



UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Estructura genética del citotipo FM2 de *Sceloporus grammicus* en dos poblaciones del Estado de Hidalgo

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

JACQUELINE DOMÍNGUEZ OLMEDO

DIRECTOR (A) DE TESIS

DRA. MARÍA DEL CARMEN SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO

2009

DEDICATORIA

A LOS MEJORES PADRES, JAZMIN OLMEDO ISLAS Y PABLO DOMÍNGUEZ GOMEZ POR SU APOYO, PACIENCIA Y AMOR; A PAOLA, JESSICA Y JIMENA, MIS HERMANAS INCONDICIONALES. LOS AMO Y SON LO MAS IMPORTANTE EN MI VIDA.

A TODA MI FAMILIA POR ACOMPAÑARME EN CADA ETAPA DE MI EXISTENCIA.

A MIS AMIGOS POR CADA MOMENTO QUE COMPARTIMOS.

AGRADECIMIENTOS

Antes que a nadie agradezco a mis padres por darme la oportunidad de nacer, por darme la libertad de vivir a mi manera y por confiar en mí siempre. Gracias papá y mamá, por sus palabras y enseñanzas, por ser los mejores maestros y los mejores padres que dios pudo haber elegido para mí. A mis queridas hermanas, por todo el apoyo y cariño que me han demostrado siempre. Los amo.

Me gustaría también destacar a mis abuelitos Leonila y Agustín, por que han sido ellos unos de los principales seres guía en mi vida; a mi tía Fabiola por el inmensurable cariño que me ha proporcionado.

A mis primas Nohemi, Zulma, Crystal, Berenice, Lizeth, Lizbeth y Jizelth por todos los momentos compartidos, la complicidad que disfrutamos y el cariño demostrado. Asimismo, mi profundo agradecimiento a mis abuelos Ciro y Gloria, a todos mis demás primos, primas, tías, tíos, sobrinas, sobrinos y anexos, los quiero mucho.

A la Dra. María del Carmen Sánchez Hernández por su apoyo invaluable como directora de esta tesis. En cada momento has sido una guía para la elaboración de este trabajo, con sus valiosos consejos y comentarios, pero sobre todo por su paciencia y amistad.

A mi comité tutorial integrado por el M. en C. Jesús Castillo Cerón, Dr. Alberto Enrique Rojas Martínez, Dr. Ignacio Esteban Castellanos Sturemark, Dra. Irene Goyenechea Mayer-Goyenechea, M. en C. Adrián Leyte Manrique y Biol. Ulises Iturbe Acosta, por tomarse el tiempo de revisar este trabajo y, emitir sus atinadas y valiosas observaciones para la conclusión de esta tesis.

Agradezco a todos los profesores que formaron parte de mi carrera universitaria, porque cada uno de ellos tuvo que ver para que semestre tras semestre me convenciera de lo que realmente quería hacer, llegando así al punto donde me encuentro.

A mis compañeros y amigos Toño, Diana, Carmen y Ernesto, por todo su fundamental apoyo durante el proceso de realización de este proyecto de investigación, pero sobre todo por su afecto.

Quisiera agradecer a todos mis colegas de generación 2002-2006, porque gracias a ellos mi paso por la universidad estuvo genial, fue muy grato conocerlos y convivir con ustedes.

A mi mejor amigo incondicional Antonio Abad, quiero agradecerle por ser siempre un gran apoyo para mí, por todo su cariño y simplemente por ser como eres.

A mis amigos Alejandro, Alex y Pompilio por todos los momentos compartidos y por estar conmigo cuando, en su momento, los he necesitado. Gracias por su amistad, los quiero.

A mi amiga Janeth por su grandiosa amistad, apoyo y complicidad.

Finalmente, a Alberto por ser el amigo y compañero que ha estado conmigo durante la última etapa de este proceso, gracias por tu apoyo y cariño.

Al proyecto CONACyT “Descripción de la estructura genética y evolutiva de los diferentes citotipos y zonas híbridas asociadas al complejo de *Sceloporus grammicus* (Phrynosomatidae) en el estado de Hidalgo”, número 52736, de la Convocatoria para el Apoyo Complementario a Proyectos de Investigación Científica para Investigadores en proceso de Consolidación 2006, por los recursos financieros otorgados para esta tesis.

RESUMEN

Actualmente, la especie de lagartija *Sceloporus grammicus* se considera un complejo conformado por siete razas cromosómicas, las cuales tienen una amplia distribución geográfica y ecológica en norteamérica. En el Estado de Hidalgo se encuentran seis de los siete citotipos y, aunque se han reportado diversos análisis citológicos, geográficos y ecológicos para *Sceloporus grammicus*, no se cuenta con información referente al efecto del ambiente sobre la estructura y diversidad genética en poblaciones de un mismo citotipo, por lo que en este trabajo se analizan las relaciones microevolutivas del citotipo FM2 para dos poblaciones que habitan en ambientes diferentes en Hidalgo: bosque de pino-encino (La Estanzuela) y matorral xerófilo (Tilcuaautla). Se caracterizó al citotipo mediante un cariotipo no invasivo (cultivo de sangre), utilizando una muestra de 43 individuos adultos en ambas localidades, de los cuales sólo se obtuvo la cola para cultivar la sangre y extraer el DNA. Se utilizaron, además, cinco microsatélites nucleares reportados previamente, tanto para *S. grammicus* como para una especie relacionada (*S. jarrovi*), que se amplificaron *in vitro* mediante la reacción de polimerización en cadena (PCR) del DNA; se separaron mediante electroforesis vertical de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes de urea y se visualizaron con nitrato de plata. Los datos genéticos se procesaron con programas informáticos de genética poblacional (Arlequin, TFGA, Fstat, STRUCTURE). Se estandarizó una técnica para determinar el cariotipo que no precisa el sacrificio de los organismos (no invasiva), se encontraron además alelos de microsatélites específicos para, al menos, una de las poblaciones analizadas; así como patrones específicos de frecuencias alélicas en cada sitio, probablemente como resultado de un efecto diferencial del ambiente a nivel genético en dichos organismos.

CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	ANTECEDENTES	3
2.1.	El complejo <i>Sceloporus grammicus</i> y el concepto de especie	3
2.2.	Descripción del complejo de <i>Sceloporus grammicus</i>	6
2.3.	Citología	7
2.4.	Análisis genético de las poblaciones	9
2.5.	Marcadores moleculares (Microsatélites)	11
3.	JUSTIFICACIÓN	12
4.	OBJETIVOS	13
4.1.	Objetivo general	13
4.2.	Objetivos particulares	13
5.	HIPOTESIS	13
6.	MATERIAL Y MÉTODO	14
6.1.	Área de estudio	14
6.2.	Trabajo de campo.....	16
6.3.	Obtención de material biológico	17
6.4.	Técnica no invasiva para el cariotipo.....	17
6.5.	Extracción de DNA	19
6.6.	Selección de microsatélites y obtención de productos de PCR.....	19
6.7.	Análisis de diversidad genética y estructura poblacional.....	20
7.	RESULTADOS	21
7.1.	Cariotipo	21
7.2.	Diversidad genética	23
7.3.	Estructura genética.....	26
7.4.	Dinámica del Flujo genético	27
8.	DISCUSIÓN	32
8.1.	Técnica citológica estandarizada	32
8.2.	Diversidad genética	35
8.3.	Estructura genética.....	38
8.4.	Dinámica del flujo genético.....	39
9.	CONCLUSIONES.....	41

LITERATURA CITADA	42
APÉNDICE A.....	53
APÉNDICE B.....	54
APÉNDICE C.....	55
APÉNDICE D.....	56

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Frecuencias alélicas por cada <i>locus</i> y entre poblaciones, donde: P1=Tilcuautla y P2= La Estanzuela. En color verde los alelos exclusivos para la población de Tilcuautla, en los <i>loci</i> Scel-138, Scel-437 y Scel-571.....	24
Cuadro 2. Resultados de diversidad genética en ambas poblaciones, promedios obtenidos por <i>locus</i> y por población. Los valores en negrita indican los datos representativos.	25
Cuadro 3. Valores de diversidad genética de cada población. Donde: N: Tamaño de muestra, Na: Número de alelos observados, Ne: Número efectivo de alelos, Ra: Riqueza alélica, Ho: Heterocigotos observados, <i>F</i> : índice de fijación, He: Heterocigotos esperados promedio.....	25
Cuadro 4 Índices de heterocigosidad de Nei, para cada <i>locus</i> se muestra: Ho (Heterocigotos observados), He (Heterocigotos esperados) y porcentaje de polimorfismo (% P).	26
Cuadro 5. Valores promedio de los estadísticos F en ambas poblaciones, el intervalo en el que se interpretan los valores estadísticos va de 0 a 1 en F_{ST} y F_{IS} , mientras que para F_{IT} el rango es de -1 a 1. El valor clave para la estructura genética es el de F_{ST} , pues proporciona la diferenciación genética, ya sea pequeña (0 a 0.05), moderada (0.05 a 0.15), grande (0.15 a 0.25) y muy grande (mayor a 0.25; Wright, 1951). Los valores en negrita indican el promedio para cada valor.....	27
Cuadro 6. Matriz de Flujo genético entre pares de muestras para las poblaciones de San Juan Tilcuautla y La Estanzuela (N_m). Se muestra en azul la población que presenta menor flujo genético.	29

Lista de Figuras

Figura 1. Mapa de ubicación de los sitios de muestreo, las localidades de San Juan Tilcuautla (San Agustín Tlaxiaca) y La Estanzuela (Mineral del Chico) situados al sureste del estado de Hidalgo, México.	15
Figura 2. Tipo de vegetación en la que se encuentran los individuos del citotipo FM2 analizados en este estudio; La Estanzuela con Bosque de pino-encino (izquierda) y Tilcuautla con Matorral xerófilo (derecha).	15
Figura 3. Morfología ventral (izq.) y Dorsal (der.) de individuo de <i>Sceloporus grammicus</i> (Citotipo FM2) en la localidad de La Estanzuela.	16
Figura 4. Descripción de la forma de colecta manual y con la ayuda de ligas mencionada por Casas-Andreu <i>et al.</i> (1991), la cual permite manipular a los ejemplares sin dañarlos para ser posteriormente liberados.	16
Figura 5. Referencia del corte de un centímetro de la cola de los ejemplares del citotipo FM2, la cual mide aproximadamente 5.5 cm. de largo total, para obtener la fuente celular (sangre) para el cariotipo y el tejido para la extracción del DNA.	17
Figura 6. Visualización de alelos amplificados con el microsatélite Scel-238 para los individuos de La Estanzuela (Ez) y Tilcuautla (TI), mediante electroforesis de acrilamida al 7.5%; los alelos amplificados se encuentran dentro de un intervalo de peso molecular de 226-250 pb.	20
Figura 7. Visualización de los cromosomas del citotipo FM2 de una hembra perteneciente a la localidad de San Juan Tilcuautla, mediante la técnica no invasiva estandarizada. Donde se muestran las fisiones del par uno al par seis (1, 2, 3, 5 y 6) con un cromosoma completo perteneciente al par cuatro (4). Escala= 5 µm.	21
Figura 8. Visualización del frotis con los cromosomas del citotipo FM2 con sus fisiones en cinco de los seis macrocromosomas (1, 2, 3, 5 y 6) y un cromosoma entero del par cuatro (4), perteneciente a una hembra de la localidad de La Estanzuela.	22
Figura 9. Ideograma y representación completa de las siete razas cromosómicas del complejo <i>Sceloporus grammicus</i> , descritos por Hall (1973) y modificados por Reed <i>et al.</i> (1995). Resaltados en el óvalo rojo, el ideograma de los macrocromosomas fisiónados de la raza FM2 analizada en este trabajo.	22

Figura 10. Cariotipo de los primeros seis pares de macrocromosomas del citotipo FM2 de <i>Sceloporus grammicus</i> , los cuales fueron recortados y organizados por homología con su respectivo ideograma.	23
Figura 11. Representación del flujo de genes entre las poblaciones de Tilcuautla y La Estanzuela. Observado la proporción de alelos compartidos, siendo mayor el intercambio de genes de los individuos de Tilcuautla a la población de La Estanzuela. En verde, alelos compartidos no fijados, en rojo, alelos compartidos fijados.	28
Figura 12. Frecuencias alélicas registradas para cada individuo de las dos poblaciones analizadas. Los individuos 1-22 pertenecen a la población de Tilcuautla; los individuos 23-43 son de la población de La Estanzuela.	28
Figura 13. Dinámica del flujo genético entre los individuos de las poblaciones de Tilcuautla (rojo) y La Estanzuela (verde), utilizando el método de asignación de alelos compartidos. Se aprecia que los individuos de la población de Tilcuautla presentan una mayor homología genética en comparación con los individuos de La Estanzuela.....	29
Figura 14. Descripción de las frecuencias alélicas para el <i>locus</i> Scel-114, indicando que el alelo 226 es el que presenta mayor frecuencia en la población de Tilcuautla, mientras que para La Estanzuela es el alelo 206.	30
Figura 15. Frecuencias alélicas por población para el <i>locus</i> Scel-238, observando que el alelo 241 es el que presenta mayor frecuencia en la población de Tilcuautla, mientras que el alelo 239 es el más frecuente en la población de La Estanzuela. ...	30
Figura 16. Descripción de las frecuencias alélicas para el <i>locus</i> Scel-138, indicando que el alelo 259 es el que presenta mayor frecuencia en la población de Tilcuautla, mientras que para La Estanzuela es el alelo 249.	31
Figura 17. Frecuencias alélicas para el <i>locus</i> Scel-571, obteniendo que para la población de Tilcuautla el alelo 273 presenta mayor frecuencia. En lo que respecta a la Estanzuela el alelo con una frecuencia mayor es el 271.	31
Figura 18. Para el <i>locus</i> Scel-437, el alelo 185 de la población de Tilcuautla es el que presenta mayor frecuencia, mientras que el alelo 177 en La Estanzuela presenta mayor valor en cuanto a frecuencia alélica.....	32

1. INTRODUCCIÓN

Del 50 al 80% de la biodiversidad que existe en el mundo -según el Fondo Mundial para la Vida Silvestre- está confinado en 12 países, entre los que se encuentra México (Olson *et al.*, 2001). Según el índice de biodiversidad mundial, México ocupa lugares destacados en latinoamérica en grupos de organismos como los reptiles, con lo que ocupa el primer lugar con 820 especies reportadas (Peterson *et al.*, 1993).

Las lagartijas pertenecientes al género *Sceloporus* son de los taxa más abundantes de reptiles en norteamérica, con 80 especies distintas, tanto a nivel morfológico como ecológico (Sites *et al.*, 1992) debido a patrones de especiación simpátrica, mismos que provocan que las poblaciones que ocupan el mismo espacio territorial, sin que existan barreras geográficas, se diversifiquen a causa del surgimiento de algún mecanismo de aislamiento, entre los que se podrían mencionar: el ecológico, el etológico, el sexual o el genético (Rundle y Nosil, 2005).

Dentro de este género, se pueden encontrar especies que presentan amplia distribución geográfica y ecológica, como es el caso de la lagartija *Sceloporus grammicus* (Phrynosomatidae), que se ha clasificado como un complejo de razas cromosómicas, el cual presenta un elevado polimorfismo cromosómico, que va desde $2n=32$ hasta $2n=46$ (Bickham, 1983; Sites, 1983; Goyenechea, 1993).

El complejo de *Sceloporus grammicus* ocupa una amplia gama de hábitats que van desde las llanuras hasta los desiertos y ambientes de alta montaña (Arévalo *et al.*, 1991) y en el Estado de Hidalgo estas lagartijas se encuentran asociadas a tipos de vegetación diversos como el matorral xerófilo y el bosque de pino-encino (Leyte- Manrique, 2006).

Desafortunadamente, en décadas recientes, la fragmentación de hábitats y la urbanización que se ha dado a nivel global han reducido el número y talla de los matorrales, incrementándose también los parches aislados; lo que ha provocado, como consecuencia, que la flora y la fauna se vean seriamente amenazadas (Ernst *et al.*, 2004). En este sentido, las poblaciones de *Sceloporus grammicus* que están asociadas a este tipo de vegetación xerófita podrían resultar afectadas ecológicamente, lo que implicaría que sus poblaciones pudieran estar limitadas para obtener recursos alimentarios y reproductivos por el intercambio de genes, que los induciría también a un aislamiento evolutivo (Lee, 2002).

El número y forma de los cromosomas en los diferentes grupos de animales vertebrados (aves, anfibios, reptiles y mamíferos) es una característica importante en las poblaciones naturales (Prevosti, 1979). Sin embargo, hay especies que presentan polimorfismos cromosómicos como una estrategia de diversificación genética. Aunado a lo anterior, la evidencia citológica (alta politipia cromosómica) es también importante para medir la variación en las poblaciones, ya que proporciona información acerca del papel de los rearrreglos cromosómicos en los procesos de especiación (Bickham, 1983).

En este sentido, actualmente se describe a *Sceloporus grammicus* como un verdadero complejo de razas cromosómicas, de las cuales se tienen descritas e identificadas geográficamente siete: S, F5, F6, F5+6, FM1, FM2 y FM3 (Degnan y Arévalo, 2004), siendo el Estado de Hidalgo una zona dentro del intervalo de distribución del complejo que presenta el mayor número de citotipos reportados para dicho complejo, seis de los siete que existen (Leyte-Manrique *et al.*, 2005).

Es importante mencionar que el alto grado de politipias cromosómicas dentro y entre poblaciones del complejo *Sceloporus grammicus* es una característica rara en grupos no mamíferos (aves, anfibios y reptiles) por lo que es interesante conocer el comportamiento del grupo a nivel morfológico y cromosómico, determinando parámetros genéticos importantes a nivel poblacional, con el fin de elucidar patrones microevolutivos específicos dentro y entre las poblaciones actuales de *Sceloporus grammicus*; para ello son necesarios marcadores moleculares altamente sensibles que permitan caracterizar las interacciones genéticas de los individuos del complejo (Leyte-Manrique *et al.*, 2005).

