



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO(A) EN BIOLOGÍA

**Caracterización genética molecular de *Ctenosaura pectinata*
(Iguana negra) en la zona de la REBIOSH, Tequesquitengo y en la
zona turística de Coatetelco, utilizando marcadores universales.**

QUE PRESENTA EL ALUMNO (A)

Badillo Rodríguez Ruben Eduardo
2142031643

ASESORES:

Dr. Francisco García Franco
Profesor titular
Depto. De Investigación
Universidad Tominaga Nakamoto
Asesor Externo

Dr. Gabriel R. Campos Montes
Profesor titular
Depto. El Hombre y su Ambiente
UAM-Xochimilco
Asesor Interno

Ciudad de México.

Febrero 2020

Índice

1. Introducción.....	4
2. Marco Teórico.....	4
2.1 La biodiversidad.....	4
2.1.1 Las principales áreas de biodiversidad en el mundo.....	6
2.1.2 Biodiversidad en México.....	7
2.1.3 Herpetofauna en México.....	7
2.1.4 Las iguanas en México.....	8
2.2 <i>Ctenosaura pectinata</i>.....	10
2.2.1 Estado de conservación.....	11
2.2.2 Distribución de <i>Ctenosaura pectinata</i>	11
2.2.3 Genética de <i>Ctenosaura pectinata</i>	13
2.3 Métodos de colecta.....	15
2.3.1 Método de lazo montado.....	15
2.3.2 Trampas cilíndricas.....	16
2.4 Métodos de medición de la biodiversidad.....	16
2.4.1 Índices de biodiversidad.....	17
2.4.1.1 Alfa.....	18
2.4.1.2 Beta.....	19
2.4.1.3 Gama.....	20
2.4.2 Diversidad Genética molecular.....	20
2.4.2.1 Frecuencias alélicas.....	23
2.4.2.2 Frecuencias genotípicas.....	23
2.4.2.3 Marcadores moleculares.....	24
2.4.2.3.1 Marcadores mitocondriales.....	26
2.4.2.3.2 Marcadores nucleares.....	27
2.4.2.3.2.1 Gen TYR nuclear.....	28
2.5 Métodos de biología molecular.....	31
2.5.1 Extracción de ADN.....	32
2.5.2 Amplificación de ADN.....	33
2.5.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	34
2.5.3 Secuenciación de ADN.....	36
2.6 Bioinformática.....	38
2.6.1 Plataformas bioinformáticas.....	39
2.6.1.1 NCBI.....	40
2.6.1.2 GenBank.....	40
2.6.1.3 ENSEMBL.....	40
2.6.1.4 OMIM.....	41
2.6.1.5 Albinism Database.....	41
2.6.2 Softwares bioinformáticos.....	42
2.6.2.1 Primer-BLAST.....	42
2.6.2.1.1 Diseño de primers.....	42
2.6.2.1.2 BLAST.....	45
2.7 La Reserva de la Biosfera de la Sierra de Huautla (REBIOSH).....	46
2.7.1 Huautla.....	47
2.8 Coatetelco.....	48

2.9 Tequesquitengo	48
3. Justificación	49
4. Hipótesis	49
5. Objetivos.	50
6. Diseño experimental	50
7. Material y Métodos	51
7.1 Muestreo.....	51
7.1.1 Sitios de colecta.....	51
7.1.2 Método de colecta.....	52
7.2 Biología Molecular	53
7.3 Método de extracción de ADN	53
7.3.1 Electroforesis.....	54
7.3.2 Diseño de primers	55
7.3.2.1 Primers para gen ND4	55
7.3.2.1.1 Identificar a las especies de reptiles genéticamente más emparentadas con <i>C. pectinata</i>	55
7.3.2.1.2 Obtener las secuencias ortólogas del ADN mitocondrial de las especies de reptiles más emparentadas con <i>C. pectinata</i>	55
7.3.2.1.2 Estructura del gen mitocondrial ND4	55
7.3.2.2 Primers para gen TYR	55
7.3.3 Método de amplificación del ADN	56
7.3.3.1 Gen Tyr y gen ND4	56
7.3.3.2 Condiciones de amplificación gen ND4.....	57
7.3.3.2 Condiciones de amplificación para el gen TYR	58
7.4.4 Método de secuenciación del ADN	58
7.4.5 Análisis Bioinformática	61
7.4.5.1 Plataforma GenBank de NCBI	61
7.4.5.2 Plataforma ENSEMBL	61
8 Resultados	61
8.1 Muestreo.....	61
8.2 Extracción de ADN	62
8.2.1 Curva de concentración de tejido	62
8.2.2 Electroforesis.....	63
8.3 Diseño primers.....	64
8.3.1 Gen ND4	64
8.3.1.1 Especies genéticamente más relacionada a <i>C. pectinata</i>	64
8.3.1.2 Secuencias ortólogas del ADN mitocondrial completo (mitocondrion) anotadas en GenBank, de especies de reptiles que están emparentadas con <i>C. pectinata</i>	65
8.3.1.3 Estructura del ADN mitocondrial	67
8.3.1.3.1 Estructura del ADN mitocondrial	67
8.3.1.3.2 Primers diseñados para el ADN mitocondrial.....	67
8.3.1.4 Secuencias de los <i>primers</i> ND4 y Leu (Arevalo, <i>et al.</i> , 1994).	69
8.3.1.4 Secuencias homologas entre los <i>primers</i> ND4 y Leu (Arevalo, <i>et al.</i> , 1994) con el ADN mitocondrial de las especies más emparentadas a <i>C. pectinata</i>	69
8.3.2 Gen TYR.....	72

8.3.2.1 Especies genéticamente más relacionada a <i>C.pectinata</i> . Bis 8.3.1.1	72
8.3.2.2 Secuencias ortólogas del TYR anotadas en GenBank, de especies de reptiles que están emparentadas con <i>C. pectinata</i>	73
8.3.2.3 Estructura del Gen TYR.....	75
8.3.2.4 Secuencia del Gen TYR de Anolis carolinensis.....	76
8.3.2.4 Construcción de Primers.	78
8.3.2.5 Secuencia de exones con <i>primers</i>	79
8.3.2.5.1 Secuencia Exón 1	79
8.3.2.5.2 Secuencia Exón 2	80
8.3.2.5.3 Secuencia Exón 3	80
8.3.2.5.4 Secuencia Exón 4	81
8.3.2.5.5 Secuencia Exón 5	81
9. Amplificación	82
9.1 Amplificación gen ND4	82
9.2 Amplificación gen TYR	83
9.3 Secuenciación	84
9.3.1 Secuencias obtenidas del gen mitocondrial ND4.....	84
10. Conclusiones preliminares	93
10.1 Muestreo	93
10.2 Extracción de ADN.....	93
10.2.1 Curva de concentración de tejido	93
10.3 Diseño <i>primers</i>	93
10.3.1 Estructura del Gen TYR	93
11. Bibliografía	94

1. Introducción

El mantenimiento y conservación de especies es de gran importancia ecológica para alcanzar el equilibrio eco sistémico, y de central importancia en varias regiones de nuestro país especies como es el caso de la Iguana.

Sus especies han sido tradicionalmente objeto de cacería en sus áreas de distribución, ya que desde épocas precolombinas los pueblos originales la utilizaban de manera cotidiana como un importa alimento, por día recogían hasta cien de ellas (Gumilla, 1745). Según Sahagún (Iturriaga, 2000) en la Nueva España es un alimento de gran abundancia lo representaban diversas especies animales entre las que sobresalían las iguanas entre otros.

Actualmente, la práctica de la cacería, cultivo, alimentación y ornato ilegales, se encuentra ampliamente difundida a razón de la importancia que tienen estas especies, las cuales incluso se aprovechan de ellas: su carne, huevos y piel. Estas presiones se incrementan con mayor intensidad en su período reproductivo, tanto por la exquisitez de los huevos como por el supuesto poder afrodisíaco de los mismos.

2. Marco Teórico

2.1 La biodiversidad

El concepto de biodiversidad se refiere en general a la variabilidad de la vida; incluye los ecosistemas terrestres y acuáticos, los complejos ecológicos de los que forman parte, así como la diversidad entre las especies y dentro de cada especie. La biodiversidad abarca, por lo tanto, tres niveles de expresión de variabilidad biológica: ecosistemas, especies y genes. En estos niveles se integra una amplia gama de fenómenos, de manera que la biodiversidad de un país se refleja en los diferentes tipos de ecosistemas que contiene, el número de especies que posee, el cambio en la riqueza de especies de una región a otra, el número de endemismos, las subespecies y variedades o razas de una misma especie, entre otros (Mittermeier y Goettsch, 1992).

Por otra parte, la biodiversidad se fundamenta y desarrolla en lo enorme diversidad genética, en su estructura molecular y en los procesos que la componen, determinando con todo ello al fenómeno de la vida. Esta, a través de la genética

presenta una asombrosa homogeneidad bioquímica y metabólica de base, que claramente explica la posibilidad de la evolución entendida como el proceso de transformación, desde la genética, que se manifiesta en la gran diversidad fisiológica y morfología de los seres vivos.

Sin embargo, y a pesar de que la genética conserva la homogeneidad de esa base bioquímica y metabólica, y por otra parte genera los nuevos cambios que permiten la adaptación de los seres vivos a los nuevos entornos, mediante procesos evolutivos que permiten nuevas formas de integración e integración a los entornos ecológicos, partiendo desde la misma incorporación de la materia inespecífica externa para el metabolismo intermedio (Gómez & Luis, 2011).

Esta diversidad de formas en las que se expresa la vida, tiene como resultado procesos del ecosistema. Dichos procesos que defienden a los sistemas vivos, pueden ser vistos como flujos de materia y energía. Para ello es fundamental la fotosíntesis, en la que la energía de la luz solar se utiliza para convertir el dióxido de carbono y el agua en oxígeno y biomasa. La respiración entonces libera energía, descomponiendo la materia orgánica en, esencialmente, dióxido de carbono y agua. Otros aspectos de los procesos de los ecosistemas que también son extremadamente importantes son la incorporación de elementos procedentes de fuentes inorgánicas en los sistemas vivos, en particular la incorporación de nitrógeno procedente de la atmósfera por diversos tipos de bacterias (que también se lleva a cabo cada vez más a través de procesos industriales) y la descomposición de los residuos para que vuelvan a entrar en los distintos ciclos de nutrientes y minerales. A nivel planetario, estos son los servicios de los ecosistemas, dependiendo absolutamente la existencia humana. A nivel local se han dividido en servicios de soporte como se muestra en la tabla 1 (Neville & Jenkins, 2007).

Tabla 1. Clasificación de los servicios del ecosistema según Neville & Jenkins (2007).

Soporte: Ciclo de nutrientes, Formación del suelo y Producción primaria	
Aprovisionamiento	Comida, Purificación de agua, Madera y fibras, combustible y Medicinas.
Regulación	Climas, crecidas de ríos, Enfermedades y Polinización.
Cultura	Estético, Espiritual, Educacional, Recreacional y Valores intrínsecos.

Se requiere cierto nivel de diversidad para mantener los procesos de los ecosistemas a todas las escalas. Por lo que incluso los sistemas más simples tienen más de un tipo de organismo. A mayor escala, ningún organismo está adaptado a toda la gama de condiciones físicas que se dan en el planeta, por lo que las mismas funciones deben ser desempeñadas por diferentes organismos en diferentes lugares (Neville & Jenkins, 2007).

2.1.1 Las principales áreas de biodiversidad en el mundo

Entonces, para comprender la enorme diversidad biológica, Myer *et al* (2000) describe la existencia de 25 hotspots (zonas calientes de alta biodiversidad) que contienen los hábitats de 133,149 especies endémicas de plantas vasculares, que equivale al 44% de todas las especies del planeta y 9,645 especies de vertebrados endémicos (35% del total mundial). Toda esta diversidad se extiende en 2.1 millones de kilómetros cuadrados, es decir, en 1.4 % de la superficie terrestre (Figura 1).

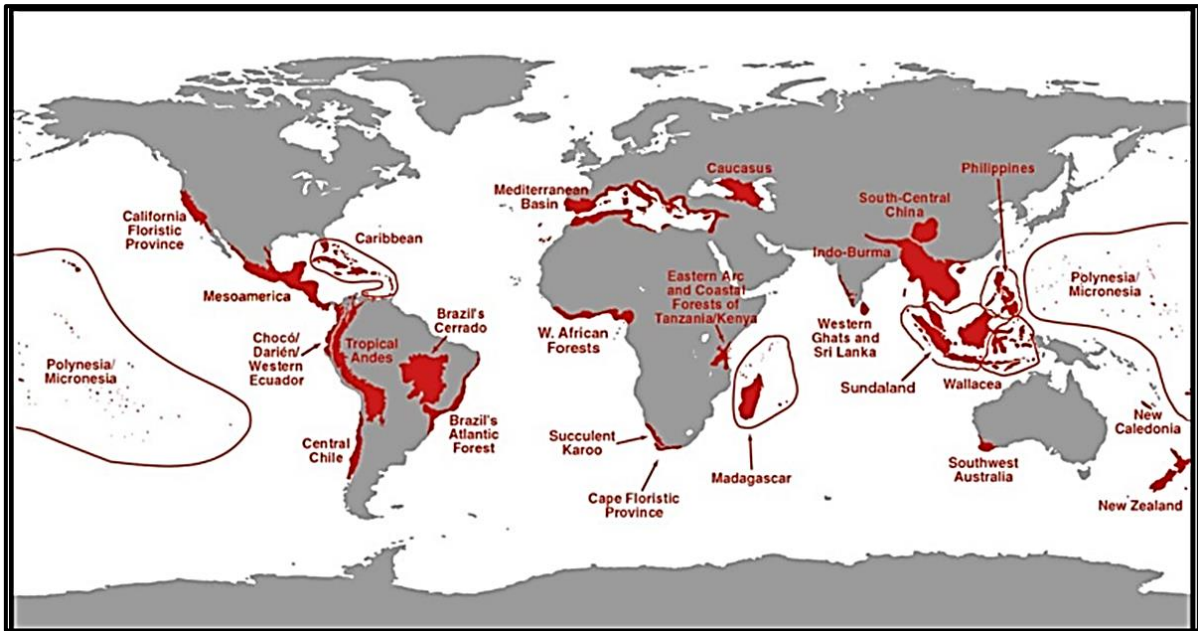


Figura 1. Los 25 hotspots, en donde el 44% de todas las especies de plantas vasculares y el 35% de todas las especies en cuatro grupos de vertebrados están conectados comprendiendo tan solo el 1.4% de la superficie terrestre de la Tierra. Imagen de Myer *et al* (2000)

2.1.2 Biodiversidad en México

Mesoamérica se ha identificado como uno de los "puntos calientes" de la biodiversidad de la Tierra, con el mayor número tanto de especies totales de reptiles y anfibios, así como de especies endémicas de esos dos taxones (Myers Norman, *et al.*, 2000). Su diversidad biológica se debe en parte a su posición geográfica entre el reino Neártico de América del Norte y los Neotrópicos de América del Sur, y a su topografía altamente fragmentada y ecosistemas diversos. Esta región también se considera una de las áreas más desafiantes y emocionantes para el estudio de la biogeografía y la evolución debido a la dispersión masiva de organismos entre América del Norte y América del Sur. Esta dispersión fue facilitada por el cierre del istmo panameño hace aproximadamente 3 millones de años (Ma), un evento que también dio forma a la diversidad de esta región (Malone, *et al.*, 2017) (Ríos-Muñoz, 2013).

2.1.3 Herpetofauna en México

México, por su inmejorable posición geográfica, ubicado entre la región Neártica y Neotropical, es considerado un corredor biológico que cuenta con una importante diversidad de flora y fauna México, por lo que es uno de los países que cuentan con

mayor riqueza florística y faunística, así como con una gran variedad de ecosistemas, producto de su topografía compleja que le confiere relieves variados. Estos factores fueron decisivos en los procesos evolutivos que dieron origen a la gran variedad de formas biológicas. Dentro del acervo faunístico de nuestro país la riqueza de especies de anfibios y reptiles de México ha sido motivo de significativas aportaciones científicas. Por sus factores taxonómicos, biogeográficos, de comportamiento y ecológicos, estos grupos resultan interesantes e indispensables en el buen funcionamiento de los ecosistemas naturales, y se les ha catalogado como organismos modelo por sus establecidos ciclos de vida y acelerados desarrollos embrionarios (Vite-Silva, 2010).

En México existen 704 especies de reptiles que pertenecen a 154 géneros de 37 familias. Para los reptiles los grupos mejor representados en México son los saurios (lagartijas) y las serpientes (culebras y víboras); los iguánidos, ánguinos, teíidos, xantúsidos, colúbridos, elápidos y vipéridos son los que presentan más especies endémicas (Flores 1993; Flores y Gerez, 1994). En México se encuentra 9.8% de las especies de reptiles del mundo. La herpetofauna (anfibios y reptiles) de México es una de las más ricas del mundo, con más de 52% de especies endémicas. De hecho, México ocupa el primer lugar en el mundo en riqueza de reptiles (Flores 1993).

2.1.4 Las iguanas en México

De acuerdo al portal ENCICLOVIDA de la Comisión Nacional para la Biodiversidad (CONABIO), los reptiles conocidos como iguanas o iguánidos están incluidos en la clasificación taxonómica de la familia Iguanidae, son descritos como una familia de saurópsidos escamosos, es decir reptiles escamosos, que comprenden diversos géneros de lagartos del Nuevo Mundo, conocidos popularmente como iguanas.

En general son reptiles diurnos terrestres, a veces semi-arborícolas o semi-marinos, que se distribuyen en el sur de los Estados Unidos, México, América Central, El Caribe y Sudamérica, aunque se distinguen también dos géneros en Madagascar y Fiyi. Se alimentan principalmente de material vegetal, y a veces de pequeños invertebrados (CONABIO, s.f.a).

La familia Iguanidae incluía inicialmente muchos géneros y especies. Sin embargo, Frost *et al.* 2001, examinando lagartos pertenecientes a la familia polychrotidae con base en datos de marcadores moleculares y marcadores morfológicos ha refinado la clasificación taxonómica de esta familia, reduciendo significativamente el número de géneros incluidos, demostrando que Polychrotidae no es un grupo monofilético, ya que comprende al grupo Corytophanidae como taxón hermano de Anolis además de Polychrus (Frost, *et al.*, 2001).

Flores (1993) reporta que, este grupo está bien representado en las regiones naturales áridas extratropicales en el occidente, tierras bajas tropicales y tierras altas extratropicales. Sin embargo los estudios sobre biogeografía actuales han cambiado (Figura 2), las zonas descritas anteriormente representan una parte de la provincia de California, provincia de Baja California, provincia de Sonora, provincia de Tierras Bajas del Pacífico, parte sur de la provincia de la Sierra Madre Occidental donde interactúa con las Tierras Bajas del Pacífico, la parte del extremo sur de la provincia del desierto de Chihuahua y las provincias de la Sierra Madre del Sur, cuenca del Balsas y el cinturón volcánico transmexicano (Morrone, 2017).

En México se reconocen 11 especies del género *Ctenosaura* (*C. acanthura*, *C. clarki*, *C. pectinata*, *C. similis*, *C. oaxacana*, *C. conspicuosa*, *C. nolascensis*, *C. alfredschmidtii*, *C. hemilopha* y *C. macroilopha*), de las cuales 7 especies se encuentran dentro de la NOM-59-SEMARNAT-2010 (*C. acanthura*, *C. hemilopha*, *C. pectinata*, *C. oaxacana*, *C. similis* y *C. clarki*) como especies prioritarias para la conservación (PROFEPA, 2010; CONABIO, 2019).



Figura 2. Provincias biogeográficas de México de Morrone, (2017).

2.2 *Ctenosaura pectinata*

Esta especie exhibe dimorfismo sexual, con machos con una cresta espinosa dorsal y generalmente más grandes que las hembras, alcanzando hasta un metro de longitud total. Muestran un cambio de color ontogenético, con las crías siendo verdes y oscureciéndose cuando son adultos, que exhiben una amplia gama de coloración (figura 4) (Zarza, Reynoso, & Emerson, 2016).

Son de talla grande (1200 mm), de forma larga y robusta, con párpados movibles y cola generalmente larga, cuerpo comprimido lateralmente; hilera de escamas

mediodorsales alargadas y formando una cresta. La cabeza es larga, aplanada anteriormente, cubierta con escamas hexagonales de tamaño pequeño. Escamas dorsales lisas, pequeñas en comparación a las ventrales; presenta poros femorales. La cola; larga y con anillos de escamas, cada una separada por dos o más hileras de pequeñas escamas a lo largo de la cola. El color del cuerpo es uniformemente negro con manchas dispersas de color blanco amarillentas formando manchas irregulares, además la cabeza siempre es de color negra (CONABIO, sf.b).

2.2.1 Estado de conservación

En la NOM-059-SEMARNAT-2010 esta especie se encuentra en la categoría de amenazada, debido a la disminución de sus poblaciones por su uso como mascota y para consumo dentro de las comunidades donde se distribuye (PROFEPA, 2010).

2.2.2 Distribución de *Ctenosaura pectinata*

Es una especie de hábitos diurnos, que se encuentra preferentemente en zonas cálidas y húmedas de la selva baja subperennifolia espinosa, selva baja caducifolia, selva mediana subcaducifolia y bosque caducifolio espinoso de *Prosopis sp.*, sobre rocas y árboles de amate del género *Tubeburia sp.* La iguana negra suele encontrarse en los barrancos cerca de los arroyos, sus lugares de preferencia son los sitios rocosos en terrenos secos; también trepa a los árboles y muchos individuos viven en las ramas y troncos huecos. Se distribuye a lo largo de la costa del Pacífico, desde el sur de Sonora hasta Chiapas, en el Océano Pacífico en las islas Marías e Isabel, y penetrando a la Cuenca del Balsas hasta Morelos, Puebla y el Estado de México y fuera del país ha sido introducida en los Estados Unidos, especialmente en algunos lugares de los estados de Florida y Texas (Castro-Franco & Bustos, 2003; Ramírez & Hernández, 2004; Zarza, Reynoso, & Emerson, 2016) (Figura 3).

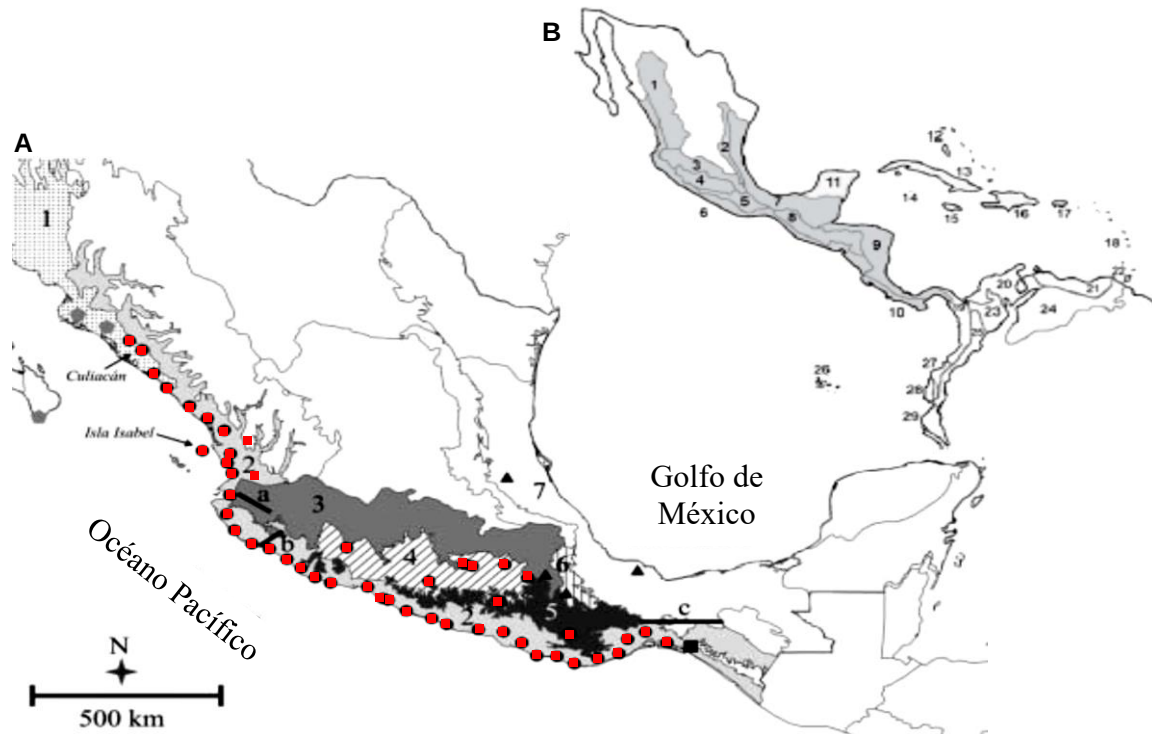


Figura 3. A. Mapa que muestra la presencia de *C. pectinata* (círculos rojos), *C. acanthura* (triángulos negros), *C. hemilopha* (pentágonos grises) y *C. similis* (cuadrado negro); provincias bióticas relevantes: 1) Sonorense; 2) Costa del Pacífico; 3) Cinturón volcánico mexicano (MVB); 4) Depresión de Balsas; 5) Sierra Madre del Sur; 6) Provincia de Oaxaca y 7) Golfo de México. Cortes biogeográficos y filogeográficos (barras negras): "a" y "b" asociados al MVB, y "c" en el Istmo de Tehuantepec. Imagen modificada de Zarza, Reynoso, & Emerson (2008).

B. Provincias biogeográficas. 1 a 5 Zona de Transición Mexicana: 1, Sierra Madre Occidental; 2, Sierra Madre Oriental; 3, Eje Volcánico Transmexicano; 4, Cuenca del Balsas; 5, Sierra Madre del Sur. Dominio Mesoamericano (6 a 10): 6, Costa Pacífica Mexicana; 7, Golfo de México; 8, Chiapas; 9, Este de Centroamérica; 10, Oeste del Istmo de Panamá. Dominio Antillano (11 a 18): 11, Península de Yucatán; 12, Bahamas; 13, Cuba; 14, Islas Caimán; 15, Jamaica; 16, Española; 17, Puerto Rico; 18, Antillas Menores. Dominio Noroeste de América del Sur (19 a 29): 19, Chocó; 20, Maracaibo; 21, Costa de Venezuela; 22, Trinidad y Tobago; 23, Magdalena; 24, Llanos venezolanos; 25, Cauca; 26, Islas Galápagos; 27, Occidente de Ecuador; 28, Ecuador árido; 29., Tumbes-Piura. Imagen modificada de Ríos-Muñoz (2013).

La iguana negra (*C. pectinata*) es una especie amenazada y endémica de México que es manejada a través de UMAs, algunas de las cuales albergan iguanas que fueron mascotas indeseadas o decomisadas, de origen desconocido. Las instalaciones pueden llegar a superpoblarse al no poder regresar las iguanas a su hábitat sin saber de dónde vienen. Esto puede llevar a liberaciones irresponsables o escapes de individuos o su descendencia nacida en cautiverio, constituyendo así una fuente potencial de 'contaminación genética' para las poblaciones locales. Para promover el manejo adecuado de los individuos en cautiverio y evaluar la posibilidad de su liberación en su hábitat, es indispensable identificar el sitio de origen de los individuos a liberar (Zarza, Reynoso, & Emerson, 2016).

La distribución de *C. pectinata* es particularmente interesante porque cubre varias zonas biogeográficas conocidos como provincias: Sonorense, Costa del Pacífico, depresión de Balsas y Sierra Madre del Sur (Fig. 3). Estas provincias se consideran entidades naturales y se definen por patrones de distribución concordantes de especies en asociación con características geográficas. *C. pectinata* puede exhibir una estructura de población influenciada por los límites geográficos de estas provincias, o los diferentes ambientes dentro de ellas, o una combinación de estas. Los estudios de taxones distribuidos dentro de las tierras bajas del oeste mexicano, han detectado divisiones profundas entre los grupos de ADN mitocondriales (ADNmt) al norte y al sur del Cinturón Volcánico Mexicano (MVB). Dado que esta característica geológica se extiende por la provincia de la costa del Pacífico, pone en tela de juicio la continuidad y homogeneidad que las clasificaciones biogeográficas atribuyen a esta provincia (Zarza, Reynoso, & Emerson, 2008).

2.2.3 Genética de *Ctenosaura pectinata*

La genética de la conservación involucra la aplicación de genética molecular y evolutiva para la conservación de la biodiversidad, mediante la obtención de información de parámetros demográficos, de su historia, sistemas de apareamiento, flujo de genes, parentesco, etc., con el propósito de resolver incertidumbres taxonómicas, definir unidades evolutivas divergentes que requieren un manejo separado, y con todo ello reducir la endogamia, la pérdida de diversidad genética y el riesgo de extinción, además de comprender la distribución y dinámica de la diversidad genética, para asignar poblaciones de referencia con base en genotipos multilocus (Zarza, Reynoso, & Emerson, 2016).

En la actualidad existen pocos estudios acerca de la existencia de linajes genéticamente y geográficamente distintos de especies terrestres neotropicales y subtropicales, y mucho menos del caso particular de la iguana negra de cola espinosa (*Ctenosaura pectinata*), que se distribuye a través de 2000 km de tierras bajas, principalmente cubiertas por bosques tropicales estacionales secos (SDTF), en el oeste y centro de México y los trópicos más septentrionales de América (Zarza, Reynoso & Emerson, 2008), además, los herpetólogos no reconocen subespecies

dentro de *C. pectinata* aunque morfológicamente existe una variación sustancial del patrón de color en el rango de *C. pectinata* (figura 4).



Figura 4. Ejemplos de variación de color en *Ctenosaura pectinata* a través de su distribución geográfica en México. (Imágenes originales de Víctor H. Reynoso and Eugenia Zarza (2016).

De acuerdo a Zarza, 2008, *C. pectinata* se compone de nueve linajes criptográficos de ADN mitocondrial (ADNmt): Norte A, Norte B, Norte C, Norte D, Colima, Balsas, Guerrero, Oaxaca y Sur (figura 8). Además, los estudios multilocus descubrieron dos grupos genotípicos de microsatélites que son geográficamente discordantes con la distribución de linajes North C, North D, Colima y Balsas sugiriendo que la hibridación introgresiva podría no ser un proceso raro en la evolución de las especies en esta región. Mientras que, otros cuatro haplotipos nucleares (α -enolasa), o grupos genealógicos de haplotipos, son geográficamente distintos: (i) haplotipo AE-16, noroeste costero y suroeste México, (ii) haplotipo AE-5 en el noroeste costero como en el suroeste de México; (iii) ocho haplotipos distribuidos costeramente y tierra adentro, y (iv) el haplotipo AE-2, se distribuye a lo largo del Golfo de México y el Istmo de Tehuantepec (Zarza *et al.* 2008, 2011).

Las introducciones accidentales o intencionales podrían conducir al apareamiento de individuos con diferentes antecedentes genéticos y, por lo tanto, a la introgresión. También conducen a una pérdida de la adaptación local y la depresión de la endogamia. Se necesitan con urgencia estrategias de conservación que utilicen

información genética junto con la biología de la especie y sus amenazas para proteger la historia evolutiva única, las adaptaciones y el papel ecológico de *C. pectinata* (Zarza, Reynoso, & Emerso, 2016).

2.3 Métodos de colecta

Para realizar una exitosa colecta de especímenes de iguana, es fundamental tener en cuenta que existe una zona óptima de confortación para la actividad de los organismos ectodermos como la iguana negra, que se encuentra entre la variación de la temperatura media-alta y alta que corresponde a temperaturas de 30 a 40°C; por ello las iguanas en vida silvestre pasan periodos intermitentes de exposición al sol y a la sombra (Arcos-García, y otros, 2005).

Por lo tanto, ya que las iguanas durante la mañana se asolean, y en la tarde es cuando salen a comer, generando periodos intermitentes de actividad, anteriormente señalados, entonces las búsquedas y capturas se deben realizar desde las 10:00 horas hasta las 16:00 horas aproximadamente.

Existen varios métodos y sistemas para capturar iguanas, el más utilizado es la técnica del lazo montado en vara (figura 5), aunque generalmente solo se utiliza para iguanas que están acostumbradas a la presencia humana, pues no se inquietan y permanecen muy quietas, lo que permite lazarlas sin problema.

Por otra parte, las trampas de botes o agujeros cilíndricos (figuras 6 y 7), se utilizan con la intención para atraer a las iguanas con alimento, se instalan en lugares muy soleados y se les agrega un poco de comida para que ellas mismas se introduzcan a la trampa y ya no tengan posibilidad de huir.

2.3.1 Método de lazo montado

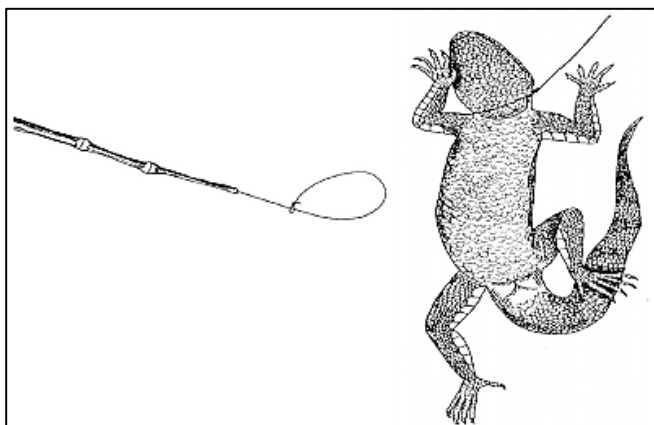


Figura 5. Lazo montado en una vara o caña de pescar, para cazar iguanas o lagartijas. (Fauna silvestre uni amazonia, 2013)

2.3.2 Trampas cilíndricas

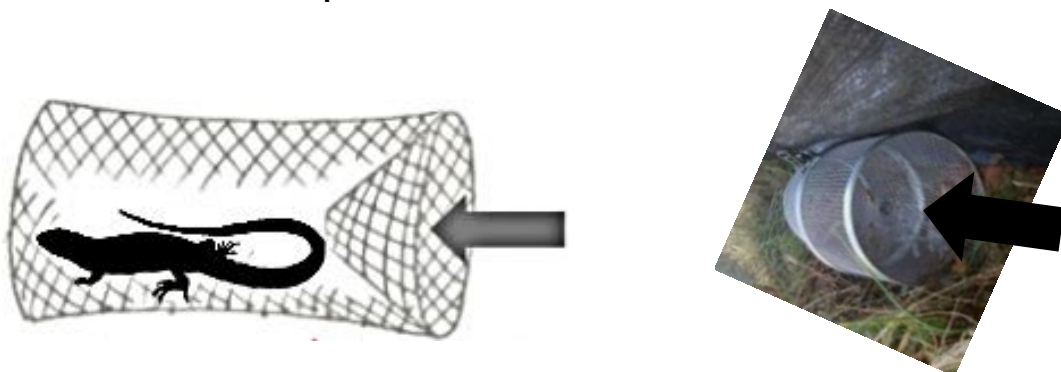


Figura. 6. Trampas de elongadas (cilíndricas) con embudos en los extremos.

