de la contaminación química presente en el sistema lagunar de Xochimilco, también hay contaminación biológica.

En un trabajo realizado por Mondragón y colaboradores en el 2011 donde se menciona que el número de coliformes totales y fecales en el sistema lagunar de Xochimilco (Enterobacterias), está por arriba del 50% de lo especificado por la NOM-003- ECOL- 1997 (Zambrano *et al.*, 2003). Con respecto a *Streptococcus*, se presentan con más del 90% de lo estipulado por la misma norma (NOM 003). En tanto, otros grupos de bacterias infecciosas como *Pseudomonas* y *Aeromonas* superan del 30 al 80% de lo especificado por la norma, con mayor concentración en las zonas turísticas y en zonas con descarga de plantas tratadoras de agua (Contreras *et al.*, 2009). Estos contaminantes traen como consecuencia enfermedades y por lo tanto pérdida de recursos naturales, además de provocar problemas de tipo económico y social (Mondragón-Ancelmo *et al.*, 2011). Al igual que la contaminación en el agua, los cambios en la temperatura y la precipitación son los factores responsables de la alteración de microclimas, así como de patrones reproductivos en distintas poblaciones (Sá, 2005).

Otro factor importante en la disminución de las poblaciones de ajolotes en vida libre es la presencia de especies exóticas que compiten por el alimento y espacio. La carpa (*Cyprinus carpio*) y la tilapia (*Oreochromis niloticus*), dos especies invasoras, se alimentan de los huevos del ajolote (Alcaraz *et al.*, 2015), por su parte la lobina negra (*Micropterus salmoides*), otra especie introducida, depreda a organismos juveniles (Zambrano *et al.*, 2003). La tilapia (*Oreochromis niloticus*) que también se alimenta de las puestas de los ajolotes tiene una densidad poblacional mayor a 0.093 organismos /m² en los lagos de Xochimilco causando un peligro importante en la sobrevivencia del ajolote en su hábitat natural (Zambrano *et al.*, 2003; Alcaraz *et al.*, 2015).

Programas de conservación.

Uno de los mayores esfuerzos que se han hecho para la conservación y restauración de especies nativas en peligro de extinción por actividades antropogénicas (Christie *et al.*, 2012), ha sido la creación de programas de reproducción en cautiverio

(Hedrick, 2005; Willoughby *et al.*, 2015) ya sea en condiciones controladas o semi-controladas (Leus y Lacy, 2008). Muchos estudios de conservación se han enfocado en conocer la diversidad genética para evitar la pérdida del potencial adaptativo. Incluso, en la actualidad en el caso de algunas especies en peligro de extinción, solo las podemos encontrar en cautiverio (Hedrick y Miller, 1992). El éxito de los programas de reproducción en cautiverio con fines de reintroducción, está basado en la preservación de la variabilidad genética de las poblaciones cautivas. A través del análisis de pedigrí y la selección de organismos en función al índice de parentesco (mk o mean kinship) (Hedrick y Miller, 1992), se ha intentado mantener la variabilidad genética en estas poblaciones. Mediante el análisis genético de los organismos cautivos, comparándolos con individuos de poblaciones naturales se ha logrado identificar organismos de la población cautiva que podrían ayudar a incrementar la diversidad genética de la población en vida libre y viceversa (Hedrick, 2005; Griffiths y Pavajeau, 2008; Leus y Lacy, 2008; Hedrick y Miller, 1992).

Las UMA (unidades de manejo y aprovechamiento sostenible) han jugado un papel importante en la conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción, ya que tienen como principal objetivo la reproducción y reintroducción de organismos a su hábitat natural (Christie *et al.*, 2012). El objetivo de estas unidades es mantener poblaciones genéticamente viables, minimizando la pérdida de diversidad genética y asegurando una reproducción por periodos largos de tiempo (Hedrick, 2005; Christie *et al.*, 2012; Leus y Lacy, 2008). Las UMA han servido también como centros de enseñanza, investigación y captación de recursos para la conservación de especies silvestres (Luo *et al.*, 2008). Una variante de estas unidades, las PIMV (Predios intensivos de manejo de la vida silvestre), mantienen de forma confinada organismos, pero a diferencia de las UMAs, en estos lugares no se considera la reintroducción, solamente la reproducción (Young *et al.*, 2001; Frankham, 2003; Lerner *et al.*, 2009; Allendorf, 2010; SEMARNAT, 2010; Christie *et al.*, 2012).

La reproducción en cautiverio ha permitido la recuperación de especies amenazadas, tal es el caso del lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*). Esta subespecie del lobo gris del Norte de América fue colocada en la lista de especies en peligro de extinción en el año 1976. La caza furtiva y la destrucción del hábitat, habían causado una disminución considerable de las poblaciones silvestres. En el año 1980 se reportaban pocos individuos en vida libre de manera aislada. Sin embargo, gracias a que se tenían individuos en cautiverio, se logró en los años ochenta, establecer un programa de rescate de la especie (Hedrick y Fredrickson, 2009). En el caso del cocodrilo (*Crocodylus moreletii*), una especie que se ha visto amenazada por la contaminación de su hábitat y por la sobreexplotación para la comercialización de su piel, las UMA han servido para la recuperación de la especie.

Con respecto a los anfibios, actualmente diversas especies son reproducidas en cautiverio, básicamente porque son los individuos que se han visto mayormente afectados por cambios antropogénicos en su hábitat (Newman y Squire, 2001; Griffiths y Pavajeau, 2008; Tzika *et al.*, 2008; Ivy y Lacy, 2012). En el caso del *A. mexicanum* las grandes alteraciones en su hábitat a causa de las actividades humanas; han convertido a esta especie en una de las especies endémicas más amenazadas en vida libre por lo que la reproducción en cautiverio se ha convertido en su principal manera de reproducción y sobrevivencia.

El Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca (CIBAC), desde su apertura en 1993, se han encargado de la conservación y reproducción de

especies endémicas de la zona lacustre de Xochimilco. Este lugar se registró como UMA (DGVIS-CR-IN-0952-DF/07) en el año 2007 y se han encargado principalmente de la reproducción del ajolote (*A. mexicanum*) en condiciones semi-naturales manteniendo la reproducción de un número importante de organismos cautivos (Alcaraz *et al.*, 2015). La población del CIBAC, está conformada por un grupo de individuos que fueron tomados de vida libre, con lo cual se estableció un grupo fundador, que se refiere a un pequeño grupo desprendido de una población más grande, representando una pequeña parte de los alelos de la población parental (Población original) (Eguiarte *et al.*, 2008), sin haber hecho un estudio de diversidad genética previa. La IUCN menciona que a la hora de hacer un estudio genético de poblaciones en cautiverio es necesario tener una muestra de al menos veinte individuos que no estén genéticamente emparentados, con los que podríamos tener representado el 97.5% del total de la diversidad genética de la población (Leus y Lacy, 2009) durante un período de 200 años (Hedrick y Miller, 1992). Otra alternativa a la depresión endogámica es la introducción de nueva diversidad genética de otras poblaciones (Amos y Balmford, 2001).

Estructura genética y diversidad genética.

En la actualidad, el establecimiento de la estructura genética en poblaciones pequeñas o aisladas se ha convertido en un aspecto fundamental para tomar decisiones en la conservación y mantenimiento de una población (Sunny *et al.*, 2014). Cuando las poblaciones no se encuentran en equilibrio genético y cuentan con mayor número de organismos homocigos o heterocigos, la probabilidad de extinción aumenta conforme pasa el tiempo (Eguiarte *et al.*, 2008). La estructura genética de la población depende del flujo genético, la dinámica y el tamaño poblacional que a su vez determina la tasa de deriva y el pool genético con el que cuenta la población para su reproducción. Por lo que el estudio de la estructura y variabilidad genética se ha convertido en una herramienta fundamental en cuestión de conservación (Newman y Squire, 2001). La estructura de una población está influenciada por la interacción de procesos microevolutivos como la deriva génica y la migración por una ausencia de selección o mutación como resultado del flujo genético ya que el flujo genético tiende a homogenizar las frecuencias alélicas de distintas poblaciones dando lugar a la disminución de la diferenciación entre ellas (Newman y Squire, 2001; Godoy, 2009).

La estructura poblacional es la herramienta que permite la asignación de individuos a poblaciones e indirectamente se puede hacer una inferencia sobre la dinámica detectando fenómenos como migración (Godoy, 2009). Cuando tenemos niveles bajos de heterocigosidad hay una pérdida importante de alelos que podrían ser útiles en la población para poder responder a cambios ambientales y por lo tanto podría ayudar en futuras adaptaciones (Brito, 2009). Actualmente, hay estudios donde mencionan que la pérdida de la diversidad genética de una población puede conducir a situaciones donde se pone en riesgo su existencia como población y como especie (Eguiarte *et al.*, 2007; Godoy *et al.*, 2009).

La diversidad genética es una de las tres formas de biodiversidad reconocidas por la IUCN, basándose en la necesidad de conservar la diversidad genética para que pueda ocurrir la evolución y la adaptación de la población ante perturbaciones ambientales (Reed y Frankham, 2003). Sin embargo, en muchas ocasiones podemos hacer una determinación de la secuencia en los cambios que ha sufrido una característica a través del tiempo en aquellos organismos que la poseen, con este

estudio también se pueden identificar mutaciones que probablemente estén asociadas con enfermedades (Eguiarte *et al.*, 2008). Para lograr un buen manejo de los animales en vida cautiva y mantener los niveles de diversidad genética, es necesario conocer la estructura y variabilidad genética dentro y entre la población antes de llevar a cabo un plan de reproducción (Eguiarte *et al.*, 2008). Aunque, hay estudios en los que demuestran que la tasa de migración puede tener un efecto positivo en el rescate de pequeñas poblaciones previniendo una depresión por endogamia. En el caso del lobo (*Canis lupus*), tuvo una dramática reducción en el tamaño de su población al grado de considerarse extinta en los años 60's. Sin embargo, algunas poblaciones se han visto favorecidas por la llegada de organismos que ayudan a incrementar la heterocigosidad de la población (Vilà *et al.*, 2002). La diversidad genética es un producto de la evolución que se da a lo largo del tiempo por diversos factores como: la mutación, endogamia, deriva génica, selección natural y flujo génico que puede aumentar o disminuir la diversidad genética de la población puesto que las poblaciones son unidades dinámicas que cambian su tamaño y distribución a lo largo del tiempo constantemente. Estos cambios se ven repercutidos en la genética de la población que está directamente relacionada con su viabilidad a largo plazo (Hedrick, 2005; Willoughby *et al.*, 2015).

Las variantes genéticas en las poblaciones son las herramientas que utilizarán los individuos para sobrevivir y reproducirse en nuevas condiciones. La medición de la variabilidad genética se hace principalmente, por medio de la medición de polimorfismos a nivel del DNA con ayuda de marcadores moleculares. Midiendo principalmente el número de haplotipos y su diversidad, diversidad nucleotídica, el grado de polimorfismo, el número promedio de alelos y la heterocigosidad (Eguiarte *et al.*, 2008; Godoy *et al.*, 2009).

El estudio del flujo genético ha sido un tema importante en la estimación de la estructura de una población (Eguiarte *et al.*, 2008). La falta de flujo génico está asociado principalmente a la fragmentación o pérdida del hábitat, lo que ha provocado a su vez una reducción en el número de individuos o en algunos casos la extinción de especies endémicas (Frankham, 2003; Joop-Ouborg *et al.*, 2010). En genética de la conservación los estudios se han enfocado en los efectos relacionados con la falta de flujo genético (Frankham, 2003). El flujo genético se refiere a todos los mecanismos que generan movimiento de genes de una población a otra, provocando fluctuaciones en las frecuencias alélicas. El flujo genético en subpoblaciones hace que evolucionen de diferente forma y a su vez se adquieran variaciones genéticas diferentes en cada una de las poblaciones (Hamilton, 2009).

En una población, cuando hay un alto flujo génico, se ve reflejado en bajos niveles de variación genética y una débil estructura poblacional, ya que la variación genética es homogénea en la población. La tasa del movimiento de genes de una población a otra afecta de manera importante a las especies y a la cantidad de flujo genético que es necesaria para prevenir una evolución independiente de las poblaciones y que a su vez dependerá de las otras fuerzas evolutivas (Piñero *et al.*, 2008). En muchas especies en peligro de extinción la deriva genética se refiere a todos los cambios en las frecuencias génicas de la población, como resultado de eventos aleatorios de una generación a otra. Este efecto se ha convertido en un factor importante como determinante en su persistencia ya sea en vida libre o en cautiverio (Eguiarte *et al.*, 2008; Hedrick y Fredrickson, 2009). Sin embargo, aunque la erosión de la diversidad genética durante el tiempo es un proceso natural en poblaciones pequeñas, también la deriva génica da como resultado una pérdida de alelos incluso más rápido que un

proceso de mutación que puede generar nueva diversidad de alelos en la población (Malone *et al.*, 2003). Las frecuencias alélicas en una población van cambiando de manera constante, (Montgomery *et al.*, 1997) de tal forma que la disminución en el número de individuos de una población puede convertirla en una población especialmente vulnerable a efectos de deriva génica que tiene origen en el muestreo aleatorio con un número limitado de gametos de una generación para formar parte de la siguiente. Este proceso puede afectar la variabilidad genética de la población, incrementando los niveles de endogamia (Brito, 2009; Hamilton, 2009; Parra-Olea *et al.*, 2012).

En la actualidad, los marcadores moleculares se han convertido en la principal herramienta para describir y estimar la variación genética de diversas poblaciones usando parámetros como: el número total de haplotipos, la diversidad haplotípica, el número de sitios segregantes, diversidad nucleotídica, el grado de polimorfismo, el número promedio de alelos y la heterocigosidad, puesto que el déficit relativo de heterocigotos es un método indirecto para estimar el nivel de endogamia poblacional (Godoy *et al.*, 2009).

Marcadores moleculares

Un marcador molecular es una herramienta que nos sirve para medir cualquier variación entre individuos, poblaciones, subpoblaciones o incluso entre especies (Godoy *et al.*, 2009). En la actualidad se han utilizado diversos marcadores moleculares que han permitido la estimación de la variabilidad genética de diversas poblaciones ayudando a comprender diversos procesos poblacionales como la dinámica poblacional e incluso procesos evolutivos (Eguiarte *et al.*, 2007; Newman y Squire 2008).

Uno de los marcadores más utilizados en la genética de la conservación han sido los microsatélites o STR, por sus siglas en inglés "*Short tandem repeats*", que son repeticiones en tándem de pequeñas secuencias de 1 a 6 nucleótidos (mononucleótidos (TT), dinucleótidos (AT) o tetranucleótidos (AAGG) que forman parte del ADN repetitivo no codificante y en principio son fragmentos de ADN compuestos por secuencias nucleotídicas cortas (2-5 p.b.) (Carranza, 2008). Son secuencias altamente variables de un individuo a otro que se encuentran de manera abundante y repetida a lo largo de todo el genoma en la mayoría de los organismos eucariotas (Godoy, 2009). Se caracterizan por ser altamente polimórficos en cuanto a su longitud, lo que los convierte en marcadores moleculares más apropiados para utilizarse en estudios a nivel poblacional (Romero *et al.*, 2014). Su elevado nivel de polimorfismo se atribuye a dos mecanismos de mutación: el deslizamiento en el apareamiento de las hebras de ADN "*slippage misspairing*" y el entrecruzamiento desigual "*unequal crossing over*", suelen presentar un alto número de alelos que difieren en el número de repeticiones (Eguiarte *et al.*, 2007; Godoy, 2009; Romero, 2014). Las repeticiones de las secuencias microsatélites tienen un máximo de 60 repeticiones, son marcadores evolutivamente neutros (Eguiarte *et al.*, 2007) y se encuentran altamente conservados, ocupando la misma posición cromosómica (Godoy, 2009) son secuencias considerablemente informativas y tienen alto nivel de discriminación (Rojas *et al.*, 2007).

