



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**ESTRUCTURA GÉNÉTICA DE *Ambystoma velasci* (Dugés,
1888) EN TRES LOCALIDADES DEL ESTADO DE HIDALGO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

MARÍA DEL CARMEN GARCÍA CHÁVEZ

DIRECTORA: DRA. MARÍA DEL CARMEN SÁNCHEZ HERNÁNDEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA
COORDINACIÓN DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGIA

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE CONTROL ESCOLAR, UAEH

P R E S E N T E

Por este conducto le comunico que el Jurado asignado la pasante de Licenciatura en Biología **María del Carmen García Chávez** quien presenta el trabajo recepcional de tesis titulado "**Estructura genética de *Ambystoma velasci* (Dugés, 1888) en tres localidades del Estado de Hidalgo**", después de revisarlo en reunión de sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE: **M. en C. Jesús Martín Castillo Cerón**
PRIMER VOCAL: **Dra. María del Carmen Sánchez Hernández**
SEGUNDO VOCAL: **Dr. Aurelio Ramírez Bautista**
TERCER VOCAL: **Dr. Ignacio Esteban Castellanos Sturemark**
SECRETARIO: **Dra. Irene Goyenechea Mayer-Goyenechea**
PRIMER SUPLENTE: **Dra. Iriana Leticia Zuria Jordan**
SEGUNDO SUPLENTE: **Biol. Ulises Iturbe Acosta**

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

A T E N T A M E N T E
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"
Mineral de la Reforma, Hidalgo a 19 de noviembre de 2008

Biol. Ulises Iturbe Acosta
Coordinador Adjunto de la Licenciatura en Biología



DEDICATORIA

A mis padres **Rubén García Ortiz** y **Ana Chávez Martínez**.

“Nadie pone sus sueños en manos de aquellos que pueden destruirlos”

Gracias por su amor incondicional, apoyo y comprensión, por estar a mi lado siempre. Por haberme formado, por enseñarme a hacer bien las cosas y nunca conformarme con nada. Por apoyarme en todas mis decisiones y ayudarme a alcanzar y cumplir cada uno de mis objetivos.

Los amo, mil gracias.

AGRADECIMIENTOS

A Cristian Aguilar-Miguel (Kris o Dr.....) por su amor, apoyo y comprensión en todo momento, gracias por estar a mi lado. Por enseñarme que cada día es distinto y hay cosas nuevas por descubrir e ideas nuevas que tomar para poder evolucionar.

A mi hermanito Jesús y a mis sobrinos: Gerald y Josafath, solecitos que irradian día a día luz y calor por donde pasan, y un ejemplo para aquellos que no piensan más allá de sus horizontes.

A mis hermanas, Maricruz y Brenda Araceli (Pibi), por estar siempre a mi lado, por quererme tal y como soy, por confiar en mi, las quiero. A Marielita que también es como mi hermana. Y a Diego Josefad, por que ya formas parte de la familia.

A mis tías Yolanda y Ángeles, por su apoyo incondicional y por todos sus consejos, que me hacen mejorara día a día.

A la familia Aguilar Miguel, por apoyarme en todo momento y por que siempre me hacen sentir como en casa, gracias.

Quisiera también expresar mi deuda y mi gratitud a los muchos Investigadores y amigos que me han ayudado con comentarios, observaciones, discusiones y de muchas otras maneras. Sus contribuciones han variado. En algunos casos, han sido de ayuda directa en relación con un punto concreto del presente trabajo, pero, en otros, han ejercido su estímulo de un modo más indirecto, a menudo a lo largo de un periodo de varios años, influyendo sobre mi pensamiento general y ayudándome a clasificar mis ideas. Resulta imposible citarlos a todos ellos, pero cabe destacar particularmente los siguientes:

A los miembros del jurado por sus sugerencias y observaciones que ayudaron a mejorar este trabajo:

Dra. María del Carmen Sánchez Hernández, por haberme aceptado a formar parte de su equipo de trabajo, por su apoyo en el campo y por su enorme paciencia.

M. en C. Jesús Martín Castillo Cerón, por la revisión de la tesis, por tu infinita paciencia y disposición para ayudarme en la identificación de los bichos, por tu apoyo (sobre todo durante los últimos meses de locura extrema).

Dra. Irene Goyenechea Mayer-Goyenechea, por los comentarios y sugerencias que ayudaron sin duda a mejorar este trabajo, por su disposición y ayuda en todo momento (gracias por todo).

Dr. Aurelio Ramírez Bautista, por la revisión de la tesis, por la ayuda en la identificación de la especie (*Ambystoma velasci*), por la asesoría para poder identificar los estadios larvarios y por el préstamo de literatura (que ayudaron sin duda a mejorar este trabajo).

Biol. Ulises Iturbe Acosta, por sus comentarios que ayudaron a mejorar este trabajo y por su disposición en todo momento, que ayudaron a agilizar todo este proceso de trámites burocráticos.

Dr. Ignacio Esteban Castellanos Sturemark, por sus comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorar este trabajo.

Dra. Iriana Leticia Zuria Jordan, por la revisión del presente trabajo y por sus comentarios en la estructuración de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio: Diana, Ernesto, Jaqueline, Antonio, Lupita, Héctor, Chepis por su ayuda y compañía en el laboratorio de Genética.

Un agradecimiento muy especial a Elizabeth y Sergio, por su ayuda con los mapas, a Julian Bueno, por su ayuda en la búsqueda de la nueva nomenclatura para los anfibios y su asesoría para fijar bien a los bichos.

Y también a mis amigos de generación: Ana Laura y Nallely (gracias por escucharme), a Mario (por apoyarme en todo momento y escuchar mis loqueras, de verdad lo aprecio), a Héctor, Arturo Palma, Erika, Mariana, Yadira, Vero y Edel, con quienes compartí muchos momentos inolvidables que forman parte de mi vida.

Al apoyo financiero otorgado al proyecto (B13), titulado "*Estructura genética de anfibios en cuencas hídricas residuales de la meseta central de México*", financiado por el Programa Académico de Investigación (PAI-2006) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH).

CONTENIDO

I. LISTA DE CUADROS	III
II. LISTA DE FIGURAS	IV
III. ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	4
La declinación de los anfibios.....	4
El caso de la Cuenca de México.....	5
El género <i>Ambystoma</i>	5
<i>Ambystoma velasci</i> (Dugés, 1888).....	6
Hábitat y distribución.....	8
Descripción.....	9
El uso de los marcadores moleculares en genética evolutiva.....	11
Los microsatélites como marcadores altamente polimórficos.....	12
Uso de los marcadores moleculares en anfibios.....	15
JUSTIFICACIÓN	16
OBJETIVOS	17
Objetivo general.....	17
Objetivos particulares.....	17
HIPÓTESIS	18
MÉTODOS	18
Área de estudio.....	18
Laguna de Tecocomulco.....	19
El parque nacional El Chico (El Oyamel y El Valle).....	21
Trabajo de campo.....	22
Trabajo de laboratorio.....	24
Análisis morfológico.....	24
Análisis genético.....	27

Obtención de tejido.....	27
Extracción de DNA.....	27
Amplificación de secuencias de microsatélites.....	28
Separación y revelado de los microsatélites	29
Análisis de diversidad y estructura genética.....	29
RESULTADOS	31
Análisis morfológicos.....	31
Análisis genéticos.....	39
Diversidad genética.....	39
Estructura genética.....	42
Dinámica de flujo génico.....	48
Relaciones alélicas ancestrales y actuales.....	51
DISCUSIÓN	56
Variación morfológica.....	56
Diversidad genética.....	60
Estructura genética.....	62
Dinámica de flujo génico.....	64
Relaciones alélicas ancestrales y actuales.....	66
CONCLUSIONES	67
LITERATURA CITADA	68
ANEXOS	79

I. LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. Marcadores previamente seleccionados de *Ambystoma tigrinum* y *A. maculatum*, remarcándose con negrita los cuatro marcadores que amplificaron para la especie *Ambystoma velasci*. 28
- Cuadro 2. Matriz de correlación de los 16 caracteres morfológicos que se midieron para 56 individuos de *Ambystoma velasci* en las tres localidades (Laguna de Tecocomulco, El Oyamel y El Valle). *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$; ****= $p < 0.0001$, ns= no significativo. 32
- Cuadro 3. Análisis discriminante entre localidades, en este cuadro se muestra con negritas los caracteres que obtuvieron los valores más altos y que apoyan al primer eje de ordenación. El valor relativo dentro de cada FD indica las variables que son más importantes para la exclusión entre localidades. 34
- Cuadro 4. Análisis de componentes principales. El coeficiente de variación, está dado por la desviación estándar ($DS/mediana \cdot 100$). Con negrita se indican que Ltib. y AnDv son los coeficientes de variación que obtuvieron los valores más altos y las variables significativas asociadas a los componentes principales uno y dos (CP1: LT y LC; CP2: LHC, LCr, AnCr, AnCb, AnCm y AnCt) 36
- Cuadro 5. Análisis de la Varianza Anidada (ANDEVA). Para este análisis se tomaron dos de los 10 componentes principales CP1 y CP2. Se anidaron los individuos tomados como un factor al azar, dentro de las localidades, como un factor fijo. .. 37
- Cuadro 6. Frecuencias alélicas por locus y entre localidades. Para cada locus se muestran las frecuencias obtenidas por muestra. Tecocomulco se muestra como Loc_1, El Oyamel como Loc_2 y El Valle como Loc_3. Los asteriscos indican que no se encuentran esos alelos..... 38
- Cuadro 7. Diversidad genética por locus y localidad. 39
- Cuadro 8. Riqueza alélica por locus y localidad. 39
- Cuadro 9. Sumario de heterocigosidad de Nei; para cada locus se indica; heterocigotos observados (H_o), heterocigotos esperados (H_e), heterocigosidad (H_t) y porcentaje de polimorfismo (%P). 40
- Cuadro 10. Análisis de grupos para las localidades de *Ambystoma velasci*. Para cada comparación se muestra la riqueza alélica, los heterocigotos observados (H_o) y los heterocigotos esperados (H_e). 40
- Cuadro 11. Diferencias genéticas entre individuos de la especie *Ambystoma velasci* (F_{IS} = nivel de endogamia) por locus y por localidad. El valor remarcado representa el promedio de F_{IS} para el total de las muestras analizadas. 41

Cuadro 12. Diferencias entre individuos con respecto a su especie (F_{IT}). El valor remarcado representa el promedio para el total de las muestras analizadas.	41
Cuadro 13. Diferencias genéticas entre localidades de la especie <i>Ambystoma velasci</i> (F_{ST}). El valor remarcado representa el promedio de F_{ST} para el total de las muestras analizadas.	42
Cuadro 14. Estadísticos “F” de Wright en la cual se indican los valores promedio obtenidos para los tres indicadores.....	42
Cuadro 15. Comparación de distancias genéticas de Nei (1972) entre localidades de la especie <i>Ambystoma velasci</i> . Sobre la diagonal se muestra la identidad genética y bajo la diagonal la distancia genética.....	43
Cuadro 16. Matriz de Flujo génico entre pares de muestras para las poblaciones de la especie de <i>Ambystoma velasci</i> ($M=2Nm$). Se muestran remarcadas las poblaciones con menor flujo génico.	44
Cuadro 17. Componentes de la varianza molecular calculado a partir del método de diferencias alélicas (F_{ST}) entre y dentro de las tres muestras de estudio.....	45
Cuadro 18. Componentes de la varianza molecular calculados a partir del método de diferenciación alélicas (F_{ST}) entre muestras, entre individuos dentro de cada muestra y diferencias alélicas entre el total de los individuos.	45
Cuadro 19. Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA), <i>locus por locus</i>	46
Cuadro 20. Proporción de los alelos encontrados en cada una de las localidades.	47

II. LISTA DE FIGURAS

- [Figura 1. Distribución geográfica actual de la especie *Ambystoma velasci* \(modificado de Casas-Andreu y Aguilar-Miguel, 2003\). Sistema de información sobre los recursos Bióticos del Estado de México \(BIOSI\), UNAM-UAEM\).....](#) 8
- [Figura 2. Ejemplares adultos de *Ambystoma velasci*, del parque nacional El Chico. En el individuo de la parte derecha de la imagen aún se alcanza a observar parte de las branquias.](#) 9
- [Figura 3. Ejemplares de *Ambystoma velasci* en etapa larvaria de la Laguna de Tecocomulco y en la parte inferior derecha ejemplar de *A. velasci* del parque nacional El Chico.](#) 10
- [Figura 4. Áreas de estudio en el Estado de Hidalgo. En color verde se encuentra el parque nacional El Chico y en color rosa la Laguna de Tecocomulco.](#) 18
- [Figura 5. Descripción de los caracteres morfológicos que se midieron en los ejemplares de *Ambystoma velasci* longitud total \(LT\), longitud hocico-cloaca \(LHC\), longitud de la cola \(LC\), longitud del antebrazo \(Lant.\), longitud del fémur \(Lfem.\), longitud de la tibia \(Ltib\), longitud de la extremidad delantera a la extremidad posterior \(Lex.-ex.\), longitud del cuarto dedo de la pata posterior \(L4dpp\), longitud del cráneo \(LCr\), ancho de el cráneo \(AnCr\), altura de la parte dorso-ventral \(AIDv\), ancho del cuerpo en la parte dorso-ventral \(AnDv\), longitud de las comisuras bucales \(Lboca\), longitud de la aleta caudal de la parte más alta \(AnCb\), ancho de la aleta caudal a la altura de la cloaca \(AnCm\) y ancho de la cola en la parte terminal \(AnCt\), en las tres localidades, El Oyamel y El Valle en el parque nacional El Chico y la Laguna de Tecocomulco.](#) 24
- [Figura 6. Revelado y separación de los marcadores amplificados mediante electroforesis vertical en poliacrilamida, teñidos con nitrato de plata.....](#) 29
- [Figura 7. Resultados del análisis de agrupación que muestra la similitud entre las tres localidades, con respecto a los caracteres morfológicos.](#) 31
- [Figura 8. Análisis discriminante entre localidades, a partir de los caracteres que tuvieron los valores más altos. Con azul se representa la localidad de Tecocomulco, con rosa la localidad de El Valle y con verde la Localidad de El Oyamel.](#) 33
- [Figura 9. Morfotipos distintivos entre localidades. En el eje vertical se observan las medidas en milímetros \(mm\) y en el eje horizontal las 16 variables.](#) 35
- [Figura 10. Estadísticos “F” para el total de las muestras analizadas en el que se indica que índice que tiene mayor frecuencia \(F_{IT}\).](#) 43
- [Figura 11. Dendrograma que muestra las relaciones genéticas entre las localidades analizadas \(UPGMA con 1000 repeticiones de remuestreo o bootstrap\).](#) 44

<u>Figura 12. Frecuencias alélicas encontradas en cada una de las muestras.....</u>	47
<u>Figura 13. Frecuencias alélicas registradas por individuo para cada muestra analizada. Individuos del uno al 30 pertenecen a Tecocomulco, individuos del 31 al 50 pertenecen a El Oyamel y, por último, individuos del 51 al 56 pertenecen a El Valle.</u>	48
<u>Figura 14. Gráfico de barras en el que se observa las tres localidades representadas cada una por un color distinto. El color rojo en el complejo uno (1), representa a los individuos de la localidad de Tecocomulco, el color verde en el complejo dos (2), representa a los individuos de la localidad de El Oyamel, el color azul del complejo tres (3), representa a los individuos de la localidad de El Valle. Los colores intercalados en cada uno de los complejos representan a los individuos con trazas de mezclas incipientes y hay un porcentaje significativo de intercambio genético en F₂ en la localidad dos.....</u>	48
<u>Figura 15. Se observa a los individuos de la localidad de Tecocomulco como la especie con mayor similitud genética entre sus individuos, mientras que los individuos de la localidad de El Oyamel y El Valle muestran mayor dispersión.....</u>	49
<u>Figura 16. Frecuencias ancestrales y actuales para el <i>locus</i> ATS5-6.</u>	50
<u>Figura 17. Frecuencias ancestrales y actuales para el <i>locus</i> ATS5-7.</u>	50
<u>Figura 18. Frecuencias ancestrales y actuales para el <i>locus</i> ATS10-7.</u>	51
<u>Figura 19. Frecuencias ancestrales y actuales para el <i>locus</i> ATS12-3.</u>	51
<u>Figura 20. Frecuencias alélicas por localidad para el <i>locus</i> ATS5-6.</u>	52
<u>Figura 21. Frecuencias alélicas por localidad para el <i>locus</i> ATS5-7.</u>	52
<u>Figura 22. Frecuencias alélicas por localidad para el <i>locus</i> ATS10-7.</u>	53
<u>Figura 23. Frecuencias alélicas por localidad para el <i>locus</i> ATS12-3.</u>	53

III. ABREVIATURAS

	Carácter	Descripción
Caracteres Morfológicos	LT	Longitud total
	LHC	Longitud hocico-cloaca
	LC	Longitud de la cola
	Lant.	Longitud del antebrazo
	Lfem.	Longitud del fémur
	Ltib.	Longitud de la tibia
	Lex./ex.	Longitud extremidad-extremidad
	L4dpp	Longitud del cuarto dedo de la pata posterior
	LaCr	Longitud del cráneo
	AnCr	Ancho del cráneo
	AIDv	Altura dorso transversal
	AnDv	Ancho dorso transversal
	Lboca	Longitud de la boca
	AnCb	Ancho de la cola, en la parte basal
	AnCm	Ancho de la cola, en la parte media
AnCt	Ancho de la cola, en la parte terminal	
Diversidad y Estructura genética	p.b	Pares de bases
	R_{ST}	Índice de fijación
	Nm	Índice de migración o número de migrantes
	F_{IS}	Nivel de endogamia
	F_{IT}	Balance entre deriva y flujo génico
	F_{ST}	Nivel de diferenciación entre poblaciones
	Ho	Heterocigotos observados
	He	Heterocigotos esperados
	Ht	Heterocigosidad
	%P	Porcentaje de polimorfismo
	M	Migración por pares de muestras
	F₁	Primera generación
	F₂	Segunda generación

RESUMEN

En las últimas décadas, se ha documentado un declive progresivo de las poblaciones de anfibios en el mundo, atribuido a causas diversas. En regiones como México, la diversidad y endemismo de este grupo son elevadas y, en el caso particular del género *Ambystoma*, se han documentado especies con distribución restringida y/o endémica, lo que las ha situado en algún estatus de vulnerabilidad dentro de la legislación ambiental.

Para la Cuenca de México no se cuenta actualmente con información sobre especies que puedan describir el estatus evolutivo de los anfibios en los lagos relictos para esta zona, considerando que son reservorios importantes de flora y fauna locales, además de posibles núcleos de endemismos y riqueza genética. En este trabajo se analiza la variación morfológica, estructura genética y patrones de ancestría en poblaciones de *Ambystoma velasci* en la Laguna de Tecocomulco, El Oyamel y El Valle (estas dos últimas en el parque nacional El Chico), dentro del Estado de Hidalgo, con la finalidad de diagnosticar el estatus evolutivo y de conservación de la especie, para proponer una estrategia de manejo de los recursos genéticos existentes para el mismo.

Se tomaron muestras de tejido a 56 larvas de *A. velasci*; se realizó la extracción de DNA y se utilizaron cuatro microsatélites previamente reportados para los análisis de ancestría, diversidad y estructura genéticas, los que se amplificaron *in vitro* mediante la técnica de reacción de polimerización en cadena del DNA (PCR); se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida y se visualizaron mediante tinción con nitrato de plata; se obtuvieron también datos morfométricos para verificar la variación fenotípica (16 caracteres totales). Los resultados sugieren que existe diferenciación alélica y morfológica importante para las poblaciones analizadas.

Además, dentro de los individuos de la población asociada al lago de Tecocomulco y las dos poblaciones del parque nacional El Chico, es posible verificar la existencia de dos morfotipos específicos para los dos hábitats analizados (bosque de pino-encino *versus* matorral templado), además de niveles moderados de variación genética, con permanencia de alelos ancestrales y flujo génico prácticamente nulo. Las diferencias alélicas encontradas en cada población, probablemente sean consecuencia de la deriva génica y selección ambiental específica por tipo de hábitat.

INTRODUCCIÓN

El declive de las poblaciones de anfibios es un hecho bien documentado, pues muchas especies que han sufrido cambios recientes en su distribución pueden presentar patrones de flujo génico diferentes a los patrones mantenidos a lo largo de su historia evolutiva, lo que podría afectar su potencial reproductivo, además de la alteración de sus patrones de variación y estructura genética (Foster, 1991). Durante las últimas décadas, las poblaciones de *Ambystoma* han sufrido una alarmante disminución en su tamaño; hoy en día son escasas y se cuestiona la posibilidad de su extinción en un plazo corto de tiempo (Parra-Olea y Matías-Ferrer, 2006).

La estructura genética de una especie puede estar condicionada por diversos factores tales como: el hábitat, los recursos alimentarios con los que cuenta, el tipo de depredadores a los que se enfrenta y a las interacciones que establece con otros organismos (Huele y Arntzen, 2002). La genética evolutiva se ocupa principalmente de los aspectos genéticos (genotípicos y fenotípicos) de las poblaciones y el cambio de éstos a través del tiempo, debido a que las poblaciones naturales tienen una estructura genética particular; es decir, dos poblaciones no son genéticamente iguales. Sin embargo, cuando las diferentes poblaciones dentro de una especie son sometidas por varias generaciones a distintas condiciones ambientales, ocurren diversos cambios de tipo variado y, si su magnitud resulta suficiente, una especie ancestral puede dividirse en dos o más especies contemporáneas (Mettler y Gregg, 1982).

En la última década, los enfoques genéticos han resultado ser una herramienta muy eficiente para responder cuestiones ecológicas; actualmente el uso y la aplicación de marcadores y de técnicas moleculares como aloenzimas, microsatélites y secuencias de DNA mitocondrial y nuclear, han permitido evaluar parámetros de interés para los ecólogos (Sunnucks, 2000; Selkoe y Toonen, 2006); abarcando temas tan diversos como la evaluación de tasas de migración, flujo génico inter e intrapoblacional, genética histórica de la especie, análisis de ancestría, estimación de relación genética dentro y entre individuos, genética y estructura de las poblaciones y conservación de la biodiversidad (Smith y Wayne, 1996; Vázquez-Domínguez *et al.*, 2001).

Con el uso de los marcadores moleculares es posible describir variantes genéticas en los organismos; es decir, se pueden conocer las diferencias y similitudes genéticas existentes en las poblaciones. A través del análisis de estos marcadores se puede estudiar la estructura y diversidad de alelos en una población y su transmisión, así como las interacciones entre genotipo y ambiente (Carvalho, 1998).

En el presente trabajo se realizó un análisis de organismos de la especie *Ambystoma velasci* en la Laguna de Tecocomulco, así como en dos poblaciones del parque nacional de El Chico, que se encuentran en los límites de la Cuenca de México, dentro del Estado de Hidalgo debido a que en dicha cuenca se presentan severas amenazas en cuanto a su conservación. La fragmentación progresiva del sistema lacustre de dicha cuenca y la existencia de hábitats relictuales asociados a los lagos, permite suponer que existe un alto grado de diferenciación genética local dentro y entre especies. Es necesario entonces, analizar taxones vulnerables de anfibios como *A. velasci* para diagnosticar su estatus evolutivo y de conservación en estos cuerpos de agua de esta cuenca hídrica residual, reservorios importantes de flora y fauna locales y posibles núcleos de endemismo, diversidad genética y diferenciación evolutiva local; para esto, se analizaron los niveles de variación y estructura genética, así como la variación morfológica y el estatus evolutivo de este complejo en esa región.

ANTECEDENTES

La declinación de los anfibios

La evaluación global de los anfibios ha recogido información valiosa de censos de todas las especies de este grupo, ofreciendo datos científicos que confirman el fenómeno de extinciones elevadas de anfibios a nivel mundial (Collins y Storfer, 2003). El análisis de éstos, proporciona las bases para discusiones sobre políticas, sustentando futuras acciones para preservar los hábitats de los anfibios en el mundo (Lips *et al.*, 2005).

En el caso de América Latina, el conocimiento sobre las disminuciones de las poblaciones (donde la diversidad de anfibios es alta) se encuentra limitado a unos pocos estudios bien documentados (Young *et al.*, 2001). Por lo menos, 13 países han tenido disminuciones y en 40 casos, las especies son ahora consideradas extintas en un país donde alguna vez existieron (Collins y Storfer, 2003). La disminución o extinción de especies ha afectado a 30 géneros y nueve familias de anfibios. La mayoría de las disminuciones documentadas ocurrieron en la década de 1980 y en un intervalo de 500 y 1000 m.s.n.m. (Collins y Storfer, 2003; Lips *et al.*, 2005).

De las posibles causas estudiadas a la fecha, el cambio climático parece ser uno de los importantes en algunas regiones, mientras que enfermedades causadas por hongos se han correlacionado en sitios de al menos tres países. Entre otras causas probables y confirmadas que ocasionan la disminución mundial de anfibios, están: la fragmentación de hábitats, la introducción de especies exóticas, la radiación UV-B, algunos contaminantes químicos, pérdida de hábitats nativos y sinergismo, entre otros (Young *et al.*, 2001; Parra-Olea *et al.*, 2005). A pesar de los esfuerzos de conservación, muchos estudios de monitoreo en hábitats diversos son muy recientes y de corta duración, por lo que, es necesario implementar proyectos multidisciplinarios para conocer la extensión geográfica de la disminución de poblaciones.

El caso de la Cuenca de México

Se estima que casi 1.5% de la biodiversidad global del planeta se alberga en la Cuenca de México (Challenger, 1998); el país cuenta con 361 especies de anfibios (Flores-Villela y Canseco-Marquéz, 2004). Aproximadamente el 60% de estas especies son endémicas a México y son de especial importancia dentro de la región de la cuenca mexicana por su papel como bioindicadores del estado de conservación de los hábitats (Welsh, 1990; Lips *et al.*, 2005).