En este contexto, las secuencias de microsatélites son muy utilizadas para investigar la estructura de las poblaciones y estudios del comportamiento de los individuos, basándose en frecuencias de heterocigotos para identificar los alelos. Los microsatélites son buenos marcadores porque son altamente polimórficos, son codominantes y selectivos (Degnan y Arévalo, 2004).

En este estudio se utilizaron los microsatélites como herramienta para conocer las frecuencias alélicas de dos poblaciones de *Sceloporus grammicus* (citotipo FM2) ubicadas en las localidades de San Juan Tilcuautla y La Estanzuela, en el estado de Hidalgo. A partir de dichas frecuencias se determinó la diversidad genética (heterocigotos observados) y estructura genética (diferenciación genética y

la dinámica del flujo genético con la deriva genética) de estas poblaciones mediante el manejo de software específico (POPGENE, TFGPA, Fstat y Structure).

Se obtuvo también un procedimiento estandarizado no invasivo para el análisis cromosómico de *Sceloporus grammicus*, mediante el cultivo de una muestra pequeña de sangre, lo que implica que ya no será necesario sacrificar a los organismos para obtener su cariotipo y puede extrapolarse a otros grupos biológicos, como anfibios y aves.

2. ANTECEDENTES

2.1. El complejo *Sceloporus grammicus* y el concepto de especie

A través del tiempo se ha señalado que el complejo *Sceloporus grammicus* (Phrynosomatidae) presenta una amplia distribución geográfica y ecológica, además de un amplio polimorfismo cromosómico, por lo que es un buen modelo para diversos estudios evolutivos que permitan saber los procesos por los que se han transformado, permitiéndoles sobrevivir a pesar de los diversos factores a los que se enfrentan los organismos en general (Alvarado, 2004). Recientemente, se han analizado un gran número de datos de aloenzimas y cromosomas con métodos basados en distancias genéticas para identificar los límites de distribución de las razas dentro del complejo (Marshall *et al.*, 2006).

Debido a que *Sceloporus grammicus* es un taxón genéticamente complejo por las variaciones cromosómicas que ha presentado a largo del tiempo, aunado a la cosmopolita distribución y a la diferencia de hábitats en los que se encuentra, es necesario entonces utilizar conceptos no biológicos de especie para definirlo y entender su comportamiento evolutivo.

En las últimas décadas, se han originado diversos conceptos sobre la especie, entre ellos están el taxonómico, el nominalista, el evolutivo, el biológico, el filogenético y el ecológico, entre otros. Para este estudio en particular, se ocuparán los conceptos ecológico y filogenético. El primero considera a las especies como las unidades fundamentales de los ecosistemas, como un grupo (población) de organismos que explotan un mismo nicho ecológico, el cual es diferente del de otros linajes en su misma área de distribución y que evoluciona de manera independiente de otros linajes fuera de su rango geográfico (Van Valen, 1976). Este concepto da relevancia al ambiente como modelador del fenotipo de las poblaciones.

Por otro lado, el concepto filogenético implica que una especie es un grupo irreducible de organismos (poblaciones), que poseen al menos un carácter diagnóstico no compartido con otro grupo (apomorfía) y que entre ellos comparten un camino evolutivo común a lo largo del tiempo (Baum, 1992).

En este caso hay tal relación, que tanto el ancestro como los individuos descendientes son la misma especie, pero si algunas poblaciones han estado aisladas evolutivamente unas de otras, por la existencia de barreras geográficas o biológicas por un tiempo suficiente para que aparezcan diferencias que puedan ser utilizadas como marcadores o caracteres de diagnóstico, o que el flujo genético entre las mismas sea tan bajo, para que se produzca una divergencia genética, entonces se podría hablar ya de dos o más especies (Agapow, 2004). Los caracteres usados en la diagnosis de las especies pueden ser morfológicos, conductuales, fisiológicos o químicos y moleculares, todos sustentados genéticamente.

Considerando sus características ecológicas, es importante mencionar que el complejo *Sceloporus grammicus* se distribuye en una gran diversidad de hábitats que incluye ambientes distintos: áridos y templados; en tipos de vegetación como: matorral xerófilo, bosque de encino, bosque de pino, bosque de pino-encino, bosque mesófilo de montaña e inclusive zonas urbanas, con hábitos arborícolas, terrestres y saxícolas (entre rocas o grietas), además de su plasticidad morfológica y cromosómica, lo hace un excelente modelo para estudios evolutivos.

En este sentido, en las últimas décadas se han realizado estudios citológicos, biogeográficos y evolutivos en *Sceloporus grammicus*, tales como: usos diferenciales de hábitat y microhábitat (Arévalo *et al.*, 1993); análisis de procesos de especiación (especiación estasipátrica, para este caso en particular), descripción cromosómica y geográfica de los diferentes citotipos del complejo (Arévalo *et al.*, 1991; Sites *et al.*, 1992) y descripción de zonas híbridas de los diferentes citotipos en la meseta central de México (Goyenechea, 2001).

Como resultado de múltiples estudios realizados sobre los diferentes citotipos que presenta *Sceloporus grammicus*, se ha propuesto que posiblemente estos pudieron originarse a partir de un proceso de especiación estasipátrica o por una especiación cromosómica en cascada (Porter y Sites, 1986) que ocurrió a raíz de cambios en los complementos de cromosomas, mediante el reacomodo

cromosómico en pequeños grupos de individuos dentro del área geográfica ocupada por la especie ancestral y que puede estar dada por el ambiente (Salomon, 2002).

Para el complejo *Sceloporus grammicus* existen pocos trabajos donde se han determinado las diferentes condiciones ambientales a las que están sometidos los siete citotipos que conforman el complejo. Para determinar si aquéllos están provocando algún tipo de adaptación ecológica más allá de los rearreglos cromosómicos, lo cual se puede determinar mediante la descripción de los cambios en las frecuencias alélicas, a través de las generaciones y el análisis de las causas que conducen a esos cambios (Leyte-Manrique *et al.*, 2005)

La especiación ecológica se constituye por tres componentes necesarios: una fuente ecológica de selección divergente, una forma de aislamiento reproductivo y un mecanismo genético para unirlos (Rundle y Nosil, 2005). La selección divergente puede surgir debido a diferencias entre los ambientes de las poblaciones incluyendo, por ejemplo: la estructura del hábitat, el clima, los recursos alimentarios y la cantidad de depredadores o competidores presentes (Rundle y Nosil, 2005), causando de esta manera que se separen para formar dos especies diferentes. Asimismo, el aislamiento reproductivo se da cuando el ambiente ejerce una presión evolutiva sobre el fenotipo de las especies o poblaciones, estableciendo diferencias morfológicas o barreras precigóticas o poscigóticas que hacen imposible que se reproduzcan entre sí.

Cuando en poblaciones de la misma especie comienzan a darse cambios graduales de sus rasgos fenotípicos por influjos y condiciones ambientales, entonces se dice que la especie se asocia a alguna clina ambiental. Esta se caracteriza por el cambio de un carácter fenotípico (tamaño, coloración, entre otras), a causa de un gradiente ecológico (humedad, temperatura, altitud, entre otras). Este fenómeno sucede en poblaciones de organismos con una amplia área geográfica de distribución, por lo que los cambios graduales se dan de una población a la otra (Campbell *et al.*, 2001).

También se denomina clina a la distribución, creciente o decreciente, de la frecuencia con que un gen se presenta en poblaciones vecinas (Lieberman y Jackson, 1995); estos genes son responsables de las diferencias que se usan para definir categorías raciales. Es importante mencionar que cualquier población presenta variaciones en el ámbito territorial, generalmente relacionadas con diferencias en las condiciones ambientales, que pueden reflejar patrones de

migración individual o de flujo de genes (Huxley, 1938), lo que las llevaría a una plasticidad fenotípica como producto de diferencias locales en las poblaciones donde se encuentran.

2.2. Descripción del complejo de *Sceloporus grammicus*

La morfología en la actualidad no sólo estudia las estructuras de los organismos, sino que investiga otros aspectos esenciales relacionados con ellas, como sus funciones, evolución y relaciones con el ambiente que los rodea (Love, 2003).

En lo que respecta a la morfología del complejo *Sceloporus grammicus*, incluye una forma corporal de tamaño mediano, con cabeza, extremidades y cola largas y delgadas. En cada lado del cuello se localizan dos bolsas; la longitud promedio de las escamas dorsales en las hembras es de 64.8 mm y para los machos de 74.2 mm, en número de 40 a 100 escamas (Lara-Góngora, 2004).

La coloración del cuerpo es verde oscuro; la superficie dorsal es verde oscuro a gris oscuro; hay una franja transversal amarilla a nivel de la escama frontal; en los hombros hay una mancha grande oscura que se prolonga hacia atrás de los mismos, reduciéndose hacia la parte dorsal; esta mancha no llega a tocar el lado opuesto; en la parte dorsal del cuerpo se notan líneas negras en forma de ondas, los cuales son de un tono más intenso en la región lateral del cuerpo. Las manchas de las extremidades y cola son del mismo color que las manchas de los lados (Uribe-Peña *et al.*, 1999).

En los machos, generalmente la coloración del área gular puede ir de una tonalidad verde hasta negro con o sin motas que son puntos negros, azul o blanco del tamaño de una escama, presentes también en las hembras (Sites, 1982). La parte lateral del vientre y la zona preanal son amarillas y en la mayor parte de la zona medial, se presentan unas manchas azules, las cuales se oscurecen en una línea media, llegando a formar una franja oscura que llega a ser negra. En las hembras, la coloración del vientre es azul claro (muy débil), amarillo claro o naranja claro. En la región gular de ambos sexos, presentan puntos negros, azul o blanco del tamaño de una escama (Uribe-Peña *et al.*, 1999).

Es bien sabido que la morfología de los organismos en las poblaciones naturales puede modificarse durante su vida debido a que se enfrentan a diferentes condiciones ambientales dentro de su hábitat. En un sentido amplio, puede incluir

todas las condiciones en las cuales viven los seres vivos (temperatura, luz, medio ambiente social y medio ambiente conductual), así como aquellos factores internos tales como enfermedades, microorganismos, toxinas (Siegel, 1995), lo que puede llegar a modificar al fenotipo y, de esta manera, alterar en el organismo su fisiología y morfología como respuesta para adaptarse y sobrevivir (Via y Lande, 1985).

Específicamente la raza FM2 presenta las extremidades más cortas de todas las razas, asimismo sus individuos tienen un diseño de la cabeza menos altas, menos anchas y menos largas que el resto de las siete razas cromosómicas (Rubio-Pérez, 2005). Esta característica puede estar relacionada con aspectos como el establecimiento y defensa del territorio, cortejo, alimentación y comportamientos defensivos contra predadores (Herrel *et al.* 2001).

Además, el citotipo FM2 está relacionado a sitios como pastos, hierbas y rocas (Rubio-Pérez, 2005), en este sentido se han realizado estudios específicos sobre la morfología y ecología en los individuos de esta raza en dos localidades del estado de Hidalgo (Tilcuautla y La Estanzuela), con lo que se ha demostrado que el tipo de sustrato, la cobertura de la vegetación, suelo desnudo, T°C ambiente, T°C microhábitat, humedad y punto de rocío (más relacionados estos cuatro, con la actividad de las lagartijas), influyen posiblemente en el diseño morfológico que presentan los individuos de ambas poblaciones del complejo *Sceloporus grammicus* (Leyte- Manrique, 2006).

2.3. Citología

Naturalmente cada especie tiene un número característico de cromosomas; la mayoría de los organismos superiores son diploides, con dos juegos de cromosomas homólogos: un juego donado por el macho y el otro por la hembra, durante el proceso de fertilización. En la naturaleza, es común encontrar alguna variación, a través de mutaciones, en el número de juegos de cromosomas (Stanfield, 1992).

La variación cromosómica se puede determinar mediante un cariotipo, el cual se define como la organización gráfica de los cromosomas de una especie; se caracteriza por un número, tamaño y forma específicos de los cromosomas, por lo que es útil como carácter taxonómico adicional y una herramienta poderosa para describir relaciones filogenéticas en el grupo de los reptiles (Goyenechea, 2001).

En este sentido, se considera que *Sceloporus grammicus* es un complejo que presenta una alta variación cromosómica, se reporta un cariotipo estándar de $2n=32$

y otros cariotipos de 34, 36 y 38, incluso algunos por arriba de 46 cromosomas, lo que hace un total de siete diferentes razas citotípicas (Lara-Góngora, 2004).

El citotipo más primitivo de este complejo $2n=32$ (S o *Standard*) está compuesto por seis pares de macrocromosomas meta o submetacéntricos, 20 (♀; hembras) ó 19 (♂; machos) microcromosomas. Se sugiere que a partir de éste se originaron el resto de las razas cromosómicas, dentro del rango $2n=32$ a $2n=46$, por fisiones en los seis pares de macrocromosomas y por las que se han denominado S, F5, F6, F5+6, FM1, FM2 y FM3 (Hall, 1973; Sites, 1983; Goyenechea, 1993).

Las características distintivas de cada una de las razas cromosómicas son las siguientes: S (P1) se caracteriza por la fisión en el par uno y un cariotipo de $2n=32-34$; F5 presenta una fisión en el par cinco y $2n=34$; F6 cuenta con fisión en el par seis y $2n=34$; F5+6 tiene $2n=36$ a causa de la fisión en los pares cinco y seis; FM1 con $2n=40-44$ por la fisión en todos los macrocromosomas con excepción de los pares uno y cuatro; FM2 presenta fisión en todos los macrocromosomas excepto el par cuatro y con un par adicional de microcromosomas, con un cariotipo de $2n=44-46$, y FM3 con fisiones en los macrocromosomas dos, cinco y seis, con $2n=38$ (Leyte-Manrique *et al.*, 2005).

Para explicar esta alta tasa de variación cromosómica observada en *Sceloporus grammicus* se desarrolló la teoría de la especiación en cascada, en la que cada citotipo que se forma, tiene un papel crucial en la formación de otros adicionales derivados del él (Leyte-Manrique *et al.*, 2005). Asimismo, se comenta que esta variación de citotipos se considera como resultado de una serie de eventos de reacomodos cromosómicos en línea (S, F6, F5, F5+6, FM3, FM1 FM2). Sumado a lo anterior, White (1978) menciona el hecho de que la forma más primitiva (S), está generalmente distribuida periféricamente, en tanto que los citotipos más modernos (FM1 y FM2) presentan una distribución central, lo cual sugiere que el complejo *Sceloporus grammicus* es el resultado de una serie de fisiones cromosómicas que funcionaron como mecanismos de aislamiento de acuerdo al modelo de especiación estasisipátrica (Goyenechea, 1993).

Es importante mencionar que en el estudio de poblaciones citogenéticas de este complejo se han detectado diferentes puntos de contacto parapátrico entre combinaciones distintas de poblaciones de las razas cromosómicas, llegando a formar zonas híbridas, de las cuales se tienen reportadas siete diferentes, separadas

entre seis combinaciones diferentes de citotipos; se ha descrito también un caso de polimorfismo cromosómico extremo (Arévalo *et al.*, 1991; Goyenechea *et al.*, 1996).

En el caso del complejo *Sceloporus grammicus*, las hembras presentan números diploides en las razas de cromosomas y los machos cuentan con un microcromosoma menos que las hembras, lo que le confiere un heteromorfismo cromosómico sexual. Tanto hembras como machos divergen en otros niveles de organización del genoma por medio de las diversas fisiones en los macrocromosomas (Arévalo *et al.*, 1993).

2.4. Análisis genético de las poblaciones

Los datos moleculares pueden ser utilizados y constituyen una aproximación adecuada para determinar los procesos que configuran la estructura genética de una especie, ya que proporcionan información tanto sobre la distribución actual de la diversidad genética neutral y los procesos que actúan sobre ella (flujo genético, deriva genética, endogamia y selección natural), así como de la historia evolutiva de la población, en particular sobre los patrones geográficos y la importancia del aislamiento histórico (Moritz, 1999).

Los datos genéticos permiten el estudio de las tendencias a largo plazo, a diferencia de los parámetros demográficos que señalan la evolución a corto plazo. De este modo, es posible comparar las tendencias actuales con las históricas para comprobar si se están produciendo desviaciones que puedan comprometer la sobrevivencia de la población o la especie. Por ello, cuando se plantea una hipótesis de los procesos evolutivos en algún grupo biológico, es necesario conocer cómo la variabilidad genética se encuentra distribuida dentro y entre las distintas poblaciones (Jiménez y Collada, 2000).

La estructura genética es útil como material de partida en la conservación dinámica de las poblaciones, ya que cuantifica la variabilidad mediante la descripción de los cambios en las frecuencias alélicas. Actualmente se considera como uno de los principales objetivos de los programas de conservación el mantenimiento de la diversidad genética de la especie, protegiendo de esta forma sus procesos ecológicos y evolutivos (Eriksson, 2000).

Dentro de este estudio se menciona el término población, por lo que es importante saber el concepto del mismo. Una población es un grupo de individuos de la misma especie con características homogéneas que viven en una misma área

geográfica y que interactúan contemporáneamente; sin embargo, los miembros de una especie se muestran en diversas escalas en áreas geográficas extensas (Dyer, 2004).

Las poblaciones son dinámicas, se expanden y contraen a través de los cambios en las tasas de nacimientos y muertes, migraciones o contactos con otras poblaciones. La dinámica natural de las poblaciones tiene consecuencias importantes y pueden por sobre todo liderar los cambios en la amplia diversidad de genes contenida en los organismos vivos de las poblaciones (Klug y Cumming, 2003).

Por lo anterior, se puede considerar un solo *locus* genético en una población, pero tal vez se encuentre que los individuos que forman la población tienen diferentes genotipos. En este orden de ideas, para estudiar poblaciones genéticas se registran frecuencias de alelos dentro de algunos genotipos y con esto se puede saber cómo estas frecuencias cambian de una generación a otra (Klug y Cumming, 2003). Sin embargo, las frecuencias alélicas pueden cambiar también por efecto de los gametos de todos los miembros de una población que cambien en una sola generación. Estos cambios generacionales en la distribución de alelos y genotipos se refieren a ocurrencia de procesos básicos llamados mutación, migración, endogamia, deriva genética o selección natural, conocidos también como fuerzas evolutivas (Rubio de Casas, 2006).