En genética de la conservación, el uso de los microsatélites se ha empleado para construir filogenias (Eguiarte *et al.*, 2007), identificando a los individuos fundadores, su divergencia en el tiempo y la fijación de genes entre especies, así como la

relación entre ellos, pudiendo detectar fenómenos como la selección entre algunos otros como cuellos de botella (Allendorf *et al.*, 2010). Como lo realizaron Jehle y Arntzen en el año 2002 con una población de *B. Calamita*, donde a través del uso de microsatélites, detectaron que la población había cruzado por cuellos de botella, que le dieron características genéticas a esta población como el incremento en los niveles de heterocigosidad. Así como este trabajo, también se han hecho diversos estudios en anfibios y otros organismos que se han visto afectados por factores como la fragmentación, pérdida de su hábitat y caza furtiva como en el estudio que realizaron Ruíz-García y colaboradores en el 2006 o Hagg y colaboradores en el 2010 donde observaron una subdivisión en la población que concordaba con la fragmentación de su hábitat y que fue descubierto igualmente, por medio de microsatélites.

Los microsatélites son los marcadores nucleares más utilizados en anfibios y reptiles para el estudio de la estructura de las poblaciones. Permiten construir con precisión la estructura genética de las poblaciones en cautiverio determinando su relación con los individuos fundadores que a su vez son los parientes más cercanos con los individuos que se encontraban en vida libre (Hajeer *et al.*, 2000; Allendorf, 2010; Joop-Ouborg *et al.*, 2010). Utilizan cebadores específicos y los alelos son identificados de acuerdo a las diferencias de su tamaño, por medio de la técnica de electroforesis (Godoy *et al.*, 2009). En genomas diploides, al determinar el tamaño de los electromorfos se infiere la condición homóciga o heteróciga de los alelos. Cuando se observan dos bandas hay alelos diferentes (heterocigos). Cuando sólo se observa una banda, los dos alelos son iguales (homocigos). En genomas haploides sólo se observa una banda o electromorfo correspondiente a un alelo (Romero *et al.*, 2014).

Se han podido describir patrones genéticos en poblaciones de vida libre y cautiverio llegando a escalas que van desde individuos hasta especies (Godoy, 2009), pueden dar una buena aproximación de la filogenia de una población (Aranguren- Méndez *et al.*, 2005), la lectura de las bandas es clara y fácil de interpretar, ya que, si se tiene un interés en particular, esta característica no la encontramos en otros marcadores moleculares (Aranguren- Méndez *et al.*, 2005; Eguiarte *et al.*, 2007). Estos marcadores moleculares tienen la gran ventaja ante otros marcadores de poderlos emplear cuando la muestra de ADN es escasa o se encuentra degradada (Eguiarte, 2007; Godoy, 2009). En su mayoría, los microsatélites se encuentran en diversas especies siendo dinucleótidos, excepto en primates que son mononucleótidos. Sin embargo, se ha descrito que cuando los tripletes son muy largos no son conservados durante períodos muy largos de tiempo, es debido a desestabilizaciones durante la meiosis, la distribución de los microsatélites varía no sólo entre especies, sino también dentro de cromosomas del mismo organismo (Godoy, 2009). Sin embargo, los microsatélites tienen efecto neutro frente a la selección (Eguiarte, 2007), han sido ampliamente utilizados en poblaciones donde el nivel de endogamia es alta, permitiendo diferenciar aquellas poblaciones que están estrechamente relacionadas. Dentro de las mayores ventajas están que pueden ser utilizados con éxito para otra especie del mismo género. De acuerdo con los principios de Mendel, cuando un alelo marcado y unos alelos del gen de interés están muy separados dentro del mismo cromosoma o están en cromosomas diferentes, éstos segregarán de forma independiente (Godoy, 2009).

El estudio con estos marcadores es sencillo, rápido y de bajo costo. Por lo que actualmente se ha convertido en el marcador ideal para numerosos estudios

genéticos, mapeo genético, análisis de ligamento, de filiación y el análisis genético de poblaciones (Godoy, 2009).

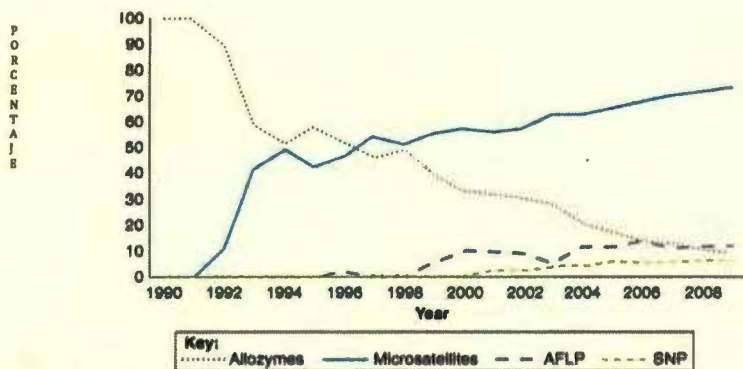


Figura 1. Aumento en el uso de marcadores moleculares microsatélites en el uso de Genética de la conservación a lo largo del tiempo.

Han tomado ventaja sobre otros marcadores genéticos como los AFLPs, RAPDs, RFLPs (Figura 1) debido a que se segregan de manera mendeliana y son codominantes. Anteriormente se utilizaban RFLPs, pero con el tiempo fueron reemplazados por microsatélites por sus características utilizadas para este fin como: herencia mendeliana, distribución homogénea y frecuente a lo largo del genoma, con elevado polimorfismo (Eguiarte, 2007; Godoy, 2009). Están situados en regiones no codificantes, (Jehle y Arntzen, 2002), son amplificados por medio de la técnica de PCR con primers específicos y los diferentes alelos son separados a lo largo de un gradiente de electroforesis (Jehle y Arntzen 2002). Esta técnica es útil en la identificación de individuos fundadores y la fijación de genes entre especies a lo largo del tiempo, así como la relación que hay entre ellos. Se pueden detectar fenómenos como selección (Allendorf *et al.*, 2010), convirtiéndolos en los marcadores más confiables y más utilizados para hacer estudios de genética de poblaciones (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005).

La identificación a nivel individual en una población, ha permitido su combinación con pruebas de paternidad o simplemente monitorear su reproducción. Así podemos realizar indirectamente estudios de diversidad genética en diversas poblaciones y asignar pares de individuos a una categoría determinada de parentesco (Godoy, 2009). Entre más pequeña sea la población, la probabilidad de que dos alelos tomados al azar tengan ancestros idénticos aumenta, dando como resultado la endogamia (consanguinidad) (Hamilton, 2009). La endogamia puede actuar rápidamente en poblaciones pequeñas, ya que en una población donde se presenta una disminución de diversidad genética, se debe generalmente a una depresión endogámica que es causada a su vez por la presencia de alelos recesivos que pueden tener efectos letales en la población (Leberg y Brigitte, 2008 ; Parra-Olea *et al.*, 2012).

Este incremento en el aislamiento y reducción en el tamaño de la población da como resultado una diferenciación y pérdida en la diversidad genética (Malone *et al.*, 2003), incremento en los niveles de endogamia, deriva génica así como la depresión por

endogamia o incluso la adaptación al cautiverio (Leus y Lacy *et al.*, 2008; Christie *et al.*, 2012). En algunas investigaciones, se ha documentado que el incremento en los niveles de homocigosidad resulta en endogamia causando la pérdida o disminución del fitness trayendo una depresión por endogamia (Hedrick y Miller, 1992).

No solo a nivel nacional sino también a nivel mundial, los programas de reproducción en cautiverio de especies amenazadas han logrado el mantenimiento de diversas poblaciones como el panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*) en China, que a pesar de que se ha visto afectado por la destrucción de su hábitat y la explotación de su principal fuente de alimentación que es el bambú. La población cautiva se ha mantenido gracias a un manejo controlado en cautiverio a pesar de tener altos niveles de endogamia por ser una población cautiva con un número pequeño de organismos fundadores (Shen *et al.*, 2009).

El coeficiente de relación entre los individuos de una población y los organismos fundadores puede ser calculado con la suma de todos los organismos descendientes con lo que se obtiene su contribución, en particular de los organismos fundadores (Hedrick y Miller 1992).

La reducción de la depresión por endogamia por la purgación de alelos letales puede causar una reducción en la variabilidad genética para futuras adaptaciones y éxito de reintroducción y en poco tiempo e incrementar la probabilidad de extinción. Sin embargo, esta purgación depende del potencial reproductivo de las especies (Hedrick y Miller 1992). La depresión por endogamia se refiere a una reducción en la sobrevivencia y fertilidad de la descendencia de individuos relacionados genéticamente (Charlesworth y Willis, 2009).

Aunque también Templeton y Read en 1984 sugirieron que algunos programas de reproducción radicales que incrementan el coeficiente de endogamia pueden purgar a la población de alelos deletéreos o letales y evitar los efectos de la depresión por endogamia a lo largo de muchas generaciones (Hedrick y Miller 1992).

En 1951, S. Wright sugirió que un migrante por generación puede ser suficiente para evitar que haya diferenciación en la población que ha cruzado por deriva génica. Aunque algunas investigaciones sugieren que son necesarios de 1 a 10 migrantes por generación para que pueda darse un equilibrio en la variación (Dutta *et al.*, 2013 ; Roques *et al.*, 2015). Esto es importante mencionar puesto que la endogamia y la pérdida de la variabilidad genética incrementa el riesgo de extinción (Montgomery *et al.*, 1997).

Como se mencionó anteriormente, el lobo mexicano se ha convertido en una de las especies endémicas más mencionadas que se encuentra en peligro de extinción por actividades antropogénicas como: la destrucción de su hábitat, la caza furtiva y la extracción ilegal de estos animales de vida libre. Esta problemática ha orillado a esta especie a estar en peligro de extinción desde 1976, quedando solo algunos grupos de individuos de manera aislada en vida libre desde 1980. En el 2009, Hedrick y Fredrickson hicieron un estudio en el cuál describieron tan sólo 3 linajes fundadores que trataron de incrementar el número de organismos fundadores, la heterocigosis, el fitness y por su puesto, reducir los niveles de endogamia con el que contaba la población (Hedrick y Fredrickson; 2009). Sin embargo, en otro estudio con lobos, a pesar de que estaba casi extinta, hicieron un análisis en el cual demostraron que la migración de algunos individuos incrementó los niveles de heterocigosidad con el

segundo establecimiento de individuos ayudando en la reducción de depresión por endogamia reflejado en un crecimiento exponencial de la población (Vilà *et al.*, 2002). Cabe destacar que solo los individuos con éxito reproductivo pueden contribuir al rescate de la población (Vilà *et al.*, 2002).

En el 2013, Dutta y colaboradores mencionan que en una población de leopardos donde encontraron niveles altos de heterocigosidad. Decidieron hacer un análisis de la población actual e hicieron una comparación con respecto a su historia genética, su hipótesis era que la población había pasado por un cuello de botella, sin embargo, encontraron que los niveles de heterocigosidad altos era principalmente porque había un constante movimiento de organismos y por lo tanto un intercambio importante de genes, lo que daba origen a nuevos genes dentro de la población. Puesto que los leopardos tienen que viajar largas distancias para conseguir su alimento, ya que ha ido cambiando sus condiciones por la fragmentación y destrucción de su hábitat creando barreras geográficas que han subdividido las poblaciones de leopardos.

Se han realizado estudios que han demostrado que la extinción de las especies se ha dado principalmente por efecto de la endogamia (Frankham, 2003; Brito, 2009). Mostrando un deterioro a nivel genético y en las frecuencias alélicas. Por ello es importante establecer la estructura genética para poder tomar decisiones de reproducción y conservación en programas de reproducción en cautiverio (Sunny *et al.*, 2014).

El efecto de la consanguinidad en una población es de vital importancia en cuestión de conservación ya que se ve reflejada directamente en la dinámica poblacional de tal forma que afecta la viabilidad y reproducción individual (Godoy, 2009). La endogamia se refiere a un apareamiento no aleatorio, en donde hay mayor probabilidad de que un organismo sea autócigo con respecto a una población con reproducción panmíctica. Este proceso puede llevar a la población a reducir el número de organismos o individuos reproductivos que afectan directamente la diversidad alélica con un incremento de organismos homocigos (Eguarte *et al.*, 2008; Charlesworth y Willis, 2009; Willoughby *et al.*, 2015).

La unión de gametos consanguíneos formados por endogamia se observa cuando hay una reducción en el fitness causado por un incremento en la expresión de alelos deletéreos (Williams *et al.*, 2008; Hedrick y Fredrickson, 2009). Los individuos emparentados se caracterizan por tener mayor probabilidad de compartir alelos que individuos no relacionados, debido a que presentan alelos con copias directas de un alelo presente en un antepasado en común (Godoy, 2009).

El incremento en los niveles de endogamia pueden reducir directamente la heterocigosidad por el incremento en la proporción de homocigotos relativa (Willoughby *et al.*, 2015). Algunos estudios sugieren que en el caso de las salamandras, los factores bióticos y abióticos como los patógenos, la radiación UV y la regeneración, juegan un papel importante en la expresión de alelos deletéreos y malformaciones (Williams *et al.*, 2008). En algunas ocasiones, la depresión endogámica está relacionada con malformaciones morfológicas. Incluso, en algunos *taxa* hay estudios donde relacionan las malformaciones específicas y el incremento de la incidencia en consanguinidad. Sin embargo, cabe mencionar que no todas las malformaciones son resultado de la endogamia (Williams *et al.*, 2008).

Para poder obtener las estimaciones de los valores de coeficiente de endogamia y los apareamientos no aleatorios de la población. Se pueden obtener por medio de: F_{IT} , F_{IS} , y la F_{ST} .

$$F_{ST} = F_{IT} - F_{IS} / 1 - F_{IS}$$

Donde:

F_{ST} = Subdivisión de la población

F_{IT} = Coeficiente de endogamia

F_{IS} = Apareamiento no aleatorio

Los estadísticos de prueba F sirven para correlacionar los genes homólogos así como la correlación de genes entre individuos de una población (F_{IS}) y los genes del total de la población que se puede calcular con la F_{ST} o estimando N_m que es el grado de diferencia genética entre dos poblaciones (Piñero *et al.*, 2008).

F_{ST} nos ayuda a determinar la reducción de heterocigosis por una diferenciación genética entre las poblaciones. En el caso de poblaciones en cautiverio como la del ajolote mexicano, se asume que todos los individuos no son consanguíneos y no están emparentados entre ellos (Piñero *et al.*, 2008).

Como se mencionó anteriormente, el tamaño efectivo de la población es uno de los parámetros más importantes en la evolución y conservación biológica ya que es considerado el factor determinante de la tasa de decaimiento de la heterocigosis provocando cambios en las frecuencias génicas de la población. Cuando un alelo al azar deja mayor descendencia, con el paso del tiempo aumenta la frecuencia en la población (Jehle y Arntzen 2002; Eguiarte *et al.*, 2007). Los cambios demográficos juegan un papel muy importante en la formación y estructura génica de la población. Los procesos como cuellos de botella modifican las frecuencias alélicas por efecto de deriva génica (Godoy *et al.*, 2009).

Un parámetro más que se utiliza para inferir sobre la variabilidad genética de las poblaciones es la heterocigosidad que se refiere a los individuos con diferentes alelos para un locus (Allendorf, 2007; Eguiarte *et al.*, 2008). La heterocigosis se divide en dos: H_o (Heterocigosidad observada) y H_e (heterocigosidad esperada). La primera es la frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en la muestra y la segunda se refiere a la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes. Por ejemplo, si tenemos que la H_o y la H_e son diferentes se puede inferir que hay un déficit o un exceso de organismos heterocigotos. Esto se puede deber a un tamaño efectivo de la población reducido (Eguiarte *et al.*, 2008).

Otro caso de poblaciones en peligro de extinción muy conocido, es el caso del chita que son organismos que son poco reproducidos en cautiverio y que además tienen altas tasas de mortalidad en cautiverio. Convirtiendo a esta especie, especialmente vulnerable a la extinción (Hedrick, 2001). Además un estudio realizado por O'Brien y colaboradores en 1987, encontraron que en dos poblaciones de Chita (*Acinonyx jubatus jubatus* y *Acinonyx jubatus*), hubo poca distancia génica entre las subpoblaciones, esto es que la población tiene altos niveles de endogamia y que por lo tanto el promedio de heterocigosidad es de los más bajos (0.0004-0.014) con respecto a otras especies como el tigre, el ocelote, el leopardo, ratones, la mosca o incluso hasta el humano (Figura 2) (O'Brien *et al.*, 1987).