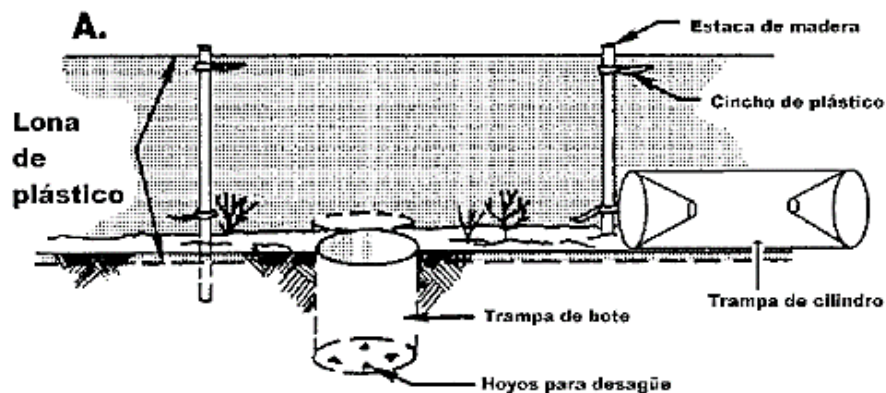


Figura 7. Trampa terrestre de cerco de desvío en combinación con trampa de fosos (botes) y de cilindro. (Fauna silvestre uni amazonia, 2013).

2.4 Métodos de medición de la biodiversidad

La vida puede ser expresada de muchas maneras, no existe una medida general de biodiversidad, sino más bien múltiples medidas de sus diferentes facetas. La medida escogida de biodiversidad puede influir en los hallazgos de un estudio en particular y puede revelar algo sobre los valores adjudicados por un investigador determinado a una faceta particular de la variedad de vida (Gaston & Spicer, 2004).

Los estudios sobre medición de biodiversidad se han centrado en la búsqueda de parámetros para caracterizarla como una propiedad emergente de las comunidades ecológicas. Sin embargo, las comunidades no están aisladas en un entorno neutro (Moreno, 2001). Por ello, para comprender los cambios de la biodiversidad con relación a la estructura del paisaje, la separación de los componentes alfa, beta y gamma (Whittaker, 1972).

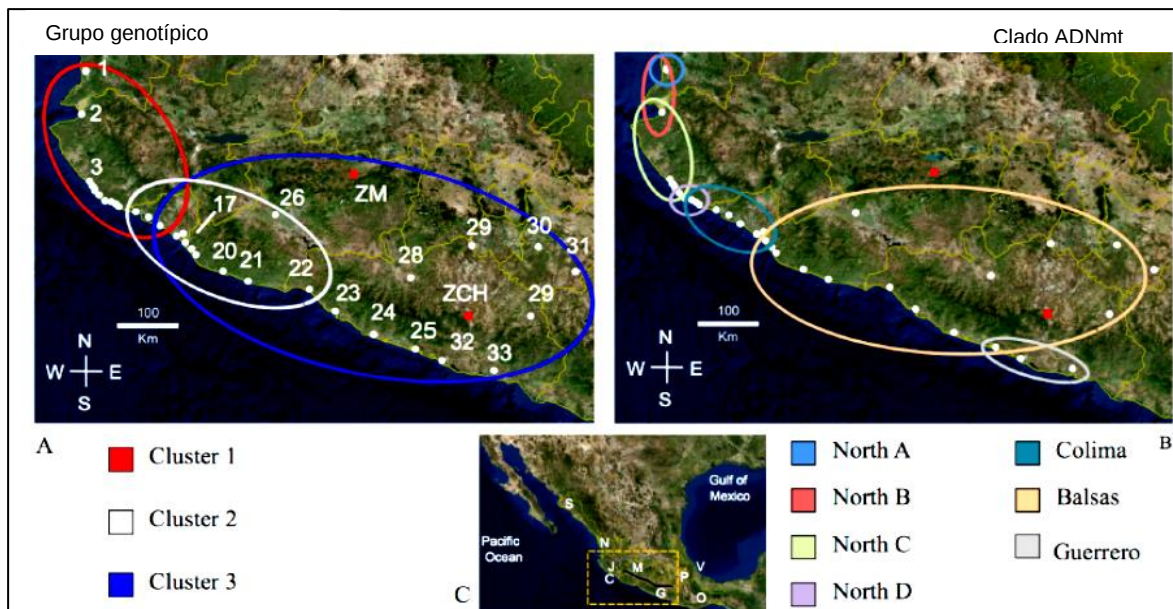


Figura 8. Entorno geográfico, muestreo y asignación de poblaciones genéticas de individuos cautivos de *C. pectinata* de México. (A) Distribución geográfica (óvalos) de los grupos genotípicos inferidos con ESTRUCTURA, y localidades de muestreo de individuos silvestres (puntos blancos). Para simplificar, sólo algunas localidades están numeradas. La ubicación del Zoológico de Morelia (ZM) y del Zoológico Zoolochilpan (ZCH) están marcados como cuadros rojos. Los detalles de las localidades se encuentran en el material suplementario disponible a petición (Zarza, Reynoso, & Emerson, 2016). (B) Distribución del clado de ADN mitocondrial y localidades de muestreo como en A. (C) Mapa de México con nombres de estados relevantes para este estudio (S: Sinaloa; N: Nayarit; J: Jalisco; C: Colima; M: Michoacán; G: Guerrero; O: Oaxaca; P: Puebla; V: Veracruz), área geográfica de conjunto de datos reducida (cuadrado amarillo, tal como se destaca en A y B) y ubicación de la Depresión de Balsas (línea negra). (D) ESTRUCTURA parcela que muestra tres grupos en las poblaciones silvestres reducido conjunto de datos, cada barra representa la proporción de la ascendencia de un individuo (valor Q). Para simplificar, sólo algunas localidades están numeradas. (E) Diagrama de barras que muestra el haplotipo de ADN mitocondrial de cada individuo recolectado en poblaciones silvestres; faltan las barras blancas. Para simplificar, sólo algunas localidades están numeradas. (F) Proporción de ascendencia de los individuos confiscados que viven en dos zoológicos de la UMA. (G) haplotipo de ADN mitocondrial de individuos confiscados alojados en zoológicos. En las Fig. F y E, los individuos recolectados en el Zoológico Zoolochilpan se muestran en el lado izquierdo de la línea negra (ZCH 1-9); los individuos recolectados en el Zoológico de Morelia se muestran en el lado derecho de la línea negra (ZM 1-15) extraído de Zarza, Reynoso, & Emerson (2016).

2.4.1 Índices de biodiversidad

La principal ventaja de los índices es que resumen mucha información en un solo valor y nos permiten hacer comparaciones rápidas y sujetas a comprobación estadística entre la diversidad de distintos hábitats o la diversidad de un mismo hábitat a través del tiempo (Moreno, 2001).

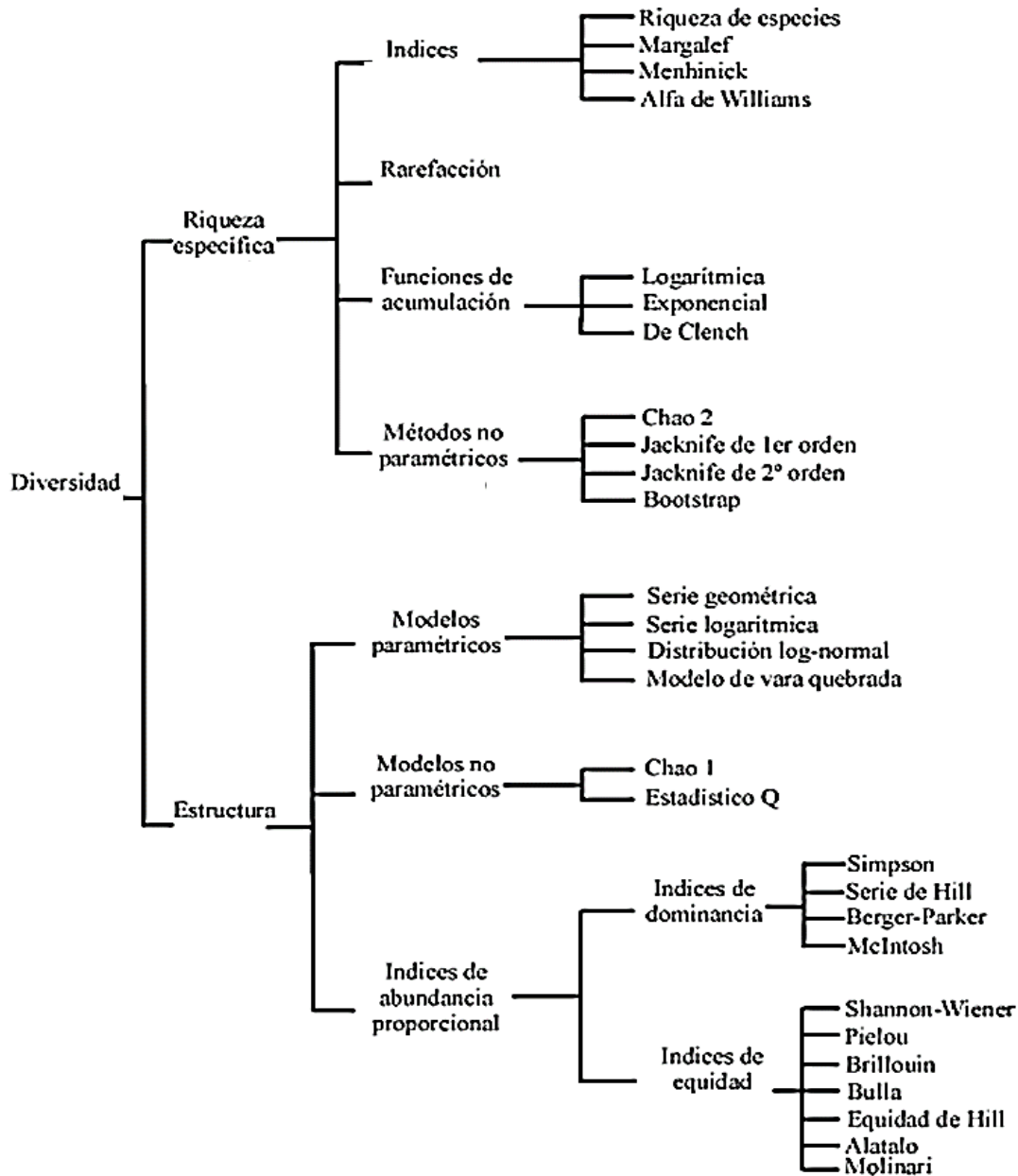


Figura 9. Clasificación de los métodos para medir la diversidad Alfa de Moreno (2001).

2.4.1.1 Alfa

La diversidad alfa es la riqueza de especies de una comunidad particular a la que consideramos homogénea, está dividida en dos grandes grupos; riqueza específica y estructura (Moreno, 2001) como se muestra a figura 9..

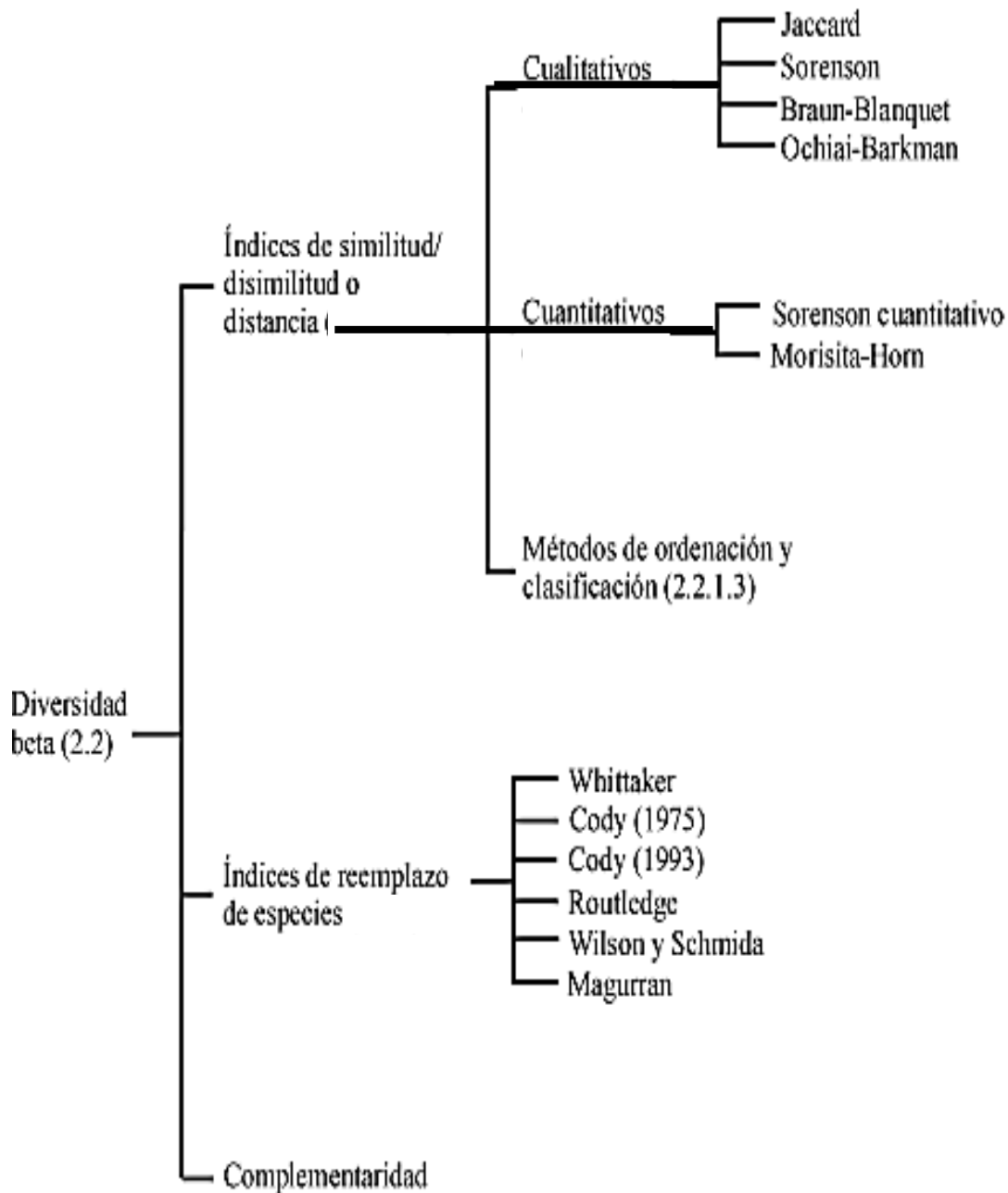


Figura 10. Clasificación de los métodos de medición de la diversidad Beta de Moreno (2001).

2.4.1.2 Beta

La diversidad beta es el grado de reemplazamiento de especies o cambio biótico a través de gradientes ambientales (Whittaker, 1972) (figura 10).

2.4.1.3 Gama.

La diversidad total o gamma de un paisaje, o área geográfica, es un producto de la diversidad alfa de sus comunidades y del grado de diferenciación beta entre ellas. La posición de la especie en un paisaje de comunidades, tal como se describe tanto en términos de hábitat como de relaciones de nicho, puede denominarse su ecotópico (Whittaker, 1972).

Moreno (2001) realizó una recopilación de índices que puede ayudar a solucionar el problema en la medición de la diversidad *gamma*. Como se menciona anteriormente se puede calcular con ayuda de la diversidad alfa; Riqueza de especies (Riqueza de especies) o Estructural (Shannon-Wiener o Simpson), los siguientes fórmulas y descripciones son tomadas de Moreno (2001) no se tomaron los ejemplos propuestos :

- Riqueza de especies: $Beta = \sum_j q_j (S_r - S_j)$

Donde

q_j = Peso proporcional de la comunidad j , basado en su área o cualquier otra medida de importancia relativa.

S_r = Número total de especies registradas en el conjunto de comunidades.

S_j = Número de especies registradas en la comunidad j .

- Cálculo basado en el índice de Shannon-Wiener: $H'_{beta} = -\sum_i P_i \ln P_i - \sum_j q_j H_j$

Donde

$$P_i = \sum_j q_j P_{ij}$$

que representa la frecuencia promedio de la especie i en el conjunto de comunidades, ponderada en función de la importancia de las comunidades (q_j).

- Cálculo basado en el índice de Simpson: $\lambda = \sum P_i^2$ y $Beta = \sum_j q_j \lambda_j - \sum_i P_i^2$

Donde

p_i = Abundancia proporcional de la especie.

$$D = 1 - \lambda$$

q_j = Peso proporcional de la comunidad j , basado en su área o cualquier otra medida de importancia relativa.

2.4.2 Diversidad Genética molecular

La variación genética es una condición *sine qua non* (sin la cual) la evolución es imposible (o la selección natural) y por tanto la vida (los sistemas genéticos) como

la conocemos. La evolución es un proceso por el que la variación dentro de las especies se transforma en variación entre especies. La variación es también esencial en la técnica del análisis genético. Sin variación genética no es posible obtener marcadores ni hacer disección genética.

De tal forma que los motores de la evolución están representados por la existencia de los dos procesos moleculares que generan la variación genética, 1) La mutación, que genera nueva variación genética; 2) La recombinación, que, a partir de la variación genética ya existente, produce nuevas combinaciones de variabilidad genética. Por otra parte, el fenómeno de La migración entre poblaciones y La introgresión (hibridación) entre especies son procesos poblacionales que también pueden inyectar nueva variación genética en las poblaciones y especies.

Por lo tanto, la cantidad de la variación genética en una especie está determinada por toda su historia evolutiva, en donde la selección natural y la deriva genética son las fuerzas moduladoras de dicha variación. Aunque los factores encargados del mantenimiento de la variación dentro y entre poblaciones es una cuestión todavía no resuelta. Una especie típica es polimórfica en alrededor de un tercio de los *loci* que codifican proteínas solubles y, en promedio, un individuo es heterocigoto en un 10% de sus *loci*. Pero estos valores de variación proteica son netamente inferiores a los hallados en el nivel de secuencias de ADN. Por ejemplo, en la especie *D. melanogaster* la heterocigosidad por nucleótido es 0,006, o sea, 6 de 1000 pares de bases difieren en dos secuencias cogidas al azar de una población (Barbadilla, 2018).

En la genética se distinguen varios niveles de variación. Así, la variación puede ser fenotípica o genotípica. La primera puede subdividirse a su vez en morfológica, fisiológica y conductual. Otra forma de clasificar la variación es en cuantitativa y cualitativa. El análisis genético de la primera es el objeto de la Genética cuantitativa. La variación cualitativa es la materia prima del análisis genético mendeliano. Sólo un cuarto de las mutaciones en *Drosophila* parecen ser cualitativas, analizables mendelianamente (Barbadilla, 2018).

Los enfoques que se han usado para entender la variación genética en especies mexicanas incluyen isoenzimas, polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP,

por sus siglas en inglés), polimorfismos de ADN amplificados aleatoriamente en mayor o menor grado (RAPD y AFLP), repetidos de secuencias internas (ASSR, por sus siglas en inglés), microsatélites y secuencias de ADN. La elección del marcador que se pretende utilizar depende de varios factores, tales como: *que se pretende, cuáles son las características del marcador, cual es el tipo de herencia, la facilidad de uso, la disponibilidad, el costo* etc (Piñero, Barahona, Eguiarte, Rocha, & Salas, 2008).

Aunque para elegir un marcador útil es necesario considerar, el modelo de mutación al que se ajusta, así las isoenzimas se ajustan a un modelo de alelos infinitos, los datos de secuencia de ADN usan un modelo de sitios infinitos. En cuanto a *que se pretende* se incluyen cuestiones tales como: ¿cuál es la magnitud, distribución y dinámica de los acervos silvestres de especies domesticadas?, ¿cuáles han sido los centros de origen y diversificación de las especies domesticadas?, ¿cuál es la mejor estrategia de conservación de la variación genética en especies domesticadas, especies raras o en peligro de extinción en México?, ¿cuál ha sido el tamaño histórico efectivo de la población de especies raras, claves o útiles y cómo se puede usar esa información para concebir el tamaño efectivo viable de las poblaciones?, ¿cuál es la asociación de parentesco entre animales y/o plantas de una población particular?, ¿cuál es la asociación entre los haplotipos o genotipos de especies patógenas y su grado de virulencia? (Piñero, 2008).

Los estimados que normalmente se utilizan para evaluar la variación genética incluyen la heterocigosis esperada, el polimorfismo, π y θ . Estos estimados se han desarrollado para todos los marcadores, aunque algunos de ellos, como la heterocigosis observada, no pueden estimarse usando métodos tradicionales con marcadores que muestran dominancia como los RAPD, AFLP o ISSR. Por ello se han desarrollado métodos bayesianos para estimar los estadísticos F_{IS} y F_{ST} de Wright. Los valores de π tienen la característica de ser estimados de la heterocigosis en el nivel nucleotídico, es decir, pueden ser interpretados como la heterocigosis esperada. Su método de estimación toma en cuenta la distancia que hay entre dos secuencias de ADN como el número de diferencias y lo corrige multiplicándola por las frecuencias de ambas secuencias. La suma de ese estimado para todas las

combinaciones posibles de pares de secuencias es π . Otro estimado de la diversidad genética en el nivel nucleotídico es el número de sitios segregantes S . El número de sitios segregantes es una manera muy precisa de estimar la variación, siempre y cuando el modelo de mutación sea de sitios infinitos y como consecuencia no haya homoplasia. Estos estimados pueden extrapolarse a secuencias de aminoácidos de forma sencilla (Piñero, 2008).

2.4.2.1 Frecuencias alélicas

Es el número relativo de alelos de cada tipo en los gametos presentes en una población. Según (Cabrero & Camacho, 2002) se puede calcular de dos maneras:

- Conociendo el número de individuos de cada genotipo

$$p = \frac{2n_{AA} + n_{Aa}}{2N} = \frac{n_{AA} + \frac{1}{2}n_{Aa}}{N}, \text{ y } q = \frac{2n_{aa} + n_{Aa}}{2N} = \frac{n_{aa} + \frac{1}{2}n_{Aa}}{N}$$

Dónde:

p = Frecuencia de A (alelo dominante)

q = Frecuencia de a (alelo recesivo)

n_{AA} = Número de individuos con configuración AA (homocigoto).

n_{Aa} = Número de individuos con configuración Aa (Heterocigoto).

n_{aa} = Número de individuos con configuración aa (Heterocigoto)

N = Número total de individuos.

- A partir de las frecuencias genotípicas:

$$p = \frac{n_{AA} + \frac{1}{2}n_{Aa}}{N} = \frac{n_{AA}}{N} + \frac{1}{2} \frac{n_{Aa}}{N} = X_{AA} + \frac{1}{2}Y_{Aa} \text{ y}$$

$$q = \frac{n_{aa} + \frac{1}{2}n_{Aa}}{N} = \frac{n_{aa}}{N} + \frac{1}{2} \frac{n_{Aa}}{N} = Z_{aa} + \frac{1}{2}Y_{Aa}$$

Donde

X_{AA} = Proporción genotípica de la configuración AA.

Y_{Aa} = Proporción genotípica de la configuración Aa.

Z_{aa} = Proporción genotípica de la configuración aa.

2.4.2.2 Frecuencias genotípicas

Es el número relativo de genotipos (variación de la secuencia de ADN) de cada clase de adultos en una población. La suma de cada genotipo tendrá como resultado

el número total de individuos, su frecuencia será menor a 1 (Cabrero & Camacho, 2002) como se observan en las siguientes formulas:

- Total, de genotipos.

$$N = n_{AA} + n_{Aa} + n_{aa}$$

Dónde:

N = Número total de individuos.

n_{AA} = Número de individuos con la configuración AA (Homocigoto).

n_{Aa} = Número de individuos con la configuración Aa (Heterocigoto).

n_{aa} = Número de individuos con la configuración aa (Homocigoto).

- Frecuencia genotípica.

$$X_{AA} = \frac{n_{AA}}{N}, \quad Y_{Aa} = \frac{n_{Aa}}{N}, \quad Z_{aa} = \frac{n_{aa}}{N}$$

Dónde:

X_{AA} = Frecuencia fenotípica de la configuración AA.

Y_{Aa} = Frecuencia fenotípica de la configuración Aa.

Z_{aa} = Frecuencia fenotípica de la configuración aa.

N = Número total de individuos.

2.4.2.3 Marcadores moleculares

Para el análisis de la variabilidad genética de muchas especies, se conocen una gran cantidad de marcadores genéticos y de técnicas moleculares, como los Polimorfismos de longitud de fragmento amplificado (AFLP), los Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP), la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), el Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), las isoenzimas, el polimorfismo de conformación de cadena simple monocatenario (SSCP), los espaciadores transcritos internos (ITS), los diversas tipos de secuencias satélites, y el marcador EPIC nuclear (Cruce de intrones con terminación de exón) entre otros (Atencia, 2018).

De manera general, los marcadores de ADN presentan una serie de ventajas frente a los proteicos: no se ven afectados por variaciones ambientales ni de desarrollo, muestran la base misma de la variación de los individuos, permiten seleccionar

regiones concretas dentro de la molécula de ADN para estudios determinados, el número de polimorfismos detectables es teóricamente ilimitado, permiten analizar tanto la información que se expresa como la que no y en la actualidad se han desarrollado un gran número de técnicas adecuadas a diferentes situaciones (Jiménez & Collada, 2000).

Los marcadores moleculares tienen diferentes características en cuanto a su tipo de herencia y dominancia; por tanto, la elección de los mismos debe hacerse pensando en la información que se quiere obtener. En ese sentido, al elegir la técnica a utilizar tendremos en cuenta si proporciona un marcador dominante o codominante, si maneja ADN nuclear (generalmente de origen biparental) o ADN mitocondrial de origen monoparental (materno) o ADN de cloroplasto, también de origen monoparental (dependiendo de las especies es paterno o materno). También será necesario tener en cuenta el coste y la dificultad de la técnica, así como la necesidad de información previa sobre la secuencia de ADN, o el uso de radiactividad (Jiménez & Collada, 2000).

El primer paso es siempre la extracción del ADN a partir del tejido deseado. Las diferentes técnicas difieren en el fragmento o fragmentos que se estudia y en la manera de aislarlo: enzimas de restricción, amplificación selectiva, o una combinación de ambos métodos. La separación de los fragmentos estudiados se realiza mediante electroforesis en geles de agarosa o acrilamida y se visualizan con diferentes técnicas de tinción (Jiménez & Collada, 2000).

Todos esos métodos de análisis de genética y biología molecular han sido utilizados desde hace ya varias décadas, para cuantificar y comprender la distribución y dinámica de la diversidad genética. Con lo cual, sobre la base de genotipos multilocus de diversos genes, tanto mitocondriales como nucleares, de secuencias no codificantes, así como de secuencias determinadas aleatoriamente, ha sido posible generar y recabar información sobre la composición genética y la estructura de las poblaciones de especies para obtener conclusiones importantes de su historia evolutiva y sus relaciones de parentesco, tanto a nivel de ciencia básica como también para intereses prácticos a nivel de conocimiento aplicado, mediante la correspondiente caracterización genética de cada población estudiada.

Estos procedimientos han sido utilizados ampliamente en la genética de la conservación de una gran cantidad de especies, para comprender los patrones de migración, para identificar individuos híbridos, para abordar el comercio ilegal de especies, la caza y la pesca, identificar translocaciones pasadas e informar la repatriación de individuos, e identificar el origen de individuos cautivos para informar la liberación de especies a su hábitat (Zarza, Reynoso y Emerson. 2016).

2.4.2.3.1 Marcadores mitocondriales

Los marcadores de ADN mitocondrial o polimorfismos del ADN mitocondrial (ADNmt) se han utilizado ampliamente en análisis de diversidad genética. El ADNmt haploide, este contenido en las mitocondrias del citoplasma celular, presenta un modo materno de transmisión, así como una alta tasa de mutación y no se recombina. Con ello permiten a los biólogos reconstruir relaciones evolutivas dentro de una especie y entre distintas especies valorando las pautas de mutación del ADNmt.

Los marcadores de ADNmt pueden también permitir la rápida detección de hibridación entre especies o subespecies de ganado. Los polimorfismos en la secuencia de la región hipervariable del bucle-D o región de control del ADNmt han contribuido en gran medida a identificar los progenitores salvajes de las especies domésticas, establecer pautas geográficas de diversidad genética, y a entender los procesos de domesticación de algunas especies.

Por ejemplo, se ha demostrado que el origen del ganado bovino europeo moderno tuvo lugar en Oriente Medio. Del mismo modo, se han observado en cabras múltiples orígenes maternos, con tres estirpes de ADNmt, siendo Asia y el Creciente Fértil los posibles centros de origen. También se descubrió un tercer linaje de ADNmt en ovejas chinas nativas, un cuarto en cabras chinas nativas, y un quinto en bovinos chinos. En gallinas asiáticas, se han descubierto nueve clados diferentes de ADNmt, lo cual sugiere orígenes múltiples en el Asia meridional y sudoriental. Siendo utilizados varios genes dependiendo de su velocidad de mutación e regiones particulares de sus secuencias, uno de los más utilizados son los marcadores de secuencias del gen ND4.

2.4.2.3.1.1 Gen ND4 mitocondrial

El gen ND4, que codifica para la subunidad 4 de la enzima NADH deshidrogenasa, ha sido ampliamente usado como marcador para estudios de genética de poblaciones y permite inferir la historia evolutiva de las poblaciones estudiadas, además, existe una vasta información disponible públicamente a través de internet, de todo tipo de estudios y de secuencia basados en el gen ND4, en los bancos de datos moleculares (GenBank, BOLD y EMBL), en donde se puede comparar e identificar las variaciones entre las secuencias nucleotídicas homólogas de poblaciones de diversas especies de todo el mundo (Atencia, 2018).

El gen mitocondrial ND4, codifica para la subunidad 4 de la enzima NADH-deshidrogenasa. Esta proteína es parte de un gran complejo enzimático conocido como complejo I, que es activo en las mitocondrias. Las mitocondrias son estructuras dentro de las células que convierten la energía de los alimentos en una forma que las células pueden utilizar. Estas estructuras celulares producen energía a través de un proceso llamado fosforilación oxidativa, que utiliza oxígeno y azúcares simples para crear trifosfato de adenosina (ATP), la principal fuente de energía de la célula (U.S National Library of Medicine , 2019b).

2.4.2.3.2 Marcadores nucleares

Existe una gran variedad de marcadores genéticos moleculares disponibles para detectar polimorfismos del ADN nuclear. Siendo los más utilizados los microsatélites. Aprovechando su cualidad de presentar una alta tasa de mutación que aunada a su naturaleza codominante permiten la estimación de la diversidad genética dentro y entre poblaciones, así como la mezcla genética entre ellas. Con este sistema se puede estimar el número medio de alelos (MNA) por población, y la heterocigosidad observada y esperada (H_o y H_e), que son los parámetros más usuales en la evaluación de la diversidad intrapoblacional. Aunque también se puede evaluar los parámetros más simples de la diversidad intrapoblacional con varios estimadores (F_{ST} y G_{ST}). Se usan muy frecuentemente para evaluar relaciones genéticas entre poblaciones e individuos mediante el cálculo de las distancias genéticas, como la de Nei (DS). Sin embargo, para poblaciones estrechamente emparentadas, en las que la deriva genética es el principal factor de

diferenciación genética, se recomienda la distancia Cavalli-Sforza modificada (DA), además se suele visualizar la relación genética mediante la reconstrucción filogenias utilizando método de adyacencia (N-J).

Otro tipo de marcadores nucleares son los SNP, que al ser marcadores bialélicos, poseen un contenido de información bastante bajo, y hay que usar muchos de ellos a la vez.

Los AFLP también son marcadores bialélicos dominantes. Las variaciones en muchos loci se pueden detectar simultáneamente en un microarray, aunque un inconveniente, es que muestra un modo dominante de transmisión (FAO, 2010).

Muchos genes son candidatos, por su importancia médica, o biotecnológica para detectar estos marcadores nucleares, como por ejemplo el gen TYR.

2.4.2.3.2.1 Gen TYR nuclear

La tirosinasa, codificada por el gen TYR, es responsable de dos de los primeros pasos en la producción de melanina y de otro paso intermedio. Convierte un componente proteico (aminoácido) llamado tirosina en otro compuesto llamado dopaquinona. Una serie de reacciones químicas adicionales convierten la dopaquinona en melanina en la piel, los folículos pilosos, la parte coloreada del ojo (el iris) y la retina (U.S National Library of Medicine , 2019a).

Las mutaciones en el gen TYR, representan uno de los principales factores que determina el color de los animales, y aunque en los humanos ha sido profundamente estudiado, incluso para proyectos de genética de poblaciones, como se explica a continuación, en iguanas aún falta mucho por comprender de su funcionamiento en la determinación de la coloración. Este gen es muy conservado a lo largo de la escala evolutiva, especialmente entre los animales como un gen ortólogo, manteniendo muy parecidas tanto sus secuencias nucleotídicas como sus estructuras dentro del cromosoma, en humanos en el cromosoma 11 en iguanas en el cromosoma 3 (NCBI, 2008).

Los humanos modernos somos genéticamente menos diversos que otros homínidos vivos, ya que la mayor parte de la diversidad genética humana se encuentra dentro de las poblaciones y no entre ellas.

Aunque una excepción a esa norma lo representa la variación del color de la piel, pues la variación genética entre poblaciones de este rasgo se ha estimado en un 88%, comparado con aproximadamente el 10-15% para los loci genéticos globales en promedio.

Se entiende que dicha alta diferenciación fenotípica se debe al efecto de la selección natural, demostrado por el patrón geográfico de variación en la pigmentación de la piel humana que se correlaciona con las diferencias latitudinales en el nivel anual de radiación UV, ósea que, el color de nuestra piel se define por la cantidad, la distribución intracelular y el recambio de melaninas, una mezcla de eumelanina fotoprotectora oscura y feomelanina clara.

Aunque se han propuesto varios mecanismos evolutivos para lo anterior, la más consistente supone que el grado óptimo de pigmentación de la piel es un equilibrio entre la piel lo suficientemente oscura como para proteger nuestras células de la radiación UV, pero lo suficientemente ligera como para permitir la producción suficiente de vitamina D. El aumento de la concentración de eumelanina protectora es esencial para evitar daños por quemaduras solares y una extensa fotólisis de folato en áreas (casi) ecuatoriales, mientras que podría ser dañino en regiones con un bajo nivel de UV anual debido a la síntesis reducida de vitamina D dependiente de UV.

En lo referente a los estudios moleculares, se han identificado alrededor de 170 genes de pigmentación con ortólogos humanos en ratones. Sin embargo, se sabe que solo una pequeña fracción de estos genes candidatos, incluidos TYRP1, OCA2, SLC45A2, SLC24A5, MC1R y KITLG, influyen en la variación normal del color de la piel en nuestra especie. Los ejemplos más llamativos de cambios sustitucionales únicos que explican una proporción sustancial de la variación del fenotipo de la piel y el color del cabello son: El polimorfismo no sinónimo en el gen SLC24A5, responsable de hasta un 38% de diferencia entre el índice de melanina europeo frente al africano de la piel. Una mutación en el gen TYRP1, que representa el cabello rubio en la población melanesia. La variación en el gen MC1R, se conecta al cabello rojo y rubio fenotipo de la piel en europeos y, posiblemente en neandertales.

Por otro lado, algunos genes, incluidos SLC24A5, SLC45A2 y KITLG, están enriquecidos con señales de selección positiva. Mientras que el gen MC1R tiene un exceso de mutaciones no sinónimas en Europa y Asia Oriental y muestra rastros de evolución relajada en ausencia de fuertes restricciones funcionales o incluso mejora selectiva de la diversidad genética en un entorno de baja radiación UV. Y seguramente muchos más genes de pigmentación puedan haber sido afectados por la selección en humanos anatómicamente modernos.