Para cuantificar la variación en las poblaciones mediante la descripción de los cambios en las frecuencias alélicas a través del tiempo, se utiliza como herramienta la genética de poblaciones. Esta disciplina trata la diversidad fenotípica, especialmente cuando esta diversidad se debe a las diferencias en la composición genotípica de los individuos (IPGRI, 2004), lo anterior debido a que uno de los atributos universales de las poblaciones naturales es la diferencia en el fenotipo de los organismos con respecto a muchos rasgos.

En particular, el campo de la genética de poblaciones ha sentado para sí misma las tareas de determinar el grado en el que ocurren las variaciones genéticas en poblaciones naturales y de explicar la importancia de su origen, mantenimiento y evolución. La variación genética en la forma de alelos múltiples de los genes, existe en la mayoría de las poblaciones sexualmente reproductivas. Además, es importante describir cómo los alelos en las poblaciones naturales se organizan en genotipos

para establecer, por ejemplo, si los alelos de genes similares o diferentes están asociados al azar (Hartl y Clark, 1997).

La diversidad genética es un requisito necesario en las poblaciones para adaptarse a los cambios ambientales (Frankham *et al.*, 2002); para el complejo de *Sceloporus grammicus* esto parece ser importante porque cuenta con una amplia distribución geográfica, tienen grandes poblaciones en hábitats diversos (matorral xerófilo, bosque de pino-encino, entre otros) y están sometidas sus poblaciones a condiciones ambientales heterogéneas.

2.5. Marcadores moleculares (Microsatélites)

Una de las herramientas más utilizadas en la actualidad para saber la estructura genética de una población son los marcadores moleculares y, en específico, los microsatélites. Históricamente, el término de microsatélites a menudo ha sido aplicado únicamente en repeticiones de dinucleótidos CA (GT)_n, aunque actualmente existen otras repeticiones que se organizan en tándems y que se han clasificado también como microsatélites (Litt y Luty, 1989; Weber y May, 1989).

Por otra parte, una variedad de otros nombres han sido útiles para describir secuencias repetidas, incluyendo secuencias simples (Tautz, 1989) y STR's (*Short Tandem Repeats* o secuencias cortas repetidas; Edwards *et al.*, 1991).

Los microsatélites son secuencias formadas por una única secuencia motivo, no más de seis bases de largo, que se presenta en tándems a lo largo de un sitio específico del cromosoma, es decir, con arreglos iguales repetidos de principio a fin, sin interrupción de cualquier otra base.

Estos marcadores se han detectado dentro de los genomas de cada uno de los organismos analizados hasta el momento y se localizan con frecuencias más altas de las que se hubieran previsto en su composición base. Esto ha sido formalmente mostrado por las repeticiones TA en levadura (Valle, 1993) y trectos de polipirimidina en una variedad de genomas (Behe, 1987, 1995). Los microsatélites muestran altos niveles de polimorfismo (Litt y Luty 1989; Weber y May 1989; Tautz, 1989).

Por otro lado, numerosos microsatélites están pobremente caracterizados, debido a que muchos de ellos han sido aislados de las bibliotecas genómicas usando pruebas de oligonucleótidos y después probados para evaluar su polimorfismo. También se ha observado que estos marcadores presentan tasas de

mutación altas, lo que genera los elevados niveles de diversidad alélica necesarios para los estudios genéticos de procesos que actúan sobre escalas de tiempo ecológicas (Schlotterer, 2004).

Las ventajas de los microsatélites como marcadores moleculares es que presentan un polimorfismo muy elevado (multialélico); son altamente informativos ya que presentan herencia codominante y los mismos alelos se encuentran entre los individuos estrechamente relacionados; son técnicamente simples de medir por un proceso automatizado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés); son altamente sensibles requiriendo sólo pequeñas cantidades de oligonucleótidos de DNA; como los microsatélites están uniformemente dispersos a través del genoma (aproximadamente cada 10 Kpb), son muy abundantes y son ampliamente aplicables debido a que los *loci* están frecuentemente conservados entre especies relacionadas y algunas veces entre géneros (Yáñez-Amayo, 2002).

A pesar de sus ventajas, los microsatélites (como todos los marcadores), presentan algunas desventajas como el tiempo y costo en el proceso del diseño de cada secuencia que podría, en el peor de los casos, limitar su utilidad y confundir algunos análisis. Sin embargo, existe la posibilidad de usar los mismos marcadores en más de una especie, debido a que existe un grado de conservación de los microsatélites entre genomas de especies tan distantes como son algunos mamíferos y diversos grupos de plantas (Becerra y Paredes, 2000). Por lo anterior, los microsatélites cuentan con la versatilidad para responder muchos tipos de preguntas ecológicas, pese a sus desventajas para otros usos.

3. JUSTIFICACIÓN

Sceloporus grammicus es un modelo biológico con una plasticidad morfológica y cromosómica documentada con anterioridad. Sin embargo, a la fecha no se han reportado estudios donde se analice el efecto de hábitats distintos sobre la diversidad y estructura genética intra e interpoblacional en algún citotipo en particular, así como tampoco se tienen estudios genéticos reportados, utilizando marcadores moleculares altamente polimórficos, como los microsatélites.

En este sentido, el presente estudio analiza las posibles diferencias genéticas existentes entre dos poblaciones del citotipo FM2 para *S. grammicus*, que se

encuentran en dos hábitats diferentes (matorral xerófilo vs. bosque de pino-encino), utilizando microsatélites como marcadores genéticos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Analizar la diversidad y la estructura genéticas del citotipo FM2 (*Sceloporus grammicus*), dentro y entre dos poblaciones localizadas en La Estanzuela (Mineral del Chico) y Tilcuautla (San Agustín Tlaxiaca), en el Estado de Hidalgo, utilizando cinco marcadores moleculares (microsatélites) altamente polimórficos.

4.2. Objetivos particulares

1. Obtener un método no invasivo (cultivo de sangre) para evaluar el cariotipo de *Sceloporus grammicus*;
2. Analizar la diversidad genética y riqueza alélica disponible dentro de las poblaciones seleccionadas, utilizando cinco secuencias de microsatélites reportadas previamente para el género *Sceloporus* (Scel-571, Scel-138, Scel-238, Scel-437 y Scel-114);
3. Determinar los patrones de estructura y flujo genético entre las poblaciones seleccionadas, para verificar la posible influencia de ambientes distintos en la dinámica genética del citotipo FM2 de *Sceloporus grammicus*.

5. HIPOTESIS

Sceloporus grammicus está considerado históricamente como un grupo taxonómico con una gran plasticidad genética y morfológica; con base en ello, se propone que, ante el efecto de dos hábitats contrastantes (bosque de pino-encino *versus* matorral xerófilo), probablemente existan patrones micro-evolutivos diferenciales en cada una de las dos poblaciones analizadas, que promuevan discrepancias en la diversidad y estructura genética intra e interpoblacionales.

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1. Área de estudio

Se seleccionaron dos sitios dentro del Estado de Hidalgo donde se ha reportado previamente el citotipo FM2 en la bibliografía (Arévalo *et al.*, 1991): una del municipio de Tilcuautla y una en La Estanzuela (Parque Nacional El Chico). Ambas regiones presentan diferentes condiciones geográficas y ecológicas, ya que en Tilcuautla predomina la vegetación de matorral xerófilo y La Estanzuela es una zona boscosa de pino-encino, que se encuentra también asociada a elementos de material xerófilo; asimismo, ambas regiones presentan gradientes altitudinales diferentes (Leyte-Manrique, 2006).

- a) **San Juan Tilcuautla.** Se ubica en la porción sur del Estado de Hidalgo, dentro de la región noreste del municipio de San Agustín Tlaxiaca, entre las coordenadas 20° 09' 09.8" longitud norte y 98° 48' 13.2" latitud oeste (Figura 1), su altitud es de 2361 m.s.n.m. El sitio cuenta con un clima templado subhúmedo, una temperatura promedio anual de 15° C y una precipitación media anual de 750 mm (Leyte-Manrique, 2006). El tipo de vegetación que prevalece en la zona es matorral xerófilo (Figura 2). Por lo que se aprecia, que esta localidad presenta una moderada concentración humana, aunque en los últimos años el área ha sido afectada por la urbanización y el cambio de uso de suelo provocado por la actividad agrícola y el asentamiento humano.
- b) **La Estanzuela.** Se localiza en la parte sur del Estado de Hidalgo, Municipio de Mineral del Chico. Entre las coordenadas 20° 10' 02.1" latitud norte y 98° 45' 49.5" longitud oeste (Figura 1), con una altitud de 2700 m.s.n.m., un clima templado frío, una temperatura promedio anual de 14° C y una precipitación promedio anual de 1506 mm (Leyte-Manrique, 2006). Su tipo de vegetación que domina es el bosque de pino- encino (Figura 2), aunque también cuenta con matorral xerófito. Estimando que es una zona relativamente poblada, con evidencia de perturbación del hábitat y microhábitat ocupado.

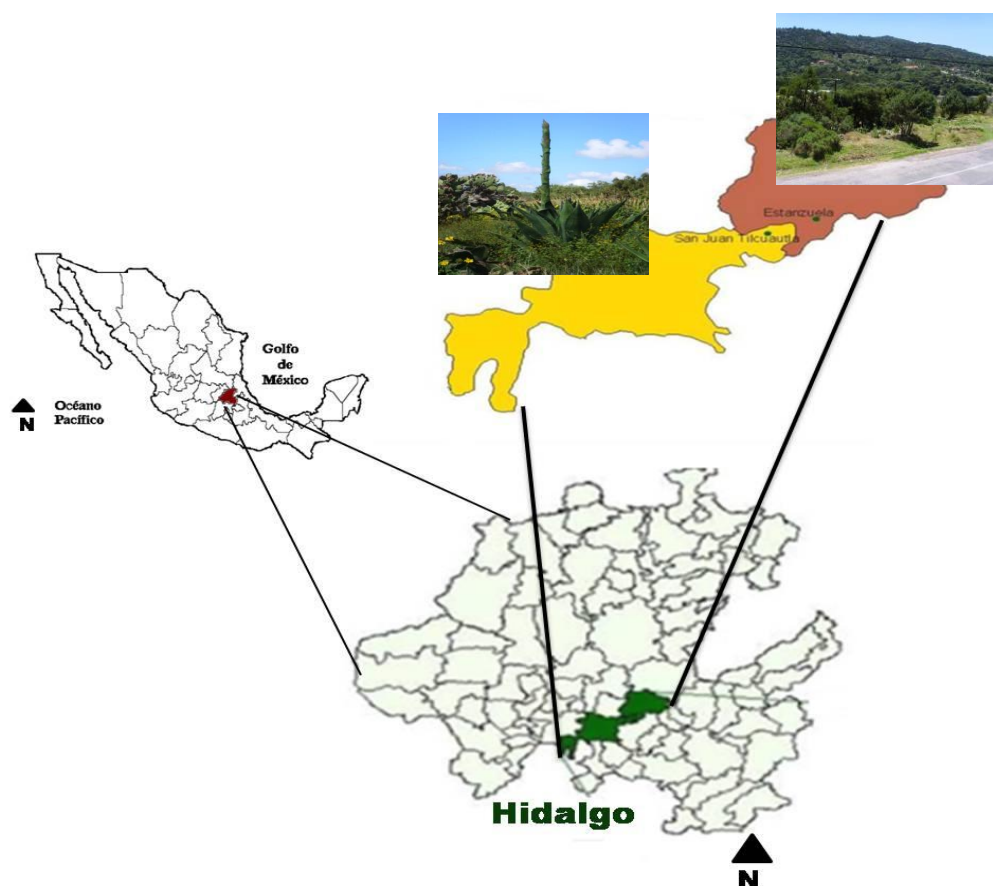


Figura 1. Mapa de ubicación de los sitios de muestreo, las localidades de San Juan Tilcuautla (San Agustín Tlaxiaca) y La Estanzuela (Mineral del Chico) situados al sureste del Estado de Hidalgo, México.



Figura 2. Tipo de vegetación en la que se encuentran los individuos del citotipo FM2 analizados en este estudio; La Estanzuela con Bosque de pino-encino (izquierda) y Tilcuautla con matorral xerófilo (derecha).

6.2. Trabajo de campo

Se recolectaron 22 individuos (6 machos y 16 hembras) de la localidad de San Juan Tilcuautila y 21 individuos (8 machos y 13 hembras) de La Estanzuela, todos pertenecientes al citotipo FM2 de *Sceloporus grammicus* (Figura 3). La recolecta se realizó en dos periodos; el primero fue de Junio a Noviembre del 2006 y el segundo de enero a abril del 2007. Los individuos fueron seleccionados y su captura se realizó manualmente, con la ayuda de ligas (Figura 4), de acuerdo a las técnicas propuestas por Casas-Andreu *et al.* (1991).



Figura 3. Morfología ventral (izq.) y dorsal (der.) de individuo de *Sceloporus grammicus* (Citotipo FM2) en la localidad de La Estanzuela.



Figura 4. Descripción de la forma de colecta manual y con la ayuda de ligas mencionada por Casas-Andreu *et al.* (1991), la cual permite manipular a los ejemplares sin dañarlos para ser posteriormente liberados.

6.3. Obtención de material biológico

Para la obtención de los cariotipos se obtuvieron muestras de sangre de los 43 individuos recolectados (29 hembras y 14 machos), para el citotipo FM2 de *Sceloporus grammicus*, capturados en las localidades de San Juan Tilcuautla y La Estanzuela del Estado de Hidalgo.

La sangre se obtuvo mediante un corte transversal de la cola de los individuos, de aproximadamente un centímetro (1-2 g), del extremo final de la cola de la lagartija (Figura 5); las muestras se transportaron en microtubos estériles con hielo seco y se almacenaron a -20° C, para ser procesadas posteriormente.

La cantidad de sangre adquirida mediante este método, es la suficiente para obtener la fuente celular, que en este caso son los leucocitos y eritrocitos, ya que en ellos se encuentran los cromosomas que se visualizaron óptimamente en metafase.

Cabe mencionar que los individuos recolectados fueron liberados en el mismo sitio, después de haber obtenido el material biológico a utilizar para la realización del cariotipo y la extracción del DNA.



Figura 5. Referencia del corte de un centímetro de la cola de los ejemplares del citotipo FM2, la cual mide aproximadamente 5.5 cm. de largo total, para obtener la fuente celular (sangre) para el cariotipo y el tejido para la extracción del DNA.

6.4. Técnica no invasiva para el cariotipo

Para estandarizar esta técnica se tomaron en cuenta las técnicas propuestas por Sites (1983) y la mencionada por Goyenechea (2001) para saurios, además de la planteada por Baker *et al.* (1982). De igual forma, se consideraron técnicas aplicadas a mamíferos que utilizan cultivo celular de sangre, como las propuestas por Kessler *et al.* (2006) y Gaffaroglu y Yuksel (2006), haciendo las respectivas modificaciones en cuanto al medio de cultivo utilizado y el tiempo de incubación de las células, básicamente.

Con los métodos examinados se realizaron las modificaciones necesarias (Apéndice A), quedando la técnica utilizada en este estudio de la siguiente manera:

1. Preparar en un microtubo, 0.75 ml de medio de cultivo modificado McCoy 5A con L-glutamina y bicarbonato de sodio (NaHCO_3), más 0.009 ml de EDTA y 0.025 ml de Fitohemaglutinina (FHA).
2. Gotear la sangre en el tubo que contiene el medio previamente preparado (medio de cultivo modificado McCoy 5A, EDTA, FHA) para aglutinar los eritrocitos y leucocitos, posteriormente incubar a 26°C por un periodo de 18 a 24 horas.
3. Agregar posteriormente 0.05 ml de colchicina al 0.025% para detener la mitosis, mezclar perfectamente e incubar durante 30 minutos a una temperatura de 26°C .
4. Agregar aproximadamente un ml de solución hipotónica de KCl (cloruro de potasio) previamente enfriada a 4°C , para hinchar las células e incubar posteriormente durante 30 minutos a temperatura ambiente, provocando así el choque hipotónico.
5. Centrifugar 10 minutos de 700-1000 rpm, eliminar el sobrenadante y adicionar el fijador al botón celular, que en este caso es solución Carnoy (metanol-ácido acético 3:1), lo que ayudará a reventar los glóbulos rojos, esto se hace muy lentamente, evitando levantar el botón al agregar la solución (preferentemente por las paredes del tubo).
6. Después de 15 minutos a temperatura ambiente, resuspender el botón celular en el fijador y centrifugar nuevamente por 10 minutos de 700 a 1000 rpm, la resuspensión se puede hacer tres ó cuatro veces hasta que el sobrenadante se presente totalmente limpio.
7. Gotear desde una altura de 2.5 metros sobre portaobjetos lo más fríos posible, para lograr que las células se revienten y los cromosomas queden esparcidos en la superficie del portaobjetos.
8. Teñir con colorante Giemsa (40 y 100X) durante 35 minutos, lavar con agua por goteo indirecto, secar al aire al aire y observar al microscopio (40X).

Las modificaciones a la técnica original se basaron principalmente en el medio de cultivo utilizado, que en este caso fue McCoy 5A, enriquecido con albúmina de suero bovino (BSA) y Gentamicina como antibiótico de amplio espectro; se estandarizó específicamente: la concentración de colchicina, el periodo y temperatura de incubación, además del tiempo de exposición de las células a las soluciones hipotónica y de fijación.

6.5. Extracción de DNA

La extracción de DNA total se llevó a cabo mediante la técnica de solventes orgánicos, reportada previamente por Higuchi (1989; Apéndice B), a la cual se le realizaron algunas modificaciones. Por cada muestra de tejido obtenido del corte transversal de la cola, se obtuvieron aproximadamente 100 ng/μl de DNA genómico. Para verificar la presencia de DNA de buena calidad en las muestras extraídas, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1.4%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transluminador UV.