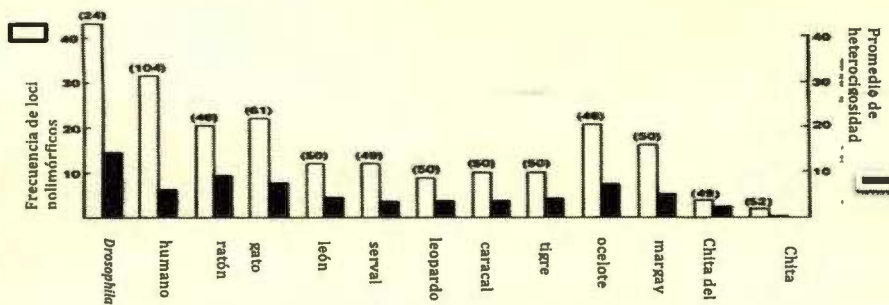


Figura 2. Variación genética de distintas especies comparado con dos subpoblaciones de Chita, donde se observa que los niveles de heterocigosidad para esta especie está muy por debajo con respecto a las demás (O'Brien *et al.*, 1987).

Sin embargo, en un artículo realizado por Amos y Balmford en el 2001 hace mención de que en el caso del chita, los bajos niveles de variabilidad genética también están relacionados con la pobre calidad espermática y el pobre éxito reproductivo en cautiverio, aunque cabe mencionar que esto no hace menos importante el deterioro y fragmentación de su hábitat un factor importante en la disminución de esta especie en vida libre (O'Brien *et al.*, 1987).

En el caso de los anfibios, la dinámica que tienden a seguir es la filopatría que es un proceso en el cual los organismos tienden a reproducirse en el lugar en donde nacieron, manteniendo un nivel de flujo génico bajo (Newman y Squire 2001).

En el 2011 Parra-Olea y colaboradores hicieron una estimación de la variabilidad genética de algunas poblaciones de *Ambystomas* (*A. rivulare*, *A. andersoni*, *A. granulosum*). Sólo en las poblaciones estudiadas de *A. altamirani* y *A. velasci*, se obtuvieron niveles altos de diversidad genética, a pesar de la destrucción de su hábitat. Con respecto a *A. andersoni* que tenía relativamente mucho más individuos que *A. mexicanum*. Se obtuvieron niveles bajos de heterocigosidad que a su vez se vio reflejado en una disminución en el "fitness" por incremento en los niveles de endogamia, convirtiéndolos en organismos propensos a la extinción. Incluso, en el 2008, Shu-Jin y colaboradores mencionaron que con un buen manejo de organismos en cautiverio aparte de servir para la educación e investigaciones, pueden ser contemplados como un reservorio genético para que las poblaciones que se encuentran en amenaza o peligro de extinción se puedan recuperar.

III. OBJETIVO

Analizar la variabilidad genética de la base reproductiva de la población de *A. mexicanum* del Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca (CIBAC). Con registro SEMARNAT DGVS-CR-IN-0952-DF/07, con el fin de proponer programas de manejo que aseguren la conservación de esta especie.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio es de tipo descriptivo, observacional donde se hizo un análisis de la estructura poblacional de los organismos reproductores del Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca, con una sola toma de muestra de tejido para la extracción de ADN que lo hace un estudio de tipo transversal.

Colecta y preservación de muestras

Se tomaron muestras de 83 individuos adultos (de los cuales 51 contaban con microchip). A cada organismo se le tomaron datos morfométricos como el peso, longitud y sexo (ver anexo 1). Posteriormente se tomó una muestra de tejido caudal (aproximadamente 100 mg) (Figura 3). La muestra se preservó en microtubos de 1.5 mL estériles y se congeló hasta su procesamiento en el Laboratorio de Microbiología Agropecuaria de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Cabe aclarar en este punto, que este procedimiento no representa riesgo para los animales dado que la zona de la cual se obtienen la muestra no está muy irrigada, por lo cual el sangrado es nulo, incluso estas membranas eventualmente se pierden con el movimiento de la cola cuando los animales nadan.



Figura 3. Extremidad caudal *A. mexicanum* (toma de muestras de tejido)

Extracción, cuantificación e integridad del DNA

La extracción se hizo de acuerdo al protocolo hecho por Sambrook (1989). El DNA obtenido se cuantificó a través de un espectrofotómetro (SmartSpec 3000), que cuenta con una lámpara de Xenón con cubetas Bio-Rad Truview, que permiten la cuantificación de ADN, ARN y proteínas, por medio de la Ley de Beer- Lambert lo cual indica que la concentración de una molécula en solución depende de la cantidad de luz absorbida de las moléculas disueltas. Una de las características del ADN es que absorbe la luz UV (ultravioleta) a 260 nm, esto nos permite estimar su concentración, mediante espectrofotometría. En este caso se realizó a una longitud de onda de 260 nm, estableciendo una concentración de 45 µg/ml para un valor de 1 de absorbancia (A_{260}). En el cuál se colocaron 1mL de TE (1mL TRIS, 0.2mL EDTA) como blanco y en otra cubeta se colocaron: 999 µl de TE (1mL TRIS, 0.2mL EDTA) y 1µl de muestra. La integridad se verificó por medio de la electroforesis en geles de agarosa al 0.8% y se corrieron a 85V, 300mA y 12W, durante 45min y fueron teñidos con bromuro de etidio a 0.5µg/ml. (Figura 4). En cada gel se destinó un carril para un marcador molecular en p.b. (Thermo Scientific Gene Ruler Express DNA Ladder

®Figura. 4). Las muestras se almacenaron a -20°C hasta el momento de ser utilizadas para la amplificación de los microsatélites.



Figura 4. Gel de agarosa al 0.8% teñido con Bromuro de Etidio donde se observa el ADN cromosomal de *A. mexicanum* de organismos reproductores

Condiciones de amplificación de microsatélites por PCR

Para el análisis de variabilidad genética se emplearon pares de loci de microsatélites descritas previamente por Parra-Olea *et al.*, (2007) y Wieczorek *et al.*, (2002) para *Ambystoma tigrinum* y *Ambystoma maculatum* respectivamente (Tabla 1). Se realizaron controles negativos durante la estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) para cada par de oligonucleótidos y para asegurar que no existiera contaminación durante la amplificación. También se realizaron controles positivos para asegurar que las condiciones de la amplificación se mantuvieran entre experimentos.

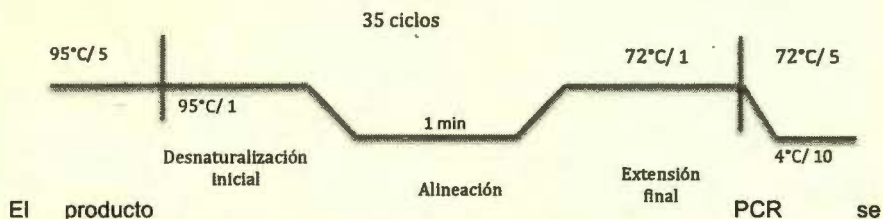
Tabla 1. Nombre, tamaño y temperatura de alineación de los iniciadores reportados para *Ambystoma tigrinum* y *Ambystoma maculatum*.

NOMBRE	SECUENCIA	TAMAÑO ESPERADO	TEMPERATURA DE ALINEACIÓN
Atig 52.143	TCAGGCATCAGATTTCGTTGTTA TGTTTGTCGGATTTCGTTGTG	309-359	57°C
At 52.1	GACACCCACAATGCATTTCTACACC GCTCTGGCCTTACCCTGCTATCC	381-465	58°C
At 60.3	TTTGCCAATGTTTACCTGCCTGAAT TGAGTCATGCCTTTCCTGGTGTA	216-297	62°C
At 52.20	TTCTCTTCCCACTTCTCGTTCTGTATT TTTCGAGGGTAAGGGTCTATTGATTC	267-341	58°C
At 52.6	TTACTCAATATCAGACTCCCCAAATGT CCTATGCCTTCCCAGACACTCC	151-163	58°C
At52.10	GGTGCAACGAGGCAGTTTTTACCTATTT GTCGCTCCTTCCCTAAGCAAGCTGAT	405-435	56°C
AmaA	CCAATCTAGTGCTCTCTCCC ACATACTCCCCTCTGCTAC	151-197	58°C
Ama2c2	GCTTTCAAGTCAACATAAAC CCTTAACCCCTCCCTTTC CCT	203-221	49°C

Se hicieron las reacciones de PCR utilizando un volumen total de 50 µl. en microtubos tipo Eppendorf de 0.5 µl libres de nucleasas. La amplificación de las

muestras se realizó en un termociclador Techne TC-312, programable con software de gradientes,. Se programó para cada una de los 8 pares de loci de microsatélites, cambiando la temperatura de alineación según el locus y de acuerdo a su longitud (Tabla 1).

Figura 5 . Condiciones para la amplificación de las 8 secuencias microsatélites en el Termociclador



El producto se visualizó en geles de agarosa al 1.2%. El primer carril se colocaron 2 µl del marcador molecular (Thermo Scientific Gene Ruler Express DNA) y en los siguientes carriles se colocan las muestras (2 µl de cada muestra y 2 µl de Buffer de carga 1x) para después tñirlo con Bromuro de Etidio al 0.5 µg/ml (Figura 6).

Analizador de fragmentos Qiaxel

Después de obtener los fragmentos esperados por medio de la técnica de PCR. Posteriormente colocamos 12 µl del producto de PCR y 1 µl de marcador (Alignment Marker 15bp-3kb QIAGEN) en tubos de 0.5 mL en el analizador de fragmentos (QIAxcel DNA Fast Analysis Kit) de Qiagen para obtener el tamaño en pares de bases (p.b.) de cada uno de los productos de manera más específica.

V. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Alelos nulos, errores de lectura y errores de amplificación

Para minimizar lecturas erróneas de los datos, con el software MICRO-CHECKER 2.2.3 (van Oosterhout *et al.*, 2004). Se verificó que no existieran errores de lectura (*stutters*), alelos no amplificados o alelos nulos (*null alleles*) y dominancia corta en los alelos (*large allele droop out*). Los parámetros que se consideraron fue un tamaño máximo esperado de un alelo de 400 pb con un intervalo de confianza de 95% y 1,000 repeticiones. Además, MICRO-CHECKER 2.2.3 corrige las frecuencias alélicas y genotípicas en caso de encontrar alelos nulos. El software calcula dichas frecuencias con base en cuatro estimadores; el análisis que mejor se ajusta a los datos es el de Brookfield 1 (Brookfield, 1996), el cuál asume que no existen homocigos con alelos nulos e ignora las muestras que no amplificaron debido a DNA degradado, errores en las lecturas o durante el PCR (Sunny *et al.*, 2014). Posteriormente con el software FREENA se realizó una corrección en los genotipos con el software FREENA y así poder saber si estas diferencias eran significativas o no entre los valores de F_{ST} .

Estructura genética

STRUCTURE versión 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000) fue utilizado así mismo para analizar la estructura genética. Utilizamos un modelo de mezcla (*admixture*), que

permite que los individuos tengan múltiples orígenes poblacionales (calculando su proporción de pertenencia a cada grupo), con un modelo de frecuencias correlacionadas (Falush *et al.*, 2003). El rango de posibles grupos (K) analizados fue de entre 1 a 8, llevando a cabo análisis independientes para verificar la consistencia de los resultados entre los diferentes análisis para cada estimación de K. La longitud de las iteraciones de MCMCs y el proceso de "burning" se fijó en 1,000,000 y 100,000 respectivamente. El valor óptimo de K se seleccionó a partir del valor máximo del logaritmo de la probabilidad posterior de los datos [$\ln \Pr(X/K)$] para un valor de K determinado. El valor más bajo de K que mejor explica la estructura poblacional se tomó como la solución más idónea (Pritchard *et al.*, 2000). Después de conocer la estructura de la población, utilizamos STRUCTURE ; Earl *et al.*, 2012) para hacer una media de la asignación de individuos a las diferentes subpoblaciones (Evanno *et al.*, 2005). Con el software POPULATIONS 1.2.32 (Langella, 2002) Se construyó un árbol de Neighbour-Joining (N-J) N-J con el estimado de distancias genéticas estandarizadas de Nei: DS (Nei, 1972) aplicando una prueba de bootstrap con 1,000 repeticiones. Con el software GENEALOX (Peakall y Smouse 2006) se realizó un análisis de componentes principales en el cual se pueden rotar los ejes para visualizar en un hiperespacio tridimensional la variación genotípica (Peakall y Smouse, 2006).

Diversidad genética

Con el software GENEPOP 3.4 (Raymond y Rousset 1995) se analizó la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg con su coeficiente de endogamia, el desequilibrio de ligamiento, las frecuencias alélicas, los genotipos observados y las distribuciones alélicas. Las pruebas de probabilidad se llevaron a cabo mediante dos métodos: 1) Cadenas de Markov para cada locus por población, utilizando los siguientes criterios del programa: 10,000 dememorizaciones, 200 *batches*, 5,000 iteraciones y con una significancia de $q < 0.001$ y 2) Método de Fisher para los loci analizados. Con el software GENEALOX 6.1 (Peakall y Smouse 2006) se estimaron y se graficaron las frecuencias de los alelos y genotipos en cada locus; también se realizó un listado de los alelos y genotipos por locus y se identificaron los alelos privados por locus y se calculó la heterocigosis observada (H_o) y la heterocigosis esperada (H_e).

Historia demográfica

Con el software ML-RELATE (Kalinowski *et al.*, 2006) se buscó la relación de parentesco entre individuos (Blouin, 2003). ML-RELATE compara la verosimilitud de una relación dada contra una hipótesis alternativa (sin relación) y la verosimilitud de que exista una relación estimable contra el valor del coeficiente de los individuos (Lynch y Walsh 1998; Blouin 2003; Buckleton *et al.*, 2005). Además, el programa establece la significancia entre cada relación, por lo que puede haber valores de r parecidos con diferentes grados de significancia. Este programa, especialmente diseñado para microsatélites, incorpora el cálculo de alelos nulos (Wagner *et al.*, 2006), para reducir el error posible (Kalinowski *et al.*, 2006).

VI. RESULTADOS

Se obtuvo DNA de todas las muestras con una buena integridad y todos los loci de microsatélites fueron polimórficos (Figura 6).



Figura 6. Gel de agarosa al 1.2 %, teñido con Bromuro de Etidio donde se observa At52.1 con tamaño esperado de 381-465 p.b., con ADN de reproductores de *A.mexicanum*.

Genotipificación

Encontramos alelos nulos en todos los loci. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los resultados de F_{ST} antes y después de la corrección obtenidos por FREENA ($t=-0.98306$, $p=0.34226$) (ver anexo 4).

Se evaluaron los 83 organismos reproductores con las ocho secuencias microsatélites. Encontramos alelos nulos en todos los loci (At52.1, At52.10, At52.6, At52.20, At60.3, Atig 52.143, Ama A, Ama2C2) con MICROCHECKER (Van Oosterhout *et al.*, 2004). Posteriormente con PAST v.3.14 se obtuvo una *t-student* ($t=-0.98306$, $p=0.34226$) por lo que la presencia de alelos no afectaría el análisis de la población (ver anexo 4).

Estructura genética

El valor de K fue de tres grupos genéticos $LnPr(k=3)=-1911.4$ (Figura 7) pero se observa que los grupos genéticos están poco diferenciados existiendo flujo génico, representados por los colores: rojo, verde y azul. Sin embargo al realizar el análisis elaborado por Evanno y colaboradores en el 2005. Se obtuvo que solo existía un grupo genético, razón por la cuál a partir de este punto, se realizaron los análisis para cada uno de estos tres grupos genéticos o poblaciones y considerando todas las muestras como un único grupo genético/ población (Figura 7).