Un gen que ha llamado mucha la atención, por su importante función en la coloración de la piel los ojos y el cabello humanos, es el de la tirosinasa humana (gen TYR), que cataliza los dos primeros pasos, y al menos un paso posterior, en la conversión de tirosina en melanina. Esta proteína transmembranal de 529 aminoácidos está codificada por el gen TYR (11q14.3, MIM 606933), que tiene cinco exones y abarca poco más de 117 kb en total. Varios estudios de genotipado de SNP han sugerido el papel de este gen en la variación normal de la pigmentación de la piel. Un polimorfismo no sinónimo de TYR, rs1042602 (Ser192Tyr), se ha asociado con diferencias entre individuos con pigmentos claros y oscuros del sur de Asia. El alelo derivado de este SNP tiene una frecuencia específicamente alta en Europa, donde se asocia con el color de los ojos, las pecas y la pigmentación de la piel, y también con el riesgo de cáncer de piel (Hudjashov, Villems, & Kivisild, 2013). El gen TYR proporciona instrucciones para producir una enzima llamada tirosinasa. Esta enzima se encuentra en los melanocitos, que son células especializadas que producen un pigmento llamado melanina. La melanina es la sustancia que da color a la piel, el cabello y los ojos. La melanina también se encuentra en el tejido sensible a la luz en la parte posterior del ojo (la retina), donde desempeña un papel en la visión normal (U.S National Library of Medicine , 2019a).

En los reptiles. El melanismo es un fenómeno particularmente frecuente entre los reptiles, lo que parece indicar que proporciona algunas ventajas a los ejemplares de color más oscuro, que favorecería la regulación de la temperatura y otras funciones fisiológicas en estos animales ectotermos o de sangre fría

Por lo cual, el melanismo consiste en un exceso de pigmentación oscura (melanina) en la piel y es una de las variaciones cromáticas más frecuentes en la naturaleza,

junto con el albinismo (ausencia de pigmentación) y el leucismo (incapacidad para fijar la pigmentación en los tejidos). El ejemplo más conocido de animal melánico es sin duda la pantera negra, que no es una especie en sí, sino un leopardo o un jaguar de pelaje oscuro. Aunque el melanismo se debe a una mutación genética, para que el rasgo se mantenga a lo largo de generaciones debe aportar alguna ventaja adaptativa frente a los individuos de coloración normal.

De hecho, se han descrito varios tipos de melanismo adaptativo. En primer lugar, el melanismo de crípsis, que es raro en los reptiles, aunque se da en algunas especies como la lagartija de las Pitusas (*Podarcis pityusensis*), especie endémica de Ibiza y Formentera que utiliza las zonas de sombra para camuflarse. También aparece en las lagartijas leonesa (*Iberolacerta galani*) y aranesa (*Iberolacerta aranica*), ya que los individuos que habitan sobre pizarras son notablemente más oscuros que el resto, aunque sin llegar a ser melánicos. Este tipo de melanismo suele ser más frecuente en anfibios o mamíferos nocturnos que utilizan la oscuridad de la noche para camuflarse (Ortiz, 2019).

En cuanto a la genética de poblaciones de estas especies, se han logrado identificar algunos genes relacionados al albinismo por mutaciones específicas en el gen TYR de la serpiente rata japonesa *Elaphe climacophora* (Iwanishi, Shohei, Hiroki, & Nitasaka, 2018), y de la lagartija *Anolis sagrei* (Rasys, y otros, 2019), así como en el gen MCR1 de la cobra *Naja kaouthia*, (Suntrarachun, Chanhom, & Thaveekarn, 2015).

Además, como un importante recurso de investigación genética se ha secuenciado el gen TYR en diversas especies de reptiles: *Anolis carolinensis*, *Gekko japonicus*, *Elaphe climacophora*, *Python bivittatus* y *Pogona vitticeps* (NCBI-lizards, 2008), y se ha demostrado su origen ortólogo (NCBI-O, 2008), con lo cual ahora es posible desarrollar estudios más completos de mutaciones en dicho gen, considerando su alta homología tanto en estructura como en secuencias nucleotídica.

2.5 Métodos de biología molecular

De manera muy general, se han denominado como métodos de biología molecular a todas las estrategias de laboratorio que se utilizan cotidianamente para estudiar a la molécula de ADN, fundamentalmente para aislar ácidos nucleicos o extraerlos

con alta pureza, visualizarlos con métodos electroforéticos, cortarlos con enzimas de restricción, pegarlos con enzimas ligasa, amplificar una región en una enorme cantidad de moléculas, etc., todo ello para saber si por una mutación se modifica algún sitio específico de un gen, entre otras múltiples variantes. Existiendo una enorme cantidad de aplicaciones, en el diagnóstico de enfermedades hereditarias, en la búsqueda de alelos o marcadores moleculares asociados a características de interés, en el diagnóstico microbiológico, entre otras muchas otras.

Siendo sus procesos más fundamentales la extracción del ADN, la amplificación de ciertas regiones, la secuenciación y la clonación de segmentos de interés. Y desde luego se complementa con el poderoso análisis de plataformas bioinformáticas para desentrañar los mecanismos evolutivos, las relaciones filogenéticas, diagnósticos genéticos (Gallou, Suste, & Andrade, 2015).

2.5.1 Extracción de ADN

Todos los métodos de extracción de ADN, ya sean tradicionales, utilizando kits o con equipos automatizados, están fundamentados en los mismos procesos: lisado de tejido para liberar el ADN de las células; aislamiento del ADN mediante precipitación, lavado del ADN, recuperación de ADN puro.

La extracción de ADN por métodos tradicionales (Fenol-cloroformo, Acetato de potasio, Bromuro de cetil-trimetil amonio-CTAB entre otros), aunque han sido estandarizados para diferentes protocolos tanto de tejidos como de tipos de organismos, aun requieren de una gran cantidad de procesos, de delicadas adecuaciones de puesta a punto, de largos periodos de tiempo y contar con personal humano dedicado exclusivamente a ello. Generalmente son utilizados para grandes cantidades de muestra y utilizan grandes cantidades de reactivos, además de equipos variados. Así que cuando logran ser adaptados para un laboratorio en donde su uso es rutinario y de gran escala (cientos o miles de muestras mensuales) su efectividad puede ser redituable y muy productiva.

Por otra parte, los métodos de extracción de ADN basados en Kits comerciales o sistemas automatizados, aunque inicialmente son comparativamente más caros, representan una gran ventaja en cuanto a la reducida cantidad de tiempo que emplean, también requieren de mínimos recursos humanos, pues un solo técnico

puede hacerse cargo de una gran cantidad de muestras, además de ser procesos utilizar una mínima cantidad de equipos y reactivos, y lo más importantes es, que debido a su alto control de calidad y amabilidad de uso, su eficiencia es superior a los procesos tradicionales. Por lo cual estos métodos son de gran interés para laboratorios en donde se requiere de alta precisión y efectividad, siendo muy prácticos para el manejo de moderadas cantidades de muestras mensuales (decenas) (Fraga, 2004).

Uno de los métodos más utilizados en la actualidad, debido a su fácil disponibilidad, a la variedad de tipos de muestras que puede procesar y por su relación costo-beneficio, es el Kit de extracción de ADN conocido como “DNeasy® Blood & Tissue Handbook” de la empresa QIAGEN®. Este método, requiere de lisar las muestras de tejido usando proteinasa K para liberar el ADN de las células, la unión selectiva de ADN a las membranas de columnas de pequeñas columnas de carga, centrifugación utilizando amortiguadores específicos para permitir que los contaminantes salgan de la columna, dos pasos de lavado eficientes con soluciones apropiadas y la elución del ADN con tampón que deja listo al ADN con un nivel de alta pureza con el que se pueden realizar subsiguientes procesos de biología molecular como la amplificación por PCR.

2.5.2 Amplificación de ADN

En la actualidad existen diferentes técnicas moleculares que brindan gran soporte a los estudios genéticos de todo tipo de organismos, y sin lugar a dudas la reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*) ha revolucionado los últimos 20 años la investigación biológica e incluso interdisciplinaria.

La PCR permite la síntesis exponencial (amplificación) de una determinada región de ADN utilizando a una enzima polimerasa termoestable, un par de oligonucleótidos flanqueantes de la región de interés, denominados también “*primers*” u “oligonucleótidos”. Esta técnica es un proceso cíclico donde la molécula de ADN es inicialmente desnaturalizada (apertura de la doble hélice) por el calentamiento a altas temperaturas, continuando con la hibridación o alineamiento de los *primers* a menor temperatura para su posterior polimerización por la enzima.

Todo el ciclo anterior (desnaturalización, alineamiento y polimerización) es repetido por un número determinado de veces (figura 11).

Al concluir la reacción, los productos de amplificación son analizados por electroforesis en geles de agarosa acrilamida según se requiera (Gallou, Suste, & Andrade, 2015).

2.5.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es una técnica que ha revolucionado el modo de manipular, clonar y detectar fragmentos de ADN, lo que le ha valido a su descubridor K. B. Mullis el Premio Nobel. Después de su descubrimiento en 1983, se ha convertido en una de las técnicas básicas de Biología Molecular, ampliamente utilizada debido a su rapidez, especificidad, flexibilidad y aplicabilidad.

Entre sus aplicaciones generales encontramos la generación de sondas, clonación, secuenciación, diagnóstico clínico y tipificación de individuos y microorganismos, siendo entonces muy utilizada en medicina forense y en estudios filogenéticos.

La PCR es una falsificación en el laboratorio de la replicación celular del ADN. La replicación del ADN es la duplicación semiconservativa de la cadena de ADN.

Los siguientes componentes son obligatorios para producir una PCR en el laboratorio:

1. ADN (muestra de ADN que contiene la secuencia de interés que queremos copiar)
2. Una ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa)
3. Soluciones tampón
4. Los 4 nucleótidos trifosfatados
5. 2 segmentos cortos de una hebra de ADN (primer)
6. Tubos de pared delgada
7. Termociclador (máquina que puede generar gradientes de temperatura drásticamente en periodos de tiempo muy cortos)

El fundamento de la PCR son los cambios de temperatura y el efecto que estos gradientes producen en el ADN. En la reacción de PCR, la siguiente serie de pasos es repetida en un rango de 20-40 ciclos (figura 11).

Paso1: Desnaturalización del ADN: comienza con un calentamiento inicial que desnaturaliza el ADN blanco a 94-95 °C o más. Este primer paso del ciclo dura en promedio 90 s a 3 minutos. En el proceso de desnaturalización, las dos cadenas del ADN se separan una de la otra y permiten que la matriz (“template”) se encuentre como cadena simple, necesaria para la actividad llevada a cabo por la polimerasa termoestable durante los pasos de amplificación

Paso2: Hibridación de los cebadores o *primers*: En el siguiente paso del ciclo, la temperatura se reduce a un valor que oscila en el rango de los 40 °C a los 60 °C. A esta temperatura, cada uno de los oligonucleótidos (*primers*) hibrida con la secuencia complementaria en cada una de las cadenas simples de ADN, que se han separado en el paso anterior, y sirven como cebadores para la síntesis, por la polimerasa termoestable. La síntesis de ADN se inicia cuando la temperatura de la reacción llega al valor óptimo para la actividad de la polimerasa. Para la mayoría de las polimerasas esta temperatura se encuentra en, aproximadamente los 72 °C. Luego se permite la síntesis durante 30 s a 2 min.

Paso3: La ADN polimerasa extiende la cadena de ADN: a 72°C la ADN polimerasa extiende la cadena de ADN adicionando nucleótidos al extremo 3' prima de los *primers* (Cortazar & Silva, 2004; Sánchez *et al*, 2014).

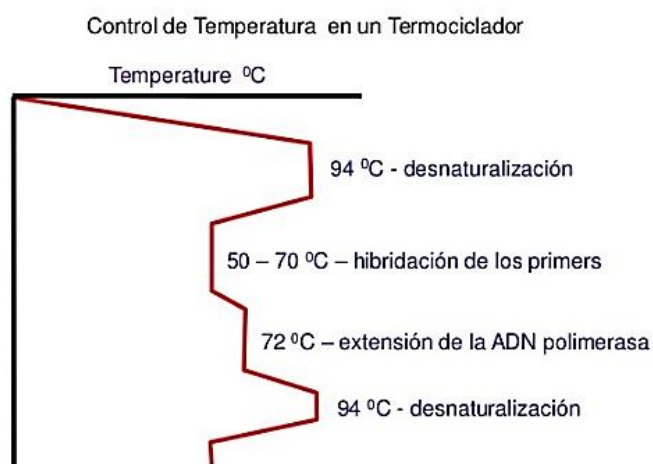


Figura 11. Principales etapas del proceso de amplificación del DNA por el método de PCR.

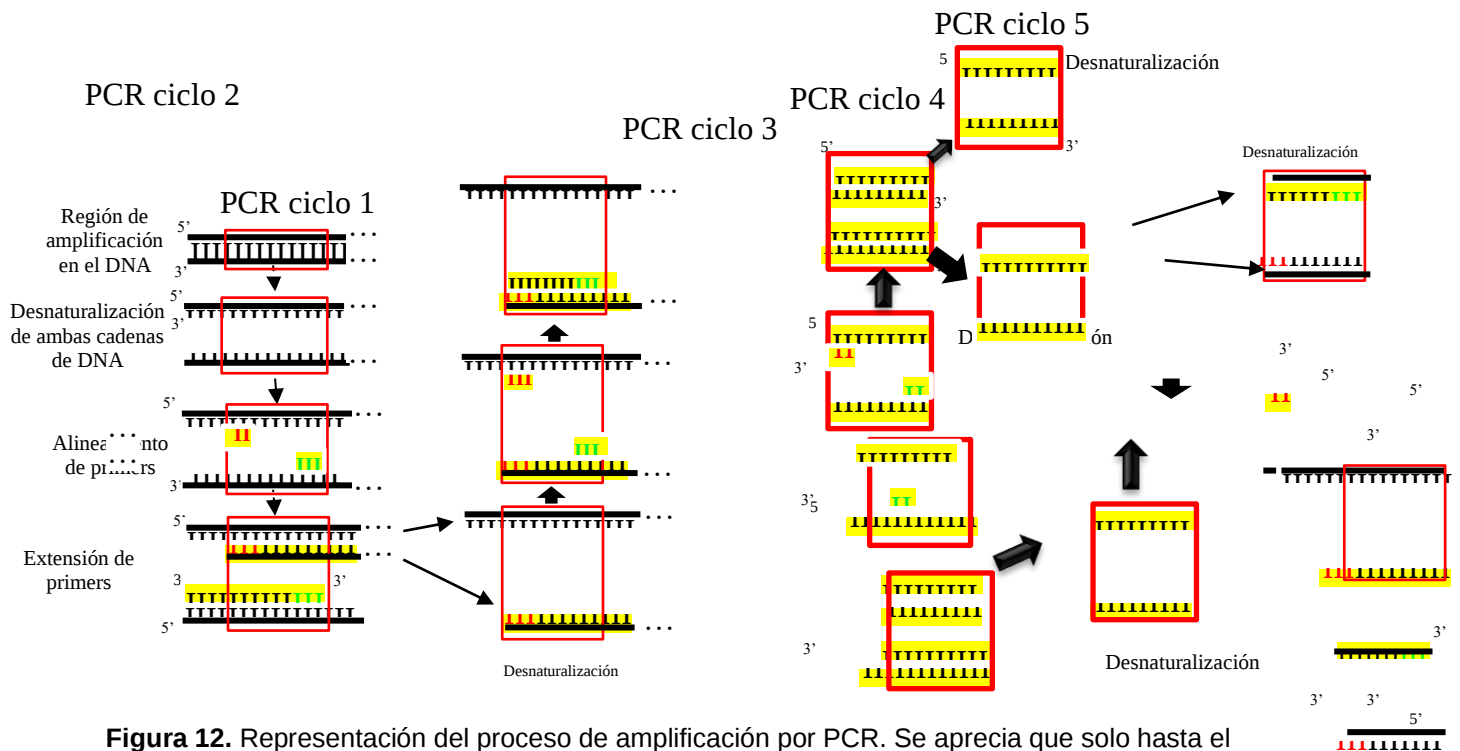


Figura 12. Representación del proceso de amplificación por PCR. Se aprecia que solo hasta el ciclo 5 se sintetiza una mayor población de secuencias de interés.

2.5.3 Secuenciación de ADN

Una secuencia de ADN se refiere al orden de nucleótidos de los cuales está compuesto el ADN. Hay cuatro nucleótidos diferentes en el ADN los cuales tienen respectivamente en su estructura las bases adenina, timina, citosina y guanina. Secuenciar el ADN es un proceso que permite obtener información sobre enfermedades, procesos metabólicos y procesos evolutivos.

Antes de secuenciar el ADN, los procesos previos de extracción y amplificación deben asegurar una muestra de ADN de alta pureza y de fragmentos de ADN de tamaños adecuados. El siguiente paso antes de secuenciar, es la purificación de los fragmentos de ADN.

Los fragmentos de ADN obtenidos y purificados son enviados a secuenciar a instituciones o empresas comerciales que cuenten con equipos muy sofisticados y

con reactivos especializados muy costosos. Además, se debe contar con técnicos especialistas que cuenten con mucha experiencia.

El proceso más popular para obtener las secuencias de ADN se conoce como método de Sanger, que se fundamenta en la habilidad que tienen las polimerasas de introducir tanto deoxinucleótidos como dideoxinucleótidos a una cadena de ADN en crecimiento. Utilizando la técnica en sistemas automatizados de tecnología capilar y de fluorescencia, se puede detectar de manera diferencial cada uno de los di-deoxinucleótidos que se adicionan al final de un fragmento en la polimerización, los cuales son separados de otros fragmentos de diferente tamaño, por medio de una electroforesis capilar y a través de un software, se descifra la secuencia de un fragmento de ADN.

Existen otras técnicas de secuenciación como la técnica de pirosecuenciación que se basa en la detección de la señal luminosa generada por una reacción quimioluminiscente, en la cual se utiliza como sustrato el pirofosfato que se libera como resultado de la incorporación de un nucleótido a la cadena de ADN naciente. Otra técnica más reciente es la secuenciación con chip semiconductor. Este método es basado en la capacidad de detectar un ion de hidrógeno $[H^+]$, proveniente de la polimerización de la cadena complementaria a un ADN patrón, los dNTP's son incorporados durante un ciclo de secuenciación, permitiendo la formación del enlace fosfodiéster y una posterior liberación de PPI e H^+ . Esta polimerización se lleva a cabo en conjunto de pocillos, colocados sobre un sensor de efecto de campo sensible a iones, utilizados en las mediciones de pH en soluciones, por lo que cuando cambia la concentración de iones, cambia por consecuencia la corriente del transmisor y genera una señal eléctrica detectada en el chip.

Después del proceso de secuenciación, el software del equipo nos envía los resultados en archivos electrónicos que contienen el electroferograma y toda la información del análisis en formatos como el AB1.

La última etapa para la identificación molecular es el análisis de secuencia de ADN con métodos bioinformáticos, comparando nuestras secuencias obtenidos contra secuencias de referencia, obtenidas de bancos de datos como el GenBank. Estas

comparaciones permitirán descubrir similitudes funcionales y estructurales, y las diferencias entre múltiples secuencias biológicas.

Además, este análisis bioinformático puede incluir: Corrección y ensamble de las secuencias de ADN; Búsqueda de secuencias registradas; Alineación de secuencias de ADN y Análisis filogenético (Gallou, Suste, & Andrade, 2015).

2.6 Bioinformática

La Bioinformática es una subdisciplina de la biología y las ciencias computacionales que se encarga de adquirir, almacenar, analizar y diseminar la información biológica, en gran parte correspondiente a las secuencias de ADN y aminoácidos. La Bioinformática usa programas informáticos que tienen muchas aplicaciones, como, por ejemplo: determinar las funciones de genes y proteínas, establecer relaciones evolutivas y predecir la conformación tridimensional de las proteínas.

La Bioinformática es un campo de las ciencias computacionales que lleva a cabo el análisis de secuencias de moléculas biológicas. Normalmente se aplica a los genes, al ADN, al ARN, o a las proteínas, y resulta especialmente útil para comparar secuencias de genes y proteínas entre distintos organismos, pudiendo ver las relaciones evolutivas entre organismos, e intentando averiguar cuál es la función de dichos genes y proteínas. Podríamos decir que la Bioinformática se encarga de la parte lingüística de la genética. De la misma manera que los lingüistas estudian los patrones en el lenguaje, los bioinformáticos estudian los patrones en las secuencias de ADN o de proteínas (National Human Genome Research Institute NIH, 2019).

Por otra parte, las tareas más importantes de las que se ocupa la bioinformática consisten en entender las correlaciones, las estructuras y los patrones en los datos biológicos. En los últimos años, la Bioinformática ha atraído la conjugación de varias disciplinas, entre las que están la informática, las matemáticas, la estadística, la química y las ciencias biológicas no tradicionales. Esto se debe a la disponibilidad de enormes cantidades de datos biológicos públicos y privados, y a la necesidad imperiosa de transformar datos en información biológica útil y en conocimiento (Meneses, Rozo, & Franco, 2011).

La Bioinformática abarca tres tipos de actividades:

1. La creación de bases de datos (BD) que almacenen, organicen y gestionen gran cantidad de datos biológicos. Cada BD debe disponer de un motor de búsqueda que permita localizar rápidamente la información. Las BD deben ser accesibles a través de Internet y contar con un diseño intuitivo que facilite su uso.
2. El desarrollo de algoritmos y herramientas estadísticas que permitan establecer relaciones entre los datos como, por ejemplo, métodos para comparar secuencias, patrones de expresión génica o estructuras tridimensionales de proteínas.
3. El desarrollo e implementación de herramientas informáticas que permitan analizar e interpretar los datos (por ejemplo: métodos para la anotación de secuencias de ADN o de proteína, o métodos para predecir la estructura y/o función de una proteína). Estas herramientas pueden ser páginas web o programas informáticos que se pueden descargar e instalar en un ordenador personal. Muchos de estos programas pueden funcionar en distintos sistemas operativos como Windows, Apple, Linux o Android.

Gracias a las aportaciones de la bioinformática, la secuenciación del genoma humano se consiguió antes de lo programado. Por lo tanto, la bioinformática está siendo fundamental en la utilización de la información genética a las aplicaciones biomédicas y sociales. Sin embargo, una de las principales limitaciones cada vez más apremiante, se refiere a los escasos de profesionales y desde luego la escasa implementación de infraestructuras en bioinformática para la formación básica dentro del área médica (Meneses, Rozo, & Franco, 2011).

2.6.1 Plataformas bioinformáticas

Las Plataformas Bioinformáticas son estructuras digitales, conformadas por bancos de datos, diversos tipos softwares y herramientas de trabajo, que funcionan para la organización y el análisis de todo tipo de datos biológicos, fundamentados a partir del análisis de secuencias de genes y proteínas, para identificar e interpretar las variantes existentes y poderlas comparar.

Posibilitando, además, el análisis de experimentos de expresión génica, sus interacciones en los procesos de regulación y vías metabólicas, la identificación de

biomarcadores asociados con enfermedades o caracteres de interés humano, luego entonces el análisis de la variación molecular y genética dentro y entre poblaciones, así como de individuos representa la base de estas plataformas.

Estas plataformas se encuentran alojadas en instituciones gubernamentales, académicas, y de carácter particular (Alva, Nam, Soding, & Lupas, 2016).

2.6.1.1 NCBI

Existen varias instituciones que ofrecen servicios de bases de datos biológicos o plataformas bioinformáticas, siendo una de las más populares el National Center for Biotechnology Information o NCBI. En este sitio web podemos encontrar una colección anotada de todas las secuencias de ADN de todos los genes disponibles públicamente además de una gran variedad de herramientas de análisis y softwares para estudiarlos. El NCBI a través de su plataforma bioinformática GenBank proporciona y fomenta el acceso público a toda la comunidad científica la información de secuencia de ADN más actualizada y completa.

Al ser un sitio confiable usado a nivel mundial para la obtención de información veraz, ha utilizado de manera común para realizar investigación bioinformática y así poder mostrar resultados confiables, ya que se basa en un riguroso escrutinio y evaluación de expertos y líderes científicos para el registro o anotación de cualquier secuencia o dato de interés biológico de cualquier especie (NCBI, s.f.).

2.6.1.2 GenBank

Es una base de datos de secuencias genéticas de NIH, que a partir del NCBI, promueve la ciencia y la salud al proporcionar acceso a información biomédica y genómica de una colección anotada de todas las secuencias de ADN disponibles ya publicadas. GenBank forma parte de la base de datos llamada International Nucleotide Sequence Database Collaboration, que comprende el ADN DataBank de Japón (DDBJ), el European Nucleotide Archive (ENA) y GenBank en NCBI. Estas tres organizaciones intercambian datos diariamente (NCBI, s.f.).

2.6.1.3 ENSEMBL

Ensembl es un buscador de genomas para genomas de vertebrados que apoya la investigación en genómica comparativa, evolución, variación de secuencia y regulación transcripcional. Ensembl anota genes, calcula múltiples alineamientos,

predice la función reguladora y recopila datos de enfermedades. Las herramientas de Ensembl incluyen BLAST, BLAT, BioMart y el Variant Effect Predictor (VEP) para todas las especies compatibles.

Es una plataforma bioinformática, utilizado para estudiar la secuencia y la estructura de genomas, genes y proteínas de vertebrados, que apoya la investigación en genómica comparativa, evolución, variación de secuencia y regulación transcripcional. Ensembl también es un sitio de anotación de genes, de herramientas disponibles para calcular múltiples alineamientos y para predice la función reguladora y recolecta datos de enfermedades o de caracteres de interés. Las herramientas de Ensembl incluyen BLAST, BLAT, BioMart y el Variant Effect Predictor (VEP) para todas las especies compatibles (Ensembl, 2019).

2.6.1.4 OMIM

OMIM es una plataforma digital, que mantiene un compendio completo y autorizado de genes humanos y fenotipos genéticos, que está disponible y actualizado diariamente, y que contienen información sobre todos los trastornos mendelianos conocidos y más de 15,000 genes.

OMIM se centra en la relación entre fenotipo y genotipo.

Esta base de datos fue iniciada a principios de la década de 1960 por el Dr. Victor A. McKusick como un catálogo de rasgos y trastornos mendelianos, titulado Herencia mendeliana en el hombre (MIM).

En 1995, el NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica) desarrolló OMIM para la World Wide Web. OMIM es editado en el Instituto McKusick-Nathans de Medicina Genética, Facultad de Medicina de la Universidad Johns Hopkins, bajo la dirección de la Dra. Ada Hamosh (JHU, 1995).

2.6.1.5 Albinism Database

La base de datos de albinismo (Albinism DatabAse) es editada por William Oetting, de la Universidad de Minnesota. Esta base de datos incluye mutaciones asociadas con todas las principales formas conocidas de albinismo oculocutáneo y ocular. La base de datos de albinismo es parte de las bases de datos de mutaciones específicas de locus de la sociedad de variación del genoma humano.

Esta base de datos de mutaciones forma parte de las bases de datos de mutaciones específicas de locus de la Sociedad de Variación del Genoma Humano (HGVS) (Albinism Database, 2009).

2.6.2 Softwares bionformáticos

2.6.2.1 Primer-BLAST

Es un software disponible dentro de las herramientas proporcionadas en GenBank, que está diseñado a base de algoritmos ya estipulados con los parámetros ya requeridos para el diseño de Primers. El algoritmo de búsqueda de *primer* encuentra cebadores de genotipado de PCR, multiplex y SNP óptimos con la temperatura de fusión más precisa utilizando el algoritmo vecino más cercano. Los cebadores se analizan en busca de estructuras secundarias, dímeros, horquillas, homologías y propiedades físicas antes de informar los mejores para su secuencia, en un orden ordenado. Cargue el gen de interés de NCBI, seleccione un rango de búsqueda, (NIH, s.f.).

2.6.2.1.1 Diseño de primers

El diseño de *primers* representa un complejo, profundo y muy sofisticado ejercicio de investigación, que inicialmente requiere del estudio de genomas o genes de interés utilizando plataformas bioinformáticas (GenBank, Ensemble, entre otros) que cuenten con bastos bancos de secuencias de genomas, genes y proteínas, además de proporcionar softwares para realizar búsquedas y comparaciones (BLAST) de las estructuras y las secuencias de genomas o genes de interés, y también disponer de otros softwares que realicen la construcción de *primers* (primer-Blast) a partir de la programación de algoritmos que determinen las específicas y precisas características que deben tener cada par de primers.

Los *primers* son pares de moléculas cortas de una sola hebra de ADN, constituidas a cada una por 10-30 nucleótidos, también son llamados cebadores, iniciadores o arrancadores.

La función de cada par de *primers* es delimitar, a partir de todo un genoma completo, una pequeña región de ADN, de aproximadamente 100 a 1000 pares de base (pb), para que con dichos *primers* la secuencia de interés sea amplificada, es decir, reproducida en millones de copias, mediante el método de la amplificación en

cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en ingles). Posteriormente esa secuencia amplificada, también conocida como amplicon, podrá ser secuenciada con equipos automatizados, para poder conocer la secuencia específica de sus nucleótidos, y con ello estudiarla mediante procesos bioinformáticos para compararla con secuencias de genes o de genomas completos, determinando su ubicación y las mutaciones o variaciones que pudiera contener en comparación con dichas secuencias de referencia.

El adecuado diseño de los *primers* se traduce en el éxito de la amplificación de la región de ADN que se pretende replicar mediante la técnica de PCR. Por lo tanto, se deben de tomar en cuenta las principales variables para el diseño de los *primers*, ya que en realidad se propone una replicación de la síntesis de ADN como lo hace la célula, solo que realizada en condiciones artificiales o sea in vitro.

Por lo que es necesario cuidar una serie de parámetros básicos y realizar las especificaciones pertinentes para el diseño de *primers*:

1. Lo más complejo y fundamental es identificar la secuencia nucleotídica de interés. Por lo que hay que realizar un completo estudio bioinformático acerca de la secuencia nucleotídica de interés, buscando en bancos de genes la secuencia completa del gen involucrado, así como la secuencia de la región específica de interés.
2. Una vez localizada la región genética de interés se procede a la realización de un estudio detallado de la misma, también en plataformas bioinformáticas, para conocer como está estructurada (exones, intrones, promotores, mutaciones etc.) tanto la secuencia específica, como el gen completo y dese luego la posición en su respectivo cromosoma.
3. Después de todo lo anterior, ahora se requiere de considerar las características de los *primers* a construir.
 - a) Singularidad del Primer: solo puede haber una zona complementaria de ADN donde el primer se ligue, por complementariedad nucleotídica a un sitio único de la secuencia de interés, lo cual significa que la secuencia del primer debe ser irrepetible.

- b) Longitud del Primer: este afecta en su especificidad y su temperatura de hibridación. El Primer tendrá como mínimo 15 bases para asegurar su especificidad, normalmente los *primers* están en el rango de 17-28 bases de longitud. Cuanto más largo sea el oligonucleótido más eficiente será la hibridación. La meta es diseñar un oligonucleótido con una temperatura de hibridación de al menos 50°C.
- c) Composición de Bases: la composición de bases afecta la especificidad de la hibridación, así como su temperatura. Lo mejor es evitar *primers* con secuencias de conformación GCGCGC o ATATATAA. También hay que evitar secuencias ricas en polipirimidinas (T, C) y polipurinas (A, G). Un contenido de G+C en el rango de 50-60% nos proporcionara una temperatura de hibridación y estabilidad, debido a que poseen triples puentes de hidrogeno.
- d) Estructura interna: si los *primers* son complementarios entre si y se hibridan entre ellos en lugar de hibridarse con el ADN muestra, la eficiencia de la PCR se verá afectada drásticamente. Sin embargo, estas potenciales estructuras no se presentan debido a que la temperatura de hibridación no les permite formarse. Por ejemplo, los dímeros y orquillas de firman a 30°C pero en el ciclo de la PCR, la temperatura más baja es de 60°C.
- e) Complementariedad de pares de *primers*. Los *primers* trabajan en parejas: forward primer y reverse primer, un tema muy importante es su temperatura de hibridación que debe ser mutuamente compatible. La máxima diferencia permisible en la temperatura de dos primers es de 3°C.
- f) Temperatura: En general una temperatura de fusión de 55°C-72°C es la más adecuada.
- g) Secuencia 3' terminal. Se sabe que la posición 3' terminal de los oligonucleótidos de PCR es esencial para controlar el apareamiento incorrecto. Ya hemos visto el problema de la homología del oligonucleótido en esas regiones. Otra variable que hay que considerar es que haya algún residuo de G o C en el extremo 3' del oligonucleótido. Este "cepo de GC" (en inglés "CG clamp") ayuda a asegurar que el extremo 3' hibride

correctamente debido a los enlaces de hidrogeno que se dan entre los residuos de GC. también ayuda a mejorar la eficiencia de la relación de PCR minimizando cualquier deshibridación que pudiese ocurrir. Los oligos con secuencias inestables en el extremo 3' a menudo son más específicos ya que en potencial de apareamiento en lugares incorrectos es menor. Por lo general, esta condición se puede cumplir incluyendo como mucho 2 residuos G o C en las últimas 5 bases del extremo 3' terminal.

h) Secuencia 5' terminal y regiones centrales: Es conveniente incluir en esas zonas “cepos GC” para mayor estabilidad a la hibridación de oligonucleótidos con su secuencia diana. Los *primers* ideales deben carecer de estructuras secundarias, así como de complementariedad entre sí. Si existe complementariedad en el extremo 3' se induce a que ambos iniciadores se traslapan en dicho extremo y sirvan de templados y a su vez de iniciadores para que la polimerasa los extienda generando así pequeñas ampliaciones referidos como dímeros de *primers*, reduciendo la cantidad de oligos disponibles en la reacción, provocando un menor rendimiento del amplicon de interés (Cortazar & Silva, 2004; Sánchez, *et al*, 2014).

2.6.2.1.2 BLAST

Los softwares o programas de análisis de datos conocidos como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, por sus siglas en inglés), son una versátil herramienta utilizada para alinear dos o más secuencias de datos, especialmente de secuencias de datos biológicos de nucleótidos y proteínas.

Las opciones que se encuentran en los softwares BLAST nos permiten hacer búsquedas en diferentes bases de datos y además permite ajustar diversos parámetros del programa para precisar las comparaciones a las necesidades del usuario. Además, estos programas calculan la significación estadística de la homología entre las diferentes secuencias comparadas, identificando las regiones de similitud entre las secuencias biológicas que se someten a comparación.

Este programa puede comparar las secuencias de nucleótidos o proteínas, cargando directamente cada secuencia completa en la ventana dispuesta del programa, o bien accesarlas directamente de los bancos de datos (GenBank,

ENSEMBLE etc.) utilizando las claves de acceso de las bases de datos de las secuencias previamente anotadas que se desee comparar (NIH.BLAST, 2019).

2.7 La Reserva de la Biosfera de la Sierra de Huautla (REBIOSH)

La REBIOSH fue decretada en 1999, y es considerada como región prioritaria para la conservación (Arias, D., *et al.*, 2002) al ubicarse dentro de la Cuenca del Río Balsas, sigue constituyendo un reservorio de biodiversidad de gran relevancia para la conservación del trópico seco de México, actualmente la REBIOSH es el último reducto de SBC (Selva Baja Caducifolia) bien conservado en Morelos (figura 13).

