



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología

Análisis genético de *Skiffia bilineata* (Bean 1887)
(Cyprinodontiformes: Goodeidae), una especie
amenazada

T E S I S

Que para obtener el título de Licenciado en Biología
presenta:

Claudia Patricia Ornelas García

Director
Dr. Edmundo Díaz Pardo

Centro Universitario, Diciembre 2004

BIBLIOTECA CENTRAL, U.A.Q.

No. Adq. H69986

No. Título _____

Clas. TS

597

074a

AGRADECIMIENTOS

Agradezco esta tesis a las dos personas que me dieron la vida, a ellos porque siempre me han apoyado y sin su indispensable amor no podría ser lo que soy. También quiero darles las gracias porque más de una vez a lo largo de este camino en la licenciatura, y en mi vida, me brindaron su apoyo y confianza. Gracias papá porque has sido un ejemplo a seguir en los momentos más difíciles, gracias mamá porque son incontables el número de veces que me has motivado a hacer lo que quiero. Le doy gracias a mi hermana por ser la mejor compañía que pude tener después de tres meses de estar lejos de casa y a la cual le agradezco su apoyo a distancia. A Carlos le doy las gracias por estar siempre a mi lado y por el simple hecho de existir.

Agradezco de manera particular a Edmundo y a Alta por compartir conmigo sus conocimientos y por enseñarme un panorama distinto de la ictiología. Aún recuerdo ese proyecto de Sistema I y que desencadeno esta tesis.

Sin duda a Omar Domínguez por su apoyo y a Ignacio Doadrio, a ambos agradezco su oportunidad de trabajar y aprender a su lado. A Nacho le doy las gracias por permitirme trabajar en su laboratorio y en general por todo, a su equipo de trabajo les agradezco todo lo que me han enseñado pero sobre todo por brindarme su amistad y compañía que para mi no tiene precio y en particular a Lourdes, Silvi, Fernando, Gary, Elena, Noelia, Anabel, Annie y a muchos otros del museo que más de una vez me ayudaron y tuvieron la paciencia de explicarme.

A todos muchas gracias.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
JUSTIFICACIÓN	8
HIPÓTESIS	9
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
MÉTODOS	11
RESULTADOS	20
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXO 1	
ANEXO 2	
ANEXO 3	
ANEXO 4	
ANEXO 5	
ANEXO 6	

I. INTRODUCCIÓN

La familia Goodeidae (Cyprinodontiformes: Teleostei), tiene 20 géneros y cerca de 42 especies, se divide en dos subfamilias: Empetrichthyinae y Goodeinae. Empetrichthyinae se distribuye en el sureste de los Estados Unidos de Norteamérica y Goodeinae en el norte de México, extendiéndose al sur hasta las cuencas de los ríos Balsas y Panuco en las pendientes del Pacífico y Atlántico. La subfamilia Goodeinae presenta alrededor de 18 géneros (Alvarez, 1970, Espinosa-Pérez y col. 1993, Doadrio y Domínguez 2004), los cuales se caracterizan por ser vivíparos y endémicos de México. Siendo más diversos y abundantes en la Mesa Central, zona que ha presentado una intensa actividad volcánica y tectónica desde principios del Mioceno (Barbour 1973, Doadrio y Domínguez 2004).

Con respecto a su conservación, la situación actual de la subfamilia Goodeinae es crítica, ya que en su área de distribución, y en particular en el sistema Lerma – Santiago, se presenta un alto grado de degradación ambiental debido a la actividad humana (Soto-Galera 1989, Díaz-Pardo y col. 1993, Soto-Galera y col. 1998, Soto-Galera y col. 1999, López-López y Paulo-Maya 2001). Por lo anterior 11 de sus especies, aparecen listadas en la NOM – 059 – ECOL – 2001 (SEMARNAT, 2002) y entre ellas *Skiffia bilineata* como amenazada.

Actualmente los estudios de genética de poblaciones se han aplicado en el desarrollo de programas de manejo y conservación de especies (Rowe y col. 1999, Farrigon y Austin 2000, Hendrick y col. 2001, Garrigan y col. 2002). Una de las herramientas más utilizadas son los microsatélites, que como marcadores moleculares presentan algunas

Introducción

ventajas ya que son neutros y altamente polimórficos (Rowe y col. 1999, Marshall y col. 1999).

En el presente trabajo se utilizaron dos marcadores moleculares: secuencias del citocromo b (gen mitocondrial) y microsatélites (DNA nuclear), con el fin de llevar a cabo un análisis de diversidad genética entre diferentes poblaciones de *Skiffia bilineata*, que permitió elucidar sus relaciones así como establecer el estado de conservación de la especie y proponer medidas de conservación para la misma.