Estructura genética (STRUCTURE)

Obtuvimos 3 grupos filogenéticos (K), los organismos reproductores están representados por barras verticales y los colores representan los 3 subgrupos genéticos (rojo, verde, azul) representando la proporción de cada subgrupo en cada uno de los individuos (Figura 7). ($LnPr(k=3)=-4,557.45$) (Figura 8). Se observa poca diferenciación entre ellos, lo que nos habla de que hay flujo genético entre los grupos filogenéticos y que hay una estructura débil, como lo muestra el AMOVA en el cuál se obtuvo una pequeña diferencia entre las poblaciones (6%) con un valor de $p=0.001$. Al realizar el análisis con STRUCTURE HARVESTER obtuvimos que la población estaba conformada por tres grupos filogenéticos (Figura 10) con una

probabilidad de confianza del 95% considerando a la población como una sola población a la hora de hacer los análisis.

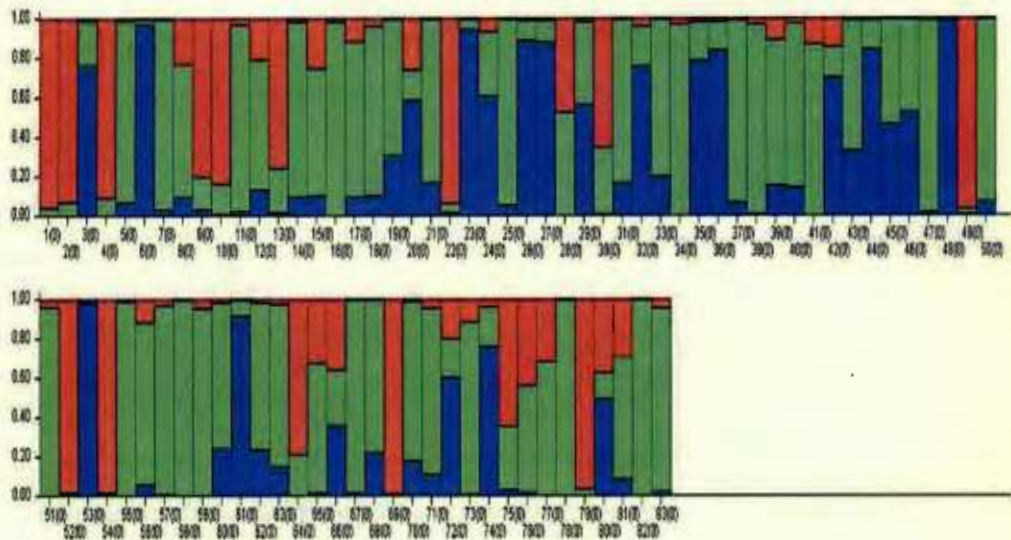


Figura 7. Estimación de la estructura genética de la población cautiva del CIBAC con 83 individuos reproductores, representados por barras verticales, divididos por subpoblaciones representadas por tres colores diferentes (K=3) usando el software STRUCTURE versión 2.3.4.

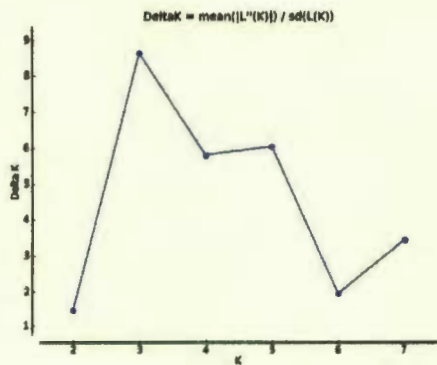


Figura 8. Resultados obtenidos con STRUCTURE HARVESTER donde se refleja que la población está conformada por tres subpoblaciones.

También se observaron 3 grupos genéticos con el análisis de componentes principales , lo que se muestra en la Figura 9.

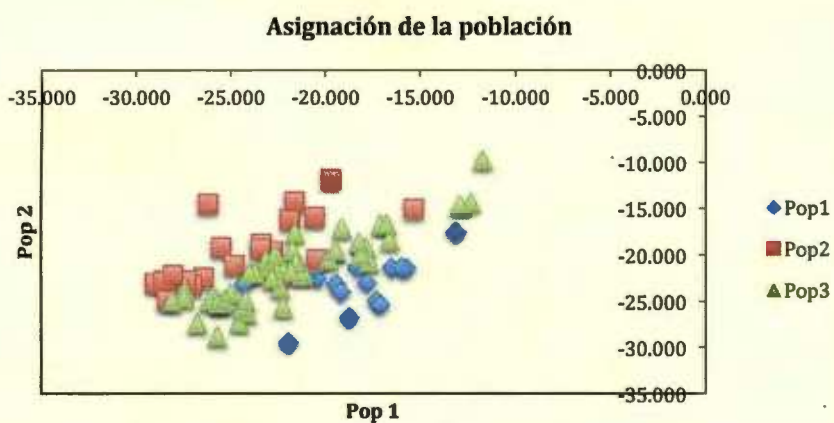


Figura 9. Análisis de componentes principales donde se observa la diferencia entre individuos de manera gráfica.

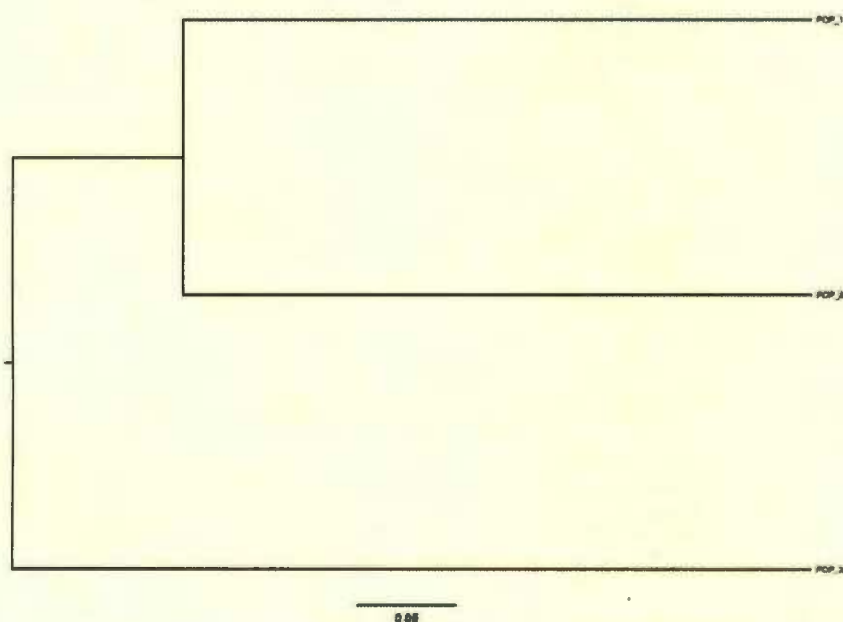


Figura 10. Construcción del árbol filogenético de la población de reproductores tomando en cuenta las tres subpoblaciones obtenidas en STRUCTURE.

Así mismo el dendograma mostró 3 grupos genéticos con el estimador de distancia genética de Nei contemplando a los 83 organismos (Figura 10).

Diversidad genética

Obtuvimos un promedio de heterocigosidad observada (H_o) de 0.308 y un promedio de 0.905 con respecto a la heterocigosidad esperada (H_e). El valor más alto tanto en H_o como en H_e lo encontramos en el locus At52.10 0.516 y 0.945 respectivamente. El valor más bajo lo encontramos en el locus At52.20 con respecto a la H_o y en cuanto a H_e el locus con menor valor lo encontramos en At52.6.

Locus	Población					
	Na	Ne	I	H_o	H_e	F
Atig52.143	14.667	11.108	2.313	0.288	0.860	0.675
At52.1	25.000	18.784	2.927	0.491	0.932	0.476
At60.3	17.333	11.220	2.492	0.143	0.882	0.842
At52.20	19.333	15.938	2.755	0.097	0.925	0.896
At52.6	12.667	7.922	2.219	0.321	0.857	0.628
At52.10	27.000	20.636	3.078	0.516	0.945	0.456
Ama2C2	15.000	9.437	2.365	0.128	0.866	0.854
AmaA	19.333	14.797	2.699	0.381	0.918	0.587
Promedio	18.792	13.730	2.606	0.296	0.898	0.677

Tabla 3. Estimación de : H_o (heterocigosidad observada), H_e (heterocigosidad esperada), N_e (tamaño efectivo de la población), N_a (número observado de alelos), F (índice de fijación) y el Índice de información (I) de 83 individuos.

El mayor número de alelos lo presentó el locus At52.1 (69), en At52.10 (64), Ama A (55), At52.20 (49), At60.3 (38), Atig 52.143 (36), Ama2C2 (32) y finalmente en el locus At 52.6 (29).

Frecuencias alélicas

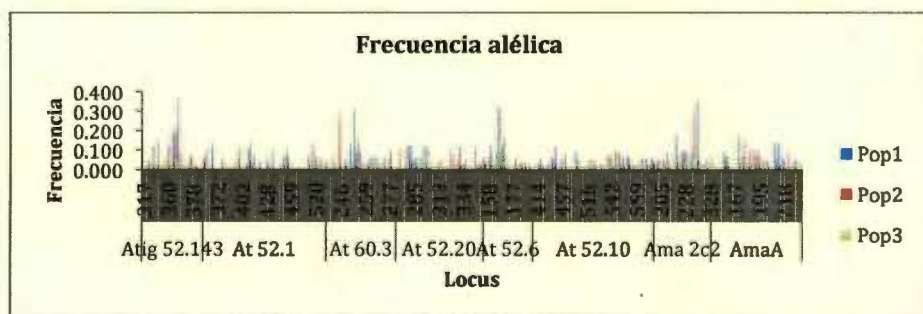
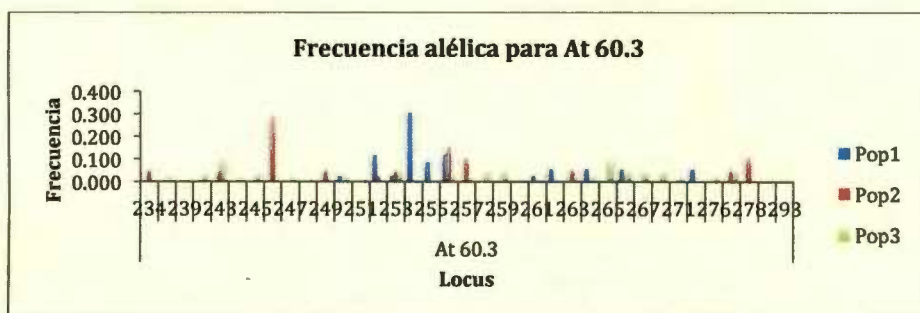
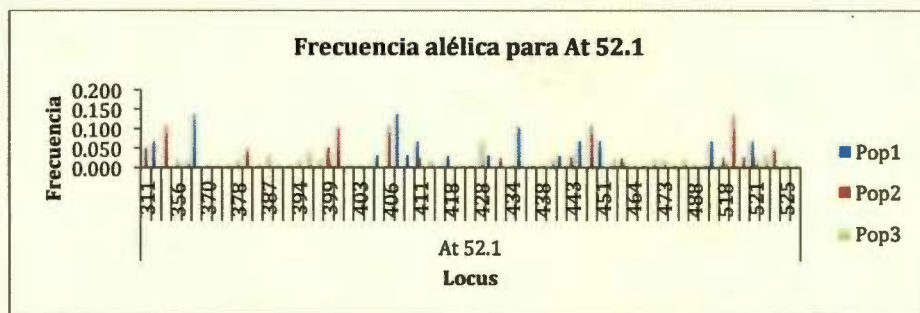
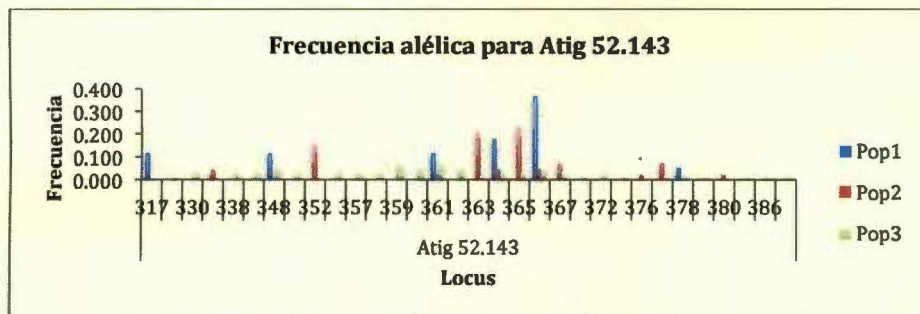


Figura 11. Frecuencia alélica de la población de reproductores tomando en cuenta los 8 loci.



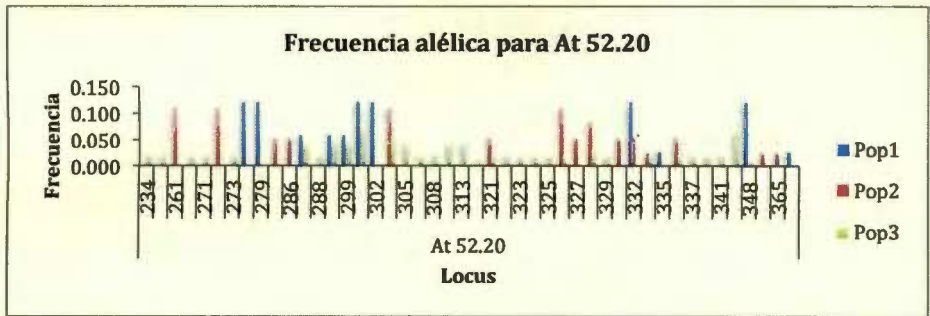


Figura 15. Frecuencia alélica del locus At52.20



Figura 16. Frecuencia alélica del locus At52.6



Figura 17. Frecuencia alélica del locus At52.10

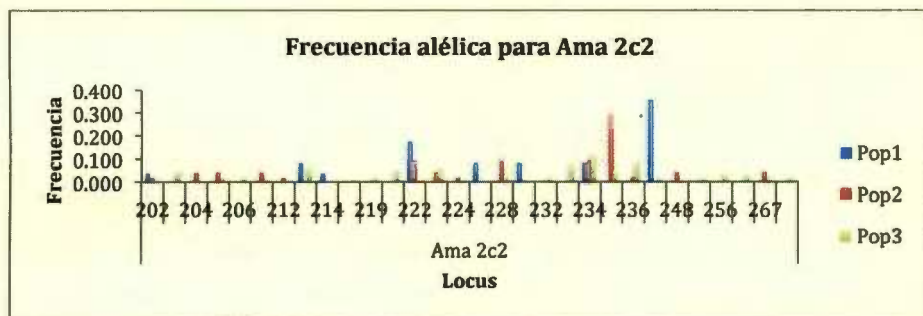


Figura 18. Frecuencia alélica del locus Ama2C2

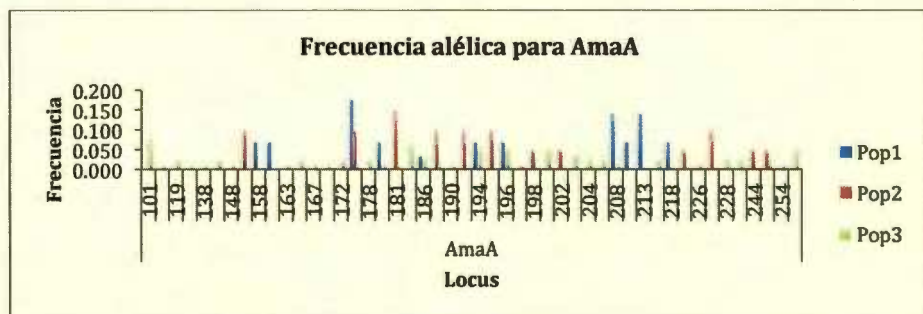


Figura 19. Frecuencia alélica del locus AmaA

Tamaño efectivo de la población

Con un valor de frecuencia alélica de 0.05 obtuvimos un $N_{eb}^* = 136.9$ y un $N_e = 66$, con el método de LD (desequilibrio de ligamento) con un 95% de confianza con N_e ESTIMATOR v.2.01 (Waples *et al.*, 2013)

Niveles de endogamia

Con respecto a los estadísticos F que fueron obtenidos a través del software GENEALOX, obtuvimos que los valores de consanguinidad fueron de moderados a bajos, con un coeficiente de variación (F_{IS}) más alto en el locus At 52.20 (0.883) con un intervalo entre 0.883-0.429, con respecto a los valores de F_{IT} oscilaron en un intervalo entre 0.471– 0.888 con el valor mas alto en el locus Ama2c2 y con el valor más bajo en el locus At52.10. Con respecto a la F_{ST} los valores obtenidos oscilaron entre 0.030- 0.073.