En la REBIOSH se presentan tanto ecosistemas terrestres predominantes como acuáticos. El principal tipo de ecosistema terrestre corresponde a la selva baja caducifolia. Los ecosistemas acuáticos en su mayoría son de temporal y en ellos existen un número limitado de especies vegetales con afinidades acuáticas. El único afluente permanente en la REBIOSH es el Río Amacuzac, el cual es el más importante del estado de Morelos. Se ubica al sur del estado de Morelos, cubre una superficie de 59,030-94-15.9 ha y tiene un rango altitudinal que va de los 700 a los 2,200 m.s.n.m. El límite natural al suroeste es el Río Amacuzac.

La REBIOSH está comprendida de dos provincias fisiográficas, la primera incluye al Eje Neovolcánico, particularmente la subprovincia del sur de Puebla, y la segunda provincia está situada en la zona occidental de la REBIOSH, que pertenece a la Sierra Madre del Sur, representada por la subprovincia de los Lagos y Volcanes del Anáhuac (CONANP, 2005).

La REBIOSH se localiza en la región central del país, en la franja conocida como Centro y Eje Neovolcánico, principalmente en el estado de Morelos, y compartiendo colindancias con los estados de Puebla y Guerrero.

La REBIOSH está conformada por los municipios de Amacuzac, Puente de Ixtla, Jojutla, Huitzuc de los Figueroa y Buenavista de Cuellar.

La REBIOSH es administrada por la CONANP y la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CONAMP, 2005).



Figura 13. Ampliación del mapa del estado de Morelos. En el mapa de México se muestra que el estado de Morelos se localiza entre dos zonas fisiograficas, el eje neovolcanica y la Sierra madre del Sur. Imágenes modificadas respectivamente de (Gambusino prospector, 2015) y (CONAMP, 2005).

2.7.1 Huautla

La localidad de Huautla pertenece al municipio de Tlaquiltenango con un área aproximada de 78.94 hectáreas (INEGI, 2019), se encuentra dentro de la REBIOHS y es uno de los principales poblados dentro de la reserva. El régimen de tendencia de tierra en el poblado de Huautla es mayormente ejidal, sin embargo, existe una pequeña parte que es de régimen privado.

Presenta un régimen ecológico descrito como selva baja caducifolia, en donde se aprovechan diversos recursos de flora y fauna, además el poblado de Huautla cuenta con una presa que ofrece esencialmente servicios de pesca rustica, pequeñas lanchas de remos y utilizan redes y chinchorros, administrada por la misma organización ejidal a los pobladores locales (Secretaria de Medio ambiente y Recursos Naturales, 2007).

2.8 Coatetelco

Las lagunas de Coatetelco y El Rodeo, se localizan en la zona sur del estado de Morelos y son utilizadas para diversos usos, como riego, vaso de almacenamiento (El Rodeo) así como servicios destinados a actividades turísticas-recreativas, estas lagunas se ubican relativamente cercanas entre sí, se ubican en el municipio de Miacatlán, mismas que presentan una cuenca de aportación de aproximadamente 30.44 km² y 6.25 km² respectivamente (Medina, *et al*, 2018).

EL municipio de Coatetelco cuenta con un ecosistema terrestre que está constituido principalmente Selva baja caducifolia, también tiene una laguna rodeada por una gran oferta de restaurantes de tipo rural, y su oferta turística se complementa por las ruinas prehispánicas que son visitadas por turismo principalmente de tipo nacional, a quienes se les ofrecen productos locales. Es una localidad turística de corte rustico en donde está prohibido utilizar lanchas de motor, por lo que el impacto aun es controlado, pues también la pesca es organizada por los mismos ejidatarios, y no cuenta con áreas naturales protegidas (Secretaría de Desarrollo Sustentable, 2013; Estado de Morelos, sf.a).

2.9 Tequesquitengo

Tequesquitengo es un poblado del municipio de Jojutla y Puente de Ixtla, al sur del estado de Morelos, El municipio de Jojutla se encuentra ubicado al noroeste del estado de Morelos y tiene una extensión territorial de 142.633 Km², que representa 3.2% de la extensión territorial del estado. El Lago de Tequesquitengo se localiza al poniente de la parte central del Estado de Morelos, entre las coordenadas 18°38' de latitud norte y 99°15' de longitud oeste, a una altitud de 900 m.s.n.m. (Estado de Morelos, sf.b). Su turismo es de alto impacto, pues se practican diversos deportes modernos como paseos en lanchas de motor, esquí con lanchas de motor, bongi, paracaidismo, ala delta, paseos en avioneta, y la pesca, aunque también es administrada por los mismos ejidatarios utiliza redes y lanchas de motor.

El poblado de Tequesquitengo cuenta con un clima es cálido subhúmedo. El monitoreo satelital del gobierno del estado muestra 360 días de sol promedio anual. Es uno de los pocos sitios en el país donde se practica el paracaidismo, vuelo en

aviones ultraligeros y vuelos en globo aerostático los 365 días del año (Medina, *et al*, 2018).

3. Justificación

Las comunidades han aprovechado este recurso como alimento y comercialmente (mascotas), pero al mismo tiempo es cazada por considerarse venenosa, estas acciones han contribuido a la reducción en el tamaño poblacional de manera importante, perdiendo variabilidad genética y aumentando el riesgo de desaparecer a mediano plazo, lo que ha llevado a catalogarlas como prioritarias para la conservación en la NOM-059-SEMARNAT-2010. Por lo cual es urgente realizar proyectos de recuperación de sus poblaciones y ecosistemas en la REBIOSH al ser el último reducto de SBC bien conservado en Morelos, con especial énfasis en lo concerniente a su diversidad genética, ya que no se cuenta con inventarios faunísticos completos y mucho menos con su caracterización genética; para poder establecer sitios de protección para su refugio y dispersión

4. Hipótesis

Las poblaciones de iguana negra son afectadas por las actividades humanas, y han sido diagnosticadas como especies amenazadas, por haber disminuido la cantidad de individuos de sus poblaciones en sus hábitas (PROFEPA, 2010).

Si el impacto antropogénico afecta negativamente la variabilidad gen especies que habitan en el ecosistema de Selva baja caducifolia, entonces al caracterizar genéticamente la biodiversidad de la iguana negra en diversos ambientes afectados por el impacto antropogénico, la diversidad genética será reducida en los ambientes con mayor impacto ambiental.

5. Objetivos.

General

Comparar la diversidad genética de *Ctenosaura pectinata*, en tres ambientes con diferente nivel de impacto antropogénico.

Particular

Caracterizar la diversidad genética de la iguana negra en la localidad de Huautla dentro de la REBIOSH, en la zona de turismo rustico de Coatetelco y en la zona de alto impacto turístico de Tequesquitengo.

6. Diseño experimental

Diseño Experimental:

- 3 áreas de muestreo: 1Huautla; 2Coatetelco; 3Tequesquitengo.



Figura 14. Diseño experimental comparando el estado de diversidad genética de *Ctenosaura pectinata* en tres lugares con distinto impacto antropogénico.

7. Material y Métodos



Figura 15. Esquema general de los métodos utilizados.

7.1 Muestreo

7.1.1 Sitios de colecta

Las tres zonas de colecta se seleccionaron de acuerdo a su nivel de impacto antropogénico, Huautla, Coatetelco y Tequesquitengo (figura. 16), se localizan en el estado de Morelos y su régimen ecológico corresponde a la Selva Baja Caducifolia, ecosistema en el que se desarrollan las poblaciones de iguana negra (*C. pectinata*).

Cada una de estas tres zonas mantiene un nivel de impacto turístico diferente, el de mayor grado de afectación lo presenta la población de Tequesquitengo debido al turismo de alto impacto, especialmente los fines de semana, debido a la alta oferta de actividades de recreación en el lago de Tequesquitengo. El segundo lugar de impacto turístico lo representa la comunidad de Coatetelco, debido a que su principal oferta de recreación turística lo representa su zona arqueológica y las actividades turísticas, de carácter rusticas, ofrecidas en el lago Coatetelco. Finalmente, la zona de Huautla que pertenece a un área natural protegida, La Reserva de la Biosfera de la Sierra de Huautlala (REBIOSH) es la de menor impacto antropogénico, ya que cuenta con una unidad de manejo de los recursos naturales, administrada por las autoridades ejidales, lo que permite un manejo moderado del manejo de los recursos naturales además de que su turismo es prácticamente local, de las familias o amistades de la región.

Coatetelco



Tequesquitengo



Huautla



Figura 16. Imágenes de un aspecto de la oferta turística de Coatetelco, Tequesquitengo y de Huautla en la REBIOS. (AlMomentoQueretaro, 2019), (Zona Turistica, s.f.), (fr-ca.facebook.com).

7.1.2 Método de colecta

Las colectas se realizaron durante 6 episodios, distribuidos a lo largo de los meses de julio y agosto de 2018.

La búsqueda y captura de iguanas se llevó a cabo entre las 10:00 a las 16.00 horas, considerando que durante estas horas se registran los picos de actividad más altos para esta especie.

Se recorrieron transectos de 2 kilómetros, con recorridos en zigzag, siguiendo las condiciones del terreno. Los organismos se buscaron en árboles, montículos de rocas y piedras, pequeñas cuevas y oquedades en tierra y árboles, y a la orilla de cuerpos de agua (figura 17A).

Aunque se utilizaron varas con una cuerda amarrada formando una horquilla de nudo corredizo en la punta, que se coloca alrededor de la cabeza de la iguana y mediante un movimiento rápido hacia abajo se atrapan sin maltrato alguno, la principal estrategia de colecta se realizó directamente a mano, contando con la ayuda de personas experimentadas en la caza de iguanas en cada localidad (Ramos, 2016).

Una vez colectado un organismo se realizaron las mediciones y la toma de muestra de cola, cortando 2 cm del extremo de la cola de cada individuo y se almaceno en ETOH al 100% manteniendo en hielo los tubos con las muestras hasta su traslado al laboratorio de la Universidad Tomiga Nakamoto, en donde se transfirieron a refrigeración a 4°C hasta su extracción de ADN (figura 17 B-C).

El área de extracción de tejido en la cola fue desinfectada con ETOH, antes y después de la extracción, se aplicó presión a la herida hasta que cese la hemorragia y se selló con cinta adhesiva estéril para prevenir la infección, se tomaron en cuenta

las consideraciones para manejo, toma de muestras y traslado propuestos por el comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Querétaro (Zarza, Reynoso, & Emerson, 2008; Pasachnik *et al.* 2010; UAQ, 2016).



Figura 17. Búsqueda y muestreo de iguanas. A) Iguana asoleándose sobre montículo rocoso. B y C) Mediciones de iguana y toma de muestra de cola.

7.2 Biología Molecular

Los métodos de biología molecular que se han utilizado durante el desarrollo de este proyecto de investigación fueron: la extracción y purificación de ADN; la visualización del ADN extraído mediante electroforéticos; la amplificación de regiones específicas mediante PCR utilizando *primers* singulares; un nuevo proceso de purificación por columnas y centrifugación de los amplicones; y finalmente la secuenciación de esos fragmentos.

Todos esos procedimientos de Biología Molecular se complementaron con diversos análisis bioinformáticos, el diseño de *primers*, el análisis de las secuencias obtenidas mediante softwares bioinformáticos.

7.3 Método de extracción de ADN

Se utilizó el método de extracción de ADN por columnas y centrifugaciones, con el Kit de extracción de ADN conocido como “DNeasy® Blood & Tissue” de la empresa QIAGEN (QIAGEN, 2006).

La estrategia de extracción de ADN se realizó de acuerdo al protocolo de procedimientos del manual de extracción de ADN Qiagen (DNeasy Blood and Tissue Handbook) (figura 18), únicamente modificando la cantidad de tejido a 12.5

miligramos de cola de iguana, después de haber realizar un proceso de puesta a punto del método, como se aprecia en los resultados de la curva de cantidad de tejido, en el apartado de resultados (figura 24).

Se utilizó proteinasa K para liberar el ADN de las células; columnas con membranas de afinidad de ADN; centrifugaciones con previa carga de amortiguadores específicos para lavados del ADN; y la elución del ADN con tampón que deja listo al ADN con un nivel de alta pureza con el que se pueden realizar subsiguientes procesos de biología molecular como la amplificación por PCR (figura 19).

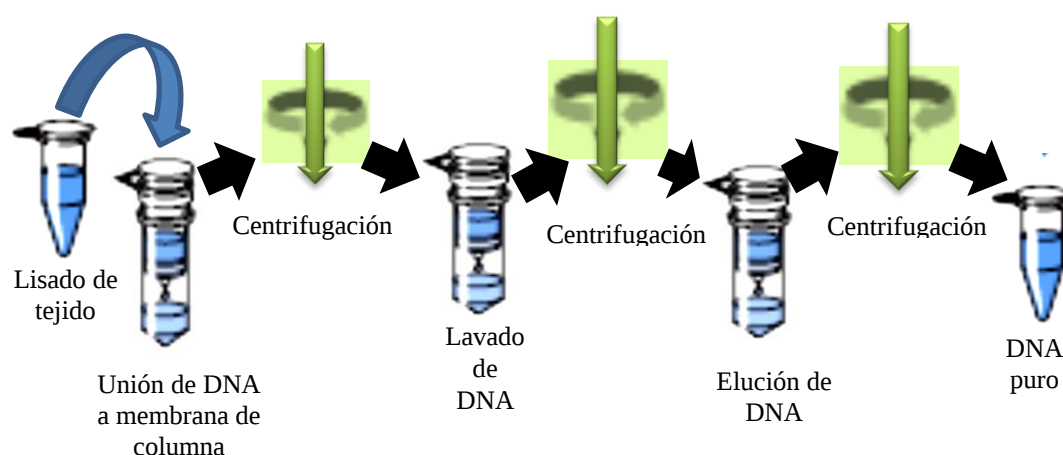


Figura 18. Procedimientos generales del método de extracción de ADN por el método de columna de afinidad y centrifugaciones, utilizando el kit comercial DNeasy® Blood & Tissue de Qiagen.

7.3.1 Electroforesis

Las muestras de la extracción de ADN fueron analizadas en electroforesis en gel de agarosa, utilizando 5 μ L de cada muestra de ADN y 1 μ L de glicerol para la mezcla de carga. Mientras que para la muestra del marcador de peso molecular se utilizaron 5 μ L de marcador de peso molecular y 1 μ L de glicerol.

Cada una de estas mezclas fueron cargadas en cada uno de los posos del gel de agarosa al 0.8% preparado en amortiguador TAE 1X, y teñido con bromuro de etidio. A este gel montado dentro de la cámara de electroforesis, conteniendo amortiguador TAE 1X, se le aplicó un voltaje de 100 volts x 30 minutos.

Finalmente, el gel fue revelado en cuarto oscuro a través de la luz UV de una lámpara ultravioleta compacta de mano UVP, con múltiples longitudes de onda de 254/302/365 nm. Y se tomó una imagen con cámara de teléfono celular.

7.3.2 Diseño de primers

7.3.2.1 Primers para gen ND4

7.3.2.1.1 Identificar a las especies de reptiles genéticamente más emparentadas con *C. pectinata*.

Basándonos en la literatura científica especializada acerca de la filogenia de reptiles, identificamos a las especies genéticamente más emparentadas con *C. pectinata*.

7.3.2.1.2 Obtener las secuencias ortólogas del ADN mitocondrial de las especies de reptiles más emparentadas con *C. pectinata*.

Utilizando la plataforma bioinformática GenBank, obtuvimos las secuencias de ADN mitocondrial de las especies de reptiles más emparentadas con *C. pectinata*.

7.3.2.1.2 Estructura del gen mitocondrial ND4

Con base en la literatura científica especializada acerca de la filogenia de reptiles, y con la plataforma bioinformática identificamos a las especies genéticamente más emparentadas con *C. pectinata*.

1. Obtener la estructura del gen mitocondrial ND4, para la especie más emparentadas con *C. pectinata*.
2. Alineamiento Blast.
3. Obtener las secuencias nucleotídicas de la región homologa para los Primers ND4F y LeuR (Arevalo, 1994).
4. Alineamiento manual: Comparar las secuencias homologas a los primers ND4F y LeuR, propuestos por Arevalo 1994, de las especies más emparentadas a *C. pectinata*.

7.3.2.2 Primers para gen TYR

Considerando que no existen reportes de diseños de *primers* para el gen TYR de *C. pectinata*, y que tampoco existen secuencia anotadas del gen TYR para *C. pectinata*, para diseñar los primers para amplificar los exones del gen TYR de *C. pectinata*, planteamos una estrategia de 3 etapas de investigación:

1. Literatura científica especializada de acerca de la filogenia de lagartos. Identificar a las especies de reptiles genéticamente más emparentadas con *C. pectinata*.
2. Plataforma ENSEMBL: Obtener la estructura de la región del gen TYR para la especie más emparentada con *C. pectinata*.
3. Gen Bank: Obtener la secuencia nucleotídica del gen TYR de la especie más emparentada de *C. pectinata*.
4. *Primer-Blast*
 - Diseño de *primers* para amplificar los 5 exones del gen TYR.
 - Determinar las especificaciones básicas para los algoritmos del diseño de *primers*.
 - Ingreso de especificaciones en software Primer-BLAST.
 - Resultado de la construcción de *primers* en software Primer-BLAST
 - Obtención de las secuencias nucleotídicas de los *primers* generados.
 - Obtención de las posiciones de los *primers* sobre la región nucleotídica de la mutación del principal gen del Albinismo.
 - Selección de los *primers* que cubran toda la región de las mutaciones.

7.3.3 Método de amplificación del ADN

7.3.3.1 Gen Tyr y gen ND4

Las amplificaciones de ADN se realizaron en el Laboratorio de Bioquímica Molecular de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES–IZTACALA, UNAM, utilizando el Termociclador Mycycler™ Thermal Cycler–BIORAD.

Para ambos tipos de genes, gen TYR y gen ND4, las muestras de extracción de ADN, a partir de colas de iguana, fueron amplificadas por la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Mullis *et al.*, 1986), utilizando el protocolo de amplificación de ADN “Top Taq Maxter Mix” de Qiagen. Es un proceso muy sencillo, práctico y eficiente, pues cuenta con una mezcla maestra de reacción (buffer, nucleótidos, polimerasa) a la que solo es necesario añadir el ADN molde y los *primers*, para arrancar los ciclos de amplificación (Qiagen, 2010).

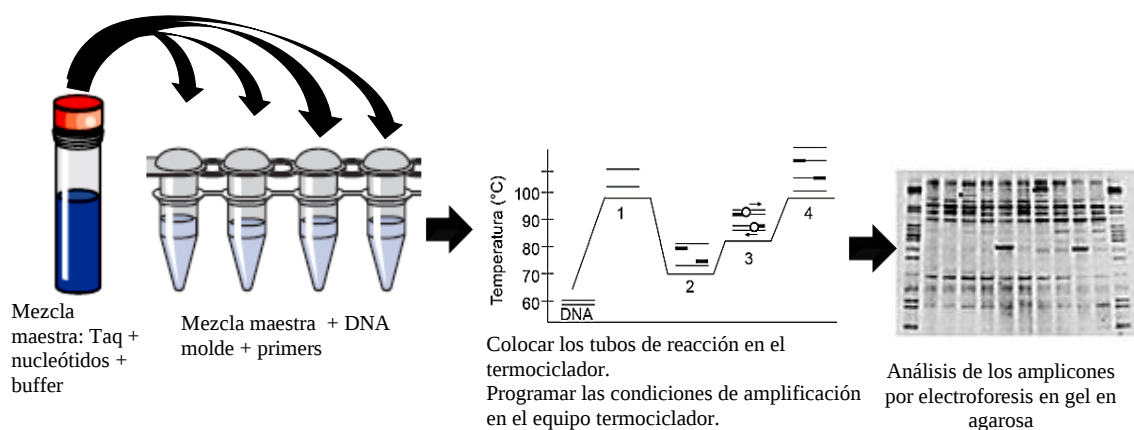


Figura 19. Esquema de los procesos fundamentales de la amplificación del ADN por PCR de punto final. Preparación de tubos con mezcla de reacción completa, amplificación del ADN por PCR en termociclador y electroforesis en gel de agarosa.

7.3.3.2 Condiciones de amplificación gen ND4

En la tabla 2 se muestran las cantidades de cada reactivo para una mezcla de reacción, de acuerdo al protocolo Top Taq Maxter Mix de Qiagen y en la tabla 3 se muestra las condiciones de amplificación utilizados en este trabajo. Una vez terminada la amplificación las muestras se almacenaron las muestras a 4 °C.

Tabla 2. Cantidades utilizadas en este trabajo para la amplificación de las muestras de ADN mitocondrial.

Sustancia	Volumen (µL)
TopTaq Master Mix	12.5
Primer Forward	0.5
Primer reverse	0.5
ADN molde	1.0
H ₂ O (libre de ARNasas)	10.5
Total	25

Tabla 3. Condiciones de los ciclos de amplificación PCR de acuerdo al protocolo seguido por Zarza, Reynoso, & Emerson (2008).

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	5 min
40 ciclos	Desnaturalización	30 s
	Alineamiento	40 s
	Extensión	1 min
Extensión final	72	5 min

7.3.3.2 Condiciones de amplificación para el gen TYR

En la tabla 4 se muestran las cantidades de cada reactivo para una mezcla de reacción, de acuerdo al protocolo Top Taq Maxter Mix de Qiagen y en la tabla 5 se muestra las condiciones de amplificación utilizados en este trabajo. Una vez terminada la amplificación las muestras se almacenaron las muestras a 4 °C.

Tabla 4. Cantidades utilizadas en este trabajo para la amplificación de las muestras de ADN nuclear.

Sustancia	Volumen (µL)
TopTaq Master Mix	12.5
Primer Forward	0.5
Primer reverse	0.5
ADN molde	1.0
H ₂ O (libre de ARNasas)	10.5
Total	25

Tabla 5. Condiciones de los ciclos de amplificación PCR de acuerdo al protocolo seguido por (Wang, y otros, 2017).

Paso		Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial		95	3 min
35 ciclos	Desnaturalización	95	30 s
	Alineamiento	55	30 s
	Extensión	72	45 s
Extensión final		72	7 min

7.4.4 Método de secuenciación del ADN

El sistema de secuenciación automatizada de electroforesis capilar, inicialmente requiere de la preparación de la muestra en placas de 96 pocillos, en donde cada fragmento de ADN en una muestra es marcado químicamente con un colorante fluorescente (figura 20), de la siguiente manera: cada una de las muestras con amplicones producidos por PCR, se diluyeron en relación 1/10 w/w, utilizando 1 µl de la dilución del producto amplificado; 9,75 µl de HiDi Formamide y 0,25 µl ROX-500.

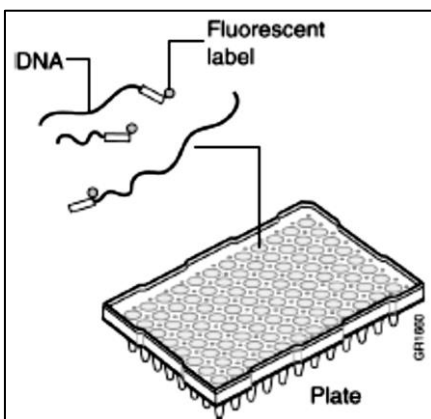


Figura 20. Marcación con colorantes fluorescentes del ADN amplificado por PCR.

En seguida, las placas de 96 pocillos, conteniendo el ADN amplificado ya marcado, se cargó en el equipo secuenciador “ABIPRISM 3100 Genetic Analyzer de Applied Biosystem” (figura 22) del laboratorio de bioquímica molecular de la UBIPRO en la FESI-UNAM, para realizar el análisis de secuenciación por el método de electroforesis capilar (figura 21).

De manera automática las moléculas de ADN marcadas, de manera automática son inyectadas electroforéticamente en delgados capilares, la electroforesis de todas las muestras comienza al mismo tiempo cuando se aplica un voltaje en todos los capilares. Y entonces de acuerdo a la longitud de cada fragmento son separados, los fragmentos de ADN migran hacia el otro extremo de los capilares, y los fragmentos más cortos se mueven más rápido que los fragmentos más largos.

Posteriormente, los fragmentos entran en la celda de detección óptica, y se mueven a través del camino de un haz de excitación. El haz de excitación hace que el tinte en los fragmentos florezca, para determinar el orden de las cuatro bases desoxirribonucleótidos de cada fragmento, todo ello en una sola ejecución, al mismo tiempo se estima la concentración relativa de cada fragmento.

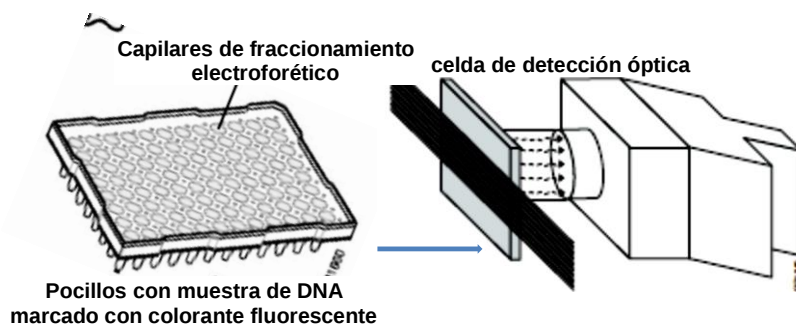


Figura 21. proceso de detección de luz fluorescente para detectar y clasificar cada nucleótido marcado.



Los datos analizados se visualizan con el software ABI PRISM ADN Sequencing Analysis (para la secuenciación) (Biosystems, 2002).

Una vez obtenidas las secuencias problema serán comparadas con las secuencias de la base de datos del Centro Nacional para la Información de la Biotecnología (NCBI, GenBank), mediante la búsqueda BLAST para caracterizar al ejemplar.

7.4.5 Análisis Bioinformática

7.4.5.1 Plataforma GenBank de NCBI

La plataforma GenBank aporta su banco de datos de genes, para identificar las secuencias nucleotídicas parciales o totales, de los genes anotados para todos los organismos.

También, de esta plataforma utilizaremos las herramientas o softwares BLAST y Primer-BLAST, para realizar las comparaciones e identificación de secuencia específicas entre diferentes secuencias nucleotídicas, y la construcción de los primers requeridos, respectivamente.

7.4.5.2 Plataforma ENSEMBL

Esta plataforma cuenta con varias herramientas y bancos de datos, de los cuales utilizaremos las construcciones de la estructura de los genes de interés, así como su procesamiento por *splicing*.

8 Resultados

8.1 Muestreo

Además de los individuos silvestres, muestreados en las localidades de Coatetelco, Tequesquitengo y Huautla, adicionalmente en la UMA de Barranca Honda de Yauteppec, Mor., nos permitieron tomar muestras de 11 individuos *C. pectinata* mantenidos en cautiverio y una muestra de *Heloderma sp.*, por otra parte colectamos una muestra de ajolote *Ambistoma Sp.*, en Cahuacan, municipio de Nicolás Romero Edo . de Mex. (tabla 6).

Tabla 6. Resultado del proceso de muestreo y toma de tejidos.

Localidad	Número de Individuos iguanas	Organismo externos
Coatetelco.	3	-
Tequesquitengo.	3	-
Huautla (REBIOSH).	4	-
UMA Barranca Honda, Yautepec.	11	1 <i>Heloderma sp.</i>
Estado de México (Cahuacán)	-	1 ajolote sp.
Total	21	

A cada organismo colectado le fue cortada 2 cm del extremo de la cola y se almaceno en ETOH al 100%, manteniendo en hielo los tubos con las muestras hasta su traslado al laboratorio de la Universidad Tomiga Nakamoto, en donde se transfirieron a refrigeración a 4°C hasta su extracción de ADN. Todos los organismos diferentes de *C. pectinata*, so manipulados de igual manera que *C. pectinata*, para considerarlos como grupos externos en los análisis filogenéticos.

8.2 Extracción de ADN

8.2.1 Curva de concentración de tejido

Se pesaron 5 muestras de tejido (tabla 7), de cola de iguana de un solo individuo, almacenado a 4°C durante 17 meses, con la finalidad de determinar la cantidad óptima de tejido para este tipo de muestra, se siguió el protocolo para el procedimiento de extracción de ADN con el kit "DNeasy Blood & Tissue Handbook.

Tabla 7. cantidad de tejido de cola de iguana, utilizado para determinar la masa óptima utilizando el protocolo de extracción de ADN por el método DNeasy Blood & Tissue de Qiagen.

Muestra	Masa de tejido (mg)
1	12.5
2	25.0
3	50.0
4	100.0
5	200.00

Cada muestra de tejido se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml, conteniendo 180 µL de buffer ATL, se trituro con un pistilo de plástico por 3 minutos, se agregó 20 µL de proteínas K, se homogenizo con vórtex por un minuto y se dejó incubar por cuatro horas a 56 °C en baño maría.

Nuevamente se homogenizó en vórtex por 30 segundos, se agregó 200 µL de buffer AL, se homogenizó nuevamente en vórtex por 30 segundos y se pasó a incubar en

baño María a 56°C por diez minutos, después se agregó 200 µL de etanol al 96% homogenizando nuevamente en vórtex por 30 segundos.

Cada una de las 6 muestras fue trasladada a una minicolumna de centrifugado, colocando cada columna dentro de un tubo de recogida para centrifugar a 8000 rpm por un minuto. Se descartó el tubo de recogida conteniendo el material precipitado, y la columna se colocó dentro de un nuevo tubo de recogida.

Entonces se agregó a cada columna 500 µL de tampón AW1 y se centrifugó por un minuto a 8000 rpm, descartando nuevamente el tubo de recogida conteniendo el nuevo material precipitado.

Inmediatamente se añadieron 500 µL de tampón AW2 a cada una de las columnas, colocándolas dentro de un tubo de recogida nuevo, para centrifugar a 14000 rpm por tres minutos. Se descarta el tubo de recogida conteniendo el material precipitado y la columna se coloca dentro de un tubo eppendorf de 1.5 ml, sin tapa, en seguida se agregaron 100 µL buffer AE (buffer de elución) a cada columna, se dejó incubar a temperatura ambiente durante un minuto, para luego centrifugar a 8000 rpm por un minuto, finalmente se recuperan los tubos eppendorf conteniendo el ADN purificado.

8.2.2 Electroforesis

En total se cargaron 6 muestras de tejido de cola de iguana para determinar la cantidad óptima de tejido a utilizar, en el protocolo de extracción de DNA DNeasy® Blood & Tissue de Qiagen.

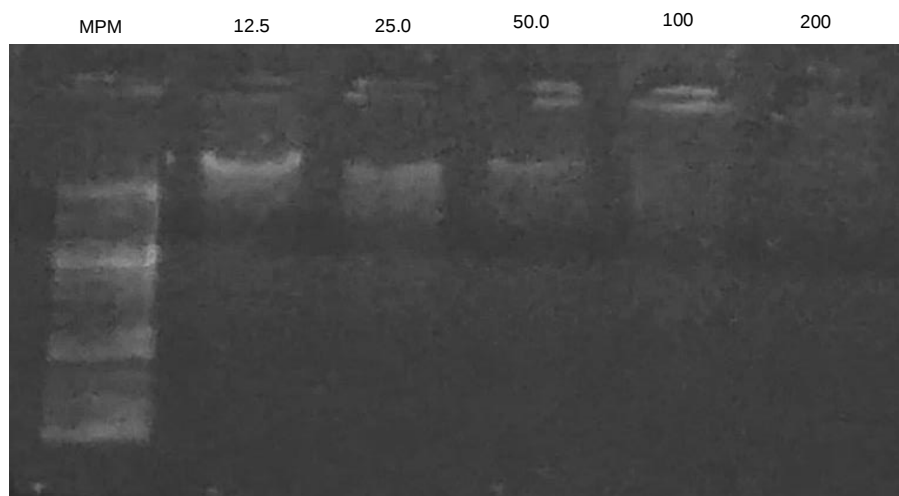


Figura 24. Intervalo de 12.5 a 200 mg de tejido utilizado para la extracción de DNA. En el gel se indica la cantidad en miligramos de tejido de cola de iguana utilizado para cada muestra de extracción de ADN. Marcador de peso molecular (MPM) de una kilobase se encuentra en el primer carril de la izquierda.

La muestra de 12,5 mg de tejido resulto ser la muestra de extracción de ADN de mejor calidad, al mostrar mayor intensidad de luz y mejor integridad al ser ligeramente de mayor peso y tener menor cantidad de bandas de barrido inespecíficas (Figura 24).

8.3 Diseño primers

8.3.1 Gen ND4

8.3.1.1 Especies genéticamente más relacionada a *C. pectinata*.

De acuerdo al trabajo de “A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes” de Pyro, 2013, las especies más emparentadas a *Ctenosaura pectinata* son las especies pertenecientes a los géneros *Conolophus*, *Amblyrhynchus* e *Iguana*, ya que esos 3 géneros al igual que *C. pectinata* pertenecen a la familia *Iguanidae* (figura 25).

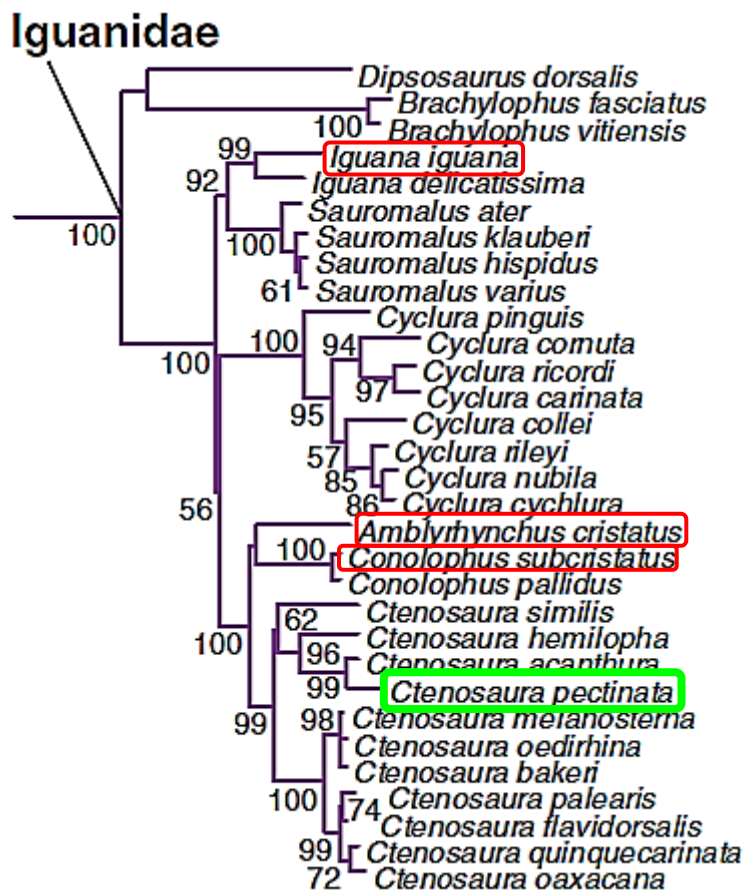


Figura 25. Géneros y especies de la familia Iguanidae. Resaltados en color las especies *Amblyrhynchus cristatus*, *Conolophus subcristatus*, *Iguana iguana* y *C. pectinata*. Imagen modificada de (Pyron, Burbrink, & Wiens, 2013).

8.3.1.2 Secuencias ortólogas del ADN mitocondrial completo (mitocondrion) anotadas en GenBank, de especies de reptiles que están emparentadas con *C. pectinata*.