La Cuenca de México, como unidad geográfica, es una cuenca endorreica de 9,600 kilómetros cuadrados, en la que se incluyen, además de la de México, las subcuencas de las lagunas de Apan, Tecocomulco y Tochac en el Estado de Tlaxcala. Se encuentra bordeada por montañas altas, limitada al sureste por la Sierra Nevada (con los Volcanes Popocatepetl e Iztaccíhuatl), uniéndose al sur con las sierras Chichinautzin y Ajusco; al sureste se localizan las sierras de Las Cruces; se sigue hacia el noreste con la Sierra de Tepozotlán, para cerrar al norte con las sierras de Tezontlalpan y Tolcayuca, así como la Sierra de Pachuca (Ávila-López, 1991).

El estatus de conservación para esta región es crítico, pues actualmente se considera que gran parte de los endemismos han desaparecido, así que se recomienda censar y conservar a los que aún existen. Existe conocimiento de los cuerpos de agua superficiales, pero el rubro de aguas subterráneas requiere de mayores estudios en cuanto a su funcionamiento y las extracciones de acuíferos que se realizan a pesar de las consecuencias. Los sistemas naturales están desarticulados aunque quedan microambientes relictuales, como la Laguna de Tecocomulco y en algunos vasos reguladores se conservan organismos de especies nativas (como los anfibios) que contribuyen a la biodiversidad local (Santos-Barrera *et al.*, 2004).

El género *Ambystoma*

Este género está presente exclusivamente en norteamérica, se encuentra distribuido desde Canadá hasta México (Thien, 1969a). Pertenece a la familia Ambystomatidae, se encuentra constituido por aproximadamente 31 especies, de las que cuatro ya son consideradas como extintas, *Ambystoma hibbardi*, *A. kansaense*,

A. minshalli y *A. tihenii* (Estes, 1981; Larson, 1996), de las 27 especies restantes, 17 de éstas se distribuyen en el centro y noreste de México, entre los 1,600 a 3,800 m de altitud (Vega-López y Álvarez, 1992; Huacúz-Elias, 2001). La mayoría de las especies de *Ambystoma* que son endémicas a México, se distribuyen en el Eje Neovolcánico Transversal (Flores-Villela, 1993).

Las especies mexicanas de *Ambystoma* se encuentran confinadas a regiones de gran altitud al noreste y centro del país; este género es de suma importancia, ya que la distribución de muchas de sus especies se encuentra restringida en la zona centro de México (Shaffer, 1989). Matías-Ferrer (2006), menciona que en el caso de las salamandras del género *Ambystoma*, muchas de las especies mexicanas son de origen aparentemente “reciente”, esto debido a que se ha propuesto una diversificación en función de una diferenciación alopátrica determinada por la geología e hidrología del país (Shaffer, 1984).

La mayoría de los organismos del género son corpulentos o robustos con la cabeza grande y ancha y el hocico chato. Sus ojos no presentan párpados móviles; tienen cuatro dedos en las patas delanteras y cinco en las posteriores; crían y se desarrollan en los cuerpos de agua y algunas formas presentan adultos terrestres con pulmones bien desarrollados (Huacuz-Elias, 2001). Para algunas especies del género, los adultos son paedomórficos o neoténicos, es decir, que alcanzan la madurez sexual reteniendo características larvarias; por ejemplo, la presencia de branquias externas y su permanencia siempre como formas acuáticas (Casas-Andreu *et al.*, 2004).

Ambystoma velasci (Dugés, 1888)

Ambystoma velasci, también llamada salamandra tigre de meseta, es una especie endémica de México; anteriormente era considerada como una subespecie del complejo de *A. tigrinum*, sin embargo, Shaffer y MaKnight (1996) presentaron datos que sugerían que la situación de las especies mexicanas de este complejo resultaba ser muy inestables, debido a la escasa diferenciación morfológica que existe entre complejos de especies crípticas, que hacía difícil su taxonomía (Dawood *et al.*, 2002). Anteriormente, Irschick y Shaffer (1997) reconocieron taxonómicamente a *Ambystoma*

velasci como una especie distinta de *A. tigrinum*, aunque señalan que *A. velasci* podría no ser un grupo monofilético con respecto a algunas especies mexicanas del género.

No obstante, Flores-Villela y Canseco-Márquez (2004) recomiendan mantenerla como *A. tigrinum*. Sin embargo las diferencias morfológicas (en cuanto al tamaño y coloración) que se observan en los organismos de *A. tigrinum* se pueden interpretar como una especie distinta a *A. velasci*.

En este sentido, es conveniente mencionar que, para este caso, se ha definido el concepto de *especie críptica*, a todo aquel complejo taxonómico en donde existen dificultades severas para hacer distinciones entre las diferentes especies que lo componen y se tienen que utilizar métodos combinados de identificación (datos genéticos, ecológicos, morfológicos, etc.). Generalmente las especies crípticas mantienen una correspondencia con la historia natural de los ambientes en los cuales se desarrollan. Cuando dichos ambientes han sido severamente transformados, es fundamental, en términos de conservación de los recursos genéticos de las mismas, establecer y delimitar las relaciones taxonómicas que mantienen entre sí (intra e interespecíficas; Bickford *et al.*, 2006).

La especie ha sido seriamente impactada por el gran crecimiento urbano en el centro del país, que ha destruido su hábitat. Dentro de la Laguna de Tecocomulco, *A. velasci* forma parte de la dieta tradicional de los ribereños, además de su uso terapéutico dentro de la medicina tradicional local. A pesar de que está prohibida su captura y comercialización, resulta ser un recurso que tiene un alto valor monetario para los pobladores de los márgenes de la laguna; su precio por kilogramo llega hasta \$80.00 pesos (Gutiérrez-Zavala *et al.*, 2002). Actualmente se encuentra sujeta a protección especial (Pr), en la NOM-059-ECOL-2001; es decir que se encuentra sujeta a limitaciones o vedas en su aprovechamiento por tener poblaciones reducidas o una distribución geográfica reducida; además, mantiene la categoría de vulnerable VU, según la IUCN y el Apéndice II del CITES.

Hábitat y distribución

La ecología de *A. velasci* es similar a la de *A. tigrinum*. Se reproduce y desarrolla en cuerpos de agua, lagos profundos y superficiales, charcas temporales, en ríos y arroyos; también se les encuentra en los bosques de pino-encino y pastizales de las zonas templadas de México. Habita en un clima templado subhúmedo con lluvias en verano (Cw), templado subhúmedo Cb' (w2), semifrío, con temperatura media anual entre 5°C y 12°C, la precipitación anual es de entre 200 y 1 800 mm, lluvias de verano del 5 al 10.2% anual (García, 1988).

Esta salamandra se distribuye en el centro de México (Petranka 1998). Sin embargo, hay pocas localidades específicas registradas, ya sea bajo el nombre de *A. velasci* o bajo algún sinónimo (Riojas-López y Mellink, 2006). Actualmente el área de distribución geográfica de esta especie es muy reducida (Figura 1), menor al 5% del territorio nacional. Se ha registrado para el centro de México, en los estados de México e Hidalgo (Aguilar-Miguel y Casas-Andreu, 2005).



Figura 1. Distribución geográfica actual de la especie *Ambystoma velasci* (modificado de Casas-Andreu y Aguilar-Miguel, 2003). Sistema de información sobre los recursos Bióticos del Estado de México (BIOSI), UNAM-UAEM).

Descripción

Son organismos de tamaño medio con cuerpo más o menos robusto, los adultos transformados tienen una longitud hocico-cloaca (LHC) de 50-121 mm y la longitud de la cola (LC) variable menor que la LHC o sobrepasándola hasta 1.2 veces. El número de dientes maxilares-premaxilares es de 69-134 y dientes vomeropalatinos de 25-84 piezas. Las extremidades son relativamente largas, presentando cuatro dedos en las extremidades anteriores y cinco en las extremidades posteriores. La membrana caudal está reducida hacia la cola y mayormente en la región ventral (Aguilar-Miguel y Casas-Andreu, 2005). Los adultos transformados (Figura 2) presentan una coloración que va de pardo oscuro a negro, con máculas o pequeños bloques amarillos o verde olivo esparcidos irregularmente sobre el dorso y en los extremos de las inserciones de los miembros; la región ventral presenta el mismo patrón que la región dorsal, pero con tonalidades más claras (Gehlbach, 1967).



Figura 2. Ejemplares adultos de *Ambystoma velasci*, del parque nacional El Chico. En el individuo de la parte derecha de la imagen aún se alcanza a observar parte de las branquias.

Presentan neotenia facultativa, es decir, que alcanzan su madurez sexual conservando algunas características de la fase larvaria, aunque, pueden transformarse o metamorfosearse en su medio natural (Huacúz-Elias, 2001). Las características distintivas de las larvas son: longitud hocico-cloaca (LHC) de 50.3 ± 12.06 y longitud total (LT) de 92.2 ± 12.53 , con ramificaciones secundarias de las branquias en la superficie anterior del tercer arco branquial (Figura 3).



Figura 3. Ejemplares de *Ambystoma velasci* en etapa larvaria de la Laguna de Tecocomulco y en la parte inferior derecha ejemplar de *A. velasci* del parque nacional El Chico.

Los adultos son organismos terrestres que habitan en bosques templados, sin tener mucha dependencia del bosque como otras especies del género *Ambystoma*, necesitan para su reproducción de cuerpos de agua poco profundos que se forman temporalmente en la época de lluvias (Aguilar-Miguel y Casas-Andreu, 2005).

Presentan fecundación interna, huevos y larvas acuáticas (Duellman y Trueb, 1986); al igual que otras especies de *Ambystoma* los ciclos reproductivos de *A. velasci*

están regulados hormonalmente, es decir, las hormonas juegan un papel importante en el apareamiento. Primero, se lleva a cabo un cortejo, en que el macho deposita un espermátforo que contiene los espermatozoides y que es secretado por las glándulas cloacales; sobre éste se posa la hembra para introducirlo en su cloaca y se lleve a cabo la fecundación mediante la penetración de varios espermatozoides ya que los huevos son poliespérmicos (Armstrong y Duhon, 1989).

Ambystoma velasci se diferencia de *A. tigrinum* por su morfología, ya que son organismos considerablemente más grandes, los adultos metamorfoseados tienen una longitud hocico-cloaca (LHC) de 75-160 mm, en formas larvales la LHC, es de 61.4 ± 18.36 mm, con ojos pequeños y redondos, hocico redondeado amplio y cabeza ancha. Las larvas se pueden metamorfosear a los 45-85 mm de longitud hocico-cloaca (LHC), pero pueden permanecer como neoténicos y exceder al tamaño del adulto. Los adultos transformados presentan una coloración en la parte dorsal que consiste de máculas redondeadas pequeñas y/o medianas, barras o reticulaciones de color generalmente amarillo o verde olivo, sobre un fondo claro u oscuro (ocasionalmente de un solo color), la región ventral generalmente de color amarillento o verde olivo (Wentz 2001; Aguilar-Miguel y Casas-Andreu, 2005).

Ambystoma tigrinum tiene la característica de transformarse o metamorfosearse en su medio natural; los adultos son terrestres y habitan en bosques templados, sin tener mucha dependencia del bosque como otros organismos del género *Ambystoma*. Necesitan para su reproducción de cuerpos de agua poco profundos que se forman temporalmente en la época de lluvias (Aguilar-Miguel y Casas-Andreu, 2005).

El uso de marcadores moleculares en genética evolutiva

Los marcadores utilizados tiempo atrás en estudios de genética eran controlados por genes asociados a caracteres morfológicos, por lo general fenotipos de fácil identificación de manera visual. Éstos contribuyeron significativamente al desarrollo teórico del análisis de ligamiento y en la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Con la llegada de las técnicas modernas de biología molecular surgieron diversos métodos de detección de polimorfismo genético a nivel del DNA, los llamados marcadores moleculares (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Los marcadores moleculares o genéticos son biomoléculas, como proteínas (antígenos e isoenzimas) y DNA (genes conocidos o fragmentos de secuencia), que pueden relacionarse con un rasgo hereditario (Koreth *et al.*, 1996).

Entre los marcadores genéticos más utilizados se encuentran los RFLP's (*restriction fragment length polymorphisms*; fragmentos de restricción polimórficos de longitud variable), SSR's (*simple sequence repeats o short tandem repeats*; secuencias simples repetidas o microsatélites), mtDNA (*mitochondrial DNA markers*; marcadores de DNA mitocondrial), SNP's (*single nucleotide polymorphisms*; polimorfismos de un solo nucleótido), AFLP's (*amplified fragment length polymorphisms*; fragmentos de amplificación polimórficos de longitud variable; Dodgson *et al.*, 1997).

Una de las principales ventajas de los marcadores moleculares descritas por Ferreira y Grattapaglia (1998) es el nivel de polimorfismo que, generalmente, es alto para cada *locus*; en su mayoría son codominantes y contienen mayor cantidad de información genética por *locus* que los marcadores morfológicos, los cuales son, por lo general, dominantes o recesivos. Por otro lado, los marcadores moleculares deben poseer una buena distribución a lo largo del genoma y su análisis debe ser rápido y práctico, además de que pueda ser reproducible (Cheng y Crittenden, 1994).

Los microsatélites como marcadores altamente polimórficos

Los microsatélites se encuentran ampliamente distribuidos por todo el genoma eucarionte (Powell *et al.*, 1995) tanto en el núcleo, como en la mitocondria o el cloroplasto y han sido ampliamente utilizados, desde su descubrimiento (alrededor de 1980) en estudios de genética de poblaciones, principalmente en análisis de parentesco (Jarne y Logoda, 1996; Scotti *et al.*, 1999). Presentan, además, enormes ventajas sobre otros métodos genéticos convencionales ya que son abundantes y polimórficos; es decir, que son altamente sensibles para detectar variabilidad genética, permitiendo

documentar el genotipo de un individuo en un *locus* simple (Balloux y Lugon-Moulin, 2002).

Los microsatélites son pequeñas secuencias de nucleótidos de DNA con grupos de dos a seis pares de bases (p.b.) repetidos en motivos o en *tándem*; variables en tamaño que, por lo general, se repiten dentro de un intervalo de entre 100 y 200 p.b. (Gibbs *et al.*, 1997). Estas repeticiones de secuencias simples están presentes tanto en las regiones codificadoras como en las no codificadoras y normalmente se caracterizan por su alto grado de polimorfismo (Ortega y Maldonado, 2007).

Las regiones adyacentes a los microsatélites tienden a conservarse al interior de las especies; sin embargo, en ocasiones se pueden también conservar en otros niveles taxonómicos (Hajeer *et al.*, 2000). En genética de poblaciones, generalmente se utilizan microsatélites de dos, tres y cuatro nucleótidos repetidos, de los cuales deben evidenciarse diferencias de tamaño con una precisión de un par de bases al menos (Jarne y Lagoda, 1996).

Una ventaja de estos marcadores es que su estructura molecular se encuentra ampliamente caracterizada, así como sus tasas de mutación (Jarne y Lagoda, 1996). Las tasas de mutación de la mayoría de los microsatélites son de varios órdenes de magnitud mayor que la de otros *loci* en el mismo genoma, siendo particularmente frecuentes las mutaciones que cambian el tamaño del microsatélite (Eisen, 1999). Otras ventajas asociadas a los microsatélites es que son codominantes y se heredan de forma mendeliana con un *locus* único, lo que permite diferenciar los estados homocigotos y heterocigotos (Anzidei *et al.*, 1999), además de considerarse selectivamente neutrales (Jarne y Lagoda, 1996).

En las poblaciones naturales, estos marcadores presentan altos niveles de polimorfismo, dando como resultado diferentes números de repetición del motivo o *tándem* en la región del microsatélite, lo cual es fácilmente detectable por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Anzidei *et al.*, 1999), desarrollada por Mullis *et al.*, (1986).

Ésta consiste en la reproducción *in vitro* de grandes cantidades de una región específica de DNA, a partir de una pequeña cantidad original de DNA molde y de “cebadores o *primers*”, que son secuencias cortas de oligonucleótidos, las cuales resultan ser específicas para la región de interés, garantizando que sólo esa parte va a amplificarse y ninguna otra.

El elevado polimorfismo que presentan estos marcadores y la posibilidad de identificar ambos alelos, los hace muy útiles para la identificación de individuos, ya que resulta muy poco probable que dos individuos elegidos completamente al azar, al ser analizados, compartan todos sus alelos. Los polimorfismos de los microsatélites se pueden visualizar fácilmente, esto mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida usando diversas técnicas, como: tinción con bromuro de etidio, nitrato de plata, radioisótopos o fluorescencia, entre otros (Dean *et al.*, 1999).

El mecanismo que dirige la evolución de los microsatélites aún es incierto, sin embargo, se ha demostrado que la distribución del tamaño de los microsatélites puede ser comparado entre especies. La evolución de los microsatélites puede verse en la diferencia que existe en las frecuencias de los haplotipos de dos especies relacionadas, debido a la deriva génica y procesos de migración después de que posiblemente divergieron de un ancestro común (Hedrick, 1999). Como resultado se puede predecir que el número de alelos y el número de bases que componen a un microsatélite, son mayores en la especie donde se originaron que en las especies cercanamente relacionadas a ésta. Esta es la regla de “tendencia de acertividad” (Crawford *et al.*, 1998).

Una de las principales utilidades que se le dan a los microsatélites, es la posibilidad de estimar los niveles de variabilidad genética dentro y entre las poblaciones, además de poder analizar las relaciones genéticas existentes entre éstas (Takezaki y Nei, 1996). La variabilidad genética se puede definir como “la habilidad genética para variar”, es decir la capacidad que tienen las poblaciones a responder a variaciones ambientales o cambios en los objetivos de selección (Rochambeau *et al.*, 2000).

Uso de marcadores moleculares en anfibios

Los criterios genéticos obtenidos del estudio de marcadores moleculares podrían ser útiles para seleccionar poblaciones de vida silvestre como candidatos con prioridad para su conservación. Los esfuerzos actuales para proteger y mantener especies raras o en peligro de extinción a menudo se concentran en el mantenimiento de la diversidad genética (Sherwin y Moritz, 2000; Hedrick y Kalinowski, 2000; Hedrick, 2001). Por ejemplo Garner y col. (2000), hicieron uso de los microsátélites para demostrar que la diversidad genética de poblaciones de *Rana lessonae* (*Pelophylax lessonae*) se encuentra a niveles muy bajos; posteriormente, los mismos autores analizaron en el 2001 poblaciones de *R. latastei* (*Rana latastei*), encontrando los mismos resultados que con *R. lessonae* (*Pelophylax lessonae*), por lo que propusieron que estas especies deben ser consideradas para unidades especiales de conservación.

Vos y col. (2001), pusieron de manifiesto que las barreras lineales (tales como carreteras, brechas, etc.) tienen un impacto significativo en las medidas de distancias genéticas en poblaciones de *R. arvalis*, mientras que Newman y Squire (2001) encontraron poca diferenciación genética en poblaciones de *R. sylvatica* (*Lithobates sylvaticus*) en humedales de América del norte. Otros análisis en los cuales se han empleado microsátélites como marcadores moleculares son el de Rowe y col. (1999), en el cual se analizaron modelos metapoblacionales (isla/continente-isla) con poblaciones de sapo (*Bufo calamita* ahora *Epidalea calamita*) en Gran Bretaña y estudios de demografía y adecuación (Reh y Seitz, 1990; Velo-Antón *et al.*, 2006) sobre características ecológicas, evolutivas y de conservación de anfibios en las islas atlánticas de Galicia.

Hitching y Beebee (1997, 1998), sugirieron que debido a la fragmentación del paisaje inducida por el hombre, se puede observar claramente un efecto negativo sobre la estructura genética de las poblaciones de anuros de los géneros *Bufo* y *Rana* en Europa. Por otro lado, Pope y col. (2000), hicieron uso de estos marcadores moleculares para analizar poblaciones de anfibios, concluyendo que la conectividad que pueda existir entre poblaciones y la disponibilidad de los hábitats, influyen en la estructura poblacional de estos grupos.

JUSTIFICACIÓN

Debido a la creciente fragmentación del sistema lacustre de la Cuenca de México y a la reducción de hábitats relictuales, como la Laguna de Tecocomulco, que albergan especies que presentan patrones evolutivos particulares, ha generado que las especies que habitan esos sitios (como *Ambystoma velasci*) se vuelvan especialmente vulnerables a cambios ecogeográficos, como los que actualmente han ocurrido en diferentes cuerpos de agua en el centro de México.

En este caso, la distribución restringida de la especie permite suponer que los recursos genéticos existentes en las poblaciones dependerán, en gran medida, del tipo de cuerpo de agua al cual se asocian. Es decir, cuerpos de agua crípticos o cerrados como el de Tecocomulco, mantendrán diferencias importantes con respecto a otros que son abiertos y estacionales, como los arroyos del parque nacional El Chico, ambos con historias naturales distintas y asociados a hábitats específicos.

Dado el estatus de vulnerabilidad de *Ambystoma velasci* es importante considerar elementos de riqueza alélica y estructura genética dentro y entre sus poblaciones, para que se puedan plantear estrategias de conservación eficientes, así como planes de manejo sustentable en aquellas regiones donde se explota clandestinamente. Actualmente, no hay estudios de genética de poblaciones que aborden esto y el presente trabajo es una primera aproximación.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Analizar la variación morfológica y la estructura genética en poblaciones de *Ambystoma velasci* de la Laguna de Tecocomulco y dos localidades en el parque nacional El Chico, Hidalgo, para determinar el estatus evolutivo y de conservación de los recursos genéticos de la especie.

Objetivos Particulares:

1. Obtener los patrones de variación morfológica en las dos poblaciones del parque nacional El Chico y la Laguna de Tecocomulco, mediante análisis morfométrico de caracteres específicos.

2. Obtener los patrones de diversidad y estructura genética utilizando las secuencias de microsatélites ATS5-6, ATS5-7, ATS10-7 y ATS12-3 como marcadores genéticos, para las tres poblaciones.

3. Realizar un análisis de ancestría genética de las poblaciones de Tecocomulco y del parque nacional El Chico, para determinar los alelos que se transmiten preferentemente entre generaciones.

4. Establecer las relaciones evolutivas para *Ambystoma velasci* dentro del Estado de Hidalgo, comparando la población de Tecocomulco con las dos poblaciones del parque nacional El Chico.

HIPÓTESIS

Ambystoma velasci se clasifica actualmente como una especie amenazada y de distribución restringida, distribuida en el centro de México. Considerando que puede encontrarse en regiones tanto de pastizales templados y cuerpos de agua cerrados (el caso de la Laguna de Tecocomulco), como en hábitats boscosos, en riachuelos temporales (el caso del parque nacional El Chico), se supone la existencia de patrones morfológicos específicos de cada localidad, influenciados por el ambiente (morfortipos) que, sin embargo, mantienen una estructura genética específica (ecotipos), promovida por procesos locales, como deriva genética y/o selección, que eventualmente promoverán reservorios de alelos específicos en cada población.

MÉTODOS

Área de estudio

El área de estudio comprende dos zonas principales en el Estado de Hidalgo; la Laguna de Tecocomulco con un solo sitio de colecta y el parque nacional El Chico, con dos sitios de colecta, en los cuales está presente la especie de trabajo (Figura 4).

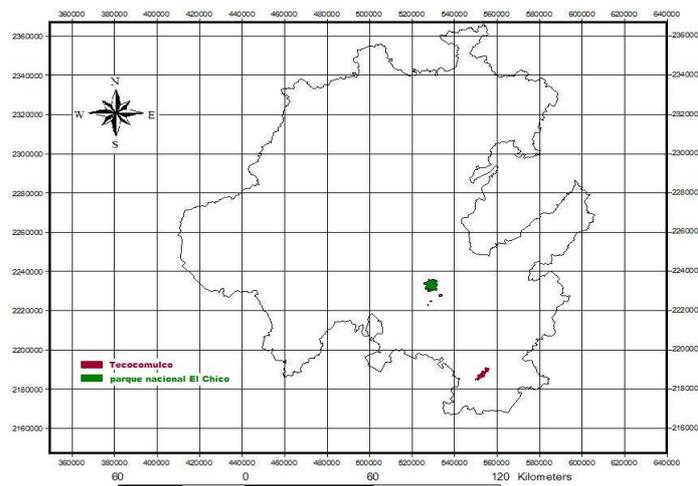


Figura 4. Áreas de estudio en el Estado de Hidalgo. En color verde se encuentra el parque nacional El Chico y en color rosa la Laguna de Tecocomulco.

1) Laguna de Tecocomulco

La Laguna se encuentra dentro de la subcuenca de Tecocomulco área que abarca una extensión de 49,300 ha y comprende parte de los municipios de Apan, Almoloya, Cuauhtepic de Hinojosa, Singuilucan y Tepeapulco, dentro del Estado de Hidalgo, así como parte del Municipio de Chignahuapan del Estado de Puebla.

Corresponde a la región neártica y, por su relieve, dentro de la provincia fisiográfica del sistema volcánico transversal (INEGI, 1992). Debido a esta característica, en esta región hay grandes cadenas montañosas de origen volcánico que dan origen a una cuenca cerrada. De acuerdo con la clasificación de Dugan (1992), la Laguna de Tecocomulco se encuentra ubicada dentro de los sistemas lacustres que predominaron en toda la Cuenca de México hasta finales de 1940, los cuales se formaron por depresiones causadas por fenómenos de origen volcánico y, en particular, esta laguna se formó por el bloqueo del drenaje original (FIR, 2003).

Así, esta laguna es un relicto del antiguo sistema lacustre que predominó en dicha cuenca hasta hace 70 años y, desde entonces, ha sufrido una desecación drástica. Se le considera como el último humedal relictual en el que se refugian y habitan una gran variedad de peces, anfibios, aves acuáticas y migratorias, así como hidrófitas, grupos característicos de los que fueron los antiguos lagos de Anáhuac (García-Calderón, 1976). Hoy en día, esta laguna cuenta con una superficie de 1,769 ha (INEGI, 1992).