II. ANTECEDENTES

Los peces de la subfamilia Goodeinae [(sensu Parenti 1981) = Goodeidae (sensu Hubbs y Turner 1939)], se caracterizan por ser vivíparos y endémicos de México (Díaz-Pardo y Ortiz-Jiménez 1986). *Skiffia bilineata* se distribuye en la parte media del sistema Lerma – Santiago (Díaz-Pardo y col. 1993) (Figura 1), siendo una de las cuencas de México más degradadas por la intervención del hombre (Soto-Galera y col. 1999). Algunas de estas perturbaciones son los represamientos, así como por el vertimiento de desechos industriales, agrícolas, ganaderos y urbanos, que han alterado el cauce y las características físico – químicas de la cuenca y la introducción de peces exóticos (Soto-Galera 1989, Soto-Galera y col. 1998, López-López y Díaz-Pardo 1991, Díaz-Pardo y col. 1993, Soto-Galera y col. 1999; López-López y Paulo-Maya 2001), provocando la extirpación de *S. bilineata* de los grandes lagos michoacanos como Cuitzeo, Pátzcuaro y Zirahuén (Díaz-Pardo y col. 1993), y de otros sitios de la misma cuenca, ocasionando que los registros para este taxon hayan disminuido con el tiempo.

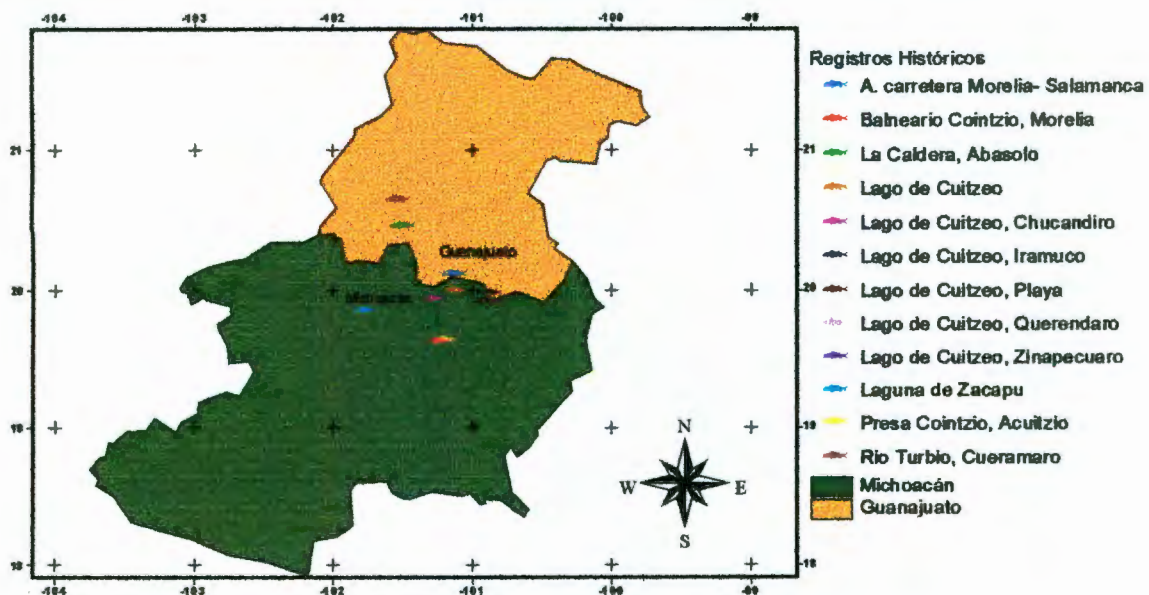


Figura 1. Mapa de distribución histórica de *Skiffia bilineata*.

Antecedentes

Once especies de la subfamilia Goodeinae aparecen listadas en la NOM – 59 – ECOL – 2001. Donde *S. bilineata* fue catalogada con la categoría de amenazada, debido a la restricción en el 40% de su área de distribución, su tolerancia intermedia sus requerimientos estrictos de hábitat y por presentar una baja tasa reproductiva (Díaz-Pardo y Gutiérrez-Hernández 2002).

Actualmente los estudios de diversidad genética de una especie son una representación de la diversidad biológica, la cual depende, entre otras causas, de su historia evolutiva, el nivel de endogamia en la población, el grado de aislamiento reproductivo y la selección natural, ya que estas a su vez modifican el acervo genético de la población (Mejía Guerrero 2000). Es por esto que en diferentes grupos de peces han sido llevados a cabo numerosos trabajos relacionados con el estudio de la diversidad genética a nivel poblacional, al ser considerados valiosas herramientas en la implementación de programas de manejo de las poblaciones (Rowe y col. 1999, Farrigon y Austin 2000, Hendrick y col. 2001, Garrigan y col. 2002). Por lo anterior resulta importante el planteamiento de estudios de este tipo, ya que aportan elementos de relevancia para la evaluación del estado genético de las poblaciones de *S. bilineata* y por lo tanto para el establecimiento de políticas adecuadas para su conservación.