Se obtuvieron 11 secuencias del ADN mitocondrial completo (Anexo 1), anotadas en GenBank, de los reptiles más emparentados a *C. pectinata*, especies que se enlistan a continuación en la siguiente tabla.

Las 11 especies de reptiles, de las cuales se obtuvo su respectiva secuencia de ADN mitocondrial completo, pertenecen al orden Squamata, están agrupadas en 4 diferentes infraordenes de 7 diferentes familias, representados por 9 diferentes generos (*Conolophus*, *Amblyrhynchus*, *Iguana*, *Sceloporus*, *Anolis*, *Chamaeleo*, *Heloderma*, *Amphisbaena*, *Gekko*) tal como se manifiesta en la tabla 8.

Tabla 8. Relación taxonómica de las 11 especies de reptiles con ADN mitocondrial anotado en GenBank.

Orden	Infraorden	Familia	Género y especie
Squamata	G) Iguania	Iguanidae	1 <i>Conolophus subcristatus</i>
			2 <i>Amblyrhynchus cristatus</i>
			3 <i>Iguana delicatissima</i>
			4 <i>Iguana iguana</i>
		Phrynosomatidae	5 <i>Sceloporus occidentalis</i>
			6 <i>Sceloporus grammicus</i>
		Dactyloidae	7 <i>Anolis punctatus</i>
		Chamaeleonidae	8 <i>Chamaeleo dilepis</i>
	F) Anguimorpha	Helodermatidae	9 <i>Heloderma suspectum</i>
	D) Lacertoidea	Amphisbaenidae	10 <i>Amphisbaena schmidtii</i>
	A) Gekkota	Gekkonidae	11 <i>Gekko vittatus</i>

Datos obtenidos de (Pyron, Burbrink, & Wiens, 2013).

Por otra parte, la filogenia de esas 11 especies se puede apreciar en el siguiente árbol (figura 26), en donde se observan agrupados sus respectivos géneros. En donde las especies más emparentadas a *C. pectinata* corresponden a las especies pertenecientes a la familia *Iguanidae*. Además, es interesante apreciar que dos géneros de esa familia, *Conolophus* (Uetz P. F., 2019) y *Amblyrhynchus* (Uetz P. F., 2019), se distribuyen en las islas galápagos en Ecuador y el género *Iguana* se distribuye desde México hasta Paraguay y en algunas islas del Caribe (Uetz, Freed, & Hošek, 2019).

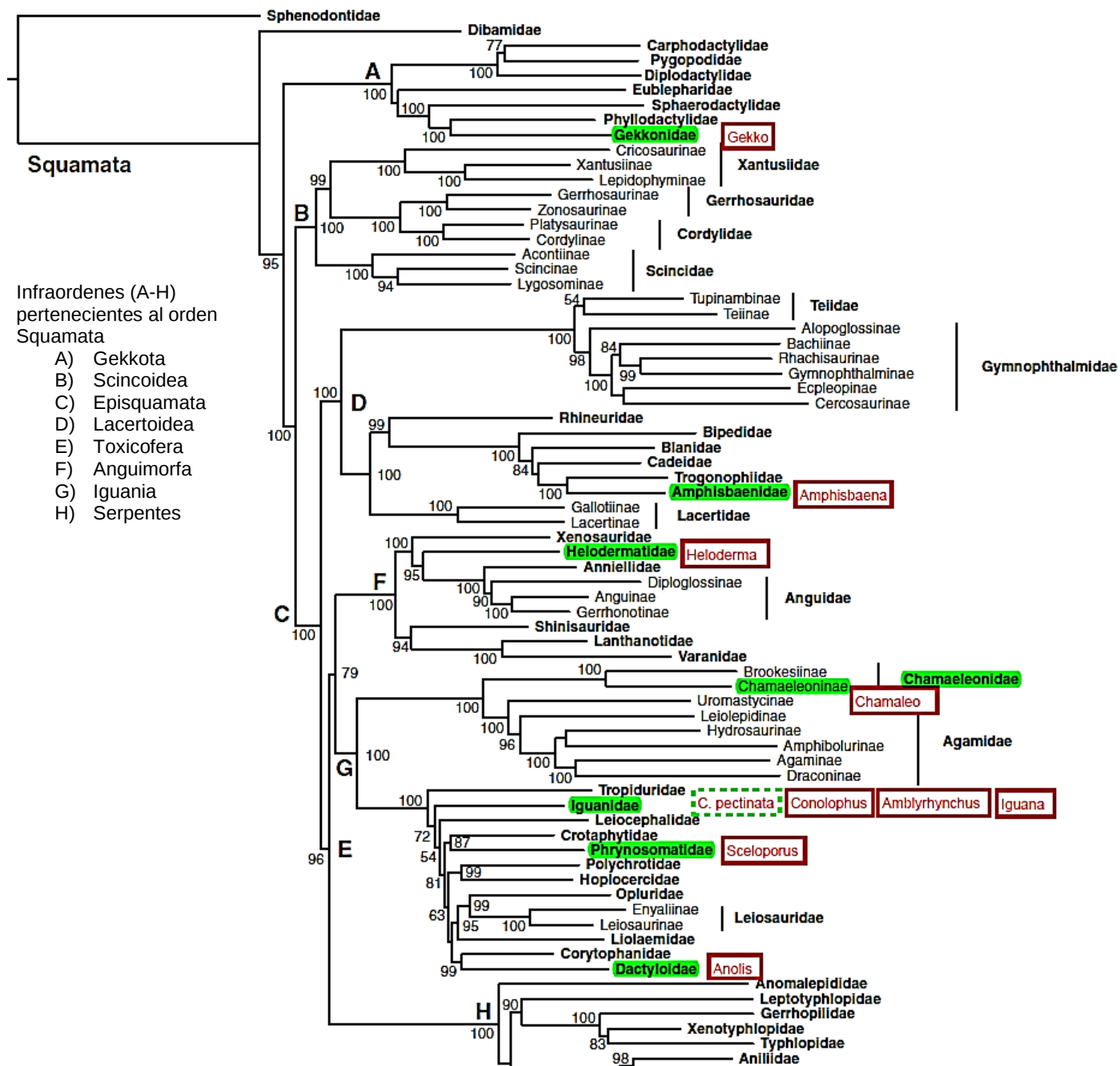


Figura 26. Filogenia del nivel superior *Squamata*. Representación del árbol obtenido a partir del análisis de máxima verosimilitud utilizando 12 genes, con ramas que representan familias y subfamilias. La mayor parte de los nodos tienen un soporte SHL de la prueba de razón de probabilidad aproximada no paramétrico de Shimodaira-Hasegawa, con valores superiores al 85, indicando que están fuertemente soportados. En las cajas rojas se indican los 9 géneros considerados para este estudio. Imagen modificada de Pyron, 2013.

8.3.1.3 Estructura del ADN mitocondrial

8.3.1.3.1 Estructura del ADN mitocondrial

Los genomas mitocondriales completos de la iguana marina, *Amblyrhynchus cristatus*, de la iguana terrestre *Conolophus subcristatus* y de *Iguana iguana* tienen un orden genético idéntico, contienen: 13 genes que codifican para proteínas, 22 para ARN de transferencia y dos genes de ARN ribosomal, así como una región de control (figura 27) (MacLeod, Irisarri, Vences, & Steinfartz, 2015).

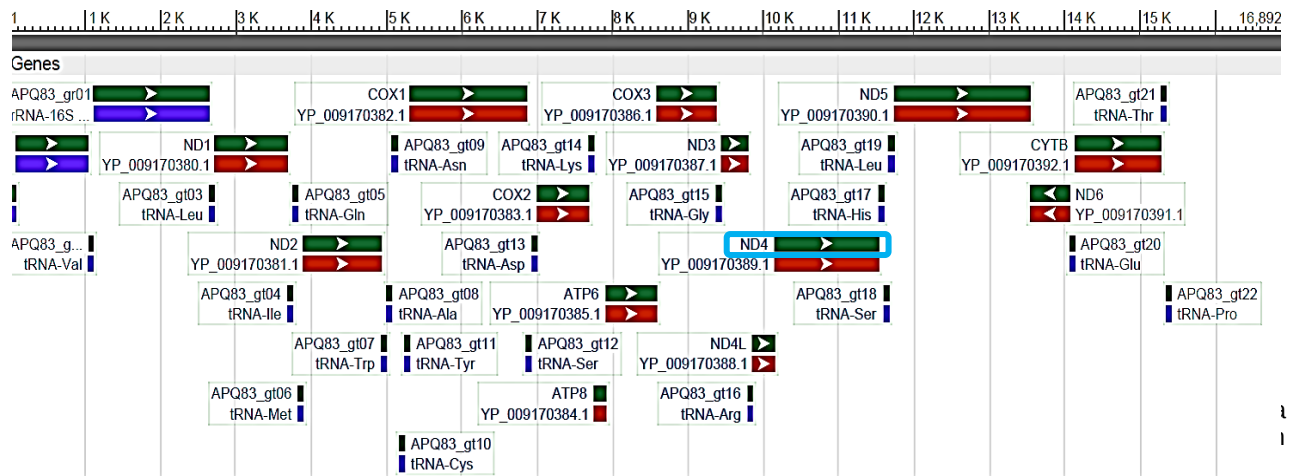


Figura 27. Estructura del gen ND4 de *Conolophus subcristatus* de GenBank ID: NC_028030

8.3.1.3.2 Primers diseñados para el ADN mitocondrial

En los estudios de variabilidad genética de muchas especies se han utilizado diversas secuencias de fragmentos del ADN mitocondrial. De manera particular para *C. pectinata* los principales trabajos de variabilidad genética (Sites, 1996), (Malone, 2017), (Zarza, 2008), (Zarza, 2016), han utilizado fragmentos de secuencias del gen mitocondrial ND4, amplificando con algunos de los 33 pares de *primers*, ya sean integros o modificados (figura 28), que fueron originalmente diseñados por Arévalo, *et al* (1994), para el complejo de especies del género *Sceloporus*. Dichos *primers* fueron diseñados a partir de la secuencia del ADN mitocondrial de *Bos taurus*.

Por lo tanto, en cada uno de esos estudios fueron amplificados fragmentos de ADN del gen ND4 de particular tamaño (561pb Zarza, 2008; 798pb Malone, 2017; 956pb Sites, 1996), dependiendo del juego de primers que fueron seleccionados.

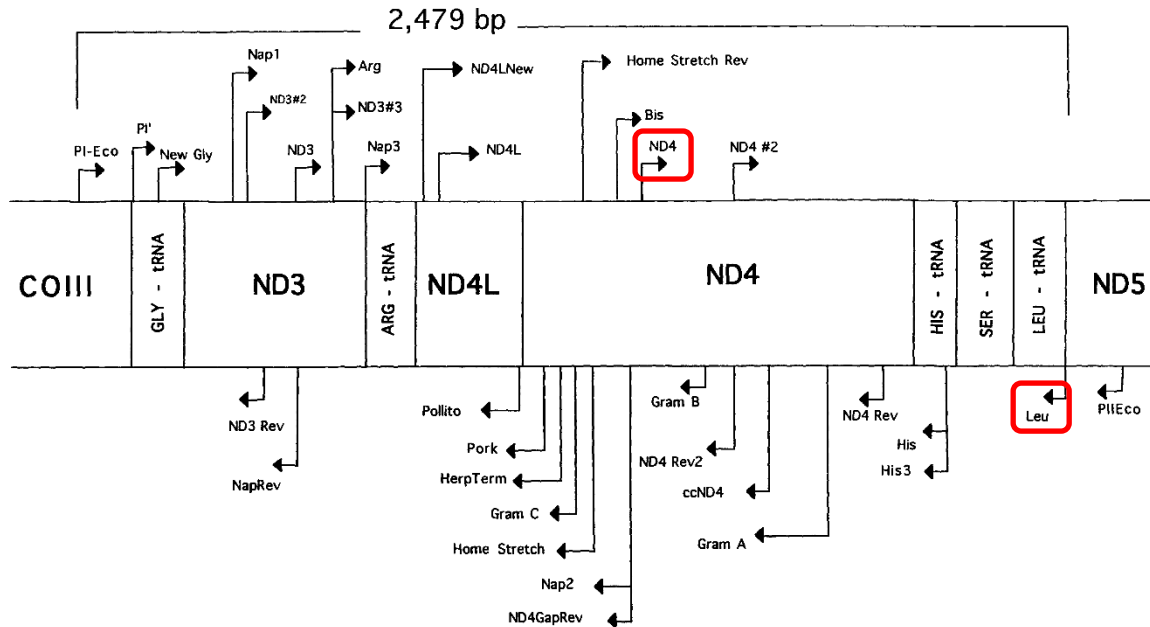


Figura 28. El fragmento de ADN de 2.479 pb secuenciado para el estudio de las razas cromosómicas de *Sceloporus grammicus* (Arevalo, 1994), que muestra las posiciones aproximadas de los primers sobre la estructura del ADN mitocondrial de *Bos taurus*. Todas las flechas indican la dirección de 5 a 3' de los primers. En cajas rojas los primer ND4 forward y Leu reverse para amplificar un fragmento de ADN mitocondrial de 956pb.

Por lo anterior, la estrategia que desarrollamos, para poder diseñar los *primers* de amplificación del fragmento de ADN mitocondrial del gen ND4 de *C. pectinata*, fue el obtener las secuencias del ADN mitocondrial completo (mitocondrion) de las especies más emparentada a *C. pectinata*, para compararlas contra las secuencias homologas de los *primers* ND4F y LeuR, propuestos por Arevalo, *et al.*, 1994, que amplifican el fragmento más grande del gen ND4 (956pb) en los estudios previos. Y de esa manera, determinar las secuencias consenso de los *primers* ND4F y LeuR, que por lo mismo son las más conservadas entre las especies de reptiles más emparentadas a *C. pectinata*.

Además, este nuevo juego de *primers* consenso para las especies más emparentadas a *C. pectinata*, presentan mayor especificidad para esa región del gen ND4 de *Ctenosaura pectinata*, y permiten amplificar el fragmento de mayor tamaño utilizado para estos estudios (956pb).

8.3.1.4 Secuencias de los *primers* ND4 y Leu (Arevalo, et al., 1994).

Tabla 9. Secuencia de los *primers* ND4 y Leu de Arévalo et al (1994), como parte de un set de 33 juegos de primer para amplificar un fragmento de ADN mitocondrial de 2479, del complejo de la especie *Sceloporus grammicus*.

Nombre del <i>primer</i>	Secuencia en dirección 5' a 3'
ND4 32 nucleotidos	CAC CTA TGA CTA CCA AAA GCT CAT GTA GAA GC
Leu 26 nucleotidos	CAT TAC TTT TAC TTG GAT TTG CAC CA

8.3.1.4 Secuencias homologas entre los *primers* ND4 y Leu (Arevalo, et al., 1994) con el ADN mitocondrial de las especies más emparentadas a *C. pectinata*.

Tabla 10. Variación de las secuencias homologas con el primer ND4 de Arévalo (1994) y entre especies más emparentadas con *C. pectinata* registradas en la plataforma GenBank.

Especie	Secuencia de ADNm homologa con el primer ND4 de Arévalo, 1994. Diseñado para el complejo <i>Sceloporus</i>	(ID) GenBank mitocondrion
<i>Primer ND4</i> cadena plus 5' a 3' (Arévalo, 1994)	CAC CTA TGA CTA CCA AAA GCT CAT GTA GAA GC	Arevalo, (1994)
<i>Bos taurus</i>	CAC CTT TGA CTA CCT AAA GCT CAC GTA GAA GC	MG736676.1
1. <i>Conolophus subcristatus</i>	CAC TTA TGA TTA CCA AAA GCC CAC GTC GAA GC	NC_028030
2. <i>Amblyrhynchus cristatus</i>	CAC CTC TGA CTA CCA AAA GCC CAC GTC GAA GC	KT277937.1
3. <i>Iguana iguana</i>	CAC CTC TGA CTA CCA AAA GCC CAC GTC GAA GC	AJ278511.2
4. <i>Sceloporus occidentalis</i>	CAC CTA TGA CTC CCA AAA GCC CAT GTA GAA GC	NC_005960
5. <i>Anolis punctatus</i>	CAC CTA TGA TTA CCC AAA GCA CAC GTA GAA GC	NC_044125.1
6. <i>Chamaeleo dilepis</i>	CAT CTA TGG CTA CCA AAA GCT CAT GTA GAA GC	NC_012436.1
7. <i>Heloderma suspectum</i>	CAC TTG TGA CTT CCG AAA GCC CAT GTA GAA GC	NC_008776.1
8. <i>Amphisbaena schmidtii</i>	CAC CTA TGA CTC CCA AAG GCA CAT GTT GAA GC	NC_006284.1
9. <i>Gekko vittatus</i>	CAC CTG TGA TTA CCT AAA GCA CAT GTA GAG GC	NC_008772.1
Secuencia consenso	CAC CTA TGA CTA CCA AAA GCC CAT GTA GAA GC	
Secuencia consenso solo con miembros de la familia <i>Iguanidae</i>	CAC CTC TGA CTA CCA AAA GCC CAC GTC GAA GC	
Primer Forward 5' a 3'	CAC CTC TGA CTA CCA AAA GCC CAC GTC GAA GC	

Tabla 11. Variación de las secuencias homologas con el primer Leu de Arévalo (1994) y entre especies emparentadas con *C. pectinata* con sus secuencias complementarias.

Especie	Secuencia de ADNm homologa con el primer Leu de Arévalo 1994.	(ID) GenBank mitocondrion
Primer Leu (secuencia homologa en cadena minus 5' a 3')	CAT TAC TTT TAC TTG GAT TTG CAC CA	Arevalo (1994)
Secuencia invertida	GTA ATG AAA ATG AAC CTA AAC GTG GT	
Secuencia complementaria de secuencia invertida	TG GTG CAA ATC CAA GTA AAA GTA GTA	
<i>Bos taurus</i>	TG GTG CAA CTC CAA ATA AAA GTA ATA	MG736676.1
1. <i>Conolophus subcristatus</i>	TG GTG CAA CTC CAA GTA AAA GTA CAT	NC_028030
2. <i>Amblyrhynchus cristatus</i>	TG GTG CAA CTC CAA GTA AAA GTA CAT	KT277937.1
3. <i>Iguana iguana</i>	TG GTG CAA TTC CAA GTA AAA GTA CAT	AJ278511.2
4. <i>Sceloporus occidentalis</i>	TG GTG CAA CTC CAA GTA AAA GTA CAT	NC_005960
5. <i>Anolis punctatus</i>	TG GCT CAA TAC CAA GTA AAA GCA TAT	NC_044125.1
6. <i>Chamaeleo dilepis</i>	TG GTG CAA CTC CAA GTA AAA GTA GTG	NC_012436.1
7. <i>Heloderma suspectum</i>	TG GTG CAA ATC CAA GTA AAA GTA TAT	NC_008776.1
8. <i>Amphisbaena schmidtii</i>	TG GTG CAA TTC CAA GTA AAA GTA CAT	NC_006284.1
9. <i>Gekko vittatus</i>	TG GTG CAA CCC CAA GTG AGA GCA CAT	NC_008772.1
Secuencia consenso	TG GTG CAA CTC CAA GTA AAA GTA CAT	
Secuencia consenso solo con miembros de la familia <i>Iguanidae</i>	TG GTG CAA CTC CAA GTA AAA GTA CAT	
Secuencia elegida para diseño de primer	TAC ATG AAA ATG AAC CTC AAC GTC GT	
Secuencia elegida invertida	ATG TAC TTT TAC TTG GAG TTG CAG CA	
Secuencia complementaria de secuencia invertida.	ATG TAC TTT TAC TTG GAG TTG CAC CA	
Primer reverse 5' a 3'	ATG TAC TTT TAC TTG GAG TTG CAC CA	

La construcción de los *primers* ND4FM y ND4RM, para amplificar y secuenciar la región del ADN mitocondrial de *C. pectinata* fue llevada a cabo comparando a mano, las secuencias complementarias para los *primers* ND4 y Leu (Arevalo, *et al.*, 1994) del ADN mitocondrial bovino (*Bos taurus*), y de las mismas secuencias disponibles en GenBank para los reptiles más próximos filogenéticamente a *C. pectinata* (*Conolophus subcristatus*, *Amblyrhynchus cristatus*, *Iguana iguana*, *Sceloporus grammicus*, *Sceloporus occidentalis*, *Chamaeleo dilepis*, *Heloderma suspectum*, *Amphisbaena schmidtii* y *Gekko vittatus*) (figura 29).

Con el alineamiento de las secuencias de los *primers* ND4 y Leu de esas 10 especies, se identificaron las secuencias de los nucleótidos más conservados a lo largo de esa cadena evolutiva, para utilizarlas como *primers* (ND4FM y ND4RM), para amplificar y secuenciar una region del gen ND4 del ADN mitocondrial de *Ctenosaura pectinata*.

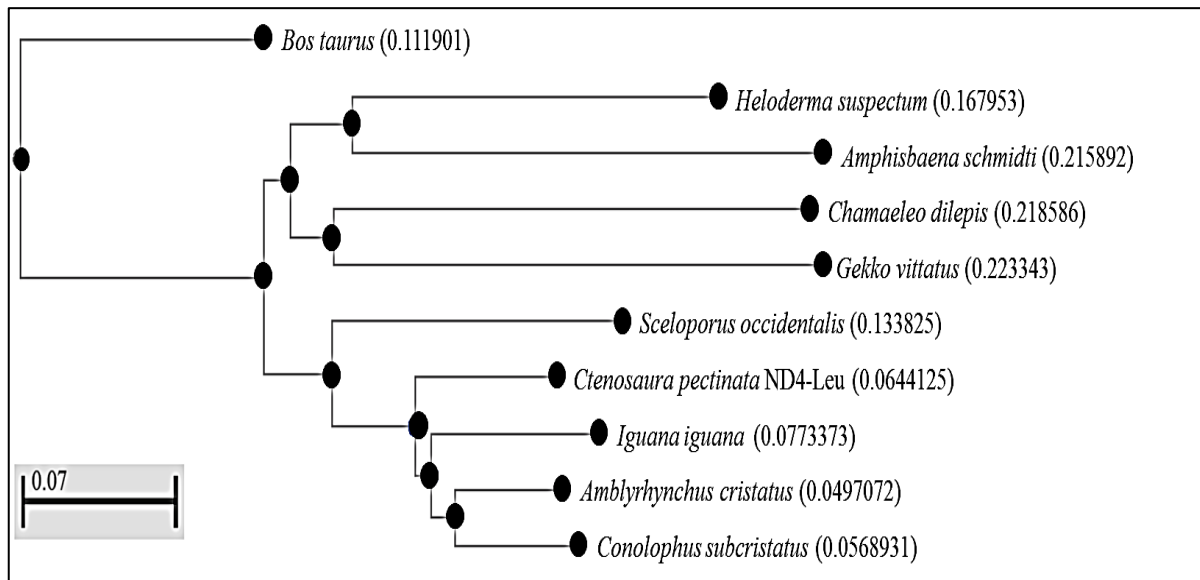


Figura 29. Árbol filogenético construido a partir de las secuencias complementarias a los primers ND4 y Leu de Arevalo 1994, de cada una de las especies que cuentan con la anotación en GenBank para la secuencia del gen mitocondrial ND4, de reptiles incluidas, utilizando como grupo externo al mamífero *Bos taurus*.

Se identificó la región conservada en la secuencia de ADNmt del juego de *primers* ND4 y Leu propuestos por Arévalo *et al.*, (1994), de 9 reptiles (*Conolophus subcristatus*, *Amblyrhynchus cristatus*, *Iguana iguana*, *Sceloporus grammicus*, *Sceloporus occidentalis*, *Chamaeleo dilepis*, *Heloderma suspectum*, *Amphisbaena schmidtii* y *Gekko vittatus*).

El ordenamiento manual difiere con ordenamiento por el programa BLAST (GenBank, 2019), el primero proponía a *Amblyrhynchus cristatus* como la secuencia más emparentada a *C. pectinata* entre los reptiles, mientras que el resultado del BLAST pone a *Conolophus subcristatus* como la secuencia más emparentada a *C. pectinata*. En ambos ordenamientos *Gekko vittatus* se encuentra como la región más alejada (0.223343) (Figura 28).

8.3.2 Gen TYR

8.3.2.1 Especies genéticamente más relacionada a *C.pectinata*. Bis 8.3.1.1

Los genomas mitocondriales completos de la iguana marina, *Amblyrhynchus cristatus*, de la iguana terrestre *Conolophus subcristatus* y de *Iguana iguana* tienen un orden genético idéntico, contienen, y representan taxones hermanos que se separaron de un ancestro común en el archipiélago de Galápagos hace unos 4.5 millones de años. Este clado, que incluye una especie de iguana marina (género *Amblyrhynchus*) y tres especies de iguana terrestre (género *Conolophus*), representa uno de los clados endémicos más antiguos de las Islas Galápagos.

En la figura 30 se presenta una filogenia mitogenómica de los Iguanidae, que ilustra la posición de las iguanas de Galápagos en relación con otras especies para las que están disponibles genomas mitocondriales completos (MacLeod, Irisarri, Vences, & Steinfartz, 2015).

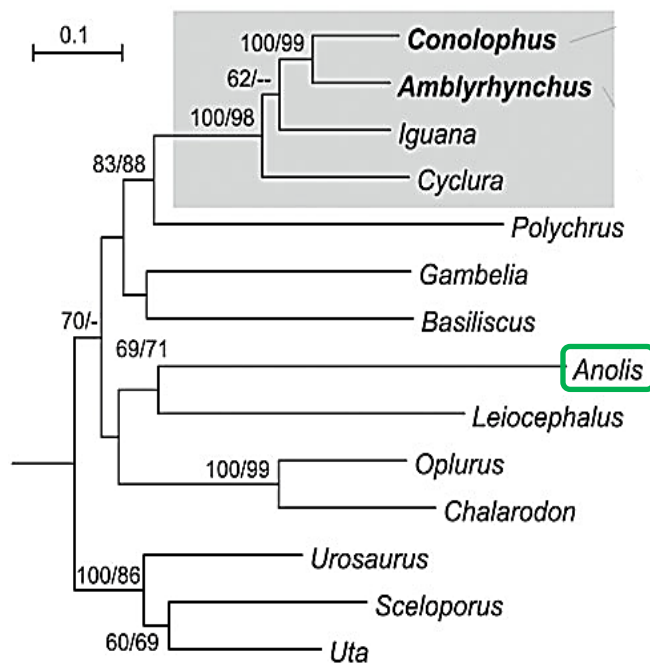


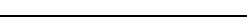
Figura 30. Los valores en los nodos representados en el árbol filogenético, construido a partir de los datos completos de mitogenomas, son valores de soporte de bootstrap no paramétrico y probabilidades posteriores del análisis bayesiano (PhyloBayes), ambos transformados en porcentaje. Se observa la estrecha relación de las iguanas hermanas de Galápagos, *Amblyrhynchus cristatus* y *Conolophus subcristatus*, y su parentesco con *Cyclura pinguis*, *urosaurus nigricaudus*, *Uta stansburiana*, *Anolis carolinensis*, *Polychrus marmoratus*, *Chalarodon madagascariensis*, *Leiocephalus personatus*, *Gambelia wislizenii*, *Basiliscus vittatus*, *Oplurus grandidieri*, *Sceloporus occidentalis*, *iguana Iguana* y *Anolis carolinensis*. Imagen modifica de (MacLeod, Irisarri, Vences, & Steinfartz, 2015).

8.3.2.2 Secuencias ortólogas del TYR anotadas en GenBank, de especies de reptiles que están emparentadas con *C. pectinata*.

La ortología se determina entre las secuencias del gen TYR de reptiles, que están anotadas en GenBank. El conjunto de ortólogos se construye por el nivel de homología existente entre pares de genomas, agrupando desde el par más homólogo hasta los de menor homología, para formar el grupo completo que se muestra en la tabla 12. Solo los genes en la base de datos de genes NCBI están en el alcance para el cálculo del ortólogo (NIH-OrtTYR, 2008).

La enzima tirosinasa (tyr) codificada por este gen cataliza los primeros 2 pasos, y al menos 1 paso posterior, en la conversión de tirosina en melanina. La enzima tiene actividades catalíticas tanto de tirosina hidroxilasa como de dopa oxidasa, y requiere cobre para funcionar. Las mutaciones en este gen provocan albinismo oculocutáneo y los polimorfismos no patológicos provocan variaciones en la pigmentación de la piel.

Tabla 12. Secuencias nucleotídicas del gen TYR de las especies de reptiles anotadas en GenBank, agrupadas por ser ortólogas en su evolución.

Especie	Gen	aa	Estructura	pb
1 <i>Pogona vitticeps</i> (Central bearded dragon)	XM_020810966.1	527		2249
2 <i>Podarcis muralis</i> (Common wall lizard)	XM_028725594.1	530		2106
3 <i>Anolis carolinensis</i> (Green anole)	XM_003219371.3	527		3587
4 <i>Gekko japonicus</i>	XM_015421974.1	528		1587
5 <i>Thamnophis sirtalis</i>	XM_014064877.1	294	-	885
6 <i>Notechis scutatus</i> (Mainland tiger snake)	XM_026679951.1	542		1629
7 <i>Pseudonaja textilis</i>	XM_026706883.1	528		1587
8 <i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	XM_015814723.1	532		1599
9 <i>Python bivittatus</i> (Burmese Python)	XM_007438960.1	278	-	836

Datos tomados de: NCBI Orthologs-lizards. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7299/ortholog/?scope=8504>

En la figura 31, se muestra la relación filogenética de las 9 especies, representadas por sus respectivos géneros. En donde las especies más emparentadas a *C. pectinata* corresponde a *Anolis* por pertenecer al mismo clado.

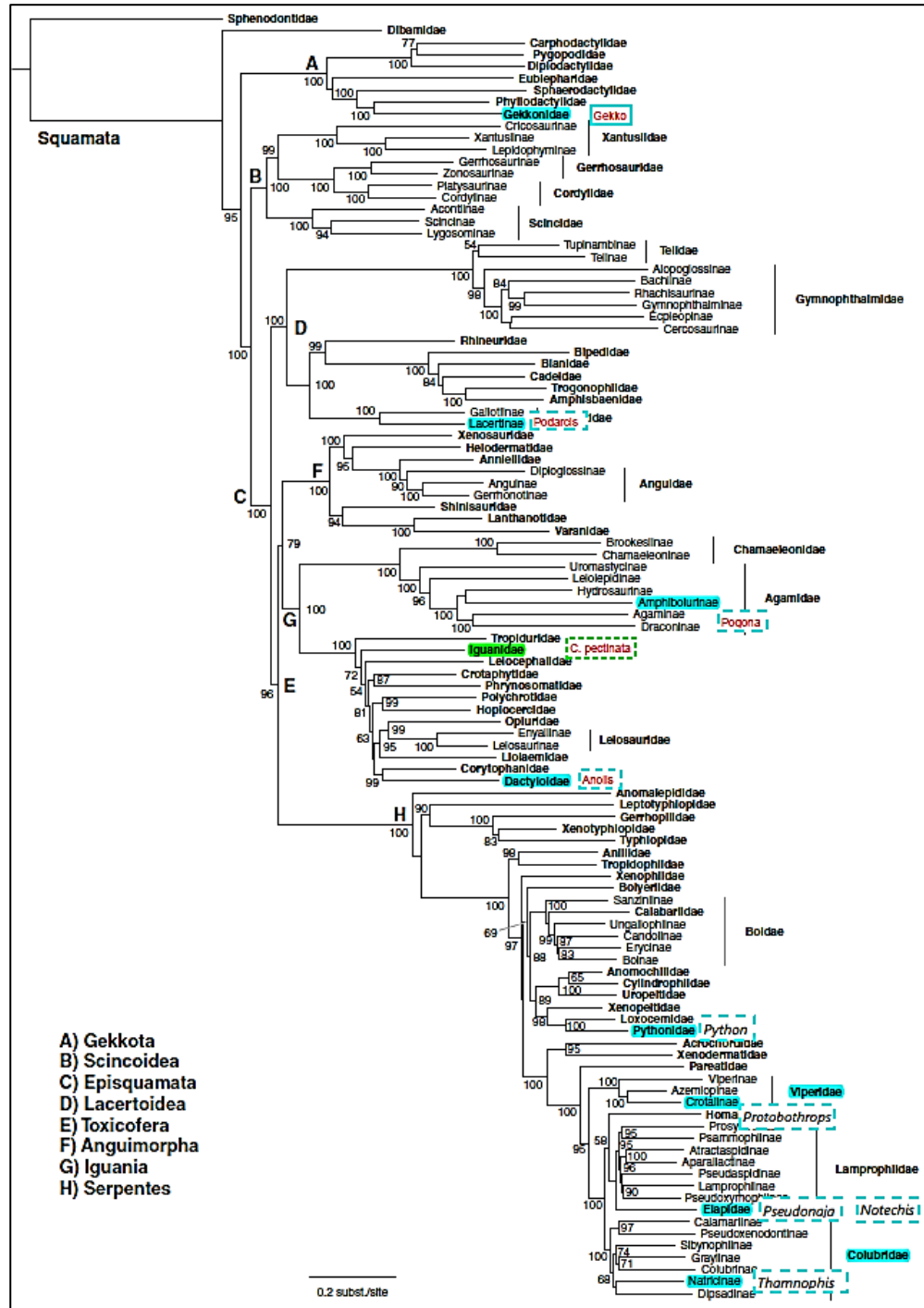


Figura 31. Filogenia del orden *Squamata*. Representación del árbol obtenido a partir del análisis de máxima verosimilitud utilizando 12 genes, con ramas que representan familias y subfamilias. La mayor parte de los nodos tienen un soporte SHL de la prueba de razón de probabilidad aproximada no paramétrico de Shimodaira-Hasegawa, con valores superiores al 85, indicando que están fuertemente soportados. Se observan resaltados en color las familias

y los géneros de las 9 especies de reptiles seleccionadas por su relación ortóloga de la secuencia del gen TYR . Imagen modificada de Pyron, 2013.

El agrupamiento de las 9 especies de reptiles, ortólogas para la secuencia del gen TYR, se realizó con el programa COBALT (constraint-based Multiple Alignment Tool, de Gen Bank y se muestra en la figura 32.