	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	N_m
Atig 52.143	0.665	0.690	0.075	3.069
At52.1	0.473	0.496	0.044	5.480
At60.3	0.838	0.849	0.068	3.407
At52.20	0.895	0.900	0.043	5.621
At52.6	0.626	0.639	0.037	6.480
At52.10	0.454	0.471	0.030	8.104
Ama2C2	0.852	0.862	0.072	3.209
AmaA	0.585	0.605	0.047	5.014

Tabla 2. Índices de fijación F_{IS} (coeficiente de endogamia de un individuo), F_{IT} (coeficiente de endogamia de un individuo), F_{ST} (índice de fijación), N_m

Homocigosidad observada y esperada

Los análisis con MICROCHECKER indican exceso de homocigosidad en todos los locus (Atig 52.143 ($H_e = 2.799$, $H_o = 42$), At52.1 ($H_e = 1.486$, $H_o = 34$), At60.3 ($H_e = 3.21$, $H_o = 63$), At52.20 ($H_e = 2.262$, $H_o = 73$), At52.6 ($H_e = 5.753$, $H_o = 42$), At52.10 ($H_e = 1.818$, $H_o = 35$), Ama2C2 ($H_e = 3.807$, $H_o = 61$), AmaA ($H_e = 1.643$, $H_o = 39$). Lo que sugiere que los errores de "stuttering" puede ser la causa de este resultado. Sin embargo, no hay evidencia de una pérdida de alelos grande.

VII. Discusión

Los resultados de este análisis genético para *Ambystoma mexicanum*, se convierte en el primero para esta población en cautiverio, donde utilizamos ocho loci analizados anteriormente y que han sido probados para otros *Ambystomas*. Al hacer el análisis con el software STRUCTURE obtuvimos que la población estaba conformada por tres subpoblaciones con respecto a la diversidad genética fue moderada a baja, lo que se ha convertido en valores normales hablando de poblaciones pequeñas en condiciones cautivas.

Diversidad genética

Los resultados nos mostraron una deficiencia de heterocigotos, lo cuál significa que esta población tiene una desviación en el Equilibrio de Hardy-Weiberg. Este tipo de resultados cada vez ha sido común en poblaciones aisladas, pequeñas o fragmentadas, especialmente en poblaciones de especies en peligro de extinción. Esta desviación pudo haber sido por la presencia de alelos nulos en todos los locus (Frankham et al., 2005). La presencia de alelos nulos pudo haber sido causada por diversos factores como: deriva génica, lo que puede hacer que se pierdan o se fijen algunos alelos o simplemente que no haya un control en la reproducción de estos organismos.

Por otra parte, observamos que en el locus At52.10 obtuvimos tamaños mayores (400-550) a los reportados por Parra-Olea y colaboradores en el 2007 (405-435). Sin embargo, consideramos en tomar en cuenta estos resultados ya que hay literatura que sustenta que los microsatélites pueden ser utilizados para la misma especie, aunque no es una regla encontrar estos genes en todos los individuos ni en la misma magnitud (Vázquez y Morales 2014).

En este estudio obtuvimos la presencia de alelos nulos que pudieran afectar en la estimación de la diferenciación de la población por medio de una reducción en la diversidad genética, ya que los alelos nulos se presentan cuando surgen mutaciones acompañadas del microsatélite, por lo que en ocasiones no hay amplificado y nos puede llevar a errores de genotipado (Peterman, 2012). En diversos estudios se han encontrado con la presencia de alelos nulos e incluso en todos los loci empleados, sin que estos pudieran afectar en los resultados de estudios de diversidad genética (Nguyen, *et al.*, 2014). Sin embargo, encontramos que en otro estudio realizado por Parra-Olea y colaboradores en el 2011 también encontraron alelos nulos en dos de los 9 loci que usaron (At52.10, At52.115), en 6 de las subpoblaciones y en cinco subpoblaciones respectivamente y que por lo tanto están fuera del Equilibrio Hardy-Weinberg por la deficiencia de heterocigosidad; uno de ellos también fue utilizado en este estudio (At52.10) y también se encontró la presencia de alelos nulos. Sin embargo, hicieron una corrección con el software FREENA para saber si la presencia de estos alelos nulos podrían afectar en los análisis de la población. Encontraron poca diferencia con respecto a los valores de F_{ST} (0.04) en las dos subpoblaciones estudiadas de *A. mexicanum* (Xochimilco y Chapultepec).

Por otro lado, en el 2007 Parra-Olea y colaboradores hicieron una comparación de la variabilidad genética de 154 individuos de cuatro especies diferentes, tanto paedomórficos (*A. andersoni*, *A. mexicanum*) como metamórficos (*A. granulatum*, *A. altamirani*) en el que obtuvieron niveles de $H_o = 0.088-0.864$, siendo *A. altamirani* la especie que tiene mayor nivel de H_o , mientras que el nivel más bajo, lo encontraron en la población de *A. granulatum*. Sin embargo, para la población de *A. mexicanum* obtuvieron valores de 0.045-0.591 que son valores muy cercanos a los obtenidos en este estudio (0.491). A pesar de que estos organismos fueron tomados de vida libre de los Lagos de Xochimilco y que está documentado que generalmente las poblaciones en vida libre tienen valores más altos de heterocigosidad.

Estructura genética

Obtuvimos valores de $N_e = 9.209$, $H_o = 0.233$, $H_e = 0.857$, $F_{IS} = 0.728$, $F_{IT} = 0.755$, $F_{ST} = 0.102$ y $N_m = 2.239$. En otros estudios realizados en diversos *Ambystomas* en vida libre, como el de Wiczorek y colaboradores en el 2002 para *A. maculatum*. Obtuvieron valores de heterocigosidad observada de (H_o) 0.467, mientras que en la Heterocigosidad esperada (H_e) obtuvieron: 0.664, obtenidos mediante un secuenciador de electroforesis capilar (ABI 310 Y 377).

En el 2012 Peterman y colaboradores al hacer una identificación de loci polimórficos con fluoróforos (6-FAM, VIC, NED y PET) analizados con equipo de electroforesis capilar (ABI 3730), obtuvieron un promedio de 0.515 (H_o) y 0.686 (H_e) en una especie endémica de Arkansas (*Ambystoma annulatum*). Mientras que Sunny y colaboradores en el 2014 obtuvieron un promedio de heterocigosidad observada de 0.804 y una heterocigosidad esperada de 0.626 en *Ambystoma leorae*, que también es una especie endémica y que está críticamente amenazada y que además se ha convertido en una población pequeña y aislada que la ha orillado a ser una especie en peligro de extinción, encontrando que la pérdida de alelos pudiera incrementar la endogamia de la población haciéndola susceptible a un proceso de extinción.

Aunque hay estudios que mencionan que el equipo para obtener los genotipos de la población pueden intervenir en la subestimación o sobreestimación de la diversidad genética de la población, ya sea con Qiaxcel donde en un estudio encontraron la presencia de alelos nulos en todos los locus (Nguyen *et al.*, 2015) o con secuenciador donde también hay estudios donde aun utilizando fluorescencia y secuenciador, se encontraron 8 de 11 locus con alelos nulos (Milián *et al.*, 2015), lo que sugiere que no hay gran diferencia utilizando un equipo u otro.

Conservación

En la actualidad el uso del *pedigree* y datos genéticos han sido extremadamente importantes en la ayuda de esfuerzos de conservación de especies en cautiverio de especies en peligro de extinción o amenazadas (De Salle y Amato, 2004).

En el caso de *Ambystoma mexicanum* de acuerdo al estudio de Zambrano y colaboradores en el 2003, esta especie tiene alta probabilidad de extinguirse para el año 2019. Sin embargo, en la actualidad no se han encontrado organismos en vida libre, por lo que la han colocado en el estatus de especie en peligro de extinción organizaciones tanto gubernamentales como no gubernamentales. Por lo que la población del CIBAC representa un reservorio genético que puede ser útil para la conservación de esta especie por ser un lugar que tiene el mayor número de organismos en vida cautiva.

En la actualidad los programas de reproducción en cautiverio han sido de gran importancia para la conservación de especies endémicas que se encuentran en peligro de extinción logrando una posterior reintroducción a su hábitat natural. Como el *Arabian Oryx* que es una especie endémica que redujo el tamaño de su población de manera importante, a tal grado que se encontraba en peligro de extinción y que gracias a un análisis genético y un programa de reintroducción lograron establecer de nuevo a la población en su hábitat natural y que se ha convertido en un ejemplo representativo de la conservación en cautiverio (Arif *et al.*, 2010).

VIII. CONCLUSIONES

El objetivo principal de los programas de reproducción en cautiverio es mantener los niveles de diversidad genética, tratando de minimizar los niveles de endogamia y haciendo viable a la población cautiva para que pueda haber una reintroducción en vida libre asegurando su reproducción a largo plazo (Lacy 2000).

En el caso del *Ambystoma mexicanum* es una especie endémica que se ha mantenido principalmente con reproducción en cautiverio. Los niveles de heterocigosidad de esta especie se han mantenido bajos en comparación con otras salamandras en vida libre. Sin embargo, para ser una población en vida cautiva consideramos que estos valores de heterocigosidad son suficientes para mantener a esta población cautiva, teniendo en cuenta que estos valores pueden ser incrementados si consideramos la reproducción con otras poblaciones cautivas.

La pérdida de diversidad genética en poblaciones pequeñas o aisladas puede incrementar los niveles de endogamia y disminuir el fitness así como el potencial adaptativo llevándolas a un procesos de deriva génica o endogamia (Malone *et al.*, 2003) que a su vez pueden conducir a un proceso de extinción en corto o largo plazo (Parra-Olea *et al.*, 2011). Aunque la endogamia puede reducir el fitness de una

población, este también depende en mucho de la historia de la población (Leus y Lacy 2009; Parra-Olea *et al.*, 2011), ya que la endogamia es también una acumulación gradual de individuos genéticamente cercanos, ya que hay una relación entre la heterocigosidad y la adaptabilidad de la población (Reed y Frankham 2003).

Sin embargo, en poblaciones en vida libre es necesario el mantener un tamaño suficiente para la retención de diversidad genética y minimizar el riesgo de extinción (Reed y Frankham 2003).

Con respecto a los valores de promedio de los alelos, el problema no es la existencia de alelos deletéreos en poblaciones cautivas, pero si los efectos que puedan haber en la población a causa de la presencia de estos, principalmente por el incremento de homocigotos en la reproducción de los organismos (Lacy 2000). Si bien, el incremento en los niveles de homocigosidad han reducido la variabilidad genética de algunas poblaciones, en algunas provocando incluso malformaciones. Las malformaciones no siempre son provocadas por cuestión de endogamia, sino también intervienen los cambios en el ambiente (Williams *et al.*, 2008).

A pesar de que el *Ambystoma mexicanum* ha sufrido una drástica reducción en el tamaño de su población, hay otras poblaciones de *Ambystomas* como el *A. andersoni* que aunque tiene mayor número de individuos, también muestran una diversidad y heterocigosidad baja como el *A. mexicanum* que ha reducido el número de organismos de manera drástica (Parra-Olea *et al.*, 2011).

Lo que sugiere que no solo *Ambystoma mexicanum* que es un claro ejemplo de las especies endémicas que se han visto afectadas por actividades antropogénicas. En general los anfibios que son un bioindicador de la calidad del ambiente y en especial los *Ambystomas* son poblaciones que han sufrido una disminución importante en el tamaño de su población por la contaminación a causa de actividades del hombre. Principalmente por la acidificación de su ambiente que afecta en la viabilidad de los organismos juveniles (Beebee, 2005). El hábitat de estos organismos se ha fragmentado y en algunas ocasiones destruido, del tal forma que se han convertido en poblaciones pequeñas o aisladas, provocando una disminución en el fitness y diversidad genética, lo que los convierte en organismos mayormente vulnerables a parásitos u otros organismos como *chytridiomycosis* que es común en anfibios (Malone *et al.*, 2003). La disminución y extinción de anfibios representa una llamada urgente para entender la calidad del medio ambiente en el que habitamos y las causas de su deterioro (Sá, 2005).

Creemos que poblaciones como la del *Ambystoma mexicanum* se puede maximizar, dándole prioridad a los individuos con valores bajos de m_k , tratando de equilibrar el tamaño de individuos con m_k similares disminuyendo los niveles de endogamia. Los individuos que son criados en cautiverio son más aptos para una reintroducción, estos deben estar representados en cautiverio por lo que los debemos de seleccionar cuidadosamente las reproducciones de estos organismos, ya que estos organismos van a tener la tarea de mejorar y mantener la diversidad genética en vida libre.

Aunque en este estudio, se hayan obtenido valores bajos de heterocigosidad observada utilizando Qiaxcel, también se han obtenido niveles bajos en otros estudios como el de Nguyen y colaboradores en el 2015 y creemos que uno de los factores que pudieron intervenir fue la definición del equipo (Qiaxcel) que tiene un margen de error de 1 a 5p.b. (Wang *et al.*, 2009) Sin embargo, en otros estudios

realizados en *Ambystomas*, se han utilizado otros equipos como la electroforesis capilar y se han obtenido valores muy similares a los obtenidos en este estudio. Por lo que creemos que hay diversos factores que intervienen en la disminución de la heterocigosidad, la reducción del fitness de la población así como la disminución de la diversidad genética debido a la pérdida de su hábitat por actividades antropogénicas como la contaminación. Como es en el caso del *A. mexicanum* (Parra-Olea *et al.*, 2011) que ha provocado que las poblaciones sean aún más vulnerables a la extinción (Frankham 1987, 1998; Malone *et al.*, 2003). Por lo que en un trabajo futuro se propone hacer la comparación de los tamaños obtenidos con las mismas secuencias microsatélites utilizando otros equipos.

Los resultados obtenidos fueron altos niveles en la homocigosidad de la población, lo que refleja un proceso de endogamia, pero consideramos que en un futuro estos organismos aún pueden mantenerse en buen camino si se lleva un buen control en la reproducción y se mantiene la diversidad genética. Si bien, la diversidad genética se va perdiendo a través de las generaciones, una gran ventaja de estos organismos es el número de huevos por puesta, pues llegan a tener hasta seiscientos huevos con información genética de dos a ocho machos (Myers y Zamudio, 2004). Lo que hace que los procesos génicos como la endogamia se vean reflejados en la población en un período mayor de tiempo.

Para que pueda haber una reintroducción en un futuro del ajolote de Xochimilco a vida libre creemos que es indispensable tener un buen control biológico, así como de un estudio de los cambios ambientales de este sitio, así como mantener una variación genética y fitness reproductivo en cautiverio que esté representado en vida libre, para que en un futuro pueda ser el soporte de la población y se pueda asegurar la reproducción de estos organismos.