El sitio se ubica en la parte sureste del Estado de Hidalgo, dentro de los municipios de Tepeapulco, Apan y Cuauhtepic de Hinojosa, con una distancia de 46 Km. en línea recta desde el centro del humedal a la capital del estado, entre las coordenadas 98°21'00" y 98°26'00" W 19°50'00" y 19°74'00" N y una altitud media de 2,250 m.s.n.m. (Lot-Helgueras y Novelo-Retana, 1978).

El tipo de clima, según el sistema de clasificación de Köpen, modificado por García (1988), es templado subhúmedo con lluvias en verano, caracterizado por una precipitación pluvial anual de los 600 a 700 mm y una precipitación anual promedio de los 658 mm (Huizar-Alvarez *et al.*, 1999). La temperatura media anual oscila entre los 12 a 18 °C.

La vegetación acuática corresponde a la que existió en los antiguos lagos de Anáhuac y comprende a 35 especies acuáticas de 21 familias distintas (Jiménez *et al.*, 1996), entre las cuales destaca principalmente el tule (*Scirpus lacustris*), formando densas masas que cubren casi un 85% total de la laguna. En las orillas se presenta principalmente la lentejuela (*Lemna* sp.), además de otras hidrófitas tales como las hidrófitas emergentes: *Scirpus lacustris* y *Typha latifolia*, hidrófitas flotantes: *Lemna gibba* y *Ricciocarpus natans*, hidrófitas de hojas flotantes: *Nymphoides fallax*, hidrófitas sumergidas: *Utricularia gibba*, *Najas guadalupensis* y *Potamogeton foliosus*, las cuales se distribuyen ampliamente en la laguna (SEMARNAP, 1997). La vegetación original de las laderas y cerros era de encino y pinos, aún reportada como escasa por García-Calderón (1997); actualmente la vegetación se encuentra formada por pastizal templado, juníperos, magueyes y matorrales, entre otras (Jiménez *et al.*, 1996).

La fauna silvestre de la laguna reporta la presencia de peces como charales *Chirostoma jordani* y carpa *Ciprinus carpio*. Además de especies introducidas como las carpas *Cyprinus carpio* y *Carassius auratus* (Lot-Helgueras y Novelo-Retana, 1978). Los anfibios que se han identificado son: *Lithobates montezumae* (con estatus de protección especial), *L. pipiens* y *Ambystoma velasci*, con status de protección especial de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001. La mayor diversidad faunística, la representan las aves. De un total de 120 especies de aves en la subcuenca, 42 especies son acuáticas y 78 son terrestres. De las 42 acuáticas, 29 son migratorias y 13 son residentes (Jiménez-Fernández *et al.*, 1996).

El mal aprovechamiento de los recursos naturales, así como el cambio de uso de suelo hacia las actividades agrícolas y el pastoreo desmedido, han tenido un efecto negativo en la laguna; ésta recibe cada año toneladas de suelos erosionados y arrastrados desde las partes altas de la cuenca, provocando su azolvamiento, la disminución de extensión, en profundidad y el cambio en las características fisicoquímicas del agua, afectando con esto a la flora y fauna del sitio (García-Calderón, 1976).

2) El parque nacional El Chico (El Oyamel y El Valle).

El parque se ubica en el extremo occidental de la Sierra de Pachuca, en la parte sureste del Estado de Hidalgo. Políticamente pertenece a los Municipios de Mineral del Chico y Pachuca; geográficamente se localiza entre las coordenadas 98°41'30" y 98°47'23" de longitud oeste y 20°11'00" y 20°12'32" de latitud norte. Cuenta con una superficie de 2,739 ha de acuerdo con el decreto publicado el 06 de julio de 1982. Tiene un intervalo altitudinal que va de los 2,300 a 3,020 m.s.n.m. Las alturas máximas que se alcanzan en este parque son la peña Las Monjas 2,960 m.s.n.m., cerro Cueva Blanca 3,060 m.s.n.m., Peña la Muela 3,040 m.s.n.m. y el cerro Monte Copado con 3,020 m.s.n.m. (Galindo *et al.*, 1988). La mayor parte del parque se encuentra en el interior de la cuenca hidrográfica del río Pánuco, cerca de la porción limítrofe entre ésta y la parte septentrional de la Cuenca de México (Rzedowski *et al.*, 1964; Medina y Rzedowski, 1981).

El parque nacional El Chico, se localiza en una zona que corresponde según Köppen modificada por García, al clima c(w2) (w) b(i)g, templado, con lluvias en verano, subhúmedo de alta humedad y semifrío, las temperaturas medias anuales varían entre 10° y 14°C, con mínimas que van de -6 a -9°C (Galindo *et al.*, 1988). La precipitación media anual es de 1,567.9 mm (Gallina *et al.*, 1974).

El área del parque nacional, pertenece a la provincia florística de las serranías meridionales de la región mesoamericana de montaña (Rzedowski, 1978). La vegetación del parque está formada por los siguientes tipos de vegetación: bosque de oyamel (*Abies religiosa*), bosque de oyamel-encino (*Abies-Quercus*), bosque de encino-oyamel (*Quercus-Abies*), bosque de encino (*Quercus*), bosque de pino (*Pinus*), bosque de encino-pino (*Quercus-Pinus*), bosque de pino-encino (*Pinus-Quercus*), bosque de Tlaxcal (*Juniperus*), bosque de cedro (*Cupressus*), pastizal y debido a los afloramientos rocosos del parque, existen condiciones xéricas (Galindo *et al.*, 1988; Zavala, 1995).

En el parque nacional todavía se desconoce mucho acerca del inventario detallado de la avifauna, se han registrado hasta el momento 48 especies distribuidas en 17 familias y 38 géneros, tales como *Basileuterus belli*, *Turdus migratorius*, *Junco phaeotus*, *Dendroica occidentales* y *D. virens* sobresalen por su abundancia.

La herpetofauna del parque es muy diversa, se han registrado 22 especies de anfibios y reptiles ocupando el 1.9% de la herpetofauna nacional, algunas especies de anfibios son: *Ambystoma velasci*, *Chiropetrotriton dimidiatus*, *Ch. multidentatus*, *Pseudoeurycea altamontana*, *P. belli*, *P. cephalica*, *Hyla eximia*, *H. plicata*, *Lithobates spectabilis*, reptiles como: *Phrynosoma orbiculare*, *Sceloporus bicanthalis*, *S. grammicus*, *S. mucrurus*, *S. spinosus*, *Plestiodon lynxe*, *Abronia taeniata*, *Barisia imbricata*, *Conopsis lineata*, *Geophis semiannulatus*, *Pituophis deppei*, *Thamnophis pulchrilatus*, *Rhadinaea gaigeae*, *Crotalus aquilus*, entre otras (Ramírez-Bautista y Ramírez-Pérez, 2008).

En cuanto a la mastofauna en el parque se conoce que habitan 30 especies de mamíferos silvestres, que representa la cuarta parte de los que habitan en el estado de Hidalgo (126 especies) entre esta podemos encontrar: *Didelphis virginiana* (tlacuache), *Dasyurus novemcinctus* (armadillo), *Urocyon cinereoargenteus* (zorra gris), *Bassariscus astutus* (cacomixtle), *Procyon lotor* (mapache), *Mustela frenata* (comadreja), *Lynx rufus* (lice), *Tomomys umbrinus* (tuza), entre otras especies de roedores y murciélagos (Rojas-Martínez y Hernández-Flores, 2008).

Trabajo de campo

Se realizaron recolectas en los tres sitios dentro de las dos áreas de estudio, mediante el permiso de colecta científica, SGPA/DGVS/05992/06, comprendiendo los meses de febrero, marzo y abril, con un último muestreo en junio de 2007. Se recolectó un total de 30 individuos para la Laguna de Tecocomulco, 20 individuos para el sitio de El Oyamel y 6 individuos para El Valle en el parque nacional El Chico; el número de individuos dependió del tamaño de los cuerpos de agua. Cada área de estudio fue seleccionada en función al tipo de vegetación (pastizal templado en Tecocomulco y bosque de pino-encino en El Chico), así como de la presencia de los organismos de estudio.

Todos los organismos fueron recolectados en estado larvario; para separar convenientemente los estadios larvarios, se utilizó la tabla de desarrollo de *Ambystoma maculatum* descrita por Harrison (1969), en la que se enumeran las etapas de desarrollo de esta especie, siendo ésta una descripción estándar de desarrollo para las salamandras. Se pudo definir que todos los organismos recolectados se encuentran en el último estadio, de un total de 46 estadios, con características larvarias remanentes, como las branquias.

La captura de los ejemplares se realizó con la ayuda de redes de arrastre y redes de “cuchara” de diferentes tamaños. Una vez capturados, los ejemplares se transportaron vivos al laboratorio en contenedores con agua de cada sitio, en donde se mantuvieron en peceras con oxigenación permanente. Posteriormente, fueron sexados e identificados con la ayuda de claves taxonómicas (Smith y Taylor, 1966; Thien, 1969b). Para tomar los datos merísticos, los ejemplares fueron sacrificados mediante congelación, después se les cortó de 1-2 cm de tejido, que se almacenó en congelación (-20° C) y que posteriormente fue utilizado para los análisis genéticos.

Los ejemplares fueron fijados mediante la técnica de Casas y col. (1991), que consiste en inyectar formol *buffer* al 10%, en distintas zonas del organismo. Posteriormente, se colocaron en recipientes de plástico con toallas de papel humedecidas con formol y se les dejó una semana para asegurar su fijación. Ya endurecidos se lavaron al chorro de agua y fueron colocados en frascos con alcohol al 70%, mismos que fueron finalmente depositados en la Colección de Herpetológica del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Los tejidos extraídos para el análisis genético fueron conservados mediante congelación y transferidos al ultracongelador del laboratorio de Sistemática Molecular del CIB de la UAEH.

Trabajo de laboratorio

Análisis morfológico

Se midieron 16 caracteres morfológicos para los 56 individuos, con un calibrador electrónico marca Truper. Estos caracteres morfológicos describen los atributos morfométricos de los individuos (Figura 5), utilizados comúnmente para los urodelos, ya que resultan ser necesarios para conocer aspectos relacionados con la biología, historia de vida, así como el grado de desarrollo de los organismos de la especie. Una vez realizada la base de datos con los caracteres morfométricos, se emplearon métodos estadísticos como el Análisis de Componentes Principales, Análisis Discriminante y Análisis de Correlación Múltiple, con la finalidad de verificar los patrones de variabilidad y su posible interrelación.

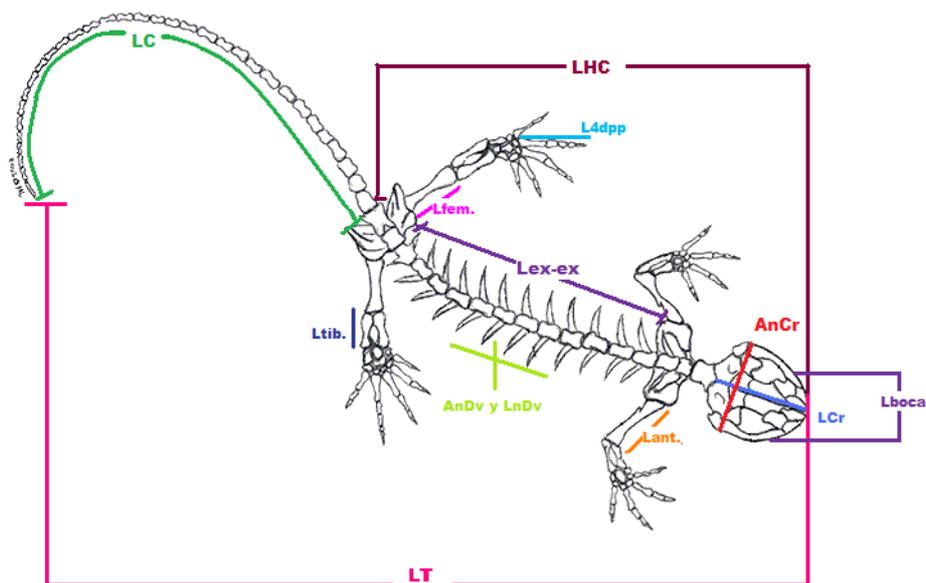


Figura 5. Descripción de los caracteres morfológicos que se midieron en los ejemplares de *Ambystoma velasci* longitud total (LT), longitud hocico-cloaca (LHC), longitud de la cola (LC), longitud del antebrazo (Lant.), longitud del fémur (Lfem.), longitud de la tibia (Ltib), longitud de la extremidad delantera a la extremidad posterior (Lex.-ex.), longitud del cuarto dedo de la pata posterior (L4dpp), longitud del cráneo (LCr), ancho de el cráneo (AnCr), altura de la parte dorso-ventral (AnDv), ancho del cuerpo en la parte dorso-ventral (LnDv), longitud de las comisuras bucales (Lboca), longitud de la aleta caudal de la parte más alta (AnCb), ancho de la aleta caudal a la altura de la cloaca (AnCm) y ancho de la cola en la parte terminal (AnCt), en las tres localidades, El Oyamel y El Valle en el parque nacional El Chico y la Laguna de Tecocomulco.

Análisis de Distancia

Se realizó un análisis de distancia morfológica para determinar la variación y el patrón de solapamiento entre las localidades mediante el método de promedios aritméticos no ponderados (UPGMA, por sus siglas en inglés). Estos métodos de distancia asignan a un individuo o un grupo a otro grupo o individuo más cercano o próximo (NCSS97, 2000), mediante un análisis de diferencias por pares.

Análisis de Correlaciones

Se utilizó para analizar la relación existente entre las variables y conocer si alguna de éstas influye directamente sobre otra variable. Debido a que estos métodos se emplean principalmente para conocer las posibles relaciones y significación entre series de datos o cuando, simultáneamente, se usan dos variables continuas, o variables discretas cuantitativas. Este estadístico se representa mediante el coeficiente de correlación (r) de Pearson. Algunas veces se suele usar (r^2), que es el coeficiente de determinación y da una medida entre 0 y 1, el cual corresponde a la cantidad de información compartida por dos características o variables continuas en los datos de la muestra (Johnson, 2000).

Con la finalidad de verificar cuál o cuáles de los caracteres morfológicos analizados se separaran a las localidades y a los individuos en grupos; se emplearon dos métodos multivariados (Análisis Discriminante y Análisis de Componentes Principales), los cuales resultan ser útiles para determinar la relevancia de los datos con una gran cantidad de variables. La importancia y la utilidad de estos métodos aumenta cuando se incrementa el número de localidades que se están evaluando (Johnson, 2000).

Análisis Discriminante (AD)

Es un método estadístico que se usa principalmente para clasificar unidades experimentales (localidades) o individuos, en dos o más poblaciones definidas de manera única para realizar una regla discriminante que clasifique las unidades experimentales en una de varias categorías posibles (McCune y Grace, 2002).

El principal objetivo de un análisis discriminante es el establecer una óptima separación de grupos basados en una transformación lineal de la variable predictiva.

En este análisis se utilizaron todos los caracteres morfológicos, para verificar cuál de los caracteres era el más consistente para la discriminación entre localidades e individuos; se introdujo un valor de tolerancia de 0.001, un valor de $F=4.00$ y una $p<0.05$, esto con la finalidad de que el análisis incorpore las variables que cumplan con este requisito. La técnica empleada en este modelo fue la de paso a paso (*forward*), la cual permite evaluar variable por variable, utilizando los valores propios estandarizados. Este análisis se realizó con el programa STATISTICA 6.0 para Windows (StatSoft, 2004).

Análisis de Componentes Principales (PCA)

El objetivo principal de este método es reducir la dimensionalidad (número de variables) del conjunto de datos (variables interrelacionadas), para encontrar las nuevas variables significativas subyacentes, las cuales son útiles para explicar las agrupaciones de conjuntos de datos, resultando que entre más cercanas se encuentren las poblaciones, más parecidas se suponen entre sí (Feinstein, 1996). La técnica de PCA se utilizó con la finalidad de agrupar y obtener el grado de semejanza entre localidades, utilizando todos los caracteres morfológicos; este análisis se realizó empleando el programa estadístico JMP (SAS, 2007).

Análisis de la Varianza Anidada (ANDEVA)

Este análisis se empleó con la finalidad de determinar si existen diferencias significativas entre las localidades y por individuo; así como en qué variables descritas anteriormente en el cuadro 1, se presentan dichas diferencias, tomando únicamente dos de los diez componentes principales (CP1 y CP2). El análisis se llevó a cabo anidando los individuos dentro de las localidades, tomando a las localidades como un factor fijo, mientras que los individuos fueron considerados como un factor al azar.

El porcentaje de la varianza para cada nivel de asociación, se determinó para cada uno de los factores anidados; este análisis se realizó utilizando el programa estadístico JMP (SAS, 2007).

Análisis Genético

Obtención de tejido

En total se utilizaron 56 muestras de tejido del músculo de la cola (1.5 – 2.0 cm), que se tomaron de los ejemplares recolectados en el área de estudio. De la cantidad de tejido colectado se ocupó el 50% de cada muestra para la extracción de DNA y el otro 50% se almacenó en criotubos debidamente etiquetados con el número de muestra, sitio y fecha de colecta y transferidos al ultracongelador (-85 °C) del laboratorio de Sistemática Molecular del CIB de la UAEH.

Extracción de DNA

La extracción de DNA se llevó a cabo utilizando dos técnicas no invasivas, las cuales consisten en obtener muestras de un organismo sin que tenga que ser destruido (sacrificado). El primer método es una versión modificada del protocolo descrito por Higuchi (1989; ver Anexo A), que consiste en la obtención de DNA a partir de un fragmento de tejido (1-2 cm). La extracción se realizó con una técnica de mini-preparaciones en tubos de 2.0 ml, utilizando *buffer* de digestión con detergentes, RNAasa y *proteínasa* K, con una extracción posterior con solventes orgánicos (fenol : cloroformo) y precipitación alcohólica (isopropanol : etanol). Sin embargo, el DNA obtenido con esta técnica resulta ser de baja calidad, que puede ser por el tipo de tejido empleado. En el segundo protocolo, se utilizó un *kit* de extracción de *Quiagen*TM basado en la purificación del DNA mediante membranas altamente selectivas, lo que permite la purificación del DNA total de manera fácil y rápida para su uso posterior en procesos de polimerización en cadena (ver Anexo A).

Con esta última técnica, es posible también recuperar fragmentos de DNA tan pequeños como 100 pares de bases (p.b.).

Tiene un sistema de *buffer* optimizado para permitir la destrucción de células de manera directa, seguida por la fijación selectiva de DNA a una membrana de gel de sílice. El procesamiento de centrifugación simple elimina los contaminantes y los inhibidores de enzimas, permitiendo el procesamiento simultáneo de muestras múltiples (Maldonado, 2006).

El DNA obtenido mediante las dos técnicas fue almacenado en alícuotas de trabajo con una concentración de 10 ng/μl a -20°C, previamente etiquetadas con el número del individuo y la población a la que pertenece, durante todo su uso.

Amplificación de las secuencias de microsatélites

Para la amplificación de marcadores genéticos se seleccionaron previamente 11 microsatélites reportados para dos especies del género *Ambystoma*: *A. maculatum* y *A. tigrinum* de los cuales sólo cuatro amplificaron mediante la técnica de PCR para *A. velasci* (Cuadro 1, ver Anexo A), cada uno de ellos amplifico con condiciones específicas (ver Anexo A).

Cuadro 1. Marcadores previamente seleccionados de *Ambystoma tigrinum* y *A. maculatum*, remarcándose con negrita los cuatro marcadores que amplificaron para la especie *Ambystoma velasci*.

Especie/Referencia	Marcadores			
<i>Ambystoma tigrinum</i> Mech, et al. (2003)	ATS5-6	ATS5-7	ATS10-7	ATS12-3
	ATS4-11	ATS4-20	ATS13-1	ATS14-3
<i>Ambystoma maculatum</i> Wieczorek (2002)	AmaA		Ama3-3	Ama9-4

Separación y revelado de los microsatélites

Los marcadores amplificados se separaron por peso molecular en un sistema de electroforesis vertical, usando geles de secuenciación en condiciones desnaturizantes de urea (7 M); el revelado de los fragmentos se realizó con la técnica de tinción con nitrato de plata (método estándar: Benbouza, *et al.*, 2006: Figura 6, ver Anexo A). Se evaluaron el tamaño y número de alelos amplificados obtenidos para cada microsatélite, verificando el intervalo de amplificación obtenido con respecto a lo reportado en la literatura. Posteriormente, se realizaron los análisis para variación y estructura genética con programas específicos de genética poblacional (Fstat, TFGA, POPGENE, Arlequin y Structure).

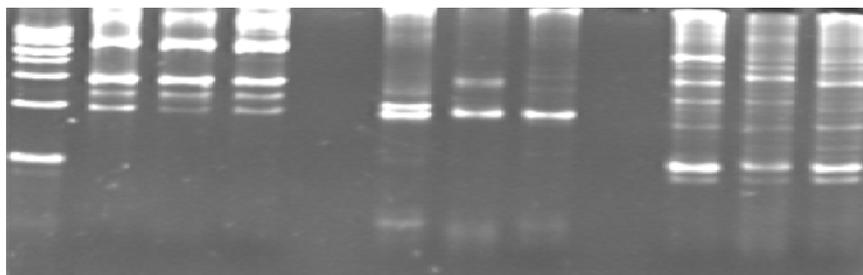


Figura 6. Revelado y separación de los marcadores amplificados mediante electroforesis vertical en poliacrilamida, teñidos con nitrato de plata.

Análisis de diversidad genética y estructura genética

Para el análisis de diversidad genética se utilizó como molde el DNA previamente extraído de los especímenes de *Ambystoma velasci* recolectados en la Laguna de Tecocomulco y los dos sitios del parque nacional El Chico. Las estimaciones se obtuvieron con base en las frecuencias alélicas de los cuatro microsatélites amplificados; los resultados fueron analizados con el programa de Fstat (Versión 2.9.3.2, 2002). Este análisis de diversidad se llevó a cabo para los tres sitios, obteniendo valores para la estructura genética y la estimación de flujo génico para los dos sitios de El Chico y Tecocomulco (Índice de fijación: R_{ST} y Índice de migración: Nm).

Con base en las frecuencias alélicas, porcentaje de polimorfismo y los estadísticos descriptivos de los heterocigotos, tanto esperados como observados, se realizaron las estimaciones para la variación genética, mediante la utilización de los programas TFPGA (Versión 1.3, 1997) y POPGENE (Versión 1.31, 1999). Esto permitió generar árboles de similitud (dendrogramas) entre las poblaciones, con la ayuda del método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Average*), el cual se basa en la hipótesis del reloj molecular, es decir, que la tasa de mutación (para los caracteres cualitativos) o la velocidad de cambio (para los rasgos cuantitativos) es constante para todas las ramificaciones del árbol (Hartl, 1999).

Para poder cuantificar la variabilidad o diversidad genética existen diversos estadísticos como por ejemplo, el porcentaje de *loci* polimórficos, el número de alelos por *locus*, el cual indica el número promedio de alelos que presenta un *locus* en una población; esta medida depende directamente del número de individuos, también es útil para medir la variabilidad críptica en los *loci*. La heterocigosidad es considerada como la mejor medida de la variación genética y se analiza con la heterocigosidad observada (H_o), la cual es definida como la frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en la muestra para cualquiera de los *loci*; mientras que la esperada (H_e), se define como la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de una población sean diferentes (Crow y Kimura, 1970).

Los métodos de distancias genéticas son estimadores del tiempo de separación entre poblaciones, los cuales asignan el individuo a la población genéticamente más cercana o próxima; por ejemplo el método de distancia de Nei el cual implica la relación entre individuo-población, considerando a los individuos como una muestra de dos genes (con valores de 0, 0.5 y 1), basado en diferencias genéticas existentes dentro y entre poblaciones (Goldstein y Shlotterer, 1999; Aranguren-Méndez *et al.*, 2001, 2005).

Con el fin de verificar diferencias de los individuos entre y dentro de grupos, se obtuvieron mediante el análisis molecular de la varianza (AMOVA), la estructura genética de las tres poblaciones y las estimaciones de los índices de Wright (1965) o estadísticos F (F_{IS} , F_{IT} y F_{ST}).

que han mostrado ser una de las herramientas más útiles para analizar patrones de estructura poblacional; estos estadísticos son definidos como la correlación entre unidades gaméticas a diferentes niveles en la población (Aranguren-Méndez *et al.*, 2002, 2005).

F_{IS} se define como el nivel de endogamia o apareamiento entre individuos con relaciones cercanas, con intervalos de valores de 0 a 1; F_{IT} es el balance entre deriva y flujo génico de los individuos dentro y entre poblaciones, con un intervalo de valores de -1 a 1. Estos dos estadísticos explican la correlación entre dos unidades gaméticas tomada al azar y el total de la población como un todo y F_{ST} es el nivel de diferenciación entre poblaciones, con un intervalo de valores de 0 a 1; esto se realizó con la ayuda de programa ARLEQUIN (Versión 3.01, 2006).

Finalmente, con la ayuda del programa Structure (Versión 2.2, 2007), se realizó un estudio de afinidad genética, mediante un análisis estadístico de asociación por máxima verosimilitud, el cual permitió un agrupamiento por semejanza de los alelos para cada una de las poblaciones, además de determinar la estructura genética de las poblaciones.

RESULTADOS

Análisis morfológicos

Se encontró que hay dos grupos claramente definidos (Figura 7). El grupo uno, está formado por las dos localidades de el parque nacional El Chico (El Valle y El Oyamel), mientras el segundo grupo está formado por los individuos de Tecocomulco. De acuerdo a este diagrama de agrupación, todos los individuos examinados del grupo uno son muy parecidos morfológicamente (tallas corporales y forma/tamaño de extremidades, similares), esto posiblemente debido a la cercanía que existe entre ambas localidades y que comparten el mismo tipo de hábitat (bosque de pino-encino). Mientras que los individuos del grupo dos son considerablemente más grandes, con longitudes hocico-cloaca sensiblemente mayores, aunque la proporción de forma/tamaño de las extremidades se mantiene.