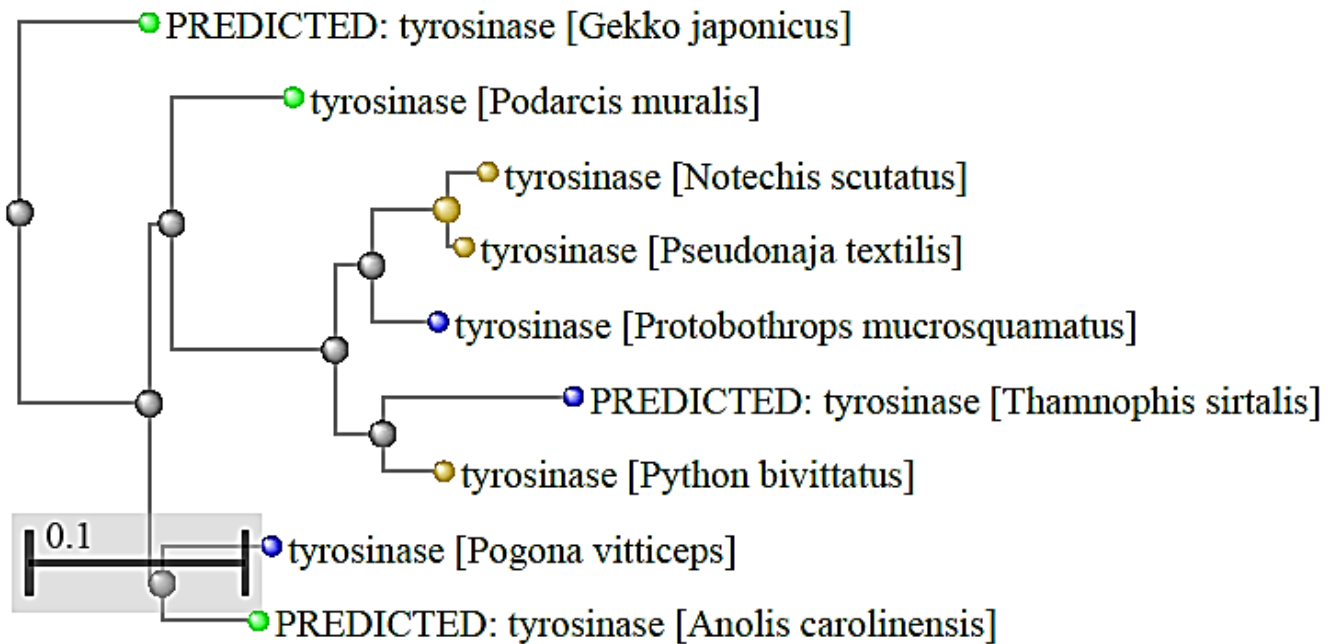


Figura 32. Arbol filogenetico construido con el software COBALT e GenBank a partir de la secuencia del gen TYR de cada especie representada. COBALT Constraint-based Multiple Alignment Tool https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi?request=page&cobaltRID=1TPH5UKM212&request=page&checkStatus=on&link_loc=alignPage&screenWidth=1600&screenHeight=900.

8.3.2.3 Estructura del Gen TYR

Con base en la filogenia del orden *Squamata* construida a partir de los datos de la secuencia de 12 genes (figura 30) y de la filogenia de las 9 secuencias ortólogas del gen TYR, la especie *Anolis carolinensis* (fig. 33) *Anolis carolinensis* es la especie que se encuentra más próxima a *C. pectinata*. En *Anolis carolinensis* el gen TYR se localiza en el cromosoma 3 (Figura 33).

Chromosome 3 – AnoCar2.0

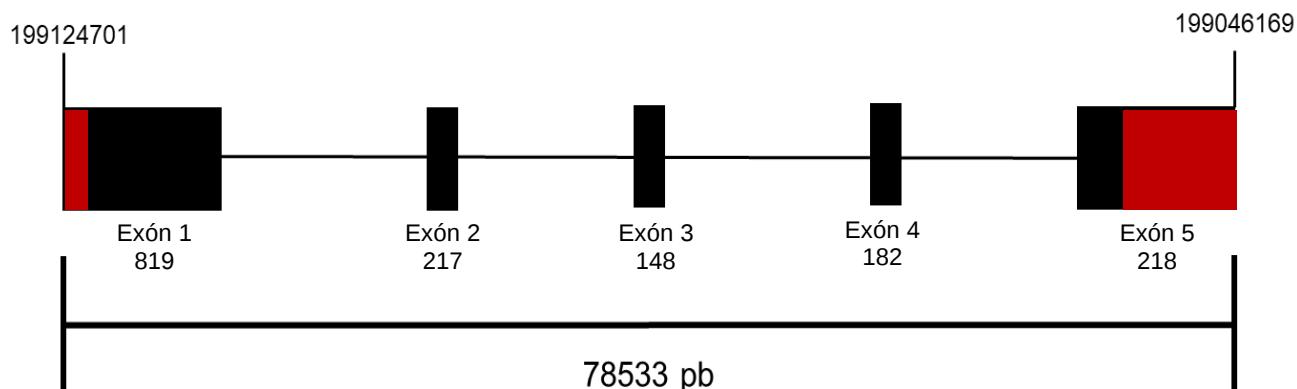


Figura 33. Estructura del gen TYR. Posición de inicio (199124701) y final (199046169) de la secuencia del gen TYR (78533) en el cromosoma 3 de *Anolis carolinensis*. La secuencia corresponde a la cadena ligera de DNA que va de 5'-3' (Derecha a izquierda), en la imagen se invirtió la secuencia a 3'-5' para visualizar los 5 exones de izquierda a derecha (ID de la secuencia: NC_014778.1). Los intrones no representan su tamaño real (espacios entre los cuadros). sin embargo, los exones representan el tamaño que tienen cada uno comparándolos entre sí. Los rectángulos en rojo representan las regiones UTR en los extremos, mientras que las regiones codificantes se representan en rectángulos de color negro.

8.3.2.4 Secuencia del Gen TYR de *Anolis carolinensis*

Secuencia completa gen TYR

ID Ensembl ENSACAT00000015042.3 (AnoCar2.0). Gris: UTR, Verde: Exón 1, Azul: Exón 2, Lila; Exón 3, Verde oscuro: Exón 4, Gris oscuro: Exón 5

```

1GTGTGTGCGTCTGTGTGTGCGAGGCAAGGATGGGAAGGGATTCTGAATGATGTACA
GAAAAGAAATGCATAGGGAAAACCTTTGCCGGGCTGCAATAAGGTTAATAACCCACTTG
TTTCCAGTTGACCAAACGACTGGTTCGTAAGTCTTCTACTGCTGCAGAGAGAATGTGT
CTTTTCTCCATCGGCATCTTCTTCGGTCTTCTTCCTCTAGGATTGAGCCAGTTCCCAC
GGGCATGTGCCAATTCGGACAGTCTGCTAAAAAAGGAATGCTGCCCCCCTTGGCCAG
GGGACGGGTCTCCTTGTGGAGAGCTTTCAGGCAGGGGGTCTGTTTCTGATATCCTTC
TTTCAGATGCCCCACTTGGTCCTCAGTTTCCCTTCTCTGGAGTGGACGACAGGGAAG
ATTGGCCAGCTGTTTTTTATAACAGAACTTGCCAATGCACAGGCAACTTCATGGGGTT
CAACTGCGGCGATTGCAAGTTCACTTTGCAGGTCCCAACTGCACTCAAAGAAAGGC
ACAGGTGAGGAGAGATATCTTCCGGATCAGTGCCAGGGAAAAGTTCCAGTTTCTTGC
CTACCTCAATTTGGCCAAGCACACAAGTAGCCGGGATTTTGTTCATTGCAACAGGAACG
TATGCTCAAATGAACAACGGCTCAACCCCTATGTTCCGAGACATCAACGTCTATGACC
TGTTTCGTTTGGATGCATTATTACGTGTCCCGGGATACGCTCCTTGGAGGCACAGCG
TGTGGCGAGACATTGATTTTGCCCATGAGGCCCCAGGTTTCCTTCCTTGGCACCGGC
TTTTTTTGCTCATGTGGGAACATGAGATCCAGAAAGTTGACTGGGAATGAGAACTTTAC

```

CATCCCCTATTGGGACTGGCGAGATGCCCAGGGCTGTGACATCTGTACGGATGAAAT
CATGGGTGGCAGACATCCCAGCAACCCAAACATTCTGAGTCCAGCTTCTTTCTTCTCT
TCATGGCAGGTAATTTGCAGCCGGTCAGAAGAGTACAACAGTCGTCAAGAACTTTGC
AATGGCACAAATGAAGGGCCTATTCTTCGAAACCCCGGCAACCATGATAAAGGGAGG
ACACCTCGGCTTCCATCTTCGGCAGATGTTGAATTCTGCTTAAGTTTGACACAGTACG
AAGCGGGAACCATGGACAAAATGGCTAACTTCAGCTTCAGGAATACTTTGGAAGGCT
TTGCTGATCCGAGTACTGCAATATCAAATGTATCTCAAAGCAGCCTGCACAACGCATT
GCACATCTACATGAATGGCTCCATGTCTGAGGTACAAGGATCAGCCAATGATCCCATC
TTCATCCTTCACCATGCCTTTGTTGACAGCATTTTTGAACAATGGCTTAGAAGACATCG
ACCTCTACGTGAGGTTTATCCTGCAGCCAATGCCCCAATTGGACACAACCGTGAATC
CTACATGGTCCCCTTCATTCCACTTTACAGGAATGGGGAATTCTTCATATCATCAATAG
AACTGGGATATGACTATGAATATCTAACAAATCCAGCCAACCCCTTCCAGAATTTTTTC
CTGCCTTATTTGGAACAGGCACGTCAAATCTGGCCATGGCTGGTGGGAGCTGCCGTG
GTGGGTGCCATTATAATGTTGATTGTTGGCATCATTGTTCTACGATGTCGGAAGAAGA
GACGGATCTCAGAAGAGACACAACCATTACTCATGGAGAGTGAGGATTATCAGCACA
TGACATACCAGTCACATGTATAACCATAGTCCAGTACCCATACTTAGGGTGAACTTG
ACATGTTGTTGGGAATCTGTGACATATGGTCCTGATATCTTTCCCAAAGCTTGGTGTT
CTGTATGTTTGTCTATTAATTCAGGACTGCAGTCAAATAAATGGATATAGTAGAGAAA
CAAAAGGTGTGTTGGCGATGGGGAAGAGGGAGAGGTGATATTTCCCACTTTCCTACC
CCATTGCCAGCAAGTATTGTCAAATGCTGGAATATCTTTGGTTCACGAGATATTTTGG
ATCCAACCCTACCTGGCATGGTCAATAGTAAGCCATTGTGGGAATTACAGTTTAAAC
ATCTAGTTTGAATAGATGTTCCCCAGGGCTGGCTAGCAACTATTGACCTCACAGAAGG
AAAACACAGCATCCTGAAATCCATTGTTAATTTCAAATAGACTAGACTTATTGAATCAA
TTGAATTGACATATGTGTTGAGTTACCAAGTTACCACTGATTTAATTGGTCTAGTGTTG
GGACCAACAATAGGATTTAGGTCAGATACAATATGAGTACCTGTTATTTAATATCTGCA
AAAGCTGCTTTGAAATATAGGAGATATAATTTAATTGAGAGAATGATCAAATGCAACAC
TAATCCCATCTCTCCACTCCATGAAATGTTTGATTTTGAAGCTTTGAAAAGACATCAGA
ACCTCCTGTTGTGGGTCTATCATAACTTGTCAATGTTACCTTTATTCTTTCAATAATCT
AATGTGGTTATTGAACATTAATAATCACTTCAAGGCAGACTTAAGCACATTTTAACCATT
CTTTTATATTTGCAACTGGAGCTGGTTCAAGGAGCAGATTTTCATTATACAGCAGCACT
ACATAGCATCATTAGACAACCAGCCTGATCCTCTTGCCATTGTCATTTTTAAAAAGCAC
ACTGAGTAAAAAACTTAATAGCTCAAGGTGATTCCACCATTCTTTTCAGCAATTAGCT
GAATCCCAATTTTTGTTCAATTCAAAGAAAGCTCATTGAATCATCAGGTTTTGCTTATTT
GTTGACTCAGCATTCAACAATTCATTTAATAGTTTAACTGTAGTTGAAACTCACCAACA

TGATTTTGGGCAATGTCTTGAAGATGTGGAATTTAGTTT TAGGACAATGTGGCAGCAGT
CATATTACTTTTATAGACATTGTATGTGGGGGCATTAGGGAAAAAGACACAATGGCAG
CTATTGGGGGCCAGTACAACCAAGGGACGTGCTTTTCCACCAATCTTAGAAAGATAAC
GTATTATTATAGAATGGGATACCATCAGACAGCATCTCTCGAGTCTTCTTTTCTCTCTT
AGTGGGCTGGGATAATATTTACATTGTCTTTAGTCTTCTATGCCAAATAATGTTGGTGT
CTCATCAAACCTACAGCTCCCATGATTACATAACATTGAACCATGACAATTAATGGCA
CCAAGATGCATTAACCTAACAGATTGGATGCATCCTCAGATAGGTTGTGGACGAAGAT
ACCACAAGGTGACAATTCTTCAAGATGAACACATCTGACACAAAAGTGGTCAGTTTCA
AGGATGACTCTATGTCACAATAAATATTACTATATCTAAGTACAAGAAGCATTTAGCCC
ACCTTGGGTTGAAAATGTGGACCAGACTATGTAGACCATTGTATATGAACAAGCATAT
TTCCAGATGTAGTGTGTGCCACTATTCATGCCTACACATGAGACACTGTTATGTATTTT
GAAATCTGCCTTTGTATTTTATTTCTTAAGGGCAATTATATGTGCGCACCTCTGCTAT
TGGCACACGTGGAATAACCTACCAATAAACATATTTTATTCTGCCT

8.3.2.4 Construcción de Primers.

Se diseñaron en total 11 juegos de *primers*. Para los exones 2,3 y 4 al ser regiones menores de 600 pb se utilizó un par para cada exón. En cambio, los exones 1 y 5 se diseñaron 4 juegos de *primers* para cada uno, al ser regiones superiores a 600 pb (Tabla 13). Se tomó como modelo la secuencia nuclear del gen TYR de *Anolis carolinensis* (ID de GenBank NC_014778.1) para el diseño de *primers*. Dentro del genoma nuclear completo se ubicó la secuencia del gen TYR identificando las posiciones de inicio y fin, tomando en cuenta los criterios generales para el diseño de *primers*.

Tabla 13. *Primers* diseñados a partir del modelo de la secuencia de ADN del gen TYR de *Anolis carolinensis* divididos por exónes.

Exón	Nombre	Posición NC_014778.1	Secuencia (5'-3')
1	AEx1F-TYR	199122934	AGG CGT GCA TGC TCT AGT TT
	AEx1R-TYR	199123494	CAA CGG CTC AAC CCC TAT GT
	BEx1F-TYR	199123475	GCA TCT CGC CAG TCC CAA TA
	BEx1R-TYR	199123960	CCA TCG GCA TCT TCT TCG GT
	CEx1F-TYR	199123942	GAC CAA GTG GGG CAT CTG AA
	CEx1R-TYR	199124613	CAC CCC CAA TCC CAA GAC AA
	DEx1F-TYR	199124391	CTT ATT GCA GCC CGG CAA AG
	DEx1R-TYR	199125334	ATC TGG AAC CTC AAG ACA GCC
2	AEx2F-TYR	199108886	AGG TCT TTC TCT GTG GGA GGA
	AEx2R-TYR	199109516	AGT TCA ACA CTG GAA AAC TGC C

3	AEx3F-TYR	199070554	CAG CCC AGT AGG CAG TAG TC
	AEx3R-TYR	199071090	CAT CAC TTG GAG TGG CTT CCT
4	AEx4F-TYR	199055980	GGC TCA GAA ACC TCC TGC TT
	AEx4R-TYR	199056538	TGG CAA CAA GAC TGA GGG AC
5	AEx5F-TYR	199046107	GGT GTC CTG TCC CAG TAT TTG A
	AEx5R-TYR	199046567	TTG TAT GTG GGG GCA TTA GGG
	BEx5F-TYR	199046406	ATC CCA GCC CAC TAA GAG AGA A
	BEx5R-TYR	199047292	ACA GCA GCA CTA CAT AGC ATC A
	CEx5F-TYR	199047216	GCT GAA AAG AAT GGT GGA ATC G
	CEx5R-TYR	199047638	AAA GGT GTG TTG GCG ATG GG
	DEx5F-TYR	199047567	TGG CTT ACT ATT GAC CAT GCC A
	DEx5R-TYR	199047664	TGG CTC TTG TTG ATG TCT TGG A

8.3.2.5 Secuencia de exones con primers

8.3.2.5.1 Secuencia Exón 1

ID GenBank: NC_014778.1; *Anolis carolinensis* chromosome 3, AnoCar2.0, whole genome shotgun sequence region from base 199122934 to 199125334. Verde: AEx1-TYR, Amarillo: BEx1-TYR, Morado: CEx1-TYR, Azul: DEx1-TYR.

AGGCGTGCATGCTCTAGTTTTTGTATTGTTTTGCAGTATTACCAATTGTATGGATTTCCAAGTG
CAAATCGTATTCTAGTTGTATTTAATCCTAGAGTTGCATATCACATTAATTGGCTCCTAAAAAC
AAGTTCAGCAGAGCAAATGATTCACATAAGCTTATTCTGTATAATTTAGGAGAAATAGGTCCCA
CCTCCCTCTTTCCTGTATATGCCTACCTGCCATGAAGAGAAGAAAGAAGCTGGACTCAGAAT
GTTTGGGTGCTGGGATGTCTGCCACCCATGATTTTCATCCGTACAGATGTCACAGCCCTGGGC
ATCTCGCCAGTCCCAATAGGGGATGGTAAAGTTCTCATTCCCAGTCAACTTCTGGATCTCATGT
TCCCACATGAGCAAAAAAAGCCGGTGCCAAGGAAGGAAACCTGGGGCCTCATGGGCAAAATC
AATGTCTCGCCACACGCTGGTGCCTCCAAGGAGCGTATCCCGGGACACGTAATAATGCATCCA
AACGAACAGGTCATAGACGTTGATGTCTCGGAACATAGGGGTTGAGCCGTTGTTTCATTTGAGC
ATACGTTCTGTGCAATGACAAAATCCCGGCTAGTTGTGTGCTTGGCCAAATTGAGGTAGGC
AAGAACTGGAACCTTTTCCCTGGCACTGATCCGGAAGATATCTCTCCTCACCTGTGCCTTTCTT
TGAGTGCAGTTGGGACCTGCAAAGTTGAACTTGCAATCGCCGCAGTTGAACCCCATGAAGTTG
CCTGTGCATTGGCAAGTTCTGTTATAAAAAACAGCTGGCCAATCTTCCCTGTCGTCCACTCCAG
AGAAGGGAACTGAGGACCAAGTGGGGCATCTGAAAGAAGGATATCTGAACAGGACCCCTG
CCTGAAAGCTCTCCACAAGGAGACCCGTCCCCTGGCCAAGGGGGGCAGCATTCTTTTTTTAG
CAGACTGTCCGAATTGGCACATGCCCCTGGGAACTGGCTCAATCCTAGAGGAAGAAGACCGA
AGAAGATGCCGATGGAGAAAAGACACATTCTCTCTGCAGCAGTAGAAGACTTACGAACCAAGTC
GTTTGGTCAACTGGAAACAAGTGGGTTATTAACCTTATTGCAGCCCGGCAAAGTTTTCCCTATG
CATTTCTTTTCTGTACATCATTCAGAATCCCTTCCCATCCTTGCCTCGCACACACAGACGCACA
CACATACACTTTTTTCAGTAATCTGATTATCACATGTTCTGGGCTCCATCCAAGTAACTTTTTGTTT
CCCCTCCTCCTCGGGCTTCGGCTGTACAGAGACTTACTTGAAAACCTTCATCTTCTGCCTAGCA

CATGATCACTTTAAAATGCCTAACCACAGAGGGTGCAATTCTTGGGCACACACAGGAACTTGG
ACAGTTCATTTAATGTTGTCTTGGGATTGGGGGTGGGAGAACGAAGCCTGGGGGTGAATGAG
GGAGAGGGGAGAGGACATTCCACAAAGCAAGCCAAGTCTGTTGAATTGCATGAGCTCTGAAAA
TCTGTAAATCTGGACAAGTAGATGGGTCTGCTATCTTTTCCTTTAGAAGAGGGTAGCGCAGTCA
TACCACAACCTTCAGAATGCAATTGGACTACAACGCCCTGTACACCTCAGCTTCAGGTAAAGCTG
AAGGGAACCTGCAGCCCAGCAACATCTGGAACTCACAGTTTGCCATCATCTACTATAGAGAAA
AAGGGTTTCTCATATTATACATAGGATTTCTACCTCACCTTTCTCCCAACTGGGATTTAACATGG
TGATAGATGTTTCCAAACAGAAATAGAAAATGATAGAACTTTTTGCTAAAATGAGAAAAAAG
CAGATATCTTAACTTAAATGAAAATATATAGGCTGTCTTGAGGTTCCAGATTGACAATCCAATG
GGTTCACCTCTATTATAGGATTCTGTATTCTCTCATCTGAAGCTAACTAAAGACTAAGATCCCATC
TACACTGCCATATAATGCAGTTTGGAACTCATATAATGTGGTTTAATTAAGATGGATTTCTGACC
ATGCTATGCATTGGAAGCTTGAAAGGCTG

8.3.2.5.2 Secuencia Exón 2

ID GenBank: NC_014778.1; *Anolis carolinensis* chromosome 3, AnoCar2.0, whole genome shotgun
sequence region from base 199108816 to199109539. Azul: AEx2-TYR

TCAAAAATCCTGCACTACACTGAAAAAAGTCCTCCAAGAACTAAAGGACATGTCTGGATTCAG
GATTTGAGGTCTTTCTCTGTGGGAGGAATATGTGAATTAATATGCAAATGCCATATTGGAAAGT
AAAGGCAAAAGGGATTACCTTCCAAAGTATTCTGAAGCTGAAGTTAGCCATTTTGTCCATGGT
TCCCGCTTCGTACTGTGTCAAACCTAAGCAGAATTCAACATCTGCCGAAGATGGAAGCCGAGG
TGTCTCCCTTTATCATGGTTGCCGGGGTTTCGAAGAATAGGCCCTTCATTTGTGCCATTGCAA
AGTTCTTGACGACTGTTGTACTCTTCTGACCGGCTGCAAATTACCTGCAGATTATACATAGTGG
ATTGAGATGTAAGACAACGGAGAAAATTTCAAGTCTTAATTTCTCCTTACTTCATGGGAATTTAG
TTTACTCTAAATGGAGCCAATCTACTAAAAATCATACCAAATCACTTGTGCTTTGCTTAGAGTTG
CAAGATTGGATGCCTTAGAATCATAGCATCATACTGTTGGAAGAGACCACATGGGCCATGCAG
TCCAACCCTCTGCCATGCAGGAAAAGCATAAAGTACCCCTGGCAGATGGCCATCCAGCCTCTG
TTTAAAAGCTTCTAAGGAAGGAGTTTCCACCACACTCTGAGGCAGTTTTCCAGTGTTGAACTGC
TCTCACGGTCAAGAAGTTCTT

8.3.2.5.3 Secuencia Exón 3

ID GenBank: NC_014778.1; *Anolis carolinensis* chromosome 3, AnoCar2.0, whole genome shotgun
sequence region from base 199070483 to199071161. Azul: AEx3-TYR

CTTCATTTCTGCAAACTGAGAGCTAAATACAAAATTAATTTTTACTCTGTCAACTCAATGGAAT
CTTGTCCAGCCCAGTAGGCAGTAGTCCTGAGGAATCCATTGTTTCAGCAAGAAGAGTTTAGAGT
AATATTGCAAGACCAAAGAAATGGTGTGAGTTATGAAATAATGACAGATATCTAGTACATATGTC
AGAGGATGCCACTTTTAGATCCCATAGTCTGGATACCTGTCAAAACACATTTTAAGCATTCATTT

TTCCTACCTGTCAACAAAGGCATGGTGAAGGATGAAGATGGGATCATTGGCTGATCCTTGAC
CTCAGACATGGAGCCATTCATGTAGATGTGCAATGCGTTGTGCAGGCTGCTTTGAGATACATTT
GATATTGCAGTACTCGGATCAGCAAAGCCTGTTGGTGAAGAAGATTGGTTAAATGATAGTGATT
GGTAAATACAGTCGCTGGTATCCTCTGTTACAGTTTATGGATTTTAAACCTAGACTTAACAATT
TGAATCTCCTCAATAATCCTGTATATTCATGATGGAGGCACTATAGCTTTCCCCCAAACCTGCC
TTAAACTCCAGGAAGCCACTCCAAGTGATGAAGATTCTGGTGGTGATCAGGCAAAGAACTAA
GGATACACCTATAATGTAGAATTAATATAGTTTGACAC

8.3.2.5.4 Secuencia Exón 4

ID GenBank: NC_014778.1; *Anolis carolinensis* chromosome 3, AnoCar2.0, whole genome shotgun sequence region from base 199055909 to 199056609. Azul: AEx4-TYR

AGAATAATCCACAGATTCTCACAGCAGTGTCTTACTTGCATGATATAAAGAGGAAAAATTAACA
CGTATAAGGCTCAGAAACCTCCTGCTTCTGAAGATCTAATTATCACAGTGTGATATCTCAAAAC
ATGTATAGTTATTGGTCACTCCCCATATTTCTACCTTCTCTATATGTGAAGAGATCATATATGA
AAAATTAATTCAATATTCATATTTTACCTGGATTTGTTAGATATTCATAGTCATATCCCAGTTCTA
TTGATGATATGAAGAATTCCCCATTCTGTAAAGTGGAATGAAGGGGACCATGTAGGATTCACG
GTTGTGTCCAATTGGGGCATTGGCTGCAGGATAAACCTCACGTAGAGGTGATGTCTTCTAAG
CCATTGTTCAAAAATGCTGTGAAAAGAGACATTGATGTAAGCATCACACAAGGATCCTCTTGCA
TTTCAGCCCAAAGTAGGAAGACAATCATTAGTAATTTGTAACAAGGCCATCAATAATGCTTACTA
GAACTCACACAATGGAAAATGGAAAATACCAACATAAACACCAGTAAAATAGTCTTCACCCAAC
AATGAGGTAGTAGTAGACAAAACCTGTTTCAGTCCCTCAGTCTTGTTGCCACCACTGAAAAAGC
TCTGTTTTGTGTAACATGATTCACACTTGCAATAGAGTAGTGACGAGGCTCAGTTACT

8.3.2.5.5 Secuencia Exón 5

ID GenBank: NC_014778.1; *Anolis carolinensis* chromosome 3, AnoCar2.0, whole genome shotgun sequence region from base 199045395 to 199047895. Amarillo: AEx5-TYR, Verde: BEx5-TYR, Azul: CEx5-TYR, Morado: DEx5-TYR

CAATCAAAGCATTCCCAATAGATGGCCATCCAGCCTACTTTAAAAAATATCTGCTAAGCATTAAA
GGAGCAGGTGTCCTGTCCCAGTATTTGATCTGGCAATTTTCAGTCCTGAGCTTTTGTGATATTCA
GGGTAAGTATAACATCACCAGTCAATATCAATTTTCCAAGAAAGACTTTAAAATATGGAGGCA
AACTTTTTTCTTCTTAAGGCAGAATAAAATATGTTTATTGGTAGGTTATTCCACGTGTGCCAATA
GCAGAGGTGCGCACATATAATTGCCCTTAAGAAATAAAAATACAAAGGCAGATTTCAAAATACA
TAACAGTGTCTCATGTGTAGGCATGAATAGTGGCACACACTACATCTGGAAATATGCTTGTTCA
TATACAATGGTCTACATAGTCTGGTCCACATTTTCAACCCAAGGTGGGCTAAATGCTTCTTGTA
CTTAGATATAGTAATATTTATTGTGACATAGAGTCATCCTTGAAACTGACCACTTTTGTGTCAGA
TGTGTTTCATCTTGAAGAATTGTCACCTTGTGGTATCTTCGTCCACAACCTATCTGAGGATGCAT

CCAATCTGTTGAGTTAATGCATCTTGGTGCCATTTTAATTGTCATGGTTCAATGTTATGTAATCA
TGGGAGCTGTAGTTTGATGAGACACCAACATTATTTGGCATAGAAGACTAAAGACAATGTAAAT
ATTATCCCAGCCCCACTAAGAGAGAAAAGAAGACTCGAGAGATGCTGTCTGATGGTATCCCATT
CTATAATAATACGTTATCTTTCTAAGATTGGTGGAAAAGCACGTCCCTTGGTTGTACTGGCCCC
CAATAGCTGCCATTGTGTCTTTTTCCCTAATGCCCCCACATACAATGTCTATAAAAGTAATATGA
CTGCTGCCACATTGTCCTAACTAAATTCCACATCTTCAAGACATTGCCCAAATCATGTTGGT
GAGTTTCAACTACAGTTAACTATTAATGAATTGTTGAATGCTGAGTCAACAAATAAGCAAAAC
CTGATGATTCAATGAGCTTTCTTTGAATTGAACAAAAATTGGGATTCAGCTAATTGCTGAAAAGA
ATGGTGAATCGACCTTGAGCTATTAAGTTTTTTACTCAGTGTGCTTTTTTAAAAATGACAATGGC
AAGAGGATCAGGCTGGTTGTCTAATGATGCTATGTAGTGCTGTGCTGTATAATGAAATCTGCTCCT
TGAACCAGCTCCAGTTGCAAATATAAAAGAATGGTTAAATGTGCTTAAGTCTGCCTTGAAGTG
ATTTTAATGTTCAATAACCAACATTAGATTATTGAAAGAATAAAGGTGAACATTGACAAGTTATGA
TAGACCCACAACAGGAGGTTCTGATGTCTTTTCAAAGCTTCAAATCAAACATTTTCATGGAGTG
GAGAGATGGGATTAGTGTTGCATTTGATCATTCTCTCAATTAAATTATATCTCCTATATTTCAA
GCAGCTTTTGCAGATATTAATAACAGGTACTCATATTGTATCTGACCTAAATCCTATTGTTGGT
CCCAACACTAGACCAATTAATCAGTGGTAACTTGGTAACTCAACACATATGTCAATTCAATTGA
TTCAATAAGTCTAGTCTATTTGAAATTAACAATGGATTTTCAGGATGCTGTGTTTTCTTCTGTGA
GGTCAATAGTTGCTAGCCAGCCCTGGGGAACATCTATTCAAACACTAGATGTTTTAACTGTAATT
CCCACAATGGCTTACTATTGACCATGCCAGGTAGGGTTGGATCCAAAATATCTCGTGAACCAAA
GATATTCCAGCATTTGACAATACTTGCTGGCAATGGGGTAGGAAAGTGGGAAATATCACCTCTC
CCTCTTCCCCATCGCCAACACACCTTTTGTTTCTCTACTATATCCATTTATTTTGACTGCAGTCC
TGAATTAATAGACAAACATACAGAACACCAAGCTTTGGGAAAGATATCAGGACCATATGTCACA
GATTCCCAACAACATGTCAAGTTTCACCCTAAGTATGGGTACTGGACTATGGTTATACATGTGA
CTGGTATGTCATGTGCTGATAATCCTCACTCTCCATGAGTAATGGTTGTGTCTCTTCTGAGATC
CGTCTCTTCTTCCGACATCGTAGAACAATGATGCCAACAATCAACATTATAATGGCACCCACCA
CGGCAGCTCCCACCAGCCATGGCCAGATTTGACGTGCCTGTTCCAAATAAGGCAGGAAAAAAT
TCTGGAAGGGGTTGGCTGTGAAGAGAGAGAAAGAGAAAGGAAGAACATTGCCTCAATTTTCCA
TTATAAAGCAGAAATCATTGAGAATCCAAGACATCAACAAGAGCCAAACTGGTGTAAGAAATG
GATCCAATAATATTTGCTTCTTCCACAACAAAGTGCTCCAAACCTATGCTAGAACCAAATTGTAA
ATTAACCATATGGAAAATTTTCTTGGGTTTATGAATTGTACATCCTCCATGCAGAGA

9. Amplificación

9.1 Amplificación gen ND4

Se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis *et al.*, 1986) de 25 µL. Se utilizó el kit comercial TopTaq Master Mix de la empresa Qiagen, los ciclos se describen a continuación:

La incubación inicial fue a 94 °C por tres minutos, para desnaturalizar la cadena de ADN, se mantuvo en 94 °C por un minuto seguido de una disminución de temperatura a 51 °C por 30 segundos para el alineamiento, nuevamente se elevó la temperatura a 72 °C por 2 minutos para la extensión y se repitió este ciclo 40 veces. Al finalizar el último ciclo desnaturalización-alineamiento-extensión se mantuvo por cinco minutos la temperatura de 72 °C para finalizar la amplificación. (Modificado de Zarza, Reynoso, & Emerson, 2008).

La curva de Magnesio (figura 34) muestra que en las concentraciones 1.5, 3, 3.5, 4 y 4.5 mM de Mg^{2+} se presentan amplificados del tamaño esperado, pero con diferente concentración del mismo, el pozo que presentó una mayor intensidad (Concentración) fue pozo tres (1.5 concentración de Mg^{2+}) y pozo 6 (3.5 concentración de Mg^{2+}). Mientras las concentraciones que van de 3.5 a 4.5 se nota una disminución de la intensidad de la banda.

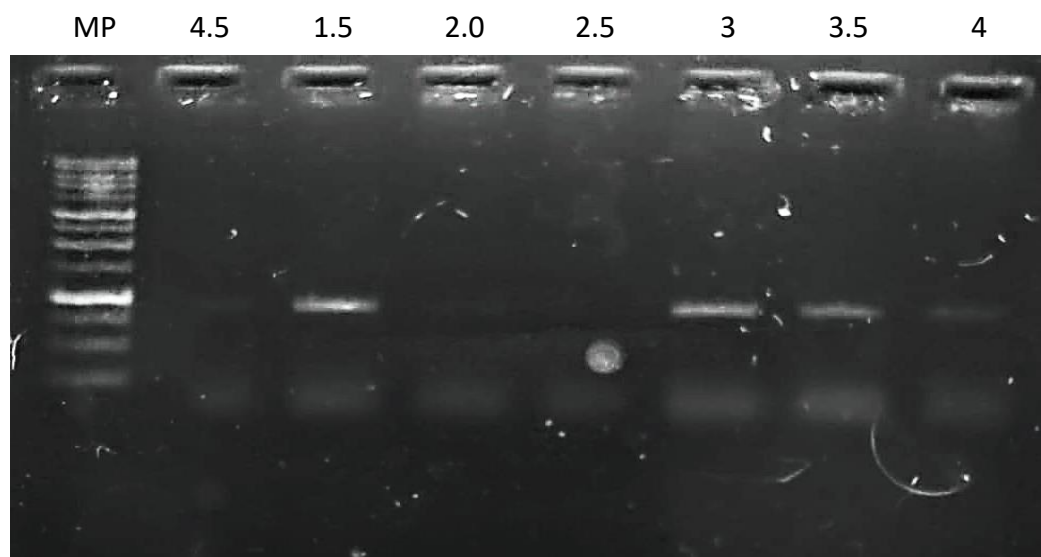


Figura 34. Concentración de magnesio (mM) que va de 1.5 mM a 4.5 mM en gel de agarosa al 1% teñido con Midori green. El primer carril es el marcador de peso molecular de 1 Kb.

9.2 Amplificación gen TYR

Los ensayos se están llevando a cabo en el laboratorio de bioquímica molecular de la UBIPRO en la FESI-UNAM.

9.3 Secuenciación

Las muestras de ADN se mandaron al departamento de secuenciación del laboratorio de bioquímica de la unidad UBIPRO de la FES-Iztacala de la UNAM con el M. en C. Alejandro Monsalvo.

9.3.1 Secuencias obtenidas del gen mitocondrial ND4.

Para este trabajo se secuenciaron 5 muestras de ADN mitocondrial que pertenecen a cinco diferentes individuos de la especie *C. pectinata*. Cada secuencia está formada por el secuenciado de la cadena pesada y ligera resultado de la amplificación de los *primers forward* y *revers*.