Debido a que *S. bilineata* presenta poblaciones fragmentadas, es importante considerar lo que Turgeon y Bernatchez (2001) mencionan con respecto a que la diferenciación genética (o flujo genético) entre poblaciones puede incrementar o decrecer con las distancias geográficas, si la dispersión es restringida. También mencionan que este

patrón de aislamiento por distancia es explícitamente revelado por una interrelación entre las estimaciones de diferenciación genética y distancias geográficas cuando las poblaciones están en equilibrio bajo deriva génica y de dispersión.

La caracterización de la diversidad genética se evalúa a nivel de alelos, grupo de alelos, (que tienden a variar en conjunto) y a nivel del genoma completo de una especie (Mejía Guerrero 2000). Para el análisis del flujo genético se han utilizado del estadísticos de F de Wright (1965), los cuales son utilizados para estimar las diferencias genéticas entre distintas poblaciones, así como para inferir patrones y niveles de flujo genético dentro de una población. F_{IS} es un coeficiente de endogamia el cual detecta la variación de la heterocigosis en los individuos de una subpoblación causada por la tendencia a que se den cruces entre individuos emparentados. Como consecuencia de la endogamia se produce una reducción en la heterocigosis esperada en cada generación, cuando el parámetro F_{IS} es positivo indica un déficit de heterocigotos. F_{ST} mide la variación de heterocigosis de las subpoblaciones debida a la fijación diferencial de alelos por deriva génica, por lo tanto es un coeficiente de fijación, valores altos de F_{ST} indican que las subpoblaciones presentan frecuencias genéticas muy diferentes, en el caso de que $F_{ST} = 1$ entonces se dice que las subpoblaciones han fijado diferentes alelos, esto es que cada población tiene un único alelo por locus (Hartl y Clark 1989). En los últimos años se ha incrementado el uso de los microsatélites en estudios de genética de poblaciones, sobre otros marcadores moleculares, debido a las ventajas que los primeros representan, ya que son neutros y altamente polimórficos (Marshall y col. 1999, Rowe y col. 1999, Alarcón y col. 2004). Los microsatélites, son marcadores nucleares que se caracterizan por ser repeticiones en tándem de secuencias simples, de di, tri o tetranucleótidos de unidades

Antecedentes

de repetición, donde los polimorfismos se manifiestan como números diferentes de repeticiones, generados por mutaciones y ocasionalmente deleciones (Rowe y col. 1999). Otra de las ventajas que presentan estos marcadores, es que son codominantes, por lo tanto las comparaciones entre poblaciones pueden ser conducidas tanto temporal como espacialmente (Marshall y col. 1999). Además se ha observado que la diversidad genética estimada con estos marcadores moleculares y con el DNA mitocondrial, están positivamente correlacionados con el tamaño poblacional por lo tanto poblaciones pequeñas presentan una variación genética baja (Johnson y col. 2003, Alarcón y col. 2004, Alda y col. 2004).

Los estudios de biología molecular llevados a cabo en la familia Goodeidae han estado principalmente relacionados con la Sistemática. Boto y Doadrio (2003) describieron nueve microsátelites, con los que fue evaluada la diversidad genética en dos especies del género *Zoogonecticus*, sus resultados muestran que *Z. tequila*, extinta en el medio silvestre, presentó una diversidad baja (tres loci polimórficos con dos alelos cada uno), en comparación con la que tiene el congénico *Z. quitzeoensis* (cinco loci polimórficos con una media de 4.6 alelos). Webb y col. (2004) desarrollaron un análisis filogenético de la familia mediante un análisis de aloenzimas y secuencias de DNA mitocondrial, en particular de la subunidad I del gen del citocromo c oxidasa (COI) y la región control, donde con base en el reloj molecular se estableció que en el Mioceno fue un periodo importante de diversificación del grupo, además *S. bilineata* se agrupa en el género *Skiffia* pero separada de las otras dos especies con una consistencia alta en el periodo del Mioceno. Por ultimo, con fines de establecer relaciones filogenéticas, Doadrio y Domínguez (2004) llevaron a cabo la secuenciación total del citocromo b (1,140 pb),

sus resultados muestran que *S. bilineata* debe ser incluida en el grupo Girardinichthyni, pero no en el subclado *Skiffia*, sino que se separa de éste, por lo que proponen se agrupe en el género *Neotoca* concluyen que la interrelación en este grupo no se resuelve adecuadamente, por lo que deben corroborarse estos resultados con el análisis de un mayor número de poblaciones.

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a la degradación que se ha presentado en el hábitat de *S. bilineata* como resultado de las actividades humanas, se ha provocado una disminución y fragmentación de sus poblaciones. Aunado a la falta de conocimiento sobre la variación genética de sus poblaciones, cabe resaltar la importancia y necesidad de la evaluación de la misma, que permita aumentar nuestro conocimiento con respecto a su estado de conservación y a su vez contar con un mayor número de herramientas para el establecimiento de los criterios en programas de manejo y de recuperación de la especie, como parte importante de la conservación de la biodiversidad de México.

