



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
HIDALGO

---

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

ESTRUCTURA GENÉTICA Y EVOLUTIVA DE UNA ZONA  
HÍBRIDA DEL COMPLEJO *Sceloporus grammicus*  
(Squamata: Phrynosomatidae) EN EL MUNICIPIO DE  
EMILIANO ZAPATA, HIDALGO.

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA PRESENTA:

ERNESTO CHAVEZ CALZADA

ASESOR: DRA. MARÍA DEL CARMEN SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

## AGRADECIMIENTOS

---

Mis más sinceros agradecimientos a la Dra. María del Carmen Sánchez Hernández por la oportunidad de permitirme trabajar bajo su cuidado, por el apoyo, enseñanzas e interés en este trabajo. Gracias Doc.

A mi comité evaluador: Dra. Irene Goyenechea Mayer-Goyenechea, Ma. C. Jesús Dra. Dr. Ignacio Esteban Castellanos Sturemark, Biol. Ricardo León Rico y Dra. María del Carmen Sánchez Hernández, Dr. Aurelio gracias por sus sugerencias y comentarios, sin los cuales este trabajo no hubiera sido posible.

A mis compañeros Antonio, Diana, Jacqueline y Carmen, gracias por su amistad y apoyo dentro del laboratorio, realmente aprecio su ayuda.

Gracias a PROMEP por el apoyo en su proyecto Análisis del Flujo Genético a través de los Complejos Híbrido en Encinos. – UAEH y a CONACYT la ayuda en su Proyecto “.Descripción de la Estructura Genética y Evolutiva de los diferentes Citotipos y Zonas Híbridas asociadas al Complejo de *Sceloporus grammicus* (Phrynosomatidae) en el Estado de Hidalgo.

Gracias Reyes por todo el apoyo, tus aportaciones en el trabajo fueron muy importante y tus consejos mis mejores armas, gracias a toda mi familia por el interés, gracias a los que conozco y a los que no conozco por darme fuerza y aliento. Gracias L”\$% y jubileo.

Dedicada a mi mejor ejemplo.

Caminando solo por la calle en un viaje de esos, donde me encontraba preso de mis propias actitudes, sin que nadie me ayude, la solución yo buscaba a los problemas que lentamente deterioraban mi alma y mi conciencia, no había ciencia ni filosofía que me sacara de la decadencia, de la consecuencia de escoger el mal camino, por mis malas decisiones se truncaba mi destino.

Ya no confiaba en nadie aunque yo hablaba con todos, muchos me dieron de codo, me sentía un don nadie, por las noches no dormía solía tener pesadillas y las veces que lo hacía era a fuerza de pastillas. La palabra viva era sinónimo de fastidio, muchas veces busque otra salida, mi corazón se obstinaba se hacía duro como el hierro.

Mis problemas ocultos bajo una fría sonrisa, era todo un payaso con una cara postiza, para todos era un joven normal que caminaba sin saber que a ese joven la depresión lo mataba, pero a quien iba a pedirle ayuda si yo no confiaba en nadie, mi amiga era la duda, solo me quedaba uno quien hace tiempo no buscaba, al que me decía te amo y caso yo no le prestaba, al que tocaba mi conciencia cuando en mal camino estaba, los pelos se me erizaban cuando sentía su presencia, el que no miraba mi apariencia ni estaba por antojos, al que aunque yo no quería hacia que lloraran mis ojos.

Por fin encontré la salida a un futuro tan incierto, hoy tengo mis ojos están abiertos para poder ver lo que es la vida, mi alma ya no esta perdida en ese pasado espantoso, los errores cometidos ahora me resultan graciosos gracias a ti por que nunca me dejaste, cada paso que camine a mi me acompañaste, por que cuando andaba perdido de mi nunca te alejaste, por que no siempre fui fiel mas sin embargo aun tu me amaste, cuantas veces me perdonaste, no se fueron tantas, de tu perdón día a día mi corazón se quebranta, realmente me di cuenta que para ti soy importante, que para el hombre estaré atrás pero tu me llevas por delante, en cada instante de mi vida mi corazón esta grabado, que me amaste sin medida como nadie aun nadie me ha amado, que sanaste mis heridas y con misericordia miraste, gracias a ti por que nunca me abandonaste.

El mundo es diferente desde este punto de vista, el mundo esta a nuestro alcance.

## ÍNDICE

---

### AGRADECIMIENTOS

### LISTA DE CUADROS

### LISTA DE FIGURAS

### RESUMEN

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1. ANTECEDENTES.....	3
1.1. Las zonas híbridas en las poblaciones naturales.....	3
1.2. Climas ambientales y ecotonos en la delimitación de especies .....	4
1.3. Las zonas híbridas en las poblaciones naturales.....	5
1.4. Zonas híbridas asociadas a climas ecológicas.....	6
1.5. Origen de las zonas híbridas.....	7
1.5.1. Zonas híbridas primarias.....	7
1.5.2. Zonas híbridas secundarias.....	7
1.6. Mantenimiento de zonas híbridas.....	8
1.7. Desplazamiento de zonas híbridas.....	8
1.8. Efecto sobre el flujo genético.....	9
1.9. La especiación y las zonas híbridas .....	9
1.10. El complejo <i>Sceloporus grammicus</i> como modelo de especiación ..	10
1.11. El complejo <i>Sceloporus grammicus</i> en la región central de México..	12
1.12. El uso de herramientas moleculares en genética evolutiva.....	13
1.13. Trabajos con microsatélites en zonas híbridas.....	14
2. JUSTIFICACIÓN.....	15
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. Objetivo general.....	16
3.2. Objetivos específicos.....	16
4. HIPÓTESIS.....	17
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
5.1. Descripción del Área de estudio.....	17

5.2.	Uso de Hábitat (microhábitat).....	20
5.3.	Trabajo de Campo.....	21
5.4.	Obtención de muestras de tejido (en laboratorio) para DNA.....	22
5.5.	Análisis citológico (cariotipos) .....	22
5.6.	Análisis morfológico .....	22
5.6.1.	Análisis de correlaciones .....	25
5.6.2.	Prueba de Tukey.....	25
5.6.3.	Análisis discriminante.....	26
5.6.4.	Análisis de componentes principales.....	26
5.7.	Extracción de DNA, selección y visualización de microsatélites.....	26
5.8.	Análisis de diversidad genética y estructura poblacional.....	27
6.	RESULTADOS.....	28
6.1.	Análisis citológicos.....	28
6.2.	Análisis morfométrico.....	34
6.2.1.	Análisis de Correlaciones .....	34
6.2.2.	Prueba de Tukey.....	35
6.2.3.	Análisis Discriminante .....	37
6.2.4.	Análisis de Componentes Principales .....	39
6.3.	Análisis genético.....	45
6.3.1.	Riqueza Alélica.....	45
6.3.2.	Estructura genética.....	49
6.3.3.	Distancias y Flujo Genético entre Razas.....	51
6.3.4.	Dinámica de Flujo Genético.....	54
6.3.5.	Relaciones alélicas Ancestrales y Actuales.....	58
6.4.	Uso de Hábitat (microhábitat).....	64
7.	DISCUSIÓN.....	65
7.1.	Análisis morfológico.....	65
7.2.	Análisis de la zona híbrida.....	68
7.3.	Estructura genética, diversidad y riqueza.....	71
7.3.1.	Dinámica de flujo genético.....	74
7.3.2.	Relaciones alélicas ancestrales y actuales.....	75
8.	CONCLUSIONES.....	76

LITERATURA CITADA.....	78
ANEXO A.....	89
ANEXO B.....	95

## ÍNDICE DE CUADROS

---

1	Características generales de las zonas de muestreo para <i>Sceloporus grammicus</i> .....	18
2	Microhábitat registrados para las tres poblaciones de Estudio.....	21
3	Lista de 11 caracteres morfométricos que se midieron en los ejemplares de <i>S. grammicus</i> .....	21
4	Análisis de correlaciones entre variables morfológicas tomadas de los individuos.....	34
5	Análisis de Varianza (ANDEVA) de las tres poblaciones.....	35
6	Prueba de Tukey para las tres localidades.....	36
7	Análisis discriminante entre localidades.....	38
8	Análisis de componentes principales.....	40
9	Frecuencias Alélicas de cada locus por población; se muestran las frecuencias obtenidas para cada población.....	46
10	Diversidad Alelica por locus en cada población.....	47
11	Riqueza alélica por Locus en cada población.....	47
12	Diversidad genética por muestra de cada población.....	48
13	Heterocigosidad de Nei, para cada locus.....	48
14	Riqueza Alélica, Heterocigotos observados, Heterocigotos observados.....	49
15	Diferencias genéticas entre las tres poblaciones analizadas de <i>Sceloporus grammicus</i> ( $F_{st}$ ) .....	50
16	Diferencias genéticas entre individuos de las tres poblaciones ( $F_{is}$ ).....	50
17	Diferencias entre individuos con respecto a su especie ( $F_{it}$ ).....	51
18	Comparación de distancias genéticas de Nei.....	52
19	Matriz de flujo genético.....	53
20	Componentes de la varianza molecular, calculada a partir del método de diferencias alélicas ( $F_{st}$ ).....	53
21	Componentes de la varianza molecular entre muestras, entre individuos dentro de cada muestra y diferencias alélicas entre el total.....	54
22	Intervalos de selección para las categorías de mezcla alélica.....	55
23	Proporciones de los alelos encontrados en cada una de las razas cromosómicas analizadas.....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

1	Ubicación del área de estudio. El municipio de Emiliano Zapata en el Estado de Hidalgo.....	19
2	Medidas morfológicas que se tomaron en cuenta para el análisis.....	24
3	Frotis cromosómico de un ejemplar de <i>Sceloporus grammicus</i> de la población de San José.....	29
4	Frotis cromosómico de un ejemplar de <i>Sceloporus grammicus</i> de la población del Casco.....	30
5	Ideograma de los cariotipos. Representación completa de las razas pertenecientes al complejo <i>Sceloporus grammicus</i> .....	31
6	Cariotipos de ambas razas problema y su representación en base a homología.....	32
7	Frotis cromosómico poliploide de Santa Clara mayor al número diploide de cualquiera de las dos razas cromosómicas presentes.....	33
8	Variabes que fueron representativas y utilizadas para diferenciar entre poblaciones.....	37
9	Análisis discriminante entre localidades, donde las tres localidades presentan una clara diferenciación.....	39
10	Distancias de similitud entre poblaciones obtenidas con el programa JMP 7.0.....	41
11	Análisis de Cluster jerárquico, donde se muestra que las localidades más parecidas.....	42
12	Morfotipos distintivos entre localidades.....	43
13	Grafica donde se muestra las relaciones que existen con respecto de las medidas en cada una de las razas cromosómicas presentes.....	44
14	Estadísticos “F” para el total de las poblaciones analizadas.....	51
15	Dendograma que muestra las relaciones genéticas entre las especies analizadas. UPGMA.....	52
16	Porcentaje de alelos compartidos entre las razas cromosómicas.....	56
17	Frecuencias alélicas registradas para los individuos de las tres poblaciones analizadas.....	56
18	Grafico de estructura genética para las tres poblaciones analizadas.....	57
19	Descripción grafica de relaciones entre individuos por medio de alelos compartidos.....	57
20	Grafica de valores ancestrales y actuales de los alelos obtenidos para el locus Gramm 101.....	58
21	Grafica de valores ancestrales y actuales de los alelos obtenidos para el locus Gramm 102.....	59
22	Grafica de valores ancestrales y actuales de los alelos obtenidos para el locus Scel 571.....	59
23	Grafica de valores ancestrales y actuales de los alelos obtenidos para el locus Gramm 104.....	60
24	Grafica de valores ancestrales y actuales de los alelos obtenidos para el locus Gramm 106.....	60
25	Grafica de valores ancestrales y actuales de los alelos obtenidos para el locus	

	Gramm 107.....	61
26	Frecuencias alélicas para el locus gramm 101, donde se muestra la frecuencia obtenida para cada población. ....	61
27	Frecuencias alélicas para el locus gramm102, donde se muestra la frecuencia obtenida para cada población. . ....	62
28	Frecuencias alélicas para el locus Scel571, donde se muestra la frecuencia obtenida para cada población. ....	62
29	Frecuencias alélicas para el locus gramm104, donde se muestra la frecuencia obtenida para cada población.....	63
30	Frecuencias alélicas para el locus gramm106, donde se muestra la frecuencia obtenida para cada población .....	63
31	Frecuencias alélicas para el locus gramm107, donde se muestra la frecuencia obtenida para cada población.....	64

## RESUMEN

---

La importancia evolutiva de la hibridación es reunir genotipos diversos y producir diferencias genéticas (en tiempo menor que la mutación y el reemplazo de genes) y formación de complejos coadaptados, como es el caso de la lagartija *Sceloporus grammicus*, que forma un complejo de razas cromosómicas (citotipos). En este estudio se analizó la estructura de una zona híbrida entre los citotipos S y FM2, en tres diferentes localidades del municipio de Emiliano Zapata, Hidalgo; se utilizaron tres estrategias para el estudio.

Primero se realizó un estudio citológico, examinando 70 cariotipos distintos de los individuos recolectados para determinar las razas presentes (S y FM2) y posibles híbridos, después se realizó un análisis morfométrico; con un total de 60 individuos adultos, se evaluaron 11 caracteres morfológicos discriminantes entre razas cromosómicas, utilizando estas medidas para definir un patrón corporal, verificando las diferencias y semejanzas que existen entre poblaciones e identificando morfotipos distintivos para cada uno de los sitios. Por último se analizaron un mínimo de 15 individuos (el Casco) a un máximo de 25 individuos (Santa Clara) por población utilizando seis microsatélites (Gram 101, Gram 102, Scel 571, Gram 104, Gram 106, Gram 107) como marcadores genéticos para determinar la estructura de la zona híbrida y los niveles de flujo genético entre individuos puros e híbridos.

Los resultados obtenidos denotan la existencia de diferencias citológicas y morfológicas definiendo un morfotipo en cada una de las tres poblaciones, también existe una tendencia significativa a arreglos cromosómicos paternos, respecto al flujo genético y la homología genética se observan valores elevados y el análisis alélico sugiere un proceso de hibridación e introgresión alélica entre las razas presentes (S y FM2) indicando procesos de especiación incipiente por lo cual los híbridos son muy raros, abundando predominantemente las retrocruzas.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

El concepto de especie es básico dentro de la delimitación de las poblaciones naturales, sin embargo, no existe un consenso sobre la versión adecuada para cada caso y se han acuñado entonces diversas definiciones al respecto. Dadas las dificultades de los conceptos reproductivos de especie para ser aplicados en múltiples situaciones, han surgido otras propuestas que intentan identificar los factores que causan que un grupo de organismos sean identificados como un grupo diferente y que hacen que sus integrantes tengan características biológicas similares y exclusivas, cuando se habla de grupos genéticamente diferenciados (como las razas cromosómicas), es posible utilizar un concepto cohesivo de especie (Templeton, 1989), el cual considera los procesos evolutivos que dan origen a la especiación, tanto filogenéticos como reproductivos.

Así, esclarecer los procesos que conllevan a una diferenciación progresiva entre las poblaciones de un grupo de organismos es crucial para entender los orígenes de la diversidad, tanto morfológica, como genética (Mettler y Gregg, 1982). Una controversia significativa para discriminar a las especies biológicas es que los grupos estudiados se encuentren en un estado evolutivo intermedio; como el proceso de cambio es gradual, es difícil separar efectivamente "razas" o "variedades" dentro de una especie determinada. Así, las *semiespecies* son un serio problema taxonómico, pero no son una contradicción al concepto biológico de especie, sólo hacen más notable la dinámica de las unidades evolutivas (Baum y Shaw, 1995).

En la actualidad se cuenta con una basta información sobre los procesos de intercambio genético dentro y entre especies, así como de la dinámica y estructura evolutiva de cada población dentro de algunos taxa. Además, el rastreo de genes presentes en el proceso de diferenciación entre poblaciones produce nuevas posibilidades de estudio e interpretación de los procesos microevolutivos que ocurren entre ellas (Dobzhansky, 1970). Los mecanismos de hibridación se consideran como una estrategia evolutiva importante de las especies que les permite aumentar la variabilidad genética, colonizar nuevos hábitats e inclusive, dar origen a nuevas especies.

Pueden considerarse a las razas como grupos de poblaciones que viven en diferentes porciones dentro del dominio geográfico de una especie y se distinguen por uno o más caracteres entre ellas; cuando las razas coinciden en una región, tienden a formar amalgamas genéticas y morfológicas mediante la hibridación (Mettler y Gregg, 1982). El aislamiento dependiente de la ecología puede ser un mecanismo frágil con discrepancias ecológicas, morfológicas y reproductivas poco diferenciadas entre las poblaciones, de tal manera que facilita un apareamiento inter-especies, dando como resultado híbridos, que pueden inclusive ser fértiles, los cuales al depender del ambiente, pueden ser rápidamente destruidos por pequeñas alteraciones (Jonsson, 1993).

La hibridación entre las especies casi siempre se compone de individuos en  $F_1$  con poca viabilidad y más prole con cruzamiento retrógrado en  $F_2$  (Hewitt, 2001). Anderson (1954) sostiene que sólo una pequeña porción de genes de una población puede cruzar la “brecha de los híbridos” para llegar a otra población distinta, manteniendo la actividad evolutiva de cada grupo relativamente limitada (hibridación introgresiva o introgresión); este proceso es frecuente en especies aisladas por factores ecológicos (Mettler y Gregg, 1982).

Puesto que el ambiente es cambiante, genotipos que estaban adaptados pueden dejar de estarlo; este proceso produce no solo variaciones dentro de una población sino que, al acumularse, pueden llevar a la formación de razas y variedades (Harrison, 1990). En este sentido, los límites de especies aun no han sido delimitados adecuadamente en muchos grupos de reptiles (Leite-Manrique *et al.*, 2005) el género *Sceloporus* ha sido un grupo de interés para los citosistématas, ya que proporciona información importante sobre el papel de los rearrreglos cromosómicos en los procesos de especiación (Bickham, 1983). El complejo *Sceloporus grammicus* presenta una gran diversidad cromosómica, después de que Hall (1973, 1980) estudiara con detalle a nivel citogenético, propuso siete citotipos distintos o razas cromosómicas (S, F5, F6, F5+6, FM1, FM3 y FM2) que lo representan.

Dentro el estado de Hidalgo se localizan seis de los siete citotipos reportados, incluyendo las tres razas de fisión múltiple (FM), además de tres

zonas de hibridación entre ellos y zonas con alto grado de polimorfismo cromosómico (Goyenechea, 1996); esta región proporciona entonces una oportunidad interesante para el estudio de la estructura y diversidad genética del complejo y la formación de zonas híbridas entre las distintas razas cromosómicas.

En este trabajo se analizó una zona de hibridación entre dos citotipos (S y FM2) para una región del estado de Hidalgo (Municipio de Emiliano Zapata), con base en la distribución espacial de ambas razas dentro del intervalo de localización del complejo, realizando una discriminación morfológica, cariotipos y análisis de estructura y flujo genético, utilizando microsatélites como marcadores genéticos. La hipótesis inicial sugiere que existe una diferenciación genética entre razas cromosómicas del complejo, las cuales mantendrán un flujo genético a través de zonas de contacto que formarán híbridos poco estables, pero fértiles, posiblemente asociados a clinas ambientales, dada la gran plasticidad ecológica de *Sceloporus grammicus*.

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1 La especiación ecológica**

Este concepto se distingue de otros modelos de especiación porque prioriza los procesos de selección y diferenciación basados en cambios ecológicos, sobre los mecanismos de aislamiento reproductivo. Esto implica que eventos aleatorios como la poliploidía, la deriva genética, los eventos de fundador o cuellos de botella y la hibridación, juegan un papel fundamental en los procesos de diferenciación, asociados generalmente a divergencias entre ambientes locales (Perfectti, 2002).

Sin embargo, aún elementos del ambiente pueden contribuir a la formación de barreras reproductivas parciales o totales dentro de una especie, lo que podría condicionar eventualmente la formación de ecotipos localmente adaptados, que pueden diferenciarse como “razas” o “sub-especies”, aunque en realidad forman parte de una misma unidad evolutiva (especie), la cual presenta una notable plasticidad adaptativa en microambientes ecogeográficos específicos (Hewitt, 2003).

Así, en muchas especies animales que mantienen ecotipos bien diferenciados, se han descrito áreas de polimorfismo robertsoniano (Barton y Hewitt, 1989, Hewitt, 2003) , denominadas habitualmente “zonas híbridas”, las cuales ocurren entre razas cromosómicas y poblaciones estándar, o entre diferentes razas cromosómicas, las cuales se caracterizan por tener un número cromosómico intermedio entre los correspondientes a las poblaciones que las han generado y por la presencia, en sus individuos, de cromosomas metacéntricos en heterocigosis.

Estas zonas se definen entonces como “regiones en las que los individuos de dos poblaciones que se pueden diferenciar por uno o más caracteres heredables, se encuentran, se reproducen y dan lugar a híbridos” (Hewitt, 2003). Este proceso se da naturalmente y los híbridos generados son viables y, al menos, parcialmente fértiles. En la mayoría de estas áreas o zonas de hibridación se generan un amplio rango de genotipos sobre los que pueden actuar, eventualmente, mecanismos selectivos que contrarrestan el flujo genético y mantienen a las poblaciones paternas como unidades diferenciadas a pesar de la hibridación.

## **1.2 Clinas ambientales y ecotonos en la delimitación de especies**

Huxley define a una clina como una variación gradual (fenotípica, genética, ecológica) a lo largo de un eje geográfico, las especies que están dentro de la clina ambiental están sujetas a la ruptura o desequilibrio ambiental creando condiciones para la especiación (Salomon, 2002). Su delimitación depende de la forma en la cual están distribuidas las poblaciones; es decir, puede haber clinas simpátricas, parapátricas o de contacto secundario (poblaciones originalmente alopátricas que coinciden posteriormente).

Los ecotonos se definen como áreas de transición entre ambientes y son de gran importancia por ser lugares donde coinciden comunidades ecológicas, en los cuales se mantiene una dinámica de la biodiversidad. La heterogeneidad ecológica presente en estas zonas de transgresión (Ver Kent *et al.*, 1997) es importantes en los procesos microevolutivos, ya que los estudios de dinámica de poblaciones evidencian procesos de especiación activa asociada a estas regiones.

Una vez que las poblaciones interrumpen el flujo génico entre si, se pueden fijar alelos diferentes en cada una de las poblaciones, con lo que pasarían a tener caracteres diagnósticos propios, y obtendrían entonces especies filogenéticas. La migración inter-démica y la hibridación pueden contrarrestar la divergencia, pero en determinadas circunstancias, la selección diversificadora (a favor de variaciones locales) puede ser el factor más importante, implicando la formación de clinas en la frecuencia de algunos loci. El apareamiento clasificado y una reducción en eficacia biológica de los híbridos conduciría al desarrollo final de la especiación (Arnold 1997).

La especiación parapátrica se produce sin una separación geográfica completa de las poblaciones, de hecho, la especie hija puede compartir parte del intervalo de distribución con la especie madre e hibridar en las zonas de contacto. Los demes (poblaciones puras) suelen divergir debido tanto a factores estocásticos como a selección local. La migración inter-démica y la hibridación pueden contrarrestar la divergencia, pero en determinadas circunstancias, la selección diversificadora (a favor de variaciones locales) puede ser el factor más importante, implicando la formación de clinas en la frecuencia de algunos loci. El apareamiento clasificado y una reducción en eficacia biológica de los híbridos conducirían al desarrollo final de la especiación.

### **1.3. Las zonas híbridas en las poblaciones naturales**

Harrison (1990) define las zonas híbridas como “regiones estrechas donde grupos genéticamente distintos se encuentran y se reproducen, resultando por lo menos algún descendiente de ascendencia mezclada (híbrido)”; este tipo de zonas se encuentran bien difundidas en la naturaleza y son de gran importancia como modelos para explicar la divergencia evolutiva y la especiación en poblaciones simpátricas (Salomon, 2002).

Con base en un análisis detallado de los procesos micro-evolutivos y la manera en cómo se establecen nuevos genes y genomas, proponiendo posibles mecanismos de cambio genético (Kohlmann y Shaw 1991).

Estas zonas son también un buen modelo de análisis para otros procesos, como: la distribución de alelos raros, análisis de asimetría morfológica, tamaño y distribución de poblaciones, la expresión genética, la base genética del cortejo, efecto de los parásitos, entre otros (Kohlmann y Shaw 1991).

Harrison y Bogdanowicz (1997) definen a estas regiones híbridas como zonas delimitadas que contienen solo híbridos que separan a las formas paternas. Rieseberg (1999, 2001) considera como zona híbrida a “un área ocupada por una población de híbridos, que conecta a dos zonas paternas” donde los fenotipos paternos son poco frecuentes (menos del cinco por ciento de la población de la zona híbrida) y algunos de ellos pudieran originarse por recombinaciones al azar.

Barton y Rouhani (1991), Barton y Hewitt (1981,1985) y Hewitt (2003) describen la zona híbrida como una clina estrecha, mantenida por el balance entre la dispersión de las poblaciones y la selección en contra de los híbridos. Una zona híbrida que se mantiene con este mecanismo se le denomina, “**zona de tensión**” (Key 1968).

#### **1.4. Zonas híbridas asociadas a clinas ecológicas**

La mayor parte de los autores coinciden en que una zona híbrida puede representarse como una clina, establecida en un gradiente o gradientes para un carácter fenotípico medible (Barton y Hewitt 1985). Algunas zonas híbridas están condicionadas a una clina o gradiente ambiental determinado. Estas clinas se forman comúnmente entre dos ambientes diferentes; su posición y dinámica depende entonces de factores externos. Endler (1977) dice que los ecotonos (fronteras entre un ambiente y otro distinto) no siempre producen escalones en las frecuencias genéticas, ni contactos secundarios.

Las clinas muy pronunciadas siempre se encuentran asociadas a áreas ecológicas definidas, por lo que las presiones de selección originadas por el gradiente ecológico actuarán con diferentes intensidades sobre cada alelo y los genotipos asociados, o también puede suceder que un organismo se adapte a diferentes medios en alopatría, formando razas o taxa ecológicos, lo cual permitirá el establecimiento de diferencias genéticas entre ellos (Levin, 2002).

Hay ambientes que representan una presión de selección que ejerce una fuerza excesiva contra los híbridos, pues éstos no han tenido tiempo de reaccionar de forma óptima a aquél, generándose entonces una desventaja híbrida, que llevaría a una diferencia aparente entre un gradiente ecológico y una zona de tensión (Hewitt 1988).