1-A-ND4 Forward (930) Coatetelco, Estado de Morelos, México.

```
GCCCTGCTGTTGGTTTGGCGGGGACCAAAAAAGCACTCCTAAAAAAGGTCCTAAGCGCCCCGGCGT
CCCCGAGCTTTTTAAAAAAGAACTAACACACAACTATTCTCCCCCTTTTAATCCGGGCCCTAT
GGGGCATCGTAATAACCAGCTCCATCGGCAAACGAAAAAAGATCTAAATCACTAATCGCCTCCTCATCA
GGAAGCCACATAGGACTAGCCCTCCCTGCATGCCTAATCCAAACCCCATGAAGCATCCCTGGGGCCACA
ATCCTAATAATTGCCAGGGCCTAACATCTTCCATATTATTCGGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAAC
TCACACCCGAACCTTAATCCTAGCCCGGGGCTTCAAATCCTCTACCCCAAAAAACATCATGAGGACTC
CTTGCCAACTAACCAACATAGCCCTCCCCCGACCATTAATTTAATGGGGGAGCTTATAATTTCCCGC
CCTCTTCAACTGATCCCAACCAACAATTATCCTAACGGGACTAGGCCCCCTCATCACAGCCATTTACTCAT
TACACATATTCTAAAAACACAACGAAACAACTCCCACTCCACATTACCATTACAGACCAACACACACTC
GGAGAACATCTAATCATAGCCCTTCCACATACTCCCACTCGCGTTAAAAACAAAAACCAACTCTCCATC
TCAAGCACCTTTCGCTTGTAGCATAGTTTAACAAAATCTTTGGGGTGTGGGCCCTAAAAACAGGGAGTT
CCACCTTCCCTCTTGCCAAACCGGAGGGGGTGTTCGAACACTAAAGAACTTGCCTTATTCTCTTATTTC
TGGAAGATAAATTTTCATGCAGATCTCTTACTTTTAAAGGAGAATAAAGGGCCATCTACTGGGTGTGTTAG
GCCCCTAAA
```

>Ctenosaura pectinata haplotype H75 NADH dehydrogenase subunit 4 (ND4) gene, partial cds; mitochondrial
Sequence ID: EU246766.1 Length: 561

Range 1: 67 to 561

Query: None Query ID: lcl|Query_56633 Length: 930

>Ctenosaura pectinata haplotype H75 NADH dehydrogenase subunit 4 (ND4) gene, partial cds; mitochondrial
Sequence ID: EU246766.1 Length: 561

Range 1: 67 to 561

Score:710 bits(384), Expect:0.0,

Identities:458/495(93%), Gaps:0/495(0%), Strand: Plus/Plus

```
Query 98 ACTAACACACAACTATTCTCCCCCTTTTAATCCGGGCCCTATGGGGCATCGTAATAAC 157
C. pect 67 ACTAACACACAACTATACTACCCCTTCATAATCCTAGCCCTATGGGGCATCGTAATAAC 126
Query 158 CAGCTCCATCGGCAAACG a a a a aGATCTAAATCACTAATCGCCTCCTCATCAGGAAG 217
C. pect 127 CAGCTCCATCTGCATACGACAAACAGATCTAAATCACTAATCGCCTACTCATCAGTAAG 186
Query 218 CCACATAGGACTAGCCCTCCCTGCATGCCTAATCCAAACCCCATGAAGCATCCCTGGGGC 277
C. pect 187 CCACATAGGACTAGTCATCACTGCATGCCTAATCCAAACACCATGAAGCATCACTGGAGC 246
```

Query 278 CACAATCCTAATAATTGCCAGGGCCTAACATCTTCCATATTATTTCGGCCTAGCCAACAC 337
C. pect 247 CACAATCCTAATAATTGCCATGGCCTAACATCTTCCATACTATTCTGCCTAGCCAACAC 306
 Query 338 CAACTACGAACGAACCTCACACCCGAACCTTAATCCTAGCCCCGGGGCTTCCAAATCCTCCT 397
C. pect 307 CAACTACGAACGAACCTCACACCCGAACCTTAATCCTAGCCCCGAGGCTTCCAAATCCTCCT 366
 Query 398 ACCCCAAAAAACATCATGAGGACTCCTTGCCAACCTAACCAACATAGCCCTCCCCCGAC 457
C. pect 367 ACCCCTAATAACATCATGATGACTCCTTGCCAACCTAACCAACATAGCACTCCCCCGAC 426
 Query 458 CATTAAATTAATGGGGGAGCTTATAATTTTCCCCGCCCTCTTCAACTGATCCCAACCAAC 517
C. pect 427 CATTAACTTAATAGGAGAGCTTACAATTATCTCCGCACTCTTCAACTGATCCCAACCAAC 486
 Query 518 AATTATCCTAACGGGACTAGGCCCCCTCATCACAGCCATTTACTCATTACACATATTCCT 577
C. pect 487 AATTATCCTAACGGGACTAGGCACCCTCATCACAGCCATCTACTCATTACACATATTCCT 546
 Query 578 AAAAACACAACGAAA 592
C. pect 547 AATAACACAACGAAA 561

2-ND4 Revers (884) Coatetelco, Estado de Morelos, México.

GATAACAAAATGTAAATTCGCGCAGTGTGGGGCCTCCTTATGGTTTATCAGTAGAGTGATCTGAGGAATT
 TAACTTCAGGAATAAGAATTAGCAGTTCTTAGTGTTTGAAACACCTCTCGGTTTGCAAGGGGAGTTGAACT
 CCTGTTTTTAGGGCCACATCCTAATGTTTTTGTAAACTATGCTAACAGGCGAAGGTGCTTGAGATGAGAG
 TTGGTTTTATGATTAGTAGCGCAGTGAGGAGTATGTGGAGGGCTATGATTAGATGTTCTCGAGTGTGTGT
 GGGTCTGTAATGGTAATGTGGAGTGGGAGTTTGTTCGTTGTGTTATTAGGAATATGTGTAATGAGTAGAT
 GGCTGTGATGAGGGTGCCTAGTCCGGTTAGGATAATTGTTGGTTGGGATCAGTTGAAGAGTGCGGAGATA
 ATTGTAAGCTCTCCTATTAAGTTAATGGTCGGGGGGAGTGCTATGTTGGTTAGGTTGGCAAGGAGTCATCA
 TGATGTTATTAGGGGTAGGAGGATTTGGAAGCCTCGGGCTAGGATTAAGGTTCCGGGTGTGAGTTTCGTTCCG
 TAGTTGGTGTGGCTAGGCAGAATAGTATGGAAGATGTTAGGCCATGGGCAATTATTAGGATTGTGGCTC
 CAGTGATGCTTCATGGTGTTTGGATTAGGCATGCAGTGATGACTAGTCCTATGTGGCTTACTGATGAGTAG
 GCGATTAGTGATTTTAGATCTGTTTGTGCGTATGCAGATGGAGCTGGTTATTACGATGCCTCATAGGCTAGG
 ATTATGAGGGTTAGTATAGTTTGTGTGTAGTGGCGAGAGAATAGGTGACTCGGATGATGGCGTAGCCCT
 AGCTTAAGTAGATAGCGCAGGTACTATTAGAGTCGA

Query: None Query ID: lcl|Query_26883 Length: 884

>*Ctenosaura pectinata* haplotype H01 NADH dehydrogenase subunit 4 (ND4) gene, partial cds; tRNA-His and
 tRNA-Ser genes, complete sequence; and tRNA-Leu gene, partial sequence; mitochondrial

Sequence ID: KX610565.1 Length: 798

Range 1: 4 to 772

Score:1170 bits(633), Expect:0.0,

Identities:725/770(94%), Gaps:4/770(0%), Strand: Plus/Minus

Query 51 AGTAGAGTGATCTGAGGAATTTAACTTCAGGAATAAGAATTAGCAGTTCTTAGTGTTCTGA 110
C. pect 772 AGT-GAGGGGTCTGAGGAGTTTAACTTCAGGAATAAGAATTAGCAGTTCTTAGTGTTCTGA 714
 Query 111 AACACCTCTCGGTTTGCAAGGGGAGTTGAACTCCTGTTTTTAGGGCCACATCCTAATGTT 170
C. pect 713 AACACCTCTCGGTTTGCAAGGAGAGTTGAACTCCTGTTTTTAGGGCCACATCCTAATGTT 654
 Query 171 TTTGTTAACTATGCTAACAGGCGAAGGTGCTTGAGATGAGAGTTGGTTTTATGATTAGT 230
C. pect 653 TTTGTTAACTATGCTAACAGGCGAAGGTGCTTGAGATGAGGGTTGGTTTTATGATTAGT 594
 Query 231 AGCGCGAGTGGGAGTATGTGGAGGGCTATGATTAGATGTTCTCGAGTGTGTGTTGGGTCT 290
C. pect 593 AATGCGAGCGGGAGTATGTGTAGGGCTATGATTAGATGTTCTCGAGTGTGTGTTGGGTCT 534
 Query 291 GTAATGGTAATGTGGAGTGGGAGTTTGTTCGTTGTGTTATTAGGAATATGTGTAATGAG 350
C. pect 533 GTGATGATAATGTGGAGTGGGAATTTGCTTCGTTGTGTTATTAGGAATATGTGTAGTGAG 474
 Query 351 TAGATGGCTGTGATGAGGGTGCCTAGTCCGGTTAGGATAATTGTTGGTTGGGATCAGTTG 410
C. pect 473 TAGATGGCTGTGATGAGGGTGCCTAGGCCGTTAGAATAATTGTTGGTTGGGATCAGTTG 414

Query 411 AAGAGTGCGGAGATAATTGTAAGCTCTCCTATTAAGTTAATGGTCGGGGGGAGTGCTATG 470
C. pect 413 AAGAGTGCGGAGATAATTGTAAGTTCTCCTATTAATAATTGTGGGGGGAGTGCTATG 354
 Query 471 TTGGTTAGGTTGGCAAGGAGTCATCATGATGTTATTAGGGGTAGGAGGATTTGGAAGCCT 530
C. pect 353 TTGGCTAGGTTGGCAAGAAGTCATCATGATGTTATTAGGGGTAGAAGGATTTGTAAGCCT 294
 Query 531 CGGGCTAGGATTAAGGTTTCGGGTGTGAGTTCGTTTCGTAGTTGGTGTGGCTAGGCAGAAT 590
C. pect 293 CGGGCTAGGATTAAGGTTTCGGGTGTGGGTTCGTTTCGTAGTTGGTGTGGCTAGGCAGAAT 234
 Query 591 AGTATGGAAGATGTTAGGCCATGGGCAATTATTAGGATTGTGGCTCCAGTGATGCTTCAT 650
C. pect 233 AATATAGAAGATGTTAGGCCATGGGCAATTATTAAGATTGTAGCTCCGGTGATACTCCAT 174
 Query 651 GGTGTTTGGATTAGGCATGCAGTGATGACTAGTCCTATGTGGCTTACTGATGAGTAGGCG 710
C. pect 173 GGTGTTTGGATTAGGCATGCAGTGATGACTAATCCTATGTGGCTTACTGATGAGTAGGCG 114
 Query 711 ATTAGTGATTTTAGATCTGTTTGTGCTATGCAGATGGAGCTGGTTATTACGATGCCTCAT 770
C. pect 113 ATTAGTGATTTTAGATCTGTTTGTGCTATGCAGATGGAGCTGGTTATTACGATGCCTCAT 54
 Query 771 AGG-CTAGGATTATG-AGGGTTAGTATAGTTTGTGTGT-AGTGGCGAGAG 817
C. pect 53 AGGGCTAAGATTATGAAGGGTAATATAGTTTGTGTGTAGTGGTGAAAG 4

3-ND4 Forward (920) Coatetelco, Estado de Morelos, México.

GCGTTGTGGTTGGGGGCGCGCACCCGAGAATAAACCCCTAAAAAAGCCCTTAGGCTACGGCATCATC
 CGAGTTTTCTTAAACTCTCGCCACTAACACAAAACTATACTACCCCTTCCTAATCCTGGCCCTATGAG
 GCATCGAAATACCCAGCTCCATCTGCATACAAAAAAGATCTAAATCCCTAATCCCCCCTCATCAGTA
 AGCCACATAGGACTAGTCATCCCTGCATGCCTAATCCAAACCCCATGAAGCCTCCCTGGGGCCACAATCC
 TAATAATTGCCCATGGCCTAACATCTTCCATACTATTCTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCTCAC
 CCCCGAACCTTAATCCTAGCCCGAGGCTTCCAAATCCCCCTACCCCTAAAAACATCATGAGGACTCCTTG
 CCAACCTAACCAACATAGCACTCCCCCGACCATTAACCTAATAGGAGAGCTTTTAATTATCTCCGCACTC
 TTCAACTGATCCCAACCAACAATTATCCTAACCAGGGCTAGGCCCCCTCATCACAGCCTTCTACTCATTACA
 CATATTCTTAAAAACACAACGAAACAACTCCCACTCCACATTACCATTACAGACCCAACACACACTCGAG
 AACATCTAATCATAGCCCTCCACATACTCCCACTCGGGCTAATAAAAAATAAAACCCACTTCTCATCTCAAG
 CACCTTCGCTGTTAGCATAGTTTAAACAAAAACATTTGGGATGGGGGCCCAAAAAACAGGGAGTTTCACTT
 CTCCTTTGAAAAACGGAGGAGGGGTTTTCGAAACAATAAAGAACTTGCTTTATTTCTTTTTTTCTTGAAGT
 ATAAATTTCTCAAACTCCCTCTCTTTTTAAAGGAATAAAAAGCCATTTCTTTTTGTTTTTTAGGG

Query: None Query ID: lcl|Query_24473 Length: 920

>*Ctenosaura pectinata* haplotype H45 NADH dehydrogenase subunit 4 (ND4) gene, partial cds; mitochondrial
 Sequence ID: EU246737.1 Length: 561

Range 1: 29 to 561

Score:813 bits(440), Expect:0.0,

Identities:503/534(94%), Gaps:1/534(0%), Strand: Plus/Plus

Query 55 GGCTACGGCATCATCCGAGTTTTCTTAAACTCTCGCCACTAACACAAAACTATACTA 114
C. pect 29 GGCTACGGCATCATCCGAG-TCACCTAATACTCTCGCCACTAACACAAAACTATACTA 87
 Query 115 CCCCTTCCTAATCCTGGCCCTATGAGGCATCGAAATACCCAGCTCCATCTGCATACaaa 174
C. pect 88 CCCCTTCATAATCCTAGCCCTATGAGGCATCGTAATAACCAGCTCCATCTGCATACGACA 147
 Query 175 aaaaGATCTAAATCCCTAATccccccTCATCAGTAAGCCACATAGGACTAGTCATCCC 234
C. pect 148 AACAGATCTAAATCACTAATCGCCTACTCATCAGTAAGCCACATAGGACTAGTCATCAC 207
 Query 235 TGCATGCCTAATCCAAACCCCATGAAGCCTCCCTGGGGCCACAATCCTAATAATTGCCCA 294
C. pect 208 TGCATGCCTAATCCAAACACCATGAAGCATCACTGGAGCCACAATCCTAATAATTGCCCA 267
 Query 295 TGGCCTAACATCTTCCATACTATTCTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCTACCC 354
C. pect 268 TGGCCTAACATCTTCCATACTATTCTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCTACAC 327
 Query 355 CCGAACCTTAATCCTAGCCCGAGGCTTCCAAATCCCCCTACCCCTAAAAACATCATGAGG 414
C. pect 328 CCGAACCTTAATCCTAGCCCGAGGCTTCCAAATCCCCCTACCCCTAATAACATCATGATG 387
 Query 415 ACTCCTTGCCAACCTAACCAACATAGCACTCCCCCGACCATTAACCTAATAGGAGAGCT 474
C. pect 388 ACTCCTTGCCAACCTAACCAACATAGCACTCCCCCGACCATTAACCTAATAGGAGAGCT 447

Query 475 TTTAATTATCTCCGCACTCTTCAACTGATCCCAACCAACAATTATCCTAACCGGGCTAGG 534
C. pect 448 TATAATTATCTCCGCACTCTTCAACTGATCCCAACCAACAATTATCCTAACCGGACTAGG 507
 Query 535 CCCCCTCATCACAGCCTTCTACTCATTACACATATTCCTAAAAACACAACGAAA 588
C. pect 508 CACCCTCATCACAGCCATCTACTCATTACACATATTCCTAATAACACAACGAAA 561

4-ND4 Revers (880) Coatetelco, Estado de Morelos, México.

GGGGGGAGGGAGCTAGGCGTTGTAGTAAGGGCCTAATTTTGGTTAACCAGTAGAGGGATCTGAGGAATT
 TAACTTCAGGAATAAGAATTAGCAGTTCCTAGTGTTGCAAACACCTCTCGGTTTGCAAGGGGAGTTGAACT
 CCTGTTTTTAGGGCCACATCCTAATGTTTTGTAAACTATGCTAACAGGCCAAGGTGCTTGAGATGAGAG
 TTGGTTTTATGATTAGTAGCGCAGTGGGAGTATGTGGAGGGCTATGATTAGATGTTCTCGAGTGTGTGT
 GGGTCTGTAATGGTAATGTGGAGTGGGAGTTTGTTCGTTGTGTTATTAGGAATATGTGTAATGAGTAGAT
 GGCTGTGATGAGGGTGCCTAGTCCGGTTAGGATAATTGTTGGTTGGGATCAGTTGAAGAGTGCAGGAGATA
 ATTGTAAGCTCTCCTATTAAGTTAATGGTCGGGGGGAGTGCTATGTTGGTTAGGTTGGCAAGGAGTCATCA
 TGATGTTATTAGGGGTAGGAGGATTTGGAAGCCTCGGGCTAGGATTAAGGTTCCGGGTGTGAGTTCGTTTCG
 TAGTTGGTGTGGCTAGGCAGAAATAGTATGGAAGATGTTAGGCCATGGGCAATTATTAGGATTGTGGCTC
 CAGTGATGCTTCATGGTGTGGATTAGGCATGCAGTGATGACTAGTCCTATGTGGCTTACTGATGAGTAG
 GCGATTAGTGATTTTAGATCTGTTTGTGCTATGCAGATGGAGCTGGTTATTACGATGCCTCATAGGCTAGA
 TTATGAGGGTAGTATAGTTGTGTGTTAGTGGCGAGAGAATTAGTGACTCGGATGATGCGTAGCCCTTAGC
 TTAAGTAGGATAGCCGCAAGTACTATAGAGCGCA

Query: None Query ID: lcl|Query_37243 Length: 880

>*Ctenosaura pectinata* haplotype H78 NADH dehydrogenase subunit 4 (ND4) gene, partial cds; mitochondrial
 Sequence ID: EU246769.1 Length: 561

Range 1: 1 to 561

Score:950 bits(514), Expect:0.0,

Identities:547/561(98%), Gaps:9/561(1%), Strand: Plus/Minus

Query	316	TTTCGTTGTGTTATTAGGAATATGTGTAATGAGTAGATGGCTGTGATGAGGGTGCCTAGT	375
<i>C. pect</i>	561	TTTCGTTGTGTTATTAGGAATATGTGTAATGAGTAGATGGCTGTGATGAGGGTGCCTAGT	502
Query	376	CCGGTTAGGATAATTGTTGGTTGGGATCAGTTGAAGAGTGCAGGAGATAATTGTAAGCTCT	435
<i>C. pect</i>	501	CCGGTTAGGATAATTGTTGGTTGGGATCAGTTGAAGAGTGCAGGAGATAATTGTAAGCTCT	442
Query	436	CCTATTAAGTTAATGGTCGGGGGGAGTGCTATGTTGGTTAGGTTGGCAAGGAGTCATCAT	495
<i>C. pect</i>	441	CCTATTAAGTTAATGGTCGGGGGGAGTGCTATGTTGGTTAGGTTGGCAAGGAGTCATCAT	382
Query	496	GATGTTATTAGGGGTAGGAGGATTTGGAAGCCTCGGGCTAGGATTAAGGTTCCGGGTGTGA	555
<i>C. pect</i>	381	GATGTTATTAGGGGTAGGAGGATTTGGAAGCCTCGGGCTAGGATTAAGGTTCCGGGTGTGA	322
Query	556	GTTTCGTTTCGTAGTTGGTGTGGCTAGGCAGAATAGTATGGAAGATGTTAGGCCATGGGCA	615
<i>C. pect</i>	321	GTTTCGTTTCGTAGTTGGTGTGGCTAGGCAGAATAGTATGGAAGATGTTAGGCCATGGGCA	262
Query	616	ATTATTAGGATTGTGGCTCCAGTGATGCTTCATGGTGTGGATTAGGCATGCAGTGATG	675
<i>C. pect</i>	261	ATTATTAGGATTGTGGCTCCAGTGATGCTTCATGGTGTGGATTAGGCATGCAGTGATG	202
Query	676	ACTAGTCCTATGTGGCTTACTGATGAGTAGGCGATTAGTGATTTTAGATCTGTTTGTCTG	735
<i>C. pect</i>	201	ACTAGTCCTATGTGGCTTACTGATGAGTAGGCGATTAGTGATTTTAGATCTGTTTGTCTG	142
Query	736	ATGCAGATGGAGCTGGTTATTACGATGCCTCATAGGCTAGGATTATGAAGGGGTAGTAT	791
<i>C. pect</i>	141	ATGCAGATGGAGCTGGTTATTACGATGCCTCATAGGCTAGGATTATGAAGGGGTAGTAT	82
Query	792	AG-TTGTGTGTTAGTGCGCAGAGAATTAG--TGACTCGGATGATGC-GTAGCCCT-TAGC	846
<i>C. pect</i>	81	AGTTTGTGTGTTAGTGCGCAGAGTATTAGGGTGACTCGGATGATGCCGTAGCCCCCTAGT	22
Query	847	TTAAGTAGGATAGCCGCAAGT	867
<i>C. pect</i>	21	TTTAGTAGGATAGCGGCAAGT	1

5-ND4 Forward (930) UMA Barranca Honda, Yautepec, Estado de Morelos, México.

GTTAGGGGGGGGGTGGGGGGGGCCAAAGAAAAAAAAACCAAAAAAAAAAGGCCTAAGGATGGGGTTTC
 CGGAACTTTATGGGGGGTAAGACGAAAGGTGTCTTTCCTTTTTTAAGTGGGAGGGTGGGGGGTATTGTA
 TTACCGCGCTCCTTTGGCATAGGAAAAATTGTTCTTATATCCCTAATGGGCTACTCTGGGGAAGCCACTGG
 GGTCTGGTCTTCACTTCTGGCCTTATCCTAACTCTTTGATTTGTCCCCGTGGCCAATATCTTAATATTTCCC
 CATGGCCTAGCACCTTCCAACTATTCTGCCTAGCCAACACCAACAACGAGCAAACCTTACACCCGACCTTT
 AAGCCTGGGCCGGGGCTCCTAAACCCTCTTACCCTTTAAACCTCTGGAAGGCTCCTTTCCAACCTTACC
 AAAATACCCCTCCCCCGTCCATTAATTTAAAGGAGATTTTTCTTTTTTCTCCGCCCTTTCCACGGTCCC
 CAACCAAAATTTTTCTTCCGGGCTTGGGCCCCCTTTTTTTGCTTTTTTTCTTTACCCGTTTTCTTAAAA
 CACCCAGTACAAATTTCACTCCCAATGCCATTTCCAGACCCCAACACACACTCGGGGGACTTTTAAATCT
 TGCCCCCCCACCTACCCCCCCTTCGGGCTACTAATCATAAAACCATCCCTTCATCCCAGAGGCCCTTT
 CGCGTGGTAAGATTAGTTTAAACCAAAAACCATAGGGGTGGGGGGCCCTAAAAACGGGGGGTCCCCAC
 CTCCCCCTGGCAAAACGGGGAGGGGTTCCGAAAACCAAAAGAACTTCCTTAATTTCTTTTTTCCCT
 GGAAGATTAAATTTCTCTCGAGGACGCTTCTTTTTTTTATAAAGAGAAAATAAGACGGCGCCACTCCTCCT
 TTGTTGTTGT

Query: None Query ID: lcl|Query_8029 Length: 930

>Ctenosaura pectinata haplotype H83 NADH dehydrogenase subunit 4 (ND4) gene, partial cds; mitochondrial
 Sequence ID: EU246774.1 Length: 561

Range 1: 113 to 513

Score:247 bits(273), Expect:1e-60,

Identities:296/401(74%), Gaps:1/401(0%), Strand: Plus/Plus

Query 130	GGTATTGTATTACCGCGCTCCTTTGGCATAGGAAAAATTGTTCTTATATCCCTAATGGGC	189
C. pect 113	GGCATCGTAATAACCAGCTCCATCTGCATACGACAAACAGATCTAAAATCACTAATCGCC	172
Query 190	TACTC-TGGGGAAGCCACTGGGGTCTGGTCTTCACTTCTGGCCTTATCCTAACTCTTTGA	248
C. pect 173	TACTCATCAGTAAGCCACATAGGACTAGTCATCACTGCCTAATCCAAACACCATGA	232
Query 249	TTTGTCCCCGTGGCCAATATCTTAATATTTCCCATGGCCTAGCACCTTCCAACTATTC	308
C. pect 233	AGCATCACTGGAGCCACAATCCTAATAATTGCCATGGCCTAACATCTTCCATACTATTC	292
Query 309	TGCCTAGCCAACACCAACAACGAGCAAACCTTACACCCGACCTTTAAGCCTGGGCCGGGGC	368
C. pect 293	TGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCTACACCCGAACCTTAATCCTAGCCCGAGGC	352
Query 369	TCCTAAACCCTCTTACCCTTTAAACCTCTGGAAGGCTCCTTTCCAACCTTACCAAAATA	428
C. pect 353	TTCCAAATCCTCCTACCCCTAATAACATCATGATGACTCCTTGCCAACCTAACCAACATA	412
Query 429	CCCCTCCCCCGTCCATTAATTTAAAGGAGATtttttCTCCGCCCTTTTCCAC	488
C. pect 413	GCACTCCCCCGACCATTAACCTAATAGGAGAGCTTACAATTATCTCCGCACTCTTCAAC	472
Query 489	GGTCCCCAACCAAAATTTTTCTTCCGGGCTTGGGCCCCCT	529
C. pect 473	TGATCCCAACCAACAATTATCCTAACC GGACTAGGCACCCT	513

6-ND4 Reverso (909) UMA Barranca Honda, Yautepec, Estado de Morelos, México.

GCTGGTGAGATCTCGGCTTTTGTAGTTATGGGGAATATTTGGGAAATCAGAGGTGAGCTGAGGAATTTAA
 CTTTCAGGAATTATAATTAGCAGTTCTTAGTGTTGCGAACACCTTTCGGTTTGCAAGGGGAGTTGAACTCCT
 GTTTTTAGGGCCACATCCTAATGTTTTGTAACTATGCTAACAGGCGAAGGTGCTTGAGATGAGAGTTG
 GTTTTATGATTAGTAGCGGAGTGGGAGTATGTGGAGGGCTATGATTAGATGTTCTCGAGTGTGTGTTGG
 GTCTGTAATGGTAATGTGGAGTGGGAGTTTGTTCGTTGTGTTATTAGGAATATGTGTAATGAGTAGATGG
 CTGTGATGAGGGTGCCTAGTCCGGTTAGGATAATTGTTGGTTGGGATCAGTTGAAGAGTGCGGAGATAAT
 TGTAAAGCTCTCTATTAAGTTAATGGTCGGGGGGAGTGCTATGTTGTTTAGGTTGGCAAGGAGTCATCATG
 ATGTTATTAGGGGTAGGAGGATTTGGAAGCCTCGGGCTAGGGATTAAGGTTCCGGGTGTGAGTTCGTTTCGT
 AGTTGGTGTGCTAGGGCAGAATAGTATGGAAGATGTTAGGCCATGGGCAATTATTTAGGATTTGTGGC

TCCAAGTGATGCTTCATGGTGTGGATTAGGCATGCAGTGATGACTAGTCCTATGTGGCTTACTGATGAG
TAGGCGATTAGTGGATTTTAGATCTTGTGGTTCGATTGCAGATGGAAGCTGGGTTATTTACGATGCCTC
AATAGGGCTAGGATTATGAAGGGGTAGTATAGTTTTGTGTTGTAAGTGCGGAGAGTATTAGGTGACTCGA
ATGATGCGTAGCCTCCTAGTTTTAGTTAGGATAGCGGCAAGTTACCTATTAGAAGCCCCGCA

Query: None Query ID: lcl|Query_54671 Length: 909

>Ctenosaura pectinata haplotype H78 NADH dehydrogenase subunit 4 (ND4) gene, partial cds; mitochondrial

Sequence ID: EU246769.1 Length: 561

Range 1: 1 to 561

Score:922 bits(499), Expect:0.0,

Identities:555/578(96%), Gaps:19/578(3%), Strand: Plus/Minus

Query	314	TTTCGTTGTGTTATTAGGAATATGTGTAATGAGTAGATGGCTGTGATGAGGGTGCCTAGT	373
C. pect	561	TTTCGTTGTGTTATTAGGAATATGTGTAATGAGTAGATGGCTGTGATGAGGGTGCCTAGT	502
Query	374	CCGGTTAGGATAAATTGTTGGTTGGGATCAGTTGAAGAGTGCGGAGATAAATTGTAAGCTCT	433
C. pect	501	CCGGTTAGGATAAATTGTTGGTTGGGATCAGTTGAAGAGTGCGGAGATAAATTGTAAGCTCT	442
Query	434	CCTATTAAGTTAATGGTCGGGGGGAGTGCTATGTTGTTAGGTTGGCAAGGAGTCATCAT	493
C. pect	441	CCTATTAAGTTAATGGTCGGGGGGAGTGCTATGTTGTTAGGTTGGCAAGGAGTCATCAT	382
Query	494	GATGTTATTAGGGGTAGGAGGATTTGGAAGCCTCGGGCTAGGGATTAAGGTTCCGGGTGTG	553
C. pect	381	GATGTTATTAGGGGTAGGAGGATTTGGAAGCCTCGGGCTAGG-ATTAAGGTTCCGGGTGTG	323
Query	554	AGTTCGTTTCGTAGTTGGTGTGGCTAGGGCAGAATAGTATGGAAGATGTTAGGCCATGGG	613
C. pect	322	AGTTCGTTTCGTAGTTGGTGTGGCTAGG-CAGAATAGTATGGAAGATGTTAGGCCATGGG	264
Query	614	CAATTATTTAGGATTTGTGGCTCCAAGTGATGCTTCATGGTGTGTTGGATTAGGCATGCAG	673
C. pect	263	CAATTATT-AGGATT-GTGGCTCC-AGTGATGCTTCATGGTGTGTTGGATTAGGCATGCAG	207
Query	674	TGATGACTAGTCCTATGTGGCTTACTGATGAGTAGGCGATTAGTGGATTTTAGATCTTGT	733
C. pect	206	TGATGACTAGTCCTATGTGGCTTACTGATGAGTAGGCGATTAGTG-ATTTTAGATCT-GT	149
Query	734	TTGTTTCGTATTGCAGATGGAAGCTGGGTTATTTACGATGCCTCAATAGGGCTAGGATTAT	793
C. pect	148	TTGT-CGTAT-GCAGATGGA-GCTGG-TTATT-ACGATGCCTC-ATAGGGCTAGGATTAT	95
Query	794	GAAGGGGTAGTATAGTTTTGTGTTGTAAGTGCGGAGAGTATTAGG-TGACTCGAATGAT	852
C. pect	94	GAAGGGGTAGTATAGTTTTGTGTT---AGTGCGGAGAGTATTAGGGTGAAGTCCGATGAT	38
Query	853	GC-GTAGCCTCCTAGTTTTAGTTAGGATAGCGGCAAGT	889
C. pect	37	GCCGTAGCCCCCTAGTTTTAGT-AGGATAGCGGCAAGT	1

7-ND4 Forward (916) UMA Barranca Honda, Yautepec, Estado de Morelos, México.

GCCTTGTGTTGGTGGGGCGGGCGAGGAAAAAGACAAAAAAGGCCTAACGATCGTGCTTGGTCTT
TCTTAAGGGGGGATTTATTTTAGGTTGACTACTTTTGTGTTATAAAAGCTGTATGGGGTTCTTTTAATGCGT
CCATTTGCTTACGAAAAAAGTTTTAGTTCACTACTCGCCTCTTCTTAGGGAAGGTAAAAGAGGTAGGTTTC
CTTCCTTCTAATCCAAACGCCTGAAGCATCATTGGGGCCACAATCCTAAGTATGGCCCTTGGCCAACT
TCTTTAATACTATTCTGCCCTGCCAACAGCATCTACGAACGACCTGACACCCGAACCTGAGTGCGGGCCC
GGGGCTTCCAAAACCTCCTACCCTAAAAACATCCTGATGACCCCTTGCCAACCTAACCAAAAGGGTTTTTC
CCCCGGAACTTAAGTTAGTGGGGGGTTTTTTTTTTTTTCCCCGCACTTTCCAACGTATCCCCACCAACTATT
ATCCAAACCGGACGAGGGCCCCCTCATCACTGCCTTTTTCTGATTACCCATGTTCTTAAACAAAGCAGGA
CGAATTCCCCCTTTCCCATTTCCCATTTGACCGACCCCAACAAACACGGGGGGAACATTTAATCTTAGCCCT
CCACAATACTCCCGCTCGGGCTATAATTATAAAACCATCTCTCATGTCAAGGCCCTTGGGTTGGGTAGAA
AAGGTTTAAACAAAAATCATTAGGGGGGGGGGGCCAAAAAACGGGGGGGTTTATCCCCCCTTGTCCTCA
CGGGGGGGTGGGTTCCGAAACACTAAAGAACCTGGCTATATCCCTTATCTCTGAAGTTAAATCTCCTCA
GAGACGCATTCTATTTTTTAAAGGGAATGAAAAGGCGCCACACCTCCCCTTGTGGTTTTAGAG

Query: None Query ID: lcl|Query_43835 Length: 916

>Ctenosaura pectinata haplotype H45 NADH dehydrogenase subunit 4 (ND4) gene, partial cds; mitochondrial

Sequence ID: EU246737.1 Length: 561

Range 1: 214 to 553

Score:303 bits(335), Expect:2e-77,

Identities:271/340(80%), Gaps:0/340(0%), Strand: Plus/Plus

```
Query 222 CCTAATCCAAACGCCTTGAAGCATCATTGGGGCCACAATCCTAAGTATGGCCCTTGGCCA 281
C. pect 214 CCTAATCCAAACACCATGAAGCATCACTGGAGCCACAATCCTAATAATTGCCCATGGCCT 273
Query 282 AACTTCTTTAATACTATTCTGCCCTGCCAACAGCATCTACGAACGACCTGACACCCGAAC 341
C. pect 274 AACATCTTCCATACTATTCTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCTCACACCCGAAC 333
Query 342 CTGAGTGCGGGCCCGGGGCTTCCAAAACCTCCTACCCTAAAAAACATCCTGATGACCCCT 401
C. pect 334 CTTAATCCTAGCCCCGAGGCTTCCAAATCCTCCTACCCCTAATAACATCATGATGACTCCT 393
Query 402 TGCCAACCTAACC AAAAGGGTTTTCCCCCGGAAC TTAAGTTAGTGGGGGGttttttt 461
C. pect 394 TGCCAACCTAACC AACATAGCACTCCCCCGGACCATTAAC TTAATAGGAGAGCTTATAAT 453
Query 462 tttCCCCGCACTTTCCAACGTATCCCCACCAACTATTATCCAAACCGGACGAGGGCCCCCT 521
C. pect 454 TATCTCCGCACTCTTCAACTGATCCCCAACCAACAATTATCCTAACCGGACTAGGCACCCT 513
Query 522 CATCACTGCCTTTTTCTGATTACCCATGTTCTAAAAACA 561
C. pect 514 CATCACAGCCATCTACTCATTACACATATTCCTAATAACA 553
```

8-ND4 Revers (899) UMA Barranca Honda, Yautepec, Estado de Morelos, México.