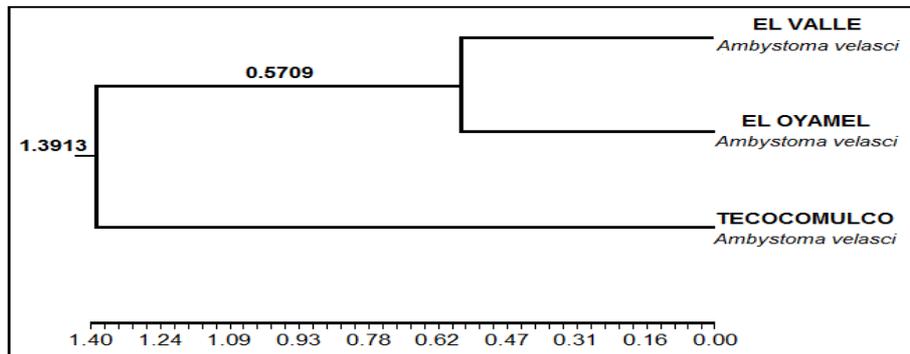


Figura 7. Resultados del análisis de agrupación que muestra la similitud entre las tres localidades, con respecto a los caracteres morfológicos.

Análisis de Correlaciones

Con este análisis se observó la relación existente entre las variables, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (r), con el criterio >0.4 ; las variables que se correlacionaron positivamente fueron: LT y LHC, LT y LC, LC y Lant., LHC y AnCr, LC y AnCr, AnDv y AIDv, Lfem. y AnCr, AnCb y AnCm con una probabilidad de $p < 0.0001$; mientras que las variables que se correlacionaron negativamente con un valor > -0.4 fueron: Ltib. y LCr, Ltib. y AnCb (Cuadro 2).

Cuadro 2. Matriz de correlación de los 16 caracteres morfológicos que se midieron para 56 individuos de *Ambystoma velasci* en las tres localidades (Laguna de Tecocomulco, El Oyamel y El Valle). *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$; ****= $p < 0.0001$, ns= no significativo.

	LT	LHC	LC	Lant.	Lfem.	Ltib.	Lex/ex	L4dpp	AnCr	LCr	AIDv	AnDv	Lboca	AnCb	AnCm
LHC	0.51****														
LC	0.564****	-0.10****													
Lant.	-0.21****	0.08****	0.42****												
Lfem.	-0.09****	-0.02****	-0.21****	0.2****											
Ltib.	0.31****	-0.12****	-0.19****	0.28****	0.16****										
Lex/ex	0.15****	0.16****	0.05****	0.27****	-0.09****	0.07****									
L4dpp	0.18****	-0.24****	0.25****	-0.09****	0.36****	0.11****	-0.03****								
AnCr	-0.12****	0.43****	0.40****	-0.15****	0.50****	-0.03****	-0.07****	-0.11****							
LCr	0.06****	-0.01****	-0.29****	0.10****	0.05****	-0.41****	0.04****	0.26****	0.33****						
AIDv	0.01****	-0.04****	0.23****	0.14****	0.21****	0.13****	-0.02****	-0.06****	-0.09****	0.33****					
AnDv	0.05****	-0.06****	-0.14****	-0.05****	-0.21****	0.24****	-0.03****	-0.08****	0.26****	0.06****	0.46****				
Lboca	-0.12****	0.05****	-0.001****	0.14****	-0.12****	0.002****	0.24****	0.20****	0.26****	0.11****	-0.30****	0.32****			
AnCb	0.31****	-0.32****	-0.11****	0.16****	0.31****	-0.58****	-0.04****	-0.18****	0.09****	-0.34****	0.08****	0.35****	0.02****		
AnCm	-0.25****	0.23****	0.01****	-0.17****	-0.37****	0.60****	0.10****	0.14****	0.18****	0.34****	-0.09****	-0.35****	-0.13****	0.84****	
AnCt	-0.16****	0.39****	-0.02****	0.09****	-0.10****	0.36****	-0.24****	0.21****	-0.10****	0.19****	-0.14****	-0.03****	-0.15****	0.21****	-0.02****

Análisis Discriminante

Los resultados para este análisis entre las localidades muestran la separación de las tres poblaciones bien diferenciadas, Tecocomulco, El Oyamel y El Valle (Figura 8). Esta separación está determinada de acuerdo con los valores propios de cada una de las funciones discriminantes (FD) y de acuerdo con las variables que obtuvieron los valores más altos en este análisis, determinando que sólo nueve de las 16 variables resultan ser informativas para la exclusión entre localidades (Cuadro 3).

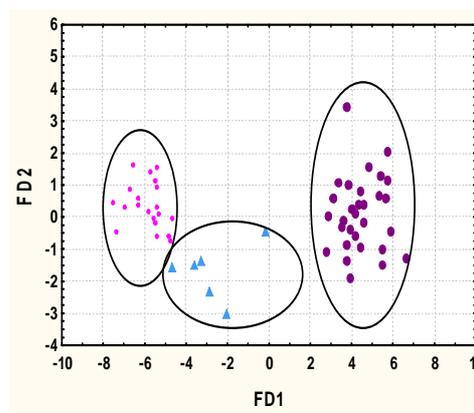


Figura 8. Análisis discriminante entre localidades, a partir de los caracteres que tuvieron los valores más altos. Con azul se representa la localidad de Tecocomulco, con rosa la localidad de El Valle y con verde la Localidad de El Oyamel.

Las variables que son más importantes para la exclusión entre localidades, determinadas con el valor relativo dentro de cada FD que corresponde a la función discriminante, FD1 y FD2, que están a su vez establecidos por los valores propios, los cuales explican la mayor variación, estipulando cuáles variables contribuyen más para la separación en grupos (Cuadro 3), son: la longitud hocico-cloaca (LHC), longitud de la cola (LC), longitud del antebrazo (Lant.), longitud del fémur (Lfem.), largo del cráneo (LCr), el ancho de la parte dorso-ventral (AnDv) y las tres variables relacionadas con el ancho de la cola, ancho de la cola en la parte basal, (a la altura de la cloaca, AnCb), ancho de la cola en la parte media (AnCm) y el ancho de la cola en la parte terminal (AnCt).

Cuadro 3. Análisis discriminante entre localidades, en este cuadro se muestra con negritas los caracteres que obtuvieron los valores más altos y que apoyan al primer eje de ordenación. El valor relativo dentro de cada FD indica las variables que son más importantes para la exclusión entre localidades.

Localidades		
Variable	FD1	FD2
LT	0.17366	0.02850
LHC	0.59399	-0.57673
LC	0.13984	1.14328
Lant.	0.35621	-0.60300
Lfem.	-0.06402	0.82369
Ltib.	0.09852	-0.23924
Lex./ex.	0.19249	0.12653
L4dpp	-0.05758	-0.64830
AnCr	-0.01736	-0.04723
LCr	0.45000	-0.58234
AIDv	-0.21598	-0.37948
AnDv	0.40057	0.75558
Lboca	-0.46029	-0.04667
AnCb	0.51688	-1.54060
AnCm	-0.40017	1.43398
AnCt	0.02402	0.71068
Constante	-12.3830	2.092719
Eigenval	24.9385	0.384117
Cum.Prop	0.98	0.02
Significacancia	<0.0001	<0.0001

Con las asociaciones y diferencias existentes entre las variables se pueden establecer morfotipos que agrupan las poblaciones. En este caso, se agruparon las tres localidades de acuerdo con las variables que aportaron mayor diferenciación entre las localidades. En la figura 10 se observa que las variables relacionadas con el tamaño corporal, tales como la longitud total (LT), longitud hocico-cloaca (LHC), la longitud de la cola (LC), longitud de extremidad a extremidad (Lex./ex.), el ancho y largo del cráneo (AnCr y LCr), el ancho y la altura dorso-ventral (AIDv y AnDv), así como las mediadas relacionadas a el ancho de la cola (AnCb y AnCm), separan claramente a la localidad de Tecocomulco, mientras El Oyamel se diferencia claramente de El Valle con las variables relacionadas con la talla de los individuos, como la longitud total (LT) y la longitud hocico-cloaca (LHC).

De acuerdo con estos resultados, se tienen los siguientes morfotipos por localidad (Figura 9): en Tecocomulco, se presentan individuos con cuerpos muy grandes, con tamaños corporales superiores a los 200 mm, con colas muy largas (casi el 50% de la longitud total del cuerpo), la longitud entre extremidades es amplia (60 mm), con cráneos grandes. Las poblaciones de El Chico presentan morfotipos muy parecidos entre sí; sin embargo, el morfotipo para la localidad de El Valle se caracteriza por individuos delgados, tamaños corporales (longitud) intermedios, con respecto a las otras dos localidades; la longitud del cráneo es mayor que el ancho del mismo, siendo éste un carácter importante para diferenciar a los individuos de esta localidad. Por otra parte, en la localidad de El Oyamel se pueden observar morfotipos con tamaños corporales pequeños (menos de 100 mm), la longitud de hocico-cloaca (LHC) es superior al tamaño de la cola (LC), colas cortas y cuerpos estrechos.

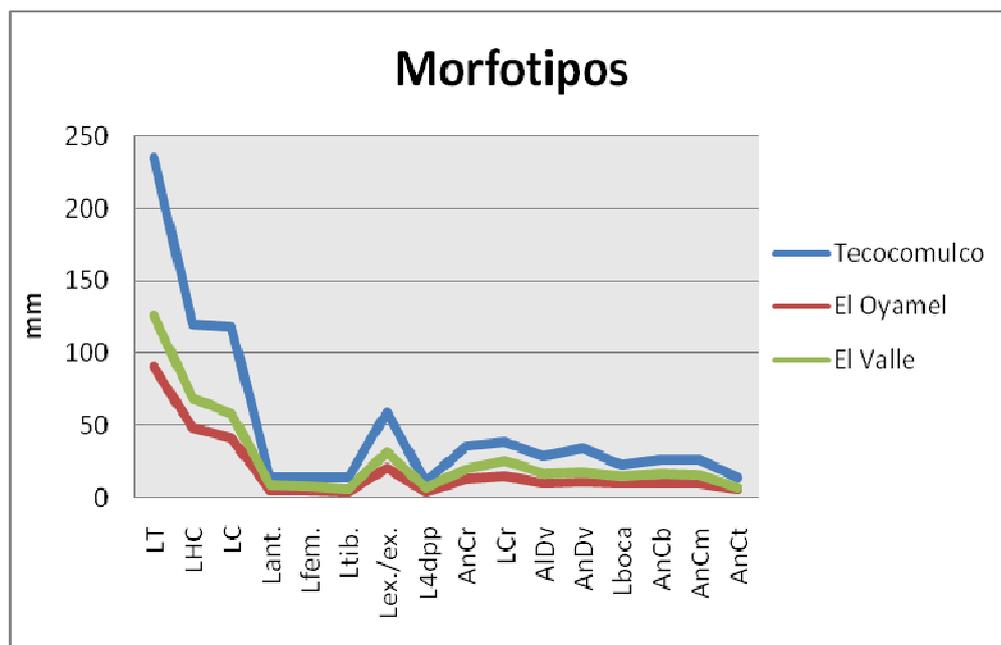


Figura 9. Morfotipos distintivos entre localidades. En el eje vertical se observan las medidas en milímetros (mm) y en el eje horizontal las 16 variables.

Análisis de Componentes Principales (PCA)

Los resultados para este análisis de las tres poblaciones con el total de las 16 medidas consideradas, indican que son altamente variables; también se muestra que con dos componentes resulta posible explicar el 99.554% de la varianza, mostrando el 56.69% del total de la variación en el componente uno (CP1; variables significativas: longitud total y longitud de la cola); y el componente dos (CP2; variables significativas: longitud hocico-claca, ancho y largo del cráneo y las tres medidas asociadas a la cola) con un porcentaje de 46.86 para el total de la varianza explicada. La longitud de la tibia (Ltib.) con un valor de 56.17% y el ancho dorsoventral (AnDv) con 52.18% son los caracteres con mayor porcentaje (superior al 50%) de coeficiente de varianza (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de componentes principales. El coeficiente de variación, está dado por la desviación estándar (DS/media*100). Con negrita se indican que Ltib. y AnDv son los coeficientes de variación que obtuvieron los valores más altos y las variables significativas asociadas a los componentes principales uno y dos (CP1: LT y LC; CP2: LHC, LCr, AnCr, AnCb, AnCm y AnCt)

Variable	Unidades	Media	DS	CV	CP1	CP2
LT	mm	172.01	72.67	42.24	0.02036	-0.018638
LHC	mm	89.39	35.46	39.66	-0.036775	0.044778
LC	mm	84.39	39.06	46.28	0.024621	-0.025954
Lant.	mm	10.18	3.90	38.31	-0.000635	0.001009
Lfem.	mm	9.87	4.56	46.20	-0.003319	0.004092
Ltib.	mm	9.31	5.23	56.17	-0.001133	0.001569
Lex./ex.	mm	42.69	19.57	45.84	0.001212	-0.000201
L4dpp	mm	8.18	3.43	41.93	-0.00117	0.001571
AnCr	mm	25.75	10.61	41.20	-0.009949	0.01216
LCr	mm	28.88	11.80	40.85	-0.019261	0.022952
AIDv	mm	20.94	10.04	47.94	0.000871	-0.000418
AnDv	mm	24.24	12.65	52.18	-0.002688	0.003776
Lboca	mm	17.34	7.18	41.40	-0.00491	0.006124
AnCb	mm	19.63	8.87	45.18	-0.013948	0.016589
AnCm	mm	19.90	9.06	45.52	-0.017774	0.021
AnCt	mm	10.11	4.89	48.36	-0.010489	0.012345
(%) Varianza					56.692	46.862
Total						99.554

Análisis de la Varianza Anidada (ANDEVA)

Para este análisis se llevó a cabo el ANDEVA, utilizando dos de los diez componentes principales, encontrándose diferencias morfológicas significativas entre las tres localidades analizadas. Sólo los caracteres morfológicos longitud de la tibia (Ltib) y el ancho de la parte dorso-ventral (AnDv) mostraron diferencias entre las localidades (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de la Varianza Anidada (ANDEVA). Para este análisis se tomaron dos de los 10 componentes principales CP1 y CP2. Se anidaron los individuos tomados como un factor al azar, dentro de las localidades, como un factor fijo.

Variable	Factor	gl	SC	F (%Var.)	P
CP1	Localidad	2	599.884	370.5196	<0.0001
	Individuo [Loc,Indv]	3	3.80286	1.5760	<0.0001
	Modelo	5	697.56555	0.804	<0.0001
	Error	50	40.21741		
	Total	55	737.78296		
CP2	Localidad	2	0.17244	0.1293	0.01
	Individuo [Loc,Inv]	3	9.36734	4.8868	0.01
	Modelo	5	9.841129	3.0804	0.01
	Error	50	31.948029		
	Total	55	41.789158		

Análisis genético

Diversidad genética

Los cuatro microsatélites seleccionados, amplificaron para todas las muestras obtenidas, detectándose un total de 42 alelos (Cuadro 6).

Cuadro 6. Frecuencias alélicas por *locus* y entre localidades. Para cada *locus* se muestran las frecuencias obtenidas por muestra. Tecocomulco se muestra como Loc_1, El Oyamel como Loc_2 y El Valle como Loc_3. Los asteriscos indican que no se encuentran esos alelos.

Alelo	Locus ATS5-6			Locus ATS5-7			Locus ATS10-7			Locus ATS12-3		
	Loc_1	Loc_2	Loc_3	Loc_1	Loc_2	Loc_3	Loc_1	Loc_2	Loc_3	Loc_1	Loc_2	Loc_3
1	****	0.075	****	0.019	****	****	****	0.079	****	****	0.225	****
2	0.018	****	****	0.074	****	****	****	0.026	****	****	0.100	0.125
3	****	0.025	****	0.019	****	****	****	0.026	0.167	0.067	0.075	****
4	****	0.025	****	0.019	****	****	0.023	0.105	****	0.067	0.225	****
5	0.018	****	****	0.074	****	****	0.068	0.026	****	0.067	0.225	****
6	****	0.075	0.100	0.019	****	****	0.023	0.105	****	0.067	0.225	0.125
7	****	0.050	****	0.019	****	****	0.068	0.026	****	0.050	0.225	****
8	****	0.075	****	0.093	****	****	0.091	0.053	****	0.017	****	****
9	****	0.050	****	0.019	****	****	0.068	0.026	****	0.017	0.050	****
10	0.018	0.100	0.100	0.019	****	****	0.046	0.026	0.083	0.017	0.050	****
11	0.125	0.050	0.400	0.074	****	****	0.046	****	****	****	0.050	****
12	0.232	0.050	****	0.037	****	****	0.023	****	****	****	0.025	****
13	0.036	0.025	****	0.019	****	****	0.068	0.026	0.083	0.050	0.075	0.375
14	0.036	0.025	****	0.019	0.053	0.100	****	0.053	****	0.017	****	****
15	****	0.050	****	0.074	0.079	0.100	****	0.026	****	****	0.050	****
16	0.054	****	****	0.074	0.158	****	****	0.026	****	****	0.025	0.250
17	0.125	0.050	****	0.037	0.053	****	0.023	0.053	****	0.017	****	****
18	0.321	0.075	****	0.037	0.026	****	****	0.105	****	****	0.025	****
19	0.018	0.025	0.300	0.093	0.105	0.100	****	0.026	****	0.033	****	****
20	****	0.025	****	0.056	0.105	****	0.023	0.026	****	0.033	****	****
21	****	0.050	0.100	****	0.053	****	0.068	0.026	****	0.133	****	****
22	****	0.025	****	0.037	0.026	0.100	0.068	****	0.083	0.033	****	****
23	****	0.025	****	0.056	0.026	****	0.023	0.053	0.083	0.117	0.025	****
24	****	0.050	****	****	0.053	0.200	****	0.026	0.167	0.100	0.050	0.125
25	****	****	****	****	0.079	0.100	0.114	0.053	****	0.100	****	****
26	****	****	****	0.019	****	****	0.136	****	0.250	****	0.025	****
27	****	****	****	****	0.105	0.100	0.023	****	0.083	****	0.025	****
28	****	****	****	****	****	0.200	0.026	****	****	****	****	****
29	****	****	****	****	****	****	0.026	****	****	****	****	****
30	****	****	****	****	****	****	0.026	****	****	****	****	****

Los niveles de variación genética fueron diferentes entre las localidades y dentro de los cuatro *loci* analizados. La muestra con mayor diversidad genética fue la localidad de El Valle con un valor de 0.975; mientras que Tecocomulco presentó los valores más bajos de 0.821.

El *locus* ATS5-7 mostró la mayor información con respecto a la diversidad genética con un valor promedio total de 0.961, mientras que el *locus* ATS5-6 presentó la menor información respecto a la diversidad genética con un promedio de 0.879 (Cuadro 7).

Cuadro 7. Diversidad genética por *locus* y localidad.

Diversidad Genética				
Locus/Localidad	Tecocomulco	El Oyamel	El Valle	Promedio
ATS5-6	0.821	0.968	0.850	0.879
ATS5-7	0.962	0.946	0.975	0.961
ATS10-7	0.946	0.962	0.950	0.952
ATS12-3	0.939	0.932	0.917	0.929
Promedio	0.917	0.952	0.923	

La mayor riqueza alélica se encuentra en la localidad de Tecocomulco, con un valor promedio de 6.785, mientras que El Oyamel es la localidad con menor riqueza alélica con un valor promedio de 5.572. EL *locus* ATS10-7 proporcionó la mayor información en cuanto a la riqueza alélica con un valor promedio de 6.733, mientras que el *locus* ATS5-6 presenta el valor promedio más bajo de 5.873 (Cuadro 8).

Cuadro 8. Riqueza alélica por *locus* y localidad.

Riqueza Alélica				
Locus/Localidad	Tecocomulco	El Oyamel	El Valle	Promedio
ATS5-6	7.111	4.400	6.109	5.873
ATS5-7	6.497	6.756	6.917	6.723
ATS10-7	7.048	6.133	7.018	6.733
ATS12-3	6.485	5.000	6.832	6.105
Promedio	6.785	5.572	6.719	

Los cuatro *loci* fueron 100% polimórficos. Los valores de heterocigosidad observada por *locus* fueron menores a la heterocigosidad esperada, probablemente por un efecto de deriva genética considerable. Mientras que el *locus* ATS10-7 con mayor heterocigosidad observada presenta un valor de 0.874, presentando menor diferencia entre la Heterocigosidad observada y la esperada (Cuadro 9).

Cuadro 9. Sumario de heterocigosidad de Nei; para cada *locus* se indica; heterocigotos observados (Ho), heterocigotos esperados (He), heterocigosidad (Ht) y porcentaje de polimorfismo (%P).

Locus	Ho	He	Ht	%P
ATS5-6	0.671	0.874	0.922	100
ATS5-7	0.742	0.962	0.960	100
ATS10-7	0.874	0.948	0.961	100
ATS12-3	0.757	0.920	0.946	100
Media	0.761	0.926	0.947	100

La riqueza alélica fue estimada mediante un análisis comparativo entre localidades, por medio de la heterocigosidad observada y esperada. En la comparación de las localidades de Tecocomulco *versus* la localidad de El Oyamel se obtuvo una riqueza alélica con un valor de 7.717, siendo el mayor valor obtenido de las demás combinaciones entre las localidades. En los análisis individuales por cada una de las muestras, los valores de heterocigosidad esperados son mayores a los observados, es decir que existe una gran riqueza alélica en las tres localidades, lo que genera un reservorio genético importante en todos los grupos (Cuadro 10).

Cuadro 10. Análisis de grupos para las localidades de *Ambystoma velasci*. Para cada comparación se muestra la riqueza alélica, los heterocigotos observados (Ho) y los heterocigotos esperados (He).

Parámetros/ Localidades	Tecocomulco vs. El Oyamel	Tecocomulco vs. EL Valle	EL Oyamel vs. EL Valle	Tecocomulco vs. El Oyamel vs. El Valle
Riqueza alélica	6.487	5.880	6.179	6.182
Ho	0.842	0.785	0.815	0.818
He	0.932	0.916	0.943	0.929

Estructura genética

Índices de Wright o estadísticos “F”

Para el análisis de diferenciación genética entre los individuos de una especie, mediante el índice de F_{IS} (niveles de endogamia), el valor promedio para las tres localidades es de 0.185, mientras que la localidad de El Valle, con un valor promedio de 0.359, fue la que presentó la menor diferenciación genética entre todos sus individuos; mientras que, con un valor promedio de 0.085, la localidad de El Oyamel presentó la mayor diferenciación genética entre sus individuos (Cuadro 11). El *locus* que detectó mayor diferenciación entre individuos de una localidad fue ATS10-7, con un valor promedio de 0.083 y, por el contrario, con un valor de 0.243, el *locus* ATS5-6 evidenció una menor diferenciación genética entre sus individuos. Esto indica, en general, bajos niveles de endogamia en todas las poblaciones analizadas (Cuadro 11).

Cuadro 11. Diferencias genéticas entre individuos de la especie *Ambystoma velasci* (F_{IS} = nivel de endogamia) por *locus* y por localidad. El valor remarcado representa el promedio de F_{IS} para el total de las muestras analizadas.

Población /Locus	Tecocomulco	El Oyamel	El Valle	Promedio
ATS5-6	0.130	0.071	0.529	0.243
ATS5-7	0.230	0.277	0.179	0.228
ATS10-7	-0.009	-0.040	0.298	0.083
ATS12-3	0.073	0.034	0.455	0.187
Promedio	0.106	0.085	0.359	0.185*

Para F_{IT} , el valor promedio para las tres localidades analizadas fue de 0.1448. El *locus* con mayor frecuencia fue el ATS10-7, con un valor promedio de 0.1824, seguido del *locus* ATS12-3 con un valor promedio de 0.1588, mientras que el *locus* ATS5-7, con un valor de 0.1118, fue el más bajo. Es decir, que para el balance entre deriva y flujo génico, este último aparentemente es el que influye de forma significativa en la estructura genética interpoblacional (Cuadro 12).

Cuadro 12. Diferencias entre individuos con respecto a su especie (F_{IT}). El valor remarcado representa el promedio para el total de las muestras analizadas.

Locus	F_{IT}
ATS5-6	0.1275
ATS5-7	0.1118
ATS10-7	0.1824
ATS12-3	0.1588
Promedio	0.1448

Para las muestras analizadas, el valor promedio de F_{ST} fue de 0.04055, la localidad de El Valle registró la mayor diferenciación con un valor total de 0.04259, seguido de las localidades de Tecocomulco con un valor de 0.04009 y El Oyamel con un valor de 0.0389. Estos datos indican que no existe una diferenciación genética interpoblacional significativa, es decir, la estructura genética dentro de cada población está determinada más bien por diferencias entre las frecuencias de alelos y/o genotipos, más que por la acumulación de alelos distintos (exclusivos) o el establecimiento de genotipos específicos en cada población (Cuadro 13).

Cuadro 13. Diferencias genéticas entre localidades de la especie *Ambystoma velasci* (F_{ST}). El valor remarcado representa el promedio de F_{ST} para el total de las muestras analizadas.

Localidad	F_{ST}
Tecocomulco	0.04009
EL Oyamel	0.03899
El Valle	0.04259
Promedio	0.04055

Finalmente, en la Figura 10 se indican gráficamente los valores de F_{IS} (nivel de endogamia), F_{ST} (nivel de diferenciación entre poblaciones) y F_{IT} (balance entre deriva y flujo génico) con los valores obtenidos para el total de las poblaciones (Cuadro 14), observándose que el índice F_{IT} (diferencias entre individuos) es el más significativo para determinar las diferencias dentro y entre poblaciones; es decir, que las diferencias básicas entre los grupos (poblaciones) está dada por las frecuencias de alelos y su asociación aleatoria como genotipos específicos en cada grupo;

también se observan los valores promedio para los estadísticos “F”, los cuales fueron descritos anteriormente (Cuadro 14, Figura 10).

Cuadro 14. Estadísticos “F” de Wright en la cual se indican los valores promedio obtenidos para los tres indicadores.