### **1.5. Orígenes de las zonas híbridas**

Se han propuesto dos mecanismos que explican el origen de las zonas híbridas (Mayr 1963):

**1.5.1) Las zonas híbridas primarias**, que se forman a partir de diferencias en los caracteres dentro de poblaciones y se encuentran distribuidas de manera continua; existe un proceso de diferenciación y ocurre aún con intensos niveles de flujo genético. Un ejemplo de clina cromosómica primaria es la representada por el ortóptero *Caledia captiva* en el este de Australia, la cual mide aproximadamente 1,500 Km. y representa un cambio gradual pericéntrico entre las “razas” cromosómicas (Shaw *et al.*, 1986; Shaw *et al.*, 1988).

**1.5.2) Una zona híbrida secundaria** se forma cuando dos grupos de amplia distribución existen como dos poblaciones previamente alopátricas y que ya estén diferenciadas, expanden su distribución geográfica y entran en contacto secundario, hibridando. Un ejemplo de esta zona híbrida son los casos del ratón común *Mus musculus* y *M. m. domesticus* (Hunt y Selander, 1973).

Otra posibilidad que explica el origen de una zona híbrida es el efecto de la perturbación humana, que origina “**hábitats híbridos**” (Anderson, 1948) creando situaciones ecológicas nuevas (Arnold y Hodges, 1995); esta probabilidad aunque no muy común, puede explicar la formación de zonas híbridas relativamente recientes convirtiéndose en factor importante para el futuro, debido a la afectación del medio ambiente por parte del hombre (Kolhmann y Shaw, 1991).

### 1.6. Mantenimiento de zonas híbridas

Las zonas híbridas también pueden ser clasificadas en transitorias y estables; las **transitorias** pueden formarse después de haber establecido un contacto secundario, con el tiempo se eliminaría cualquier diferencia entre los tipos originales (Dobzhansky, 1940). Las clinas neutrales se pueden incluir dentro de este tipo, ya que con el tiempo desaparecen. Otra opción es que la selección actúe en contra de los híbridos reduciendo y eventualmente, eliminando el entrecruzamiento (Moore, 1977).

Las zonas híbridas **estables** se pueden mantener por tres diferentes mecanismos. El primero es la superioridad o el **vigor híbrido**, muchas veces asociado a medios perturbados que crean hábitats nuevos o intermedios. El segundo mecanismo consiste en la **desventaja de los híbridos**, el cual propone la existencia de un equilibrio dinámico entre la selección en contra de los híbridos y la inmigración y entrecruzamiento en formas paternas, teoría propuesta por Bazykin (1969).

El último factor que mantiene una zona híbrida estable es la existencia de **diferentes regímenes selectivos**, que favorezcan la adaptación de grupos en áreas determinadas, formando razas localmente adaptadas, con complejos genéticos distintivos y que formarán zonas híbridas, restringidas al área de contacto, sin difundirse al resto de la población; propuesta por Fisher en los años 30's, así como por Huxley (Salomon, 2002).

### 1.7. Desplazamiento de zonas híbridas.

Varias fuerzas tanto internas como externas, son responsables del movimiento de genes hasta llegar a un equilibrio; este movimiento puede ser alterado de forma natural, causando reajustes en la posición de la zona híbrida.

En el caso de clinas neutrales, éstas se situarán en la región inicial de contacto de las dos poblaciones distintas y, a través de un mecanismo de introgresión, eventualmente desaparecerán (Dobzhansky, 1951).

Las zonas de tensión dependen de la adaptación individual, así como de la estructura poblacional y de los efectos de las frecuencias genéticas sobre ellas (Barton y Hewitt 1985).

### **1.8. Efectos sobre el flujo genético**

El flujo genético puede anularse de varias maneras:

A) Factores del medio ambiente reducen el tamaño de la población o su capacidad de dispersión; ocasionando que las llamadas zonas de tensión se desplacen hacia regiones de baja densidad poblacional o poca dispersión (Barton y Hewitt 1985).

B) La existencia de una reducción en la densidad poblacional, debida a una selección en contra de recombinantes en clinas de dispersión-selección (*desagüe* híbrido), mientras que los individuos paternos se desplazan hacia la zona de contacto y su descendencia híbrida mal adaptada es subsecuentemente eliminada del centro de la zona híbrida.

C) Asociaciones de alelos donde un locus neutral que se ha incorporado estrechamente con un locus seleccionado, tiene que recombinarse con el genoma de la nueva población, antes de que la selección en contra de su alelo asociado comience a impedir su desplazamiento (Maynard-Smith y Haigs, 1973).

Estas barreras pueden ser asimétricas en su actuación, permitiendo un mayor flujo de genes en una dirección que en otra. Se puede causar un movimiento genético diferencial por discrepancias en la adaptación de genes, contrastes en la estructura de la población o por movimiento de una clina (Barton y Hewitt, 1985).

### **1.9. La especiación y las zonas híbridas**

Se han descrito dos modelos de especiación que involucran la existencia de zonas híbridas: el primero es el estasisipátrico (White, 1968), donde los cambios cariotípicos se establecen en una pequeña región, originada probablemente por deriva génica y se ven favorecidos por procesos meióticos. Los heterocigotos son generalmente estériles, lo cual producirá una zona híbrida entre los dos tipos permitiendo que ocurra una divergencia genética entre las especies paternas.

El segundo modelo es de la especiación parapátrica (Clarke, 1966), el cual propone la división de poblaciones bajo la influencia de una selección espacialmente variable, formando grupos de poblaciones con continuidad geográfica. A este proceso de diferenciación local se le conoce también como “modelo de aislamiento por distancia” (Mettler y Gregg, 1982).

Se ha asociado a las zonas híbridas el llamado “efecto Wallace”, que es básicamente un mecanismo de especiación por un refuerzo reproductivo en el aislamiento pre-reproductivo (Perfectti, 2002), usando como base la mala adaptación post-reproductora, la selección favorecería aquellos genes provenientes de apareamiento con selección positiva dentro de cada población. Este tipo de selección se ha considerado un caso especial de aislamiento en una zona híbrida, calificado como un “desplazamiento de caracteres” (Futuyma, 1998). Remington (1968), consideró que la falta de aislamiento reproductivo en las zonas híbridas es un indicador de “juventud” de las mismas; por ello las denominó “zonas de sutura”, e implica que allí los taxa se han encontrado recientemente.

#### **1.10. El complejo *Sceloporus grammicus* como modelo de especiación**

Lara-Gongora (2004) propuso la existencia de cinco especies distintas en el complejo con base en características morfológicas presentadas por ejemplares de *Sceloporus grammicus*: *S. anahuacus*, *S. grammicus*, *S. heterolepis*, *S. palaciosi* y *S. lemosespinali* con cuatro subespecies para *S. grammicus* (*S. g. grammicus*, *S. g. disparilis*, *S. g. microlepidotus* y *S. g. tamaulipensis*) y dos para *S. heterolepis* (*S. h. heterolepis* y *S. h. shannonorum*).

Sites y Davis (1989) estudiaron las relaciones filogenéticas y la variabilidad molecular de seis razas cromosómicas del complejo en la zona centro de México, empleando para ello marcadores genéticos y mitocondriales. Arévalo *et al.* (1991) fue quién propuso la clasificación actual, agrupando en siete razas cromosómicas: LS, HS, F6, F5, F5+6, FM3, FM1 y FM2 para la zona centro de México, de las cuales seis están presentes en el estado de Hidalgo.

Marshall *et al.* (2006) analizando cromosomas y aloenzimas usando métodos de distancia genética para identificar especies dentro del complejo *Sceloporus grammicus*, produciendo cuatro grupos: uno la raza F6, otro la raza HS (low elevation estándar), un tercero con la raza HS (high elevation standard) y uno mas con las demás razas (FM1, FM2, FM3, F5 y F5+6).

El complejo *Sceloporus grammicus* se encuentra desde planicies hasta zonas montañosas, abarcando una amplia gama de ambientes (Arevalo *et al.* 1991), lo que indica su gran disponibilidad a explotar distintos hábitats y microhábitats, por lo cual se ha determinado que son generalistas y al usar microambientes creados por el hombre como las bardas implica a su vez que también son oportunistas; debido a el amplio rango de ambientes que ocupan, responden a distintos factores y crean diferencias morfológicas como respuestas adaptativas a las presiones ambientes y microambientes (Hernandez-Ramos, 2005).

La lagartija *Sceloporus grammicus* es un modelo excepcional; probablemente es el vertebrado no mamífero con mayor variación cromosómica reportado hasta ahora (Sites *et al.*, 1987), ya que presenta un gran número de mutaciones robertsonianas (fisiones céntricas y/o fusiones), formando un complejo con relevancia taxonómica y evolutiva, debido a su amplia distribución geográfica y por la presencia de varias razas cromosómicas (Sites, 1983). *Sceloporus grammicus* presenta además diversos morfos (Sites, 1982), los cuales presentan diferenciación morfológica entre y dentro de poblaciones del complejo, diferencias como tamaño del cráneo y extremidades, además de patrones de coloración.

Lara-Gongora (2004), usando caracteres morfométricos, merísticos y de coloración, propone nuevas especies del complejo. Rubio-Pérez (2005), realizó un estudio con la clasificación cromosómica dada por Sites *et al.* (1988) y Arévalo *et al.* (1991), quienes dividen al complejo en siete razas cromosómicas (S (LS y HS), F6, F5, F5+6, FM3, FM1 y FM2), encontraron diferencias morfológicas discriminantes (talla, forma del cuerpo, tamaño de la cabeza), concluyendo que

existe una estrecha relación entre el ambiente y la forma que adoptan los individuos.

Debido a que estos organismos son generalmente abundantes y fáciles de recolectar, conforman un excelente recurso para la investigación de la estructura poblacional, origen y fijación de nuevos rearrreglos cromosómicos y el papel de éstos en la especiación (Arévalo *et al.*, 1991).

Es posible además determinar la posible función de los heterocigotos en la interacción y reducción del flujo genético con los tipos cromosómicos puros, así como el papel de la heterocigosidad en las zonas híbridas (Sites, 1993).

### **1.11. El complejo *Sceloporus grammicus* en la región central de México**

En la actualidad el complejo se compone de razas cromosómicas distintas con diferente número de cromosomas, como resultado de prolongados rearrreglos cromosómicos fijos (Sites, 1993). Esto ha provocado que en algunas poblaciones se manifieste un polimorfismo cromosómico extremo, con un extenso polimorfismo intrapoblacional, así como una fijación interpoblacional para el mismo tipo de rearrreglos (Sites, 1993).

Datos publicados previamente, sugieren que están ocurriendo procesos importantes para el origen, esparcimiento y fijación de rearrreglos cromosómicos de manera activa dentro del complejo (Sites *et al.*, 1993). Estas características genéticas y ecológicas de *Sceloporus grammicus* y los estudios reportados de este grupo brindan recursos para otro tipo de investigaciones interrelacionadas, como: estructura de poblaciones, origen y fijación de nuevos rearrreglos cromosómicos, las consecuencias de la heterocigosidad cromosómica estructural en zonas híbridas, la sobrevivencia y el posible papel de rearrreglos y heterocigotos en la reducción del flujo genético entre tipos cromosómicos puros, para regiones de contacto parapátrico (Sites *et al.*, 1993).

Se ha definido previamente a una zona híbrida como una región donde poblaciones genéticamente distintas conviven y se reproducen, existiendo contacto entre especies puras con híbridos (Futuyma, 1998). Los híbridos

conocidos hasta la fecha para *Sceloporus grammicus* en el estado de Hidalgo son: HS X FM3 y F5 X FM2 (Goyenechea *et al*, 1996).

### **1.12. El uso de herramientas moleculares en genética evolutiva**

Los avances en el desarrollo de marcadores genéticos han permitido, en las últimas décadas, abordar por primera vez de forma distinta muchas preguntas básicas sobre las poblaciones naturales dentro de un contexto evolutivo, además de ecológico. La aplicación de marcadores moleculares en análisis de genética evolutiva, genética ecológica y genética de la conservación permite la evaluación de modelos de zonas híbridas, variación y estructura genéticas, flujo genético inter e intrapoblacional e hipótesis sobre la genética histórica (filogeografía), de las especies (Selkoe y Toonen, 2006).

Dentro de los marcadores más eficientes se encuentran los llamados “microsatélites”. Estos son marcadores semi-arbitrarios, amplificados *in vitro* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés; Bornet y Branchard, 2001). Esta amplificación no requiere de información previa de secuencias genéticas y conduce a patrones altamente polimórficos y multilocus. Estos marcadores también se conocen como repeticiones de secuencias simples (SSR), repeticiones de tándems de números variables (VNTR) y repeticiones de tándems cortas (STR). Presentan alta tasa de mutación y, por consiguiente, alto nivel de diversidad alélica; también presentan selección neutra y herencia mendeliana, además de codominancia.

Dentro de cada marcador, un *locus* puede ser considerado como una muestra del genoma, pero confiar en un solo locus para estimar los rasgos ecológicos desde los datos genéticos puede causar un margen elevado de error, ya que la recombinación, la selección y el flujo genético tienen historias genealógicas distintas y pueden influir de manera diferencial en la expresión de un gen determinado, por lo que hay que tomar múltiples muestras de genes para combinar los resultados de muchos *loci* y así obtener resultados más robustos y

que sean representativos del total de los genes para un individuo determinado (Selkoe y Toonen, 2006).

Los microsatélites son fáciles y rápidos de manejar y, al parecer, presentan una alta reproductividad por la gran longitud de sus oligonucleótidos iniciadores (Bornet y Branchard, 2001; Lara *et al.*, 2003; Nagaoka y Ogihara, 1997). Se ha probado además que son una técnica más confiable que las utilizadas con aloenzimas y variación de sitios de restricción de rDNA nuclear, ya que permiten que todo el DNA pueda monitorearse (Bornet y Branchard, 2001).

Debido a su alta tasa de mutación son ideales para los interesados en la demografía actual, el modelo de conectividad o los sucesos genéticos en un pasado reciente para procesos que actúan sobre escalas de tiempo ecológico (Schlotterer, 2004). A diferencia de las regiones flanco, las secuencias de microsatélites se transforman con frecuencia cambiando el número de repeticiones y, por consecuencia, la longitud de la cadena (Eisen 1999). Así, alelos de diferente longitud pueden separarse con buena resolución en un gel de electroforesis.

Los microsatélites presentan tasas de mutación altas, lo que genera los elevados niveles de diversidad alélica necesarios para los estudios genéticos de procesos que actúan sobre escalas de tiempo ecológicas (Schlotterer, 2004). Sin embargo, todos los marcadores tienen algunos inconvenientes, pero la versatilidad de microsatélites para resolver muchas preguntas ecológicas pesa más que sus desventajas.

### **1.13. Trabajos con microsatélites en zonas híbridas**

En años pasados, los estudios citogenéticos no se interesaban en analizar la estructura ni el flujo genético de las poblaciones, pero actualmente el uso de marcadores moleculares (en particular de microsatélites) ha facilitado el estudio del flujo genético en zonas híbridas. A pesar de que este tipo de marcador tiende a sobreestimar el flujo genético, es posible comparar resultados de diferentes zonas híbridas para evaluar el impacto de las diferencias cromosómicas sobre el intercambio de genes entre dos taxa distintos (Andersson *et al.*, 2004).

Un ejemplo de este tipo de estudios es el realizado por Andersson *et al.* (2004) quienes estudiaron una zona híbrida entre dos citotipos de la musaraña *Sorex araneus* en Suecia; uno de los citotipos se encontraba al oeste y otro al norte. Sus resultados muestran que existe un flujo genético considerable entre las razas involucradas a pesar de las enormes diferencias cromosómicas que se presentan (Andersson *et al.*, 2004). Esto puede ser producto de una divergencia reciente entre los diferentes grupos cromosómicos, lo que impide que se refleje en los alelos.

En otro estudio similar, Chiappero *et al.* (2004), estudiaron una zona híbrida entre dos razas cromosómicas del saltamonte *Dichroplus pratensis*, en Argentina. Sus resultados muestran que las frecuencias alélicas variaron de forma significativa entre poblaciones de diferente raza cromosómica, sin embargo, no hubo diferencias entre poblaciones de la misma raza. Las distancias genéticas entre poblaciones fueron pequeñas, sin embargo, se obtuvieron dos grupos separando las poblaciones del norte de las del sur (diferentes razas), con los híbridos ubicados entre ambos grupos. Respecto al flujo genético, los híbridos se entrecruzan con los de sur, debido a que presentan una similitud genética muy alta a pesar de que geográficamente los híbridos están más cercanos a las del norte.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La presencia en Hidalgo de seis citotipos, zonas híbridas y regiones de alto grado de polimorfismo cromosómico de la lagartija *Sceloporus grammicus* (Goyeneche, 1993) proporciona una oportunidad interesante para el estudio de la diversidad genética del complejo y la influencia del hábitat en la estructura genética de las poblaciones.

Además, la posibilidad de encontrar nuevos polimorfismos y zonas de contacto entre razas cromosómicas es elevada. Por este motivo se llevó a cabo el análisis de una zona de contacto entre dos citotipos de *Sceloporus grammicus* (S y FM2), en el Municipio de Emiliano Zapata (Hidalgo), con la posible presencia de híbridos, lo que permite verificar los patrones evolutivos que condicionan la

estructura genética y el establecimiento de zonas híbridas dentro de una clina ambiental.

Se han realizado descripciones de alcance ecológico y citológico para el complejo *Sceloporus grammicus*, pero aún es desconocido el estatus genético de la especie, los niveles de variación y la influencia de los hábitats asociados para determinar la estructura genética de sus poblaciones. Además, analizar la existencia de zonas híbridas por la interacción genética entre distintos citotipos, permite evaluar el proceso microevolutivo de intercambio horizontal de genes mediante híbridos y la correspondiente introgresión genética hacia los citotipos paternos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Evaluar la variación morfológica y estructura genética de una zona de contacto entre dos razas cromosómicas del complejo *Sceloporus grammicus* (S y FM2), en el Municipio de Emiliano Zapata, Hidalgo, para determinar la existencia de posibles híbridos, los niveles de flujo genético existente, así como la evidencia de introgresión alélica entre los citotipos involucrados.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- 1) Determinar patrones morfológicos de variación que permitan inferir morfo-citotipos asociados a zonas geográficas y ecológicas particulares, dentro del área de estudio, utilizando morfometría geométrica.
- 2) Evaluar los patrones de variación y la estructura genética interpoblacional e intercitotípica en la zona híbrida entre dos citotipos o razas (S y FM2) del complejo *Sceloporus grammicus*, utilizando marcadores genéticos (microsatélites).

- 3) Determinar los patrones de diversidad alélica y niveles de flujo genético mediante índices de hibridación e introgresión entre los citotipos presentes en la zona.

#### **4. HIPÓTESIS**

Se supone que la zona de contacto identificada entre las razas S y FM2 del complejo *Sceloporus grammicus*, en el Municipio de Emiliano Zapata, Hidalgo, es una posible región de hibridación entre ambos citotipos. Se espera entonces que, mediante el análisis de caracteres morfológicos y marcadores moleculares, se evidencie ésta como puente genético para los citotipos paternos, con patrones de hibridación e introgresión específicos, asociados tal vez a un gradiente (clina) ambiental.

#### **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

##### **5.1. Descripción del área de estudio**

Se seleccionaron tres zonas de estudio (Cuadro 1) donde se encontraron ejemplares de *Sceloporus grammicus*, dentro del municipio de Emiliano Zapata (Figura 1) el cual tiene las siguientes características generales: una altitud promedio de 2,500 metros; cuenta con una superficie de 36 km<sup>2</sup> y representa el 0.17% de la superficie total del estado. Se caracteriza por ser una zona plana, localizada en el eje Neovolcánico; está formada por lomeríos en un 70% y llanura en un 30%. Presenta un clima templado-frío, con una temperatura anual de 15° C; con una precipitación pluvial de 600 milímetros por año. La flora está formada principalmente de magueyes y nopales así como de especies de cactáceas, arbustos leñosos o matorrales, pirules, capulines y una gran cantidad de hierbas silvestres.

Cuadro 1. Características generales de las zonas de muestreo para *Sceloporus grammicus*, el tipo de asociación vegetal predominante en la región y la razas cromosómicas presentes en las zonas.

Localidad	Vegetación	Coordenadas	Altitud	Clima	Raza presente
San José	matorrales y arbustos, hierbas silvestres, nopales y magueyes	19° 41' 07'' N 98°34' 50'' O.	2530 m s.n.m.	Templado-frio	S
Santa Clara	matorrales xerófitos, árboles de pirú y frutales	19°42'04'' N 98° 34' 52'' O	2490 m s.n.m.	Templado	FM2 y S
El Casco	matorrales silvestres de temporal, algunos magueyes y pirules	19°41'39'' N 98°33'47'' O	2480 m s.n.m.	Templado	FM2

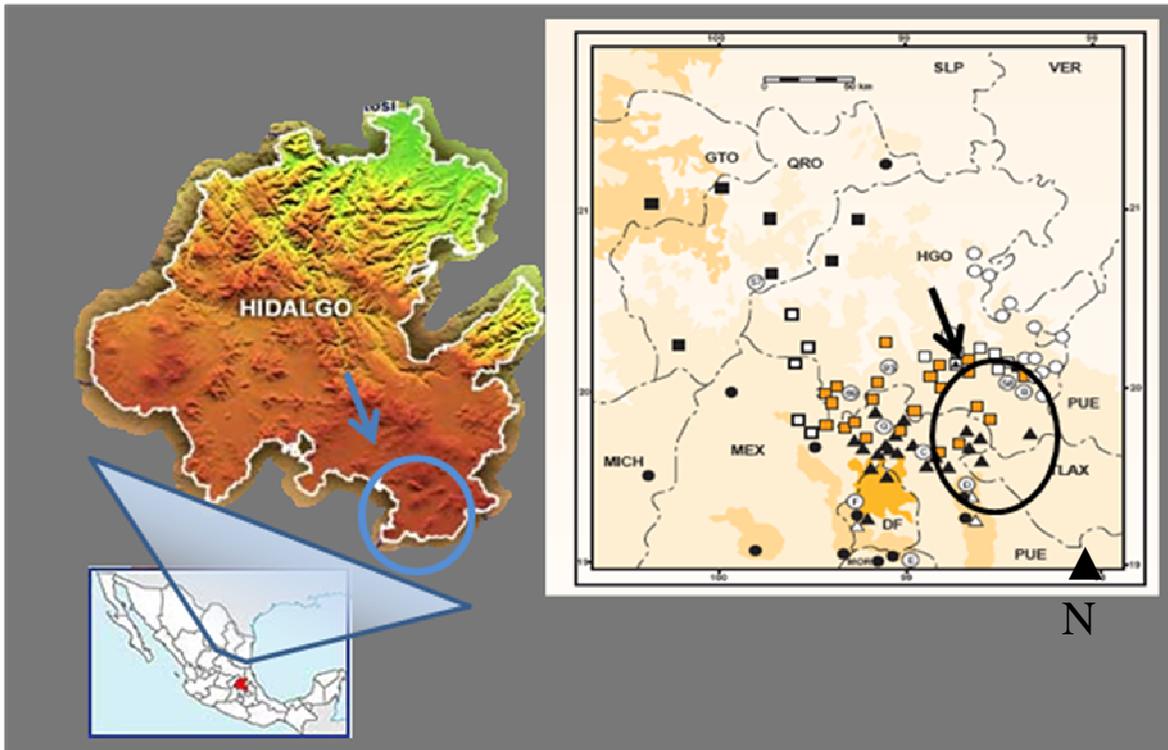


Figura 1. Ubicación del área de estudio. Izquierda, Municipio de Emiliano Zapata en el Estado de Hidalgo. Derecha, mapa de distribución de razas en el Valle de México (Arévalo, 1991), donde se enmarcan las dos razas presentes en la zona de estudio, los cuadros representan las zonas donde se identificaron ejemplares de la raza FM2 y los triángulos representan las zonas donde se identificaron ejemplares de la raza S.

### **Descripción de las poblaciones de estudio**

#### **Población 1: San José**

Es el poblado más grande de tres consecutivos en la zona; se encuentra en una loma, a una altitud de 2530 metros representado por un ambiente perturbado, su flora está constituida principalmente por matorrales y arbustos, hierbas silvestres, nopales y magueyes. Hay numerosas bardas, tabiques y montones de piedra.

### Población 2: El Casco

Es una zona plana, con una altitud de 2480 metros; el terreno se ha transformado en su totalidad para uso agrícola y solamente se encuentran pequeños matorrales silvestres de temporal, algunos magueyes y pirules, además de los restos de una construcción antigua de adobe, donde se localizaron la mayor parte de individuos para este sitio en particular.

### Población 3: Santa Clara

Es el poblado de menor concentración y actividad humana, con mayor extensión de terreno entre cada vivienda. Esta zona se divide en tres porciones: la zona habitada, donde las casas y las calles están construidas de tabique y cemento contando con pastos y jardines; la zona intermedia, donde se localizan algunos ranchos con ganado y se caracteriza por la existencia de matorrales xerófitos, árboles de pirú y frutales y, por último, la zona con una altitud de 2490 metros, que está en contacto con las zonas de cultivo, formada por hileras de magueyes y nopales, restos de matorral xerófilo y árboles de pirú o capulín, aquí es donde se localizaron el mayor número de individuos para esta región.

## **5.2. Uso de Hábitat (microhábitat)**

Odum (1982) define al hábitat de un organismo como el lugar donde vive y al nicho lo define como el espacio físico ocupado por un organismo mas el papel que desempeña este en la comunidad, interactuando con el entorno biótico y abiótico. Usando la definición de Krebs (1999) que define al hábitat de un animal como las características de la vegetación y/o factores fisicoquímicos asociados; bajo este uso diferencial de los espacios se caracterizaron un total de 10 microhábitats los cuales son los más utilizados por las lagartijas de las poblaciones de San José, Santa Clara y El Casco (Cuadro 2).

Se estimó un área de 1 m<sup>2</sup> para cuantificar los tipos de microhábitats más utilizados por las lagartijas y los microhábitats relacionados a cada población de estudio (Rubio-Pérez, 2005).

Cuadro 2. Microhábitats registrados para las tres poblaciones de Estudio

magüeyes	nopales
rocas	bardas
cercas de madera	llantas*
tabique	arbustos
ramas secas	troncos

\*presente solo en San José.

### **5.3. Trabajo de campo (recolecta de material biológico)**

Después de la identificación de las regiones con mayor abundancia de individuos, se realizaron transectos de colecta en función de la presencia de ejemplares. La hora de colecta fue establecida de 11:00 a 16:00 horas, que se identificó como el horario ideal de percha para los organismos de las tres poblaciones.

Se recolectó un total de 90 individuos adultos, 30 de cada una de las poblaciones; las lagartijas fueron capturadas vivas manualmente con la ayuda de ligas, posteriormente fueron medidas con la ayuda de un vernier electrónico para el análisis morfológico; 20 organismos de cada población fueron trasladados al laboratorio donde se les cortó medio centímetro de la parte terminal de la cola. De los 20 individuos se tomaron 10 de cada sitio para realizar los análisis citológicos. Posteriormente, los organismos que sobrevivieron se regresaron a su lugar de origen y los ejemplares que se sacrificaron fueron registrados en la Colección Herpetológica del Centro de Investigaciones Biológicas (UAEH).