GCGAAGTGATCTAGACGATGCAGTATGGGGGAATATGGGGGGTAGCCAGGGGTAATCTGAGGAATTTAA
CTTCAGGAATTAGAATTAGCAGTTCTTAGTGTTTCGAAACACCTCTCGGTTTGCAAGGGGAGTTGAACTCCT
GTTTTTAGGGCCACATCCTAATGTTTTGTAAACTATGCTAACAGGCGAAGGTGCTTGAGATGAGAGTTG
GTTTTATGATTAGTAGCGGAGTGGGAGTATGTGGAGGGCTATGATTAGATGTTCTCGAGTGTGTGTTGG
GTCTGTAATGGTAATGTGGAGTGGGAGTTTGTTCGTTGTGTTATTAGGAATATGTGTAATGAGTAGATGG
CTGTGATGAGGGTGCCTAGTCCGGTTAGGATAATTGTTGGTTGGGATCAGTTGAAGAGTGCGGAGATAAT
TGTAAGCTCTCCTATTAAGTTAATGGTCGGGGGGAGTGCTATGTTTTGTTAGGTTGGCAAGGAGTCATCAT
GATGTTTATTAGGGGTAGGAGGATTTGGAAGCCTCGGGCTAGGATTAAGGTTTCGGGTGTGAGTTCGTTCC
TAGTTGGGTTGGCTAGGCAGAATAGTATGGAAGATGTTAGGCCATGGGCAATTATTAGGATTGTGGCTCC
AGTGATGCTTCATGGTGTGTTGGATTAGGCATGCAGTGATGACTAGTCCTATGTGGCTTTACTGATGAGTAG
GCGATTAGTGATTTTTAGATCTGTTTTGTCGTATGCAGATGGGAGCTGGTTATTTACGACTGCCTCATAGG
GCTAGGATTTATGAAGGGGTAGTATTAAGTTTTGTTGTGTTTAGTGGCGAAGAGTATAGGTGACTTCGAAT
GATGCCGTAGCCCTCCTTAGTTTTAGTAGGATAGCCGGCCAGAGTTACTTAAT

Query: None Query ID: lcl|Query_3819 Length: 899

>Ctenosaura pectinata haplotype H78 NADH dehydrogenase subunit 4 (ND4) gene, partial cds; mitochondrial

Sequence ID: EU246769.1 Length: 561

Range 1: 2 to 561

Score:911 bits(493), Expect:0.0,

Identities:554/579(96%), Gaps:22/579(3%), Strand: Plus/Minus

```
Query 313 TTTCTGTTGTGTTATTAGGAATATGTGTAATGAGTAGATGGCTGTGATGAGGGTGCCTAGT 372
C. pect 561 TTTCTGTTGTGTTATTAGGAATATGTGTAATGAGTAGATGGCTGTGATGAGGGTGCCTAGT 502
Query 373 CCGGTTAGGATAATTGTTGGTTGGGATCAGTTGAAGAGTGCGGAGATAATTGTAAGCTCT 432
C. pect 501 CCGGTTAGGATAATTGTTGGTTGGGATCAGTTGAAGAGTGCGGAGATAATTGTAAGCTCT 442
Query 433 CCTATTAAGTTAATGGTCGGGGGGAGTGCTATGTTTTGTTAGGTTGGCAAGGAGTCATCA 492
C. pect 441 CCTATTAAGTTAATGGTCGGGGGGAGTGCTATGTT-GGTTAGGTTGGCAAGGAGTCATCA 383
Query 493 TGATGTTTATTAGGGGTAGGAGGATTTGGAAGCCTCGGGCTAGGATTAAGGTTTCGGGTGT 552
C. pect 382 TGATGTT-ATTAGGGGTAGGAGGATTTGGAAGCCTCGGGCTAGGATTAAGGTTTCGGGTGT 324
Query 553 GAGTTCGTTTCGTAGTTGG-GTTGGCTAGGCAGAATAGTATGGAAGATGTTAGGCCATGGG 611
C. pect 323 GAGTTCGTTTCGTAGTTGGTGTGGCTAGGCAGAATAGTATGGAAGATGTTAGGCCATGGG 264
```

Query	612	CAATTATTAGGATTGTGGCTCCAGTGATGCTTCATGGTGTGGATTAGGCATGCAGTGA	671
<i>C. pect</i>	263	CAATTATTAGGATTGTGGCTCCAGTGATGCTTCATGGTGTGGATTAGGCATGCAGTGA	204
Query	672	TGACTAGTCCTATGTGGCTTTACTGATGAGTAGGCGATTAGTGATTTTATAGATCTGTTTT	731
<i>C. pect</i>	203	TGACTAGTCCTATGTGGCTT-CTGATGAGTAGGCGATTAGTGATTTT-AGATCTG-TTT	147
Query	732	GTCGTATGCAGATGGGAGCTGGTTATTTACGACTGCCTCATAGGGCTAGGATTTATGAAG	791
<i>C. pect</i>	146	GTCGTATGCAGATGG-AGCTGGTTATT-ACGA-TGCCTCATAGGGCTAGGATT-ATGAAG	91
Query	792	GGGTAGTATTAAGTTTTGTTGTGTTTAGTGGCGAAGAGTAT-AGG-TGACTTCGAATGAT	849
<i>C. pect</i>	90	GGGTAGTAT-A-GTTT-GT-GTGTT-AGTGGCGA-GAGTATTAGGGTGAC-TCGGATGAT	38
Query	850	GCCGTAGCCCTCCTTAGTTTTAGTAGGATAGCCGGCCAG	888
<i>C. pect</i>	37	GCCGTAGCCC-CC-TAGTTTTAGTAGGATAGC-GGCAAG	2

9-ND4 Forward (931) UMA Barranca Honda, Yautepec, Estado de Morelos, México.

GCTGGGGGTTGCTGGGGGGGGGCACACAAAAAGCACAAAAAAGGCCAAATTCGGACATGTGTA
TTACTTAGGGGGGGGTTTGTGCTGAAAGGTTGAGTTTCCCTTGGTAGTGTAGGCGTTAGGGGGGTTTCAA
CACCCGTCTCCAGCTTTTAGGGATAAAATATTAATTAATCCCTTAGCGCCTCTCCACCGGGGAGCGACTTAG
GACTTGTCTCTCTCCCTGCCTAACCCAAACACCCTGAGATTCTGGGTCCCCACATACATTGTATTTGCCG
TTGTTATAACTTCTTCAAACGGGTTCTGCCCCGGCCAACAGCAACTAGGAAGTATCTCCACCCGATCCTTG
GTCCTTGGCCGGGGCGACCAAACCCTCCTACCCCTGATTACTTCGTGGTGCCTCCTTGCCAACCTTGACCA
ACGTGGCTCCCCCCCCCACCATTAACTTAATAGGAGGGGTTTTTTTTTCTCCCCCTCTTCAACTTTTCCC
AACCAACTTTTTATTCTAGCCGACTGGGGGCCCTCGACAAAGCCTTTTTCTCATTACCCCATTTCCATAA
GCGCGACGAAACATTCTCCCTCTCGATTCCCGTTCCAGCCCCAACCCACACTCGGAGAACTTTTATTTT
AGCCCCCCCCCATACGCCCCCGTCGGGGTTACTAAATAAAAAAACCAACTCTCATTTTAGGGCCCCCTTGG
CTTGTTAACTAAGTTTTAAAAAAAACCTTTGGGGAGAGCCCCCTAAAAAACCGGGGGTTCCACCTCCCCCT
TGTGCCAACCGGGGGGGGGTTTTTCGGAAACATATATAATCCTTTTTTATTTCTTTTTTTCTGAAGGATA
AAAACTTCCCCGCGAGCCCCCTCCATTTTATTTAAGGAGGAGAAAAAGAAGGGCCACCTCCCTTTTTGT
GTGTTTTTAGC

Query: None Query ID: lcl|Query_3819 Length: 899

>Ctenosaura pectinata haplotype H78 NADH dehydrogenase subunit 4 (ND4) gene, partial cds; mitochondrial

Sequence ID: EU246769.1 Length: 561

Range 1: 2 to 561

Score:911 bits(493), Expect:0.0,

Identities:554/579(96%) Gaps:22/579(3%), Strand: Plus/Minus

Query	313	TTTCGTTGTGTTATTAGGAATATGTGTAATGAGTAGATGGCTGTGATGAGGGTGCCTAGT	372
<i>C. pect</i>	561	TTTCGTTGTGTTATTAGGAATATGTGTAATGAGTAGATGGCTGTGATGAGGGTGCCTAGT	502
Query	373	CCGGTTAGGATAATTGTTGGTTGGGATCAGTTGAAGAGTGCGGAGATAATTGTAAGCTCT	432
<i>C. pect</i>	501	CCGGTTAGGATAATTGTTGGTTGGGATCAGTTGAAGAGTGCGGAGATAATTGTAAGCTCT	442
Query	433	CCTATTAAGTTAATGGTCGGGGGGAGTGCTATGTTTGGTTAGGTTGGCAAGGAGTCATCA	492
<i>C. pect</i>	441	CCTATTAAGTTAATGGTCGGGGGGAGTGCTATGTTTGGTTAGGTTGGCAAGGAGTCATCA	383
Query	493	TGATGTTTATTAGGGGTAGGAGGATTTGGAAGCCTCGGGCTAGGATTAAGGTTTCGGGTGT	552
<i>C. pect</i>	382	TGATGTT-ATTAGGGGTAGGAGGATTTGGAAGCCTCGGGCTAGGATTAAGGTTTCGGGTGT	324
Query	553	GAGTTCGTTTCGTAGTTGG-GTTGGCTAGGCAGAATAGTATGGAAGATGTTAGGCCATGGG	611
<i>C. pect</i>	323	GAGTTCGTTTCGTAGTTGGTGGTGGCTAGGCAGAATAGTATGGAAGATGTTAGGCCATGGG	264
Query	612	CAATTATTAGGATTGTGGCTCCAGTGATGCTTCATGGTGTGGATTAGGCATGCAGTGA	671
<i>C. pect</i>	263	CAATTATTAGGATTGTGGCTCCAGTGATGCTTCATGGTGTGGATTAGGCATGCAGTGA	204
Query	672	TGACTAGTCCTATGTGGCTTTACTGATGAGTAGGCGATTAGTGATTTTATAGATCTGTTTT	731
<i>C. pect</i>	203	TGACTAGTCCTATGTGGCTT-CTGATGAGTAGGCGATTAGTGATTTT-AGATCTG-TTT	147
Query	732	GTCGTATGCAGATGGGAGCTGGTTATTTACGACTGCCTCATAGGGCTAGGATTTATGAAG	791
<i>C. pect</i>	146	GTCGTATGCAGATGG-AGCTGGTTATT-ACGA-TGCCTCATAGGGCTAGGATT-ATGAAG	91
Query	792	GGGTAGTATTAAGTTTTGTTGTGTTTAGTGGCGAAGAGTAT-AGG-TGACTTCGAATGAT	849
<i>C. pect</i>	90	GGGTAGTAT-A-GTTT-GT-GTGTT-AGTGGCGA-GAGTATTAGGGTGAC-TCGGATGAT	38

Query 850 GCCGTAGCCCTCCTTAGTTTTAGTAGGATAGCCGGCCAG 888
C. pect 37 GCCGTAGCCC-CC-TAGTTTATAGTAGGATAGC-GGCAAG 2

10-ND4 Revers (902) UMA Barranca Honda, Yautepec, Estado de Morelos, México.

AGGGGGACGATCTAGTGTTAGTAGTAAGGGGAACCTTTGGGTAGCCGGGGTAATCTGAGGAATTTAACT
 TCAGGAATAAGAGTTAGCAGTTCTTAGTGTTGAAACACCTCTCGGTTTGCAAGGGGAGTTGAACTCCTGT
 TTTTAGGGCCACATCCTAATGTTTTGTTAAACTATGCTAACAGGCCGAAGGTGCTTGAGATGAGAGTTGGT
 TTTATGATTAGTAGCGGAGTGGGAGTATGTGGAGGGCTATGATTAGATGTTCTCGAGTGTGTGTTGGGT
 CTGTAATGGTAATGTGGAGTGGGAGTTTGTTCGTTGTGTTATTAGGAATATGTGTAATGAGTAGATGGCT
 GTGATGAGGGTGCCTAGTCCGGTTAGGATAATTGTTGGTTGGGATCAGTTGAAGAGTGCGGAGATAATTG
 TAAGCTCTCCTATTAAGTTAATGGTCGGGGGGAGTGCTATGTTGGTTAGGTTGGCAAGGAGTCATCATGAT
 GTTATTAGGGGTAGGAGGATTTGGAAGCCTCGGGCTAGGATTAAGGTTGCGGTGTGAGTTTCGTTTCGTAGT
 TGGTGTGCTAGGCAGAAATAGTATGGAAGATTGTTAGGCCATGGGAAATTTATTTAGGATTGTGGCTTCC
 AGTGATGCTTTCATGGTGTGTTGGGATTAGGCATGCAGTGATGACTAGTCCCTATGTGGCTTACTGATGAGT
 AGGCGATTAGGTGATTTTAGATCTGTTTTGTCGTATGCAGATGGAGCTGGTTATTACGATGCCTCAATAGG
 GCTAGGGATTTATGAAAGGGGGTAGTATAGTTTTGTGTGTTAGTGGGCGAGGAGTATTAGGGTGACTCGG
 GATGAATGCCGTAAGCCCCTATAGTTTTTGAGTTAGGGATGAGCGGCATAGGTAC

Query: None Query ID: lcl|Query_61779 Length: 902

>*Ctenosaura pectinata* haplotype H78 NADH dehydrogenase subunit 4 (ND4) gene, partial cds; mitochondrial

Sequence ID: EU246769.1 Length: 561

Range 1: 4 to 561

Score:900 bits(487), Expect:0.0,

Identities:556/584(95%) Gaps:26/584(4%), Strand: Plus/Minus

Query	312	TTTCGTTGTGTTATTAGGAATATGTGTAATGAGTAGATGGCTGTGATGAGGGTGCCTAGT	371
<i>C. pect</i>	561	TTTCGTTGTGTTATTAGGAATATGTGTAATGAGTAGATGGCTGTGATGAGGGTGCCTAGT	502
Query	372	CCGTTAGGATAAATTGTTGGTTGGGATCAGTTGAAGAGTGCGGAGATAATTGTAAGCTCT	431
<i>C. pect</i>	501	CCGTTAGGATAAATTGTTGGTTGGGATCAGTTGAAGAGTGCGGAGATAATTGTAAGCTCT	442
Query	432	CCTATTAAGTTAATGGTCGGGGGGAGTGCTATGTTGGTTAGGTTGGCAAGGAGTCATCAT	491
<i>C. pect</i>	441	CCTATTAAGTTAATGGTCGGGGGGAGTGCTATGTTGGTTAGGTTGGCAAGGAGTCATCAT	382
Query	492	GATGTTATTAGGGGTAGGAGGATTTGGAAGCCTCGGGCTAGGATTAAGGTTGCGGTGTGA	551
<i>C. pect</i>	381	GATGTTATTAGGGGTAGGAGGATTTGGAAGCCTCGGGCTAGGATTAAGGTTGCGGTGTGA	322
Query	552	GTTTCGTTTCGTAGTTGGTGTGCTAGGCAGAAATAGTATGGAAGATTGTTAGGCCATGGGA	611
<i>C. pect</i>	321	GTTTCGTTTCGTAGTTGGTGTGCTAGGCAGAAATAGTATGGAAGAT-GTTAGGCCATGGGC	263
Query	612	AATTTATTTAGGATTGTGGCTTCCAGTGATGCTTTCATGGTGTGTTGGGATTAGGCATGCA	671
<i>C. pect</i>	262	AATT-ATT-AGGATTGTGGC-TCCAGTGATGCTT-CATGGTGTGTT-GGATTAGGCATGCA	208
Query	672	GTGATGACTAGTCCCTATGTGGCTTACTGATGAGTAGGCGATTAGGTGATTTTAGATCTG	731
<i>C. pect</i>	207	GTGATGACTAGTCC-TATGTGGCTTACTGATGAGTAGGCGATTAG-TGATTTTAGATCTG	150
Query	732	TTTTGTCGTATGCAGATGGAGCTGGTTATTACGATGCCTCAATAGGGCTAGGGATTTATG	791
<i>C. pect</i>	149	TTT-GTCGTATGCAGATGGAGCTGGTTATTACGATGCCTCA-TAGGGCTAGG-ATT-ATG	94
Query	792	AAAGGGGGTAGTATAGTTTTGTGTGTTAGTGGGCGAGGAGTATTAGGGTGACTCGGGATG	851
<i>C. pect</i>	93	AA-GGGG-TAGTATAG-TTTGTGTGTTAGTGG-CGA-GAGTATTAGGGTGACTCGG-ATG	40
Query	852	AATGCCGTAAGCCCCTATAGTTTTTGAGTTAGGGATGAGCGGCA	895
<i>C. pect</i>	39	A-TGCCGTA-GCCCCC-TAGTTTT--AGT-AGG-AT-AGCGGCA	4

10. Conclusiones preliminares

10.1 Muestreo

El muestreo se completó exitosamente, de acuerdo a los métodos recomendados para no afectar a los organismos, ya que de cada organismo se obtuvo una muestra de aproximadamente 2cm del extremo terminal de la cola de cada individuo.

Cabe mencionar que originalmente se intentó coleccionar sangre de la vena coccígea ventral, pero la dificultad de ubicar exactamente dicha vena en reptiles tan pequeños fue poco eficiente.

10.2 Extracción de ADN

10.2.1 Curva de concentración de tejido

La curva de cantidad de tejido de cola de iguana, para la extracción de ADN con el Kit DNeasy Blood & Tissue de Qiagen, reveló que por este método y para este tipo de tejido la cantidad de 12.5 mg de tejido resultó ser la muestra de extracción de ADN de mejor calidad, al mostrar en la electroforesis, mayor intensidad de brillo, mejor integridad de la banda, mayor peso molecular y tener menor cantidad de bandas de barrido inespecíficas (Figura 24).

10.3 Diseño *primers*

La estrategia dispuesta para el diseño de primer, de ambos tipos de genes (mitocondrial ND4 y nuclear TYR), fue exitosa.

- 1) Identificar las especies de reptiles más emparentadas a *C. pectinatus*.
- 2) Obtención de las secuencias nucleotídicas, para ambos tipos de genes (ND4 y TYR), depositadas en GenBank para los reptiles más emparentados a *C. pectinatus*.
- 3) Obtener las secuencias consenso, para ambos tipos de secuencias nucleotídicas de las regiones propuestas para *primers*, de las para las especies emparentadas *C. Pectinatus*: Primer ND4 y Leu originales de Arévalo *et al.*, 1994.

10.3.1 Estructura del Gen TYR

Con base en la filogenia del orden *Squamata* construida a partir de los datos de la secuencia de 12 genes (Tabla 12) y de la filogenia de las 9 secuencias ortólogas del gen TYR, la especie *Anolis carolinensis* (figura 33) *Anolis carolinensis* es la especie

que se encuentra más próxima a *C. pectinata*.

11. Bibliografía

- Albinism Database. (2009). *Albinism Database University of Minesota*. Obtenido de Welcome to the Albinism Database: <https://www.ifpcs.org/albinism/>
- Alcántara, R. M. (2007). BREVE REVISIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES. En *Ecología molecular* (págs. 541-566). México.
- AlMomentoQueretaro. (5 de Abril de 2019). Lamentan pescadores de Coatetelco Morelos, falta de apoyos al sector. Obtenido de <https://almomentoqueretaro.com/2019/04/05/lamentan-pescadores-de-coatetelco-morelos-falta-de-apoyos-al-sector/>
- Alva, V., Nam, S.-Z., Soding, J., & Lupas, A. N. (2016). The MPI bioinformatics Toolkit as an integrative platform for advanced protein sequence and structure analysis. *Nucleic Acids Research*, W410–W415.
- Arcos-García, J. L., Reynoso, R. V., Mendoza, M. G., Clemente, S. F., Tarango, A. A., & Crosby, G. M. (2005). Revista Científica, FCV-LUZ. XV(4), 338-344.
- Atencia, M. C. (2018). Variabilidad genética de *Aedes aegypti* en el departamento de Sucre, Colombia, mediante el análisis de la secuencia de nucleótidos del gen mitocondrial ND4. 38, 267-276.
- Barbadilla, A. (2018). *Conceptos básicos: Variación genética*. Obtenido de Plataforma Web 2.0: http://genetica.uab.cat/base/base3.asp?sitio=genetica_gen&anar=inicio&item=Biosystems
- Biosystems, A. (2002). *User Reference Guide ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer*. HITACHI. AB. Obtenido de https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_041300.pdf
- Cabrero, J., & Camacho, J. P. (2002). FUNDAMENTOS DE GENÉTICA DE POBLACIONES. En M. Soler, *Evolución La base de la Biología* (págs. 83-127). Proyecto Sur.
- Castro-Franco, R., & Bustos, M. G. (2003). *Lagartijas de Morelos, México: Distribución, Hábitat y Conservación*. México: acta Zool.
- CONABIO. (s.f.). *ENCICLOVIDA*. Obtenido de Iguanas, garrobo y parientes (familia Iguanidae): <http://enciclovida.mx/especies/22938-iguanidae>
- CONABIO. (s.f.). *Iguana Mexicana de Cola Espinosa Ctenosaura pectinata*. Recuperado el 13 de Mayo de 2018, de <http://www.naturalista.mx/taxa/35306-Ctenosaura-pectinata>
- CONAMP. (2005). *Programa de conservación y manejo de la Reserva de la Biosfera de la Sierra de Huautla* (Vol. 1era Edición.). México, D.F.: Comisión Nacional de las Áreas Protegidas.
- CONANP. (2005). *Programa de Conservación y Manejo Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla* (1 ed.). México: México.
- Cortazar, M. A., & Silva, R. E. (2004). *Métodos físico-químicos en Biotecnología: PCR*. Ciudad de México.: UNAM.

- Ensembl. (septiembre de 2019). *Ensembl Home*. Obtenido de http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000077498;r=11:89177875-89295759;t=ENST00000263321
- Estado de Morelos. (s.f.). *Miacatlán*. Recuperado el 14 de Mayo de 2018, de <http://siglo.inafed.gob.mx/enciclopedia/EMM17morelos/municipios/17015a.html>
- FAO. (2010). *La situación de los recursos zoológicos mundiales para la alimentación y la agricultura*. Roma.
- FAO. (2010). Sección C: Marcadores moleculares. En *LA SITUACIÓN DE LOS RECURSOS ZOOGÉNÉTICOS MUNDIALES PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA* (pág. 596). Roma. Obtenido de <http://www.fao.org/3/a1250s/a1250s.pdf>
- Fauna silvestre uni amazonia. (2013 de Octubre de 2013). Obtenido de <http://faunasilvestreuniamazonia.blogspot.com/>
- Fraga, N. J., Rodríguez, J., Fuentes, O., Castex, M., & Fernández-Calienes, A. (2004). Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar. *56*(3), 208-213.
- FROST, D. R., RICHARDE, E., & DANIEL., J. (2001). Total Evidence, Sequence Alignment, Evolution of Polychrotid Lizards, and a Reclassification of the Iguania (Squamata: Iguania). *American Museum of Natural History*(3343), 1-38.
- Gallou, A., Suste, D. A., & Andrade, M. G. (2015). *Manual: Prácticas del laboratorio de biología molecular*. SENASICA.
- Gambusino prospector. (2015). *Passion for Discovery*. Obtenido de Mining Regions: <https://gambusinoprospector.com/mineral-resources-in-mexico/mining-regions/>
- Gaston, K. J., & Spicer, J. I. (2004). Measuring biodiversity. En K. J. Gaston, & S. J. I., *Biodiversity: An Introduction* (págs. 9-16). Oxford: Blackwell Publishing company.
- Gómez, G., & Luis, J. (2011). La Biodiversidad. *Gestión y Ambiente*, 59-72.
- Gumilla, J. (1745). *El Orinoco ilustrado y defendido: historia natural, civil y geographica de este gran rio y de sus caudalosas vertientes*. Tomo 2 (Segunda impresión ed.). (M. fernandez, Ed.) Madrid: Supremo Consejo de la Inquisición.
- Hudjashov, G., Villems, R., & Kivisild, T. (2013). Global Patterns of Diversity and Selection in Human Tyrosinase Gene. *PLOS ONE*, *8*(9), 1-14.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2019). *Espacio y datos de México*. Obtenido de INEGI: <https://www.inegi.org.mx/app/mapa/espacioydatos/default.aspx?ag=170250009>
- Iturriaga, J. d. (2000). *Las cocinas de México I*. México: FCE. Obtenido de <http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/fondo2000/vol2/20/htm/libro39.htm>
- Iwanishi, S., Shohei, Z., Hiroki, S., & Nitasaka, E. (2018). An albino mutant of the Japanese rat snake (*Elaphe climacophora*) carries a nonsense mutation in the tyrosinase gene. *Genes Genet. Syst.*, *93*, 163-167.
- JHU. (1995). *OMIM*. (J. H. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Editor) Obtenido de Online Mendelian Inheritance in Man: <https://omim.org/about>
- Jiménez, P., & Collada, P. (2000). TÉCNICAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y SU USO EN LOS PROGRAMAS DE CONSERVACIÓN. *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales*, 237-248.
- L., M. C., Reynoso, V. H., & Buckley, L. (2017). Never judge an iguana by its spines: Systematics of the Yucatan spiny tailed iguana, *Ctenosaura defensor* (Cope, 1866). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 27-39.

- MacLeod, A., Irisarri, I., Vences, M., & Steinfartz, S. (2015). MITOGENOME ANNOUNCEMENT: The complete mitochondrial genomes of the Gala'pagos iguanas. *Mitochondrial DNA. The Journal of DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 1-2.
- Malone, C. L., Reynoso, V. H., & Buckley, L. (2017). Never judge an iguana by its spines: Systematics of the Yucatan spiny tailed iguana, *Ctenosaura defensor* (Cope, 1866). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 115, 27-39.
- Medina, M. R., Mantilla, M. G., Alvarez, B. R., Hansen, H. A., Peñaloza, R. X., Huerto, D. R., . . . Moreno, A. V. (2018). *ESTUDIO DE FLUJOS DE GASES DE EFECTO INVERNADERO (GEI) EN CUERPOS DE AGUA DEL ESTADO DE MORELOS*. IMTA-SEMARNAT.
- Meneses, E. C., Rozo, M. L., & Franco, S. J. (2011). Tecnologías bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN . *Scientia et Technica*, XVI(49), 116-121.
- Moreno, C. E. (2001). *Métodos para medir la biodiversidad*. Zaragoza.
- Moreno-Letelier, A. (2007). *Ecología Molecular*. México: Mexico.
- Morrone, J. J., Escalante, T., & Rodríguez-Tapia, G. (2017). Mexican biogeographic provinces: Map and shapefiles. *ZOOTAXA*, 277-279.
- Myers Norman, A., M. R., G., M. C., B., d. F., & Jennifer., K. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(24), 853-858.
- National Human Genome Research Institute NIH. (24 de Marzo de 2019). Obtenido de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Bioinformatica>
- NCBI. (October de 2008). *U:S. National Library of Medicine-National Center for Biotechnology Information*. Obtenido de TYR orthologs: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7299/ortholog/similargenes/?scope=33154>
- NCBI. (s.f.). *NCNI resources*. Obtenido de GenBank: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- NCBI. (s.f.). *Welcome to NCBI*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- NCBI-lizards. (2008). *TYR orthologs from lizards*. Obtenido de Lizards TYR: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7299/ortholog/?scope=8504>
- NCBI-O. (October de 2008). *TYR - tyrosinase*. Obtenido de NCBI Orthologs: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7299/ortholog/?scope=7776>
- Neville, A., & Jenkins, M. (2007, Mayo 31). *Biodiversity Heritage Library* . Retrieved from Biodiversity and Poverty Reduction: <https://www.biodiversitylibrary.org/title/57971#page/3/mode/1up>
- NIH. (s.f.). *Primer-BLAST*. Obtenido de A tool for finding specific primers: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>
- NIH.BLAST. (septiembre de 2019). *NCBI*. Obtenido de BLAST.
- NIH-OrtTYR. (Oct. de 2008). *TYR - tyrosinase*. Obtenido de Genes similar to TYR: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7299/ortholog/?scope=8504>
- Ortiz, J. (Enero de 2019). El melanismo como rasgo adaptativo en los reptiles. *Qercus*(395).
- Piñero, D., Barahona, A., Eguiarte, L., Rocha, O. A., & Salas, L. R. (2008). C14. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. In CONABIO, *Capital Natural de México, vol 1: Tercera parte. El conocimiento de la variabilidad genética* (pp. 415-435). CONABIO. Retrieved from <http://bioteca.biodiversidad.gob.mx/janium/Documentos/13320.pdf>

- PROFEPA. (30 de Diciembre de 2010). *NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de*. Recuperado el 13 de Mayo de 2018, de http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.pdf
- Pyron, R. A., Burbrink, F., & Wiens, J. J. (2013). A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species and snakes. *BMC Evolutionary Biology*, 13(93), 1-53. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2148-13-93>
- QIAGEN. (2006). DNeasy Blood & Tissue Handbook. En Qiagen. Obtenido de <file:///C:/Users/C-T/Downloads/EN-DNeasy-Blood--Tissue-Handbook.pdf>
- Qiagen. (2010). *TopTaq PCR Handbook*. Obtenido de <https://www.qiagen.com/mx/resources/resourcedetail?id=7a9e9a75-5f2c-454a-8a75-cff0d3a59fbe&lang=en>
- Ramos, D. A. (2016). *Riqueza de vertebrados terrestres e náreas de conservación privada del centro de Veracruz, México*. Universidad Veracruzana.
- Rasys, A. M., Park, S., Ball, R. E., Alcala, A. J., Lauderdale, J. D., & Menke., D. B. (2019). CRISPR-Cas9 Gene Editing in Lizards through Microinjection of Unfertilized Oocytes. *Cell Reports*, 28(9), 2288–2292. doi:<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.089>
- Ríos-Muñoz, C. A. (2013). ¿Es posible reconocer una unidad biótica entre América del Norte y del Sur? *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84, 1022-1030. doi:10.7550/mb.34170
- Saenko, S. V., Lamichhaney, S., Martinez, B. A., Rafati, N., ndersson, L., & Milinkovitch, M. C. (2015). Amelanism in the corn snake is associated with the insertion of an LTR-retrotransposon in the OCA2 gene. *Nature. Sci. Rep.* 5, 17118. doi:10.1038/srep17118
- Sánchez, E., Nina, M., Aguirre, P., Arce, M., Toro, N., & Vilela, R. (2014). Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico. *Revista Con-ciencia*, 2(13), 125-138.
- Secretaría de Desarrollo Sustentable. (Octubre de 2013). *Programa de ordenamiento ecológico regional del estado de Morelos*. Recuperado el 13 de Mayo de 2018, de http://obum.zmcuernavaca.morelos.gob.mx/MORELOS/OET/POEREM_CARACTERIZACION.pdf
- SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES. (2007). *Programa de Manejo del área natural protegida con el carácter de Reserva de la Biosfera*. Ciudad de México: DIARIO OFICIAL.
- Suntrarachun, S., Chanhom, L., & Thaveekarn, W. (2015). Sequencing Variation in Pigmentation Genes of Albino Cobra. *Int. J. Pure App. Biosci*, 3(3), 08-215.
- U.S National Library of Medicine . (16 de Julio de 2019a). *TYR gene*. Recuperado el 28 de Julio de 2019, de Genetics Home Reference: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/TYR#normalfunction>
- U.S National Library of Medicine . (16 de Julio de 2019b). *MT-ND4 gene*. Recuperado el 28 de Julio de 2019, de Genetic Home Reference: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MT-ND4#conditions>
- Uetz, P. F. (22 de Dec. de 2019). *The Reptile Database*. Obtenido de Conolophus subcristatus: <http://reptile->

- database.reptarium.cz/species?genus=Conolophus&species=subcristatus&search_param=%28%28search%3D%27Conolophus+subcristatus%27%29%29
- Uetz, P. F. (22 de Dec. de 2019). *The Reptile Database-2*. Obtenido de Amblyrhynchus cristatus: http://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Amblyrhynchus&species=cristatus&search_param=%28%28search%3D%27Amblyrhynchus+cristatus%27%29%29
- Uetz, P., Freed, P., & Hošek, J. (22 de Dec. de 2019). *The Reptile Database-3*. Obtenido de Iguana iguana: http://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Iguana&species=iguana&search_param=%28%28search%3D%27Iguana%2C+iguana%27%29%29
- Ullate-Agote, A., Milinkovitch, M. C., & Tzika, A. C. (2014). The genome sequence of the corn snake (*Pantherophis guttatus*), a valuable resource for EvoDevo studies in squamates. *Int. J. Dev. Biol.*, 58, 881-888. doi: 10.1387/ijdb.150060at
- Universidad Autónoma de Querétaro. (2016). *Material de consulta para la investigación con animales*. Recuperado el 16 de Junio de 2018, de http://fcu.uaq.mx/docs/bioetica/cb12_Mat_consulta_inv_con_animales_marzo16.pdf
- Universidad Nacional del Nordeste. (2007). *Hipertextos del Área de la Biología*. Recuperado el 19 de Mayo de 2018, de <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/identificacion/2.htm>
- Vite-Silva, Victor D.; Ramírez-Bautista, Aurelio; Hernández-Salinas, Uriel. (2010). Diversidad de anfibios y reptiles de la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán, Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 81, 473-486.
- Wang, X., Zhu, Y., Shen, N., Peng, J., Wang, C., Liu, H., & Lu, Y. (2017). Mutational analysis of a Chinese family with oculocutaneous albinism type 2. *Oncotarget*, 8(41), 70345-70355.
- Whittaker, R. (1972). Evolution and Measurement of Species Diversity. *International Association for Plant Taxonomy (IAPT)*, 213-251.
- Zarza, E., Reynoso, H. V., & Emerson, B. C. (2011). Discordant patterns of geographic variation between mitochondrial and microsatellite markers in the Mexican black iguana (*Ctenosaura pectinata*) in a contact zone. *J. Biogeogr.*, 38, 1394-1405.
- Zarza, E., Reynoso, H. V., & Emerson, B. C. (2016). Genetics tools assisting sustainable management and conservation of the spiny-tailed iguana, *Ctenosaura pectinata*. *Herpetological Conservation and Biology*, 11(Monograph 6), 255-264.
- Zarza, e., Reynoso, V. H., & Emerson, B. C. (2008). Diversification in the northern neotropics: mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of the iguana *Ctenosaura pectinata* and related species. *Molecular Ecology*, 17, 3259-3275. doi:10.1111/j.1365-294X.2008.03826.x
- Zarza, E., Reynoso, V. H., & Emerson, B. C. (2008). Diversification in the northern neotropics: mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of the iguana *Ctenosaura pectinata* and related species. *Molecular Ecology*, 3259-3275.
- Zona Turística. (s.f.). *Que hacer*. Obtenido de Lago de Tequesquitengo.