6.6. Selección de microsatélites y obtención de productos de PCR

Los cinco microsatélites utilizados (Scel-114, Scel-138, Scel-238, Scel-437 y Scel-571) fueron seleccionados de un grupo de nueve reportados anteriormente (Zamudio y Wieczorek, 2000; Apéndice B), para *Sceloporus jarrovi* que es una especie cercana a *Sceloporus grammicus*; la amplificación de las muestras se llevó a cabo mediante una técnica estándar de amplificación *in vitro* de DNA: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Apéndice B).

Se analizó el tamaño y número de alelos amplificados y obtenidos en ambas poblaciones con cada microsatélite y se compararon con el intervalo reportado bibliográficamente para el complejo de *Sceloporus grammicus*.

Los productos de PCR se separaron en un gel de secuenciación vertical de poliacrilamida al 7.0% (Figura 6), con una cámara de electroforesis de alta resolución. La corrida de la electroforesis se realizó a 2,500 volts constantes durante 3 horas; estos geles fueron revelados mediante tinción estándar con nitrato de plata al 1.5% (Apéndice B; Benbouza *et al.*, 2006).

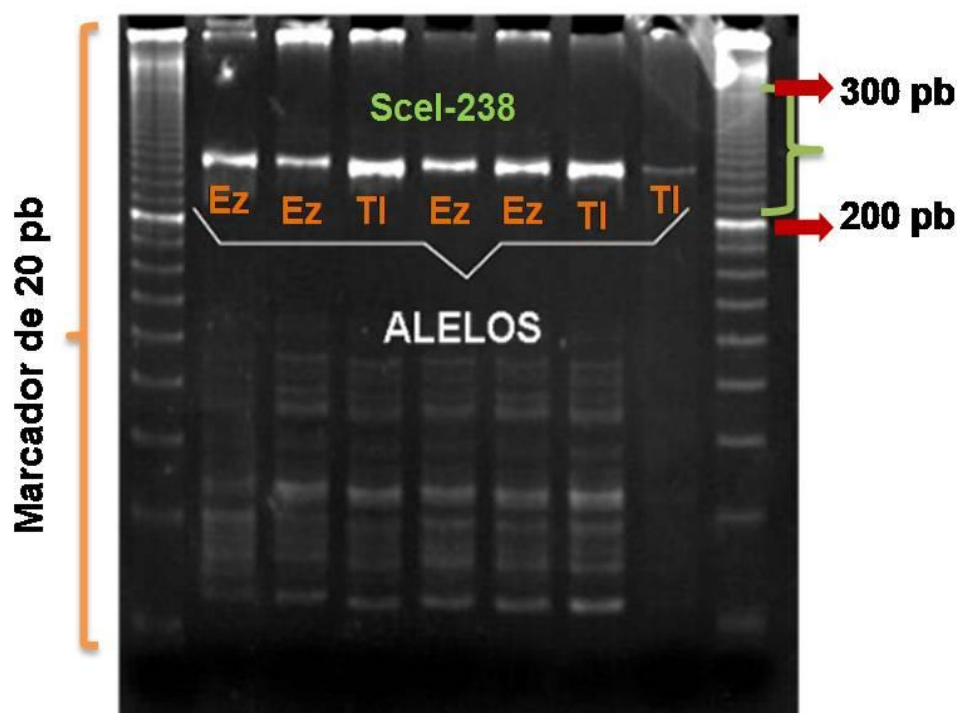


Figura 6. Visualización de alelos amplificados con el microsatélite Scel-238 para los individuos de La Estanzuela (Ez) y Tilcuautla (TI), mediante electroforesis de acrilamida al 7.5%; los alelos amplificados se encuentran dentro de un intervalo de peso molecular de 226-250 pb.

6.7. Análisis de diversidad genética y estructura poblacional

Los análisis de diversidad genética se llevaron a cabo con los programas POPGENE (Versión 1.31, 1999) y TFPGA (Versión 1.3, 1997), con los que se determinaron las frecuencias alélicas, porcentajes de *loci* polimórficos, así como el grado de polimorfismo presente con los descriptivos de heterocigotos tanto esperados como observados.

Para cuantificar el efecto de la endogamia de la subestructura de una población, Wright (1951), definió lo que ha sido hasta ahora llamado *índice de fijación*. Este índice iguala la reducción en la expectativa de heterocigosidad con apareamiento al azar en cualquiera de los niveles de una población jerárquica relativa a otra. El *índice de fijación* es un índice de diferenciación genética muy útil, debido a que permite una comparación objetiva de los efectos generales de la subestructura de la población entre organismos diferentes sin entrar en detalles en las frecuencias de alelos, los niveles observados de heterocigosidad y demás. El símbolo genético para el índice de fijación es la *F* con subíndices que indican los niveles de jerarquía que han sido comparados (estadísticos *F*).

La estructura genética de las dos poblaciones se determinó mediante el software Fstat (Versión 2.9.3.2, 2002), con el cual se obtuvo la riqueza alélica y el análisis de grupos para la obtención de los estadísticos F: F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} , que van a dar resultados de niveles de endogamia, balance entre deriva y flujo genético; además del grado de diferenciación genética entre las poblaciones, respectivamente.

Finalmente, con la ayuda del programa Structure (Versión 2.2, 2007), se verificó el porcentaje de alelos compartidos y exclusivos entre ellos; además para determinar la dinámica del flujo genético dentro del citotipo y entre las dos poblaciones.

7. RESULTADOS

7.1. Cariotipo

Mediante la técnica estandarizada se lograron obtener células en las cuales se pudieron observar, con ayuda del microscopio óptico, los 46 cromosomas mediante el frotis cromosómico, por lo que se determinó que los individuos analizados realmente pertenecen al citotipo FM2 de *Sceloporus grammicus* (Figura 7).

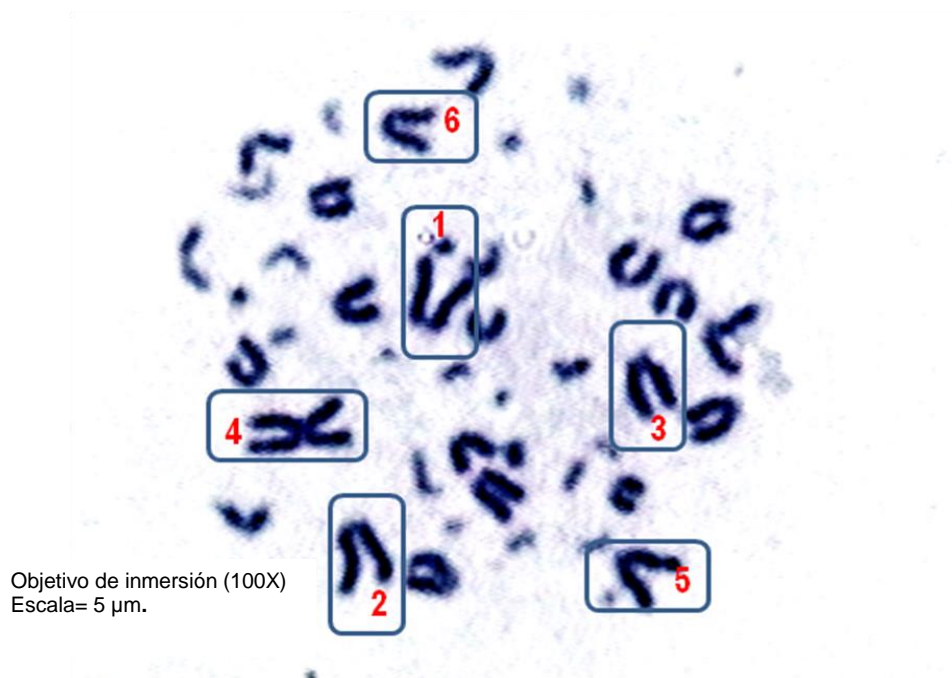


Figura 7. Visualización de los cromosomas del citotipo FM2 de una hembra perteneciente a la localidad de San Juan Tilcuautla, mediante la técnica no invasiva estandarizada. Donde se muestran las fisiones del par uno al par seis (1, 2, 3, 5 y 6) con un cromosoma completo perteneciente al par cuatro (4). Escala= 5 μ m.

En las figuras 8 y 9 se pueden percibir las múltiples fisiones y la fijación acrocéntrica del cromosoma en los pares 1, 2, 3, 5 y 6, así como un macrocromosoma completo en el par 4 (que no presenta fisión), siendo esta una característica distintiva del citotipo FM2. Lo anterior, de acuerdo al ideograma modificado y publicado por Reed *et al.* (1995), para todas las razas cromosómicas que actualmente presenta el complejo *Sceloporus grammicus* (Figura 9).

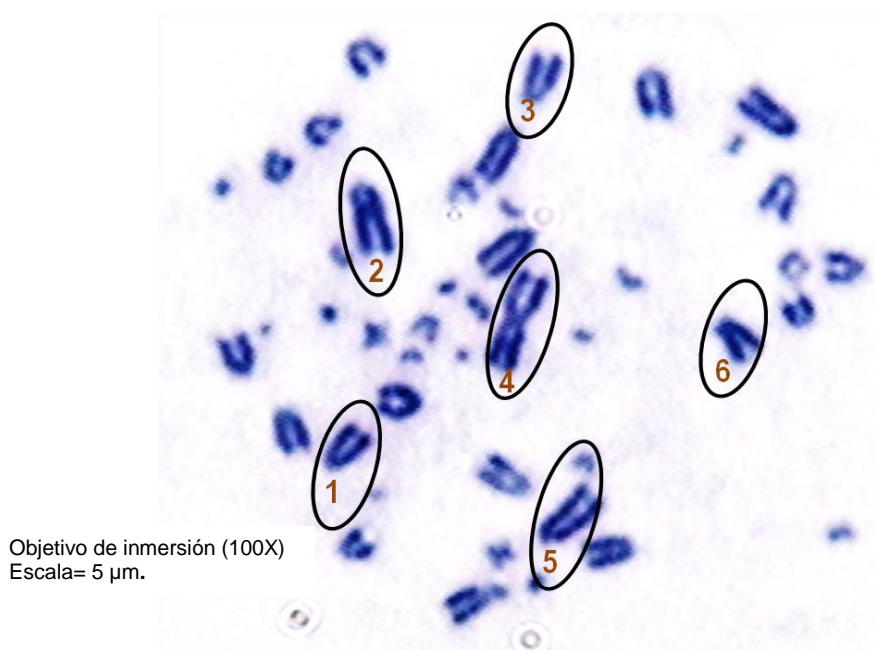


Figura 8. Visualización del frotis con los cromosomas del citotipo FM2 con sus fisiones en cinco de los seis macrocromosomas (1, 2, 3, 5 y 6) y un cromosoma entero del par cuatro (4), perteneciente a una hembra de la localidad de La Estanzuela.

Raza	2n	Ideograma
Estandar	32	
Fision en par 6	34	
Fision en par 5	34	
Fision en par 5 y 6 (F5+6)	36	
Fision en par 2, 5 y 6 (FM 3)	38	
Fision en par 1, 2, 5 y 6 (FM1)	40	
Fision en par 1- 6 (FM2)	46	

Figura 9. Ideograma y representación completa de las siete razas cromosómicas del complejo *Sceloporus grammicus*, descritos por Hall (1973) y modificados por Reed *et al.* (1995). Resaltados en el óvalo rojo, el ideograma de los macrocromosomas fisionados de la raza FM2 analizada en este trabajo.

Después de haber obtenido los frotis, se procedió a tomar fotos de las que se recortaron los cromosomas, con la finalidad de ordenarlos por pares según su homología en tamaño y forma, para integrar de manera ordenada el cariotipo representativo del citotipo FM2 para los individuos de los sitios de recolecta (Figura 10).

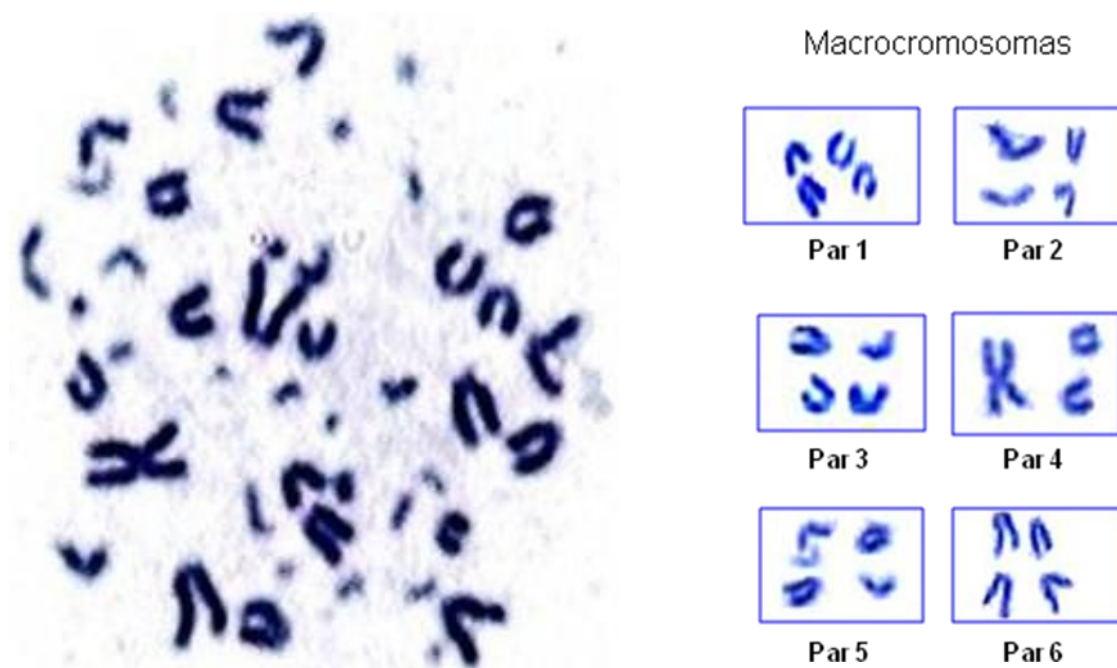


Figura 10. Cariotipo de los primeros seis pares de macrocromosomas del citotipo FM2 de *Sceloporus grammicus*, los cuales fueron recortados y organizados por homología con su respectivo ideograma.

Las condiciones optimizadas en este trabajo se basan en sólo 24 horas de incubación, además de la baja concentración de colchicina, la cual es clave para detener la mitosis, inhibiendo la formación del huso mitótico, lo que permite obtener los cromosomas en metafase. El proceso completo de la técnica estandarizada consta tan solo de 26 horas de tratamiento, lo que facilita la obtención y visualización de los cromosomas con una muestra pequeña de sangre y sin sacrificar a los individuos.

7.2. Diversidad genética

La variación para los cinco microsatélites fue determinada para los 43 individuos de las dos poblaciones del citotipo FM2 de *Sceloporus grammicus*. Los cinco microsatélites polimórficos que se utilizaron, amplificaron para el 70% de las muestras de DNA obtenidas y se detectaron un total de 107 alelos. Asimismo, se

revelaron nueve alelos exclusivos en la muestra de la población de Tilcuautla: dos para el *locus* Scel-138, uno para el *locus* Scel-437 y seis más para el *locus* Scel-571 (Cuadro 1). Estos alelos exclusivos para Tilcuautla podrían indicar una adaptación genética como respuesta a la influencia del ambiente o por efecto de la deriva genética.

Cuadro 1. Frecuencias alélicas por cada *locus* y entre poblaciones, donde: P1=Tilcuautla y P2= La Estanzuela. En verde los alelos exclusivos para la población de Tilcuautla, en los *loci* Scel-138, Scel-437 y Scel-571.

	Scel 114		Scel 138		Scel 437		Scel 238		Scel 571	
Alelo	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2
1	0.0263	0.0417	0.0625	0.0667	0.0556	0.0667	0.0250	0.0250	0.0476	0.1333
2	0.1316	0.0417	0.0625	0.0667	0.1667	0.1000	0.0250	0.0250	0.0952	0.2000
3	0.0526	0.1667	0.0625	0.0667	0.1389	0.0333	0.0250	0.1500	0.0714	0.2000
4	0.1316	0.0417	0.0625	0.1000	0.0556	0.1333	0.0250	0.1250	0.0238	0.1333
5	0.0789	0.0417	0.0625	0.0333	0.1944	0.1000	0.2000	0.1000	0.0476	0.1667
6	0.0526	0.2083	0.1562	0.1333	0.1111	0.1667	0.0500	0.0500	0.0952	0.0667
7	0.1053	0.1250	0.0938	0.0667	0.1667	0.2000	0.0250	0.0750	0.0238	0.0667
8	0.0789	0.0417	0.0625	0.2333	0.0278	0.1333	0.2000	0.2500	0.1429	0.0333
9	0.1579	0.2500	0.0312	0.0667	0.0278	0.0667	0.2750	0.1000	0.1190	
10	0.1842	0.0417	0.0938	0.1000	0.0556		0.1000	0.0750	0.1667	
11			0.1250	0.0667			0.0500	0.0250	0.0952	
12			0.0312						0.0238	
13			0.0938						0.0238	
14									0.0238	

Los niveles de diversidad genética fueron similares entre las muestras de ambas poblaciones y dentro de los *loci* analizados. La población con mayor variación genética fue la de Tilcuautla con un valor de 0.8747 y el *locus* Scel-138 fue el que presentó mayor variabilidad. Con respecto a La Estanzuela, se obtuvo un valor

ligeramente menor de variación (0.8595), aunque ambas presentan valores altos para este indicador en particular (Cuadro 2).

Cuadro 2. Resultados de diversidad genética en ambas poblaciones, promedios obtenidos por *locus* y por población. Los valores en negrita indican los datos representativos.

Población //locus	Tilcuautla	Estanzuela	Promedio
Scel-114	0.8767	0.8403	0.8585
Scel-138	0.9082	0.8800	0.8941
Scel-437	0.8642	0.8667	0.8654
Scel-238	0.8262	0.8638	0.8453
Scel-571	0.8980	0.8467	0.8723
Promedio	0.8747	0.8595	

El número efectivo de alelos (N_e) es el número de alelos que pueden estar presentes en una población. En este caso el número de alelos observados (11.600) superó al número efectivo de alelos (8.3850).