Estadísticos “F”	Frecuencias
F_{IS}	0.1157
F_{ST}	0.0332
F_{IT}	0.1448

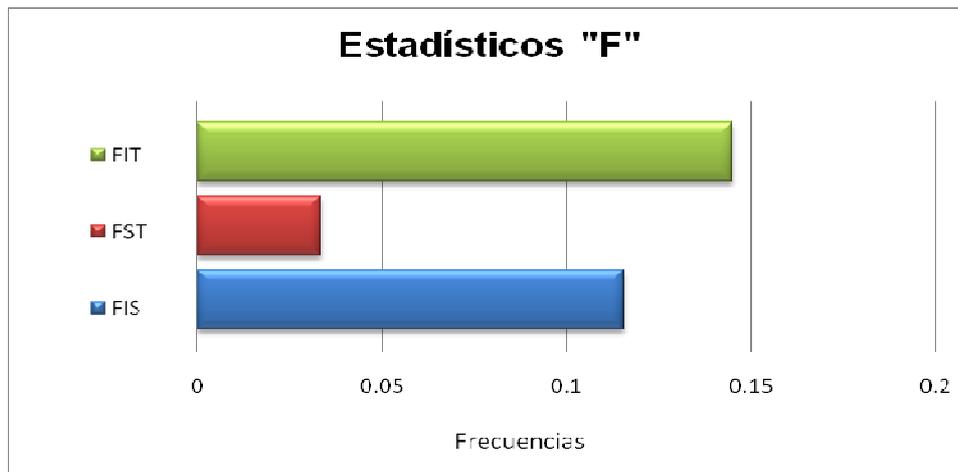


Figura 10. Estadísticos “F” para el total de las muestras analizadas en el que se indica que índice que tiene mayor frecuencia (F_{IT}).

Distancias y flujo génico entre localidades

En la matriz de distancia de Nei (1972) se muestran las diferencias genéticas entre los pares de grupos (Cuadro 15), en la cual las localidades con el valor más alto de distancia genética son El Valle y Tecocomulco con un valor de 1.2160, lo que es de esperarse, debido al poco o nulo desplazamiento de los individuos entre estas poblaciones, especialmente tomando en cuenta que existe un aislamiento geográfico considerable entre ambas localidades, mientras que las poblaciones de El Oyamel y Tecocomulco presentan menor distancia genética, pues muy probablemente se deba a que tienen menor tiempo de haberse separado.

Cuadro 15. Comparación de distancias genéticas de Nei (1972) entre localidades de la especie *Ambystoma velasci*. Sobre la diagonal se muestra la identidad genética y bajo la diagonal la distancia genética.

	Tecocomulco	El Oyamel	El Valle
Tecocomulco	****	0.4199	0.2964
El Oyamel	0.8677	****	0.3784
El Valle	1.2160	0.9717	****

Se realizó un dendrograma con la ayuda del programa TFGA (Versión 1.3, 1997), utilizando los datos de la matriz de distancia genética para las tres localidades, el cual muestra dos grupos; el primero, formado por las localidades de Tecocomulco y El Oyamel y un segundo grupo, representado por la localidad de El Valle lo que indica que probablemente Tecocomulco y El Oyamel tienen menor tiempo de haberse separado y que aún comparten alelos ancestrales (Figura 11).

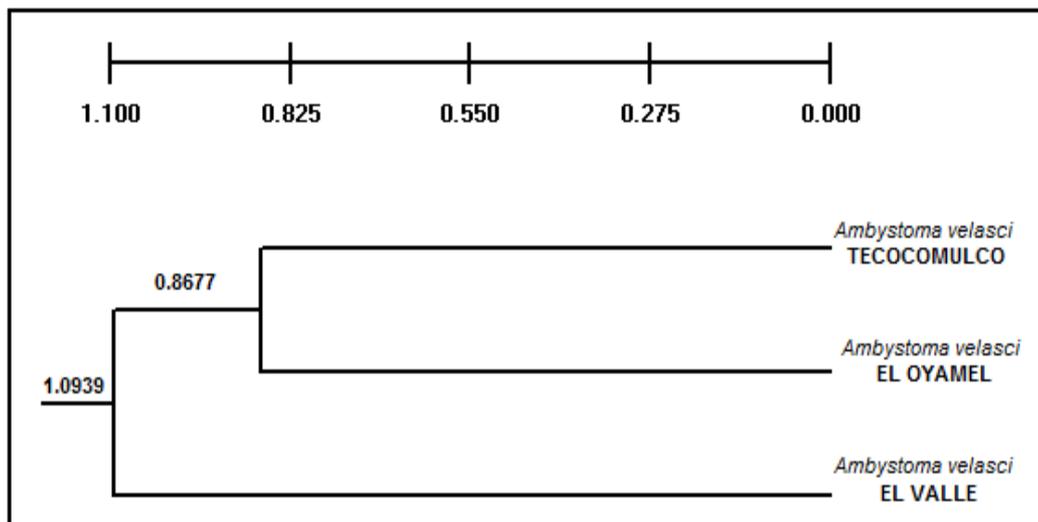


Figura 11. Dendrograma que muestra las relaciones genéticas entre las localidades analizadas (UPGMA con 1000 repeticiones de remuestreo o *bootstrap*).

Para los resultados de flujo génico mediante el índice de migración para pares de muestras (M), se observa que las localidades con menor intercambio de migrantes son El Valle y Tecocomulco (Cuadro 16).

Cuadro 16. Matriz de Flujo génico entre pares de muestras para las poblaciones de la especie de *Ambystoma velasci* (M=2Nm). Se muestran remarcadas las poblaciones con menor flujo génico.

	Tecocomulco	El Oyamel	EL Valle
Tecocomulco	*****	*****	*****
El Oyamel	14.19687	*****	*****
El Valle	7.72346	12.69772	*****

Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

Se realizaron tres análisis de la varianza molecular (AMOVA); en el primero se analizó la varianza molecular calculada mediante el método de diferenciación alélica (F_{ST}) entre y dentro de las tres localidades de estudio. El segundo análisis fue calculado entre muestras de cada localidad, entre individuos de cada muestra y diferencias alélicas entre el total de los individuos y, finalmente, *locus por locus*, en este último se estimó la variación para cada *loci* entre muestras y entre individuos.

Para el primer análisis se muestra que el 96% de la variación total se encuentra dentro de las muestras y sólo un 4% entre ellas (Cuadro 17). Para el índice de fijación F_{ST} , el valor encontrado fue de 0.03997, el cual es significativamente diferente a cero ($P < 0.05$), esto con 1023 permutaciones, reflejando escasa diferenciación genética entre las diferentes localidades analizadas.

Cuadro 17. Componentes de la varianza molecular calculado a partir del método de diferencias alélicas (F_{ST}) entre y dentro de las tres muestras de estudio.

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre muestras	2	8.633	0.07686 Va	4
Dentro de las muestras	109	201.242	1.84625 Vb	96
Total	111	209.875	1.92311	100 %
Índice de fijación F_{ST}: 0.03997				

En el segundo análisis se muestra que el 78.06% de la variación total se encuentra entre el total de los individuos, el 18.53% de la variación total se encuentra entre los individuos dentro de las muestras y el 3.41% entre las muestras (Cuadro 18).

Cuadro 18. Componentes de la varianza molecular calculados a partir del método de diferenciación alélicas (F_{ST}) entre muestras, entre individuos dentro de cada muestra y diferencias alélicas entre el total de los individuos.

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre muestras	2	8.633	0.06548 Va	3.41
Entre individuos dentro de las muestras	53	117.242	0.35605 Vb	18.53
Entre individuos	56	84.000	1.50000 Vc	78.06
Total	111	209.875	1.92153	100%

Para el último análisis *locus por locus*, se observó el 6.23397% de la variación total entre muestras, y el 99.11694% de la variación dentro de las poblaciones, mientras que el *locus* ATS5-6 fue el que presentó mayor variación entre muestras y el *locus* ATS5-7 dentro de las muestras; por el contrario, el *locus* ATS5-7 presentó el menor porcentaje de variación entre muestras y el *locus* ATS5-6 dentro de las muestras (Cuadro 19).

Cuadro 19. Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA), *locus por locus*.

Variación entre muestras				
<i>Locus</i>	Suma de Cuadrados	g.l.	Componentes de la Varianza	Porcentaje de variación
ATS5-6	2.77917	2	0.02945	6.23397
ATS5-7	1.22500	2	0.00424	0.88306
ATS10-7	2.09345	2	0.01813	3.76252
ATS12-3	2.53571	2	0.02503	5.12572
Variación dentro de las muestras				
<i>Locus</i>	Suma de Cuadrados	g.l.	Componentes de la Varianza	Porcentaje de variación
ATS5-6	48.28333	109	0.44297	93.76603
ATS5-7	51.90000	109	0.47615	99.11694
ATS10-7	50.55833	109	0.46384	96.23748
ATS12-3	50.50000	109	0.46330	94.87428

Dinámica de flujo génico

Los individuos de cada una de las localidades se identificaron y se agruparon siguiendo el criterio de discriminación, asignado mediante la estrategia de máxima verosimilitud:

- Individuos sin mezcla: >95% de alelos paternos
- Mezclas incipientes: 80 – 95% de alelos paternos
- Intercambio genético en F_2 : 60 – 80% de alelos paternos
- Intercambio genético en F_1 : 45 – 60% de cada grupo alélico

Del total de los individuos analizados, se encontraron que el 25% de el total de la muestras analizadas son individuos sin mezcla, el 5% individuos con mezclas incipientes, 24% individuos que presentan intercambios genéticos en F_2 y 2% individuos con intercambio genético en F_1 (ver Anexo B).

También se aplicó el mismo criterio para cada una de las muestras analizadas, obteniendo 25 individuos sin mezcla alélica y cinco individuos con mezclas incipientes, para un total de 30 individuos para la localidad de Tecocomulco; para la localidad de El Oyamel con un total de 20 individuos se obtuvo un individuo con intercambio genético en F_1 y 19 individuos que presentan intercambio genético en F_2 . Finalmente, para la localidad de El Valle con un total de seis individuos se registraron un solo individuo con intercambio genético en F_1 y cinco individuos con intercambio genético en F_2 (Cuadro 20 y Figuras 12, 13, 14 y 15).

Cuadro 20. Proporción de los alelos encontrados en cada una de las localidades.

Proporción	Tecocomulco	El Oyamel	El Valle
Individuos sin mezcla	0.833	0	0
Mezclas incipientes	0.166	0	0
Intercambio genético en F_1	0	0.05	0.166
Intercambio genético en F_2	0	0.95	0.833
Total	1	1	1

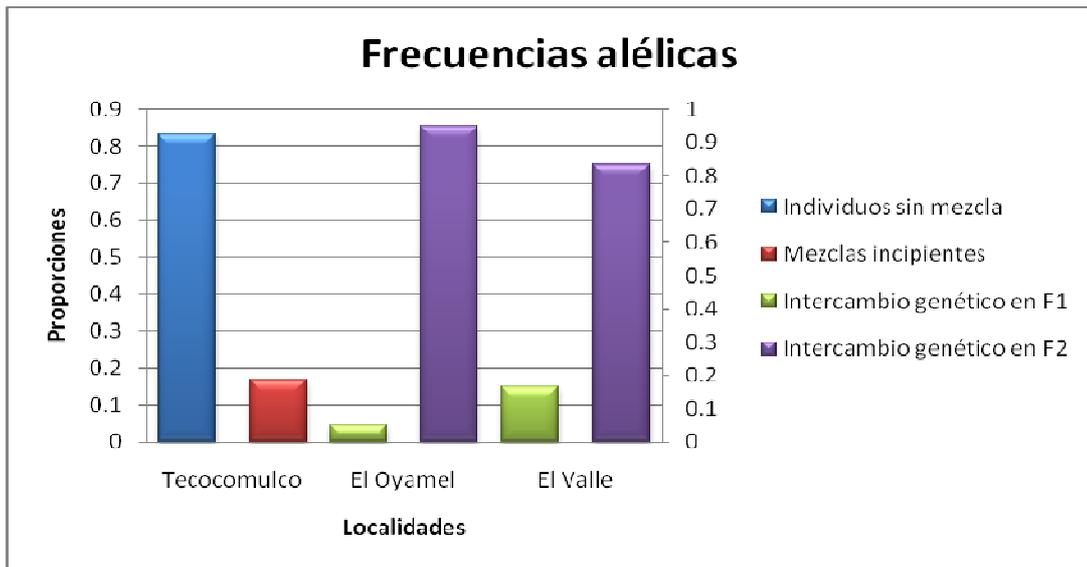


Figura 12. Frecuencias alélicas encontradas en cada una de las muestras.

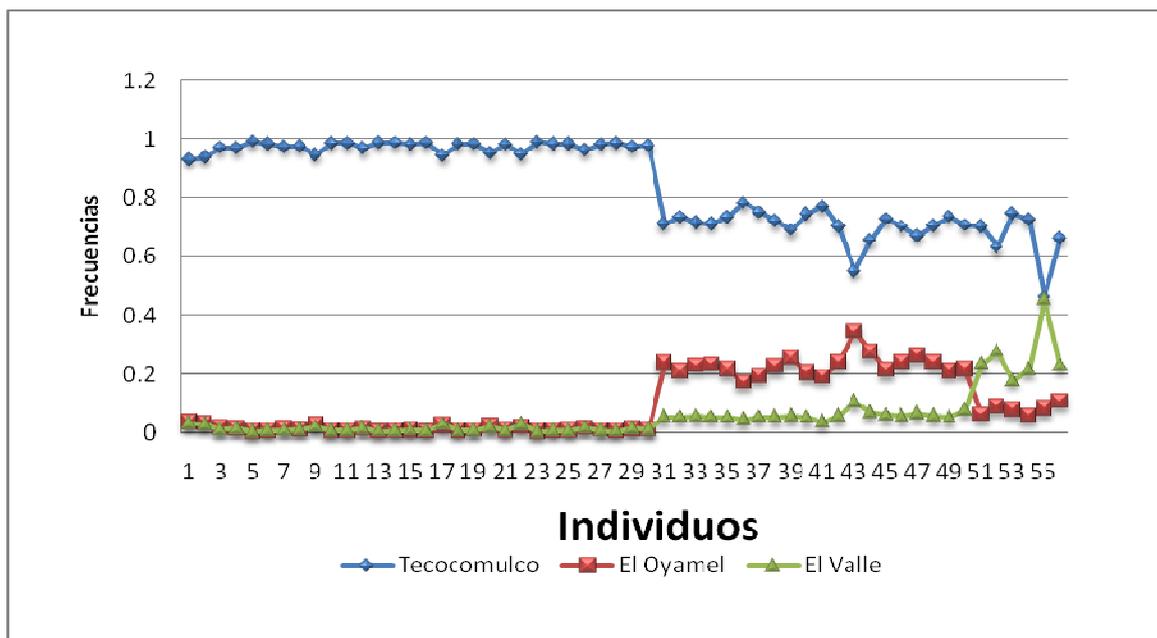


Figura 13. Frecuencias alélicas registradas por individuo para cada muestra analizada. Individuos del uno al 30 pertenecen a Tecocomulco, individuos del 31 al 50 pertenecen a El Oyamel y, por último, individuos del 51 al 56 pertenecen a El Valle.

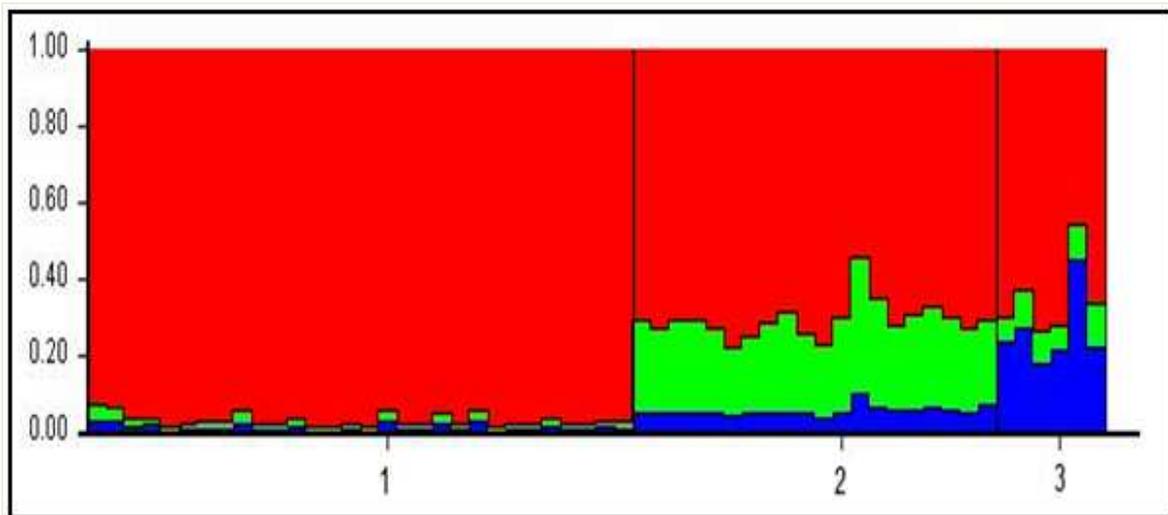


Figura 14. Gráfico de barras en el que se observa las tres localidades representadas cada una por un color distinto. El color rojo en el complejo uno (1), representa a los individuos de la localidad de Tecocomulco, el color verde en el complejo dos (2), representa a los individuos de la localidad de El Valle, el color azul del complejo tres (3), representa a los individuos de la localidad de El Valle. Los colores intercalados en cada uno de los complejos representan a los individuos con trazas de mezclas incipientes y hay un porcentaje significativo de intercambio genético en F_2 en la localidad dos.

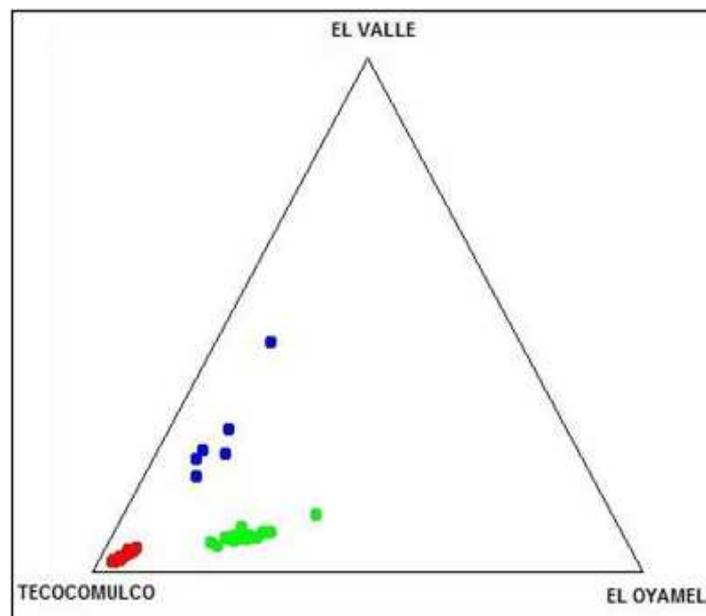


Figura 15. Se observa a los individuos de la localidad de Tecocomulco como la especie con mayor similitud genética entre sus individuos, mientras que los individuos de la localidad de El Oyamel y El Valle muestran mayor dispersión.

Relaciones alélicas ancestrales y actuales

Frecuencias ancestrales y actuales por *locus*.

Se estimaron las frecuencias alélicas para cada uno de los *loci* analizados y sus alelos, encontrándose que las frecuencias alélicas para las tres localidades se han mantenido con pocos cambios a través del tiempo; es decir, que no se han presentado variaciones significativas en las frecuencias ancestrales y actuales. A continuación se describen los resultados que representan las frecuencias de alelos ancestrales y actuales por cada *locus*.

Para el *locus* ATS5-6, los alelos con mayor frecuencia ancestral fueron el alelo 154 con valor de 0.105, el alelo 156 con 0.206 y el alelo 168 con 0.238; la mayor frecuencia actual corresponde a los alelos 156 y 168 con valores de 0.181 y 0.175, respectivamente, mientras que la mayor frecuencia ancestral y actual corresponde a los alelos 156 y 168 (Figura 16; ver Anexo B)

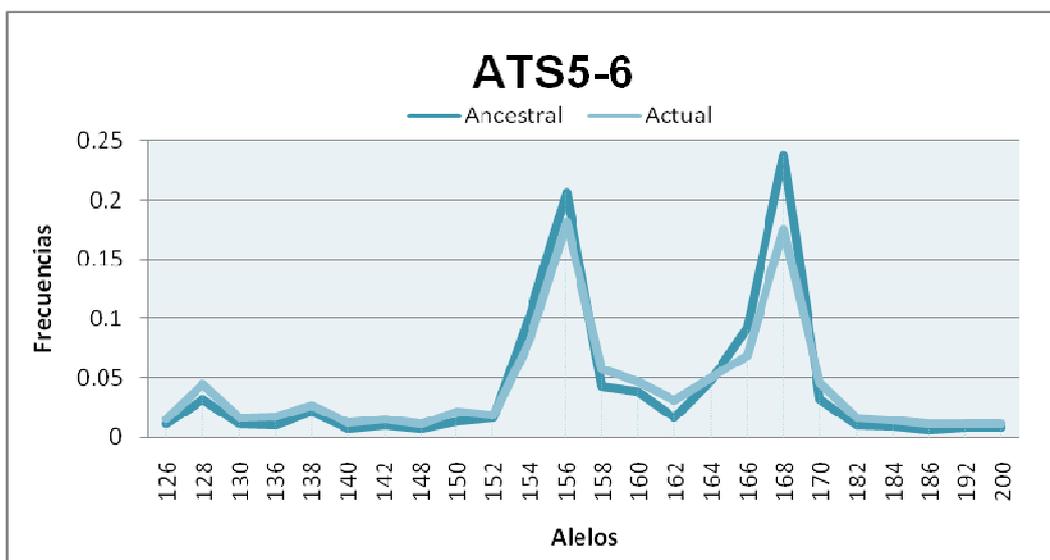


Figura 16. Frecuencias ancestrales y actuales para el *locus* ATS5-6.

Los resultados obtenidos para el *locus* ATS5-7 muestran alelos con poca frecuencia, tanto ancestral como actual; sin embargo, se observa que las frecuencias ancestral y actual del alelo 231 presentan un valor de 0.03, lo cual indica una fijación antigua de este alelo en dicho *locus* (Figura 17, ver Anexo B).

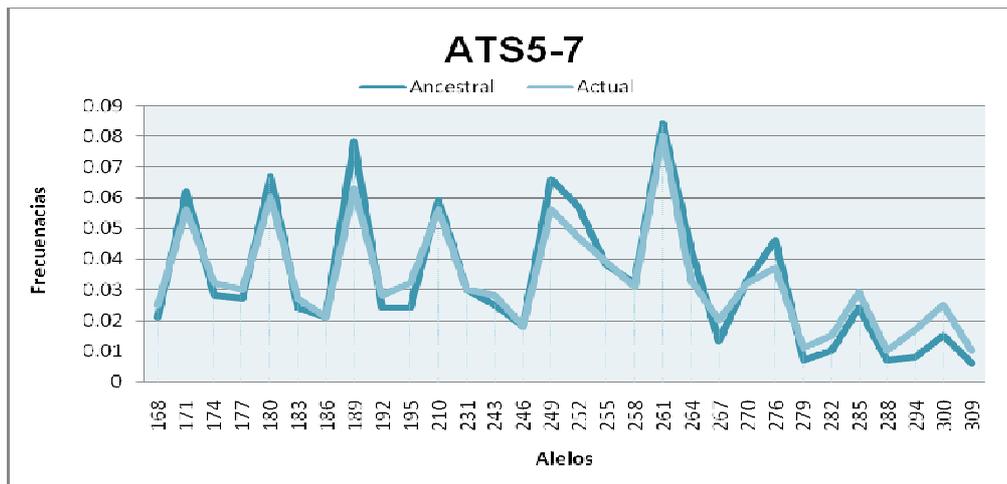


Figura 17. Frecuencias ancestrales y actuales para el *locus* ATS5-7.

Las frecuencias obtenidas para el *locus* ATS10-7 muestran que el alelo 290 presenta la mayor frecuencia ancestral con un valor de 0.104, siendo éste el único alelo con mayor frecuencia para este *locus* (Figura 118, ver Anexo B).

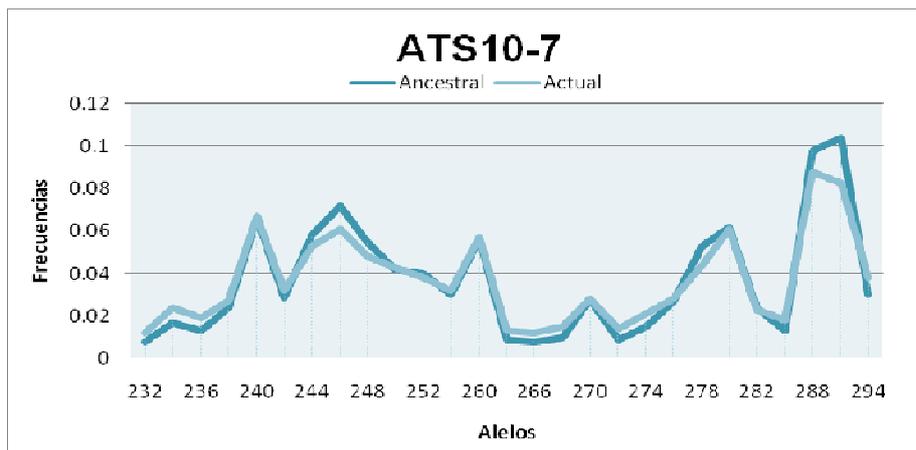


Figura 18. Frecuencias ancestrales y actuales para el *locus* ATS10-7.

Finalmente, los alelos con mayor frecuencia ancestral para el *locus* ATS12-3, son los alelos 175, con un valor de 0.108 y 181, con un valor de 0.101 (Figura 19, ver Anexo B).