IV. HIPÓTESIS

Si el deterioro ambiental de la cuenca Lerma – Chapala ha ocasionado una fragmentación y reducción demográfica de las poblaciones de *S. bilineata*, asociadas con una disminución en su distribución, entonces presentará una diversidad genética intrapoblacional baja e interpoblacional alta.

Objetivos

V. OBJETIVO GENERAL

1. Analizar la diversidad genética dentro y entre las poblaciones de *Skiffia bilineata*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la distribución actual de *Skiffia bilineata*.
2. Obtener la secuencia del gen citocromo b para conocer la relación entre sus poblaciones.
3. Llevar a cabo un estudio de microsatélites que permita evaluar su diversidad genética.
4. Esclarecer el estado de conservación con respecto a la diversidad genética de esta especie.
5. Generar propuestas que contribuyan al establecimiento de políticas de conservación para este taxon.

VI. MÉTODOS

Distribución actual de la especie.

Se buscó en bases de datos de la CONABIO y en las Colecciones del Instituto Politécnico Nacional (IPN) y de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, los sitios que contaban con registros históricos de *Skiffia bilineata*, con el fin de seleccionar los sitios de colecta. Esta revisión permitió determinar que existen registros de 9 sitios en el estado de Michoacán y de 5 en el de Guanajuato (Figura 1). Se efectuaron tres muestreos, el primero en los días 21 y 22 de agosto de 2003, y posteriormente los días 19 y el 29 de marzo de 2004, los peces fueron capturados con el uso de chinchorros de 8 m, 10 m y 30 m, con una apertura de malla de 0.8 para los dos primeros y de 1 cm para el último, así como una red de cuchara. El reconocimiento taxonómico de los ejemplares colectados se llevó a cabo con las claves de Álvarez del Villar 1970 y Weeb 1998. Los organismos fueron preservados en nitrógeno líquido o en etanol al 90% para su traslado al laboratorio (Figura 2). Se utilizó el programa ArcView GIS versión 3.1 para obtener un gráfico de la distribución actual.



Figura 2. A) Río Grande de Morelia en la desembocadura al Lago de Cuitzeo, B) organismos en el termo con nitrógeno líquido.

Métodos

Extracción del DNA.

Una vez en el laboratorio los peces se colocaron en tubos de 2 mL con etanol al 70% y se conservaron a 4 ° C, para su preservación. Previo a la extracción, los tejidos fueron lavados con agua destilada para retirar el etanol. Se utilizaron dos métodos de extracción con los cuales se obtuvo DNA de calidad y cantidad similar.

Aislamiento de DNA

Se utilizó el Kit “Dneasy Tissue QIAGEN” para extraer el DNA de los individuos 4398 y 4399 de la población de Salamanca (Anexo 1). Con una hoja de bisturí se cortaron trozos pequeños de tejido, de aproximadamente 25 mg, que se colocaron en tubos de micro centrifuga de 1.5 ml y se siguió el procedimiento especificado en el Kit.

Aislamiento con Fenol – Cloroformo

Para el resto de los individuos colectados se utilizó el método estándar del fenol – cloroformo de Sambrook y col.(1989). En tubos de 2 ml con el tejido se les agregó 600 µl de CTAB (Anexo 2) y 10 µl de proteinasa K (12 mg/mL) y se dejaron incubando a 55° C con agitación toda una noche. Posteriormente se agregaron 300 µl de Fenol y 300 µl de diclorometano: alcohol isoamílico (24:1 V/V), para mezclar por inversión se colocaron en un rotor (Roto – Torque Modelo 7637 - 10), por 10 min. Se centrifugaron las muestras a 13,200 rpm durante 10 min. Se tomó el sobrenadante y se colocó en tubos de 1.5 ml y se le agregaron 600 µl de diclorometano: alcohol isoamílico (24:1 V/V), se dejó en el rotor durante 10 min. y se centrifugaron a 13,200 rpm durante 10 min. Se tomó el sobrenadante y se pasó a un tubo de 1.5 ml y se le agregó el 10% del volumen final de acetato de sodio (AcNa) 3 M pH 7 y se aforó hasta el tope con etanol a 100%

frío. Se dejó precipitando a -80°C durante 20 min. y se centrifugó a 13,200 rpm durante 10 min. Se quitó el sobrenadante y se le agregaron 200 ml de etanol al 70% frío y se centrifugó a 13,200 rpm por 10 min. Se retiró el sobrenadante con una pipeta y se colocaron en un secador manual (Secador SPD SeedVac ThermoSavant) por 10 min. a 45°C . Se resuspendió en 100 μl de agua MilliQ estéril.