#### **5.4. Obtención de muestras de tejido (en laboratorio) para DNA**

A los individuos capturados se les extirpó un fragmento de tejido para la extracción de DNA por medio de una técnica no invasiva (corte y procesamiento de un fragmento de cola). Las muestras de tejido se almacenaron individualmente en microtubos a  $-20^{\circ}$  C, hasta la extracción. Los organismos se mantuvieron en cautiverio, en peceras de vidrio hasta la realización de los análisis citológicos.

#### **5.5. Análisis citológico (cariotipos)**

Se realizó un análisis citológico para verificar el número cromosómico de los individuos recolectados en cada región de estudio. El cariotipo se define como el número diploide de cromosomas de una especie, que está caracterizado por el número, tamaño y forma de los cromosomas, por lo que es útil como carácter taxonómico adicional y una herramienta poderosa para describir relaciones filogenéticas en el grupo de los reptiles (Goyenechea, 2001).

La obtención del cariotipo de los ejemplares se realizó con base en la técnica propuesta por Sites (1983) y mencionada por Goyenechea (2001) para saurios, además, se hicieron modificaciones propuestas por Nader., (1997; ver Anexo A). Se tomaron fotos de los frotis obtenidos y se recortaron los cromosomas con la finalidad de ordenarlos por pares según su homología en tamaño y forma, para integrar de manera ordenada los cariotipos representativos para individuos de los tres sitios de recolecta.

#### **5.6. Análisis morfométrico**

Para solventar el segundo objetivo se tomaron en cuenta caracteres ontogenéticos distintivos asociados principalmente a las formas del esqueleto, se midieron 11 caracteres (Figura 2) morfológicos (Sites, 1982; Cuadro 3) estadísticamente discriminantes entre citotipos, con un vernier electrónico, en un total de 60 individuos obtenidos de las tres localidades.

Cuadro 3. Lista de 11 caracteres morfométricos que se midieron a los ejemplares de *Sceloporus grammicus*, recolectados en las tres poblaciones antes mencionadas.

Abreviación de Carácter	Descripción
LTC	Longitud total del cuerpo
LHC	Longitud-hocico-cloaca
L Cr	Longitud del cráneo
A Cr	Ancho del cráneo
L fem	Longitud del fémur
L tib	Longitud de la tibia
L ante	Longitud del antebrazo
ALT C DO	Altura del cuerpo dorso-transversal
ANCH C DO	Ancho del cuerpo dorso-transversal
LC	Largo de la cola
L4DPP	Largo del cuarto dedo de la pata posterior

Estos caracteres describen atributos morfométricos tales como: Longitud total del cuerpo(LTC), longitud-hocico-cloaca (LHC), longitud del cráneo (LCr), ancho del cráneo (ACr), longitud del fémur (LFem), longitud de la tibia (LTib), antebrazo (ANTBRAZ), altura dorso-transversal del cuerpo (ALTC DTRANSV), ancho dorso-transversal del cuerpo (ANCHCDTRANSV), largo de la cola (LC) y largo del cuarto dedo de la pata posterior (L4DPP; Sites, 1982; figura 2). Los individuos fueron sexados posteriormente. Los caracteres mencionados aportaron información referente a las diferentes razas cromosómicas evaluadas para discriminar variables que permitieron determinar morfo-citotipos particulares en las razas cromosómicas encontradas en cada localidad y las diferencias entre ellas mediante análisis de estadística multivariada.

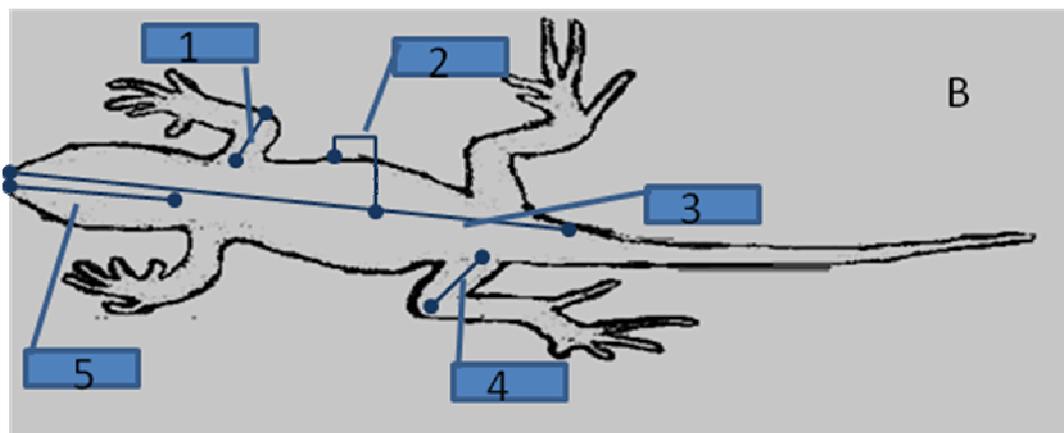
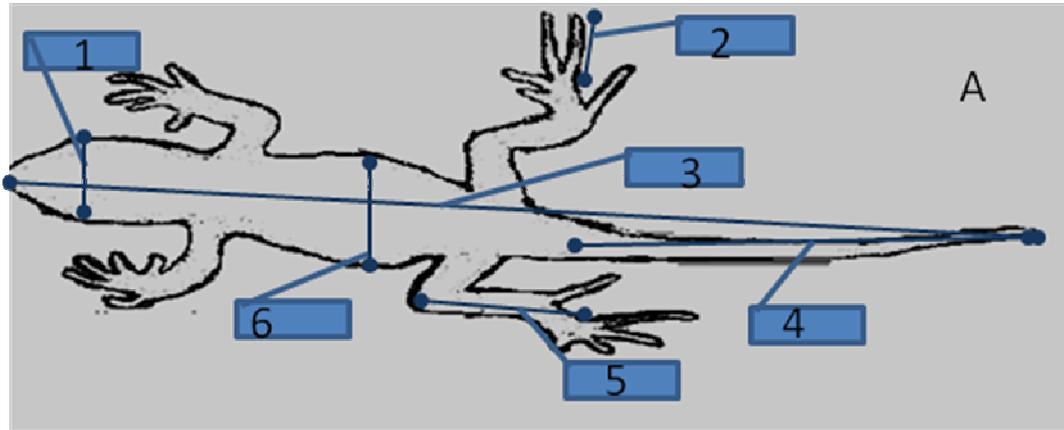


Figura 2. Marcando con líneas las medidas morfológicas que se tomaron en cuenta para el análisis. Donde  $A_i = A Cr$  (Ancho de cráneo),  $A_2 = L4DPP$  (Largo del cuarto dedo de la pata posterior),  $A_3 = LTC$  (longitud total del cuerpo),  $A_4 = LC$  (Largo de la cola),  $A_5 = L Tib$  (longitud de tibia,  $A_6 = ANCH C Do$  (ancho del cuerpo dorsotransversal),  $B_1 = L Ante$  (longitud de antebrazo),  $B_2 = ALT C Do$  (Altura del cuerpo dorsotransversal),  $B_3 = LHC$  (Longitud hocico cloaca),  $B_4 = L fem$  (Longitud de femur),  $B_5 = L Cr$  (Longitud de Craneo).

### Análisis estadístico

Para verificar cuáles caracteres morfológicos separaban a las localidades y a los individuos en grupos, se utilizaron métodos estadísticos de análisis multivariado (Análisis Discriminante y Análisis de Componentes Principales), los

cuáles son útiles para determinar la relevancia de los datos con una gran cantidad de variables. La importancia y utilidad de estos métodos aumenta cuando se incrementa el número de variables que se están midiendo y el número de unidades experimentales, en este caso las localidades.

El objetivo principal de estos métodos de análisis es resumir grandes cantidades de datos por medio de pocos parámetros. El interés de los análisis multivariados es encontrar relaciones entre las variables de respuesta (caracteres significativos), las unidades experimentales (localidades), y las relaciones entre las variables de respuesta y dichas unidades experimentales.

#### **5.6.1. Análisis de Correlación**

Estos métodos se emplean para conocer las relaciones y su nivel de significación entre series de datos o cuando, simultáneamente, se usan dos variables continuas, aunque también se pueden usar en variables discretas cuantitativas. Este estadístico se representa por medio del coeficiente de correlación ( $r$ ) de Pearson, es el coeficiente de determinación y da una medida entre 0 y 1, que corresponde a la cantidad de información compartida por dos características o variables continuas en los datos muestrales (Johnson, 2000). Se utilizó para verificar que existe algún tipo de relación entre las variables analizadas; es decir, si se influyen mutuamente algunas de ellas.

#### **5.6.2. Prueba de Tukey**

Para este caso es necesario conocer si existe una homología a nivel de poblaciones cuando todas las muestras son semejantes en tamaño, esta prueba también se conoce como Prueba DVS (diferencia verdaderamente significativa) y utiliza un solo valor con el que se comparan todas las diferencias (Daniel, 1999). La prueba de Tukey se realizó por poblaciones de acuerdo a los caracteres que fueron significativos en el ANDEVA.

### **5.6.3 Análisis Discriminante (DA)**

Es un método estadístico que se usa principalmente para clasificar individuos o unidades experimentales (localidades) en dos a más poblaciones definidas de manera única (McCune y Grace, 2002). En este análisis se utilizaron todos los caracteres morfológicos para verificar cuales permitían la discriminación entre localidades e individuos; con 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 estos requisitos. En este modelo la técnica utilizada fue la de paso a paso (*forward*) ya que permite evaluar variable por variable; se utilizaron los valores propios estandarizados. Este análisis se realizó utilizando el programa STATISTICA 7.0 para Windows (Statsoft, 1998).

### **5.6.4. Análisis de Componentes Principales (ACP)**

El objetivo principal de este método es reducir la dimensionalidad del conjunto de datos e identificar las nuevas variables significativas. La técnica de ACP se utilizó para verificar la agrupación y el grado de semejanza entre localidades (Manly 1992), utilizando todos los caracteres morfológicos, el análisis fue realizado con el programa estadístico JMP 4.0.

### **5.7. Extracción de DNA, selección y visualización de microsatélites**

La extracción de DNA se llevó a cabo con la técnica propuesta por Higuchi (1989) con modificaciones (Ver anexo A), utilizando un fragmento de tejido de los especímenes colectados y se obtuvieron concentraciones finales de 100 ng/ $\mu$ l aproximadamente, dichas muestras se utilizaron como molde en el análisis genético. Para verificar que se obtuvo DNA de buena calidad, se identificaron las muestras extraídas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.4%, teñido con bromuro de etidio.

Cada muestra de DNA se amplificó para nueve microsatélites previamente reportados en una especie cercana (*Sceloporus jarrovi*; Zamudio 2000); de los cuales se seleccionó el Scel-571; además se evaluaron siete más de la serie

reportada para *Sceloporus grammicus* (Degnan y Arévalo, 2004), de los cuales se seleccionaron cinco (Sgramm 101, Sgramm 102, Sgramm 104, Sgramm 106, Sgramm 107) ya que produjeron alelos polimórficos y diferenciables entre sí.

La separación y revelado de los microsátélites se realizó en un sistema de electroforesis vertical de poliacrilamida al 4%, en condiciones desnaturalizantes de urea (7 M), en una cámara manual de secuenciación. La corrida de electroforesis se efectuó a 2,500 voltios constantes, durante tres horas. Los alelos se visualizaron mediante una técnica estándar de revelado (Benbouza *et al*, 2006) con nitrato de plata al 1.5% (Anexo A).

### **5.8. Análisis de diversidad genética y estructura poblacional**

Se realizaron estimaciones de variación genética obtenidas con base en las frecuencias alélicas, porcentaje de *loci* polimórficos y los estadísticos descriptivos de los heterocigotos (esperados y observados) para los niveles de polimorfismo presentes, los cuales fueron calculados utilizando los programas TFGA (Versión 1.3, 1997) y POPGENE (Versión 1.31, 1999), generando árboles de similitud entre las especies, basados en las distancias genéticas. Lo anterior para realizar la evaluación de patrones de variación y estructura genética dentro y entre poblaciones, la determinación de diversidad alélica y los niveles de flujo genético con índices de hibridación e introgresión entre los citotipos de estudio.

La estructura genética de las tres poblaciones y la estimación de los estadísticos “F” de Wright (1951;  $F_{IS}$  = nivel de endogamia o apareamiento entre individuos con relaciones cercanas; intervalo de valores de 0 a 1.  $F_{IT}$  = balance entre deriva y flujo genético de los individuos dentro y entre poblaciones; intervalo de valores de -1 a 1.  $F_{ST}$  = nivel de diferenciación entre poblaciones; intervalo de valores de 0 a 1), se obtuvieron mediante un análisis molecular de la varianza (AMOVA), con la ayuda del programa ARLEQUÍN (Versión 3.01, 2006), Debido a que cuenta con distintas jerarquías de análisis molecular para evaluar la estructura genética de las poblaciones, se reportaron las tres versiones del programa: diferenciación intra e interpoblacional, para verificar diferencias dentro y entre

grupos y para evaluar el porcentaje de variación entre grupos, dentro de cada grupo y entre individuos.

Finalmente, con la ayuda del programa Structure (Versión 2.2, 2007), se verificó la existencia de tres taxa genéticamente distintos, el porcentaje de alelos compartidos y exclusivos entre ellos; además de los alelos ancestrales y actuales en cada población, para determinar la dinámica del flujo genético entre ambos citotipos y la descripción genética de la zona híbrida analizada.

Se realizó el estudio de afinidad genética mediante un análisis estadístico de asociación por máxima verosimilitud, que permitió un agrupamiento por semejanza de los alelos para cada una de las razas que se suponen paternas (S y FM2) y los posibles híbridos, con la finalidad de determinar si estas tres poblaciones constituyen o no un complejo híbrido, además de establecer la estructura genética en dicho complejo y si existe evidencia de introgresión en las razas paternas.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. Análisis citogenético**

La técnica de cariotipo (Ver anexo A) se estandarizó con resultados positivos, obteniendo los cariotipos (citotipos) para las dos razas paternas, tanto la raza S presente en San José (Figura 3) y la raza FM2 presente en El Casco (Figura 4).

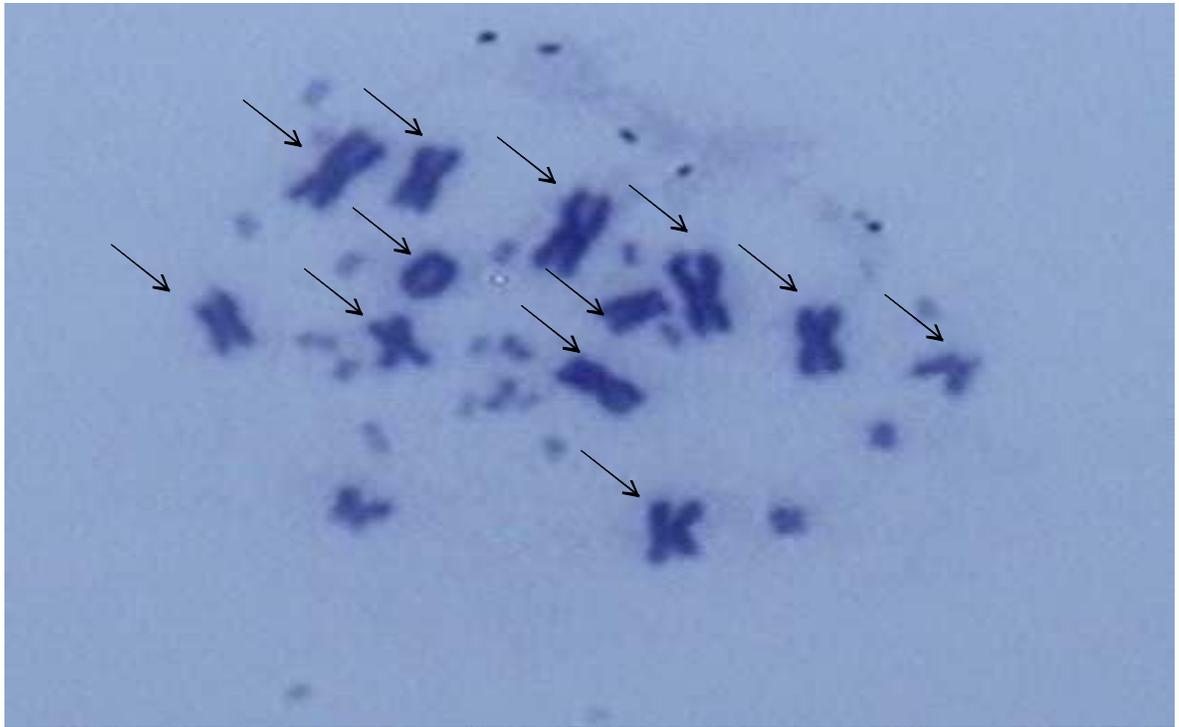


Figura 3. Frotis cromosómico de un ejemplar de *Sceloporus grammicus* de la población de San José, teñido con Giemsa 10%, para un individuo macho de la población de San José. Se observan los seis pares de macrocromosomas metacéntricos, representativos de la raza cromosómica S.



Figura 4. Frotis cromosómico de un ejemplar de *Sceloporus grammicus* en la población de El Casco, obtenido de un individuo macho, donde se muestran fisiones del par uno al seis (c y b) con un cromosoma entero perteneciente al par cuatro (A), representativos de la raza cromosómica FM2.

El arreglo de los cromosomas fue por medio de la homologación de pares cromosómicos, dando importancia a los seis pares de macrocromosomas, los cuales permiten la diferenciación entre razas (Figura 5).

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

Figura 5. Ideograma de los cariotipos. Representación completa de las razas pertenecientes al complejo *Sceloporus grammicus*, descritos por Hall (1973) y modificados por Reed *et al* (1995). Marcadas las que están presentes en la zona de estudio.

Los cromosomas al ser cortados y comparados, quedan de la siguiente manera: seis pares de cromosomas completos para la raza S y para la raza FM2 los cromosomas están fisionados a excepción de uno de los macrocromosomas, perteneciente al par cuatro (Figura 6).

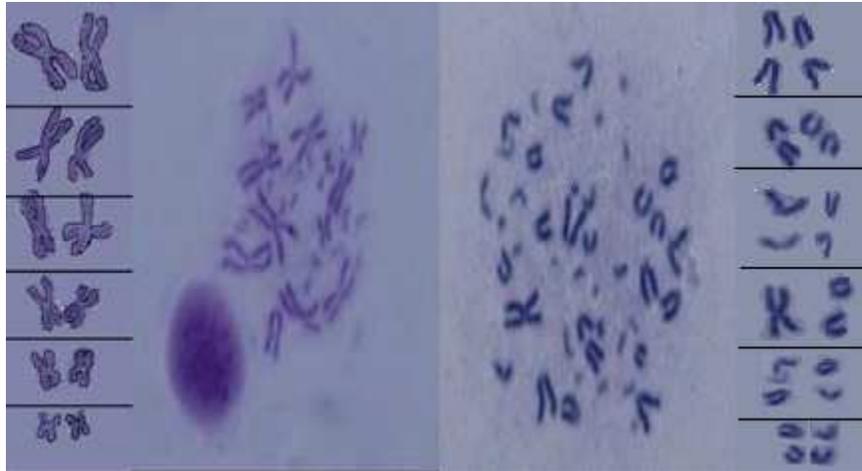


Figura 6. En el centro se muestran los frotis de dos individuos de distintas poblaciones, a la izquierda San José y a la derecha Santa Clara y a las orillas el cariotipo (solo los primeros 6 pares) recortados y organizados por homología como sus respectivos ideogramas.

Además de la presencia de ambas razas cromosómicas en el poblado de Santa Clara, donde se encontró un individuo con cariotipo poliploide, posiblemente de origen híbrido (Figura 7). En anexo B se muestra un ejemplo cariotipo completo donde se parearon los cromosomas por homología y se toman en cuenta los más grandes ya que son los representativos para discriminar entre razas cromosómicas de *Sceloporus grammicus*.



Figura 7. Frotis cromosómico de un ejemplar de *Sceloporus grammicus* polipliote que pertenece a Santa Clara donde se muestra un número de macrocromosomas mayor al número diploide de cualquiera de las dos razas cromosómicas presentes, el cual se obtuvo de un individuo macho del poblado de Santa Clara.

## 6.2. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

### 6.2.1. Análisis de correlaciones

Este análisis permitió verificar la fuerza de la relación existente entre todas las variables (Cuadro 4), evaluadas por pares entre sí, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (r). Las variables con correlación positiva y significativa (> 0.4), fueron: LHC y LTC, LC y LTC, L4DPP y LTC, L tib y LHC, A cr y LHC, L tib y LC, A cr y LC, L4DPP y ACr, ANC C dorstrans y ALTC dorstrans.

Las variables con correlación negativa y significativa (> -0.4), fueron: L tib y LTC, A cr y LTC, LC y LHC, L4DPP y LC, L Cr y L4DPP.

Cuadro 4. Análisis de correlaciones: Índices de correlación de Pearson, para todas las variables, analizadas en pares.

Variable	LTC	LHC	LC	Lfem	Lante	Ltib	ACr	ALTC Do.	ANC C Do.	L4DPP
LHC	0.76 ****									
LC	0.97 ****	-0.73****								
L fem	-0.33 ns	0.37 ns	0.35 ns							
L ante	-0.05 ns	0.30 ns	0.05 ns	0.08 ns						
L tib	-0.47 ****	0.42****	0.55 ****	-0.21 ns	0.33 ns					
A Cr	-0.42 ****	0.70****	0.46 ****	-0.10 ns	-0.26 ns	-0.30				
ALT C Do.	0.30 ns	-0.04 ns	-0.27 ns	0.08 ns	0.08 ns	-0.05	0.03 ns			
ANC C Do.	0.05 ns	-0.21 ns	-0.10 ns	0.12*	-0.14ns	0.32ns	0.39ns	0.59 ****		
L4DPP	0.48 ****	-0.38 ns	-0.52 ****	0.09 ns	0.19 ns	0.27ns	0.72 ns	0.20 ns	-0.30ns	
L Cr	0.47 sn	-0.32*	-0.52ns	0.06 ns	0.21 ns	0.35 ns	0.51 ns	0.09ns	-0.10 ns	-0.80 ***

\*\*\*\* =  $p < 0.0001$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \* =  $p < 0.05$ , ns = no significativo.

### 6.2.2. Prueba de Tukey

Con las medidas morfométricas obtenidas, se realizó una prueba de ANDEVA (análisis de varianza) para verificar si existen diferencias entre las variables de las diferentes poblaciones (Cuadro 5); las variables LHC, L. Fem, L. Ante, An Cr, ALT Cdortrans, ANC Cdortrans, L4DPP y L cr (largo de cráneo) fueron las que presentaron diferencias estadísticamente significativas para la prueba de ANDEVA.

Cuadro 5. Análisis de Varianza (ANDEVA), donde SS= Suma de Cuadrados, MS= Suma de Cuadrados Medios, g. l.= grados de libertad, F= Estadístico F y p= Intervalo de Confianza.

Variable	SS	g. l.	MS	F	P
LHC	427.9	2	213.9	3.322	0.0445
LTC	2800.4	2	1400.2	3.02	0.0612
LC	1022.37	2	511.18	2.61	0.0877
L. Fem	74.449	2	37.224	11.274	0.0001
L. Ante	20.957	2	10.478	4.632	0.0144
L. Tib	1.857	2	0.928	0.5503	0.5803
An Cr	29.501	2	14.751	6.653	0.0028
ALT C Do	27.248	2	13.624	5.702	0.0060
ANCH C Do	77.565	2	38.783	4.071	0.0232
L4DPP	523.247	2	261.623	21.555	0.0001
L Cr	65.354	2	32.677	7.188	0.0018

Posteriormente se hizo una prueba de Tukey (comparación entre medias) en las variables que presentaron diferencias significativas. Se encontró que existen diferencias en ocho de las once variables utilizadas en al menos dos de las poblaciones estudiadas: Las variables LHC (longitud hocico cloaca;  $p=0.0445$ ), L. Fem (longitud de femur;  $p=0.0001$ ), An. Cr (ancho de cráneo;  $p=0.0028$ ) y L4DPP (longitud del cuarto dedo de la pata posterior;  $p=0.0001$ ) son significativamente

mayor en el poblado de San José con respecto de las otras dos poblaciones (Santa Clara y El Casco), mientras que las variables L Ante (longitud de antebrazo;  $p=0.0144$ ) y la L Cr (longitud de cráneo;  $p=0.00189$ ) tienen valores significativamente superiores en Santa Clara, en referencia a las otras dos poblaciones (San José y El Casco) y las variables ALT C Do (altura del cuerpo dorsotransversal;  $p=0.0060$ ) y ANCH C Do (ancho del cuerpo dorsotransversal;  $p=0.0232$ ) son significativamente mayores para el poblado de El Casco con respecto de las otras dos poblaciones (Cuadro 6, figura 8).

Cuadro 6. Prueba de Tukey para las tres localidades donde se muestran las variables que presentaron diferencias significativas y los valores de confiabilidad (p).

Variable	Med San José	Med Sta. Clara	Med El Casco	P
LHC	63.51	61.44	55.01	0.0445
L. Fem	13.19	11.35	10.43	0.0001
L. Ante	9.15	9.88	8.26	0.0144
An. Cr	13	11.35	11.45	0.0028
ALT C Do	9.16	7.81	9.69	0.0060
ANCH C Do	13.44	13.08	15.39	0.0232
L4DPP	16.67	10.14	9.87	0.0001
L Cr	12.47	15.26	14.45	0.0018

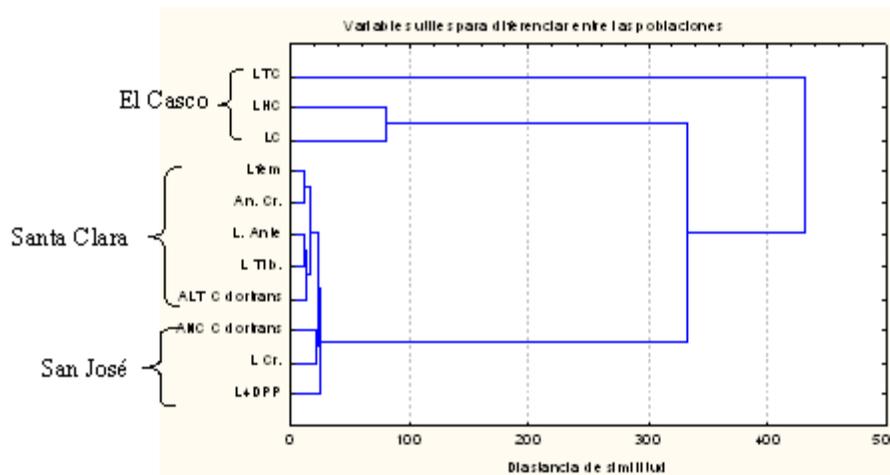


Figura 8. Diagrama donde se muestran las variables que fueron utilizadas para diferenciar entre las tres poblaciones estudiadas.