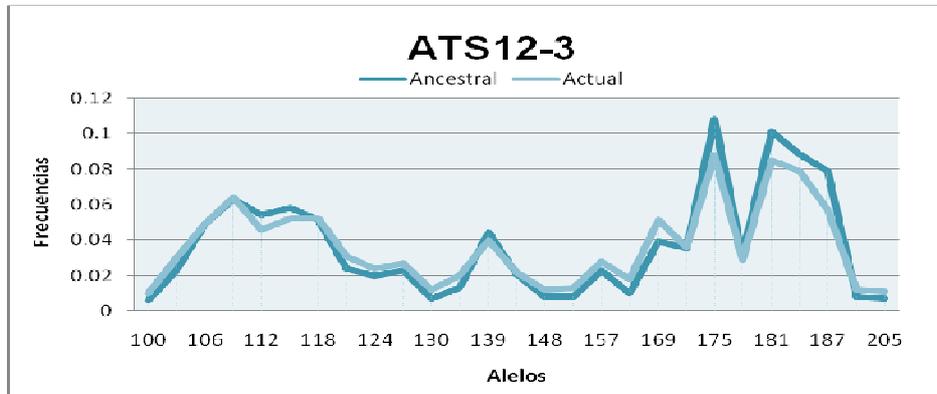


Figura 19. Frecuencias ancestrales y actuales para el *locus* ATS12-3.

Alelos con mayor frecuencia por *locus* y por especie

Se obtuvieron las frecuencias alélicas por *locus*, eligiéndose aquellos alelos con mayor frecuencia por grupo analizado. Para el *locus* ATS5-6 se seleccionaron los alelos 168, 156, 164 y 166, observándose con mayor frecuencia el alelo 168 para la localidad de Tecocomulco, con un valor de 0.238; para la localidad de El Oyamel y El Valle el alelo con mayor frecuencia fue el 156 con un valor de 0.181 y 0.183, respectivamente para ambas localidades (Figura 20).

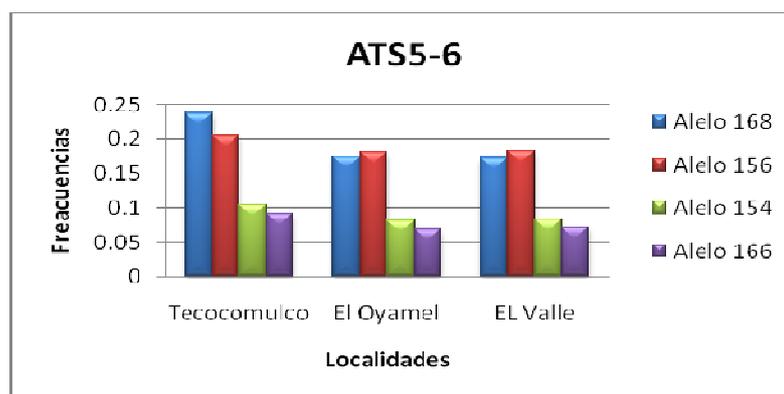


Figura 20. Frecuencias alélicas por localidad para el *locus* ATS5-6.

Para el *locus* ATS5-7 se seleccionaron cinco alelos (261, 189, 180, 249 y 171). Para las tres localidades el alelo con mayor frecuencia fue el 261, con un valor de 0.084 para Tecocomulco, 0.08 para El Oyamel y un valor de 0.082 para El Valle (Figura 21).

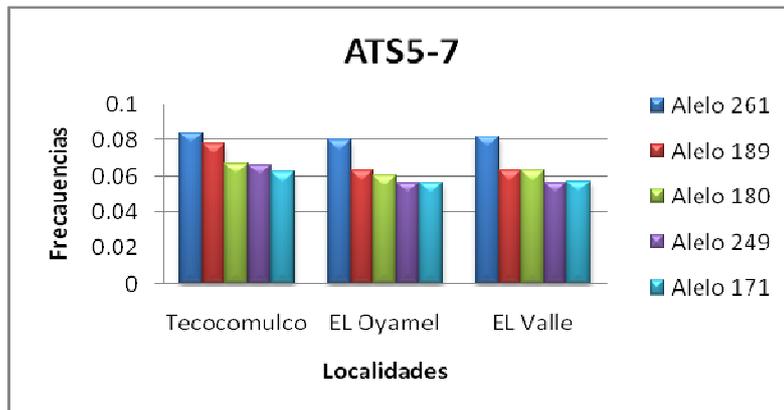


Figura 21. Frecuencias alélicas por localidad para el *locus* ATS5-7.

Para el *locus* ATS10-7 se seleccionaron cinco alelos (288, 290, 240, 280 y 246). En la localidad de Tecocomulco el alelo con mayor frecuencia fue el 290 con un valor de 0.104, mientras que para las localidades de El Oyamel y El Valle, el alelo con mayor frecuencia fue el 288, con un valor de 0.088 para El Oyamel y 0.087 para El Valle (Figura 22).

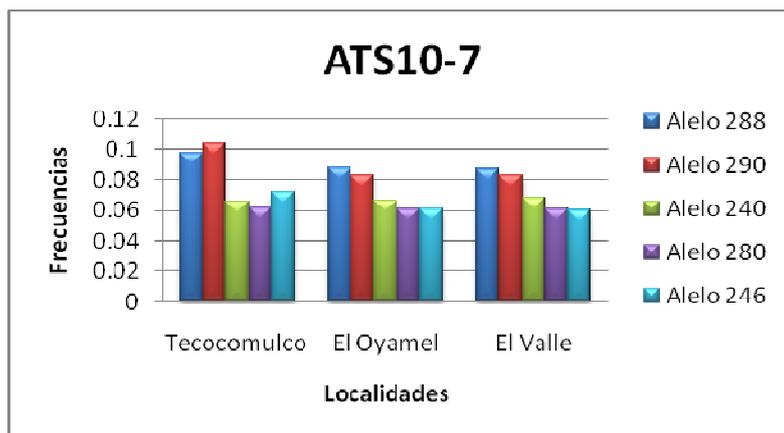


Figura 22 Frecuencias alélicas por localidad para el *locus* ATS10-7.

Finalmente para el *locus* ATS12-3 se seleccionaron seis alelos (175, 181, 184, 109, 187 y 118). Siendo el alelo 288 el que presenta mayor frecuencia para las tres localidades, con un valor de 0.108 para Tecocomulco, 0.088 para El Oyamel y un 0.088 para El Valle (Figura 23).

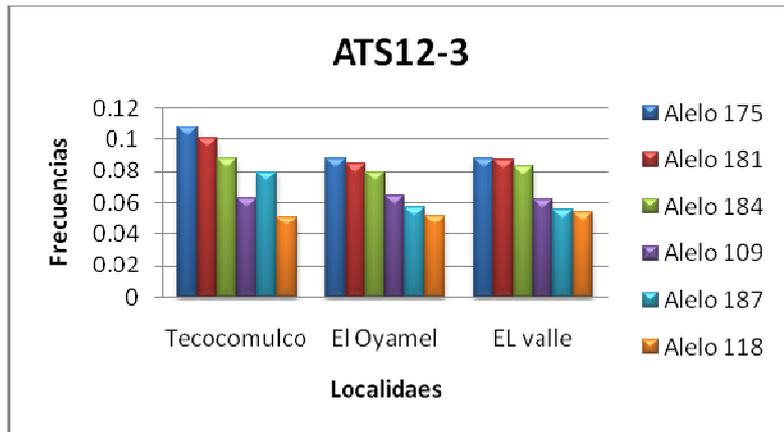


Figura 23 Frecuencias alélicas por localidad para el *locus* ATS12-3.

DISCUSIÓN

Variación morfológica

En varios géneros de salamandras, en especial la familia Ambystomidae, se presentan caracteres morfológicos muy conservados; esto existe en complejos de especies crípticas que muestran muy poca diferenciación morfológica (Matías-Ferrer, 2006). Esto da como resultado de encontrar pocas variables o características diagnósticas que puedan ser evaluadas para determinar la variación y diferenciación que ocurre entre especies, por lo que resulta de gran importancia establecer las diferencias entre individuos dentro de una población y dentro de los individuos de la misma especie (Dawood *et al.*, 2002).

Sin embargo, se ha documentado en otros modelos animales (Miaud y Merilä, 2001) la existencia de morfos específicos asociados a clinas ambientales (Semlitsch y Bodie, 2003), o a microambientes particulares (Morrison y Hero, 2003), que condicionan su diseño fenotípico y promueven adaptaciones a largo plazo, tanto genéticas como morfológicas, como respuesta evolutiva a condiciones ambientales específicas.

En las tres localidades analizadas de *Ambystoma velasci* se encontraron morfotipos específicos para cada una, con caracteres distintivos entre sí, lo que puede sugerir una diferenciación fenotípica promovida por condiciones ecogeográficas particulares y una posible adaptación a escala local; este tipo de mecanismos evolutivos asociados a organismos con historias de vida diferentes (aunque formen parte de un mismo complejo taxonómico), ya se ha documentado previamente en otros modelos de anfibios y reptiles (Semlitsch y Bodie, 2003).

No obstante, estas variaciones pueden ser producto de una alta plasticidad fenotípica asociada a esta especie o a diferencias en cuanto a la etapa larvaria en la que se recolectaron los especímenes en cada localidad, pues no se llevó un control estricto de la edad de las mismas, aunque se están considerando edades equivalentes, pues la temporada de precipitación es equivalente en las tres

poblaciones (observación personal; García, 1988) y esto se tomó como un parámetro para considerar que el estadio larvario era equivalente en las tres localidades muestreadas.

En otros estudios, Veloso y col. (1982) observaron diferencias en el tamaño corporal y en los índices biométricos entre poblaciones a lo largo de un gradiente altitudinal y ambiental en la zona de Arica en Chile, en la cual se muestra una variación morfológica (fenotípica) interpoblacional considerable, relacionada principalmente con factores ambientales como: distancia geográfica, latitud y altitud.

En el presente estudio se tienen dos modelos de dinámica poblacional, es decir, los individuos de la Laguna de Tecocomulco viven en un hábitat críptico, estable y con recursos más o menos constantes a lo largo del año; se reproducen anualmente en periodos regulares y sus huevos están protegidos por las raíces de tule y otras plantas acuáticas existentes en la laguna. Por el contrario, las poblaciones encontradas en El Chico, son poblaciones estacionales, que dependen de la formación temporal de riachuelos y estanques, como consecuencia de la precipitación pluvial, con recursos variables y mayor exposición a depredadores potenciales. Posiblemente estas diferencias sean los condicionantes de morfotipos locales específicos para las poblaciones analizadas, como una consecuencia de la plasticidad fenotípica reportada para otros modelos de anfibios (De Witt y Langerhans, 2004).

Con base en la definición de estos dos modelos y las diferencias encontradas en los morfotipos de las tres localidades, es posible sugerir que el diseño fenotípico depende en gran medida de la dinámica poblacional particular y las diferentes historias de vida (críptica *versus* estacional; Bickford *et al.*, 2006). Una de las diferencias morfológicas más importantes fue la talla, considerablemente más grande para los individuos de Tecocomulco, lo que se ha reportado para otros taxones de *Ambystoma* como un indicador de la disponibilidad y tipo de alimento, así como un bajo nivel de depredación (Spear *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos para las poblaciones de *A. velasci* en este estudio coinciden con lo registrado por Vega-López y Álvarez (1992) y otro estudio realizado

con poblaciones de *Bufo valliceps* ahora *Incilius valliceps*, (Mendelson, 1998). En los que se documentó que existe una tendencia general en el aumento del tamaño corporal con el aumento de la latitud para un intervalo de distribución específico. Por otro lado, Soto-Maraibo (2003) menciona que algunos anfibios que se encuentran presentes en ambientes secos presentarían como adaptación tamaños mayores que le permitirían conseguir una razón de superficie-volumen favorable para evitar la pérdida de agua. En este sentido, es probable que las tallas considerablemente mayores encontradas en los individuos de Tecocomulco, también sean producto del efecto local del ambiente sobre la plasticidad fenotípica de estos animales.

De acuerdo con el análisis de distancia morfológica, y al observar los tres diferentes morfotipos de *A. velasci* dentro de las localidades analizadas, se encontró la formación de dos grupos claramente definidos, el grupo interno conformado por las localidades de El Oyamel y El Valle, mientras que el grupo externo sólo está formado por individuos de Tecocomulco; esto se puede corroborar también por el análisis discriminante que muestra la separación de las tres agrupaciones bien diferenciadas y que aparentemente se encuentran determinadas por la zona geográfica. Estos resultados pueden interpretarse como una evidencia importante del efecto del ambiente, muy probablemente el tipo de hábitat en este caso, sobre el diseño fenotípico de estos anfibios. En otros estudios (Skelly *et al.* 1999; Marsh y Trenham 2001), se han reportado resultados similares en especies de ambientes temporales que reducen menos su actividad en principio como compromiso para poder así mantener unas tasas de crecimiento y desarrollo altas por la presión causada por la temporalidad del ambiente (Relyea y Werner, 1999).

Esto quiere decir que las dos poblaciones del parque nacional El Chico: El Oyamel y El Valle, se encuentran más relacionadas por la cercanía que existe entre ambas y por la similitud de las condiciones ambientales de sus respectivos hábitats (ambas dentro de un bosque de pino-encino), a diferencia de los individuos de Tecocomulco, que se encuentran a una distancia considerable de las otras dos poblaciones y en un hábitat de pastizal.

Se ha documentado previamente que las poblaciones crípticas presentan un fenotipo muy similar, sin embargo, esto depende en muchas ocasiones de las condiciones ambientales e historias de vida. Un escenario claro de este efecto es la población de Tecocomulco; según Gary *et al.* (2004), el efecto ambiental influye directamente sobre el tamaño corporal de especies crípticas a diferencia de las poblaciones con ambientes muy parecidos, en los cuales se presentarían tamaños corporales similares, como en el caso de las poblaciones de El Chico.

La variación significativa en el total de las características morfológicas analizadas entre localidades y entre individuos dentro de las localidades, puede deberse principalmente a la expresión de la plasticidad fenotípica a causa de las condiciones ambientales diferenciales para cada población, sin embargo la variación morfológica también puede ser el resultado de las historias de vida de los organismos, rangos geográficos de distribución, efectos ambientales (como: la temperatura, precipitación, disponibilidad de alimentos, competencia, depredación, etc.) y, por último, factores genéticos (Sorci *et al.*, 1996).

Estudios realizados con algunas especies de bufónidos, se han enfocado en investigar las probables causas que generan la variación morfológica en función del rango geográfico que presentan algunas especies (Mathews, 1975; Mendelson, 1998; Castellano *et al.*, 2000); dando como principal explicación a los patrones de variación morfológica la posible correlación de ésta con las distancias geográficas, a lo que se agrega los componentes ambientales que directamente influyen en los ambientes en donde se encuentran las poblaciones (Soto-Maraibo, 2003).

La discriminación de dos morfotipos básicos: tallas y cráneos pequeños, con extremidades largas y dedos cortos para las poblaciones de El Chico y tallas y cráneos más grandes, con extremidades y dedos cortos para la población de Tecocomulco, podrían sugerir que la influencia determinante en el diseño del fenotipo depende básicamente del tipo de hábitat donde se encuentran los individuos; es decir, que representan características específicas de las especies como adaptaciones a los ambientes que ocupan, como se ha reportado previamente para otros modelos animales (Skelly *et al.*, 1999; Marsh y Trenham 2001).

Diversidad genética

Comprender los patrones de diversidad y variación genética de una especie, significa que se deben evaluar los genotipos de diferentes individuos (Slatkin, 1994). Bossart y Prowell (1998) mencionan que al realizar análisis genéticos de las poblaciones, se debe considerar a los procesos históricos como una primera aproximación para comprender mejor los efectos de los eventos recientes de variación genética que ocurren dentro y entre las poblaciones.

En el caso de las salamandras del género *Ambystoma*, se ha propuesto que las especies mexicanas se han diversificado en función de una diferenciación alopátrica, la cual está determinada por la geología e hidrología del país (Shaffer, 1984), por lo que muchas especies son de origen aparentemente reciente (Matías-Ferrer, 2006). Si bien, el mecanismo de aislamiento alopátrico puede dar como resultado especies distintas al ser combinado con una selección divergente en caracteres, los cuales pueden ser ecológicos o sexualmente dimórficos, este mecanismo también puede funcionar como un precursor de divergencia genética, que puede dar como resultado un aislamiento reproductivo (Phillips *et al.*, 2004).

Considerando que la distancia geográfica existente entre las tres zonas de ocurrencia de *A. velasci* estudiadas: Tecocomulco, El Oyamel y El Valle (parque nacional El Chico), es una distancia considerable, pues la vagilidad de estos organismos está condicionada principalmente por la disponibilidad de recursos hídricos cercanos, es decir, no existe un cuerpo de agua que conecte directamente a las tres poblaciones y esto limita de forma específica el posible flujo génico entre ellas. Esto puede promover de forma importante la divergencia alélica observada entre las poblaciones y, por lo tanto, permitir la fijación diferencial de alelos dentro de las poblaciones, lo que promueve diferencias genéticas específicas dentro de cada grupo analizado.

Avise (1994) argumenta a que una población continua se fragmenta al formarse barreras geográficas, dando como resultado la divergencia. El comprender los eventos históricos tales como los tamaños poblacionales, cambios en la

demografía, formación de barreras geográficas, todos ellos factores que promueven o restringen el flujo génico entre las poblaciones, puede influir directamente en los modelos actuales de diversidad genética (De Young y Honeycutt, 2005).

Las tres localidades analizadas presentaron niveles elevados de diversidad genética, en contraste con lo que se esperaría para una especie con distribución restringida (Morrison y Hero, 2003). Se ha reportado previamente que muchas especies de agua dulce, muestran mayor diversidad genética cuando se encuentran asociadas a sistemas acuáticos abiertos, como ríos, arroyos y, en general, caudales que permitan el intercambio de flujo génico con otras poblaciones, a través de una red hídrica determinada (Aliaga-Poma, 2004).

Características asociadas a historias de vida específicas, tales como los sistemas de apareamiento, la capacidad de dispersión y algunos eventos históricos como la fragmentación entre poblaciones, los rangos de expansión, la colonización de nuevos hábitats, entre otros, proporcionan elementos para entender la estructura geográfica de la diversidad genética entre poblaciones (Templeton *et al.*, 1995). En el caso particular de este estudio, las características genéticas de *A. velasci* parecen no estar influidas directamente por condiciones ambientales específicas, pues son homogéneas entre los grupos analizados, aunque la población de Tecocomulco presenta un mayor número de alelos (específicos y compartidos), lo que genera también mayores posibilidades de combinación entre ellos, promoviendo una mayor diversidad de genotipos.

A pesar de que las tres poblaciones presentaron niveles similares de diversidad genética y riqueza alélica, se encontraron patrones diferenciales en las frecuencias de alelos para cada grupo; es decir, los tres grupos presentan un número elevado y similar de alelos y genotipos, pero las frecuencias de los mismos son específicas en cada una de ellas. Estas diferencias entre frecuencias sí pueden ser resultado de los factores ambientales específicos de cada sitio, como se demuestra en estudios previos donde se comparan datos obtenidos para marcadores nucleares y mitocondriales (Soto-Maraibo, 2003; Weisrok *et al.*, 2005), en donde es posible

evidenciar que la mayor diversidad genética de las poblaciones se debe básicamente a los cambios intrapoblacionales de frecuencias alélicas, promovidos probablemente por eventos locales de deriva genética y mecanismos de selección específicos, los cuales permiten la fijación de alelos específicos en cada localidad.

Esto es importante para efectos de conservación de recursos genéticos, porque aunque los tres grupos presenten una elevada riqueza alélica y diversidad genética, las pozas genéticas (alelos específicos disponibles) de cada uno son diferentes y únicas. Uno de los errores más comunes cuando se plantean estrategias de conservación es considerar regiones geográficas, más que recursos genéticos específicos de las poblaciones. En este sentido, un diseño a partir de Unidades Evolutivamente Significativas (ESU's, por sus siglas en inglés), considerando los reservorios genéticos y los niveles de riqueza alélica particulares de las poblaciones, sería el más adecuado para estos organismos (Semlitsch y Bodie, 2003).

Estructura genética

Si bien la estructura genética de una especie se define a partir de la variación que existe dentro de una población o entre poblaciones, ésta puede estar condicionada por diversos factores como el hábitat, los recursos alimentarios, el tipo de depredadores a los que se enfrentan los individuos y las interacciones que establecen con otros organismos (Huele y Arntzen, 2002). La combinación de procesos ecológicos y biogeográficos son un mecanismo importante para comprender la estructura genética de las poblaciones (Templeton *et al.*, 1995).

Se han documentado modelos con animales donde la estructura genética de los organismos está condicionada por el sistema acuático al cual pertenecen, como el realizado por Revaldaves y col. (1997), encontrándose que las especies analizadas (*Colossoma maropomum* y *Piaractus brachypus*) presentan una estructuración genética diferente en relación con la geografía de diferentes ríos. Esto puede estar relacionado con las diferencias en la historia evolutiva o en las historias de vida (Aliaga-Poma, 2004).

Los resultados obtenidos para los estadísticos F en las tres poblaciones de *A. velasci* analizadas en este estudio, muestran que los niveles de endogamia son bajos (F_{IS}), en general, para las tres poblaciones analizadas. Este proceso aumenta las frecuencias de homocigotos reduciendo las frecuencias esperadas bajo un apareamiento al azar, es decir, hay pérdida de adecuación de los individuos. Para las tres localidades se observa que El Valle es la localidad que presenta mayor endogamia entre sus individuos, mientras que las dos restantes presentan alrededor de un 10%. Dada la gran riqueza alélica encontrada en las tres poblaciones, es factible suponer que los heterocigotos sean frecuentes (inclusive más de los esperado, como puede verse en los resultados), en todas las localidades, lo que evidencia un reservorio genético suficiente en todos los grupos.

En este caso en particular, fenómenos como la deriva génica pueden actuar más bien fijando alelos diferencialmente en cada población (como puede verse en las frecuencias para cada *locus* analizado), en conjunto con mecanismos de selección ambiental específicos. Cuando se verifica el efecto conjunto de deriva y flujo génico (F_{IT}) se observa que, en general, el flujo génico no tiene un efecto significativo en la estructura genética de las poblaciones (casi 1.5%).

Cuando se consideran los niveles de diferenciación genética interpoblacional (F_{ST}), es posible verificar que no existen diferencias importantes en los tres grupos para determinar una estructura genética particular; a pesar de que aparentemente existe un flujo génico elevado entre poblaciones, la realidad es que se está utilizando un parámetro indirecto de medida (Nm), el cual puede sobrevaluar el número de migrantes reproductores entre las poblaciones (responsables del intercambio de genes entre ellas). Esto ya se ha documentado en otras ocasiones para poblaciones alopátricas (Zamudio y Savage, 2003) que, sin embargo, es la evidencia de un número elevado de alelos ancestrales que se comparten entre las distintas poblaciones, como producto de un origen ancestral único.

Para este estudio en particular, con el análisis molecular de la varianza, en tres niveles de variación distintos, se encontró que la fuente mayor de variabilidad se

encuentra a nivel de individuos, con escasa diferenciación entre localidades, pero con una variación significativa entre *loci*, lo que refuerza el argumento de que, si bien no hay una variación significativa con alelos nuevos entre cada localidad, sino más bien la mayor parte de los alelos detectados se encuentran en todas las localidades, el ambiente ha modificado significativamente las frecuencias de los mismos en cada grupo, tal vez como un mecanismo de diferenciación genética a escala local (modelo de ecotipos), patrón que se ha documentado en otros modelos animales (Miaud y Merilä, 2001).

Como ya se había mencionado, Tecocomulco y El Valle son las dos localidades que presentan flujo génico bajo, resulta ser bastante razonable si se considera que el desplazamiento de individuos entre poblaciones se presenta como un evento poco probable, especialmente tomando en cuenta las condiciones de aislamiento de la localidad de Tecocomulco y la dependencia de la especie de estudio en cuanto a los recursos hídricos.

Dinámica de flujo génico

EL flujo génico se define como la transferencia de material genético entre poblaciones dado por el movimiento de individuos o de sus gametos, y se expresa como la tasa de migración m (Avice, 1994). Las estimaciones de flujo génico se basan en modelos teóricos de estructura espacial de las poblaciones, por lo que resulta necesario analizar los patrones y dirección del flujo génico y el porcentaje de alelos compartidos dentro de las especies para poder diagnosticar la existencia de intercambio genético dentro de las poblaciones (Borge *et al.*, 2005).

El impacto del flujo de genes está determinado por la capacidad de dispersión de especies específicas, así como por barreras geográficas, distancia entre poblaciones y estructura poblacional (Orell *et al.*, 1999). Con base en los resultados obtenidos para este estudio se observa la existencia de contactos alélicos ancestrales y/o actuales entre localidades. A pesar de las distancias geográficas, la localidad de Tecocomulco presentó la mayor evidencia de individuos que presentan mezclas incipientes de alelos.

Esto puede deberse a que no hay una fijación de los mismos y que éstos han ido cambiando a lo largo de el tiempo, mientras que para la localidad de El Oyamel y El Valle, no se observa que existan estas mezclas alélicas de primera generación entre las dos localidades, pero sí presentan fuertes trazas de intercambio genético en F_2 , lo que posiblemente sea generado por el gran intercambio alélico que presenten dentro y/o entre estas dos poblaciones así como la fijación de alelos ancestrales.

Un aspecto importante de la biología de los urodelos es la frecuente escasez de barreras reproductivas entre muchas de sus especies. Este fenómeno permite tener en cuenta rasgos de mezclas de alelos paternos en especies y subespecies en la naturaleza (Voss y Shaffer, 1995). En este caso, las tres poblaciones de *A. velasci* analizadas en el parque nacional El Chico (El Oyamel y El Valle) y Tecocomulco presentan evidencia de intercambio genético ancestral, tal vez previo a la fragmentación de la red lacustre del centro del país, lo que originalmente se conocía como grandes lagos del Anáhuac y de la cual la Laguna de Tecocomulco es considerada un relictos.