Ensayos de PCR con oligos específicos para el gen citocromo b

Fue amplificado el gen de citocromo b vía reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), para cinco individuos por población (Anexo 1) de la extracción de DNA (Saiki y col. 1988). Los “primers” utilizados para la amplificación fueron los mencionados en Machordom y Doadrio (2001), cuya secuencia es:

H16460 5'-CGAYCTTCGGATTACAAGACC G – 3'

GLUD – GL 5'-TGA CTTGAARAACCA YCGTTG – 3'.

La reacción de amplificación fue llevada a cabo en un volumen final de 25 μl , conteniendo: 1 μl de DNA, Buffer 10 X, MgCl_2 2 mM, dNTP 0.2 mM, Primer GLUDGL 0.2 mM, Primer H16460 0.2 mM, Taq Polimerasa 0.06 U/ μl (Promega) y H_2O para ajustar el volumen final.

Las condiciones de amplificación fueron: una temperatura inicial de 94°C (5 min.), 30 ciclos de 94°C (30 s), 48°C (1 min.) y 72°C (1 min. 30 sec.) y una extensión final a 72°C (10 min.) y 4°C ∞ .

Métodos

Las muestras fueron analizadas en geles de agarosa al 0.8% con TAE 1 X y bromuro de etidio (BrEt) ($2.5 \times 10^{-5} \%$) (Anexo 2), la electroforesis se llevó a cabo a 90 V durante 30 min. Los geles fueron visualizados en un transiluminador de luz UV (Bio – Rad Mini Transiluminador) y analizados con el software “Quantity One” (Sambrook y Russell 2001).

Ligación al vector pGEM – T, para los positivos del gen citocromo b

Se seleccionaron las muestras que presentaron bandas de $\approx 1,100$ pares de bases en los análisis de electroforesis. Estas muestras fueron ligadas al vector pGEM – T. Para llevar a cabo la ligación en principio se precipitó el producto de la PCR y el vector de la siguiente manera: 10 μl del producto de la PCR, 1.6 μl del vector pGEM- T (50 ng/ μl), 8.4 μl H₂O, 2 μl AcNa (3 M pH 7), 60 μl Etanol 100 % frío, se centrifugó 10 min. a 13,200 rpm se tiró el sobrenadante y se agregaron 100 μl de etanol al 70%, se centrifugó durante otros 10 min. a 13,200 rpm se dejó secar al vacío por 10 min. a 45° C. Se resuspendió en 3 μl H₂O estéril, 5 μl Buffer 2 X (Tris – HCl 30 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 1 mM y 5% de polietilenglicol) y 2 μl T4 DNA ligasa (3 U/ μl). La mezcla se dejó incubar toda la noche a 4 ° C.

Transformación de la ligación

Al producto obtenido de la ligación se le adicionó 50 μl de bacterias competentes de la cepa *E. coli* JM 109 (X - Gold) y se colocaron en hielo durante 30 min., posteriormente las células fueron sometidas a un choque térmico a 42° C durante un minuto y después se pasaron a hielo por 1 minuto. A continuación se les añadió 200 μl de medio LB líquido (Anexo 2), MgSO₄ 1 M y MgCl₂ 1 M (1:0.005:0.005) y se dejaron incubando a 37° C por

una hora. Posteriormente se agregaron 20 μ l de X - Gal (20 mg/ml) y JPTG a cada muestra, y se colocaron en placas con medio de LB ampicilina sólido (Anexo 2), se dejaron crecer en una estufa a 37° C toda la noche .

Ensayos PCR de colonias

Para la selección del DNA plasmídico las colonias bacterianas blancas (positivos al marcaje X - Gal), se colocaron en 50 μ l de medio LB ampicilina líquido, se dejaron crecer por 2 horas y se llevó a cabo ensayos PCR de colonias. Se utilizaron las secuencias de los “primers” universales de M13 “forward” y “reverse”, las cuales son las siguientes:

M13 F 5'- GTAAAACGACGGCCAGT - 3'

M13 R 5'- GGAAACAGCTATGACCATG - 3'

La reacción de amplificación fue llevada a cabo en un volumen final de 13 μ l, conteniendo: 1.2 μ l de DNA, Buffer 10 X, MgCl₂ 2 mM, dNTP 0.4 mM, Primer M13 F 0.4 mM, Primer M13 R 0.4 mM, MgCl₂ 1 mM, BSA 10 mg/ml 2%, Taq 0.038 U/ μ l y el resto de H₂O.

Las condiciones de amplificación fueron: una temperatura inicial de 94° C (5 min.), 25 ciclos de 94° C (1 min.), 50° C (1 min.) y 72° C (1 min. 45 sec.) y una extensión final a 72° C (10 min.) y 4° C ∞ .

Métodos

Los productos de la PCR de colonias fueron analizados en geles de agarosa al 0.8% con TAE 1 X y bromuro de etidio (BrEt) ($2.5 \times 10^{-5} \%$) (Anexo 2), la electroforesis se llevó a cabo a 90 V durante 30 min. Los geles fueron visualizados en un transiluminador de luz UV (Bio-Rad Mini Transiluminador) y analizados con el software “Quantity One” (Sambrook y Russell 2001) y se seleccionaron las bandas que tuvieran un tamaño \approx 1,400 pb.