### 6.2.3. Análisis Discriminante

EL AD muestra las variables que revelaron los valores más altos para la segregación entre poblaciones, fueron: Largo del cuarto dedo de la pata posterior (L4DPP), la longitud del fémur (L fem) y la longitud hocico-cloaca (LHC, figura 2), con el 74% de la varianza en la primer función discriminante (DF1) ( $p < 0.05$ ). En la segunda función discriminante (DF2) los valores más altos pertenecen a la longitud del antebrazo (L ANTE) y la altura dorsotransversal del cuerpo (ALT C DOR), con el 26% de la variación ( $p < 0.05$ , Cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis discriminante entre localidades, en negrita se muestran los caracteres que obtuvieron los valores más altos y que apoyan al primer eje de ordenación. DF corresponde a la Función Discriminante; DF1 y DF2, están determinados por los valores propios, los cuales explican la mayor variación y determinan cuáles variables contribuyen más en la función discriminante y consecuentemente para la separación en grupos. El valor relativo dentro de cada (DF) indica las variables que son más importantes para la exclusión entre localidades.

<b>Variables</b>	<b>DF 1</b>	<b>DF2</b>
L4DPP	<b>1.675</b>	-0.599
L Ante	-0.560	<b>1.027</b>
ALT C DO	0.413	<b>-1.283</b>
L fem	<b>1.342</b>	0.195
LHC	<b>-1.606</b>	0.455
Val, propios	2.909	0.981
% varianza	74	26
Valor de p	.0001	.01

Los valores más altos en el análisis discriminante muestran una clara separación en tres grupos, ordenándose de tal manera que se diferencian entre las tres poblaciones, esta separación está determinada de acuerdo a los valores propios de cada una de las funciones discriminantes (DF) y de las variables con valores más altos (Figura 9).

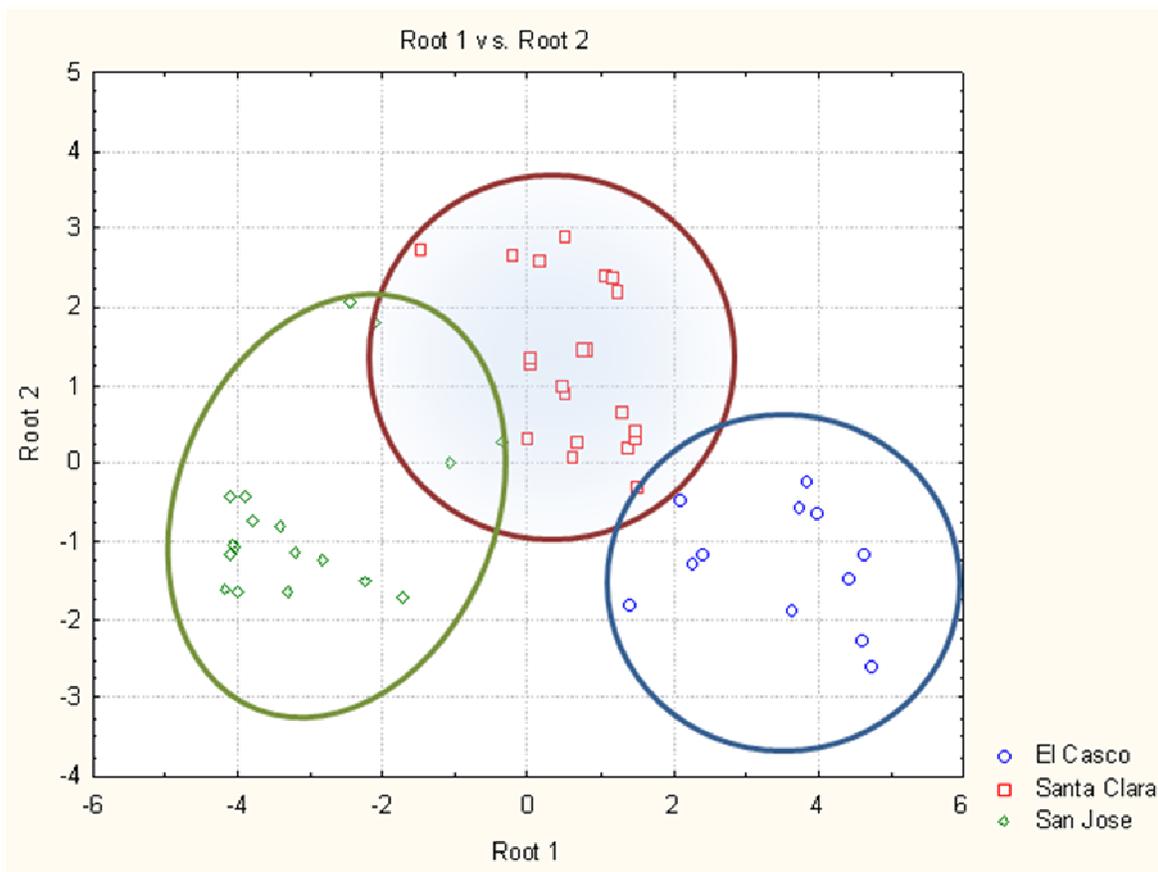


Figura 9. Análisis discriminante entre los ejemplares de *Sceloporus grammicus* de las tres localidades, a partir de los caracteres que tuvieron los valores más altos, donde las tres localidades presentan una clara diferenciación, esta separación está determinada de acuerdo a los valores propios de cada una de las funciones discriminantes (DF) y de acuerdo con las variables que obtuvieron los valores más altos en este análisis.

#### 6.2.4. Análisis de Componentes Principales (PCA)

El Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés), es una técnica estadística de síntesis de la información o reducción de la dimensión (número de variables; Jonson, 1996). Consiste en sintetizar la información o reducir su dimensión, comprimiéndolas a un menor número, se obtiene entonces el Coeficiente de Variación (VC), el cual está dado por  $D.S./ \text{media} * 100$ . En los

resultados obtenidos, el VC fue significativo para todos los caracteres, indicando que los 11 caracteres morfológicos presentan variación significativa. Los caracteres con mayor porcentaje en el coeficiente de varianza, son: el largo del cuarto dedo de la pata posterior (L4DPP) con el 38.12% y el ancho del cuerpo dorsotransversal (ANCH C DO) con 22.83%, mientras que el carácter menos variable fue la longitud de tibia con 12.68%, donde el primer componente principal (COM P1) contiene el 55.33% del total de la varianza y el segundo componente (COM P 2) contiene el 22.46% de varianza (Cuadro 8).

Cuadro 8. Resultados para los análisis de Componentes principales, donde se muestra el Coeficiente de variación, este esta dado por la desviación estándar (DS/media\*100) indicando que los 11 caracteres son variables y en negrita los valores más variables.

Variable	Unidades	Media	D.S.	C V	COM P 1	COM P 2
LTC	mm	125.4532	22.6541	<b>18.05</b>	0.1587248	-0.01967
LHC	mm	60.64863	8.38914	13.83	0.1542995	0.0070895
LC	mm	65.93526	14.59119	22.12	0.1513737	-0.0375
L fem	mm	11.61529	2.158841	18.58	0.122295	0.0290254
L ante	mm	8.956843	1.609556	17.97	0.1354394	0.0182831
L tib	mm	10.14373	1.28697	<b>12.68</b>	0.1029838	0.097421
A Cr	mm	11.97216	1.64874	13.77	0.1553177	-0.019196
ALT C DO	mm	9.058824	1.684872	18.60	0.0114462	0.3052932
ANCH C DO	mm	14.32392	3.27044	<b>22.83</b>	-0.043392	0.3615736
L4DPP	mm	12.33412	4.70282	<b>38.13</b>	0.1775404	-0.259652
L Cr	mm	13.93843	2.38146	17.95	-0.066876	0.366148
% varianza					<b>55.338</b>	<b>22.467</b>
TOTAL					77.805	

Todos los caracteres morfométricos permitieron una separación clara de tres poblaciones (Figura 10) y al hacer un análisis de agrupación jerárquica se obtuvo una agrupación de las localidades de acuerdo a la semejanza que existe entre los valores de sus medidas (Figura 11), quedando dos grupos, uno el poblado de El Casco (raza FM2) y el segundo grupo formado por las poblaciones de San José (raza S) y Santa Clara (híbridos).

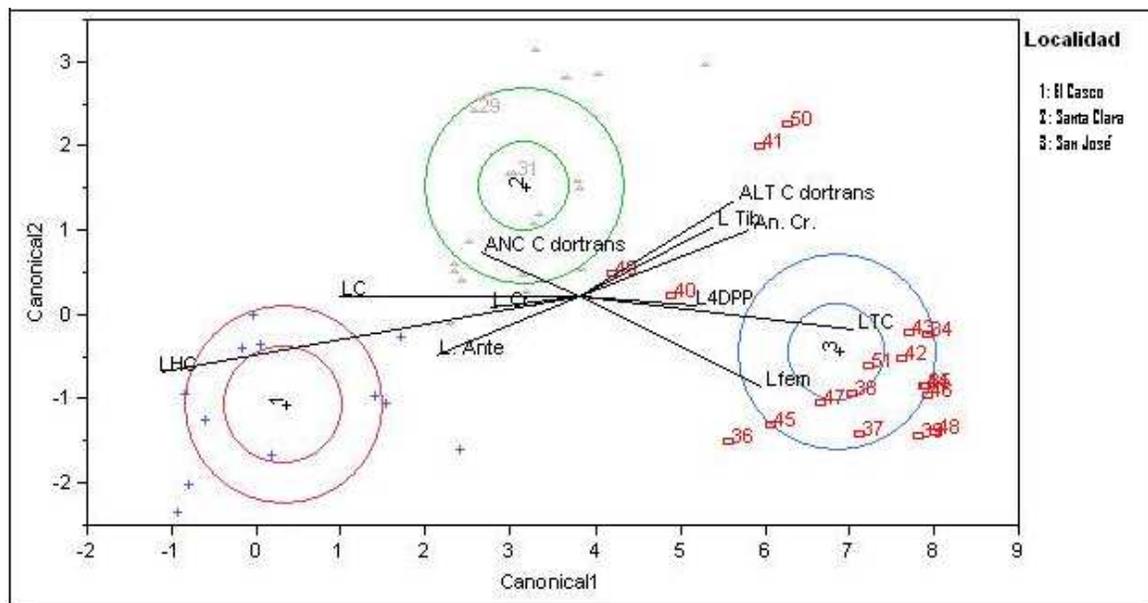


Figura 10. Diagrama de ordenación donde se muestra la distribución de las localidades de acuerdo a todos los caracteres morfológicos analizados, proporcionando el 55.33% de la varianza para el CP1 y el 22.43% de la varianza para el CP2.

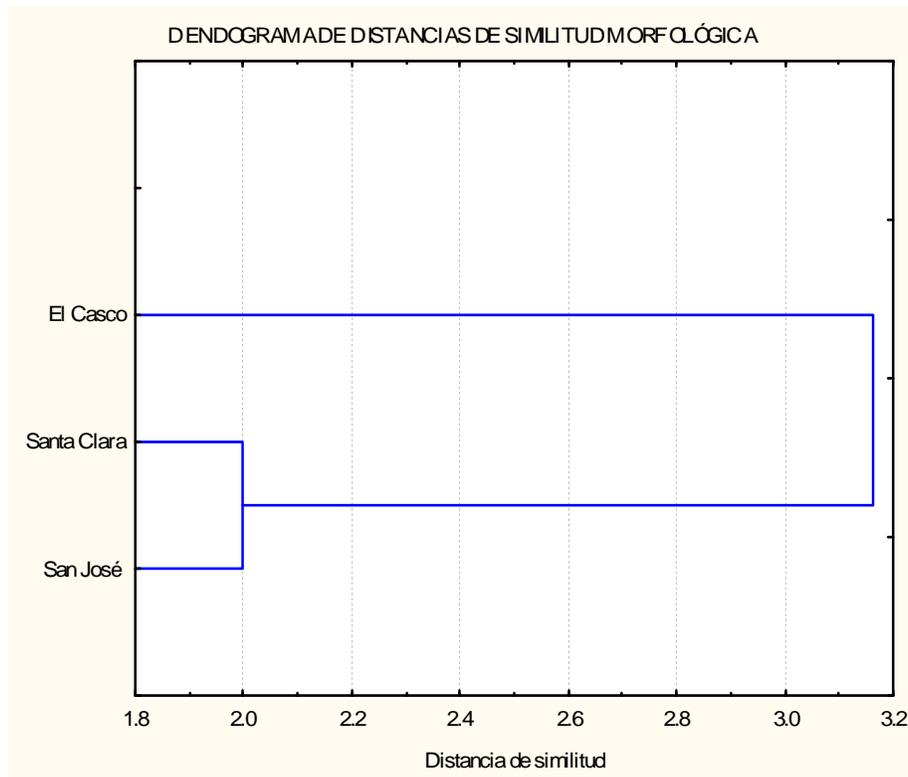


Figura 11. Análisis de clúster jerárquico, donde se muestra que las localidades de Santa Clara y San José son más parecidas en su morfología y la población de El Casco es la menos afín morfológicamente.

Usando las diferencias entre las variables, se pueden agrupar las poblaciones de acuerdo a la variable que más aportó a su diferenciación con respecto de las otras dos poblaciones; como se puede observar en la figura 12, las variables relacionadas con la talla [longitud total del cuerpo (LTC), longitud hocico cloaca (LHC) y longitud de la cola o LC], separaron la población de El Casco de las otras dos poblaciones, mientras que San José se diferencia de Santa Clara con ayuda de las variables correspondientes al ancho del cuerpo dorso-transversal (ANCH C DO), el largo del cráneo (L Cr) y el largo del cuarto dedo de la pata posterior (L4DPP); estas asociaciones y diferencias permiten establecer morfotipos distintivos para cada localidad.

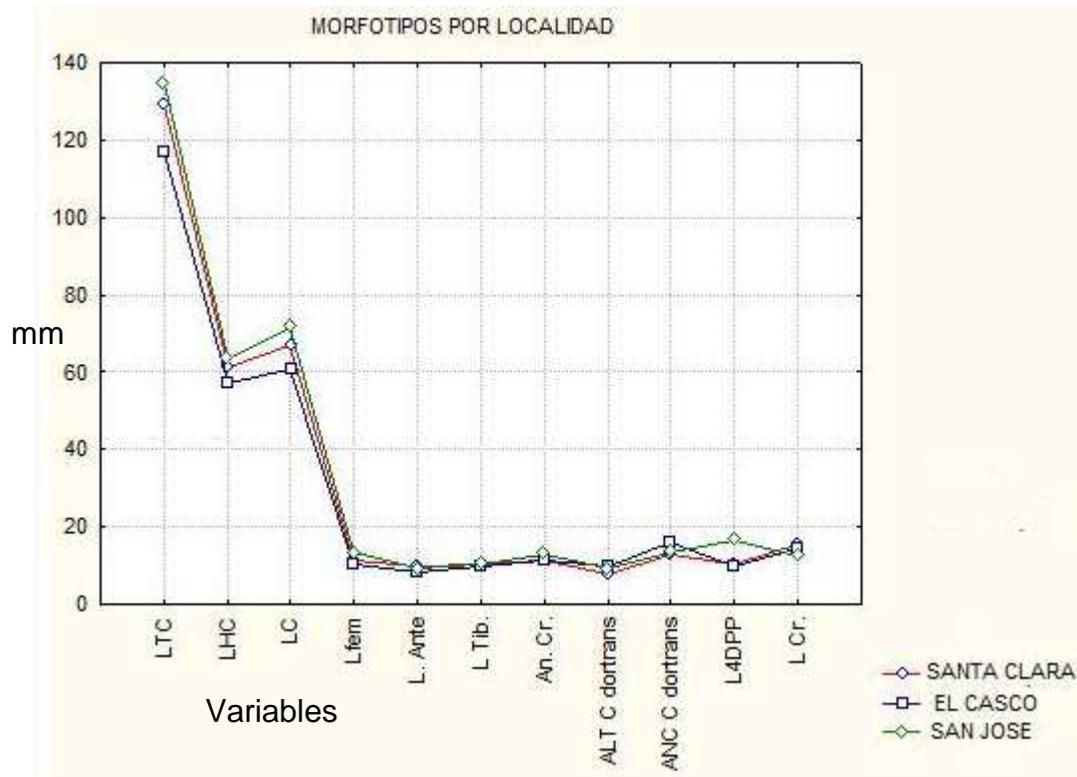


Figura 12. Morfotipos distintivos entre localidades, en el eje horizontal se encuentran las variables y en el vertical las medidas en milímetros donde se observa un comportamiento distinto entre las medidas de las tres poblaciones.

La diferencia entre las dos razas es más gráfica y se aprecia en las tallas de los ejemplares, pues las variables de Longitud total del cuerpo (LTC), Longitud hocico-cloaca (LHC) y longitud de la cola (LC) presentan diferencias significativas, la longitud del cuarto dedo de la pata posterior (L4DPP) presenta una diferenciación particular entre las razas, mientras que las demás variables mantienen un valor constante (Ver figura 13).

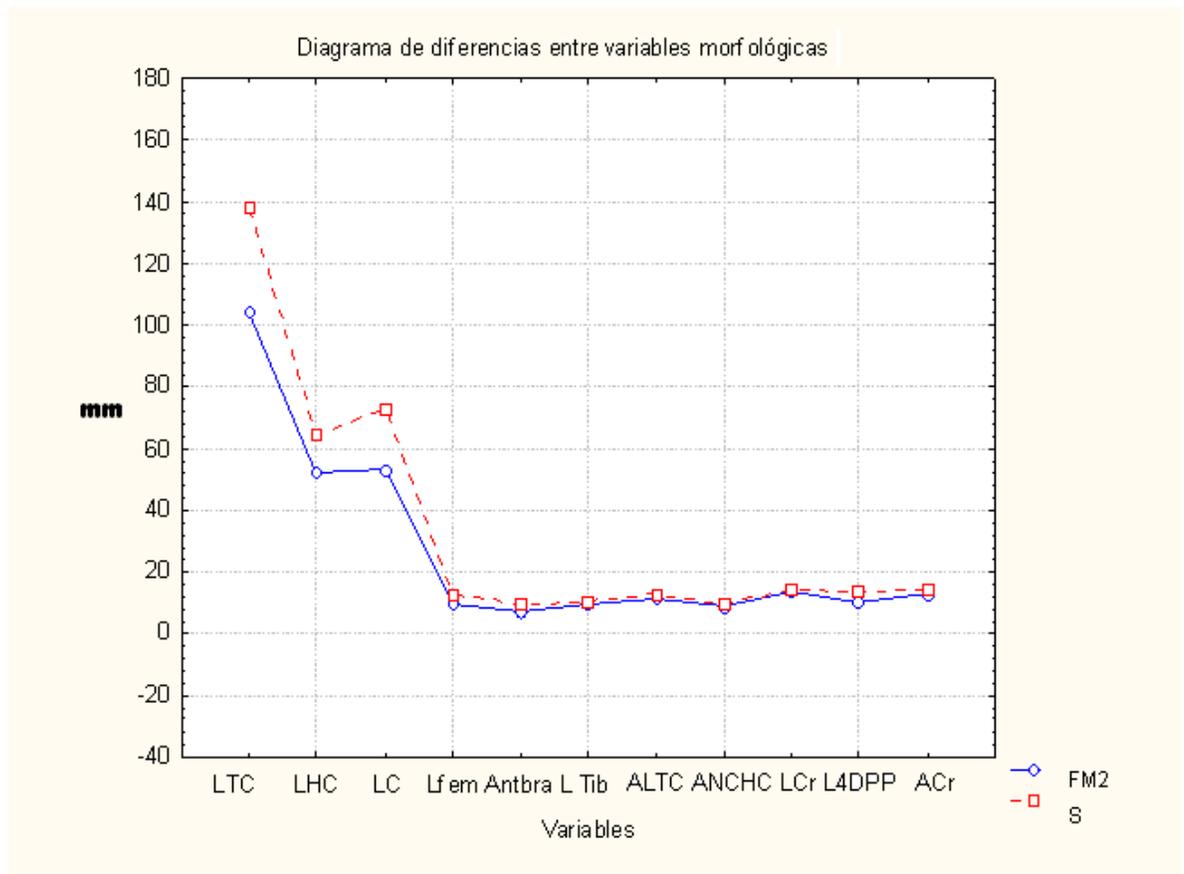


Figura 13. Gráfica donde se muestran las relaciones existentes con respecto de las medidas en cada una de las razas cromosómicas analizadas.

### **6.3. Análisis genético**

#### **6.3.1. Riqueza Alélica**

Los seis microsatélites elegidos amplificaron positivamente en las tres poblaciones, con un polimorfismo total de 116 alelos encontrados para 49 loci distintos; el patrón de distribución de los alelos entre las muestras fue el siguiente; para los loci Gramm 101 y Gramm 102 se encontraron alelos comunes en, al menos, dos de las poblaciones; para el locus Scel 571 existen alelos exclusivos en la población de San José; en el locus Gramm 104 también se encontraron alelos exclusivos de la población de El Casco; en el locus 106 se presentaron tres alelos exclusivos, dos para la población de Santa Clara y uno para la población de San José; para el locus Gramm 107, hay alelos exclusivos en la población de San José. Los loci que presentaron mayor número de alelos fueron: Gramm 102 y Gramm 106 (nueve), después Gramm 101, Gramm 104 y Gramm 107 (ocho) y por último Scel 571 (siete; Cuadro 9), el cual es común a las tres poblaciones de estudio.

Cuadro 9. Frecuencias Alélicas de cada locus por población, se muestran las frecuencias obtenidas por cada población, se resaltan los alelos **compartidos** entre dos poblaciones y los alelos **exclusivos** para cada una. Los cuadros en blanco indican alelos comunes entre los tres grupos.

	Gramm101			Gramm 102			Scel 571		
	S. José	El Casco	Sta. Clara	S. José	El Casco	Sta. Clara	S. José	El Casco	Sta. Clara
1	0.35	0.2	0.278	0.025	0.3	****	0.35	0.067	0.194
2	0.05	0.067	0.111	0.2	****	0.167	0.075	0.467	0.306
3	0.1	****	0.083	0.1	0.2	0.139	0.1	****	****
4	****	0.367	0.028	0.125	****	0.167	0.05	0.2	0.028
5	0.225	****	0.056	0.05	0.033	****	0.075	****	0.139
6	0.175	0.1	0.139	0.225	0.033	0.111	0.3	0.167	0.278
7	0.1	0.067	0.139	****	0.267	0.194	0.05	0.1	0.056
8	****	0.2	0.167	0.15	0.067	0.139	****	****	****
9	****	****	****	0.125	0.1	0.083	****	****	****

	Gramm 104			Gramm 106			Gramm 107		
	S. José	El Casco	Sta. Clara	S. José	El Casco	Sta. Clara	S. José	El Casco	Sta. Clara
1	0.125	0.433	0.278	0.225	0.033	0.111	****	0.433	0.306
2	0.4	0.067	0.222	0.125	0.4	0.389	0.325	0.067	0.194
3	0.025	****	0.028	****	0.1	****	0.2	0.2	0.167
4	0.075	0.033	0.083	0.025	****	****	0.075	0.1	****
5	0.125	****	0.111	0.35	0.133	0.306	0.125	****	0.083
6	****	0.1	****	****	0.033	****	0.15	****	0.028
7	0.125	****	0.111	0.025	****	0.028	****	0.2	0.222
8	0.125	0.367	0.167	0.175	0.167	0.111	0.125	****	****
9	****	****	****	0.075	0.133	0.056	****	****	****

Los niveles de diversidad alélica fueron mayores en la población de Santa Clara (0.81) y el valor mas bajo lo presentó la población de El Casco

(0.75), aunque los valores encontrados fueron, en general, ligeramente elevados (>0.5), mientras que para los loci, el Gramm 102 fue el que tuvo el valor más alto (0.85) en el índice de diversidad, mientras el que reportó el menor valor fue Scel 571 (0.76; Cuadro 10).

Cuadro 10. Diversidad Alélica por locus en cada población.

	Diversidad Alélica			
	Sn. José	El Casco	Sta. Clara	Promedio
Gramm 101	0.788	0.79	0.853	0.81
Gramm 102	0.862	0.805	0.869	<b>0.85</b>
Scel 571	0.776	0.717	0.784	0.76
Gramm 104	0.787	0.681	0.832	0.77
Gramm 106	0.792	0.786	0.74	0.77
Gramm 107	0.813	0.738	0.801	0.78
<b>Promedio</b>	0.8	0.75	<b>0.81</b>	

La mayor riqueza alélica se encuentra concentrada en la población de San José con un valor promedio de 6.62, la población que presentó menor riqueza alélica fue la de El Casco, con un valor promedio de 5.83. El locus Gramm 102 fue el que proporcionó mayor información respecto a la riqueza alélica con un valor promedio de 8.53 y el menor fue Scel 571 (Cuadro 11).

Cuadro 11. Riqueza alélica por locus en cada población.

	Riqueza alélica			
	San José	Casco	Sta Clara	Promedio
Gramm 101	5.938	6	7.806	7.774
Gramm 102	7.689	7	6.997	<b>8.533</b>
Scel 571	6.858	5	5.81	6.546
Gramm 104	6.736	5	6.83	6.947
Gramm 106	6.487	7	5.809	6.637
Gramm 107	5.987	5	5.831	7.53
<b>Promedio</b>	<b>6.62</b>	5.83	6.51	

Los valores de heterocigosidad observada fueron mayores a los esperados; la población de Santa Clara presentó el valor más alto de heterocigosidad observada (0.965; Cuadro 12).

Cuadro 12. Diversidad genética por muestra de cada población. Donde: Número de alelos observados ( $N_a$ ), Número efectivo de alelos ( $N_e$ ), Promedio de heterocigotos ( $\hat{H}$ ), Promedio de heterocigotos observados ( $\hat{H}_o$ ), Heterocigosidad promedio esperada (diversidad genética de Nei;  $\hat{H}_e$ ).

	<b>San José</b>	<b>Santa Clara</b>	<b>El Casco</b>	<b>Media</b>
$N_a$	9	12	8.6667	12.0000
$N_e$	5.2768	8.3484	5.1705	8.0709
$\hat{H}$	0.8294	0.8294	0.8294	0.8294
$\hat{H}_o$	0.949	<b>0.965</b>	0.914	0.943
$\hat{H}_e$	0.8061	0.8774	0.8045	0.8745

Los seis loci fueron 100% polimórficos. Los valores de heterocigosidad observada por locus fueron mayores a los esperados, siendo Gramm 102 el locus con mayor heterocigosidad observada (0.961; Cuadro 13).