El resultado de heterocigosidad observada fue menor con respecto a lo que se esperaba obtener, los valores indican que la población de Tilcuautla presenta niveles muy bajos de heterocigosidad (0.2697), en contraste con La Estanzuela (0.8747; Cuadro 3).

Cuadro 3. Valores de diversidad genética de cada población. Donde: N: Tamaño de muestra, Na: Número de alelos observados, Ne: Número efectivo de alelos, Ra: Riqueza alélica, Ho: Heterocigotos observados, F: índice de fijación, He: Heterocigotos esperados promedio.

Población	N	Na	Ne	Ra	Ho	F	He
Tilcuautla	22	11.6000	8.3850	9.27	0.2697	0.7429	0.8747
La Estanzuela	21	9.8000	7.1911	6.5	0.8747	0.6924	0.8595
Promedio	21.5	10.7000	7.7888	7.885	0.5722	0.7176	0.8671

En el cuadro 4 se muestra que los cinco *loci* fueron altamente polimórficos (100%). Uno de los factores que caracterizan la diversidad genética es el número de

heterocigotos esperados y el número de heterocigotos observados. Al respecto, el número de heterocigotos observados (0.2455), es menor que el número de heterocigotos esperados (0.9010), para los datos promedio obtenidos en todos los *loci* utilizados, lo que podría deberse al tamaño de la muestra y/o a que están actuando algunos factores evolutivos como la deriva genética, que reduce la proporción de heterocigotos en las poblaciones naturales (Cuadro 4).

Cuadro 4 Índices de heterocigosidad de Nei, para cada *locus* se muestra: H_o (Heterocigotos observados), H_e (Heterocigotos esperados) y porcentaje de polimorfismo (% P).

Locus	H_o	H_e	% de Polimorf.
Scel-114	0.2903	0.8974	100
Scel-138	0.2581	0.9212	100
Scel-437	0.1818	0.8914	100
Scel-238	0.2750	0.8741	100
Scel-571	0.2222	0.9206	100
Media	0.2455	0.9010	100

7.3. Estructura genética

El valor promedio de F_{ST} que determina el nivel de diferenciación genética para las dos poblaciones analizadas fue de 0.0217 (baja diferenciación entre las poblaciones), mientras que en el análisis *locus* por *locus*, el microsatélite Scel-571 proporcionó mayor información con respecto a la diferenciación entre las poblaciones, con un valor de 0.0355, seguido por el *locus* Scel-114, con un valor de 0.0243. En lo que respecta a los valores más bajos, se encontraron en el *locus* Scel-437 que detectó menor diferenciación genética entre los individuos de ambas poblaciones con un valor de 0.0144 (Cuadro 5).

Para los niveles de endogamia que se representan con el valor del estadístico F_{IS} , se tiene que para ambas poblaciones es de 0.7176 (niveles elevados de endogamia; Cuadro 5); siendo el *locus* Scel-437 el que indicó el valor más alto (0.7946), con respecto a los demás.

Los resultados para el análisis de F_{IT} que establecen el balance entre la deriva y el flujo genético, mostraron que el valor promedio de las dos poblaciones analizadas es de 0.7237; siendo el *locus* Scel-437 el que presenta mayor frecuencia,

con un valor promedio de 0.7975, contrario al *locus* Scel-114 que registró el valor más bajo con una frecuencia de 0.6610 (Cuadro 5). Esto indica que hay un flujo genético moderado entre ambas poblaciones, aunque con una diferenciación local suficiente para promover alelos exclusivos en al menos una de ellas (Tilcuautla).

Cuadro 5. Valores promedio de los estadísticos F en ambas poblaciones, el intervalo en el que se interpretan los valores estadísticos va de 0 a 1 en F_{ST} y F_{IS} , mientras que para F_{IT} el rango es de -1 a 1. El valor clave para la estructura genética es el de F_{ST} , pues proporciona la diferenciación genética, ya sea pequeña (0 a 0.05), moderada (0.05 a 0.15), grande (0.15 a 0.25) y muy grande (mayor a 0.25; Wright, 1951). Los valores en negrita indican el promedio para cada valor.

Locus	F_{IT}	F_{IS}	F_{ST}
Scel-114	0.6610	0.6526	0.0243
Scel-138	0.7194	0.7157	0.0130
Scel-437	0.7975	0.7946	0.0144
Scel-238	0.6814	0.6746	0.0210
Scel-571	0.7578	0.7489	0.0355
Promedio	0.7237	0.7176	0.0217

Dentro de los resultados de F_{ST} para cada una de las poblaciones (Tilcuautla y La Estanzuela), tomando en cuenta el número de alelos diferentes, se obtuvieron valores ligeramente distintos (F_{ST} Tilcuautla: 0.0935 y F_{ST} Estanzuela: -0.0501), donde es evidente que la población más diferenciada es Tilcuautla, mientras que La Estanzuela no muestra valores significativos de diferenciación ($1 \leq 0$; Wright, 1951).

7.4. Dinámica del Flujo genético

Frecuencias de Alelos Compartidos. En general, ambas poblaciones comparten los mismos alelos, con evidencia de flujo genético contemporáneo y una estructura genética específica (Figura 11). Se encontró también que para ambas poblaciones el flujo genético es moderado, aunque los individuos de La Estanzuela muestran una mayor proporción de alelos provenientes de la población de Tilcuautla como se muestra en la figura 12.

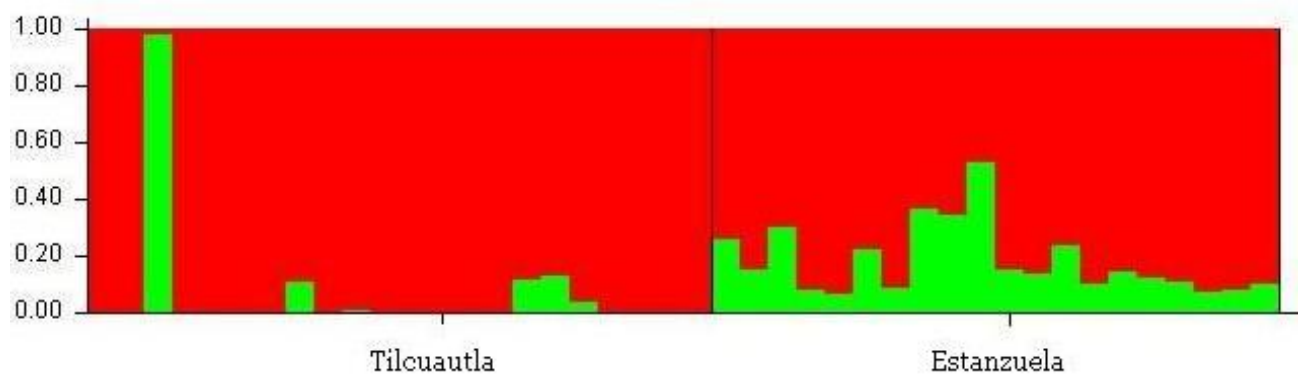


Figura 11. Representación del flujo de genes entre las poblaciones de Tilcuautla y La Estanzuela. Se observa la proporción de alelos compartidos, siendo mayor el intercambio de genes de los individuos de Tilcuautla a la población de La Estanzuela. En verde, alelos compartidos no fijados, en rojo, alelos compartidos fijados.

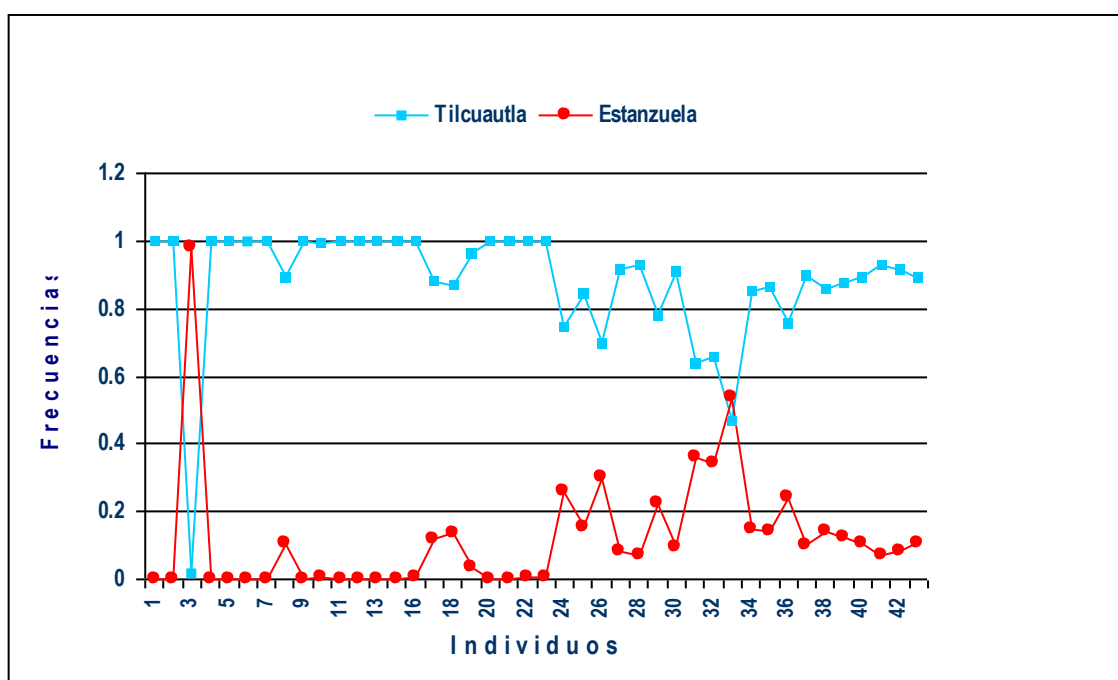


Figura 12. Frecuencias alélicas registradas para cada individuo de las dos poblaciones analizadas. Los individuos 1-22 pertenecen a la población de Tilcuautla; los individuos 23-43 son de la población de La Estanzuela.

Los individuos de Tilcuautla son más homogéneos genéticamente, con respecto a la población de La Estanzuela, probablemente porque es una población más aislada (Figura 13). También es importante considerar que en la población de La Estanzuela se han reportado otros citotipos distintos al FM2, por lo que pudiera existir un intercambio de genes con éstos, posiblemente formando híbridos. Esto

podría influir y/o modificar la estructura genética del citotipo FM2 en la población de La Estanzuela a través del tiempo.

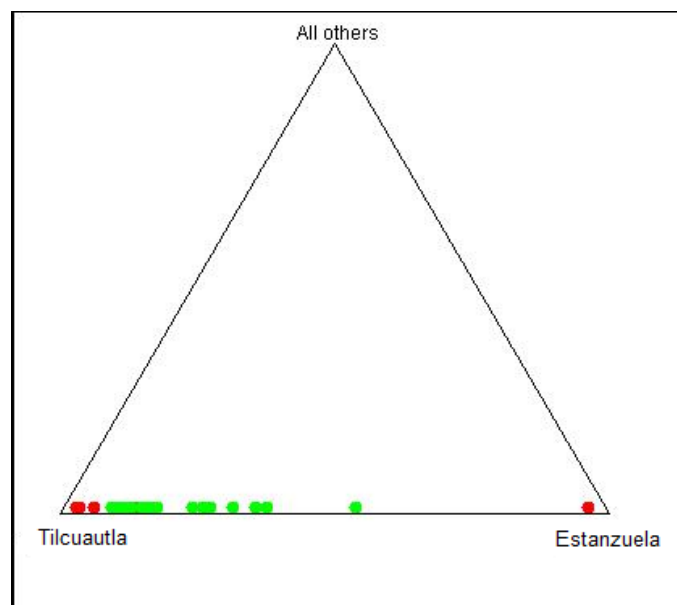


Figura 13. Dinámica del flujo genético entre los individuos de las poblaciones de Tilcuautla (rojo) y La Estanzuela (verde), utilizando el método de asignación de alelos compartidos. Se aprecia que los individuos de la población de Tilcuautla presentan una mayor similitud genética en comparación con los individuos de La Estanzuela.

En el caso de los resultados de flujo genético mediante el índice de migración para pares de muestras (N_m), muestra que el intercambio de migrantes reproductores es bajo, lo que probablemente contribuye a mantener las diferencias genéticas encontradas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Matriz de Flujo genético entre pares de muestras para las poblaciones de San Juan Tilcuautla y La Estanzuela (N_m). Se muestra en azul la población que presenta menor flujo genético.

	Tilcuautla	La Estanzuela
Tilcuautla	*****	*****
La Estanzuela	3.4828	*****

- Alelos con mayor frecuencia por *locus* y por población

Dentro de una población es importante conocer cuáles son los alelos que se encuentran con mayor frecuencia. Para este caso todos los *loci* aportaron información relevante para las poblaciones de Tilcuautla y La Estanzuela.

Para el *locus* Scel-114 se encontraron cuatro alelos (206, 210, 224 y 226), siendo el alelo con la mayor frecuencia para la población de Tilcuautla el 226, con un valor de 0.147; para La Estanzuela el alelo con mayor frecuencia fue el 206, con un valor de 0.486 (Figura 14).

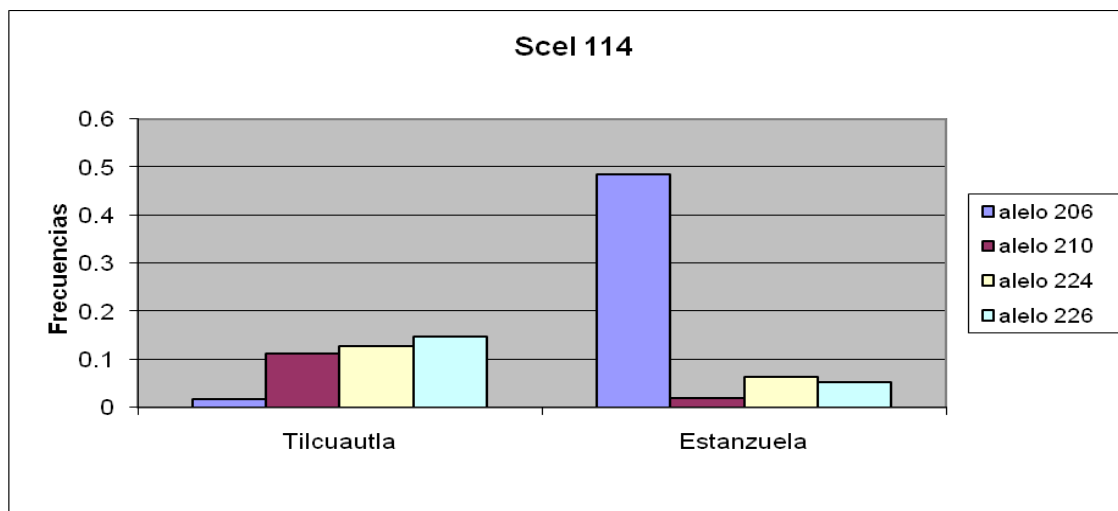


Figura 14. Descripción de las frecuencias alélicas para el *locus* Scel-114, indicando que el alelo 226 es el que presenta mayor frecuencia en la población de Tilcuautla, mientras que para La Estanzuela es el alelo 206.

Para el *locus* Scel-238 se encontraron cinco alelos (203, 219, 229, 239 y 241). Para la población de Tilcuautla los dos alelos con mayor frecuencia fueron el 241 y 229, con valores de 0.207 y 0.152, respectivamente. Mientras que con valores de 0.076 y 0.07, los alelos con mayor frecuencia fueron el 239 y el 203, respectivamente, para La Estanzuela (Figura 15).

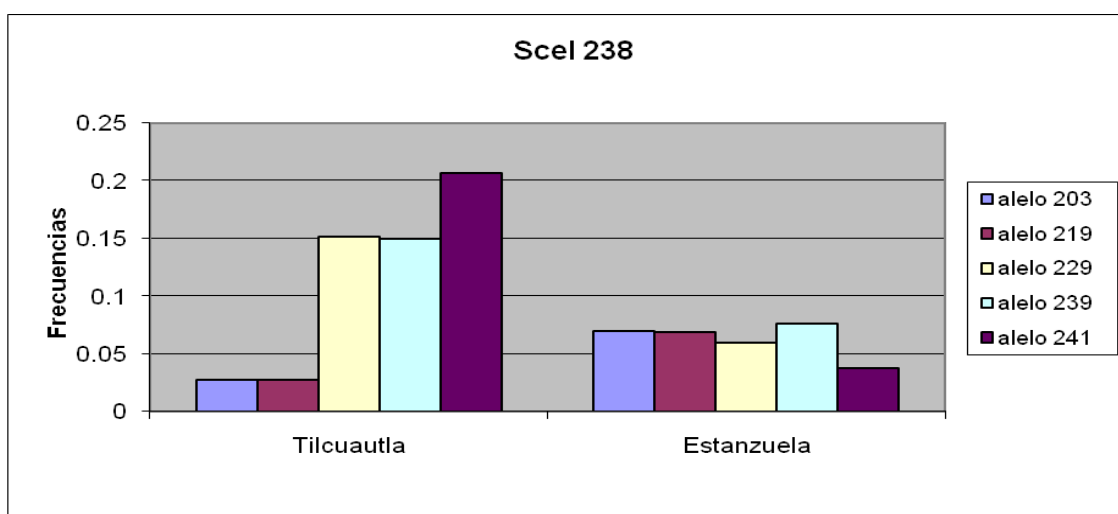


Figura 15. Frecuencias alélicas por población para el *locus* Scel-238, observando que el alelo 241 es el que presenta mayor frecuencia en la población de Tilcuautla, mientras que el alelo 239 es el más frecuente en la población de La Estanzuela.

En el caso del *locus* Scel-138 se encontraron un total de seis alelos (239, 241, 249, 259, 261 y 271) con los más altos valores de frecuencias alélicas. Para la población de Tilcuautla el alelo con mayor frecuencia fue el 259, con un valor de 0.141; el alelo con mayor frecuencia en La Estanzuela fue el alelo 249, con un valor de 0.553 (Figura 16).