Miniprep

Se obtuvieron cultivos colocando 5 μ l de las colonias originales en 5 mL de medio LB ampicilina líquido, se dejaron incubando a 37° C con agitación constante toda la noche. Al resto de muestra se le agregó una gota de glicerol y se congelaron para su preservación a -20° C. El DNA plasmídico fue aislado por una versión modificada del protocolo miniprep de lisis alcalina del plásmido (Kraft y col. 1988), utilizando el kit SV Minipreps “DNA purification Systems” (Promega).

El DNA fue cuantificado y se ajustó (diluyendo o concentrando la muestra) a una concentración final 100 ng/ μ l con ayuda de un fluorómetro modelo Hoefer DyNA Quant 200. Posteriormente se obtuvo la secuencia usando el kit de ciclos de secuenciación “Big Dye Deoxy Terminator” (Applied Biosystems) que fue proporcionada por el Servicio de Secuenciación Automática de DNA del Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, España. Los cromatogramas y los alineamientos fueron visualmente revisados y verificados, con el programa Chromas versión 1.45.

Ensayos de PCR para cinco microsatélites

El DNA aislado de las cuatro poblaciones fue utilizado como molde para llevar a cabo ensayos de PCR (Saiki y col. 1988), estandarizando las condiciones para cinco microsatélites descritos para el género *Zoogonecticus* por Boto y Doadrio (2003), de los cuales se modificó de la publicación original principalmente las temperaturas de anillamiento (T_m) y la concentración de cloruro de magnesio ($MgCl_2$) (Tabla 1):

Tabla 1. Microsatélites usados para el genotipado.

Locus	T_m °C	Secuencia	Marcaje	$MgCl_2$ mM
ZT2	52	F. GTGCAGGCATGAGTTGTCTC R. GTCTGTGAACACACAGTCAG	FAM	2
ZT6	53	F. GCACCTCCTAATACCTCACA R. AAGCAGCAGTACTGTGAGCT	FAM	1.5
ZT7	50	F. TTGCTATATTGTCAGTCT R. ACTGAAATACTGTTTGTGT	FAM	2
ZT9	52	F. CTGATGGTTTGAATCTATGC R. TGAAGAAGCTGTCTGAGAGG	HEX	2
ZT43	56	F. GCTGTGGTTATGGGTTTATC R. GCAGACATCCCTCAGTATGT	TET	1.5

La reacción de amplificación fue llevada a cabo en un volumen final de 25 μ l, conteniendo: Buffer 10 X, 1.5 – 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 0.2 mM de cada primer, Taq Polimerasa 0.06 U/ μ l (Promega) y 1 μ l de DNA.

Las condiciones de amplificación generales para todos los microsatélites fueron: una temperatura de desnaturalización inicial de 94° C (5 min.), 30 ciclos de 94° C (45 sec.), 50 – 56° C (45 sec.) y 72° C (45 sec.) y una extensión final a 72° C (7 min.).

Las muestras fueron analizadas en geles de agarosa al 1.5% con TAE 1 X y bromuro de etidio (BrEt) (Anexo 2), la electroforesis se llevó a cabo a 90 V durante 30 min. Los geles fueron visualizados en un transiluminador de luz UV (Bio – Rad Mini

Métodos

Transiluminador) y analizados con el software “Quantity One” (Sambrook y Russell 2001).

Análisis de las secuencias

La composición de nucleótidos fue analizada con el PAUP* ver. 4.0b4a (Swofford 1998), para todas las posiciones. Los datos alineados fueron analizados mediante el método de inferencia filogenética de Máximo Likelihood (ML), con el programa PAUP*, usando una búsqueda heurística con la adición de 10 pasos aleatorios y TBR intercambio de ramas con un radio de transversiones (TV), transiciones (Ti) = 6 Tv/Ti, empíricamente determinado. En los análisis de inferencia se utilizó el programa Model test 3.04 (Posada y Crandall 1998), para encontrar el modelo evolutivo que más se ajustara a los datos. El análisis de Bootstrap (200 replicas), se utilizó para conocer la robustez relativa de las ramas del árbol ML, se utilizaron como grupos externos dos especies, una perteneciente a la misma familia, *Girardinichthys multiradiatus*, y la otra perteneciente a la familia Cyprinidae *Algansea sp.*

Análisis de los microsatélites

Los productos de la PCR fueron diluidos en agua estéril como se muestra en la tabla 2 (Anexo 3), y el genotipado fue proporcionado por el Servicio de Secuenciación del Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid, España. Para obtener el genotipado se utilizaron los programas Genotyper 3.6 y GeneScan 3.5.1. Los análisis de equilibrio de Hardy – Weinberg, frecuencias alélicas, homocigotos y heterocigotos observados y esperados, así como el cálculo de los coeficientes de endogamia F_{IS} (estadístico de F de las subpoblaciones inferido a partir de los individuos), el índice de $W \& C = Weir \&$

Cockerham (Weir 1990). El índice de fijación alélica F_{ST} (estadístico de F de la población total inferido a partir de las subpoblaciones) mediante el programa GENEPOP ver. 3.3 (Raymond y Rousset 2001).