Cuadro 13. Heterocigosidad de Nei, para cada locus. Se muestran: Heterocigotos observados ( $H_o$ ), Heterocigotos esperados ( $H_s$ ), Heterocigosidad total ( $H_t$ ).

Locus	$H_o$	$H_s$	$H_t$
Gramm 101	0.956	0.81	0.85
Gramm 102	<b>0.961</b>	0.845	0.885
Scel 571	0.961	0.759	0.803
Gramm 104	0.917	0.767	0.809
Gramm 106	0.928	0.773	0.797
Gramm 107	0.922	0.784	0.838
Promedio	<b>0.941</b>	<b>0.79</b>	<b>0.831</b>

En un análisis comparativo entre especies, se estimó la riqueza alélica, la heterocigosidad observada y la esperada. Al evaluar las muestras de San José versus Santa Clara se obtuvo una riqueza alélica de 6.56, siendo éste el mayor

valor obtenido de todas las comparaciones entre muestras. Al igual que en el análisis individual por cada muestra, los valores de heterocigosidad observada fueron mayores a los esperados (Cuadro 14).

Cuadro 14. Análisis entre grupos de muestras. Se reporta: Riqueza alélica, heterocigotos observados (Ho), heterocigotos esperados (Hs).

Parámetros/ Poblaciones	Sn José y Casco	Casco y Sta. Clara	Sn José y Sta. Clara	Sn José, Casco y Sta. Clara
Riqueza Alélica	6.225	6.174	<b>6.565</b>	6.321
Ho:	0.914	0.949	<b>0.965</b>	0.943
Hs:	0.782	0.786	0.808	0.792

### 6.3.2. Estructura Genética

#### Estadísticos “F” de Wright

El valor promedio de  $F_{ST}$  para las tres poblaciones analizadas fue de 0.015; en el análisis por población, El Casco registró la mayor diferenciación con un valor total de 0.02, seguido de las poblaciones de Santa Clara (0.014) y San José con 0.013 (Cuadro 13.). En el análisis de diferenciación genética entre individuos de una misma población ( $F_{IS}$ : niveles de endogamia), el valor promedio de las tres poblaciones analizadas fue de 0.19; el poblado de San José fue la que obtuvo menor diferencia genética entre sus individuos, con un valor promedio de 0.16, mientras que el poblado de Santa Clara mostró la mayor diferenciación genética entre sus individuos con un valor promedio de 0.23 (Cuadro 15).

Cuadro 15. Diferencias genéticas entre las tres poblaciones analizadas de *Sceloporus grammicus* ( $F_{ST}$ ). El valor en color gris representa el promedio de  $F_{ST}$  para el total de las muestras analizadas.

Población	Valor de $F_{ST}$
El Casco	0.02
Santa Clara	0.01469
San José	0.01391
Promedio	0.015

El locus que detectó menor diferenciación genética entre individuos de una sola población fue Gramm 102 con un valor de 0.12, registrado en promedio para las tres poblaciones; el locus que detectó la mayor diferenciación genética entre individuos de una población fue el Scel 571, con un valor promedio de 0.28 en el poblado de Santa Clara y con un promedio entre las tres poblaciones de 0.27 (Cuadro 16).

Cuadro 16. Diferencias genéticas entre individuos de las tres poblaciones ( $F_{IS}$ = nivel de endogamia) por *locus* y por población. El valor en negrita representa el promedio de  $F_{IS}$  para el total de las muestras analizadas.

	San José	Casco	Santa Clara	Promedio
Gramm 101	0.27	0.1	0.17	0.18
Gramm 102	0.1	0.16	0.15	0.14
Scel 571	0.22	0.3	0.28	<b>0.27</b>
Gramm 104	0.21	0.18	0.2	0.19
Gramm 106	0.07	0.19	0.35	0.2
Gramm 107	0.11	0.17	0.25	0.18
Total	0.16	0.18	<b>0.23</b>	0.19

Para  $F_{IT}$ , el valor promedio de las tres poblaciones analizadas fue de 0.62 mientras que el valor de  $F_{ST}$  promedio fue de 0.015 y el valor promedio de  $F_{IS}$  fue de 0.19; Se realizó una gráfica final para el total de las poblaciones, en donde es posible observar los valores promedio para los estadísticos “F”, descritos anteriormente (Figura 14).

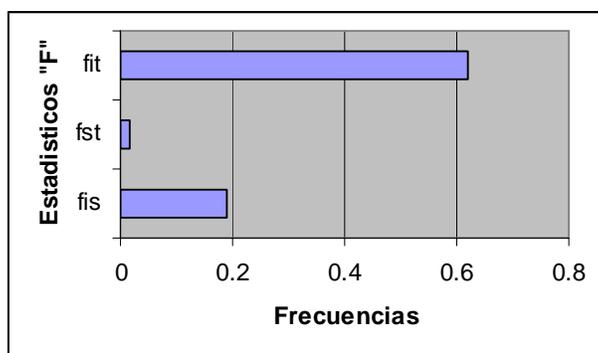


Figura 14. Estadísticos "F" para el total de las poblaciones analizadas.

El locus con la mayor frecuencia fue el Scel 571, con un valor promedio de 0.837, seguido del locus Gramm 101 con un valor de 0.779; el valor más pequeño se registró para el locus Gramm 107, con una frecuencia de 0.388 (Cuadro 17).

Cuadro 17. Diferencias entre individuos con respecto a su especie ( $F_{IT}$ ). El valor en color gris representa el promedio de  $F_{IT}$  para el total de las muestras analizadas.

Índices de Fijación	
Locus	$F_{IT}$
Gramm 101	0.779
Gramm 102	0.548
Scel 571	<b>0.837</b>
Gramm 104	0.682
Gramm 106	0.508
Gramm 107	<b>0.388</b>
Promedio	0.62

### 6.3.3. Distancias y Flujo Genético entre Razas

La matriz de distancia de Nei muestra las diferencias genéticas existentes entre pares de poblaciones, donde las poblaciones de San José y El Casco presentan la mayor distancia, mientras que las poblaciones de Santa Clara y San José presentan el valor más alto de identidad genética (Cuadro 17).

Cuadro 18. Comparación de distancias genéticas de Nei, muestra las diferencias entre las tres poblaciones. Donde la identidad genética esta sobre la diagonal y la distancia genética se encuentra por debajo de la diagonal.

	Casco	San José	Santa Clara
Casco	****	0.4542	0.8153
San José	<b>0.7893</b>	****	0.8195
Santa Clara	0.2043	<b>0.199</b>	****

Utilizando los datos de la matriz de distancia genética para las tres poblaciones, se realizó un dendograma con la ayuda del programa TFGA (Versión 1.3, 1997) que muestra dos grupos, el primero formado por las poblaciones de San José y Santa Clara y un segundo con El Casco (Figura 15).

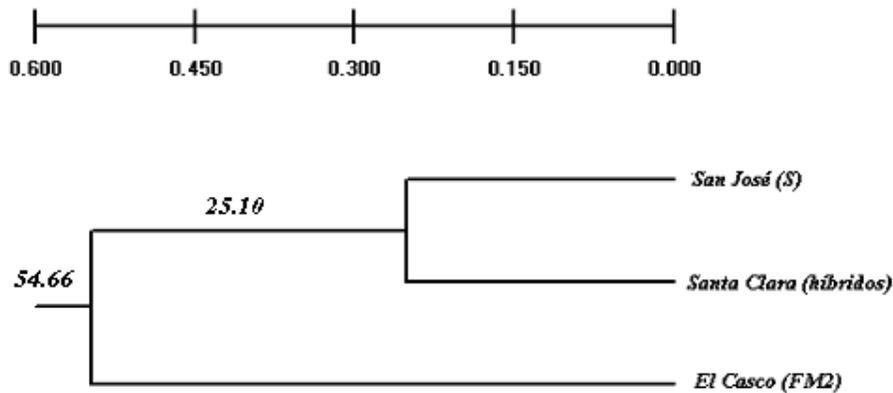


Figura 15. Dendograma que muestra las relaciones genéticas entre las poblaciones analizadas. UPGMA (método de pares de grupos sin peso a partir de la media aritmética) con 1000 repeticiones de *bootstrap* (remuestreo).

Los resultados de flujo genético estimados con el parámetro  $Nm$  (índice de migración para pares de muestras), indican que las poblaciones con menor intercambio de migrantes son El Casco y Santa Clara (Cuadro 19).

Cuadro 19. Matriz de flujo genético entre pares de muestras ( $M=2Nm$ ), en color gris se muestra a las poblaciones con menor flujo genético.

	El Casco	San José	Santa Clara
El Casco	*****	*****	*****
San José	10.9397	*****	*****
Santa Clara	7.8477	11.4126	*****

#### Análisis Molecular de la Varianza

Se realizaron tres análisis de varianza molecular (AMOVA); de los cuales el primero analiza la varianza molecular a partir del método de diferencias alélicas ( $F_{ST}$ ) entre y dentro de las tres poblaciones de estudio, reflejando que el 98.41% de la variación total se encuentra dentro de las muestras y solo un 1.59% entre ellas (Cuadro 20). El índice de fijación  $F_{ST}$  obtenido fue de 0.02, el cual es no significativamente diferente de cero ( $p < 0.05$ ) después de 1,023 permutaciones, valor que refleja poca diferenciación genética.

Cuadro 20. Componentes de la varianza molecular calculado a partir del método de diferencias alélicas ( $F_{ST}$ ) entre y dentro de las poblaciones de estudio: San José, Santa Clara y El Casco.

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Interpoblacional	2	496.365	8.56	1.59
Intrapoblacional	103	56510.115	548.64	98.41
Total	105	57006.48	540.08	
Índice de Fijación $F_{ST}$ : 0.02				

La segunda prueba de varianza molecular calculada entre muestras de cada especie, entre individuos dentro de cada muestra y diferencias alélicas entre el total de los individuos; muestra que el 64.23% de la variación total se encuentra entre el total de los individuos, el 35.74% de la variación total se encuentra repartida entre los individuos al interior de las muestras y solo un 0.3% entre ellas (Cuadro 21).

Cuadro 21. Componentes de la varianza molecular calculados a partir del método de diferencias 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 poblaciones	2	992.732	3.22620 $V_a$	0.3
Dentro poblaciones	50	19157.231	693.927 $V_b$	35.74
Entre individuos	53	93863.000	1771.000 $V_c$	64.23
Total	105	114012.962	1080.298	

Finalmente, se realizó un AMOVA locus por locus, en donde se estimó la variación para cada loci entre muestras y entre individuos; en el cual se observó que el 4.69% y el 43.51% de la variación total entre muestras y entre individuos pertenece al locus Gramm 107. El locus Scel 571 fue el que menor porcentaje de variación presentó entre poblaciones (0.3%) y entre individuos mostró la diferenciación más alta (83.39%; anexo B).

#### 6.3.4. Dinámica de Flujo Genético

##### *Frecuencias de Alelos Compartidos*

Con ayuda del programa "Structure", cada uno de los individuos se asigna a una de tres fuentes (pozas) genéticas potenciales, calculando la probabilidad de que los alelos muestreados aleatoriamente pertenezcan a alguno de los dos taxa paternos (razas cromosómicas), o al grupo híbrido.

El análisis de afinidad alélica entre individuos, se realizó bajo los criterios establecidos en el cuadro 22, asignados mediante la estrategia de máxima verosimilitud.

Cuadro 22. Intervalos de selección para las categorías de mezcla alélica.

COLOR	NOMBRE	% DE LOS ALELOS PATERNALES PRESENTES
	PUROS	> 90% DE ALELOS PARENTALES
	INTROGRESIONES	90-80% DE ALELOS PARENTALES
	RETROCRUZAS	60-80% DE ALELOS PARENTALES
	HIBRIDOS	60-40% DE CADA ALELO PARENTAL

Los individuos de cada una de las poblaciones se identificaron y agruparon siguiendo el criterio anterior, del total de individuos analizados (N= 53) se encontraron 32 individuos puros, 12 introgresiones, seis retrocruzas y tres individuos híbridos (Cuadro 23; Anexo B).

Cuadro 23. Proporciones de los alelos encontrados en cada una de las razas cromosómicas.

Criterios discriminantes	NUMERO		PROMEDIO	
	S	FM2	S	FM2
PUROS	19	13	<b>35.85</b>	24.53
INTROGRESIONES	7	5	<b>13.21</b>	9.43
RETROCRUZAS	5	1	<b>9.43</b>	1.89
HIBRIDOS	3		<b>5.66</b>	

Se obtuvo un promedio de 35.85% de alelos puros, 13.21% de introgresiones, 9.43% de retrocruzas para la raza S y para la raza FM2 se obtuvo 24.53% de alelos puros, 9.435 pertenecientes a la retrocruza y 1.89% de retrocruzas, más 5.6% de híbridos (Figura 16).

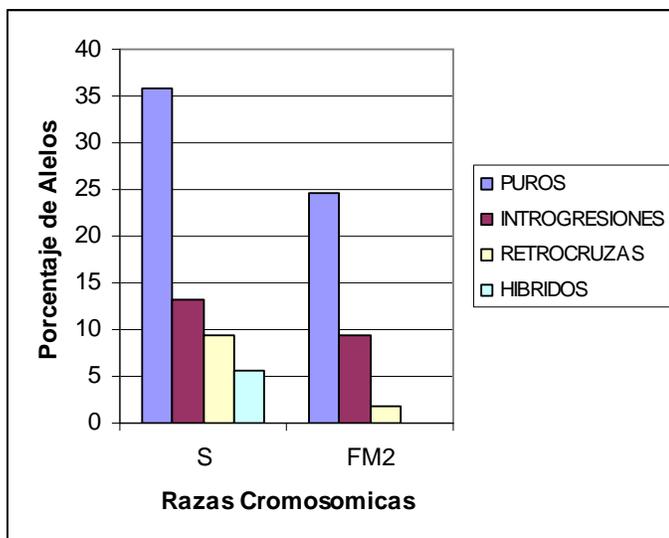


Figura 16. Porcentaje de alelos compartidos entre las razas cromosómicas.

De acuerdo a las frecuencias registradas de alelos paternos para todos los individuos de las tres poblaciones, se estableció entonces que la mayoría de los individuos puros de la raza S se encuentran en el poblado de San José, mientras que la mayoría de los individuos puros pertenecientes a la raza FM2 están en el poblado de El Casco y los individuos que presentan menos de un 90% de frecuencias paternas puras se encuentran en el poblado de Santa Clara (Figura 17).

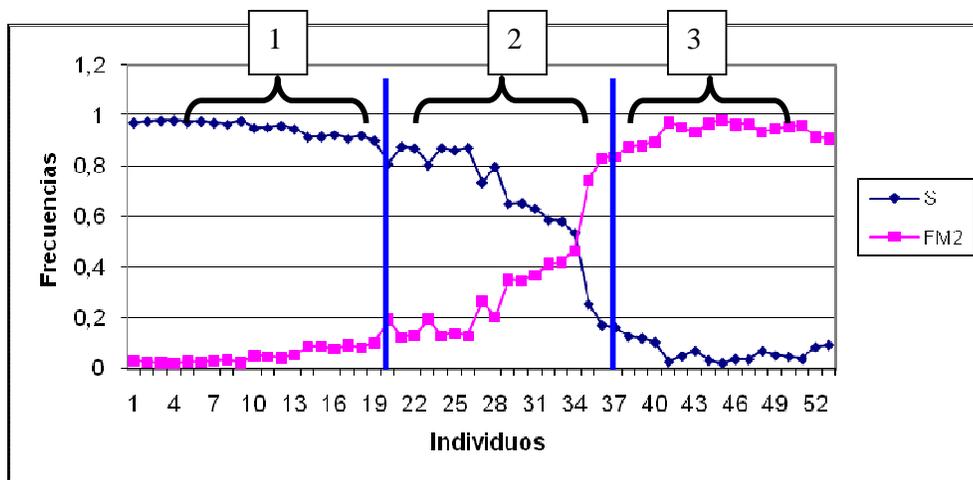


Figura 17. Frecuencias alélicas registradas para los individuos de las tres poblaciones analizadas 1: San José, 2: Santa Clara y 3: El Casco.

En la figura 18 se muestra de manera gráfica la proporción de alelos compartidos en cada población, así como la estructura y flujo genético entre las dos razas cromosómicas presentes, el color verde pertenece a la raza FM2 y el color rojo pertenece a la raza S. por lo que en San José la raza predominante es S, en El Casco es FM2, para el poblado de Santa Clara es evidente la existencia de híbridos de segunda generación o retrocruzas.



Figura 18. Gráfico de estructura genética para las tres poblaciones analizadas. Razas presentes: S (rojo) y FM2 (verde).

Se encontraron tres grupos o entidades genéticas las cuales se grafican en la figura 19; se observa a la raza S (rojo), que es la raza que presenta mayor dispersión, mientras que los híbridos (color azul), tienden hacia la raza S debido a la mayor cantidad de introgresión y mayor número de retrocruzas en el poblado de Santa Clara, mientras que en la raza FM2 (verde), es donde existe la mayor homología genética y un flujo genético más restringido con respecto de las otros dos grupos analizados.

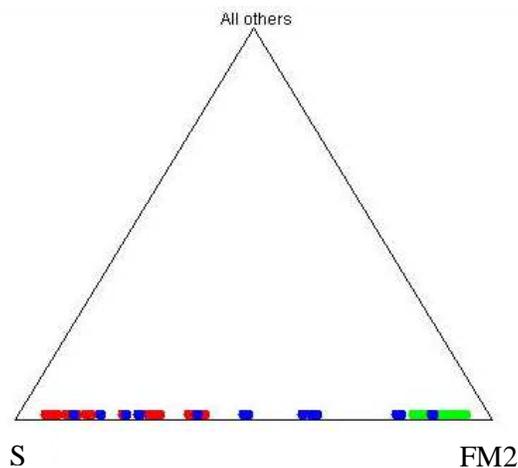


Figura 19. Descripción gráfica de relaciones entre individuos por medio de alelos compartidos; rojo (alelos de la raza S), verde (alelos de la raza FM2) y azul (alelos compartidos en híbridos, retrocruzas e introgresiones).

### 6.3.5. Relaciones Alélicas Ancestrales y Actuales

#### *Frecuencias ancestrales y actuales por locus*

Se estimaron las frecuencias ancestrales y actuales para cada uno de los loci analizados y sus alelos. Para el locus Gramm 101, los alelos con mayor frecuencia ancestral fueron 169 y 184, con valores de 0.267 y 0.16, respectivamente; la mayor frecuencia actual corresponde a los alelos 169, 178 y 190, con valores de 0.231, 0.233 y 0.176, respectivamente. La mayor frecuencia ancestral y actual corresponde al alelo 169 (Ver figura 20).

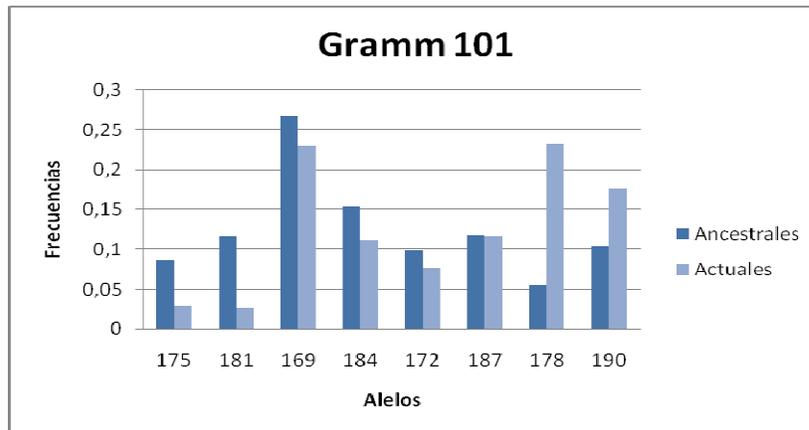


Figura 20. Gráfica de valores ancestrales y actuales de los alelos obtenidos para el locus Gramm 101.

Los resultados obtenidos para el locus Gramm 102, muestran que los alelos con mayor frecuencia ancestral fueron 218, 219 y 210 (Figura 21), con valores de 0.141, 0.145 y 0.1142, respectivamente; la mayor frecuencia actual corresponde a los alelos 214, 190, y 198, con valores de 0.271, 0.182 y 0.159, respectivamente.

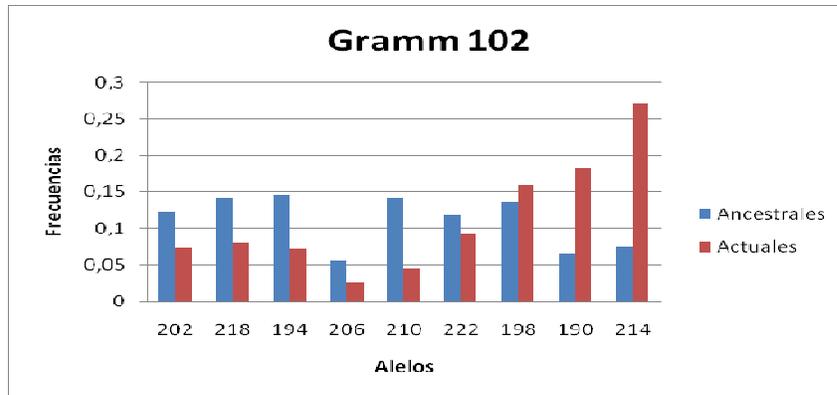


Figura 21. Gráfica de valores ancestrales y actuales de los alelos obtenidos para el locus Gramm 102.

Para el locus Scel571, se muestran que los alelos con mayor frecuencia ancestral fueron 240, 258 y 240 con valores de 0.261, 0.228 y 0.231, respectivamente; la mayor frecuencia actual corresponde a los alelos 216 y 240, con valores de 0.419 y 0.2 (Figura 22).

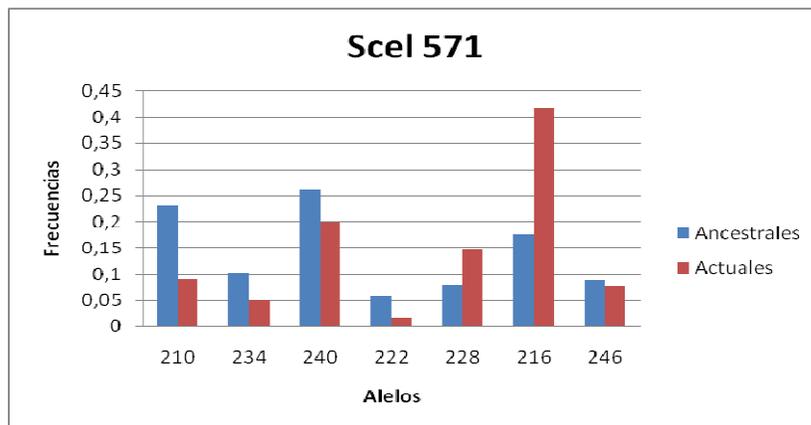


Figura 22. Gráfica de valores ancestrales y actuales de los alelos obtenidos para el locus Scel 571.

Para el locus Gramm 104, muestran que los alelos con mayor frecuencia ancestral fueron 115 y 110 con valores de 0.249 y 0.214, respectivamente; la mayor frecuencia actual corresponde a los alelos 110 y 160, con valores de 0.34 y 0.314, respectivamente (Figura 23).

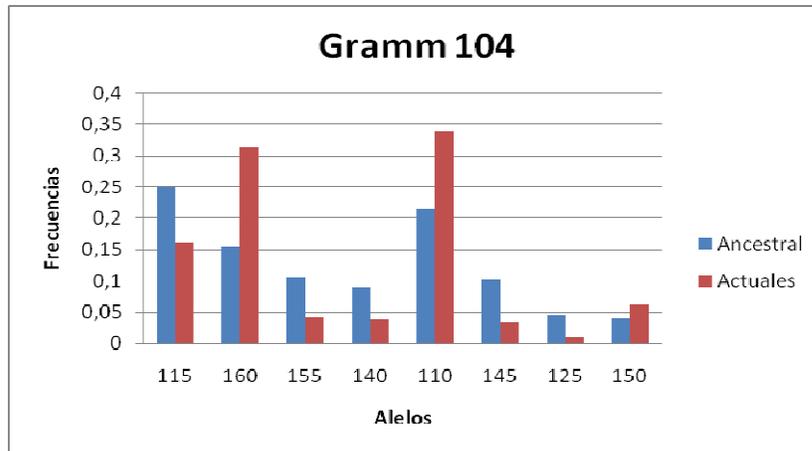


Figura 23. Gráfica de valores ancestrales y actuales de los alelos obtenidos para el locus Gramm 104.

Para el locus Gramm 106, se observa que los alelos con mayor frecuencia ancestral fueron 175 y 155 con valores de 0.26 y 0.211, respectivamente; la mayor frecuencia actual corresponde a los alelos 155 y 175, con valores de 0.392 y 0.22, respectivamente (Figura 24).

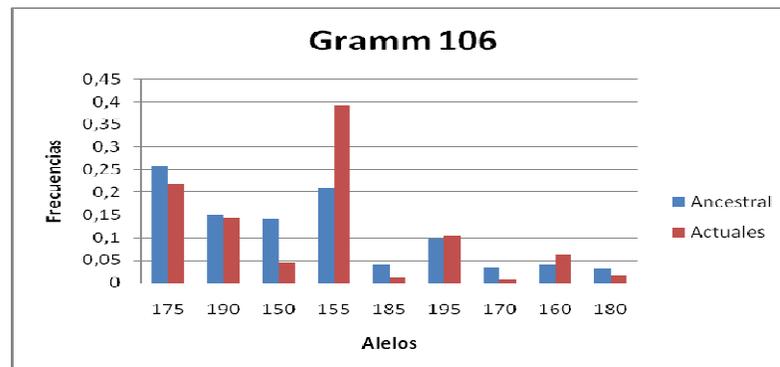


Figura 24. Gráfica de valores ancestrales y actuales de los alelos obtenidos para el locus Gramm 106.

Finalmente para el locus Gramm 107, los alelos con mayor frecuencia ancestral fueron 171 y 177, con valores de 0.224 y 0.174, respectivamente; la mayor frecuencia actual corresponde a los alelos 168 y 177 con valores de 0.387 y 0.225, respectivamente.

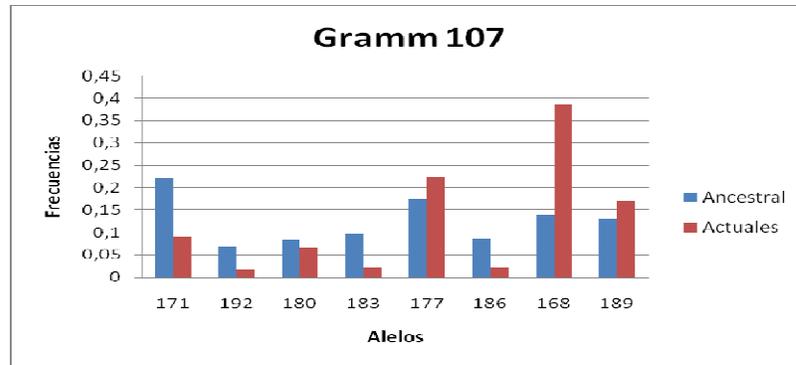


Figura 25. Gráfica de valores ancestrales y actuales de los alelos obtenidos para el locus Gramm 107.