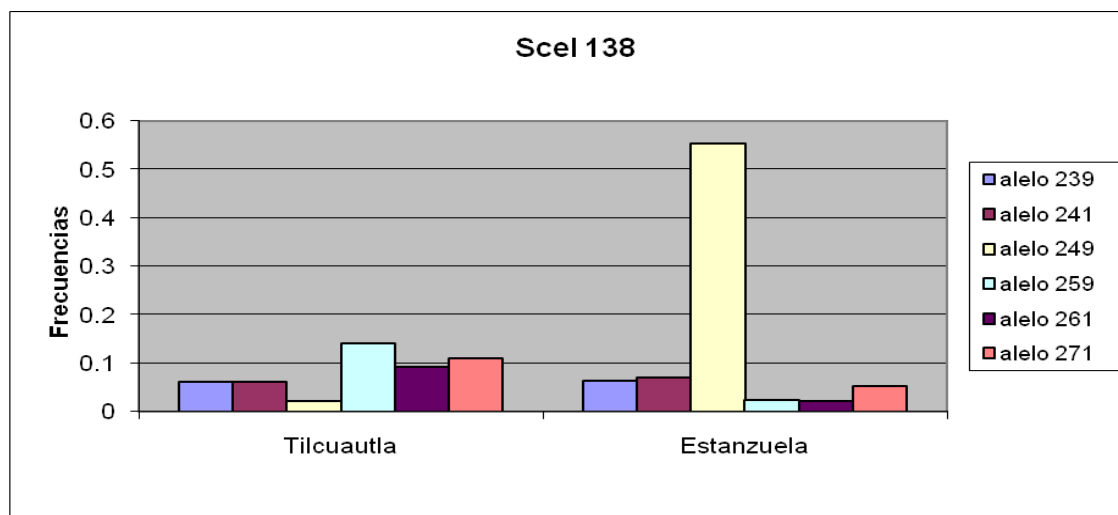


Figura 16. Descripción de las frecuencias alélicas para el *locus* Scel-138, indicando que el alelo 259 es el que presenta mayor frecuencia en la población de Tilcuautla, mientras que para La Estanzuela es el alelo 249.

Para el caso del *locus* Scel-571 fueron encontrados seis alelos (255, 257, 265, 271, 273 y 283). De estos, el que presenta mayor valor es el alelo 273, con una frecuencia de 0.138 en la población de Tilcuautla; para La Estanzuela el valor más alto, con una frecuencia de 0.31, lo presentó el alelo 271 (Figura 17).

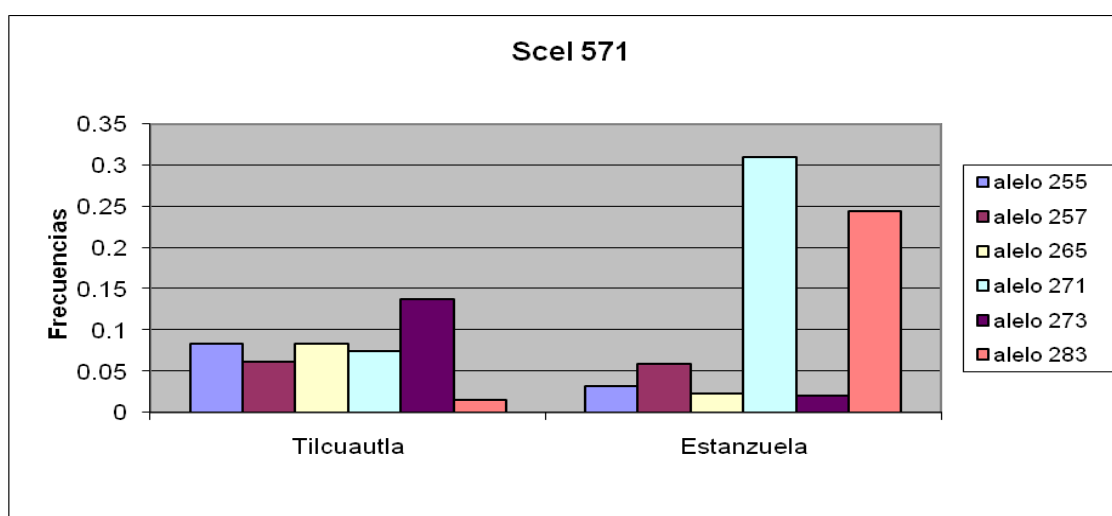
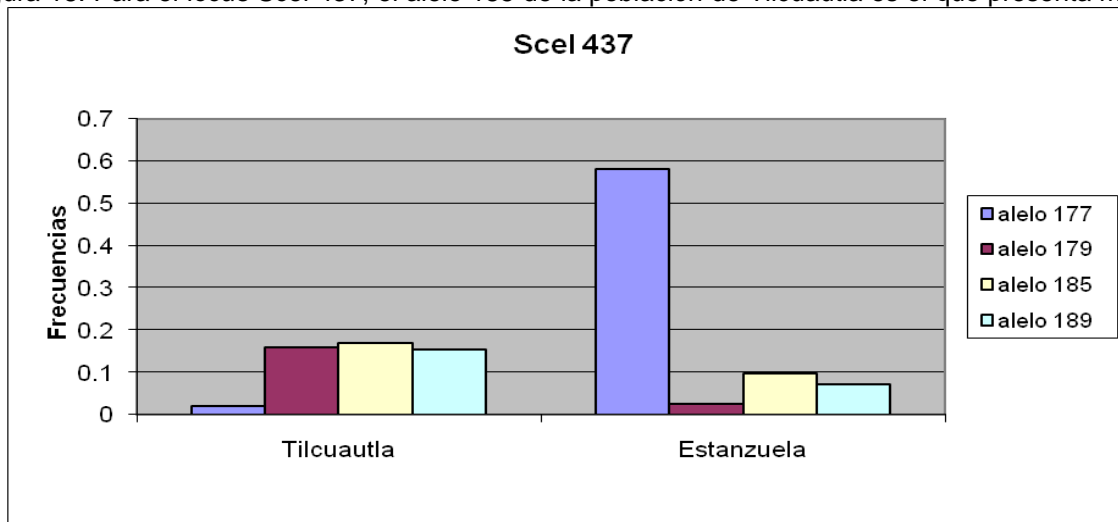


Figura 17. Frecuencias alélicas para el *locus* Scel-571, obteniendo que para la población de Tilcuautla el alelo 273 presenta mayor frecuencia. En lo que respecta a la Estanzuela el alelo con una frecuencia mayor es el 271.

Finalmente para el *locus* Scel-437 se identificaron cuatro alelos (177, 179, 185 y 189), siendo el 185 el más frecuente en la población de Tilcuautla, con un valor de 0.171; para el caso de La Estanzuela el alelo 177 es el que presentó mayor frecuencia, con un valor de 0.581 (Figura 18).

Figura 18. Para el *locus* Scel-437, el alelo 185 de la población de Tilcuautla es el que presenta mayor



frecuencia, mientras que el alelo 177 en La Estanzuela presenta mayor valor en cuanto a frecuencia alélica.

8. DISCUSIÓN

8.1. Técnica citológica estandarizada

La obtención de cariotipos se lleva a cabo a través de cualquier tejido cuyas células sean susceptibles de división (sangre periférica, médula ósea, piel, líquido amniótico, entre otros) cultivándolas y deteniendo la mitosis en la etapa de metafase (Ruiz y Hernando, 2005).

En este sentido, la obtención de cariotipos en animales, en la mayoría de los casos, implica el sacrificio de los individuos, por lo que es necesario desarrollar técnicas no invasivas que no impliquen el sacrificio de los organismos, estableciendo como base las características y condiciones de los métodos establecidos. Por lo anterior, es necesario desarrollar métodos más prácticos de obtención de los cromosomas en metafase, como herramienta para estudios genéticos en diversos grupos biológicos.

En estudios anteriores, para el diagnóstico de enfermedades hematológicas, las técnicas para la obtención de cariotipos a partir de la médula ósea o células periféricas de sangre en general, utilizan volúmenes considerables de estos tejidos

(Brigaudeau *et al.*, 1996). Se han reportado también métodos distintos a los utilizados en los mamíferos, en grupos como los reptiles, en el que se ha usado el cariotipo como una herramienta de clasificación sistemática para este grupo, donde se establecen diferencias en reptiles con respecto a los mamíferos, tales como: la presencia de eritrocitos nucleados, la temperatura corporal, la duración del ciclo celular y los periodos óptimos de incubación para la obtención de linfocitos (Rohilla *et al.*, 2005).

Una diferencia clave de la técnica estandarizada en este trabajo, con respecto de otras reportadas anteriormente, es que ésta no implica el sacrificio de los ejemplares; lo anterior debido a que las células (linfocitos) se obtuvieron a partir de unas gotas de sangre derivadas de un corte transversal de un centímetro en la cola de las lagartijas y no de médula ósea y gónadas, como se hace comúnmente en anfibios y reptiles (Piazze, 1995).

Es fundamental señalar que la pérdida de una porción de la cola no afecta a las temperaturas corporales ni a la precisión termorreguladora de las lagartijas adultos, posiblemente debido a que la regeneración de la cola se maximiza a una temperatura similar a la de otros procesos fisiológicos (Rueda, 1992).

Se ha reportado previamente la optimización de un cultivo *in vitro* de linfocitos de sangre periférica de dos tortugas de agua dulce, *Lissemys punctata* (Trionychidae) y *Geoclemys hamiltoni* (Batagurinae), donde se analizaron los diversos parámetros como las concentraciones, índice mitótico, volúmenes, tiempos de incubación, humedad, duración de arresto mitótico, entre otros. En el método en estas tortugas, se incubó la sangre durante 84 horas a una temperatura de 28° C y tomando en cuenta las 72 horas más en fijador, determinan que este sea un proceso tardado (Rohilla *et al.*, 2005).

Considerando lo anterior, las modificaciones que se realizaron en las concentraciones de las soluciones utilizadas con respecto a la técnica invasiva original para la obtención de cariotipos planteada por diversos autores (Baker *et al.*, 1982; Sites, 1983; Goyenechea, 2001; Kessler *et al.*, 2006; Gaffaroglu y Yuksel, 2006), funcionaron eficientemente en las lagartijas de *Sceloporus grammicus*, lo que permitió apreciar de manera óptima los cromosomas en metafase.

En el caso de la técnica donde se sacrifican los individuos para obtener las células de la médula ósea para el cariotipo, se utilizaba inyectar una solución de levadura-azúcar en una de las extremidades del organismo, la cual desencadenaría

una infección y por consiguiente una proliferación celular importante (específicamente de linfocitos). Este proceso tenía una duración de 72 horas, aproximadamente, con exposición del animal a una fuente de calor. En contraste, la técnica que se utilizó en este estudio no requirió de lo anterior, en su lugar se empleo la fitohemaglutinina como agente mitogénico, pues permite la transformación blástica de linfocitos; asimismo, aglutina las células (eritrocitos) a partir de una pequeña muestra de sangre (Cózar, 2007).

Esta fue una de las modificaciones más importantes, puesto que permitió la recolecta del tejido directamente en el campo, sin el sacrificio de las lagartijas. La inyección de levadura con azúcar no es un método eficiente, pues muchas de las veces ocasiona la muerte prematura de los individuos (por la infección), sin que se logre obtener el cariotipo correspondiente e implica necesariamente el transporte al laboratorio de los organismos recolectados (Chávez-Calzada, comunicación personal).

El porcentaje de concentración de colchicina utilizado en la técnica utilizada en este estudio, 0.025%, fue más bajo que la utilizada en algunos estudios anteriores, donde trabajaron una concentración de 0.05%, debido a que, como lo señalan Calvo *et al.* (2000), los cromosomas sólo son visibles durante la mitosis, además de que las células deben dividirse constantemente. Por otra parte, si la célula se toma de muestras de sangre (que no están dividiéndose), éstas se deben de tratar con bajas concentraciones de colchicina ya que no se requiere gran cantidad para detener o inhibir la división celular en metafase (Brigaudeau *et al.*, 1996).

El periodo de cultivo celular, es un punto clave en las técnicas empleadas para obtener los cromosomas en metafase, ya que se sabe que este parámetro (monitoreado a través de la morfología celular), se debe de vigilar para evitar la muerte celular en este periodo (Gaffaroglu y Yuksel, 2006); por lo anterior, en este estudio se verificó sistemáticamente el tiempo de cultivo, sometiendo las células a un máximo de 24 horas de tiempo de incubación a una temperatura de 26° C, con una buena recuperación de células en división. Teniendo un aproximado de cincuenta células por campo 10X, lo cual es un dato importante ya que permite tener más posibilidades de encontrar los cromosomas en metafase.

En este sentido, la cantidad de sangre utilizada en algunas técnicas para la obtención de cromosomas en metafase puede obtenerse en cantidades

considerables (hasta 10 ml), dependiendo del tamaño y peso del organismo del que se extraiga. Por ejemplo, para la tortuga de agua dulce *Lissemys punctata* se han obtenido hasta 5 ml de sangre retirada de la vena femoral, la cual se trata con heparina sódica y se almacena a 28° C (Rohilla *et al.*, 2005), mientras que la técnica propuesta en este trabajo indica que sólo se requiere de un ml de sangre aproximadamente, que se incuba con medio de cultivo modificado McCoy 5A y se almacena a 26°C. Esto es una ventaja significativa para la obtención del material citológico (linfocitos) con una muestra mínima de sangre.

A partir de esta técnica se puede conseguir una cantidad similar e importante de muestra, en cuanto a número de células, que la obtenida a partir de medula ósea (Aiache *et al.*, 2000); cabe mencionar que al medio de cultivo McCoy utilizado en este trabajo se le adicionó gentamicina, un antibiótico de amplio espectro que impide el crecimiento de bacterias y hongos en la sangre, acompañado por una proteína estabilizadora, que en este caso es la albúmina de suero bovino (BSA). Esto asegura que se obtengan preparaciones de buena calidad, con cromosomas visibles en metafase (Mella *et al.*, 2004).

El cariotipo obtenido como resultado en el presente estudio, demuestra que los individuos de las poblaciones que se encuentran en las localidades de Tilcuautla y La Estanzuela pertenecen al citotipo FM2 de *Sceloporus grammicus*, ya que mostraron la presencia de seis pares de macro cromosomas con sus respectivas fisiones (excepto en el par 4) y también la presencia de 11 pares de microcromosomas, indicados previamente para esta raza cromosómica (Sites, 1983).

Con base en todo lo anterior, se puede decir que con esta técnica se logró obtener los cariotipos de forma no invasiva, con un ahorro considerable de tiempo y recolectando las muestras de tejido *in situ*, que puede utilizarse en otros grupos biológicos de anfibios y reptiles, de tal manera que no represente un peligro para las poblaciones en cuanto a su disminución o provoque un impacto negativo a nivel fisiológico, ecológico y biológico en los individuos de la especie.

8.2. Diversidad genética

Ambas poblaciones en este estudio presentan niveles elevados de diversidad genética, lo que coincide con lo reportado anteriormente para especies con amplia distribución (Becerra y Paredes, 2000), como lo es *Sceloporus grammicus*. Dentro

de los estimadores sobresalientes se encuentran los niveles de heterocigosidad, lo que es importante para saber cuántos individuos heterocigotos observados son representantes de la combinación genética con mayor diversidad (heterocigotos observados).

El número de heterocigotos observados, corresponden al porcentaje de individuos heterocigotos en las muestras, mientras que los heterocigotos esperados se refieren a lo estimado por el equilibrio Hardy-Weinberg (heterocigosidad teórica; Aliaga, 2004). En este caso, los resultados son contrastantes para ambas poblaciones: mientras que en La Estanzuela hay un ligero exceso de heterocigotos, en Tilcuautla hay una deficiencia importante de ellos (de casi el 60% menos con respecto a lo esperado), lo que parece indicar un efecto importante de endogamia y, probablemente, la deriva genética como una fuerza predominante dentro de dicha población.

La endogamia provoca la pérdida de heterocigotos y, junto con la deriva y flujo genético restringido, promueve diferenciación aleatoria de las frecuencias alélicas dentro de las poblaciones (Pabijan y Babik, 2006).

La población de Tilcuautla, al parecer, es una población mucho más circunscrita que la de La Estanzuela, con un patrón de diferenciación genética restringido y la presencia de alelos exclusivos, lo que sugiere un modelo de diferenciación genética local; considerando que ambas poblaciones se encuentran en hábitats distintos y que en Tilcuautla existen alelos exclusivos, deficiencia de heterocigotos y niveles altos de endogamia, es posible que las diferencias genéticas encontradas se hayan establecido por deriva genética y se mantengan como tales por un efecto local del ambiente, como se ha reportado previamente para organismos de amplia distribución, que presentan alelos exclusivos en alguna de sus poblaciones (Delgado *et al.*, 2002).

En relación con los alelos exclusivos en la población de Tilcuautla, es importante mencionar que éstos se encuentran en baja frecuencia, es decir, ninguno de ellos se ha fijado significativamente dentro de la población, por lo que probablemente son evidencia de patrones de mutación-selección a escala local, como se ha documentado previamente para poblaciones muy restringidas geográficamente (Roda *et al.*, 1996).

Otra explicación posible para la existencia de alelos exclusivos en la población de Tilcuautla es el flujo genético moderado que, probablemente, se ha ido

restringiendo a través del tiempo, tal vez como un efecto de la fragmentación del hábitat original, por causas antropogénicas (Ochando *et al.*, 2004).

La riqueza alélica encontrada en ambas poblaciones es casi un 30% mayor en Tilcuautla, lo que sugiere, en complemento a los resultados anteriores, que la existencia de alelos exclusivos mantiene una mayor diversidad de alelos en esta población, aunque también niveles elevados de endogamia, lo que promueve efectos importantes de deriva genética, que se ha documentado como un efecto de disminución repentina del tamaño efectivo y/o fragmentación severa de las poblaciones originales (Roda *et al.*, 1996), lo que es muy factible, pues esta localidad se encuentra dentro de un área urbana, donde el cambio de uso de suelo ha sido radical en los últimos años.