VII. RESULTADOS

Se colectaron en total 56 individuos de cuatro poblaciones, de los cuales se utilizaron 5 ejemplares por población para el análisis entre poblaciones con la secuencia del citocromo b, para el análisis de microsatélites se utilizaron del río Grande Morelia tres individuos, para el Borbollon cinco, el río Turbio Corralejo cinco y para la población de Salamanca cuatro.

Caracterización de la distribución actual de Skiffia bilineata.

La revisión de la literatura y de las bases de datos de Colecciones Científicas, permitió concluir que su área de distribución comprende la zona limítrofe entre los estados de Michoacán y Guanajuato.

En el estado de Michoacán se muestrearon nueve sitios: Balneario Cointzio, Lago de Cuitzeo, Presa Santa Clara, Manantial de Chapultepec, Presa Queréndaro, Río Queréndaro, río Zinapécuaro y el manantial El Pajonal, solo se encontró en un sitio *Skiffia bilineata*, el río Grande de Morelia en Indaparapeo y en el Borbollon.

En lo que respecta al estado de Guanajuato se muestrearon los sitios: La Caldera, río Irapuato, río Turbio Cuerámara, río Turbio Abasolo, río Turbio en Corralejo y Salamanca (Figura 1), nuevamente solo en los dos últimos sitios se registró la presencia del taxon en estudio, siendo la población de Salamanca un nuevo registro para la especie, además se ser la especie íctica más abundante (Figura 3).

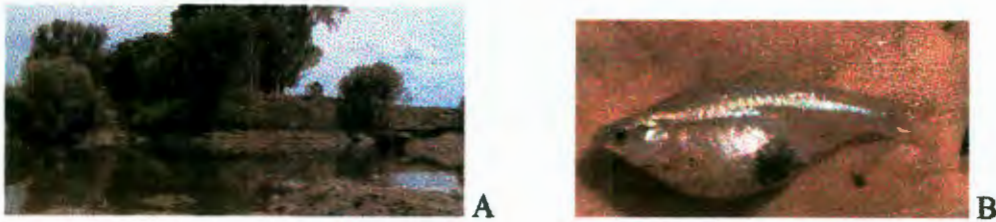


Figura 3. A) Salamanca , B) *Skiffia bilineata*.

En la figura 4 se observa la distribución actual de la especie con base en los muestreos llevados a cabo.

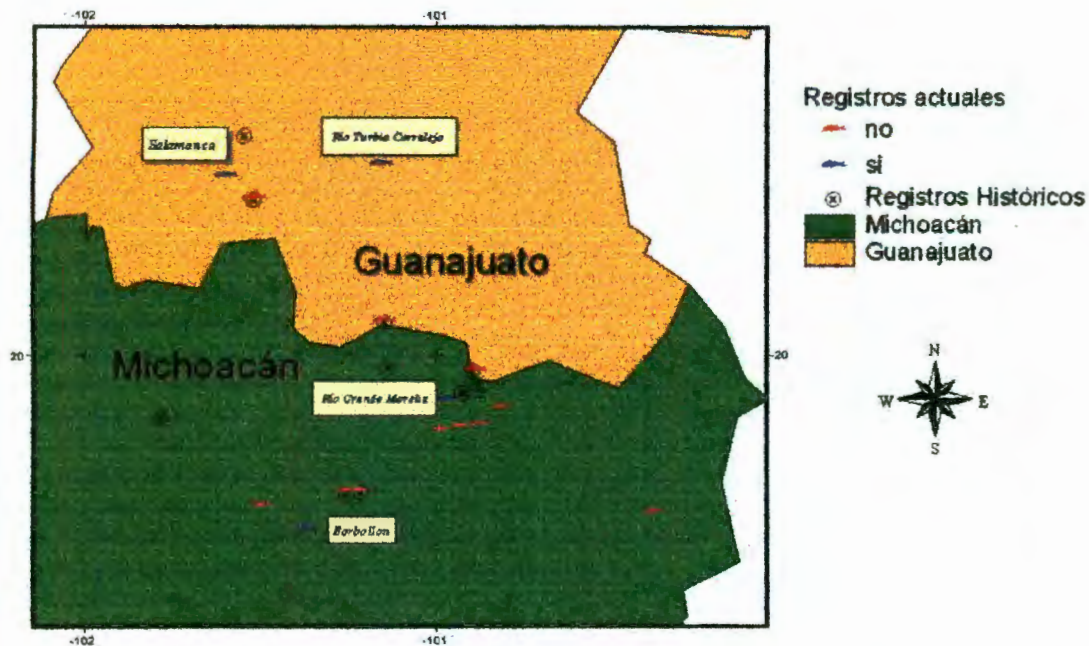


Figura 4. Registros históricos y actuales de *Skiffia bilineata*. Los puntos en rojo indican la ausencia de la especie, mientras en azul indican presencia.