*Alelos con mayor frecuencia por locus y por especie*

Se obtuvieron las frecuencias alélicas por locus, para cada uno se eligieron aquellos alelos con mayor frecuencia por cada muestra. Para el locus Gramm 101 se seleccionaron ocho alelos (175, 181, 169, 184, 172, 187, 178 y 190). El alelo con la mayor frecuencia para los poblados de San José (raza S) y Santa Clara (híbridos) fue el 169, con un valor de 0.267 y 0.302 respectivamente, mientras que en El Casco, los alelos con mayor frecuencia fueron el 169, 178 y 190 con valores de 0.231, 0.233 y 0.176 (Figura 26).

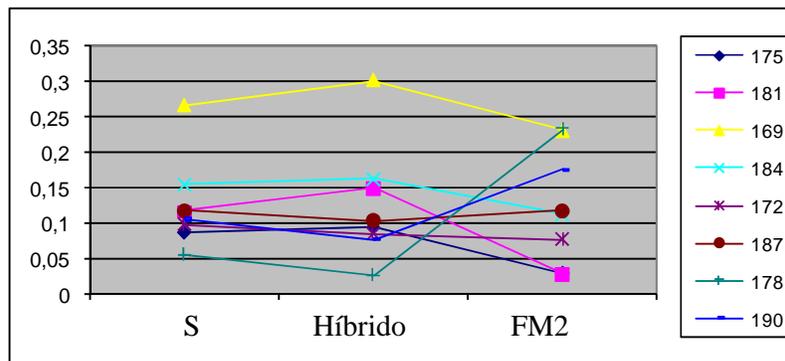


Figura 26. Frecuencias alélicas para el locus Gramm 101, donde se muestra la frecuencia obtenida para cada población.

Para el locus Gramm 102 se seleccionaron nueve alelos (202, 218, 194, 206, 210, 222, 198, 190 y 214). Los alelos presentaron frecuencias mayores a 0.1 a excepción de 206, 190 y 214 para el poblado de San José (raza S); para el poblado de Santa Clara (híbridos) los alelos con valores mayores a 0.15 fueron el 194 y 210 con valores de 0.168 y 0.181 mientras que en El Casco, los

alelos con mayor frecuencia fueron el 198, 190 y 214 con valores de 0.159, 182 y 0.271 (Figura 27).

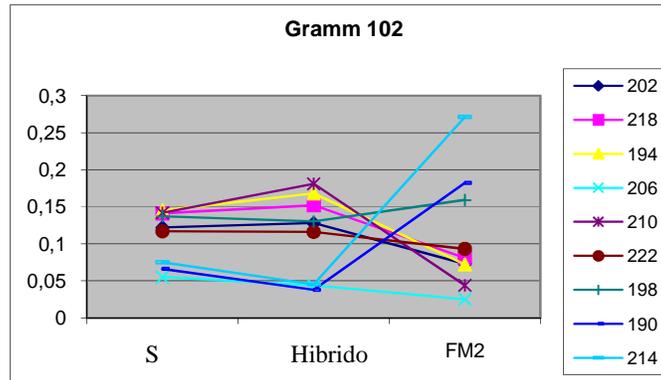
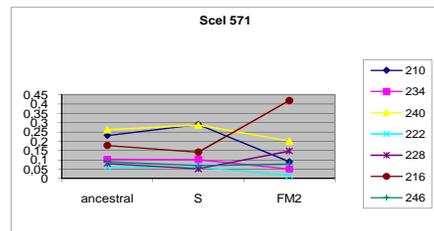


Figura 27. Frecuencias alélicas para el locus Gramm 102, donde se muestra la frecuencia obtenida para cada población.

Para el locus Scel 571 los alelos con la mayor frecuencia para los poblados de San José (raza S) y Santa Clara (híbridos) fueron el 210 y 240, con un valor de 0.231 y 0.261 para el primer poblado y 0.29 y 0.286 para Santa Clara mientras que en El Casco, los alelos con mayor frecuencia fueron el 240 y 246 con valores de 0.2 y 0.419 (Figura 28).

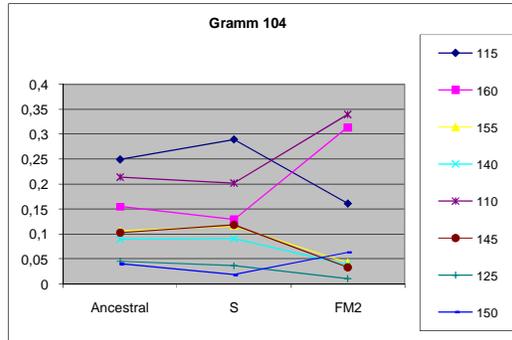


S Híbrido

Figura 28. Frecuencias alélicas para el locus Scel 771, donde se muestra la frecuencia obtenida para cada población.

Para el locus Gramm 104 los alelos con la mayor frecuencia para los poblados de San José (raza S) fueron 115 y 110 con valores de 0.249 y 0.214, respectivamente; mientras que para Santa Clara (híbridos) fue el 115, con un

valor de 0.289 mientras que en El Casco, los alelos con mayor frecuencia fueron el 160 y 110, con valores de 0.314 y 0.34 respectivamente (Figura 29).



S Híbrido

Figura 29. Frecuencias alélicas para el locus Gramm 104, donde se muestra la frecuencia obtenida para cada población.

Para el locus Gramm 106 los alelos con la mayor frecuencia para los poblados de San José (raza S) fueron 175 y 155 con valores de 0.26 y 0.211 respectivamente; mientras que para Santa Clara (híbridos) fue el 175, con un valor de 0.295; en El Casco, el alelo con mayor frecuencia fue el 155 con un valor de 0.392 (Figura 30).

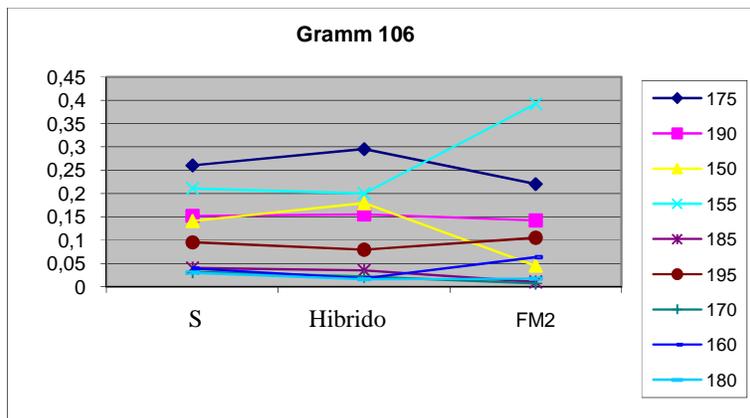


Figura 30. Frecuencias alélicas para el locus Gramm 106, donde se muestra la frecuencia obtenida para cada población.

Para el locus Gramm 107 los alelos con la mayor frecuencia para los poblados de San José (raza S) fueron 171 y 177 con valores de 0.224 y 0.174 respectivamente; mientras que para Santa Clara (híbridos) fue el 171, con un valor de 0.277; en El Casco, los alelos con mayor frecuencia fueron el 177, 168 y 189 con valores de 0.225, 0.387 y 0.171 respectivamente (Figura 31).

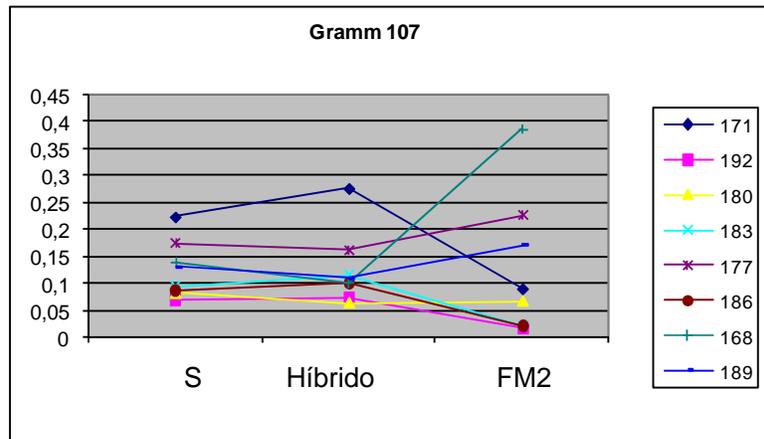


Figura 31. Frecuencias alélicas para el locus Gramm 107, donde se muestra la frecuencia obtenida para cada población.

#### 6.4. Uso de hábitat (microhábitat)

Se estimó un área de 1m<sup>2</sup> para determinar el tipo de microhábitat más utilizado por las lagartijas en cada población analizada y los microhábitats más cercanos, quedando una asociación en orden de abundancia de la siguiente manera:

1. Microhábitats asociados para el poblado de San José, en orden de abundancia: bardas, llantas, tabiques, rocas, arbustos troncos, magueyes, cercas de madera.
2. Microhábitats asociados para el poblado de El Casco, en orden de abundancia: magueyes, nopales, ramas secas, troncos, arbustos y tabiques.

3. Microhábitats asociados para el poblado de Santa Clara en orden de abundancia: magueyes, nopales, cercas de madera, tabique, arbustos, ramas secas y bardas.

## 7. DISCUSIONES

### 7.1. Análisis morfológico

#### Establecimiento de morfo-citotipos en una clina ambiental

Desde la propuesta de clinas ambientales en diversos modelos ecológicos como una herramienta para explicar el análisis de los polimorfismos de las poblaciones naturales y la teoría evolutiva (Huxley, 1939), se han descrito diversos sistemas biológicos donde se asocian diferencias fenotípicas con variaciones ecogeográficas, como una respuesta adaptativa a ambientes locales por parte de los individuos (Salomon, 2002). Sin embargo, son pocos los casos donde es posible documentar la existencia de gradientes fenotípicos y genéticos como respuesta al cambio ambiental.

Se ha argumentado previamente la existencia de morfos específicos a gradientes ambientales en diversos modelos animales (Seehausen, 2004), ya sea como producto de dos especies simpátricas (Rieseberg *et al.*, 1999 b) o por especies que tienen un contacto secundario (Chiba, 2005). Para el caso particular de la zona híbrida de *Sceloporus grammicus* motivo de este estudio (S X FM2), fue posible encontrar diferencias morfológicas significativas en las tres localidades analizadas, lo que supone a su vez, morfotipos distintivos entre los dos citotipos paternos y los híbridos formados. Aunque los cariotipos no revelaron ningún individuo híbrido de primera generación (F<sub>1</sub>), solamente un cariotipo poliploide que se supone pertenezca a un individuo híbrido, probablemente porque existe una selección muy fuerte contra los genotipos híbridos, considerando que están hibridando los extremos del gradiente cromosómico (raza S=32 cromosomas *versus* raza FM2=48 cromosomas).

Estos morfotipos documentados para zonas híbridas, sugieren que el proceso de hibridación está asociado a su vez a un gradiente ambiental específico (Seehausen, 2004). En el caso de *S. grammicus*, se ha documentado previamente la influencia del microhábitat y los hábitos alimenticios a variaciones morfológicas específicas, considerando básicamente

caracteres asociados a la reproducción y que permiten verificar el dimorfismo sexual, para el citotipo FM2 (Leyte-Manrique, 2006). De igual manera, en otros modelos híbridos, tanto animales como vegetales, se ha documentado el proceso de *segregación transgresiva*, que se refiere a la producción de fenotipos extremos dentro de una zona híbrida, lo que permite un establecimiento exitoso de híbridos fértiles en regiones bien delimitadas a lo largo de una clina ambiental, como un mecanismo adaptativo a la selección diferencial que se efectúa sobre los genotipos híbridos y que promueve la divergencia evolutiva potencial de los genotipos paternos, generalmente promovida por las diferencias ecológicas dentro de cada taxón diferenciado (Rieseberg *et al.*, 1999).

Aunque el modelo de hibridación que se describe en este estudio se corresponde al establecimiento de una “zona de tensión”, donde existen pocos híbridos, limitados a las regiones de contacto entre ambos citotipos (Leaché y Cole, 2007), cuando se considera la variación altitudinal y los microhábitats encontrados en cada localidad, es posible verificar la existencia de un gradiente clinal que está condicionando la distribución de los citotipos y sus híbridos: raza S en altitud extrema, zona híbrida en altitud intermedia y raza FM2 en altitud más baja. Además, se observaron también preferencias particulares de microhábitat para cada grupo genético (S, FM2 e híbridos), lo que refuerza la propuesta de un modelo híbrido mantenido por condiciones ecogeográficas específicas para cada grupo genético analizado.

Con el análisis morfométrico del fenotipo, se encontraron patrones de variación significativos entre taxón, tal vez como evidencia de diferenciación fenotípica promovida por la clina ambiental y una posible adaptación a escala local (microhábitats). Este tipo de diferencias morfológicas ya se han documentado con anterioridad para otras poblaciones de *Sceloporus grammicus* (Hernández 2006, Torres 2006, Leyte, 2006).

Se evidenciaron diferencias fenotípicas importantes que se relacionan con la explotación del hábitat (Rubio- Pérez, 2005), como: la longitud de los dedos, el ancho del cuerpo, la longitud de la cola, el largo del cráneo y la longitud total del cuerpo. Lo anterior muestra que la forma del cuerpo cambia significativamente en cada una de las localidades y para cada grupo genético

documentado, lo que permite proponer entonces tres morfocitotipos para cada localidad y la correspondiente raza cromosómica asociada:

1. **Raza S.** forma del cuerpo: generalmente alargado, con LHC y LTC mayor (es la talla promedio más grande dentro de las tres poblaciones analizadas), presenta extremidades anteriores y dedos más largos y un cráneo más ancho. Se localiza a una altitud de 2,530 metros y con microhábitats preferentes de: bardas, llantas, tabiques, rocas, arbustos troncos, magueyes, cercas de madera.
2. **Raza FM2.** forma del cuerpo: generalmente pequeño, con LHC, LTC y L4DPP menor (es la talla promedio más pequeña dentro de los grupos analizados), aunque con una mayor altura y un mayor ancho promedio dorsotransversal del cuerpo. Se localiza a una altitud de 2,480 metros y con microhábitats preferentes de: magueyes, nopales, ramas secas, troncos, arbustos y tabiques.
3. **Zona híbrida.** forma del cuerpo: diferente de las dos poblaciones paternas, con una forma general similar al citotipo S aunque la talla promedio es más pequeña, significativamente mayor con respecto de la raza FM2; a pesar que la forma general es del tipo S, la longitud y forma de las extremidades es más parecida al fenotipo FM2. Se localiza a una altitud de 2,490 metros y con microhábitats preferentes de: magueyes, nopales, cercas de madera, tabique, arbustos, ramas secas y bardas.

Este tipo de distribución clinal ya se ha reportado previamente en reptiles que presentan modelos de especiación estasipátrica (Salomon, 2002) y que forman zonas híbridas en ecotonos que separan hábitats distintos o en poblaciones fragmentadas con contacto secundario, como un “efecto de borde” que, generalmente, indica perturbación o cambios significativos con respecto al ambiente original (Lambrot, 2002). Para el caso de *Sceloporus grammicus*, estos escenarios promueven probablemente una mayor coincidencia espacial entre las distintas razas, potenciando la formación de híbridos asociados a estas “fronteras transicionales” entre regiones ecológicas diferentes.

Las consecuencias evolutivas de este tipo de zonas híbridas son: el surgimiento potencial de nuevas razas cromosómicas, pues los híbridos de primera ( $F_1$ ) y segunda ( $F_2$ ; retrocruzas) generaciones son poco estables y más susceptibles a sufrir fusiones o fisiones pericéntricas en sus cromosomas; los

híbridos se consideran también como “puentes genéticos” que promueven una mayor diversidad genética, lo que implica un incremento en la diversidad de caracteres adaptativos heredables y un potencial mayor de colonización de nuevos hábitats, documentado para especies de amplia distribución (Lambrot, 2003); además, es posible documentar *ecomorfos*, asociados a regiones estables y bien diferenciadas a lo largo del gradiente clinal que, en ocasiones, es una evidencia de especiación adaptativa incipiente para complejos de especies, documentados algunos de ellos para el género *Sceloporus* (Leaché y Cole, 2007).

Así, la hibridación origina en este caso, el establecimiento de morfos específicos, asociados a condiciones ecogeográficas particulares para los dos citotipos (FM2 y S) y los híbridos resultantes, como una estrategia para colonizar ecotonos a través de los híbridos, lo que promueve eventualmente la diversificación ecológica y los mecanismos de radiación adaptativa que se han descrito en un contexto ecológico para el complejo *S. grammicus* (Sites, 1982; Rubio-Pérez, 2005).

## **7.2. Análisis de la zona híbrida**

Por lo general, los híbridos son estériles porque los cromosomas no han conservado homología suficiente para generar un arreglo cromosómico estable en la F<sub>1</sub> híbrida, sin embargo, pueden generarse genotipos poliploides, aunque éstos son casos raros y poco reportados, pero posibles (Hewitt, 2003). En este caso, la poliploidía puede considerarse como una estrategia de balance entre la disparidad cromosómica de ambas razas, así como la posibilidad de obtener individuos F<sub>1</sub> viables que, tal vez, sean menos exitosos que sus padres, pero fértiles y capaces de reproducirse, generando a su vez híbridos de segunda generación en F<sub>2</sub>, los cuales servirán como interfase para la introgresión de genes hacia los reservorios genéticos de los taxa puros (Mettler y Gregg, 1982).

En una escala de tiempo donde los híbridos tienden a la fertilidad parcial con respecto de las razas progenitoras, estos funcionan como un caudal para que genes o alelos específicos se intercambien de una a otra raza (Coyne y Orr, 1997). En casi todas las condiciones, los híbridos se encuentran menos

adaptados al medio que cualquiera de las razas paternas. Por lo tanto, aunque sean fértiles, la selección actúa en su contra, no logran hacerse comunes (Grant, 1963) por lo que probablemente encontrar un cariotipo intermedio es más difícil y raramente se les observa, como en este estudio.

Así, los híbridos, siendo relativamente raros tienen más probabilidad de cruzarse con una de las razas paternas que con otro híbrido, por lo que es más factible encontrar cariotipos que tienden a las razas paternas, produciendo descendientes donde, en promedio, tres cuartas partes de su complemento cromosómico pertenecen a una raza y una cuarta parte a la otra y el nuevo cruzamiento de una retrocruza con un paterno producen una marcada direccionalidad a los taxa originales, por eso es más común encontrar cariotipos que tienden a las razas paternas (Barton, 2001); esto potencia un pequeño flujo genético y, de este modo los morfotipos se mantendrán diferentes (hibridación introgresiva; Anderson, 1949).

Cuando se analizan zonas híbridas dentro de gradientes ecogeográficos, en la mayoría de estas áreas se genera un amplio rango de genotipos sobre los que pueden actuar mecanismos selectivos que contrarrestan el flujo genético y mantienen a las poblaciones diferenciadas a pesar de la hibridación (Wytténbach *et al.*, 1999).

### ***Diversidad genética de los citotipos analizados***

Se encontraron niveles elevados de polimorfismo en las tres poblaciones analizadas (FM2, S e híbridos) y un número importante de alelos en todas ellas. En las poblaciones de San José y El Casco es donde se encontraron alelos exclusivos, lo que coincide con la distribución de los individuos puros para ambos citotipos (FM2 en San José y S en El Casco). Esto permite corroborar que, a pesar de la amplia distribución reportada para el complejo, así como la gran variedad de hábitats que pueden colonizar, se mantienen niveles elevados de diversidad genética debido al flujo genético intra e intercitotípico, este último generado mediante hibridación.

Sin embargo, es posible verificar que en cada raza cromosómica se mantienen frecuencias diferenciales de los alelos analizados y que, para cuatro de los seis marcadores analizados, se mantienen frecuencias específicas para seis alelos exclusivos, lo que permite suponer que la hibridación que ocurre

entre ambos citotipos es reciente y limitada quizá a los alelos fijados (con mayor frecuencia) dentro de las poblaciones. Además, la existencia de morfos específicos dentro de la clina ambiental, permite suponer también que existen procesos de selección diferencial, posiblemente asociados a un ecotono, para cada uno de los grupos genéticos, lo que permite que, tanto su morfología como su genética, estén delimitados por las condiciones ambientales específicas, como se ha reportado para otros modelos similares (Costedoat *et al.*, 2007).

Para el caso de los individuos híbridos (Santa Clara), es evidente que comparten alelos de ambas especies paternas, sin embargo, las frecuencias para la mayor parte de los alelos compartidos presentan mayor afinidad con las frecuencias alélicas del citotipo FM2, como un indicador de flujo genético retrógrado preferencial entre los híbridos y dicho citotipo. En otros estudios (Gehring y Delph, 1999; Costedoat *et al.*, 2007; Mebert, 2008), se han reportado modelos con este tipo de hibridación preferencial hacia alguno de los taxa paternos, como un mecanismo para “enriquecerse” con genes nuevos y/o como una estrategia de colonización de nuevos hábitats a través de los híbridos (con nuevos juegos genéticos), quienes mantienen una homología preferencial de genes hacia el grupo más afín, considerando que los individuos producto de retrocruzas (híbridos F<sub>2</sub>) son más estables genéticamente.

Uno de los indicadores de variación que se utiliza como parámetro básico de la diversidad genética en una población es la riqueza alélica y la heterocigosidad; la población de híbridos (Santa Clara), fue la que presentó una mayor riqueza de alelos y niveles más elevados de heterocigosidad, aunque con valores cercanos a las poblaciones paternas. Es importante destacar que existe una heterocigosidad mayor a la esperada, tal vez como consecuencia de un efecto de muestreo; es decir, considerando que los heterocigotos son los individuos más frecuentes en una población, es posible que se haya muestreado un mayor número de ellos, por probabilidad; no obstante, el exceso de heterocigotos es proporcional en todas las poblaciones, por lo que no se considera un factor que pueda alterar otros resultados.

En este sentido, otros autores (Salomón, 2002; Hewitt, 2003; Mebert, 2008) señalan que el exceso de heterocigotos dentro de las poblaciones híbridas es una consecuencia de las cruces entre genomas heterólogos y una

tendencia natural de los híbridos de buscar estabilidad cromosómica y “regresarse” hacia alguno de los genotipos paternos, por lo que esto también explicaría la mayor abundancia de híbridos de segunda generación (retrocruzas) en el modelo analizado.

### **7.3. Estructura genética, diversidad y riqueza alélicas**

Hasta el momento los trabajos de variación interpoblacional que se han realizado para *Sceloporus grammicus* solo se confinan a analizar características cromosómicas, fenotípicas o conductuales (Leyte, 2006, Hernández-Ramos, 2005, Hernández-Salinas, 2007, Goyenechea, 1993). Las características fenotípicas juegan un papel importante en la estructura genética poblacional de las especies, siendo resultado de fuerzas selectivas tales como: deriva, flujo genético y selección natural, entre otras (Lawson y King, 1995).

Por otra parte, los hábitos reproductivos, la movilidad, la territorialidad, etc.; también determinan en parte la estructura genética poblacional. Al igual que otros factores, éstos pueden actuar solos o en conjunto y, por ello, resultaría un tanto difícil determinar cuál es el más importante. Sin embargo, la aproximación genética descrita mediante los estadísticos de Fisher-Wright ha resultado una aproximación válida para determinar las relaciones genéticas intra e interpoblacionales en grupos biológicos diversos (Salomon, 2002).

Se encontró una diferenciación genética escasa en los tres grupos analizados, lo que sugiere niveles elevados de flujo genético. Sin embargo, los tres grupos presentan niveles moderados de consanguinidad, lo que sugiere apareamientos preferenciales entre individuos afines. Esto permite mantener las singularidades genéticas y morfológicas reportadas para cada taxón, así como la existencia de alelos exclusivos, probablemente por efectos diferenciales de los ambientes locales en cada uno de ellos, como se ha reportado para otros modelos animales de zonas híbridas (Gehring y Delph, 1999; Costedoat *et al.*, 2007; Mebert, 2008).

Cuando se verifica el efecto de la deriva genética, es posible determinar que ésta no tiene un efecto significativo en ninguna de las tres poblaciones y que, por el contrario, el flujo genético es la fuerza evolutiva que permite homogenizar en gran medida las características genéticas de los tres grupos

analizados, aunque probablemente con intercambios diferenciales de genotipos o alelos específicos.

Considerando las relaciones de afinidad genética, se evidencia un flujo genético preferencial entre la población de San José (citotipo S) y Santa Clara (zona híbrida), esto probablemente porque son poblaciones simpátricas, lo que no ocurre con la población de El Casco, que permanece aislada de las otras por campos de cultivo y los individuos parecen desplazarse por caminos específicos (vías del tren y posiblemente por la milpa en época de temporal), lo que restringe de forma importante el intercambio genético con las otras dos. La distribución geográfica y las barreras físicas existentes ya se han reportado previamente como limitantes para los fenómenos de hibridación (Hewitt, 2003; Gehring y Delph, 1999; Costedoat *et al.*, 2007; Mebert, 2008) y como condicionantes de la estructura y flujo genético específicos dentro de la zona híbrida.

A pesar de que el flujo genético es muy elevado entre las tres poblaciones, es posible que no sea un fenómeno homogéneo para todos los individuos disponibles en cada población; considerando que *Sceloporus grammicus* se caracteriza por colonizar microhábitats específicos cuando hay abundancia de recursos en los mismos (Rubio-Pérez, 2005), es de suponer que solamente se intercambiarán migrantes en los límites de cada población y/o cuando alguna comunidad determinada de individuos no consigue recursos suficientes y se desplaza entonces a lugares cercanos. Esto se verifica con los índices de flujo genético que indican que el intercambio establecido va de San José a Santa Clara y de ésta al Casco. Es decir, existe una “ruta” de intercambio genético que está determinada por la distribución espacial de las poblaciones, la preferencia de retrocruzas hacia el citotipo S y el tipo y frecuencia relativa de los alelos compartidos entre los tres grupos genéticos analizados.

El análisis de varianza molecular indica que la mayor variación genética es entre los individuos, más que entre cada población, probablemente porque la colonización de microhábitats distintos (se encontraron al menos nueve microhábitats en cada población) implica que la distribución de los mismos más bien es en parches que corresponden a un microhábitat particular, lo que promueve la existencia de comunidades pequeñas con diferenciación local en

cada parche, esto implica entonces una diferenciación importante entre cada grupo de individuos dentro de la población total.