En el caso de La Estanzuela, se observa una riqueza alélica moderada, aunque también hay evidencia de endogamia y alelos fijados, lo que sugiere que el flujo de genes, definido como el intercambio de genotipos (y sus respectivos alelos) con poblaciones cercanas, ha impedido una diferenciación genética significativa (Soto, 2003).

Se ha documentado que todas las poblaciones fluctúan de tamaño y, con frecuencia, de forma drástica (Galtier *et al.*, 2000). Es posible entonces que la población de Tilcuautla tenga un tamaño poblacional efectivo pequeño, que probablemente se deba a una situación geográfica restringida, que esté limitando el flujo genético al exterior con otras poblaciones, promoviendo de esta manera la endogamia que podría estar provocando, en consecuencia, el bajo nivel de heterocigotos observados. Lo anterior, contrasta con la población de La Estanzuela que aparentemente, presenta un tamaño poblacional más grande, probablemente permitiéndole el elevado nivel de heterocigotos observados, indicando que sus individuos están teniendo flujo genético con otras poblaciones y así disminuye la endogamia entre sus individuos (So *et al.*, 2006).

Los resultados presentados en este trabajo contrastan con los resultados de trabajos anteriores con *Bufo spinulosus* y *Salmo trutta* (Soto, 2003; Vera 2007), en los que sí se aprecia una diferenciación genética entre sus respectivas poblaciones, producto del aislamiento por distancia provocando la disminución del flujo genético. Sin embargo, para *S. grammicus* se ha reportado una influencia mucho más fina para los procesos de diferenciación (a nivel de microhábitat), además de patrones de

hibridación entre las razas cromosómicas, lo que también se ha reportado como condicionante de diferenciación genética a nivel local (Pabijan y Babik, 2006).

8.3. Estructura genética

Es importante mencionar que la estructura genética de las poblaciones está determinada por fuerzas evolutivas, como: la selección natural, la recombinación, el flujo genético, la deriva genética y la mutación. La estructura genética refleja el número de alelos intercambiados entre poblaciones, y este intercambio de genes homogeniza las frecuencias alélicas entre ellas, determinando los efectos relativos de la selección y de la deriva genética. El alto flujo de genes descarta una adaptación local y por lo tanto también impide los procesos de especiación (Balloux y Lugon, 2002).

Para este análisis, las dos poblaciones, del citotipo FM2 de *Sceloporus grammicus*, analizadas (Tilcuautla y La Estanzuela), presentaron una homología genética bastante elevada, considerando el valor obtenido para F_{ST} (0.0217), esto si se compara con el resultado de $F_{ST}= 0.73$ obtenido para *Colossoma macropomum* y *Piaractus brachypomus*, que indica que ambas especies están totalmente diferenciadas (Aliaga, 2004). Una diferenciación genética tan escasa es una evidencia secundaria de la gran plasticidad genética existente dentro de *S. grammicus*, así como de niveles importantes de flujo genético con poblaciones cercanas.

Para el caso de las poblaciones analizadas en este trabajo, no se encontró diferenciación genética importante, derivada de la estructura de heterocigotos dentro de las poblaciones (valor de F_{ST}); sin embargo, parámetros como los niveles de heterocigosidad, riqueza alélica, niveles de endogamia y patrones diferenciales de alelos (frecuencia y exclusividad de los mismos), sugieren que los patrones micro-evolutivos intrapoblacionales son distintos en cada una de ellas. Este comportamiento (diferenciación genética local para especies con amplia distribución), ya se ha documentado previamente para otras especies de animales (Hansen *et al.*, 2002).

En el caso de Tilcuautla y tomando en cuenta los datos de F_{IT} , la deriva genética es la fuerza evolutiva que probablemente esté condicionando la estructura genética en este grupo, debido a la evidencia de los alelos exclusivos, bajos niveles de heterocigosidad con respecto a la Estanzuela, pocos alelos fijados para los cinco

loci utilizados y un flujo genético moderado con respecto a la otra población (La Estanzuela).

En el caso de La Estanzuela, la estructura genética puede estar determinada más bien por un efecto local del ambiente, flujo genético importante a nivel local (con poblaciones simpátricas de otros o el mismo citotipo), mayor diversidad de genotipos (exceso de heterocigotos), alelos fijados y tamaños poblacionales más grandes, distribuidos en una zona más extensa también. En este sentido, se han reportado otros modelos en reptiles en donde existen poblaciones con niveles elevados de heterocigosidad, donde la estructura genética la determina el flujo genético y patrones de selección local, cuando los tamaños poblacionales son grandes, mientras que en las poblaciones más pequeñas, la fuerza que moldea la distribución de alelos y genotipos es la deriva genética (So *et al.*, 2006).

En este último caso las frecuencias génicas (alélicas) pueden cambiar por razones puramente aleatorias, debido a que cualquier población consta de un número finito de individuos y además de que ambas mantienen un flujo genético moderado mediante la migración (Moulin *et al.*, 1996), sin que éste sea suficiente para diluir las diferencias alélicas locales en ambas poblaciones, contribuyendo a una diferenciación genética progresiva entre poblaciones.

8.4. Dinámica del flujo genético

Desde una perspectiva genética, la migración implica no sólo el movimiento de individuos hacia poblaciones nuevas, sino la introducción de alelos nuevos en la población (flujo genético; González, 2001)

La diferenciación entre las poblaciones, es a menudo la consecuencia de una restricción en el flujo genético entre ellas, de manera que los diferentes grupos poblacionales se aíslan reproductivamente los unos de los otros, parcial o totalmente, permitiendo la acumulación por mutación, deriva genética o selección de las diferencias genéticas.

En este sentido, a través del tiempo las poblaciones aisladas pueden divergir entre ellas, perdiendo heterocigosidad; o sea, la variación que aparecía dentro de las poblaciones podría aparecer después entre poblaciones. En el caso del grupo biológico examinado en el presente estudio (*S. grammicus*), en ambas poblaciones analizadas se observa un efecto diferente del flujo genético: mientras que la población de Tilcuautila tiene flujo genético restringido, poca variabilidad y altos

niveles de endogamia, la población de La Estanzuela, por el contrario, presenta niveles elevados de heterocigosidad, flujo genético moderado (tal vez con otras poblaciones cercanas) y alelos fijados dentro de la población; aunque entre ambas poblaciones no se presenta una barrera geográfica importante, las fuerzas evolutivas dentro de cada una son distintas y condicionan frecuencias alélicas específicas para cada una.

La introducción de migrantes de una población a otra reduce la diferenciación genética y puede restaurar la pérdida de la diversidad genética (Frankham *et al.*, 2002), y por el valor de número de migrantes para cada población, se puede considerar que probablemente, existe un mayor flujo de genes en la población de La Estanzuela a nivel inter e intrapoblacional, además de la evidencia de alelos fijados, lo que podría sugerir un efecto de selección local a nivel de genotipos (Castric y Bernatchez, 2003).

En contraste, Tilcuautla probablemente no presenta un flujo genético interpoblacional, lo que promueve que la deriva genética tenga un efecto importante sobre la estructura de la misma. Esto explicaría que las frecuencias de alelos en Tilcuautla no estén fijas, por el contrario, se esperarían modificaciones en cada generación (Pabijan y Babik, 2006).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son las primeras aproximaciones de análisis de genética evolutiva en el complejo *Sceloporus grammicus*, donde se destaca el uso de marcadores moleculares altamente polimórficos, que permitieron evidenciar los patrones evolutivos existentes dentro y entre las dos poblaciones analizadas.

Asimismo, estos patrones evolutivos podrían indicar que, posiblemente, las diferentes razas cromosómicas del complejo *Sceloporus grammicus* comparten un camino evolutivo común a lo largo del tiempo y, que a pesar de que han estado en diferentes ambientes y sometidas a diversas condiciones, al parecer no existen barreras geográficas o biológicas lo suficientemente grandes para promover una divergencia genética definitiva, que podría convertirlas en especies separadas. Con lo anterior, se puede decir que, filogenéticamente, las siete razas cromosómicas de *Sceloporus grammicus* pertenecen a una misma especie, que presenta una variabilidad cromosómica y ecológica importante.

9. CONCLUSIONES

- Se estandarizó exitosamente la técnica no invasiva para obtener el cariotipo de *Sceloporus grammicus*, a partir de un cultivo de células sanguíneas con un volumen mínimo (hasta 50 µl/individuo). Este método optimiza la inducción mitogénica con fitohemaglutinina y disminuye el tiempo de incubación a 24 horas; así como las concentraciones de colchicina utilizadas para el arresto metafásico de los cromosomas.
- Ambas poblaciones analizadas presentaron patrones de diversidad y estructura genética específicos y diferentes entre sí, la población de La Estanzuela presenta mayores niveles de heterocigosidad, con niveles moderados de endogamia y riqueza alélica, con evidencia de alelos fijados; mientras que la población de Tilcuautla es genéticamente homogénea, con endogamia importante, presencia de alelos exclusivos y escasos alelos fijados.
- La estructura genética de las dos poblaciones analizadas es distinta para cada una. Existe poca diferenciación genética entre ambas poblaciones y flujo genético moderado que, junto con los datos de diversidad genética, sugieren que la fuerza evolutiva determinante en la población de Tilcuautla es la deriva genética, lo que mantiene una diferenciación mayor a nivel intrapoblacional con respecto a La Estanzuela. En esta última se encontraron evidencias de flujo genético mayor, sin alelos exclusivos y endogamia moderada, lo que sugiere que el flujo genético interpoblacional es la fuerza evolutiva que prevalece en esta población.

LITERATURA CITADA

- Agapow, P. M. (2004) "The Impact of Species Concepts on Biodiversity Studies". *The Quartely Review of Biology*. 79 (2), 162-179.
- Aiache, J.M.; Aiache, S; Beysac, E. y Cardot, J.M. (2000) "Técnicas no invasivas para el estudio de nuevas forma da administración de fármacos". *Ciencia e Investigación*. Departamento de Biofarmacia de la Facultad de Farmacia. 3 (1): 215-236.
- Aliaga, P.C. (2004) "Variabilidad genética de *Colossoma macropomum* y *Piaractus brachypomus* en la región del alto maderá (Amazonia boliviana) para el análisis del polimorfismo de la longitud de secuencias intrónicas (epic-pcr)". Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia. 103 p.
- Alvarado, D.L. (2004) "Los procesos evolutivos de la creatividad en las organizaciones". *Creatividad y Sociedad*, 5: 29-32.
- Arévalo, E.; Porter, C.; González, A.; Mendoza, F.; Camarillo, J. y Sites, W. (1991) "Population cytogenetics and evolution of the *Sceloporus grammicus* complex (Iguanidae) in Central Mexico". *Herpetological Monographs*, 5: 79-115.
- Arévalo, E.; Casa, G.; Davis, S.K.; Lara, G. y Sites J.W. (1993) "Parapatric hybridization between chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae): structure of the Ajusco transect". *Copria*. 2: 352-372.
- Baker, R.J.; Haiduk, M.W.; Robbins, L.W.; Cadena, A. y Koop, B.F. (1982) "Chromosomal studies of South American bats and their systematic implications". Pp.303-327. In: *Mammalian Biology of South America*. (Mares, M.A. and H.H. Genoways, eds.). Special Publication Series, Pymatuning Laboratory of Ecology, University of Pittsburgh, 6:1-539.
- Balloux, F. y Lugon, M.N. (2002) "The estimation of population differentiation with microsatellite markers". *Molecular Ecology*, 11: 155-165.

- Baum, D. (1992) "Phylogenetic species concepts". *Trends in Ecology and Evolution*, 7: 1-2.
- Becerra V.V. y Paredes C.M. (2000) "Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética". *Agricultura Técnica. Instituto de Investigaciones Agropecuarias*, 60 (3), 270-281.
- Behe, M.J. (1995) "An overabundance of long oligopurine tracts occurs in the genome of simple and complex eukaryotes". *Nucleic Acids Research*, 23: 689–695.
- Benbouza, H.; Jaquelim, J. M.; Baudoin, J. P. y Mergeai, G. (2006) "Optimization of a reliable, cheap and sensitive silver staining method to detected SSR markers in polyacrylamide gel". *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 10 (2) 77-81.
- Bickham, J. (1983) "Patterns and modes of chromosomal evolution in reptiles". Pp 13-40. In: (A. Sharma, y A. Sharma, Edits.) *Chromosomes in evolution of eukaryotic groups*. 2: 13-40.
- Brigaudeau, C.; Gachard, N.; Clay, D.; Fixe, P.; Rouzier, E. y Praloran, V. (1996) "A "miniaturized" method for the karyotypic analysis of bone marrow or blood samples in hematological malignancies". *Laboratoire d'Hématologie, CHRU de Limoges, Cédex, France*.
- Calvo, R.; Colvard, M. y Simpson, G. (2000) "Karyotype Analysis". *Cornell Institute for Biology Teachers. Cornell University. Ithaca, New York*.
- Campbell, N.A.; Mitchell, L.G. y Reece, J.B. (2001) "Biology: concepts and connections". 3rd ed. *Pearson Educación, México*.
- Casas-Andreu, G.; Valenzuela-López, G. y Ramírez-Bautista, A. (1991) "Cómo hacer una colección de anfibios y reptiles". *Publicaciones del Instituto de Biología, Cuaderno # 10, Universidad Nacional Autónoma de México*. 68 p.

- Castric, V. y Bernatchez, L. (2003) "The rise and fall of isolation by distance in the anadromous brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchill)". *Genetics*, 163: 983-99.
- Cózar, R.S. (2007) "Estudio de la función Inmunitaria en pacientes Esquizofrénicos y bipolares Tipo I". Tesis Doctoral. Departamento de Medicina. Universitat de Valencia. 200 pp.
- Degnan, P. y Arévalo, E. (2004) "Isolation of Microsatellite Loci un *Sceloporus grammicus* (Squamata, Phrynosomatidae)". *American Journal of Undergraduate Research*. University of Northern Iowa, 2 (4), 1-11.
- Delgado, P.; Cuenca, A.; Escalante, A.E. et al. (2002) "Estructura genética comparada en pinos: consecuencias evolutivas y para la conservación". *Revista Chilena de Historia Natural*, 75 (1): 27-37.
- Dyer, R.J. y Nason, J.D. (2004) "Population Graphs: the graph theoretic shape of genetic structure". *Molecular Ecology*. 13: 1713-1727.
- Edwards, A. et al. (1991) "Typing with Trimeric and Tetrameric Tandem Repeats: Polymorphic Loci, Detection Systems, and Population Genetics, DNA". The Second International Symposium on Human Identification, *Promega Corporation*, 31.
- Eriksson, G. (2000) "Genética evolutiva y conservación genética". *Department of Forest Genetics*, 2: 209-219.
- Ernst, J.; Branch, C.; Clark, M. y Hokit, D. (2004) "Polymorphic microsatellite markers for the Florida scrub (*Sceloporus woodi*)". *Molecular Ecology Notes*, 4: 364-365.
- Frankham, R.; Ballou, J. y Briscoe, D. (2002) "Introduction to Conservation Genetics". Cambridge University Press. 617 p.
- Gaffaroglu, M. y Yuksel, E. (2006) "Karyotype Analysis of Ground Squirrel (Mammalia: Rodentia) in Malatya (Turkiye)". *Journal of Biological Sciences*. 6 (4): 754-757.

- Galtier, N.; Depaulis, F. y Barton, N. (2000) "Detecting bottlenecks and selective sweeps from DNA sequence polymorphism". *Genetics*, 155: 981-987.
- González Martínez, S.C. (2001) "Estructura poblacional y flujo genético de *Pinus pinaster* Aiton en el noroeste de la Península Ibérica". Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica de Madrid. 178 p.
- Goudet, J. (2002) FSTAT, version 2.9.3.2: A program to estimate and test gene diversities and fixation indices. URL:<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.htm>
- Goyenechea, I. (1993) "Condición citogenética de *Sceloporus grammicus* (Sauria: Phrynosomatidae) en Santuario Mapethé, Estado de Hidalgo, México". Mexico, D.F. UNAM.
- Goyenechea, I.; Mendoza, F.; Flores, O. y Reed, K.H. (1996) "Extreme chromosomal polytypy in a population of *Sceloporus grammicus* (Sauria: Phrynosomatidae) at Santuario Mapethé, Hidalgo, México". *Journal of Herpetology* , 30 (1), 39-46.
- Goyenechea, I. (2001) Sistemática de reptiles y citogenética. *Boletín de la Sociedad Herpetológica Mexicana*. 9 (1): 13-21.
- Hall, W.P. (1973) "Comparative population cytogenetics, speciation and evolution of the iguanid lizards genus *Sceloporus*". Tesis doctoral, Harvard Univ., Cambridge, MASS. p 1-173.
- Hansen, M.M.; Ruzzante, D.E.; Nielsen, E.E.; Bekkevold, D. y Mensberg, K.L.D. (2002) "Admixture analysis and stocking impact assessment in brown trout (*Salmo trutta*), estimated with incomplete baseline data". *Canadian Journal Fisheries and Aquatic Sciences*, 58:1853-1860.
- Hartl, D.L. y Clark, A.G. (1997) "Principles of Population Genetics" (Tercera ed.). Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- Herrel, A.; Meyers, J.J. y VanHooydonck, B. (2001) "Correlations between habitat use and body shape in a Phrynosomatid lizard (*Urosaurus ornatus*): a

- population-level analysis". *Biological Journal of the Linnean Society*, 74: 305-314.
- Higuchi, R. (1989) "DNA from Biopses". *Amplifications*. 2:1-3
- Huxley, J. (1938) "Clines: an auxiliary taxonomic principle". *Nature*, 3587:219-220.
- Jimenez, P. y Collada, C. (2000) "Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación". Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales, *Fuera de Serie* (Chile) 2: 237-248.
- Kessler, M. *et al.* (2006) "Immunogenicity of biopharmaceuticals". *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21: 9-12.
- Klug, W.S. y Cumming M.R. (2003) "Conceptos de Genética". Madrid: Prentice Hall.
- Lara-Góngora, G. (2004) "A New Species of *Sceloporus* (Reptilia, Sauria: Phrynosomatidae) of the *grammicus* complex from Chihuahua and Sonora, Mexico". *Bulletin of the Maryland Herpetological Society*, 40:1-45.
- Lee, C.E. (2002) "Evolutionary genetics of invasive". *Trends in Ecology and Evolution*, 17 (8), 386-391.
- Leiberman y Jackson (1995) "Race and Three Models of Human Origins". *American Anthropologist*. 97(2), 231-242.
- Leyte-Manrique, A.; Hernández, S.U.; Chávez, C.E.; Sánchez, H.C.; Marshall, J. y Ramírez, B.A. (2005) "El complejo *Sceloporus grammicus*, un grupo de lagartijas en especiación". *Biol. Soc. Herpetol.* 14 (1), 18-24.
- Leyte-Manrique, A. (2006) "Ecología y morfología de *Sceloporus grammicus* en dos ambientes diferentes del Estado de Hidalgo, México". Tesis de maestría, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 77 p.
- Litt M. y Luty, J.A. (1989) "A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle gene". *American Journal of Human Genetics*, 44: 397-401.