IX. LITERATURA CITADA

- Amos W, Balmford A 2001 When does Conservation Genetics matter?. Heredity. The Genetics society of Great Britain.87:257-265.
- Aranguren-Méndez J, Román R , Isea W, Villasmil Y, Jordana J 2005 Los microsatélites (STR's), Marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. Asociación Latinoamericana Producción Animal.13 .1:1-6.
- Arif I, Khan H., Shobrak M., Homaidan A, Sadoon M y Farhan A 2010 Measuring the genetic Diversity of Arabian Oryx using microsatellite markers: implication for captive breeding. Genes.85.141-145.
- Alcaraz G, López-Portela X, Robles- Mendoza C 2015 Response of a native endangered axolotl, *Ambystoma mexicanum* (Amphibia), to exotic fish predator. Hydrobiologia.753:73-80.
- Allendorf F 1996 The one migrant per generation rule in Conservation and management. En: Conservation Biology. 10:6: 1509-1518.
- Allendorf F, Hohenlohe P y Luikart G 2010 Genomics and the future of Conservation genetics. En: Nature Reviews. Genetics.11
- Beebee T 2005 Conservation genetics of amphibians, Nature, Heredity.95:423-427.
- Blouin MS 2003 DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. Trends in Ecology and Evolution. 18. 503-511.
- Brookfield J 1996 A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. Molecular Ecology. 5. 453-455.
- Buckleton J, Trigos C, Walsh S 2005 Forensic DNA evidence interpretation CRC Press Boca Ratón Florida.
- Carranza S 2008 Los métodos moleculares en el estudio de la sistemática y filogenia de los anfibios y reptiles Ibéricos. Atlas y libro rojo de los anfibios y reptiles de España.
- Charlesworth B 2009 Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. En: Fundamental concepts in genetics. Nature Reviews. 10
- Charlesworth B 2009 The genetics of inbreeding depression, En: Fundamental concepts in genetics. Nature Reviews. 10.
- Christie M, Marine M, French R. y Blouin M 2012 Genetic adaptation to captivity can occur in a single generation. PNAS. 109. 1
- CONABIO 2011 Fichas de especies prioritarias. Ajolote Mexicano (*Ambystoma mexicanum*) Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México D.F.
- Contreras V, Martínez- Meyer E, Valiente E, Zambrano L 2009 Recent decline and

potential distribution in the last remnant area of the microendemic Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Biological Conservation*. 142: 2881-2885.

De Salle R, Amato G 2004 The expansion of Conservation genetics, *Nature, Genetics*. 5: 705-712.

Dutta T, Sharma S, Maldonado J, Wood T, Panwar H, Seidensticker J 2013 Fine-scale population genetic structure in a wide-ranging carnivore, the leopard (*Panthera pardus fusca*) in central India. *Diversity and Contributions*.19: 760-771.

Earl D, VonHoldt, Bridgett M 2012 STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*.4.2.:359-361.

Eguiarte L, Souza V, Aguirre X 2007 Ecología molecular, Herramientas moleculares. Breve Revisión de los marcadores moleculares. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. UNAM.542-557

Evanno G, Regnaut S, Goudet J 2005 Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14: 2611-2620.

Falush D, Stephens M, Pritchard J 2003 Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567-1587.

Frankham R 2003 Inbreeding and extinction: island populations. *Conservation Biology* 12:pp. 665-675

Frankham R 2007 Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular Ecology*.17: 325-333

Frankham R 2009 Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genetics Research* 66. 95-107

Frankham R, Ballou J, Briscoe D 2005 Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge

Frankham R 2016 Conservation genetics. *Annual review of genetics*. 29:305-327

Fredrickson R, Siminski P, Woolf M, Hedrick P 2007 Genetic rescue and inbreeding depression in Mexican wolves. *Proceedings of the Royal society*.274: 2365-2371

Griffits R y Pavajeau L 2008 Captive breeding, reintroduction and the Conservation of amphibians. *Conservation Biology*.22: 4: 852-861

Haag T, Santos A, Sana D, Morato R, Cullen L Jr, Crawshaw Jr, De Angelo, C, Di Bitetti S, Salzano M y Eizirik E 2010 The effect of hábitat fragmentation on the genetic structure of a top predator: loss of diversity and high differentiation

among remnant populations of Atlantic Forest jaguars (*Panthera onca*). Molecular Ecology. 19:4906-4921.

Hajeer A, Worthington J, John S 2000 SNP and microsatellite genotyping: Markers for genetic analysis. En: Biotechniques: Molecular laboratory methods series. Eaton Publishing, Manchester, U.K.

Hamilton M 2009 Genetics population. Library of Congress Cataloguing in Publication Data ISBN 978-1-4051-3277-0

Hedrick P 2005 Genetics of populations. Jones and Bartlett, Sudbury

Hedrick P, Fredrickson R 2009 Genetic rescue guidelines with examples from Mexican wolves and Florida panthers. Conservation Genetics

Hedrick P, Miller P 2016 Conservation genetics: techniques and fundamentals. Ecological applications.2:1:30-46

Ivy J, Lacy R 2012 A comparison of strategies for selecting breeding pairs to maximize genetic diversity retention in managed population. En: Journal of Heredity 103.2. 186-196

IUCN (World Conservation Union) 2010 Lista roja de especies en peligro de extinción, IUCN, disponible en: <http://iucnredlist.org>

Gascon C, Collins P, Moore D, Church R, McKay E. y Mendelson, R. III 2007 *Amphibian Conservation Action Plan*. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 64.

Griffits R y Pavajeau L 2008 Captive breeding, reintroduction and the Conservation of amphibians. Conservation Biology.22: 4: 852-861

Jehle R, Arntzen J 2002 Microsatellite markers in amphibian conservation genetics. Herpetology Journal 12:1-9.

Jehle R, Wilson G, Arntzen J, Burke T 2005 Contemporary gene flow and the spatio-temporal genetic structure of subdivided newt populations (*Triturus cristatus*, *T. marmoratus*). Journal Evolutionary Biology. 18:619-628.

Kalinowski S, Wagner A, Taper M 2006 ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. Molecular Ecology Notes. 6:576-579.

Lacy R 2000 Should we select genetic alleles in our conservation breeding programs?. Zoo Biology.19: 279-282.

Langella O 2002 Populations 1230 1999 Olivier Langella CNRS-UPR9034. Disponible en: <http://bioinformatics.org/tryphon/populations/>

Leberg P, Brigitte F 2008 Role of inbreeding depression and purging in captive breeding and restoration programmes, En: Molecular Ecology.17. 334-343.

- Leus K, Lacy R 2009 Genetic and demographic management of Conservation breeding programmes oriented towards reintroduction. En: Conservation Ex situ del Lince Ibérico: un enfoque multidisciplinario *Iberian Lynx Ex situ Conservation: An: Interdisciplinary Approach*, IUCN, Fundación Biodiversidad.
- Luo S, Johnson E, Martenson J, Antunes A, Martelli P, Uphyrkina O, Taylor- Holzer K, Smith J, O'Brien J 2008 Subspecies genetic assignments of worldwide captive tigers increase Conservation value of captive populations. *Current Biology*.18. 592-596.
- Lynch M, Walsh B 1998 Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer Associates Sunderland Massachussets.
- Malone C, Knapp C, Taylor J y Davis S 2003 Genetic consequences of Pleistocene fragmentation: Isolation, drift, and loss of diversity in rock iguanas (*Cyclura*). *Conservation genetics*.4:1-15
- Milián Y, Ramos R, Pérez E, Sosa G, Guerra L, Alonso M, Espinosa G, Russello M 2015 Genetic evidence of hybridization between the critically endangered Cuban crocodile and the American crocodile: implications for population history and in situ/ ex situ conservation. *Heredity*. 114: 272-280.
- Mondragón J, Rojas L, Juárez A, Gutierrez, E 2011 La lombricultura y la producción agropecuaria en el ambiente, En: Instituto de Investigaciones agropecuarias y forestales. 1-20.p.p.
- Montgomery M, Ballou J, Nurthen R, England P, Briscoe D, Frankham R 1997 Minimizing kinship in captive breeding programs. *Zoo Biology*.16: 377-389.
- Myers E y Zamudio R 2004 Multiple paternity in an aggregate breeding amphibian: the effect of reproductive skew on estimates of male reproductive success. *Molecular Ecology*.13: 1951-1963.
- Nguyen H, Liu Q, Zhao L, Zhang H, Liu J 2015 Genetic diversity of the cultured giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in China base don microsatellite. *Biochemical systematics and Ecology*. 59: 144-154.
- Newman R y Squire T 2001 Microsatellite variation and fine- scale population structure in the Wood frog (*Rana sylvatica*). *Molecular Ecology*.10:5.1087-1100.
- O'Brien S, Wildt D, Bush M, Caro T, Fitzgibbon C, Agundey I, Leakey R 1987 East African cheetahs: evidence for two population bottlenecks?. *Genetics*. 84: 508-511
- Parra-Olea G, Recuero E, Zamudio KR 2007 Polymorphic microsatellite markers for Mexican salamanders of the genus *Ambystoma*. *Molecular Ecology Notes* 7:818-820.
- Peakall R, Smouse PE 2006 GENALEX 6: genetic analysis in Excel Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6:288-

- Peterman W, Connette G, Spatola B, Eggert L y Raymond S 2012 Identification of polymorphic loci in *Ambystoma annulatum* and review of cross-species microsatellite use.3: 570-577.
- Piñero D 2008 La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. *Capital natural de México I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. CONABIO, México.415-435.
- Pritchard J, Stephens M, Donnelly P 2000 Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959 .
- Raymond M, Rousset F 1995 GENEPOP v 12: population genetics software for exact test and ecumenicism *Journal of Heredity*, 86, 248-249.
- Reed D, Frankham 2003 Correlation between fitness and genetic diversity En: *Conservation Biology*. 17.1. 230-237.
- Rojas F, Murillo O, Araya E, Aguilar G y Rocha O 2007 Validación y adaptación de la técnica de microsatélites para el análisis genético de *Vochysia guatemalensis* Donn. SM. Red de revistas científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal.9.1. Foresta Veracruzana 1-8.
- Romero A, Serrato A, Rendón B, Rocha M 2014 Herramientas moleculares aplicadas en Ecología: Aspectos teóricos y prácticos. Secretaría del medio ambiente y recursos Naturales (SEMARNAT). Instituto Nacional de Ecología y cambio Climático (INECC) y Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa UAM-I.
- Roques S, Sollman R, Jácomo A, Tôrres N, Silveira L, Chávez C, Keller c, Mello do Prado D, Carignano P, Jorge dos Santos C, Bernardes X, Magnusson w, Godoy j, Ceballos G, Palomares F, 2015, Effects of habitat deterioration on the population genetics and conservation of the jaguar. *Conservation genetics*.
- Sá R 2005 Crisis global de biodiversidad: importancia de la diversidad genética y la extinción de anfibios. 9:2. 513-522.
- SEMARNAT 2010 Norma Oficial Mexicana NOM-059- SEMAR- NAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres- Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación
- Sambrook J, Russell WD 2001 Molecular cloning: a laboratory manual 2: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor 47–53
- Shen F, Zhang Z , He W, Yue B, Zhang A, Zhang L, Hou R, Wang C, Watanabe T 2009 Microsatellite variability reveals the necessity for genetic input from wild giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) into the captive population. *Molecular Ecology* 18.
- Shu- Ju L, Johnson W, Martenson J, Antunes A, Martelli P, Uphyrkina O, Traylor-

- Holzer K, Smith J y Brien S 2008 Subspecies genetic Assignments of Worldwide Captive Tigers Increase Conservation Value of captive populations. *Current Biology* 18: 592-596
- Stuart S, Chanson J, Cox N., Young B., Rodrigues A, Fischman D, Waller 2004 Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*.1-5.
- Sunny A, Monroy-Vilchis O, Fajardo V, Aguilera-Reyes 2014 Genetic diversity and structure of an endemic and critically endangered stream river salamander (Caudata: *Ambystoma leorae*) in Mexico. *Conservation genetics*. 15:49-59.
- Templeton A, Read B 1994 Inbreeding: One word several meanings much confusion. Loeschcke, Tomiuk VJ, Jain SK. *Conservation Genetics*.91–105.
- Tzika A, Rosa S, Fabiani A, Snell H, Snell H, Marquez C, Tapia W, Rassmann K, Gentile G y Milinkovitch M 2008 Population genetics of Galápagos land iguana (*genus Conolophus*) remnant populations. *Molecular Ecology*.17: 4943-4952.
- Valiente, E 2006 Efecto de las especies introducidas en Xochimilco para la rehabilitación del hábitat del ajolote (*Ambystoma mexicanum*), Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Van Oosterhout C, Hutchinson W, Wills D, Shipley P 2004 MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *En: Molecular Ecology*.4: 535-538 .
- Vázquez A, Morales A 2014 Microsatélites. Herramientas moleculares aplicadas en Ecología. 70-275.
- Vilà C, Sundqvist A, Flagstad O, Seddon J, Björnerfeldt S, Kojola I, Casulli A, Sand H, Wabakken P y Ellegren 2003 Rescue of a severely bottlenecked Wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Biological Sciences Royal Society London* 270.91-97.
- Voss S, Shaffer B, 1997 Adaptive Evolution via a major gene effect: Paedomorphosis in the mexican axolotl, *National Academy of Sciences*.94. 14185-14189
- Voss S, Kump D, Putta S, Pauly N, Reynolds A, Henry R, Basa S, Walker J, Smith J 2011 Origin of amphibian and avian chromosomes by fission, fusión, and retention of ancestral chromosomes. *Genome research*. 21:8. 1306-1312.
- Wagner A, Creel S, Kalinowski S 2006 Estimating relatedness and relationship using microsatellite loci with null alleles. *Heredity*.93. 504-509.
- Wang I 2009 Fine-scale population structure in a desert amphibian: landscape genetics of the black toad (*Bufo exsul*). *Molecular Ecology* 18:3847–3856.
- Wang J, Savage W, Shaffer H 2009 Landscape genetics and least-cost path analysis reveal unexpected dispersal routes in the California tiger salamander (*Ambystoma californiense*). *Molecular Ecology*.18:1365–1374.

- Wang X, Rinehart T, Wadl P, Spiers J, Hadziabdic D, Windham M y Trigiano R 2009 A new electrophoresis technique to separate microsatellite alleles. *African Journal of Biotechnology*. 8.11.2432-2436.
- Wang J, Summers K 2010 Genetic structure is correlated with phenotypic divergence rather than geographic isolation in the highly polymorphic strawberry poison-dart frog. *Molecular Ecology*. 19: 447-458.
- Waples RS 2006 A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conservation Genetics*. 7:167-184.
- Waples R, Peel D, Macbeth G, Tillet B y Ovenden J 2013 NeEstimator V2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Resources*. 14.1.209-214.
- Wieczorek A, Zamudio R, King T y Gjetvåg J 2002 Isolation of microsatellite loci in spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*). *Molecular Ecology*. 2: 313-315.
- Williams R, Bos D, Gopurenko D y DeWoody A 2008 Amphibian malformations and inbreeding. *Biology Letters*. 4: 549-552.
- Williams R, DeWoody A 2004 Fluorescent dUTP helps characterize 10 novel tetranucleotide microsatellites from an enriched salamander (*Ambystoma texanum*) genomic library. *Molecular Ecology*. 4: 17-19.
- Willoughby J, Fernández N, Lamb M, Ivy J, Lacy R, DeWoody A 2015 The impacts of inbreeding, drift and selection on genetic diversity in captive breeding populations. *Molecular Ecology*. 24: 98-110.
- Wright S 1951 The genetical structure of populations. *Evolution*. 15.323-354.
- Young B, Lips K, Reaser J, Ibañez R, Salas A, Cedeño R, Coloma L, Ron S, La Marca E, Meyer J, Muñoz A, Bolaños F, Chaves G, Romo D 2001 *Conservation Biology*. 15. 1213-1223.
- Zambrano González L, Reynoso H y Herrera 2003 Abundancia y estructura poblacional del axolotl (*Ambystoma mexicanum*) en los sistemas dulceacuícolas de Xochimilco y Chalco. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. Informe final SNIB- CONABIO proyecto No. AS004
- Zambrano L, Martínez-Meyer E, Menezes N y Townsend P 2004 Invasive potential of common carp (*Cyprinus carpio*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in American fresh water systems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 63.1903-1910.
- Zamudio K, Wieczorek A 2007 Fine-scale spatial genetic structure and dispersal among spotted salamander (*Ambystoma maculatum*) breeding populations. *Molecular Ecology*. 16: 257-274.