Este fenómeno se ha descrito previamente en modelos animales y vegetales (Gehring y Delph, 1999; Costedoat *et al.*, 2007; Mebert, 2008), generalmente asociado a procesos de fragmentación, dispersión radial o establecimiento en parches, como una evidencia más del efecto determinante del ambiente en la disposición genética de las poblaciones con zonas híbridas asociadas. Así, los datos de diversidad genética permiten comprobar que no existen entonces poblaciones únicas, sino más bien sistemas de subpoblaciones pequeñas para cada taxón analizado, donde las diferencias genéticas más importantes se dan entre los individuos de cada subpoblación o parche.

Esto se confirma también en los Análisis Moleculares de la Varianza (en los tres modelos analizados): por diferencias dentro y entre poblaciones, diferencias entre individuos y locus por locus. Para las dos primeras se agrupa la mayor variación dentro de las muestras, es decir, entre individuos. Esto implica que los individuos presentan una variación genética muy grande al interior de las tres poblaciones y que esta variación es mayor que la que presentan los diferentes grupos entre sí. Para el caso de los distintos loci utilizados en el análisis, los más informativos para las poblaciones y los individuos fueron los loci Scel 571 y Gramm 107, aunque los demás presentan información significativa para la variación total de los tres grupos genéticos analizados; al ser marcadores altamente polimórficos, son capaces de detectar diferencias genéticas precisas entre individuos y entre las poblaciones analizadas.

Los valores obtenidos en este estudio muestran que las poblaciones de *Sceloporus grammicus* tienen una alta variabilidad. Hedrick (2000) menciona que los patrones de variación genética entre poblaciones, así como, sus similitudes; pueden ser el resultado de diversos factores, por ejemplo; 1) separación interpoblacional reciente, con la posibilidad de ser una sola población genética; 2) un alto flujo génico interpoblacional; 3) poblaciones muy grandes con baja deriva génica; y 4) presiones similares afectando loci similares en ambas poblaciones. De la misma manera, la diferenciación genética interpoblacional puede deberse a: 1) poblaciones aisladas por tiempo

relativamente largo; 2) ausencia o bajo flujo génico interpoblacional; 3) presiones selectivas diferentes en ambas poblaciones.

### **7.3.1. Dinámica del flujo genético**

Para diagnosticar la existencia de un taxón híbrido como tal, es necesario considerar los patrones de flujo genético dentro de las especies involucradas, así como la dirección del mismo y el porcentaje de alelos compartidos en cada una de las especies o grupos involucrados en el proceso (Borge *et al.*, 2005). Para este estudio y con base en los resultados obtenidos, se define la existencia de un complejo híbrido entre las tres poblaciones, considerando las razas S y FM2 como paternas y al poblado de Santa Clara como híbrido, con evidencia de retrocruzas e introgresión importante hacia los citotipos paternos.

La raza paterna con mayor evidencia de alelos introgresados (alelos de la otra especie, adquiridos a través de los híbridos) es la S (Figura 16) probablemente porque es la más cercana y la que mantiene una mayor interacción con la población híbrida (Santa Clara). Las introgresiones observadas en FM2, probablemente se adquieren a través de híbridos de primera generación ( $F_1$ ). Para el caso del taxón híbrido, sólo se identificaron tres híbridos de primera generación en el análisis alélico (con 40-60% de alelos de ambas especies paternas) y la mayor parte de los híbridos fueron retrocruzas ( $F_2$ ; 60-80% de alelos de alguna de las especies paternas); la dirección de estas retrocruzas es hacia la raza S con un promedio de 9.43 mientras que para FM2 fue de 1.89.

Los resultados obtenidos concuerdan con los intervalos de distribución reportados para las dos razas, puesto que para que haya formación de híbridos es necesario que las razas paternas coincidan durante la época reproductiva, mientras que para la existencia de las retrocruzas es necesario que los híbridos formados en la primera generación permanezcan en contacto con la especie paterna hacia la cual se realiza dicha retrocruza (Perfectti, 2002).

Se evidencia también que este proceso de hibridación e introgresión alélica es un proceso relativamente joven, lo que ha permitido una diferenciación poco progresiva (incipiente) de los dos taxa analizados. Las condiciones de simpatria y los altos niveles de flujo genético, así como la existencia de híbridos poco adaptados, permiten intercambio genético entre las

poblaciones, pero solamente hacia grupos específicos de alelos, manteniendo alelos exclusivos en los taxa paternos. Esto implica, muy probablemente, que aunque hay flujo genético a través de los híbridos, la clina ambiental (Salomon, 2002), la distribución preferencial de microhábitats y posiblemente el apareamiento preferencial entre morfotipos similares, promueve diferenciación genética y morfológica suficiente para que se mantengan diferencias significativas entre los citotipos paternos y los híbridos formados.

### **7.3.2. Relaciones Alélicas Ancestrales y Actuales**

Es importante considerar la dinámica de genes ancestrales y actuales cuando se analiza el establecimiento de hibridación/introgresión entre especies simpátricas. Se ha descrito la importancia de verificar si las frecuencias y tipos de alelos ancestrales se han mantenido o presentan cambios relevantes en las poblaciones actuales (Delgado, 2002).

Para el caso de las zonas híbridas, un patrón clásico es que, para determinar el éxito y/o mantenimiento de individuos híbridos viables es importante que sus frecuencias alélicas se mantengan constantes y que presenten, en su mayoría, los mismos alelos que los encontrados en las especies paternas. En este caso, para los seis microsatélites analizados, se conservan frecuencias muy distintas para cada uno de los alelos, esto corrobora la gran sensibilidad de estos marcadores y la consistencia del complejo híbrido como tal.

Es decir, la existencia de un taxón híbrido que actúa como puente entre los dos citotipos paternos, es una consecuencia de las relaciones evolutivas y ecológicas de ambos y ha permitido, además, una selección negativa de los individuos híbridos, los cuales presentan baja estabilidad y adaptación. Mebert (2008), sugiere que este comportamiento permite definir a las zonas híbridas y poblaciones paternas en simpatría, que además dependen de un gradiente ambiental, como un complejo genético, condicionado por el flujo horizontal de genes, las condiciones ambientales locales y los gradientes de selección asociados, que permiten una evolución coordinada de dicho complejo.

Para el caso de las proporciones alélicas para cada microsatélite utilizado se observa, en los seis loci, que las frecuencias de alelos para la población de

San José y Santa Clara son muy similares, lo que indica una interacción actual, mientras que El Casco, aunque presenta los mismos alelos, tiene frecuencias distintas como producto de una mayor diferenciación con respecto a las otras dos, probablemente por una separación más antigua con respecto del conglomerado original. Sin embargo, la similitud genética entre San José y Santa Clara es significativa, apoyando la función de los híbridos como puentes genéticos y la proporción alélica muestra una afinidad moderada de los híbridos con la población de San José, como evidencia de introgresión bidireccional.

Aunque resulta complejo delimitar las relaciones entre el ambiente, el fenotipo y los genes de diversos taxa, estudios como este permiten establecer, de primera instancia, evidencias de procesos de diferenciación y selección asociados a zonas híbridas dentro de una clina ambiental, no obstante serán necesarios más estudios para obtener explicaciones más precisas sobre la dinámica evolutiva de las mismas, desde un punto de vista morfológico o utilizando otras herramientas moleculares.

## **8. Conclusiones.**

- Existen diferencias morfológicas y citológicas significativas en cada una de las tres localidades analizadas, lo que corresponde probablemente a una distribución clinal de los dos citotipos paternos (S y FM2), con respecto a los híbridos; esto permite definir entonces tres morfocitotipos para el sistema, que se distribuyen de acuerdo a condiciones ecogeográficas específicas.
- Los híbridos se encuentran en una “zona de tensión” que coincide con el ecotono para la distribución de los citotipos puros; el sistema híbrido está asociado a su vez a un gradiente altitudinal local y, probablemente, a la colonización preferencial de microhábitats en cada localidad.
- Los resultados obtenidos para el análisis alélico sugieren un proceso actual de hibridación e introgresión genética entre las dos razas del complejo *Sceloporus grammicus* (S y FM2).
- Las diferencias genéticas y morfológicas observadas se mantienen por los ambientes locales y alta diversidad genética dentro de cada grupo, originada posiblemente por las abundantes fisiones pericéntricas que

son características del complejo de razas cromosómicas, así como por el mantenimiento de genes exclusivos en cada población.

- Los datos morfológicos y moleculares sugieren una mayor afinidad genética entre las poblaciones de San José y Santa Clara, debida a factores tanto ecológicos, de selección de hábitat, abundancia, coincidencia en regiones, lo que ha propiciado un proceso extensivo de hibridación e introgresión de genes, el flujo genético es preferencial hacia el citotipo estándar (S), probablemente por ser el más estable a nivel cromosómico.

## Literatura citada:

- Anderson, E., 1948, Hybridization of the habitat, *Evolution* 2:1-9.
- Anderson E, Stebbins G .1954. Hybridization as an evolutionary stimulus. *Evolution*, 8, 378–388.
- Anderson, E. 1949. Introgressive Hibridization. New York: *Wiley*. 156- 169.
- Andersson, A.C., Narain, Y., Tegelström, H. y Fredga, K. 2004. No apparent reduction of gene flow in a hybrid zone between the west and north European karyotypic groups of the common shrew, *Sorex araneus*. *Molecular Ecology* 13(5): 1205-1215.
- Arévalo E, Porter CA, Gonzales A, Mendoza F, Camarillo JL, Sites JW Jr., 1991. Population Cytogenetics and Evolution of the *Sceloporus grammicus* Complex (Iguanidae) in Central Mexico. *Herpetological Monographs*. 5:79-115.
- Arnold, M. L. y Hodges, S. A. 1995. Are natural Hybrids fit or unfit relative to their parents? *Trends in Ecology and Evolution*, 10: 67-71
- Arnold, M. L. 1997. Natural Hybridization and Evolution. Oxford University Press. New York.
- Barton, N.H. 2001. The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology*. 10: 551-568.
- Barton, N.H., y S. Rouhani, 1991 The probability of fixation of a new karyotype in a continuous population. *Evolution* 45: 499-517.
- Barton, N. H. y Hewitt, G.M. 1981, Hybrid zones and speciation. Evolution and especiation: essays in honour of M. J. D. White (W. R. Atchley y D. S. Woodruff, eds.), Cambridge University Press, Cambridge.

- Barton, N. H. y Hewitt, G.M. 1985 Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16:113-48.
- Baum, D.A. y Shaw, K.L. 1995. Genealogical perspectives on the species problem. En P.C. Hoch y A.G. Stevenson (Eds.): *Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematics*. Pg: 289-303. Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO.
- Bazykin, A. D., 1969, Hypothetical Mechanisms of speciation, *Evolution* 23:685-687.
- Benbouza H. Jaquelim J. M. Baudoin J. P. Mergeai G. 2006. Optimization of a reliable, cheap and sensitive silver staining method to detected SSR markers in polyacrylamide gel. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10 (2) 77-81.
- Bickham, J. W. 1983. Patterns and modes of chromosomal evolution in reptiles. Pp 13-40. In: *Chromosomes in evolution of eukaryotic groups*. Vol. II (Sharma, A. K. and A. Sharma eds.) CRC Press, Florida, USA.
- Borge, T., Lindroos, P. Na' Dvorni'K, C. Syva" Nen, y G.P. Saetre. 2005. Amount of introgression in flycatcher hybrid zones reflects regional differences in pre and post-zygotic barriers to gene Exchange. *Journal Evolutionary Biology* 18: 1416-1424.
- Bornet, B. y M. Branchard. 2001. No anchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plan Molecular Biology Reporter* 19: 209-215.
- Chiappero M.B., Parise C., Marti-Dardo A., Bidau C.J. and Gardenal C.N., 2004. Distribution of genetic variability in populations of two chromosomal races of *Dichroplus pratensis* (Melanoplinae, Acrididae) and their hybrid zone. – *Journal of Evolutionary Biology*, 17(1), 76-82.

- Chiba, Satoshi. 2005. Appearance of morphological novelty in a hybrid zone between two species of land snail. *Evolution* 59 (8): 1712-1720.
- Clarke, B., 1966, The evolution of morph ratio clines, *The American Naturalist* 100:389-402.
- Costedoat, C., Pech, N., Chappaz, R. y Gilles, a. 2007. Novelities in hybrid zones: crossroads between population genomic and ecological approaches. *PlosOne* 4: 1-17.
- Coyne, J.A. y Orr, H.A. 1997. Patterns of speciation revisited. *Evolution* 51: 295-303.
- Degnan P. H. y Arévalo., 2004. Isolation of Microsatellite Loci in *Sceloporus grammicus* (Squamata, Phrynosomatidae). *American Journal of Undergraduate Research*. Vol. 2 No. 4 (2004).
- Delgado, P.V. (2002). Dinámica histórica de la hibridación introgresiva en poblaciones naturales de *Pinus montezumae* Lamb y *P. pseudostrobus* Lind (Pinaceae). Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM. México, D. F.
- Dobzhansky, Th., 1940 Speciation as a stage of evolutionary divergence, the *American Naturalist* 74: 312-321.
- Dobzhansky, T. 1951. Genetics and the Origin of Species. 3rd ed. New York: Columbia University Press.
- Dobzhansky, T. 1970. Genetics of the evolutionary process. Columbia Univ. Press, New York

- Eisen, J. A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. en: Goldstein, D., Schötterer, C. (Eds.). *Microsatellites Evolution and Applications*. Cap. 4, pp.34-48. Oxford University Press, New York.
- Endler, J. A., 1977 *Geographic variation, speciation and clines*, Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Excoffier, LG Laval, y S. Schneider 2005 Arlequin ver. 3.0. *Bioinformática línea evolutiva 1* :47-50.
- Fisher, R. A., 1930, *The genetical theory of natural selection*, Clarendon Press, Oxford.
- Futuyma, D. J. 1998. *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates. USA. 759 pp.
- Gehring, J.L. y Delph, L.F. 1999. Fine-scale genetic structure and clinal variation in *Silene acaulis* despite high gene flow. *Heredity* 82: 628-637.
- González-Astorga, y J. Núñez-Farfán. 2001. Effect of habitat fragmentation on the genetic structure of the narrow endemic *Brongniartia vazquezii*. *Evolutionary Ecology Research*. 3: 861-872.
- Goudet, J. 2002 FSTAT, version 2.9.3.2: A program to estimate and test gene diversities and fixation indices.  
URL: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Goyenechea, I. 1993. Condición citogenética de *Sceloporus grammicus* (Sauria:Phrynosomatidae) en Santuario Mapethé, Estado de Hidalgo, México. Tesis de Licenciatura. UNAM, México. 83 pp.
- Goyenechea, I., F. Mendoza-Quijano., O. Flores-Villela and K. H. Reed. 1996. Extreme chromosomal polytypy in a population of *Sceloporus grammicus* (Sauria: Phrynosomatidae) at Santuario Mapethé, Hidalgo, México. *Journal of Herpetology*. 30 (1): 39-46.

- Goyenechea, I. 2001. Sistemática de reptiles y citogenética. *Boletín de la Sociedad Herpetológica Mexicana*. 9 (1): 13-21.
- Grant, V., 1963, *The Origin of Adaptations*. New York: Columbia University Press.,. Capítulos 2,4 y 12.
- Hall, W. P. 1973. comparative population cytogenetics, speciation and evolution of the iguanid lizards genus *Sceloporus*. Ph. D. Disertation, Harvard Univ., Cambridge, MASS. p 1-173.
- Hall, W. P and R. K. Selander. 1980. Hybridization of cariotipically differentiated population in the *Sceloporus grammicus* complex (Iguanidae) *Evolution*. 27: 226-242
- Harrison, R. G. 1990. Hybrid zones: windows on evolutionary process. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, 7:69-128.
- Harrison R. G, y Bogdanowicz S. M. 1997. Patterns of variation and linkage disequilibrium in a field cricket hybrid zone. *Evolution* 51: 493–505.
- Hernández-Ramos, L. D. 2005. Algunas características reproductivas de la lagartija *Sceloporus grammicus* (Phrynosomatidae) del estado de Hidalgo, Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Hernández-Salinas, U. 2007. Comparación de las características reproductivas entre dos poblaciones de la lagartija vivípara *Sceloporus grammicus* (Sauria: Phrynosomatidae) del estado de Hidalgo, México. Tesis de licenciatura Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Hewitt, G. M., 1988, Hybrid zones-Natural laboratories for evolutionary studies *Trends in Ecology and Evolution* 3:158-167

- Hewitt, G.M. 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*. 10: 537-549.
- Hewitt, G. M. 2003 Ice ages: their impact on species distributions and evolution. In *Evolution on planet Earth* (ed. L. J. Rothschild & A. M. Lister), pp. 339–361. New York: Academic Press.
- Higuchi, R. 1989. DNA from Biopses. *Amplifications*. 2:1-3
- Hunt, W. G. y R. S. Selander, 1973, Bioquimical genetics of hybridization in European house mice, *Heredity* 31:11-34
- Huxley, J. S., 1939, Clines: an auxiliary method in taxonomy, *Bijdr. Dierk*, 27:491-520)
- Jonsson, B. 1993 Latitudinal clines in life-history variables of anandromous Brown trout in Europe. *Journal of Fish Biology*. 43: 1-16.
- Johnson, R. y Kuby, P. 2000, *Elementary Statistics* (8va Ed.), Duxbury Press
- Kent, M., Gill, W.J., Weaver, R.E., Armitage, R.P. 1997. Landscape and plant community boundaries in biogeography. *Progress in Physical Geography* 21: 315–353.
- Key, K. H. L., 1968 The concept of stasipatric speciation, *Systematic Zoology* 17:14-22.
- Kohlmann, B. y D. Shaw, 1991, The effect of a partial barrier on the movement of a hybrid zone, *Evolution*. Vol45, 7:1606-1617
- Krebs, C.J. 1999. *Ecological methodology*. Addison Wesley Longman. Second Edition. 620 pp.

- Lambrot, M., Eaton, Lafayette y A. Carrasco, B. 2003. The Aconcagua River as another barrier to *Liolaemus monticola* (Sauria: Iguanidae) chromosomal races of central Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 76:23-34.
- Lara, A., R. Valverde., O. Rocha y L. Gómez. 2003. Variabilidad y diferenciación genética en cuatro poblaciones de la planta medicinal *Psychotria acuminata* en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 27 (2): 29-42.
- Lara-Gongora, G., 2004. A New Species of *Sceloporus* (Reptilia, Sauria: Phrynosomatidae) of the *grammicus* complex from Chihuahua and Sonora, México. *Bulletin of the Maryland Herpetological Society*, 40:1-45.
- Lawson, R. y King, R. B. 1995. Color pattern variation in lake Erie water snakes; the role of gene flow. *Evolution* 49:885-896.
- Leaché, D., A. and Cole J., C.. 2007. Hybridization between multiple fence lizard lineages in an ecotone: locally discordant variation in mitochondrial DNA, Chromosomes, and morphology. *Molecular Ecology*. 16,1035-1054.
- Levin, D. A. 2002. the Origin, Expansion, and Demise of Plants Species (Oxford Series in Ecology and Evolution). New York: Oxford University Press.
- Leyte, M. Adrian, 2006. Ecología y morfología de *Sceloporus grammicus* en dos ambientes diferentes del Estado de Hidalgo. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- McCune, B y Grace J. B. 2002. Analysis of ecological communities. Editorial MjM Software Desing. USA. 300 pp.
- Manly, B. F. J. 1992. Multivariate Statistical Methods: A primer. London: Capmen and Hall.

- Marshall, J.C., Arevalo, E., Benavides, E., Sites, J. & Sites, J.W. Jr. (2006). Delimiting species: comparing methods for Mendelian characters using lizards of the *Sceloporus grammicus* (Squamata: Phrynosomatidae) complex. *Evolution* 60, 1050–1065.
- Maynard Smith, J. y J. Haig, 1973, the Hitch-hiking effect of a favorable gene *Genetical Research* 23:23-35.
- Mayr, E., 1963, Animal species and evolution, The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Mebert, K. 2008. Good species despite massive hybridization: genetic research on the contact zone between the water snakes *Nerodia sipedon* and *N. fasciata* in the Carolinas, USA. *Molecular Ecology* 17: 1918-1929.
- 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. 245pp.
- Moore, W. 1977. An evaluation of narrow hybrid zone in vertebrates. *Quarterly Review of Biology*. 52:263-77
- Nader, G.B. 1997. Manual de Prácticas de Laboratorio de Genética. universidad Veracruzana; textos universitarios. 49-52.
- Nagaoka, T. y Y. Ogihara. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theory Application Genetic.*, 94: 597-602.
- Odum, E. P. 1982. Ecología. Interamericana, Tercera Edición. México 638 p.

- Perfectti F. 2002. Especiación: modos y mecanismos. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.307-321
- Reed, K. M., I. F. Greembaun., and J. W. Sites Jr. 1995. Cytogenetic analysis of chromosomal intermediates from a hybrid zone between two chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Sauria, Phrynosomatidae). *Evolution*, 49 (1): 37-47.
- Remington, C. L., 1968, Suture zones of hybrid interaction between recently joined biotas, *Evolutionary Biology* 2:321-428.
- Rieseberg, L. H. (2001). Chromosomal rearrangements and speciation. *Ecology and Evolution* 16, 351– 358.
- Rieseberg, L.H., J. Whitton y K. Gardner, 1999 Hybrid zones and the genetic architecture of a barrier to gene flow between two sunflower species. *Genetics* 152: 713-727.
- Rieseberg, L.H., Archer, M.A. y Wayne, R.K. 1999. (b) Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity* 82: 363-372.
- Rubio-Perez, I. 2005. Analisis comparativo de la morfología, historia de vida y uso del hábitat de distintas poblaciones del complejo *Sceloporus grammicus*: Un enfoque filogenetico. Tesis de Maestría. Instituto de Ecología. Universidad Nacional Autonoma de México.
- Salomon, M. 2002, A Revised cline theory that can be used for quantified analyses of evolutionary processes without parapatric speciation. *Journal of Biogeography*. 29, 509-517.
- Seehausen, O. 2004. Hybridization and adaptative radiation. *Trends in Ecology and Evolution* 19 (4): 198-207.

- Selkoe, K.A. & R.J. Toonen. 2006. Microsatellites for Ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9:615-629.
- Schlotterer, C. 2004. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nat. Rev. Genet.*, 5, 63–69.
- Shaw, D. D., A. J. Coates y P. Wilkinson, 1986, Estimating the genetic and chromosomal components of reproductive isolation within and between subspecies of the Grasshopper *Caledia captiva*, *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 28:686-695.
- Shaw, D. D., A. J. Coates y M. L. Arnold, 1988, Complex patterns of chromosomal variation along a latitudinal cline in the grasshopper *Caledia captativa*, *Genome* 30:108-117.
- Sites, J. W., Jr. 1982. Morphological variation within and among three chromosome races of *Sceloporus grammicus* (Sauria: Iguanidae) in the north-central part of its range. *Copeia* (4): 920-941.
- Sites, J. W., Jr. 1983. Chromosome evolution in the iguanid lizard *Sceloporus grammicus*. I. Chromosome polymorphisms. *Evolution* 37(1): 38-53.
- Sites, J. W., Jr., C. A. Porter and P. Thompson. 1987. Genetic structure and chromosomal evolution in the *Sceloporus grammicus* complex. *National Geographic Research* 3(3):343-362.
- Sites, J. W., Jr., J. L. Camarillo, A. Gonzalez, F. Mendoza, L. Javier, M. mancilla y G. Lara-Gongora. 1988. Allozyme variation and genetic divergence within and between three cytotypes of the *Sceloporus grammicus* complex (Sauria: Iguanidae) in central Mexico. *Herpetological*. 44:297-307.

- Sites, J. W., Jr., and S. K. Davis. 1989. Phylogenetic relationships y molecular variability within and among six chromosome races of *Sceloporus grammicus* complex (Sauria: Iguanidae) based on nuclear and mitochondrial markers. *Evolution* 43:296-317.
- Sites, J. W., Jr. 1993. Chromosomal variation in the *Sceloporus grammicus* complex (Sauria, Phrynosomatidae) en: Chromosomes today (Summer, A. T. and A. C. Chandley eds). Chapman and Hall, London. Pp 137-147.
- Sites, J. W., Jr., K. D. Scott., D. W. Hutchison., B. A. Maurer y G. Lara. 1993. Parapatric hybridization between chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae): structure of the Tulancingo transect. *Copeia*: 373-398.
- Statsoft. 1998. STATISTICA for windows. Manual version 6.0 Statsoft. Tulsa Oklahoma USA
- Templeton, A.R. 1989. The meaning of species and speciation: a genetic perspective. En D. Otte y J.A. Endler (Eds.): Speciation and its Consequences. Pg: 3-27. Sinauer, Sunderland, MA.
- White, M. J. D., 1968, Models of speciation, *Science* 158:1065-1070.
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- Wytenbach, A., Narain, Y. y Fredga, K. 1999. Genetic structuring and gene flow in a hybrid zone between two chromosome races of the common shrew (*Sorex araneus*, Insectivora) revealed by microsatellites. *Heredity* 82: 79-88.
- Zamudio, K.M. y A. M. Wieczorek. 2000. Microsatellites for studies in ecology, behaviour and evolution in Yallows spiny lizard (*Sceloporus jarrovi*). *Molecular Ecology*. 9:1667-1669.

## ANEXO A

---

### Técnicas citogenéticas

#### Cariotipo de *Sceloporus*

La obtención del cariotipo de los ejemplares se realizó por medio de la técnica propuesta por Sites (1983) y mencionada por Goyenechea (2001) para saurios, además, se hicieron modificaciones propuestas por Nader (1997).

Estas técnicas consisten en:

1) Inyectar 48 horas antes del sacrificio del organismo una de las extremidades con una solución de levadura-azúcar (0.5 g de cada reactivo en 10 ml de agua caliente), esta desencadenará una infección y por consiguiente se provoca una proliferación celular. Esto se repite a las 24 horas antes del sacrificio. Los organismos permanecen cercanos a una fuente de calor durante ese lapso de tiempo.

2) Dos horas antes del sacrificio, se inyecta en el abdomen una solución de Colchicina al 0.05%, la cual detiene la división celular en metafase.

3) Posteriormente se sacrifica al organismo y se extraen los huesos de las extremidades y se maceran con una solución hipotónica de KCL 0.075 M. Esta suspensión se incuba a temperatura ambiente por espacio de media hora, lo que permite que las células se hinchen. En el caso de ejemplares grandes se recomienda la técnica de Baker *et al.*, (2003) en la cual se lava la medula ósea sin macerar los huesos lo que permite mayor limpieza en la solución obtenida.

4) La solución se fija con una solución Carnoy (metanol-ácido acético 3:1) y se extraen los fragmentos de hueso decantados.

5) Se centrifuga la solución por cinco minutos a 800 rpm. El botón celular se lava con el fijador para eliminar desechos celulares que obstaculizan la observación de los cromosomas. Este procedimiento se repite tres veces más.