- Love, A. (2003) "Evolutionary Morphology, Innovation, and the Synthesis of Evolutionary and Developmental Biology". *Biology and Philosophy*, 18 (2): 309-345.
- Marshall, J.C., Arévalo, E., Benavides, E., Sites, J. y Sites, J.W. Jr. (2006) "Delimiting species: comparing methods for Mendelian characters using lizards of the *Sceloporus grammicus* (Squamata: Phrynosomatidae) complex". *Evolution*, 60: 1050–1065.
- Mella, M.; Sepulveda, S.A.; González, M.R. et al. (2004) "Aminoglucósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia". *Revista chilena de Infectología*, 21 (4): 330-338.
- Miller, M.P. (1997) TFGPA, versión 1.3: Tools for population genetics analyses. A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. URL: <http://bioweb.usu.edu/mpmbio/index.htm>.
- Moritz, C. (1999) "Conservation units and translocations: strategies for conserving evolutionary processes". *Hereditas*, 130: 217-228.
- Moulin, N.L.; Wyttenbach, A.; Brunner, H.; Goudet, J. y Hausser, J. (1996) "Study of gene flow through a hybrid zone in the common shrew (*Sorex araneus*) using microsatellites". *Hereditas*, 125: 159-168.
- Nosil, P.; Vines, T.H. y Funk, D.J. (2005) "Reproductive isolation caused by natural selection against immigrants from divergent habitats". *International Journal of Organic Evolution*. 59 (4), 705-719.
- Ochando, D.M.; Callejas, C.; Fernández, H.O. y Reyes, A. (2004) "Variabilidad genética aloenzimática en *Dacus oleae* (Gmelin). (Diptera: Tephritidae). I. Análisis de dos poblaciones naturales del Sureste Español". *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 20: 35-44.
- Olson, D. M.; Dinerstein, E.; Wikramanayake, E. D.; Burgess, N. D.; Powell, G. V. N.; Underwood, E. C.; D'amico, J. A.; Itoua, I.; Strand, H. E.; Morrison, J. C.; Loucks, C. J.; Allnutt, T. F.; Ricketts, T. H.; Kura, Y.; Lamoreux, J. F.;

- Wettengel, W. W.; Hedao, P. y Kassem, K. R. (2001) A new global map of terrestrial ecoregions provides an innovative tool for conserving biodiversity. *Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth. BioScience*. 51 (11): 933-938.
- Pabijan, M. y Babik, W. (2006) "Genetic structure in Northeastern populations of the Alpine newt (*Triturus alpestris*): evidence for post-Pleistocene differentiation". *Molecular Ecology*, 15: 2397-2407.
- Peterson, A.T.; Flores-Villela, O.A.; León-Paniagua, L.S.; Llorente-Bousquets, J.E.; Luis-Martínez, M.A.; Navarro-Singüenza, A.G.; Torres-Chávez, M.G. y Vargas-Fernández, I. (1993) Conservation priorities in Mexico: moving up in the world. *Biodiversity Letters* 1: 33-38.
- Piazze, R.M.E. (1995) "Cariotipo y patrones de banda C en *Bufo spinulosus arequipensis* (Amphibia: anura)". *Revista Ecológica Latin Americana*, 2 (1-3), 05-11.
- Porter, C.A. y Sites, J.W. (1986) "Evolution of *Sceloporus grammicus* complex (Sauria: Iguanidae) in Central Mexico: Population cytogenetics". *Systematic Zoology*, 35 (3): 334-358.
- Prevosti, A. (1979) "Polimorfismo cromosómico y evolución". En *Evolución*. Libros de Investigación y Ciencia. Editorial Labor S.A. Barcelona: 85-100.
- Reed, K.M.; Greembaun, I.F. y Sites, J.W. (1995) "Cytogenetic analysis of chromosomal intermediates from a hybrid zone between two chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Sauria, Phrynosomatidae)". *Evolution*, 49 (1): 37-47.
- Roda, P.; Callejas, C.; Reyes, A. y Ochando, M. D. (1996) "Caracterización genética en *Ceratitis capitata* Wied. asociada a fruto hospedador. I. Análisis isoenzimático". *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 22: 71-78.

- Rohilla, M.S.; Rao, R.J. y Tiwari, P.K. (2005) "Use of peripheral blood lymphocyte culture in the karyological analysis of Indian freshwater turtles, *Lissemys punctata* and *Geoclemys hamiltoni*". *Current Science*, 90: 1130–1134.
- Rubio de Casas, R. (2006) "Microevolución de esclerófilas mediterráneas: diferenciación fenotípica y genética en *Quercus coccifera* L. y *Olea europea* L.". Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. 289 p.
- Rubio Pérez, I.V. (2002) "Análisis comparativo de caracteres de historias de vida en lagartijas del género *Sceloporus*, grupo *Torquatus*: una propuesta filogenética". *Boletín de la Sociedad Herpetológica Mexicana*. 10 (2): 57-58.
- Rubio-Pérez, I. (2005) "Análisis comparativo de la morfología, historia de vida y uso del hábitat de distintas poblaciones del complejo *Sceloporus grammicus*: Un enfoque filogenético". Tesis de Maestría. Instituto de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. 58 p.
- Rueda, J.M. (1992) "Consecuencias ecológicas de la pérdida de la cola en la lagartija serrana (*Lacerta monticola*)". Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid.
- Ruiz, G. J. y Hernando, A. (2005) "Caracterización cromosómica de *Anops kingi* (Squamata: Amphisbaenia)". Laboratorio de Herpetología, Dpto. de Biología. Fac. de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina. 10 p.
- Rundle, H.D. y Nosil, P. (2005) "Ecological speciation". *Ecology Letters*, 8: 336–352.
- Salomon, M. (2002) "A revised cline theory that can be used for quantified analyses of evolutionary processes without parapatric speciation". *Journal of Biogeography*, 29: 509-517.
- Schlotterer, C. (2004) "The evolution of molecular markers – just a matter of fashion?". *Nature Reviews Genetics*, 5: 63–69.
- Siegel, H.S. (1995) "Stress, strains and resistance". *British Poultry Science*, 36: 3-9.

- Sites, J.W., Jr. (1982) "Morphological variation within and among three chromosome races of *Sceloporus grammicus* (Sauria: Iguanidae) in the North-central part of its range". *Copeia*, 4: 920-941.
- Sites, J.W. (1983) "Chromosome evolution in the iguanid lizard *Sceloporus grammicus*". Chromosome polymorphisms. *Evolution*, 37 (1), 38-53.
- Sites, J.W. Jr.; Camarillo, J.L.; González, A.; Mendoza, F.; Javier, L.; Mancilla, M. y Lara-Gongóra G. (1988b) "Allozyme variation and genetic divergence within and between three cytotypes of the *Sceloporus grammicus* complex (Sauria:Iguanidae) in central Mexico". *Herpetologica*, 44: 297-307.
- Sites, J.W. Jr. y S. K. Davis. (1989) "Phylogenetic relationships y molecular variability within and among six chromosome races of *Sceloporus grammicus* complex (Sauria: Iguanidae) based on nuclear and mitochondrial markers". *Evolution*, 43: 296-317.
- Sites, J.W.; Cole, C. y Flores, V.O. (1992) "A review of phylogenetic hypotheses for lizards of the genus *Sceloporus* (Phrynosomatidae): Implications for Ecological and Evolutionary Studies". *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 213: 1-110.
- So, N.; Maes, G.E. y Volckaert, F.A.M. (2006) "High genetic diversity in cryptic populations of the migratory sutchi catfish *Pangasianodon hypophthalmus* in the Mekong River". *Heredity*, 96: 166–174.
- Soto, M.R. (2003) "Variación morfológica, variación genética y estructura poblacional en poblaciones alopátricas de *Bufo spinulosus* (Anura:bufonidae) en Chile". Tesis de maestría en Ciencias Biológicas con mención en Zoología. Universidad de Chile, 94p.
- Stanfield, W.D. (1992) "Genética" (Tercera ed.) Mc Graw Hill. Madrid.
- Tautz, D. (1989) "Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers". *Nucleic Acids Research*, 17: 6463-6471.

- Uribe-Peña, Z.; Ramírez B.A. y Casas, A. (1999) "Anfibios y reptiles de las serranías del Distrito Federal, México". Cuadernos 32, Instituto de Biología, UNAM. 119 pp.
- Valle, G. (1993) "TA-repeat microsatellites are closely associated with ARS consensus sequences in yeast chromosome III". *Yeast*, 9: 753-759.
- Van Valen, L. (1976) "Ecological species, multispecies, and oaks". *Taxon*, 25: 233-239.
- Via, S. y Lande, R. (1985) "Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity". *Evolution*, 39: 505-522.
- Vera, R.M. (2007) "Estudios de las variaciones espaciales y temporales de la diversidad genética de la trucha común, *Salmo trutta*, en ríos de la Península Ibérica". Tesis doctoral, Universitat de Girona, 210 p.
- Vicente, M.C. y Fulton, T. (2004) "Tecnologías de Marcadores Moleculares para Estudios de Diversidad Genética de Plantas: Módulo de Aprendizaje". Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos (IPGRI) e Institute for Genomic Diversity, Cornell University. Roma, Italia.
- Weber, J.L y May, P.E. (1989) "Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction". *The American Journal of Human Genetics*, 44: 388-396.
- Whitlock, M.C. y McCauley, D.E. (1999) "Indirect measures of gene flow and migration: F_{ST} not equal to $1/(4Nm + 1)$ ". *Heredity*, 82: 117-25.
- White, M.I.D. (1978) "Chain process in chromosomal speciation". *Systematic Zoology*, 27: 285-298.
- White, M.J.D. (1978) "Models of speciation". W.H. Freeman. San Francisco, p. 284.
- Wright, S. (1951) "The genetical structure of populations". *Annals of Eugenics*, 15: 323-354.

- Yáñez-Amayo, V.O. (2002) “Aislamiento y caracterización de marcadores moleculares microsatélites a partir de la construcción de librerías genómicas enriquecidas de camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). Tesis (Biólogo)--Mención: Genética”. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas. E.A.P. de Ciencias Biológicas. Lima, Perú. 101 pp.
- Yeh, F.; Yang, R. y Boyle, T. (1999) POPGENE, version 1.31: Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis. URL:<http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm>.
- Zamudio, K.M. y Wieczorek, A.M. (2000) “Microsatellites for studies in ecology, behaviour and evolution in Yallows spiny lizard (*Sceloporus jarrovi*)”. *Molecular Ecology*, 9: 1667-1669.

APÉNDICE A

PRODUCTOS QUÍMICOS Y CONCENTRACIONES DE LAS SOLUCIONES EN LA TÉCNICA ESTANDARIZADA PARA LA OBTENCIÓN DE CARIOTIPOS

- Medio de cultivo modificado McCoy 5A: Cada 1000 ml de medio de McCoy fue enriquecida con un 5% de albúmina sérica bovina (BSA), el 1% de Fitohemaglutinina (PHA) y Gentamicina (50 mg / ml). El medio enriquecido fue esterilizado por filtración (0.2 μ m) y almacenado a 4 ° C.
- Solución de Colchicina: 0.1 g de colchicina se rehidrata con 10 ml de agua destilada estéril desionizada. Después de haber sido esterilizada por filtración a 0.2 μ m, se almacena a 4 ° C durante un máximo de 6 meses. Esta solución sirve para detener la mitosis, inhibe la formación del huso acromático dejando a los cromosomas en metafase.
- Solución hipotónica: 0.56 g KCl se disolvió con 100 ml de agua destilada estéril desionizada. Se almacenó a 4 ° C durante un máximo de un mes. Es importante precalentarla a 37 ° C una hora antes de usarla. La función de esta solución es la de hinchar las células, para que puedan reventarse posteriormente con un choque térmico, al contacto con los portaobjetos fríos y dejar expuestos los cromosomas en metafase.
- Solución fijadora: 75 ml de metanol (previamente enfriado a 4 ° C) se mezcló con 25 ml de ácido acético glacial. Esta solución debe de ser utilizada recién preparada, ya que es altamente higroscópica y el pH puede ser modificado de manera significativa después de algunas horas. Su función es reventar las células.

APÉNDICE B

SECUENCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Locus	Secuencia del primer (5'-30')	Motivo repetido	Tamaño de fragmento (pb)	T _a (C°)	(MgCl ₂)
Scel 138	F-TAGAAGAGCCCAGTAGGGCA R-TCAGGGCTTAATTCAATGGG	(AAT) ₉	247-255	59	1.5
Scel 238	F-GGGTTATGCATTTGTAACCACC R- GACACCGGGCAGATTCATTTT	(TG) ₂₀	226-250	61	2.5
Scel 437	F- CCCGTGGTATATGTATGCCATTG R- GTTGCTGCTGTTATTTCTATCCC	(TG) ₁₄	284-310	53	1.5
Scel 571	F-CAGAAACACTTCCCAACTGC R- GAGATTCAGGCCATAGGTGC	(TC) ₁₃	258-282	59	2.0
Scel 114	F- TTCCTTGTCTTTGCATTCCC R- CTTTATGGCAGTTTGCCTCA	(GT) ₅	209-257	47	1.5

Reactivos	Para una reacción
dH ₂ O	8.9
dNTP's (25Mm)	3
Master stock	5.1
Primer	2.5
Primer	2.5
Taq DNA polimerasa	1
DNA	3
TOTAL	25

CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

	Scel 138		Scel 238		Scel 437		Scel 571		Scel 114	
Periodos	Tiempo (seg)	Temp (°C)	Tiempo (seg)	Temp (°C)	Tiempo (seg)	Temp (°C)	Tiempo (seg)	Temp (°C)	Tiempo (seg)	Temp (°C)
Desnaturalización Inicial	5:00	95	5:00	95	5:00	95	5:00	95	5:00	95
35 ciclos										
Desnaturalización	0:30	95	0:30	95	0:30	95	0:30	95	0:30	95
Alineamiento	0:35	61	0:35	61	0:35	60	0:35	59	0:35	49
Extensión	0:45	72	0:45	72	0:45	72	0:45	72	0:45	72
Extensión final	30:00	72	30:00	72	30:00	72	30:00	72	30:00	72

APÉNDICE C

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA MEDIANTE LA TÉCNICA DE SOLVENTES ORGÁNICOS

La extracción del DNA se llevó a cabo mediante la técnica Higuchi (1989) con modificaciones, que se basa en solventes orgánicos y que consiste en:

1. Realizar un corte de 0.5 cm. de la cola de la lagartija y se coloca en el mortero que contiene 0.5ml (250 μ l) del buffer de digestión (50mM Tris-HCl+100mM EDTA+100mM NaCl+1% SDS) con 15 μ l de Proteinasa K y 20 μ l de RNAasa, esto por cada muestra.
2. Macerar perfectamente, recuperando la suspensión tisular en un tubo de 1.5 ml limpio y se incuba a 55°C durante una hora, mezclándolo repetidamente durante este tiempo.
3. Adicionar 0.7 ml (700 μ l) de fenol/cloroformo/alcohol isoamilico (25:24:1), mezclándolo vigorosamente y centrifugándolo a 14,000 rpm durante 5 minutos.
4. Repetir el proceso de extracción con solventes si la muestra está muy sucia; ya que está limpia se toman 0.5 ml de la fase superior y se transfieren a otro tubo, adicionando un ml de etanol al 100%; dejar por un par de minutos a temperatura ambiente.
5. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 minutos y decantar cuidadosamente todo el sobrenadante, adicionar 0.7-1 ml de etanol al 70%, mezclando por inversión (sin vortex).
6. Centrifugar nuevamente por 5 minutos a 14,000 rpm y retirar el sobrenadante.
7. Secar en la campana de flujo (área estéril), escurriendo sobre una toallita esto para asegurarse que no queden restos de etanol.
8. Verificar que el botón de DNA esté totalmente seco, adicionar 50 μ l de dH₂O y disolver 24 horas en refrigeración.

APÉNDICE D

PROTOCOLO DE LA TÉCNICA DE TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA

Para la visualización de las bandas de los alelos obtenidos mediante la técnica de PCR y detectados mediante la técnica de electroforesis vertical de poliacrilamida al 7.0%, se utilizó la siguiente técnica:

1. Colocar el gel en solución fijadora (Ácido acético al 7.5%) e incubar durante 20 minutos,
2. Lavar el gel dos veces con agua destilada por un periodo de 2 minutos (cada enjuague).
3. Teñir el gel con la solución de tinción (1.5 g/L de nitrato de plata, 0.056% de formaldehído) durante 30 minutos.
4. Traspasar a la solución reveladora fría (30 g/L de hidróxido de sodio, 0.056% de formaldehído, 400 µg/L de tiosulfato de sodio), previamente preparada con 30 g de hidróxido de sodio más un ml de formaldehído al 100% y 400 microlitros de Tiosulfato de sodio al 1% aforado en un litro de agua destilada, revelar durante 10 minutos,
5. Sumergir nuevamente durante 5 minutos en la solución fijadora (ácido acético al 7.5%), la cual detiene la reacción de revelado.
6. Calcular el peso molecular de los alelos tomando como referencia el marcador de 100 pb DNA, siendo así la forma en que se identificaron los alelos para cada microsatélite utilizado.