Los datos obtenidos concuerdan con los intervalos de distribución restringida para esta especie, puesto que para que exista intercambio genético en F_1 es necesario que las especies paternas coincidan durante la época reproductiva, mientras que para la existencia de intercambio genético en F_2 es necesario que el intercambio formado en la primera generación permanezcan en contacto con la especie paterna hacia la cual se realiza el intercambio en F_2 (Perfectti, 2002).

Este análisis también da como resultado que el proceso de intercambio genético en F_1 y las mezclas alélicas sean un proceso antiguo, lo cual ha permitido una diferenciación progresiva entre las localidades. Esta diferenciación entre las localidades pudo deberse a la geología de país o variaciones climáticas ocurridos durante el Cuaternario superior, provocando un continuo cambio en la distribución de esta especie, siendo fragmentados en pequeñas poblaciones aisladas geográfica y reproductivamente generando una diversificación en función de una diferenciación alopatrica generada por estos aislamientos poblacionales.

Aunque estos valores de flujo génico, en comparación con trabajos realizados en otros taxa (Lougheed *et al.*, 2000), muestran niveles de flujo génico bajos entre poblaciones, considerando que el desplazamiento de individuos entre poblaciones se presenta como un evento poco probable, tomando en cuenta la distancia y barreras geográficas existentes entre las tres localidades, así como la gran dependencia de esta especie en cuanto a los recursos hídricos, importantes para su reproducción y desarrollo larvario, teniendo en cuenta que son neoténicas facultativas lo cual las hace dependientes a los cuerpos de agua.

Relaciones alélicas ancestrales y actuales

La dinámica entre los genes actuales y/o ancestrales dentro y entre las poblaciones, resulta ser de interés cuando se requiere de analizar la, fijación, pérdida o establecimiento de nuevos alelos. Delgado (2002) describe la importancia de verificar en las poblaciones naturales si las frecuencias y tipos de alelos ancestrales se han mantenido o presentan cambios relevantes en la actualidad.

Como se mencionó anteriormente, las frecuencias ancestrales de alelos en todas las localidades se ha mantenido con cambios escasos a lo largo del tiempo; es decir, las frecuencias de alelos ancestrales y actuales no muestran una variación significativa, lo que habla de dos causas probables para este evento: a) las condiciones ambientales en las poblaciones se han mantenido constantes a pesar de la fragmentación progresiva de las mismas, lo que ha permitido una “homología genética” dentro de cada población, o b) en taxa o hábitats relictuales se ha documentado la existencia de cripticismo genético (Morrison y Hero, 2003), es decir, un envejecimiento progresivo de las poblaciones que, aunque mantengan niveles elevados de diversidad, presentan poca variación de novo (alelos nuevos por mutación y/o migración) y solamente combinan los alelos antiguos existentes en la población, lo que eventualmente los conducirá a un efecto de “cuello de botella” (pérdida súbita de variabilidad por escasa riqueza alélica, un exceso de alelos ancestrales y prevalece la deriva genética dentro de las poblaciones), aumentando la endogamia y disminuyendo la adecuación de los ecotipos.

CONCLUSIONES

- Existen diferencias morfológicas significativas en cada una de las tres localidades analizadas, muy probablemente como consecuencia de una adaptación a escala local del grupo. Esto permite definir entonces dos morfotipos básicos, que corresponden a dos hábitats diferentes: pastizal templado y bosque de pino-encino, aunque no se descarta la posibilidad de que sean diferencias asociadas a edades distintas de las larvas.

- A pesar de que los niveles de diversidad genética y riqueza alélica de *Ambystoma velasci*, fueron muy similares entre las tres poblaciones, existen frecuencias alélicas diferentes en cada sitio, lo que promueve una estructura genética específica, con flujo génico restringido, deriva genética importante y posible selección local a nivel de genotipos (establecimiento de ecotipos).

- El flujo génico es prácticamente nulo y la homología encontrada obedece, en su mayoría, a la permanencia de alelos ancestrales en cada localidad. En este caso en particular no se recomienda utilizar medidas indirectas de flujo génico (como el número de migrantes Nm), pues el efecto de la ancestría puede interpretar la homología genética como un flujo génico alto, cuando no es así.

- Es probable que las diferencias morfológicas y genéticas encontradas para *Ambystoma velasci* en el presente estudio sean determinadas por el tipo de hábitat en el cual se localizan las poblaciones.

LITERATURA CITADA

- Aliaga-Poma, C. 2004. Variabilidad genética de *Colossoma macropomum* y *Piaractus brachypomus* en la región del alto maderera (Amazonía Boliviana) para el análisis del polimorfismo de la longitud de Secuencias Intrónicas (EPIC-PCR). Tesis de Licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés. 1-103 pp.
- Aguilar-Miguel, X., y G. Casas-Andreu. 2005. *Ambystoma velasci*. Algunas especies de anfibios y reptiles contenidos en el proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-ECOL-2000. Facultad de Ciencias, Centro de investigación en Recursos Bióticos, Universidad Autónoma del Estado de México. Bases de datos SNIBCONABIO. Proyecto W035. México. D.F.
- Anzidei, M., A. Medaghiale, C. Sperisen, B. Ziegenhagen, y G. Vendramin. 1999. Chloroplast microsatellites for analysis of the geographic distribution of diversity in conifer species. En: Which DNA Marker for Which Purpose? Compendio final del proyecto de investigación. Development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity. Guillet E. M. (ed.).
URL: <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>
- Aranguren-Méndez, J.A., J. Jordan, y M. Gomez. 2001. Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. *Genetic Selection and Evolution* 33 : 433-442.
- Aranguren-Méndez, J.A., M. Gomez, y J. Jordan. 2002. Hierarchical analysis of genetic structure in Spanish donkey breeds using microsatellite markers. *Heredity* 89 : 207-211.
- Aranguren-Méndez, J.A., R. Román-Bravo, W. Isea, Y. Villasmil, y J. Jordan. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación : una revisión. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 13 (1): 30-42.
- Armstrong, J.B., S.T. Duhon. 1989. Induced spawning artificial spawning, and other genetic manipulations. 228-236. En: Armstrong, J.B. y G.M. Malacindki (edt.) *Developmental biology of the Axolotl*. Oxford University Press. New York.
- Ávila-López, R. 1991. Chinampas de Iztapalapa. *Arqueología*. 225: 1-184.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman y Hall, Inc.
- Balloux, F., y N. Lugon-Moulin. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11: 155-165.

- Benbouza, H., J.M. Jacquemin, J.P. Baudoin y G. Mergeai. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnology Agronomy Society and Environment* 10 (2) 73-76.
- Bickford, D., D.J. Lohman, N.S. Sodhi, P.K.L. Ng, R. Meier, K. Winker, K.K. Ingram y I. Das. 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*. 349:8 p
- Borge, T., K. Lindroos, P. Na'Dvorni'K, C. Syva'Nen, y G.P. Saetre. 2005. Amount of introgression *loci* revealed by extensive avian pedigrees. *Molecular Biology and Evolution* 20: 56-61.
- Bossart, J.L., y D.P. Prowell. 1998. Genetic estimates of population structure and gene flow : limitations, lessons and new directions. *Trends Ecology and Evolution* 13: 202-206.
- Carvalho, G.R. (Ed.). 1998. *Advances in molecular ecology*. IOS Press, USA.
- Casas, G., G. Valenzuela y A. Ramírez. 1991. Como hacer una colección de anfibios y reptiles. Cuadernos del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México. 68 pp.
- Casas-Andreu, G. y X. Aguilar-Miguel. 2003. Distribución de *Ambystoma velasci*. Sistema de información sobre los Recursos Bióticos del Estado de México (BIOSI) Universidad Nacional Autónoma de México-Universidad Autónoma del Estado de México.
- Casas-Andreu, G., R. Cruz-Aviña y X. Aguilar-Miguel. 2004. Un regalo poco conocido de Méxioc al mundo: El ajolote o axolotl (*Ambystoma*: Caudata: Amphibia). Con algunas notas sobre la crítica situación de sus poblaciones. *Ciencia ergo sum*. Universidad Autónoma del Estado de México. 10-3: 304-308 pp.
- Castellano, S., C. Giacoma, y T. Dujsebayeva. 2000. Morphometric and advertisement call geographic variation in polyploid green toads. *Biological Journal of the Linnean Society* 70: 341-360.
- Challenger, A. 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, presente y futuro. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 847 pp.
- Cheng, H.H., y L.B. Crittenden. 1994. Microsatellite markers for genetic maing in the chicken. *Poultry Science* 73: 539-546.
- Collins, J.P. y A. Storfer. 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions* 9: 89-98.

- Conservación sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES). URL: <http://www.cites.org/esp/index.shtml>
- Crawford, A.M., S.M. Kappes, K.A. Paterson, M.J. DeGotari, K.G. Dodds, B.A. Freking, R.T. Stone, y C.W. Beattie. 1998. Microsatellite evolution: testing the ascertainment bias hypothesis. *Journal of Molecular Evolution* 46: 256-260.
- Crow, J.F., y M. Kimura. 1970. An introduction to population genetics theory. New York, Evanston and London. *Harper and Row Publisher* 33-98 pp.
- Dawood, A., A. Channing, y J.P. Bogart. 2002. A molecular phylogeny of the frogs genus *Tomopterna* in Southern Africa: examining Species Boundaries with mitochondrial 12s, rRNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 407-413.
- Dean, R.E., J.A. Dahlberg, M.S. Hopkins, S.E. Mitchell y S. Kresovich. 1999. Genetic redundancy and diversity among 'Orange' accessions in the U.S. national sorghum collection as assessed with Simple Sequence Repeat (SSR) markers. *Crop Science*. 39:1215-1221.
- Delgado, P.V. 2002. Dinámica histórica de la hibridación introgresiva en poblaciones naturales de *Pinus montezumae* Lamb y *P. pseudostrobus* Lind (Pinacea). Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- De Witt, T.J. y R.B. Langerhans. 2004. Integrated solutions to environmental heterogeneity. Theory of multimoment reaction norms. In Phenotypic plasticity. Functional and Conceptual approaches. En De Witt T.J. y S.M. Scheiner, (Eds.), pp. 98-111. Oxford: Oxford University Press.
- De Young, R.W., y R.L. Honeycutt. 2005. The molecular toolbox: genetic techniques in wildlife ecology and management. *Journal of Wildlife Management* 69: 1362-1384.
- Diario Oficial de la Federación. 2001. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección Ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. México, D.F.
- DNeasy[®]. 2006. Protocol: Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol). Quiagen[™].
URL: <http://www.qiagen.com/literature/protocols/DNeasyTissue.aspx> or from QIAGEN Technical
- Dodgson, J.B., H.H. Cheng, y R. Okimoto. 1997. DNA marker technology: a revolution in animal genetics. *Poultry Science* 76: 1108-1114.

- Duellman, W.E. y L. Trueb. 1986. *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill. Book Company. New York.
- Dugan, P. 1992. *Conservación de Humedales. Un análisis de temas de actualidad y acciones necesarias*. IUCN, Suiza. 100 pp.
- Dugés. 1888. *Naturaleza*. Serie. 2, 1:142
- Eisen, J.A. 1999. Mechanistic basis for microsatellites instability. En: D. Goldstein y C. Schlotterer (Eds.) *Microsatellites. Evolution and Applications*. Oxford University Press, Inc. New York. 34-48 pp.
- Estes, R. 1981. *Gymnophiona, Caudata. Handbuch der Paläoherpetologie* 2:1-115.
- Excoffier, L., G. Laval, y S. Schneider. 2006. Arlequín, Versión 3.01: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. URL: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>
- Fainstein, A., R. 1996. *Multivariate analysis: An introduction* Yale University press. *New Haven & London* 113pp.
- Ferreira, M.E., y D. Grattapaglia. 1998. *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético*. Ed. EMBRAPA. 220 pp.
- Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar (FIR). 2003. Laguna de Tecocomulco. Consejo Estatal de Ecología (COEDE). 1-10 pp.
- Flores-Villela, O. 1993. *Herpetofauna Mexicana. Carnegie Museum of Natural History Pittsburg Special Publication* 17: 1-73.
- Flores-Villela, O. y L. Canseco-Márquez. 2004. Nuevas especies y cambios taxonómicos para la herpetofauna de México. *Acta Zoologica Mexicana* 20(2) : 115-144.
- Foster, H.L. 1991. *Ecological Implications of Genetics Variation in Plant Populations*. En: D.A. Falk y K. Holsinger (Eds.). *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, Inc. Nueva York. 31-44 pp.
- Galindo, C., S. Franco, M. Flores, C. Lazcano, S. Franco y r. cortés. 1988. *Plan de Manejo Parque Nacional El Chico*. Secretaria de desarrollo urbano y Ecología. Pachuca, Hidalgo. 55 pp.
- Gallina, M., r. González, R. Moutal y G. Tello. 1974. *Bases para la Reestructuración del Parque Nacional El Chico Hidalgo, México*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 114 pp.

- García-Calderón, J.L. 1976. Calidad del agua y recurso pesquero Lago Tecocomulco, Hidalgo. Informe preliminar. Departamento de Evaluación. Universidad Autónoma de México Ixtapalapa. 12 pp.
- García E., 1988, Modificación al Sistema de Clasificación de Koppen, para adaptarlo a las condiciones de la República mexicana, 3a edición, Ofset Larios, México. 252p.
- Garner, T. W. J., B. Gautschi, S. Rothlisberger, y H.U. Reyer. 2000. A set of CA repeat microsatellite markers derived from the pool frog, *Rana lessonae*. *Molecular Ecology* 9, 2173-2175.
- Garner, T.W.J. y G. Tomio. 2001. Microsatellites for use in studies of the Italian agile frog, *Rana latastei* (Boulenger). *Conservation Genetic* 2, 77 – 80.
- Gary, W. y C. Rickey. 2004. Phenotypic similarity and differentiation among sympatric cryptic species in a freshwater amphipod species complex. *Freshwater Biology* 49 (1): 1-13.
- Gehlbach, F.R. 1967. *Ambystoma tigrinum*. *Catalogue of American Amphibian and Reptiles* 52.1-52.3.
- Gibbs, M., D. Dawson, C. McCamley, A.F. Wardle, J.A.L. Armour, y T. Bruke. 1997. Chicken microsatellites markers isolated from libraries enriched form simple tandem repeats. *Animal Genetics* 28: 401-417.
- Goldstein, B.D., y C. Schlotterer. 1999. Microsatellites evolution and applications. Oxford University Press, New York, 352 pp.
- Goudet, J. 2002. Fstat, Versión 2.9.3.2: A program to estimate and test gene diversities and fixation indices. URL: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Gutiérrez-Zavala, R.M., E. Cabrera-Mancilla, E.A. Bermúdez-Rodríguez y P.A. Pérez-Velázquez. 2002. Lago de Tecocomulco, Hidalgo. En: Pérez-Velázquez, P.A., L.E. Cruz-Suárez, E.A. Bermúdez-Rodríguez, E. Cabrera-Mancilla y R.M. Gutiérrez-Zavala. Pesquerías en tres cuerpos de aguas continentales de México. Instituto Nacional de la Pesca. 57- 88 pp.
- Hajeer, A., J. Worthington, y S. John (Eds.). 2000. SNP and microsatellite genotyping: markers for genetic analysis. *Biotechniques: Molecular Laboratory Methods Series*. Eaton Publishing, Manchester, U.K.
- Harrison, R.G. 1969. Harrison stages and description of the normal development of the spotted salamander, *Amblystoma punctatum* (Linn.). En: R.G. Harrison (ed.). Organization and Development of the Embryo, Nee Haven: Yale University. Press. 44-66 pp.

- Hartl, D.L. 1999. A primer of population genetics. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA. 121 pp.
- Hedrick, P.W. 1999. Perspective: highly variable *loci* and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53: 313-318.
- Hedrick, P.W., y S.T. Kalinowski. 2000. Inbreeding depression and conservation. *Annual Reviews Ecology and Systematics* 31, 139-162.
- Hedrick, G., G. Gutierrez, y R. Lee. 2001. Founder effect in an island population of bighorn sheep. *Molecular Ecology* 10: 851-857.
- Higuchi, R. 1989. DNA from Tail Biopsies. *Amplification* 2: 1-3.
- Hitchings, S. y T.J.C. Beebee. 1997. Genetic substructuring as a result of barriers to gene flow in urban *Rana temporaria* (common frog) populations: implications for biodiversity conservation. *Heredity* 79 117-127.
- Hitchings, S. y T.J.C. Beebee. 1998. Loss of genetic diversity and fitness in common toad (*Bufo bufo*) populations isolated by inimical habitat. *Journal Evolution Biology* 11, 269-283.
- Huacúz-Elias, D.C. 2001. Estado de Conservación del Género *Ambystoma* en Michoacán, México. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Universidad Nacional Autónoma de México, Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México. 70 pp.
- Huele, R., y J.W. Arntzen, 2002. Microsatellite markers in amphibian Conservation genetics. *Journal Herpetology* 12:1-9.
- Huízar-Álvarez, R. 1997. Hydrochemistry of the aguifers in the Rio Las Avenidas Basin, Pachuca, Hidalgo, Mexico. *Water, Air and Soil Pollution* 96: 185-201.
- Irschick, D.J. y H.B. Shaffer. 1997. The polytypic species revisited: morphological differentiation among tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*) (Amphibia: Caudata). *Herpetologica* 53: 30 – 49.
- IUCN. 2001. IUCN, Versión 3.1. Red List Categories and Criteria. Prepared by the IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland, Switzerland.
- Jerne, P., y P.J.L. Lagoda. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecology and Evolution* 11: 424-429.
- Jiménez-Fernández, E.J., J.C. Juárez-López y C. Cedillo-Alvarez. 1996. Guía para la primera expedición del taller de fauna silvestre y acuática del neártico y neotrópico a Laguna de Tecocomulco, hidalgo. Relicto ecológico delceacuicola

- de la Cuenca de México. Laboratorio de Vertebrados Terrestres. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. U.N.A.M. 36 pp.
- Johnson, D.E. 2000. Métodos: Multivariados aplicados al análisis de datos. Edt. Thomson. México. Pp. 553.
- Koreth, J., J.J. O'Leary, y J.O'D. McGee. 1996. Microsatellite and genomic analysis. Review Article. *Journal of Pathology* 178: 239-248.
- Larson, Allan. 1996. Ambystomatidae. Mole Salamanders. Version 01 January 1996 (under construction). <http://tolweb.org/Ambystomatidae/15448/1996.01.01> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
- Lips, K.R., P.A. Burrowes, J.R. Mendhelson III, y G. Parra-Olea. 2005. Amphibian Declines in Latin America: Widespread Population Declines, Extinctions and Impacts. *Biotropica* 37: 163-165.
- Lot-Helgueras, A. y A. Novelo-Retana. 1978. Lago de Tecocomulco: Guías botánicas de excursiones en México. Sociedad botánica de Mexico , A.C. Mexico. 114 pp.
- Lougheed, S.C., J.R. Freeland, P. Handford, y P.T. Boag. 2000. A molecular phylogeny of warbling-finches (*Poospiza*): paraphyly in a Neotropical emberizid genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 17: 367-378.
- Marsh, D.M. y P.C. Trenham. 2001. Metapopulation dynamics and amphibian conservation. *Conservation Biology* 15: 40-49.
- Mathews, T.C. 1975. Biochemical polymorphism in population of argentine toad, *Bufo arenarum*. *Copeia* 1975 (3): 455-465.
- Matías-Ferrer, N. 2006. Diferenciación genética y sistemática de las especies *Ambystoma altamiranoi*, *A. leorae*, *A. rivulare* y *A. zempoalaense*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional autónoma de México 67 pp.
- Maldonado, J.E. Monitoreo de especies raras y amenazadas de mamíferos utilizando análisis genéticos y muestreos no invasivos. En Vázquez-Domínguez, E. y D.J. Hafner, (Eds.). 2006. Genética y mamíferos mexicanos presente y futuro. *New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin* 32: 37-44 .
- McCune, B., y J.B. Grace. 2002. Analysis of ecological communities. MjM Software Desing. Gleneden Beach, Oregon. 300 pp.
- Mech, S.G., A. Storfer, J.A. Ernst, M.W. Reundink, y S.C. Maloney. 2003. Polymorphic microsatellite *loci* for tiger salamanders, *Ambystoma tigrinum*. *Molecular Ecology Notes* 3:79-81

- Medina, J. y J. rzedowski. 1981. Guía botánico-forestal de la parte alta de la Sierra de Pachuca. En: Zavala, E. 1995. Encinos Hidalguenses. Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales. México. 133 pp.
- Melo Gallegos C. y J.G. López. 1994. *Parque Nacional El Chico, marco geográfico-natural y propuesta de zonificación para su manejo operativo*. Rev. Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, No. 28.
- Mendelson, J.R. 1998. Geographic variation in *Bufo valliceps* (Anura:Bufonidae), a widespread Toad in the United states and middle America. *Natural History Museum, The University of Kansas* 8:1-20
- Mettler, L.E., y T.H. Gregg. 1982. Genéticas de las Poblaciones y Evolución. Unión Tipográfica Editorial Hispano-Americana (UTEHA), S.A. de C.V. México 245 pp.
- Miaud, C. y J. Merilä. 2001. Local adaptation or environmental induction? Causes of population differentiation in alpine amphibians. *Biota* 2(1): 31-50.
- Miller, M.P. 1997. TFGPA, Versión 1.3: Tools for population genetic analyses. A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. URL: [http:// bioweb.usu.edu/mpmbio/index.htm](http://bioweb.usu.edu/mpmbio/index.htm)
- Morrison, C., y J. M. Hero. 2003. Geographic variation in life-history characteristics of amphibians: a review. *Journal of Animal Ecology* 72: 270-279.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., y Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51, 263-273.
- Nei, M. 1972. Genetic distances between populations. *The American Naturalist*. 106, 283-292.
- Newman, R. A., y T. Squire. 2001. Microsatellite variation and fine-scale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*). *Molecular Ecology* 10, 1087-1101.
- Orell, M., K. Lahti, K. Koivula, S. Rytönen, y P. Welling. 1999. Immigration and gene flow in a northern willow tit (*Parus montanus*) population. *Journal of Evolutionary Biology* 12 (2): 283-295.
- Ordenamiento Ecológico Territorial del Estado de Hidalgo, Periódico Oficial del Estado de Hidalgo, Marzo 2001.
- Ortega, J., y J.E. Maldonado. 2007. Caracterización y evolución de microsatélites en murciélagos (Orden: Chiroptera). En: Sánchez-Rojas, G. y Rojas-Martínez, A.

- (Eds.). Tópicos en sistemática, biogeografía, ecología y conservación de mamíferos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México. 71-79 pp.
- Parra-Olea, G., E. Martínez-Meyer, y G. Pérez-Ponce de León. 2005. Forecasting Climate Change Effects on Salamander Distribution in the Highlands of Central Mexico. *Biotropica* 37: 202-208.
- Parra-Olea, G. y Matías-Ferrer N. 2006. Caracterización molecular y conservación de especies en extinción por epidemias víricas (iridovirus) y fúngicas (quitridiomycosis) de *Ambystoma* (Amphibia: Caudata), un recursos de importancia local para comunidades indígenas en México. Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Perfectti, F. 2002. Especiación: modos y mecanismos. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. 307-321.
- Petranka, J.W. 1998. Salamanders of the United states and Canada. Smithsonian Institution. Washington, D.C.
- Phillips, B.L., S.J.E. Bairrd, y C. Moritz. 2004. When vicars meet: a narrow contact zone between morphologically cryptic phylogeographic lineages of the rainforest skink, *Carlia rubrigularis*. *Evolution* 58: 1536-1548.
- Pope, L.C., A. Estoup, y C. Moritz. 2000. Phylogeography and population structure of an ecotonal marsupial, *Bettongia tropica*, using mtDNA and microsatellites. *Molecular Ecology* 9: 2041-2054.
- Powell, W., M. Morgante, R. McDevitt, G.G. Vendramin, y J.A. Rafalski. 1995. Polymorphic simple sequence repeat regions in the chloroplast genome: Applications to the population genetics of pines. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 92: 7759-7763.
- Pritchard, J.K., X. Wen, y D. Falush. 2007. Structure, Versión 2.2: Inference of population structure using multi/ocus genotype data.
URL: <http://pritch.bsd.uchicago.edu/software>
- Reh, W., y Seitz, A. 1990. The influence of land use on the genetic structure of populations of the common frog *Rana temporaria*. *Biology Conservation* 54: 239-249.
- Relyea, R.A. y E.E. Werner. 2000. Morphological plasticity in four larval anurans distributed along an environmental gradient. *Copeia* 2000 178-190.
- Ramírez-Bautista, A. y A. Ramírez-Pérez. 2008. ¿Sabes quién vive en el Parque Nacional El Chico? Anfibios y Reptiles. Universidad autónoma del Estado de Hidalgo, Secretaria de Educación Publica y Dirección del Parque Nacional El chico. Pachuca, Hidalgo, México 28 pp.