ANEXOS

Anexo 1

ím.	núm. de identificaci ón	sex o	talla	talla 1	talla 2	color	ecto pará sitos
1	75067869	H	89.37	21.5	12	pardo	NO
2	75053054	H	90.2	21	12	pardo	NO
3	75050300	H	175	27.5	14.5	pardo	NO
4	75071855	H	120	22	12.5	pardo obscuro	NO
5	75091325	H	100	22	11.5	pardo obscuro	NO
6	75062887	H	61	19	10.5	pardo obscuro	NO
7	75093528	H	98	21.5	12	pardo obscuro	NO
8	75073781	M	82.65	23	12	pardo obscuro	NO
9	74808517	H	89.5	20	11	pardo obscuro	NO
0	75081578	M	74.1	21	11	pardo obscuro	NO
1	75050379	H	70.8	20	11	pardo obscuro	NO
2	75096841	M	108.1	26	13	pardo obscuro	NO
3	75096067	H	71.2	22	12	pardo obscuro	NO
4	75050853	M	83.2	22	12.5	pardo obscuro	NO
5	75079287	M	96.1	24	12.5	pardo (jaspeado)	NO
6	75073564	M	82	21.5	11	pardo obscuro	SI
7	75080554	M	92	22	11.5	pardo obscuro	NO
8	75060527	H	95.6	24	12	pardo obscuro	NO
9	75090621	H	103	24.5	12.5	pardo obscuro	NO
0	74797768	H	96.6	22.5	12	pardo obscuro	NO
1	75095515	H	77	21.5	11.5	pardo obscuro	NO
2	34451450A	H	57.05	18	10	pardo	NO
3	57565799	H	34.8	15	8	verde	NO
4	75053526	M	54.4	18.5	10	pardo jaspeado	NO
5	33555486A	M	48.2	20	10	pardo	NO
6	33621311A	M	74.5	21	11	pardo	NO
7	57567778	H	37.5	14	9.5	pardo	NO
8	36513673A	M	53.4	18	10.5	pardo	NO
9	134624465A	H	55.8	17.5	9.5	pardo	NO
0	57552594	M	42.7	17.5	9.5	pardo	NO
1	50580316	H	54.3	17.5	10	pardo	NO
2	75053526	M	44.1	18	10	pardo	NO
3	75067869	M	84.9	20.5	11.5	pardo	NO
4	57565799	M	59	19	10.5	pardo	NO
5	134455230A	M	81.2	19.5	10.5	pardo	NO
6		M	47.2	17.5	10	pardo	NO
7		M	53.5	18	10	pardo	NO
8		H	61	18.5	10	jaspeado	NO
9		M	27	15	9	pardo	NO
0	57550098	M	49	15	8.5	pardo	NO
1		M	44.4	18	9.5	jaspeado	NO

12		M	70	20	11	pardo	NO
13	75053526	M	70	19.5	11	jaspeado	NO
14		M	54.5	18	10.5	pardo	NO
15		M	66	20	10.5	pardo	NO
16		M	53.4	18.5	10	pardo	NO
17		M	56.5	18	10	pardo	NO
18		H	62	19.5	10.5	pardo	NO
19	57575103	H	57.3	17.5	10	pardo	NO
20	57568002	H	44.7	17.5	9.5	pardo	NO
21	57560039	M	80	19	11	jaspeado	NO
22	1133557124	H	34.8	15.5	8.5	pardo	NO
23		H	56.5	17.5	9.5	pardo	NO
24		H	58.8	18	9.5	pardo	NO
25	57574888	M	72	19.5	11	jaspeado	NO
26	57567778	M	45.8	17.5	9.5	pardo	NO
27	57579331	M	63.3	20	11	negro	NO
28		H	55.4	17.5	10	pardo jaspeado	NO
29		H	46	17	10	verde	NO
30	1336213114	H	66	19.5	11	pardo obscuro	NO
31		H	61	18	10	pardo	NO
32		M	53	18.5	10	pardo	NO
33		M	34	16.5	9.5	pardo	NO
34		H	67	18.5	10.5	pardo	NO
35	57552372	H	54	17.5	10.5	pardo	NO
36	57571366	M	71	21	12	pardo	NO
37		H	46	18	9.5	verde	NO
38	57560613	M	70	19.5	11	pardo	NO
39		M	52	18.5	10	pardo	NO
40	57556888	H	47	18	9.5	verde	NO
41		H	67	19	10.5	pardo	NO
42		H	53	18	10.5	pardo	NO
43		H	60	18.5	9	pardo	NO
44		M	73	20	9.5	pardo	NO
45	57553360	H	51	18	9.5	pardo	NO
46		H	82	19.5	11	verde	NO
47	57552594	H	54	19.5	10.5	pardo	NO
48	133555486A	M	59	19.5	11	pardo	NO
49	57568531	H	46	17	9.5	pardo claro	NO
50		H	56	18.5	10.5	verde	NO
51	134513673A	H	57	19	10.5	pardo obscuro	NO
52		H	43	18	10	pardo obscuro	NO
53		M	47	16.5	10	pardo	NO

ANEXO 2

Title line:"8 microsajolotesMariana"

Atig52.143a

At52.1a

At60.3a

At52.20a

At52.6a

At52.10a

Ama2C2a

AmaAa

Pop

pop1, 361361 000000 254254 348348 169169 488526 000000 158158

pop1, 000000 435435 266266 335367 166166 488488 245245 000000

pop1, 365365 432521 246246 354365 166166 545563 223223 191191

pop1, 364378 446524 254254 302302 157169 547565 000000 180212

pop1, 364378 438521 268268 303315 167167 544562 203216 238238

pop1, 363377 406406 246246 326326 167182 434522 235235 000000

pop1, 372387 000000 277277 346346 168192 541559 236236 104123

pop1, 364379 393399 256256 300300 165165 546563 249249 196200

pop1, 364379 441521 254254 299299 000000 576576 234234 176176

pop1, 372372 408408 255255 287287 167167 548565 222222 208218

pop1, 000000 461521 265265 236236 163163 542559 203203 196196

pop1, 363377 531554 264264 299299 000000 520520 213224 208254

pop1, 000000 410435 256256 279279 166166 421519 202214 208208

pop1, 000000 467522 263263 361361 163163 546563 328328 257257

pop1, 359359 443443 266266 300300 167167 453470 322322 000000

pop1, 000000 488526 265265 287287 164178 521521 256256 148167
pop1, 000000 434522 242253 300300 168168 542559 205205 182216
pop1, 365365 000000 000000 309309 166166 539557 234234 194194
pop1, 330330 397397 277277 308337 000000 518518 236236 000000
pop1, 363377 461523 253253 332332 168168 552552 235235 253253
pop1, 000000 421519 247247 305305 163176 546564 236236 247247
pop1, 366366 000000 275275 289289 166166 549549 245245 176186
pop1, 363363 400519 249249 261261 169169 543543 228228 181198
pop1, 363376 311311 278278 328334 166179 541558 222222 000000
pop1, 000000 404428 000000 303303 181192 504529 221221 166166
pop1, 366366 400518 277277 285285 167181 467522 235235 181181
pop1, 365380 399519 256256 331331 167167 467467 248248 000000
pop1, 361361 394394 258258 334348 164164 402414 263263 000000
pop1, 363377 501526 246246 327327 167167 520520 211211 247266
pop1, 364378 326326 264264 278278 162162 547563 213213 248248
pop1, 000000 497525 259259 346346 167167 550566 235235 000000
pop1, 352352 400519 263263 354367 165165 542542 234234 195195
pop1, 348362 428428 257257 323323 000000 542560 253253 000000
pop1, 371371 000000 267267 313313 165188 527520 203221 203203
pop1, 361367 406406 246246 321321 166190 545563 224236 246246
pop1, 364364 399519 246246 328328 167167 541541 204204 188188
pop1, 375375 399518 242242 289289 164177 543561 233233 178178
pop1, 349349 464523 000000 273273 162162 546546 233233 180188
pop1, 366366 397397 000000 324324 000000 546546 000000 190203
pop1, 359359 478525 276276 328328 163163 479479 000000 000000
pop1, 361361 443522 267267 234234 166180 544561 206206 194194

pop1, 365356 443523 278278 286286 168168 519519 235235 227227
pop1, 329366 402402 265265 265265 167167 469469 223223 000000
pop1, 365365 380380 256256 303303 170170 545562 202212 000000
pop1, 357357 417417 265265 321321 171171 545562 000000 172172
pop1, 365365 411411 243243 272272 159159 551567 234234 244249
pop1, 372372 398420 290293 288288 000000 544562 000000 249249
pop1, 363363 400400 257257 000000 166179 545562 205205 258258
pop1, 000000 418521 254254 332332 168168 441521 245245 176276
pop1, 367367 436521 268268 244244 167181 503527 223234 204204
pop1, 370384 370384 253253 322322 170184 443523 236236 182182
pop1, 366366 366366 262262 302302 000000 447447 245245 194194
pop1, 352352 352352 257257 326326 000000 551551 228228 176176
pop1, 366366 366366 252252 348348 166166 542542 222222 160160
pop1, 000000 373387 259259 346346 169169 501527 213213 186200
pop1, 000000 389399 266266 329329 167181 546563 234234 176186
pop1, 372387 372387 243254 325325 169169 438521 236248 101101
pop1, 000000 387398 000000 306306 172172 454454 256263 228228
pop1, 378378 378378 245245 313313 169169 501526 211211 138168
pop1, 356362 356362 251261 303303 166166 490490 213213 101119
pop1, 352352 352352 000000 272272 000000 000000 235235 202221
pop1, 356362 356362 248262 326326 169169 516516 234234 101119
pop1, 348348 000000 243250 361361 000000 546562 223223 206206
pop1, 317317 408408 250255 300300 162169 547563 229229 180212
pop1, 000000 000000 244244 287287 166178 000000 000000 197200
pop1, 000000 411411 253261 300300 165165 552552 225225 213213
pop1, 000000 000000 243253 309309 181184 558558 233233 101101

pop1, 360360 000000 237237 308337 170170 504529 235235 145145
pop1, 000000 499499 252252 332332 000000 451451 000000 208218
pop1, 376376 000000 243243 305305 178185 443522 000000 000000
pop1, 338338 473473 243250 289289 178186 550566 228228 257257
pop1, 336336 000000 256256 261261 000000 449449 222222 000000
pop1, 371386 480480 245256 328334 162175 400519 232232 182216
pop1, 000000 449449 234234 303303 156156 490490 235235 157157
pop1, 348348 451451 256256 278278 000000 431431 000000 196196
pop1, 387387 439439 000000 336336 000000 483483 245245 000000
pop1, 398398 416416 258258 341341 166178 459459 000000 000000
pop1, 345345 428428 258258 338338 000000 436436 234234 182226
pop1, 378378 405429 254254 279279 168186 451451 000000 213213
pop1, 367367 449449 246252 336336 167167 457457 267267 252252
pop1, 372385 471471 243243 299299 166166 000000 219219 163181
pop1, 358358 459459 239260 271271 000000 478525 000000 000000
pop1, 360374 403428 271271 372372 158170 519519 267267 196200

ANEXO 3

1	0	361	503	254	348	169	488	267	158
1	0	361	527	254	348	169	526	267	158
2	0	386	435	266	335	166	488	245	000
2	0	386	435	266	367	166	488	245	000
3	0	365	432	246	354	166	545	223	191
3	0	365	521	246	365	166	563	223	191
4	0	364	446	254	302	157	547	267	180
4	0	378	524	254	302	169	565	267	212
5	0	364	438	268	303	167	544	203	238
5	0	378	521	268	315	167	562	216	238
6	0	363	406	246	326	167	434	235	000
6	0	377	406	246	326	182	522	235	000
7	0	372	508	277	346	168	541	236	104
7	0	387	531	277	346	192	559	236	123
8	0	364	393	256	300	165	546	325	196
8	0	379	399	256	300	165	563	249	200
9	0	364	441	254	299	000	576	234	176
9	0	379	521	254	299	000	576	234	176
10	0	372	408	255	287	167	548	222	208
10	0	372	408	255	287	167	565	222	218
11	0	387	461	265	236	163	542	203	196
11	0	398	521	265	236	163	559	203	196
12	0	363	531	264	299	000	520	213	208
12	0	377	554	264	299	000	520	224	254
13	0	371	410	256	279	166	421	202	208

13	0	385	435	256	279	166	519	214	208
14	0	371	467	263	361	163	546	328	257
14	0	385	522	263	361	163	563	328	257
15	0	359	443	266	300	167	453	322	000
15	0	359	443	266	300	167	470	322	000
16	0	374	488	265	287	164	521	256	148
16	0	388	526	265	287	178	521	256	167
17	0	374	434	242	300	168	542	205	182
17	0	374	522	253	300	168	559	205	216
18	0	365	500	165	309	166	539	234	194
18	0	365	528	179	309	166	557	234	194
19	0	330	397	277	308	170	518	236	000
19	0	330	397	277	337	170	518	236	000
20	0	363	461	253	332	168	552	235	253
20	0	377	523	253	332	168	552	235	253
21	0	375	421	247	305	163	546	236	247
21	0	375	519	247	305	176	564	236	247
22	0	366	501	275	289	166	549	245	176
22	0	366	527	275	289	166	549	245	186
23	0	363	400	249	261	169	543	228	181
23	0	363	519	249	261	169	543	228	198
24	0	363	311	278	328	166	541	222	000
24	0	376	311	278	334	179	558	222	000
25	0	000	404	166	303	181	504	221	166
25	0	000	428	166	303	192	529	221	166
26	0	366	400	277	285	167	467	235	181

26	0	366	518	277	285	181	522	235	181
27	0	365	399	256	331	167	467	248	000
27	0	380	519	256	331	167	467	248	000
28	0	361	394	258	334	164	402	263	000
28	0	361	394	258	348	164	414	263	000
29	0	363	501	246	327	167	520	211	247
29	0	377	526	246	327	167	520	211	266
30	0	364	326	264	278	162	547	213	248
30	0	378	326	264	278	162	563	213	248
31	0	000	497	259	346	167	550	235	000
31	0	000	525	259	346	190	566	235	000
32	0	352	400	263	354	165	542	234	195
32	0	352	519	263	367	165	542	234	195
33	0	348	428	257	323	181	542	253	000
33	0	362	520	257	323	185	560	253	000
34	0	371	516	267	313	165	527	203	203
34	0	371	516	267	313	188	520	221	203
35	0	361	406	246	321	166	545	224	246
35	0	367	406	246	321	190	563	236	246
36	0	364	399	246	328	167	541	204	188
36	0	364	519	246	328	167	541	204	188
37	0	375	399	242	289	164	543	233	178
37	0	375	518	242	289	177	561	233	178
38	0	349	464	167	273	162	546	233	180
38	0	349	523	190	273	162	546	233	188
39	0	366	397	000	324	000	546	289	190

39	0	366	397	000	324	000	546	289	203
40	0	359	478	276	328	163	479	000	000
40	0	359	525	276	328	163	479	000	000
41	0	361	443	267	234	166	544	206	194
41	0	361	522	267	234	180	561	206	194
42	0	365	443	278	286	168	519	235	227
42	0	365	523	278	286	168	519	235	227
43	0	329	402	265	265	167	469	223	000
43	0	366	518	265	265	167	469	223	000
44	0	365	380	256	303	170	545	202	000
44	0	365	380	256	303	170	562	212	000
45	0	357	417	265	321	171	545	304	172
45	0	357	520	265	321	171	562	304	172
46	0	365	411	243	272	159	551	234	244
46	0	365	520	243	272	159	567	234	249
47	0	372	398	290	288	000	544	000	249
47	0	372	420	293	288	000	562	000	249
48	0	363	400	257	000	166	545	205	258
48	0	363	519	257	000	179	562	205	258
49	0	000	418	254	332	168	441	245	176
49	0	000	521	254	332	168	521	245	176
50	0	367	436	268	244	167	503	223	204
50	0	267	521	268	244	181	527	234	204
51	0	370	370	253	322	170	443	236	182
51	0	384	384	253	322	184	447	245	194
52	0	366	366	262	302	000	447	245	194

52	0	366	366	262	302	000	447	245	194
53	0	352	352	257	326	000	551	228	176
53	0	352	352	257	326	000	551	228	176
54	0	366	366	252	348	166	542	222	160
54	0	366	366	252	348	166	542	222	160
55	0	373	373	259	346	169	501	213	186
55	0	387	387	259	346	169	527	213	200
56	0	389	389	266	329	167	546	234	176
56	0	399	399	266	329	181	563	234	186
57	0	372	372	243	325	169	438	236	101
57	0	387	387	254	325	169	521	248	101
58	0	387	387	162	306	172	454	256	228
58	0	398	398	184	306	172	454	263	228
59	0	378	378	245	313	169	501	211	138
59	0	378	378	245	313	169	526	221	168
60	0	356	356	251	303	166	490	213	101
60	0	362	362	261	303	166	490	213	119
61	0	352	352	164	272	170	000	235	202
61	0	352	352	186	272	170	000	235	221
62	0	356	356	248	326	169	516	234	101
62	0	362	362	262	326	169	516	234	119
63	0	348	512	243	361	000	546	223	206
63	0	348	512	250	361	000	562	223	206
64	0	317	408	250	300	162	547	229	180
64	0	317	408	255	300	169	563	229	212
65	0	000	509	244	287	166	000	000	197