6) El paquete celular se resuspende en un pequeño volumen de fijador y se gotea sobre un portaobjetos limpio el cual se seca al aire o flama y se tiñe con Giemsa al 5% (Goyenechea, 2001).

Los macrocromosomas serán ordenados en orden decreciente de acuerdo al tamaño (Sites, 1983; Goyenechea, 1993).

### **Técnicas moleculares**

Extracción de DNA con la técnica propuesta por Higuchi R. (1989) con modificaciones, usando un fragmento de cola (método no invasivo) de los especímenes colectados, para emplearse como molde en el análisis genético.

La técnica consiste en:

1) A partir del fragmento de la cola se corta aproximadamente una fracción de 0.5 cm. se coloca en un mortero previamente estéril, posteriormente se adiciona .7 ml de buffer de digestión, 15 µl de proteinasa K con una concentración final de 0.5 mg/ml y 20 µl de RNAasa.

Buffer de digestión: 50 mM Tris-HCl pH 8.0

100 mM EDTA pH 8.0

100 mM NaCl

1% SDS

2) Después de macerar, se vacía todo el contenido posible en un tubo de 1.5 ml limpio y previamente marcado y se encuba a una temperatura entre 50 y 55 °C durante una hora, mezclándola repetidamente durante este tiempo.

3) Posteriormente se toma la parte superior y se pasa a otro tubo, adicionando 0.7 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) mezclando vigorosamente, se centrifuga a 14,000 rpm durante 5 minutos.

4) Se toma la capa superior de el contenido y se repite el paso anterior hasta obtener una muestra limpia, después se transfiere a otro tubo y se le adiciona 1 ml de etanol y se deja precipitar un minuto posteriormente se centrifuga a 14,000 rpm durante 5 minutos, decantar todo el sobrenadante y repetir el paso pero con etanol al 70%.

5) Se decanta el sobrenadante y se deja secando en una área estéril (campana de flujo).

6) Se resuspende el DNA en buffer TE o agua estéril en cantidades de 100  $\mu$ l a 200  $\mu$ l (obteniendo una concentración aproximada de 20-50  $\mu$ g de DNA).

Para verificar que el DNA fue obtenido se lleva a cabo un proceso de electroforesis en un gel de agarosa al 1.4 X:

Se preparan 288 ml de buffer TBE 0.5 x y se le agregan 3 gr. de agarosa y se disuelve con ayuda de calor.

Después se coloca en el contenedor de la cámara de electroforesis previamente limpia y nivelada, se deja solidificar durante 40 minutos a una hora.

Se llena la cámara con Buffer TBE 0.5 x hasta sobrepasar el nivel del gel.

Posteriormente se toman de los tubos de muestras de DNA 10  $\mu$ l y se depositan en una superficie para mezclarlo con 4  $\mu$ l de amortiguador de carga (*Loading Buffer*, LB), para posteriormente vaciarlos con ayuda de una micropipeta dentro de los pozos del gel de agarosa (procedimiento por cada una de las muestras).

Después se lleva a cabo la corrida electroforética durante 2 horas con un voltaje de 150 y un miliamperaje de 100.

Al término de la corrida electroforética, se lleva a cabo el proceso de tinción con Bromuro de Etidio; después de 20 minutos de tinción se pasa a un recipiente con agua con la finalidad de eliminar los excesos.

Posteriormente se lleva a una cámara de luz ultravioleta se coloca dentro de esta y se le somete a exposición (302 nm) para visualizar el DNA, ya que el Bromuro de Etidio fluoresce con luz UV.

#### Electroforesis y obtención de imágenes

Los productos amplificados se separaron por tamaños en geles de secuenciación en condiciones desnaturizantes de urea y se revelaron los alelos de los microsatélites mediante la técnica de tinción con nitrato de plata (método estándar).

Posteriormente se procedió a escanear los geles para digitalizar la imagen las cuales fueron procesadas con ayuda de procesadores de gráficos.

#### Registro de datos

Una banda es definida como un producto o fragmento amplificado con tamaño particular que puede ser identificado, las bandas fueron identificadas por su peso molecular con respecto del marcador de peso molecular (Sigma®), 20 pares de bases (p.b.) y 100 p.b. en cada gel. Se asumió que cada banda para evaluar los alelos obtenidos como posibles marcadores neutrales de un locus.

Después de editar las imágenes y obtener el peso de las bandas se procedió a vaciar los datos en una matriz de datos que contiene el número de individuo, la población a la que pertenece y el peso molecular de las bandas.

Concentraciones finales por cada reacción de 25 µl:

20.8 mM de Tris-HCl }  
52 mM de KCl } Buffer PCR 10 x  
103.4 µM de cada dNTP  
2 mM de MgCl<sub>2</sub>  
0.25 pmoles de cada primer  
1.5 U de *Taq* DNA polimerasa

Concentraciones de reactivos para Master Stock:

256 µl de ddH<sub>2</sub>O estéril  
500 µl de Buffer 10 x PCR  
10 -7.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 1M  
200 µl dNTP mix 10 mM

Reacciones de PCR para microsatélites:

1 reacción (master mix)  
14 µl de ddH<sub>2</sub>O  
5.1 µl de Master Stock  
2 µl de primer Sentido a 25 µM  
2 µl de primer Antisentido a 25 µM  
*Taq* DNA polimerasa nativa 0.8 U  
2 µl de DNA molde

Cuadro 1.- Condiciones de Amplificación de los microsatélites utilizados

<b>Especie</b>	<b>Locus</b>	<b>Secuencia simple</b>	<b>Numero de Gen Bank</b>
<i>Sceloporus grammicus</i>	Sgramm 101A	(AGG) <sub>2</sub> , AAG,GGC,ACC,(AGG) <sub>3</sub>	AY386346
<i>Sceloporus grammicus</i>	Sgramm 102A	AAC,AAG, (AAC) <sub>3</sub>	AY386347
<i>Sceloporus grammicus</i>	Sgramm 107A	GTT,GTC, (GTT) <sub>4</sub>	AY386350
<i>Sceloporus jarrovii</i>	Scel82	CAGGGTATTCTTGGCACGTT	AF246947
<i>Sceloporus jarrovii</i>	Scel114	TTCCTTGTCTTTGCATTCCC	AF246949
<i>Sceloporus jarrovii</i>	Scel571	CAGAAACACTTCCCAACTGC	AF246955

Información obtenida de Arévalo *et al.* (2004) para *Sceloporus grammicus* y para *S. jarrovii* de Zamudio (2000).

Cuadro 2.-Condiciones de PCR de los diferentes microsatélites analizados en el estudio

<b>Locus</b>	<b>Tem. annealing</b>	<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<b>Motivo</b>	<b>Tamaño de banda</b>
Sgramm 101A	55.0 - 52*	2.0	AGG	135-147
Sgramm 102A	55.0 – 52*	2.0	AAC	138-144
Sgramm 107A	55.0 – 53*	2.0	AAC	267-279
Scel82	59.0	1.0	(CT)12 (CA)26	235-261
Scel114	47.0	1.5	(GT)8(GC)3(GT)2(GC)	209-257
Scel571	59.0	2.0	(TC)13	258-282

Estado	Ciclos	Pasos	Temperatura	Tiempo
1	1	1	94-95	8:00-10:00
2	35	1	92-95	0:30
		2	47-59	0:30
		3	72	0:45
3	1	1	72	4:00-30:00
		2	4	Espera

Temperaturas del termociclador:

## ANEXO B

1.- A continuación se proporcionan las frecuencias alélicas compartidas entre poblaciones, frecuencias alélicas por locus, entre las tres poblaciones.

Frecuencias alélicas de los microsatélites utilizados:

### Locus **Gramm 101**

Cuadro 1.- Alelos presentes en el locus Gramm 101, con los valores que presentan en cada una de las tres poblaciones del estudio.

Alelos	S	Hibrido	FM2
175	0.087	0.094	0.029
181	0.116	0.149	0.027
169	0.267	0.302	0.231
184	0.154	0.163	0.112
172	0.098	0.085	0.077
187	0.117	0.103	0.116
178	0.055	0.026	0.233
190	0.105	0.077	0.176

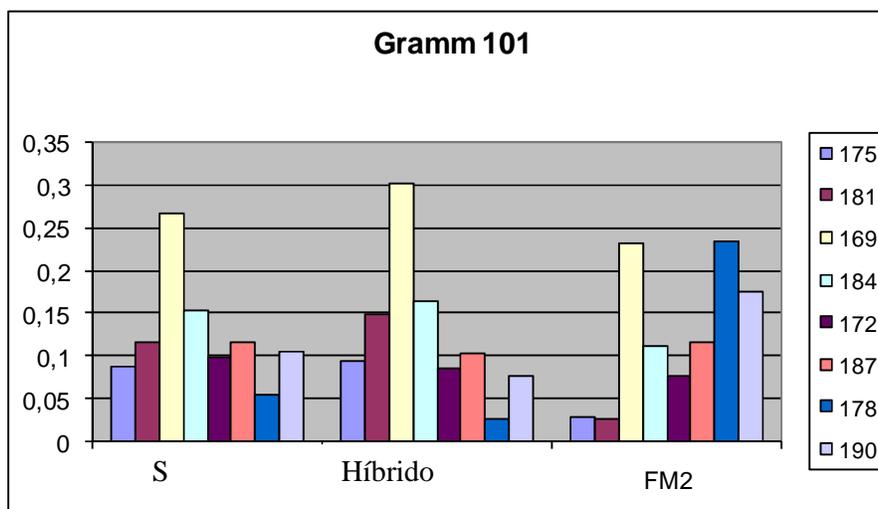


Figura 1.1.- Frecuencias alélicas para el locus Gramm101, donde se muestran las frecuencias obtenidas para cada población

**Locus Gramm 102**

Cuadro 2.- Alelos presentes en el locus Gramm 102, con los valores que presentan en cada una de las tres poblaciones del estudio.

Alelos	S	hibrido	FM2
202	0.122	0.128	0.073
218	0.141	0.152	0.081
194	0.145	0.168	0.072
206	0.055	0.044	0.025
210	0.142	0.181	0.044
222	0.117	0.116	0.093
198	0.137	0.13	0.159
190	0.066	0.038	0.182
214	0.075	0.045	0.271

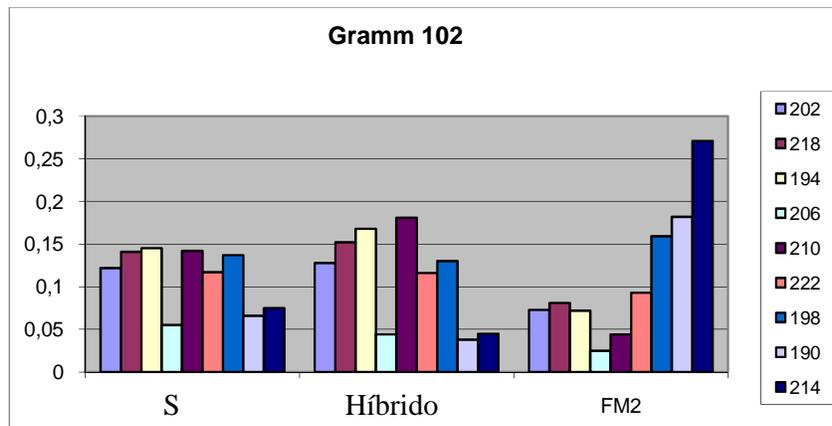


Figura 1.2.- Frecuencias alélicas para el locus Gramm 102, donde se muestran las frecuencias obtenidas para cada población.

### Locus **Scel 571**

Cuadro 3.- Alelos presentes en el locus Scel571, con los valores que presentan en cada una de las tres poblaciones del estudio.

Alelos	S	Hibrido	FM2
210	0.231	0.29	0.09
234	0.102	0.101	0.05
240	0.261	0.286	0.2
222	0.06	0.061	0.016
228	0.08	0.051	0.147
216	0.177	0.141	0.419
246	0.089	0.07	0.078

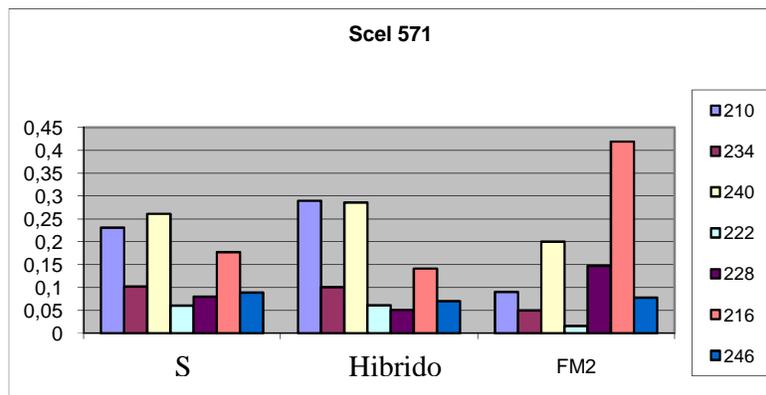


Figura 1.3.- Frecuencias alélicas para el locus Scel 571, donde se muestran las frecuencias obtenidas para cada población.

## Locus **Gramm 104**

Cuadro 4.- Alelos presentes en el locus Gramm 104, con los valores que presentan en cada una de las tres poblaciones del estudio.

Alelos	S	Hibrido	FM2
115	0.249	0.289	0.161
160	0.155	0.129	0.314
155	0.106	0.116	0.042
140	0.09	0.091	0.038
110	0.214	0.202	0.34
145	0.102	0.118	0.033
125	0.045	0.036	0.01
150	0.04	0.018	0.063

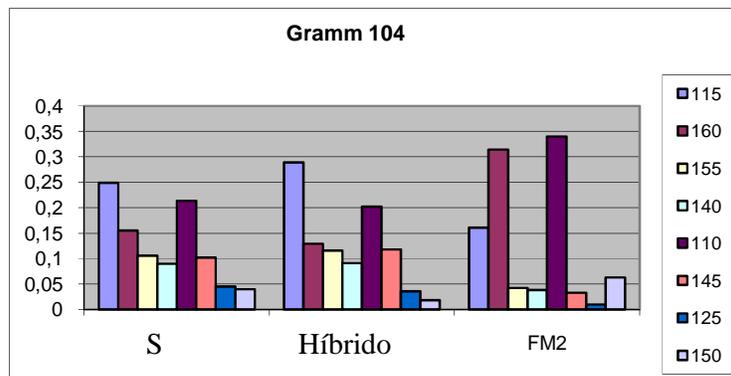


Figura 1.4.- Frecuencias alélicas para el locus Gramm 104, donde se muestran las frecuencias obtenidas para cada población.

**Locus Gramm 106**

Cuadro 5.- Alelos presentes en el locus Gramm 106, con los valores que presentan en cada una de las tres poblaciones del estudio.

Alelos	S	Hibrido	FM2
175	0.26	0.295	0.22
190	0.152	0.155	0.142
150	0.141	0.179	0.045
155	0.211	0.2	0.392
185	0.04	0.035	0.01
195	0.095	0.079	0.105
170	0.032	0.022	0.007
160	0.039	0.018	0.063
180	0.03	0.016	0.017

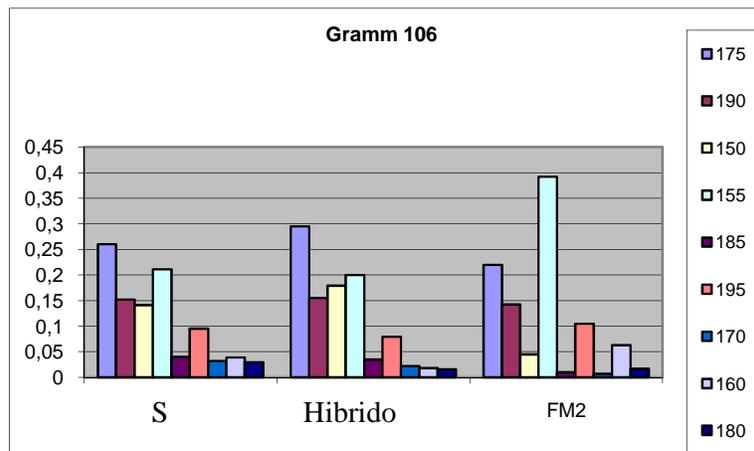


Figura 1.5.- Frecuencias alélicas para el locus Gramm 106, donde se muestran las frecuencias obtenidas para cada población.

### Locus **Gramm 107**

Cuadro 6.- Alelos presentes en el locus Gramm 107, con los valores que presentan en cada una de las tres poblaciones del estudio.

Alelos	S	Hibrido	FM2
171	0.224	0.277	0.09
192	0.069	0.074	0.017
180	0.082	0.064	0.067
183	0.095	0.114	0.022
177	0.174	0.162	0.225
186	0.086	0.1	0.021
168	0.138	0.099	0.387
189	0.132	0.111	0.171

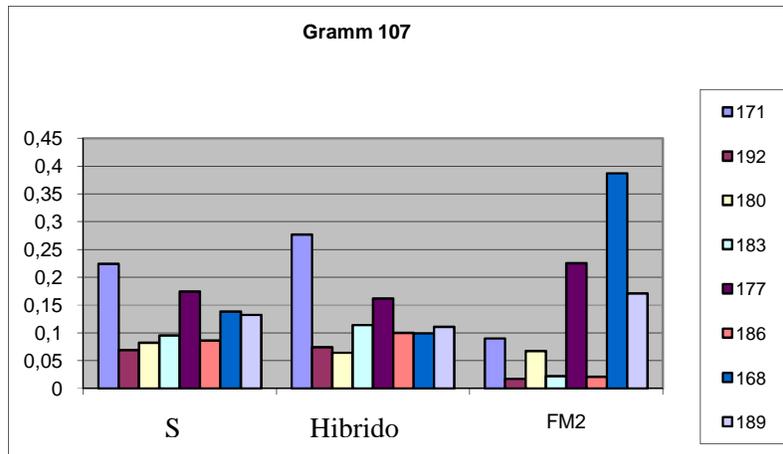


Figura 1.6.- Frecuencias alélicas para el locus Gramm 106, donde se muestran las frecuencias obtenidas para cada población.

2.- Frecuencias de alelos compartidos para cada una de las razas cromosómicas presentes en el trabajo.

**Criterios discriminantes**

COLOR	NOMBRE	% DE LOS ALELOS PATERNALES PRESENTES
	PUROS	> 90% DE ALELOS PARENTALES
	INTROGRESIONES	90-80% DE ALELOS PARENTALES
	RETOROCRUZAS	60-80% DE ALELOS PARENTALES
	HIBRIDOS	60-40% DE CADA ALELO PARENTAL

Inferencia de Ancestría de los individuos usados en el trabajo usando las frecuencias de alelos compartidos para cada una de las razas presentes:

Cuadro 7.- Frecuencias de alelos compartidos en la población de San José

# de individuo	Población		Raza S	Raza FM2
4	1	sanjose	0.98	0.02
13	1	sanjose	0.973	0.027
16	1	sanjose	0.971	0.029
3	1	sanjose	0.979	0.021
20	1	sanjose	0.978	0.022
2	1	sanjose	0.977	0.023
10	1	sanjose	0.977	0.023
1	1	sanjose	0.972	0.028
5	1	sanjose	0.965	0.035
15	1	sanjose	0.959	0.041
14	1	sanjose	0.952	0.048
9	1	sanjose	0.946	0.054
18	1	sanjose	0.92	0.08

11	1	sanjose	0.916	0.084
8	1	sanjose	0.914	0.086
17	1	sanjose	0.908	0.092
19	1	sanjose	0.901	0.099
6	1	sanjose	0.87	0.13
7	1	sanjose	0.862	0.138
12	1	sanjose	0.877	0.123

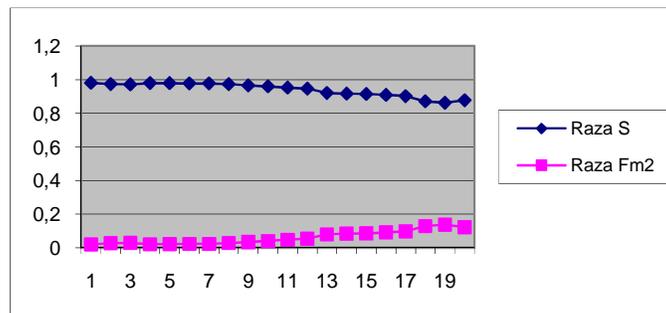


Figura 2.1.- Frecuencias de alelos compartidos de las dos razas cromosómicas (S y FM2), para el poblado de San José. La mayoría presentan mayor tendencia a la Raza S, solo tres presentan un índice menor a 90% (retrocruzas).

Cuadro 8.- Frecuencias de alelos compartidos en la población de El Casco

# de individuo	Población		Raza S	Raza FM2
21	2	casco	0.026	0.974
22	2	casco	0.048	0.952
25	2	casco	0.068	0.932
26	2	casco	0.031	0.969
27	2	casco	0.02	0.98
28	2	casco	0.036	0.964
29	2	casco	0.035	0.965
30	2	casco	0.068	0.932
31	2	casco	0.051	0.949

32	2	casco	0.045	0.955
34	2	casco	0.037	0.963
35	2	casco	0.084	0.916
23	2	casco	0.118	0.882
24	2	casco	0.103	0.897
33	2	casco	0.255	0.745

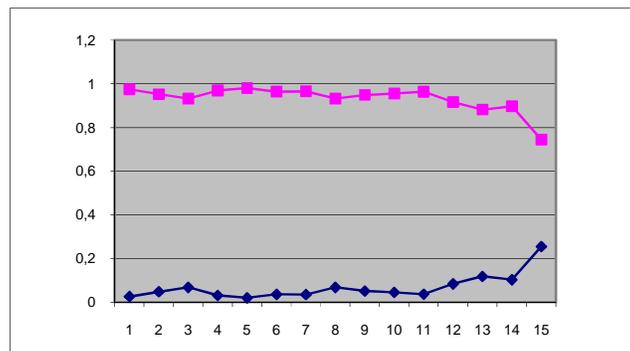


Figura 2.2.- Frecuencias de alelos compartidos de las dos razas cromosomicas (S y FM2), para el poblado de El Casco. La mayoría presentan mayor tendencia a la Raza FM2 (color rosa), solo dos presentan un índice menor a 90% (retrocruzas) y uno es retrocruza.

Cuadro 9.-Frecuencias de alelos compartidos en la población de Santa Clara

# de individuo	Población		Raza S	Raza FM2
42	3	staclara	0.95	0.05
53	3	staclara	0.923	0.077
43	3	staclara	0.873	0.127
37	3	staclara	0.871	0.129
47	3	staclara	0.808	0.192
41	3	staclara	0.804	0.196
36	3	staclara	0.797	0.203
52	3	staclara	0.735	0.265
48	3	staclara	0.651	0.349

49	3	staclara	0.653	0.347
51	3	staclara	0.631	0.369
44	3	staclara	0.586	0.414
50	3	staclara	0.581	0.419
46	3	staclara	0.535	0.465
38	3	staclara	0.171	0.829
39	3	staclara	0.162	0.838
40	3	staclara	0.126	0.874
45	3	staclara	0.093	0.907

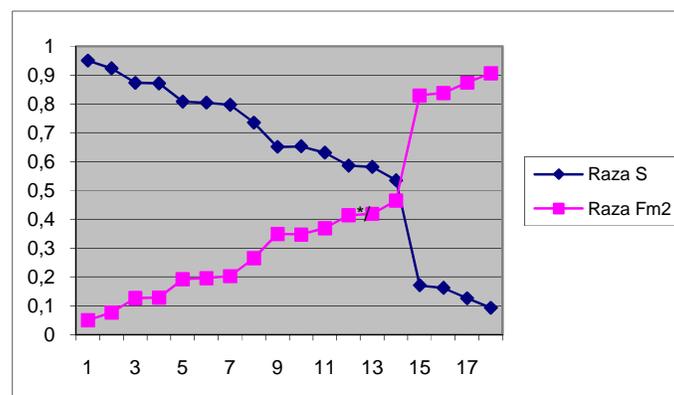


Figura 2.3.- Frecuencias de alelos compartidos de las dos razas cromosomicas (S y FM2), para el poblado de santa Clara. Dos puros para la raza S, uno puro para la raza FM2, cuatro retrocruzas hacia la raza S, tres retrocruzas para la raza FM2, cinco introgrediones hacia la raza S y tres hibridos que tienden ligeramente a la raza S.

3.- Cariotipo desarrollado completo, de la raza S.

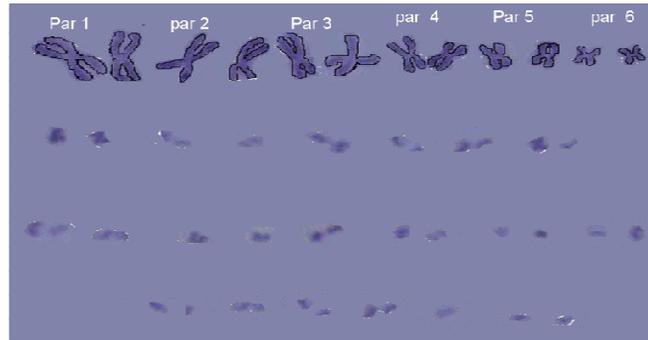


Figura 3.1.- Cariotipo completo de la raza S, de un macho de Santa Clara donde se resaltan los primeros seis pares de cromosomas (macrochromosomas). En esta imagen se parearon los cromosomas por homología y se toman en cuenta los más grandes ya que son los representativos para discriminar entre razas cromosómicas de *Sceloporus grammicus*.

Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA)

Cuadro 1.- AMOVA locus por locus entre las poblaciones. En negrita los porcentajes de los locus con mayor variación entre las poblaciones.

<b>Variación entre Poblaciones</b>				
<b>Locus</b>	<b>g.l.</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Componentes de la Varianza</b>	<b>Porcentaje de variación</b>
Gramm 101	2	127.55	1.54	2.68
Gram m102	2	155.9	0.85	0.77
Scel 571	2	20.26	0.5	<b>0.31</b>
Gramm 104	2	149.64	1.92	0.44
Gramm 106	2	256.52	0.19	0.07
Gramm	2	282.87	3.07	<b>4.69</b>

107				
-----	--	--	--	--

Cuadro 2.- AMOVA locus por locus entre individuos. En negrita el locus con mayor porcentaje de varianza y el locus con menor porcentaje de varianza.

<b>Variación entre individuos</b>				
<b>Locus</b>	<b>g.l.</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Componentes de la Varianza</b>	<b>Porcentaje de variación</b>
Gramm 101	50	482.08	46.33	80.56
Gramm 102	50	2401.69	61.12	55.56
Scel 571	50	1385.1	136.6	<b>83.39</b>
Gramm 104	50	7109.79	295.41	67.8
Gramm 106	50	6086.88	126.04	50.83
Gramm 107	50	1691.7	28.42	<b>43.51</b>