- Revaldaves, E., E. Renesto, y M. Machado. 1997. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná river. *Journal Genetic* 20(3).
- Rojas-Martínez, A. y S.D. Hernández-Flores. 2008. ¿Sabes quién vive en el Parque Nacional El Chico? Anfibios y Reptiles. Universidad autónoma del Estado de Hidalgo, Secretaria de Educación Pública y Dirección del Parque Nacional El chico. Pachuca, Hidalgo, México 28 pp.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Ed. Limusa. México. 432 pp. En : Zavala, E. 1995. Encinos Hidalguenses. Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales. México. 133 pp.
- Rzedowski, J., G. Guzmán, a. Hernández y R. Muñiz. 1964. Cartografía de los principales tipos de vegetación de la mitad septentrional del Valle de México. An. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México. 13 (1-4) : 31 – 57. En: Zavala, E. 1995. Encinos Hidalguenses. Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales. México. 133 pp.
- Riojas-López, M.E. y E. Mellink. 2006. Herpetofauna del Rancho Las Papas, Jalisco, llanuras de Ojuelos Aguascalientes, México. *Acta Zoológica Mexicana*. 22(3): 85 – 94.
- Rochambeau, H., F. Fournet-Hanocq, y J. Vu Tien Khang. 2000. Measuring and managing genetic variability in small populations. *Ann. Zootech* 49: 77-93.
- Rowe, G., T.J.C. Beebee, y T. Burke. 1999. Microsatellite heterozygosity, fitness and demography in natterjack toads *Bufo calamita*. *Animal Conservation* 2: 85- 92.
- Santos-Barrera, G., J. Pacheco, y G. Cevallos. 2004. Áreas prioritarias para la conservación de anfibios y reptiles en México. *Biodiversitas* 57: 1-6.
- SAS. 2007. JMP Statistics and graphic guide. SAS Institute, Cary, North Carolina, USA.
- Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAP). 1997. Diagnostico sobre la problemática del Lago de Tecocomulco. Delegación Federal de Hidalgo. Subdelegación de Recursos Naturales. Pachuca, Hidalgo.
- Scotti, I., G. Paglia, F. Magni, y M. Morgante. 1999. Microsatellite markers as a tool for the detection of intra-and interpopulation genetic structure. En: Winch DNA Marker for Which Purpose? Compendio final del proyecto de investigación Development, optimization and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Ressearch Programme Molecular Tools for Biodiversity. Guillet E.M. (ed.). URL: <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>

- Selkoe, K.A., y R.J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 1-14.
- Semslitsch, R.D., y J.R. Bodie. 2003. Biological criteria for buffer zones around Wetlands and riparian habitats for amphibians and reptiles. *Conservation Biology* 17(5): 1219-1228.
- Shaffer, H.B. 1984. Evolution in a paedomorphic lineage. I An electrophoretic analysis of the Mexican Ambystomatid salamanders. *Evolution* 38: 1194-1206.
- Shaffer, H.B. 1989. Natural History, Ecology and Evolution of the Mexican "Axolotls". *Axolotl* (18): 5-11.
- Shaffer, H.B. y M.L. McKnight. 1996. The polytypic species revisited: genetic differentiation and molecular phylogenetics of the tiger salamander *Ambystoma tigrinum* (Amphibia: Caudata) Complex. *Evolution* 50 : 417 – 433.
- Skelly, D.K., E.E. Werner y S.A. Cortwright. 1999. Long-term distributional dynamics of a Michigan amphibian assemblage. *Ecology* 80: 2326-2337.
- Sherwin, W.B., y C. Moritz. 2000. Managing and monitoring genetic erosion. In Genetics, demography and viability of fragmented populations, 9-34. Young, A. G. y Clarke, G. M. (Eds.) Cambridge: Cambridge University Press. Hedrick, P. W. (2001). *Conservation genetics: where are we now? Trends Evolution and Ecology* 16: 629-636.
- Síntesis Geográfica del Estado de Hidalgo, Instituto Nacional de Geografía, Estadística, e Informática (INEGI), 1992.
- Slatkin, M. 1994. Linkage Disequilibrium in Growing and Stable Populations. *Genetics Society of America* 137: 331-336.
- Smith, H.M., y E.H. Taylor. 1966. Herpetology of Mexico Annotated Checklists and Keys to the Amphibians and Reptiles. A. *Reprint of Bulletins* 187, 194 and 199 of the U. S. National Museum With a List of subsequent taxonomic Innovations. Eric Lundberg Ashton, Maryland.
- Smith, T.B., y R.K. Wayne. 1996. Molecular genetic approaches in conservation. Oxford University Press, Oxford.
- Soto-Maraibio, E.R. 2003. Variación Morfológica, Variación Genética y Estructura Poblacional en Poblaciones Alopátricas de *Bufo spinulosus* (Anura:Bufonidae) en Chile. Tesis de Maestría, Universidad de Chile.
- Sorci, G., J. Clobert, y S. Belichon. 1996. Phenotypic plasticity of growth and survival in the common lizard *Lacerta vivipara*. *Journal of Animal Ecology* 65: 781–790.

- Spear, S.F., C. Peterson, M.D. Matocq, y A. Storfer. 2005. Landscape genetics of the blotched tiger salamander (*Ambystoma tigrinum melanostictum*). *Molecular Ecology* 14: 2553-2564.
- StatSoft Institute. 2004. SATISTICA (Data analysis software system), Versión 7. URL: <http://www.statsoft.com>
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 199-203.
- Takezaki, N., y M. Nei. 1996. Genetic distance and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144: 389-399.
- Templeton, A.R., E. Routman, y C.A. Phillips. 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140:767-782.
- Thien, J.A. 1969a. The nomenclatural history of genus *Ambystoma*. *Catalogue of American Amphibian and Reptilians* 75: 1-4.
- Thien, J.A. 1969b. *Ambystoma*. Mole salamanders. *Catalogue of American Amphibian and Reptiles*. En: Flores-Villela, O., F. Mendoza-Quijano y G. González-Porter. 1995. Recopilación de claves para la determinación de anfibios y reptiles de México. *Publisher Museum of Zoology* 10: 1-285.
- Vázquez-Domínguez, E., D. Paetkau, N.J. Tucker, G. Hinten, y C. Moritz. 2001. Resolution of natural groups using interactive assignment test: an example from two species of Australian native rats (*Rattus*). *Molecular Ecology* 10: 2069-2078.
- Vega-López, A.A., y T. Álvarez. 1992. La herpetofauna de los volcanes Popocatepetl e Iztaccihuatl. *Acta Zoológica Mexicana, nov.* . 1992:1-128.
- Velo-Antón, G., A. Cordero-Rivera, y P. Galán. 2006. Características ecológicas, evolutivas y estado de conservación de los anfibios del Parque Nacional de las islas Atlánticas de Galicia. *Proyectos de investigación en parques Nacionales* 195-208
- Veloso, A., M. Sallaberry, J. Navarro, P. Iturra, J. Valencia, M. Penna, y N. Díaz. 1982. "Contribución sistemática al conocimiento de la herpetofauna del extremo norte de Chile". En "El hombre y los ecosistemas de montaña". MAB-6: 135-265.
- Vos, C.C., A.G. Antonisse-de Jong, P.W. Goedhart, y M.J.M. Smulders. 2001. Genetic similarity as a measure for connectivity between fragmented populations of the moor frog (*Rana arvalis*). *Heredity* 86: 598-608.

- Voss, S.R., y H.B. Shaffer. 1995. What Insights Into the Developmental Traits of Urodeles Does the Study of Interspecific Hybrids Provide?. Center for Population Biology and section of Evolution and Ecology Universidad de California. 1-30 pp.
- Weisrock, D.W., L.K. Harmon y A. Larson. 2005. Resolving Deep Phylogenetic Relationships in Salamanders: Analyses of Mitochondrial and Nuclear Genomic Data. *Systematic Biology* 54 (5): 758 – 777.
- Welsh Jr., H.H. 1990. Relictual amphibians in Old-Growth Forests. *Conservation Biology* 4: 309-319.
- Wentz, A. 2001. *Ambystoma tigrinum* (On-line), la diversidad de los animales. URL http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Ambystoma_tigrinum.html.
- Wieczorek, A.M., R., Zamudio, L. King, y B. Gjetua. 2002. Insolation of microsatellite loci in spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*). *Molecular Ecology Notes*. 2:313-315.
- Wright, S. 1965. Interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution* 19, 395-420.
- Yeh, F., R. Yang, y T. Boyle. 1999. POPGEN, Versión 1.31: Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis.
URL: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm>.
- Young, B.E., K.R. Lips, J.K. Reaser, R. Ibañez, A.W. Salas, J.R. Cedeño, L.A. Coloma, S. Ron, E. La Marca, J.R. Meyer, A. Muñoz, F. Bolaños, G. Chaves, y D. Romo, 2001. Population Declines and Priorities for Amphibian Conservation in Latin America. *Conservation Biology* 15: 1213-1223.
- Zamudio, K.R., y W.K. Savage. 2003. Historical isolation, range expansion, and secondary contact of two highly divergent mitochondrial lineages in spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*). *Evolution* 57(7): 1631-1652.
- Zavala, E. 1995. Encinos Hidalguenses. Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales. México. 133 pp.

ANEXOS

ANEXO A

Protocolo de Extracción modificado a partir de Higuchi, R. (1989)

1. Extraer de 1-1.5cm de tejido del individuo y colocarlo en un tubo rotulado, los tubos deben tener tapas ajustadas, de modo que no haya escapes en los pasos 3 y 7 (parte de el tejido es macerado en un mortero estéril).
2. Agregar 0.5 ml de *buffer* de digestión para DNA agregado 20 μ l de Proteínasa K (0.5mg/ml de concentración final) y 20 μ l de RNAasa por muestra.

Buffer de digestión para DNA:

50 mM Tris-HCl pH 8,0
100 mM EDTA pH 8,0
100 mM NaCl
1% SDS

3. Incubar durante la noche a 50-55 °C. Si es macerado el tejido previamente, se puede incubar a 55-60 °C durante una hora.
4. Agitar suavemente los tubos durante la incubación para acelerar la función de detergentes (*Buffer* de digestión para DNA).
5. Agregar 0.7ml de fenol/cloroformo (25:24). Mezclar vigorosamente.
6. Centrifugar a 14 000 rpm durante 5 minutos. Extraer la fase acuosa (DNA en solución y verterla en otro tubo). Si la muestra esta todavía sucia repetir el paso 5.
7. Agregar 1 ml de etanol 100% a temperatura ambiente y agitar hasta observar el precipitado de DNA (aproximadamente 1 minuto)
8. Centrifugar a 14 000 rpm durante 5 minutos, decantar cuidadosamente.
9. Agregue 0.5-1 ml de etanol al 70% (-20 °C) agitarla varias veces.
10. Centrifugar a 14 000 rpm durante 5 minutos, decantar cuidadosamente.
11. Centrifugar a 14 000 rpm durante 2 minutos para que posteriormente se quita el excedente de etanol mediante una pipeta o un capilar.
12. Dejar secar el botón (*pellet*).
13. Agregar de 100-200 μ l (μ l) de agua bidestilada estéril e incubar a 65 °C.

Purificación total de DNA a partir de tejido animal (Spin-Column) QIAGEN™ 2006. (* La proteinasa K y los *Buffer*, vienen incluidos dentro del kit de extracción).

1. Cortar 25 mg o 1-2 cm de tejido animal y se coloca en un criotubo de 1.5 ml. Posteriormente se le adiciona 180 μ l de *Buffer* ATL. (El tejido puede macerarse previamente).
2. Adicionar 20 μ l de proteinasa K, mezclar vigorosamente e incubar a 56 C° hasta que el tejido se lise completamente, en aproximadamente una hora (se adicionan 40 μ l de RNasa, ya que se requiere DNA genómico y con ello se eliminan los fragmentos de RNA).
3. Mezclar vigorosamente durante 15 seg y adicionar 200 μ l de *Buffer* AL y 200 μ l de etanol (96-100%). Con la finalidad de evitar precipitados, se puede mezclar con anterioridad el *Buffer* AL con el etanol.
4. Homogenizar con una micropipeta la mezcla del paso 3 (incluyendo cualquier precipitado), dentro de un tubo colector de 2 ml con una mini-columna *DNeasy*. Centrifugar (6,000 xg) a 8,000 rpm durante un minuto.
5. Colocar la mini-columna *DNeasy* en un nuevo tubo colector de 2 ml, adicionar 500 μ l de *Buffer* AW1 y centrifugar (6,000 xg) a 8,000 rpm durante un minuto.
6. Colocar la mini-columna *DNeasy* en un nuevo tubo colector de 2 ml, adicionar 500 μ l de *Buffer* AW2 y centrifugar (20,000 xg) a 14,000 rpm durante tres minutos.
7. Colocar la mini-columna *DNeasy* en un criotubo limpio de 1.5 ml o 2 ml y pipetear 200 μ l del *Buffer* AE directamente en la membrana de la *DNeasy*. Incubar a temperatura ambiente por un minuto y centrifugar (6,000 xg) a 8,000 rpm por un minuto.
8. Se recomienda, para un máximo rendimiento de DNA, repetir una vez más desde el paso siete.

Secuencias de oligonucleótidos para microsatélites

NOMBRE Mech, S.G., et al., (2003)	SECUENCIA
ATS5-6 -F	5'- TAT GGG TGA GAA TCT AGG AG -3'
ATS5-6 -R	5'- GCA CCA TCC AGT CAA AC -3'
ATS5-7 -F	5'- GGG CTT GAA TCA TGT AGT GG -3'
ATS5-7 -R	5'- GGG AAG ACT AGA TGG CAA TAA C -3'
ATS10-7 -F	5'- GAG GCA GGA TGA TTT AGA -3'
ATS10-7 -R	5'- CTT GGC ATT ACT GAT TAG G -3'
ATS12-3 -F	5'- TGT AGC AGA AGA CGG GTA T -3'
ATS12-3 -R	5'- AGT AAA GCG AAG ATA TGG G -3'

Master Stock (Depende de la concentración de $MgCl_2$)

REACTIVOS	$MgCl_2$ (2.5mM)	$MgCl_2$ (2.0mM)	$MgCl_2$ (1.5mM)	$MgCl_2$ (1.0mM)
dH ₂ O	463.1 μ l	465.48 μ l	467.86 μ l	470.24 μ l
Buffer PCR 10X	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l
MgCl ₂	11.9 μ l	9.52 μ l	7.14 μ l	4.76 μ l
TOTAL	975 μ l	975 μ l	975 μ l	975 μ l

dNTP's mix (2.5 mM)

Reactivos	Cantidad
dCTP	20 μ l
dGTP	20 μ l
dCTP	20 μ l
TTP	20 μ l
TOTAL	80 μ l = 2.5 mM

Master Stock Final

Reactivos	1 Reacción
Agua bidestilada estéril (ul)	8.8 μ l
Master stock (ul)	5.1 μ l
dNTP's mix	4.2 μ l
Primer (B) ----- 25 uM	2.5 μ l
Primer (F) ----- 25 uM	2.5 μ l
Taq DNA polimerasa	1U / reacción
TOTAL POR TUBO	23 μl
* 1 unidad de Taq DNA polimerasa nativa / 5 mil * # de reacciones.	

Condiciones de amplificación

	<i>Ambystoma tigrinum</i>			
	1.5	2.0	1.5	1.5
MgCl ₂ (mM)	1.5	2.0	1.5	1.5
	ATS5-6	ATS10-7	ATS12-3	ATS5-7
Desnaturalización	2 min. * 94°C	2 min. * 94°C	2 min. * 94°C	2 min. * 94°C
# de ciclos	30	31	34	32
1.Desnaturalización	30 s * 94°C	30 s * 94°C	30 s * 94°C	30 s * 94°C
2.Amplificación	30 s * 50.9°C	50 s * 58 °C	30 s * 52.8°C	30 s * 54.7°C
3.Polimerización	75 s * 72°C	70 s * 72°C	50 s * 72°C	50 s * 72°C
Ext. Final	5 min. * 72°C	5 min. * 72°C	5 min. * 72°C	5 min. * 72°C

Tinción de geles de poliacrilamida/urea con nitrato de plata

Pasos	Reactivos	Tiempo
1)Fijación	Solución fijadora (Acido acético al .5 % y etanol absoluto al 10%) Para un litro: 100 ml de etanol absoluto 50 ml de acido acético 850 ml de agua destilada	5 - 30 minutos *20
2)Lavado (2 a 3 veces)	Agua destilada	2 minutos (cambiar el agua entre lavados)
3)Tinción con Plata (impregnación)	Solución de Plata(1.5g/L de nitrato de Plata, 0.056% de formaldehido) Para un litro: 1.5 g de Nitrato de Plata 1.5 ml de formaldehido al 37% Aforar a un litro con agua destilada	10 a 60 minutos *30
4)Lavado	Agua destilada	5 – 20 segundos
5)Revelado	Solución reveladora fría (30g/L Hidróxido de sodio, 0.056% de formaldehido) Para un litro: 30 g de Hidróxido de Sodio 1.5 ml de formaldehido al 100% (1ml al 100%) 1 ml de tiosulfato de sodio al 1% Aforar a un litro con agua destilada	2 - 10 minutos
6)Paro de reacción de revelado	Solución fijadora (acido acético al .5%, y etanol absoluto al 10% usar fría [4°C])	30 s – a 5 minutos
* Para el revelado, el formaldehido (100%) y el tiosulfato (1%) se adicionan hasta el momento de revelar		

Formaldehido al 37%	Para 10 ml: 3.7 ml de formaldehido al 100% Aforar a 10 ml con agua destilada	Para 100 ml: 37 ml de formaldehido al 100% Aforar a 100 ml con agua des.
Tiosulfato de sodio al 1%	Para 5 ml: 0.5 g de Tiosulfato de sodio Aforar en 5 ml de agua destilada	Para 10 ml: 1 g de Tiosulfato de sodio Aforar a 10 ml de agua des.

ANEXO B

A continuación se proporcionan las frecuencias ancestrales y actuales, frecuencias alélicas compartidas entre poblaciones, frecuencias alélicas por *locus*, descritas en el área de resultados.

Frecuencias ancestrales y actuales para el *locus* ATS5-6

Alelo	Ancestral	Actual	Alelo	Ancestral	Actual
126	0.011	0.015	158	0.043	0.057
128	0.032	0.045	160	0.039	0.047
130	0.011	0.016	162	0.017	0.031
136	0.01	0.017	164	0.048	0.05
138	0.022	0.027	166	0.092	0.069
140	0.007	0.012	168	0.238	0.175
142	0.01	0.015	170	0.032	0.046
148	0.007	0.011	182	0.01	0.016
150	0.013	0.021	184	0.009	0.014
152	0.017	0.018	186	0.006	0.011
154	0.105	0.082	192	0.008	0.011
156	0.206	0.181	200	0.008	0.011

Frecuencias ancestrales y actuales para el *locus* ATS5-7

Alelo	Ancestral	Actual	Alelo	Ancestral	Actual
168	0.021	0.025	252	0.057	0.047
171	0.062	0.056	255	0.038	0.039
174	0.028	0.032	258	0.032	0.031
177	0.027	0.03	261	0.084	0.08
180	0.067	0.06	264	0.043	0.033
183	0.024	0.027	267	0.013	0.02
186	0.021	0.021	270	0.033	0.032
189	0.078	0.063	276	0.046	0.037
192	0.024	0.028	279	0.007	0.011
195	0.024	0.032	282	0.01	0.015
210	0.059	0.056	285	0.024	0.029
231	0.03	0.03	288	0.007	0.01
243	0.025	0.028	294	0.008	0.017
246	0.018	0.018	300	0.015	0.025
249	0.066	0.056	309	0.006	0.01

Frecuencias ancestrales y actuales para el *locus* ATS10-7

Alelo	Ancestral	Actual	Alelo	Ancestral	Actual
232	0.008	0.012	266	0.008	0.012
234	0.017	0.024	268	0.01	0.015
236	0.013	0.019	270	0.028	0.028
238	0.024	0.027	272	0.009	0.014
240	0.066	0.067	274	0.015	0.021
242	0.029	0.032	276	0.027	0.028
244	0.058	0.053	278	0.053	0.044
246	0.072	0.061	280	0.062	0.061
248	0.055	0.048	282	0.024	0.023
250	0.042	0.043	286	0.013	0.018
252	0.04	0.038	288	0.098	0.088
258	0.03	0.032	290	0.104	0.083
260	0.056	0.057	294	0.03	0.038
264	0.009	0.013			

Frecuencias ancestrales y actuales para el locus ATS12-3

Alelo	Ancestral	Actual	Alelo	Ancestral	Actual
100	0.006	0.01	148	0.008	0.012
103	0.023	0.03	151	0.008	0.013
106	0.049	0.049	157	0.023	0.028
109	0.063	0.064	160	0.01	0.018
112	0.054	0.046	169	0.039	0.051
115	0.058	0.052	172	0.035	0.036
118	0.051	0.052	175	0.108	0.088
121	0.024	0.031	178	0.031	0.029
124	0.02	0.024	181	0.101	0.085
127	0.023	0.027	184	0.088	0.079
130	0.007	0.012	187	0.079	0.057
136	0.013	0.02	196	0.008	0.012
139	0.044	0.04	205	0.007	0.011
142	0.021	0.022			

Frecuencias de los alelos compartidos para cada una de las localidades. Criterio de discriminación: Individuos sin mezcla= >95% de alelos parentales, Mezclas Incipientes= 95-80% de los alelos parentales, Intercambio genético en F_2 = 60-80% de alelos parentales e Intercambio genético en F_1 = 60-45% de cada uno de los alelos parentales

No.	Loc.	Tecocomulco	El Oyamel	El Valle	No.	Loc.	Tecocomulco	El Oyamel	El Valle
1	1	0.9298	0.0372	0.033	29	1	0.9716	0.0132	0.0152
2	1	0.9381	0.0328	0.0291	30	1	0.9765	0.0114	0.0122
3	1	0.9697	0.0191	0.0112	1	2	0.7103	0.2368	0.0529
4	1	0.9683	0.0163	0.0154	2	2	0.7331	0.212	0.0549
5	1	0.9898	0.0053	0.005	3	2	0.7142	0.2299	0.0559
6	1	0.9824	0.0086	0.009	4	2	0.7112	0.2338	0.055
7	1	0.9731	0.0164	0.0105	5	2	0.732	0.2162	0.0518
8	1	0.9749	0.0123	0.0128	6	2	0.7817	0.1728	0.0455
9	1	0.9466	0.0307	0.0227	7	2	0.7507	0.1942	0.0551
10	1	0.9856	0.0068	0.0076	8	2	0.7203	0.2265	0.0532
11	1	0.9843	0.0073	0.0083	9	2	0.6891	0.2546	0.0564
12	1	0.9684	0.0149	0.0167	10	2	0.7434	0.2047	0.0519
13	1	0.9869	0.0065	0.0066	11	2	0.7693	0.1931	0.0376
14	1	0.9857	0.0069	0.0074	12	2	0.7029	0.2393	0.0578
15	1	0.9807	0.0093	0.01	13	2	0.5493	0.3447	0.1061
16	1	0.9859	0.0067	0.0074	14	2	0.6558	0.2753	0.0689
17	1	0.9439	0.0257	0.0304	15	2	0.7259	0.2142	0.0599
18	1	0.9831	0.0077	0.0091	16	2	0.7016	0.24	0.0584
19	1	0.982	0.01	0.008	17	2	0.6699	0.264	0.0662
20	1	0.9528	0.0251	0.0221	18	2	0.7033	0.24	0.0568
21	1	0.9811	0.0098	0.0091	19	2	0.7344	0.2117	0.0539
22	1	0.948	0.0222	0.0298	20	2	0.7058	0.2162	0.078
23	1	0.9888	0.0058	0.0055	1	3	0.7022	0.0634	0.2344
24	1	0.9828	0.0084	0.0088	2	3	0.631	0.0901	0.279
25	1	0.9832	0.0092	0.0076	3	3	0.7438	0.0783	0.178
26	1	0.963	0.0189	0.0181	4	3	0.7251	0.059	0.2158
27	1	0.981	0.0108	0.0081	5	3	0.4615	0.0822	0.4563
28	1	0.9853	0.0081	0.0065	6	3	0.6621	0.108	0.2299

Frecuencias y Proporciones de alelos encontrados para el total de localidades

General		
Individuos	56	
		Proporciones
Individuos sin mezcla	25	0.446428571
Mezclas incipientes	5	0.089285714
Intercambio genético en F₁	2	0.035714286
Intercambio genético en F₂	24	0.428571429
Total		1

Frecuencias y Proporciones de alelos encontrados para la localidad de Tecocomulco

Tecocomulco		
Individuos	30	
		Proporciones
Individuos sin mezcla	25	0.833333333
Mezclas incipientes	5	0.166666667
Intercambio genético en F₁	0	0.000000000
Intercambio genético en F₂	0	0.000000000
Total		1

Frecuencias y Proporciones de alelos encontrados para la localidad de El Oyamel

El Oyamel		
Individuos	20	
		Proporciones
Individuos sin mezcla	0	0.00
Mezclas incipientes	0	0.00
Intercambio genético en F₁	1	0.05
Intercambio genético en F₂	19	0.95
Total		1

Frecuencias y Proporciones de alelos encontrados para la localidad de El Valle

El Valle		
Individuos	6	
		Proporciones
Individuos sin mezcla	0	0.000000000
Mezclas incipientes	0	0.000000000
Intercambio genético en F₁	1	0.166666667
Intercambio genético en F₂	5	0.833333333
Total		1

Frecuencias alélicas por localidad para el locus ATS5-6

	Tecocomulco	El Oyamel	EL Valle
Alelo 168	0.238	0.175	0.172
Alelo 156	0.206	0.181	0.183
Alelo 154	0.105	0.082	0.083
Alelo 166	0.092	0.069	0.072

Frecuencias alélicas por localidad para el locus ATS5-7

	Tecocomulco	EL Oyamel	EL Valle
Alelo 261	0.084	0.08	0.082
Alelo 189	0.078	0.063	0.063
Alelo 180	0.067	0.06	0.063
Alelo 249	0.066	0.056	0.056
Alelo 171	0.062	0.056	0.057

Frecuencias alélicas por localidad para el locus ATS10-7

	Tecocomulco	El Oyamel	El Valle
Alelo 288	0.098	0.088	0.087
Alelo 290	0.104	0.083	0.083
Alelo 240	0.066	0.067	0.068
Alelo 280	0.062	0.061	0.061
Alelo 246	0.072	0.061	0.06

Frecuencias alélicas por localidad para el locus ATS12-3

	Tecocomulco	El Oyamel	EL Valle
Alelo 175	0.108	0.088	0.088
Alelo 181	0.101	0.085	0.087
Alelo 184	0.088	0.079	0.083
Alelo 109	0.063	0.064	0.062
Alelo 187	0.079	0.057	0.056
Alelo 118	0.051	0.052	0.054

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.