65	0	000	509	244	287	178	000	000	200
66	0	000	411	253	300	165	552	225	213
66	0	000	411	261	300	165	552	225	213
67	0	373	513	243	309	181	541	233	101
67	0	387	537	253	309	184	558	233	101
68	0	360	504	237	308	170	504	235	145
68	0	360	532	237	337	170	529	235	145
69	0	371	499	252	332	175	451	264	208
69	0	371	499	252	332	178	451	264	218
70	0	376	525	243	305	178	443	000	000
70	0	376	525	243	305	185	522	000	000
71	0	338	473	243	289	178	550	228	257
71	0	338	473	250	289	186	566	228	257
72	0	336	500	256	261	176	449	222	000
72	0	336	500	256	261	176	449	222	000
73	0	371	480	245	328	162	400	232	182
73	0	386	480	256	334	175	519	232	216
74	0	000	449	234	303	156	490	235	157
74	0	000	449	234	303	156	490	235	157
75	0	348	451	256	278	174	431	264	196
75	0	348	451	256	278	174	431	264	196
76	0	387	439	000	336	183	483	245	000
76	0	387	439	000	336	189	483	245	000
77	0	398	416	258	341	166	459	278	000
77	0	398	416	258	341	178	459	278	000
78	0	345	428	458	338	180	436	234	182

78	0	345	428	458	338	184	521	234	226
79	0	364	405	254	279	168	451	263	213
79	0	378	429	254	279	186	451	263	213
80	0	367	449	246	336	167	457	267	252
80	0	367	449	252	336	167	457	267	252
81	0	372	471	243	299	166	000	219	163
81	0	385	471	243	299	166	000	219	181
82	0	358	459	239	271	184	478	274	108
82	0	358	459	260	271	184	525	274	108
83	0	360	403	271	372	158	519	267	196
83	0	374	428	271	372	170	519	267	200

ANEXO 4

Title line: "resultados microchecker1 13-06-16 all locishow evidence for null allele.txt"

Atig52.143a

At52.1a

At60.3a

At52.20a

At52.6a

At52.10a

Ama2C2a

AmaAa

Pop

Pop1,	361361 000000 254254 348348 169169 488526 000000 158158
pop1,	000000 435435 266266 335367 166166 488288 245245 000000
pop1,	365365 432432 246246 354365 166166 545563 223223 191191
pop1,	364364 446446 254254 302302 157169 547565 000000 180212
pop1,	364378 438438 268268 303315 167167 544562 203216 238238
pop1,	363377 406406 246246 326326 167182 434522 235235 000000
pop1,	372387 000000 277277 346346 168192 541559 000000 104123
pop1,	364379 393399 256256 300300 165165 546563 000000 196200
pop1,	000000 441441 254254 299299 000000 576576 234234 176176
pop1,	000000 408408 255255 287287 167167 548565 222222 208218
pop1,	000000 461461 265265 000000 163163 542559 203203 196196
pop1,	363377 000000 264264 299299 000000 520520 213224 208254
pop1,	000000 410435 256256 279279 166166 421519 202214 208208
pop1,	000000 467522 263263 000000 163163 546563 328328 257257
pop1,	359359 443443 266266 300300 167167 453470 000000 000000

pop1,	000000 488488 265265 287287 164178 521521 256256 148167
pop1,	000000 434434 242253 300300 168168 542559 205205 182216
pop1,	365365 000000 000000 309309 166166 539557 234234 194194
pop1,	330330 397397 277277 308337 000000 518518 236236 000000
pop1,	363377 461461 253253 332332 168168 552552 235235 000000
pop1,	000000 421421 247247 305305 163176 546564 236236 000000
pop1,	366366 000000 275275 289289 166166 549549 245245 176186
pop1,	363363 400400 249249 261261 169169 543543 228228 181198
pop1,	363376 311311 278278 328334 166179 541558 222222 000000
pop1,	000000 404428 000000 303303 181192 504529 221221 166166
pop1,	366366 400400 277277 285285 167181 467522 235235 181181
pop1,	365380 399399 256256 331331 167167 467467 248248 000000
pop1,	361361 394394 258258 334348 164164 402414 263263 000000
pop1,	363377 000000 246246 327327 167167 520520 211211 000000
pop1,	000000 326326 264264 278278 162162 547563 213213 000000
pop1,	000000 497497 259259 346346 167167 550566 235235 000000
pop1,	352352 400400 263263 000000 165165 542542 234234 195195
pop1,	348362 428428 257257 323323 000000 542560 253253 000000
pop1,	000000 000000 267267 313313 165188 527520 203221 203203
pop1,	361367 406406 246246 321321 166190 545563 224236 000000
pop1,	364364 399399 246246 328328 167167 541541 204204 188188
pop1,	000000 399399 242242 289289 164177 543561 233233 178178
pop1,	349349 464464 000000 273273 162162 546546 233233 180188
pop1,	366366 397397 000000 324324 000000 546546 000000 190203
pop1,	359359 478478 276276 328328 163163 479479 000000 000000
pop1,	361361 443443 267267 234234 166180 544561 206206 194194

pop1,	365365 443443 278278 286286 168168 519519 235235 227227
pop1,	329366 402402 265265 265265 167167 469469 223223 000000
pop1,	365365 380380 256256 303303 000000 545562 202212 000000
pop1,	357357 417417 265265 321321 171171 545562 000000 172172
pop1,	365365 411411 243243 272272 159159 551567 234234 244249
pop1,	000000 398398 290293 288288 000000 544562 000000 249249
pop1,	363363 400400 257257 000000 166179 545562 205205 000000
pop1,	000000 418418 254254 332332 168168 441521 245245 176176
pop1,	367367 436436 268268 244244 167181 503527 223234 204204
pop1,	000000 370384 253253 322322 170184 443523 236236 182182
pop1,	366366 366366 262262 302302 000000 447447 245245 194194
pop1,	352352 352352 257257 326326 000000 551551 228228 176176
pop1,	366366 366366 252252 348348 166166 542542 222222 160160
pop1,	000000 373387 259259 346346 169169 501527 213213 186200
pop1,	000000 389399 266266 329329 167181 546563 234234 176186
pop1,	000000 372387 243254 325325 169169 438521 236248 101101
pop1,	000000 387398 000000 306306 000000 454454 256263 228228
pop1,	000000 378378 245245 313313 169169 501526 211221 138168
pop1,	356362 356362 251261 303303 166166 490490 213213 101119
pop1,	352352 352352 000000 272272 000000 000000 235235 202221
pop1,	356362 356362 248162 326326 169169 516516 234234 101119
pop1,	348348 000000 243150 000000 000000 546562 223223 206206
pop1,	317317 408408 250255 300300 162169 547563 229229 180212
pop1,	000000 000000 244244 287287 166178 000000 000000 197200
pop1,	000000 411411 253261 300300 165165 552552 225225 213213
pop1,	000000 000000 243253 309309 181184 541558 233233 101101

pop1,	360360 000000 237237 308337 170170 504529 235235 145145
pop1,	000000 499499 252252 332332 000000 451451 000000 208218
pop1,	000000 000000 243243 305305 000000 443522 000000 000000
pop1,	338338 473473 243250 289289 000000 550566 228228 257257
pop1,	336336 000000 256256 261261 000000 449449 222222 000000
pop1,	371386 480480 245256 328334 162162 400519 232232 182216
pop1,	000000 449449 234234 303303 156156 490490 235235 157157
pop1,	348348 451451 256256 278278 000000 431431 000000 196196
pop1,	000000 439439 000000 336336 000000 483483 245245 000000
pop1,	000000 416416 258258 341341 166178 459459 000000 000000
pop1,	345345 428428 000000 338338 000000 436436 234234 182226
pop1,	364378 405429 254254 279279 168186 451451 000000 213213
pop1,	367367 449449 246252 336336 167167 457457 267267 000000
pop1,	372385 471471 243243 299299 166166 000000 219219 163181
pop1,	358358 459459 239260 271271 000000 478525 000000 000000
pop1,	360374 403428 271271 000000 158170 519519 267267 196200

ANEXO 5

GLOSARIO

ACERVO GENÉTICO: todos los alelos compartidos por los individuos constituyen el conjunto de genes de una población.

ADN: Polímeros de nucleótidos formados por un azúcar de cinco carbonos, una base nitrogenada y una molécula de fosfato.

ADN NUCLEAR (nADN): contiene regiones únicas de una sola copia y no únicas duplicadas o regiones repetitivas.

AFLPs (polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados): es una técnica que combina la digestión de dos enzimas de restricción, es útil para generar huellas ecológicas y mapeo, así como estudios de genética de poblaciones, donde se producen una gran cantidad de bandas polimórficas.

ALELOS: es cada una de las formas alternativas que puede tener un gen, se diferencian en su secuencia y se pueden manifestar en modificaciones concretas de la función de ese gen.

ALOENZIMAS: son variaciones polipeptídicas que representan diferentes alternativas alélicas del mismo locus génico.

AUTOCIGO: organismo con alelos idénticos por descendencia.

CUELLO DE BOTELLA: son reducciones drásticas en los tamaños efectivos y pueden repercutir en los niveles de variación genética.

COEFICIENTE DE ENDOGAMIA: probabilidad de que dos alelos homocigotos sean idénticos por descendencia. Que ambas sean copias de un alelo ancestral común.

DEPRESIÓN ENDOGÁMICA: sugiere que las mutaciones con efectos deletéreos aun en especies muy endogámicas y son difíciles de purgar.

DERIVA GÉNICA: cambios al azar en las frecuencias alélicas.

DIVERSIDAD GENÉTICA: Es la materia prima de la evolución, ya que depende tanto de la adaptación como de la especiación, da la habilidad de responder a enfermedades, parásitos, depredadores o cambios ambientales.

DIPLOIDES: células que tienen un número doble de cromosomas.

DNA "finger printing": patrones característicos de un individuo.

DNA "profiling": se utiliza para describir el uso combinado de varios tipos de marcadores moleculares para la caracterización de individuos.

EFFECTO WAHLUND: se utiliza para definir los estadísticos F. Cuando encontramos un déficit de heterocigotos y un exceso de homocigotos. Si no se sabe que son dos

subpoblaciones, aunque cada uno estén en Equilibrio Hardy Weinberg, en total parece que faltan heterocigotos.

ENDOGAMIA: apareamiento no aleatorio en donde la probabilidad de que un individuo sea autócigo es mayor que para una población panmíctica.

EXPRESIÓN GENICA: Es el proceso por el cuál todos los organismos procariotas y eucariotas transforman la información en los ácidos nucleicos en las proteínas necesarias para su desarrollo y funcionamiento.

EXTINCIÓN DE ESPECIES: Es la desaparición de una línea evolutiva que ha estado presente y compartiendo nuestro medio natural y ya nunca lo estará.

FLUJO GÉNICO: son todos los mecanismos que generan movimiento de genes de una población a otra.

F_{ST} : (0-1) mide el grado de subdivisión a través de sus efectos de aumento de endogamia = reducción de heterocigosis.

HAPLOTIPO: Es una combinación de alelos de diferentes loci de un cromosoma que son transmitidos juntos puede ser un locus, varios loci o un cromosoma entero.

HÍBRIDO: individuo descendiente de progenitores pertenecientes a poblaciones diferenciadas en por lo menos un carácter heredable.

HETEROSIS: cruza entre diferentes poblaciones.

HETEROCIGO: individuo diploide que para un gen dado, tiene cada uno de los cromosomas homólogos un alelo apareado con otro, posee dos formas diferentes de un gen en particular.

HOMOCIGOSIS: probabilidad con la que se espera que dos alelos sean idénticos por descendencia y en estado.

HOUSEKEEPING GENES: Grupo de genes que se expresan en todas las células del organismo y codifican para proteínas que son esenciales para el funcionamiento general de las células.

ISSRs: (secuencias repetidas intersimples): se han utilizado en estudios de variación poblacional en especies silvestres, es recomendable para análisis de paternidad, tiene gran número de bandas polimórficas.

ISOENZIMAS: pueden representar varias formas alélicas, conocidas como aloenzimas, se utilizan como marcadores moleculares para cuantificar las frecuencias alélicas y genotípicas de los individuos que son estimadores básicos de la composición genética de la población.

LEY DE HARDY WEINBERG: Es un principio que establece que la composición genética de una población mediante una ecuación donde la población permanece en equilibrio mientras no actúe la selección natural ni ningún otro factor como la mutación.

LOCI: es el lugar específico del cromosoma donde está localizado un gen u otra secuencia de ADN (plural)

LOCUS: es el lugar específico del cromosoma donde está localizado un gen u otra secuencia de ADN.

MARCADORES MOLECULARES: Es una herramienta que se utiliza para localizar y aislar genes de interés. Se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismo en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o codominante.

MÉTODO DE NEI-GOJOBORI: al realizar un cálculo del número de sitios sinónimos y no sinónimos, asume que la sustitución de los cuatro nucleótidos sucede de manera azarosa.

MICROSATÉLITES: compuesto de 1 a 6 pares de bases, son marcadores codominantes, altamente polimórficos y densamente distribuidos en el genoma de los organismos eucariontes, son lo suficientemente específicos para diferenciar individuos dentro de la población.

MODELO NEUTRO: Es la tasa de cambio a la cuál un nucleótido es reemplazado (sustituido) por otro dentro de una población, es igual a la tasa de mutación o cambio de este sitio sin importar el tamaño poblacional.

MUTACIÓN: alteración o cambio en la información genética de un ser vivo y que va a producir un cambio de características de este que se presenta súbita y espontáneamente se puede transmitir o heredar a la descendencia.

P.B.(PARES DE BASES): consiste en dos nucleótidos opuestos y complementarios en cadenas de ADN y RNA que están conectadas por puentes de hidrógeno.

PEDIGREE: diagrama que representa la línea de antecesores.

PIMV's: predios o instalaciones que tienen manejo de organismos de forma confinada fuera de sus hábitat natural y que no tienen como fin la reintroducción de ejemplares a vida silvestre.

PCR (polymerase chain reaction) Reacción en cadena de la polimerasa: es una técnica en Biología Molecular que se utiliza para sintetizar muchas veces un fragmento de ADN, utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy altas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a temperaturas muy altas (79 a 85°C).

POOL GENÉTICO: es la combinación de todos los alelos para todos los rasgos que exhiben los miembros de una población. Puede considerarse como la suma total de los gametos de una población a partir de los cuales se toman muestras al azar para formar los cigotos de la generación siguiente.

RFLP's: expresan diferencias específicas del ADN que fueron reconocidos por enzimas de restricción particulares (endonucleasas), se han utilizado para reconstruir mapas genéticos y para resolver problemas taxonómicos.

RAPD'S (polimorfismos de ADN amplificados al azar): son marcadores moleculares que amplifican aleatoriamente segmentos de ADN en una gran variedad de especies, son útiles para estudios de parentesco en poblaciones.

SECUENCIACIÓN DE ADN: análisis detallado de diferenciación de ADN , donde pueden obtenerse secuenciando la región de interés para diferentes individuos.

SELECCIÓN POSITIVA: es estudiada indirectamente cuando un grupo de genes parece desviarse del modelo neutral.

TAMAÑO EFECTIVO DE LA POBLACIÓN (N_e): es el número de individuos reproductivos, a que estos son los que contribuyen a la generación siguiente en términos demográficos y sobre todo genéticos.

UMA: predios e instalaciones registrados que operan con un plan de manejo aprobado y dentro de los cuales se da seguimiento permanente al estado del hábitat de poblaciones o especies que aquí se distribuyen.

UMWELT: mosaico o área especialmente heterogénea compuesta de un conjunto de interacciones desde el nivel de individuo hasta ecosistema.

VARIABILIDAD GENÉTICA: variación en el material genético de una población o especie e incluye los cromosomas.