Análisis de las secuencias del Citocromo b

Para el análisis de las secuencias obtenidas del citocromo b para cinco individuos por población (Anexo 1), el modelo evolutivo que mejor se ajusta fue el de TIM + I obtenido mediante el Model Test. Las frecuencias de las bases fueron: A = 0.2511, C = 0.2912, G = 0.1406 y T = 0.3171. El modelo de sustitución es A – C = 1.00, A – G = 12.56, A –

Resultados

$T = 0.00$, $C - G = 0.00$, $C - T = 5.4891$ y $G - T = 1$. El árbol (Figura 5), fue obtenido con el análisis de inferencia filogenética de Maximum Likelihood (ML), que de manera general muestra agrupación de las poblaciones; sin embargo, la consistencia no es alta indicando que no hay diferencias importantes que permitan separar de manera concreta las poblaciones.

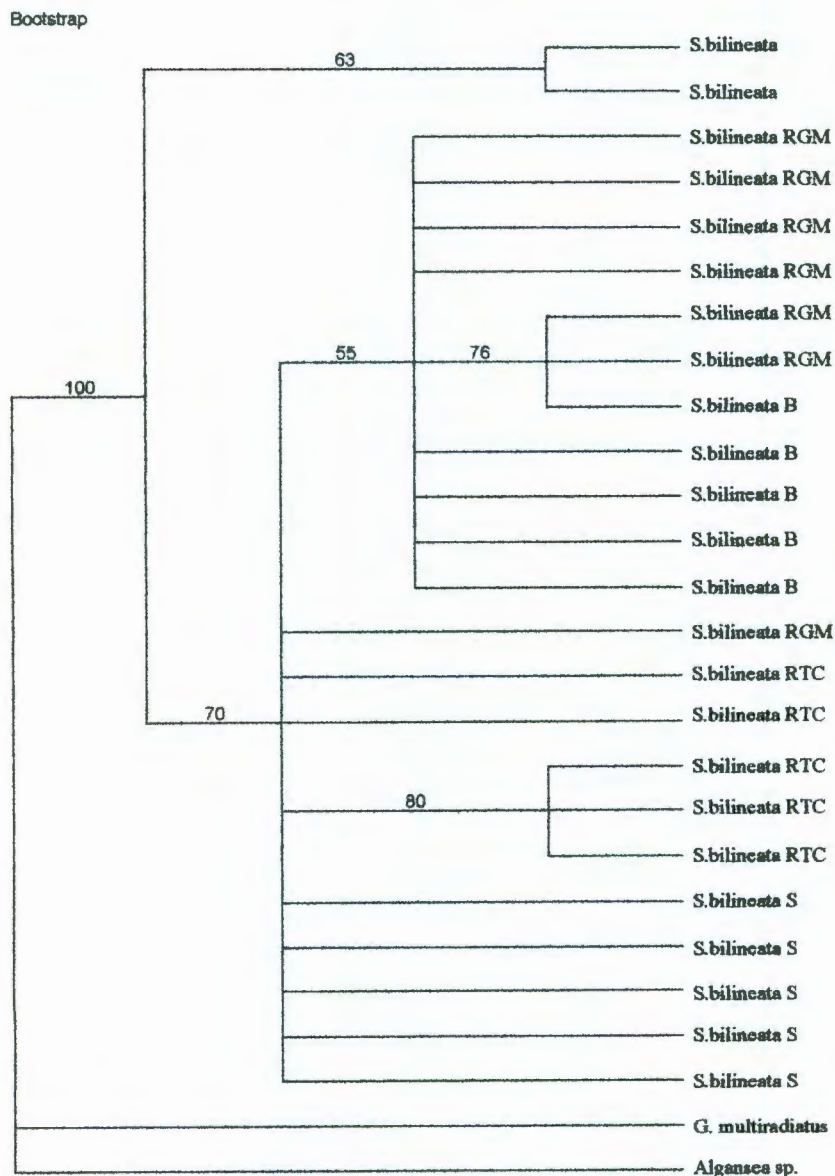


Figura 5. Análisis de inferencia filogenética de Maximum Likelihood (ML), RGM = Río Grande Morelia, B = Borbollón, RTC = Río Turbio Corralejo, S = Río Lerma en Salamanca.

Análisis de microsatélites**Intrapoblacional**

Con los resultados del análisis con microsatélites a nivel intrapoblacional se construyó una tabla de los alelos (Anexo 4) presentes cada población. Del análisis de equilibrio de ligamiento se obtuvo que los loci no se encontraban ligados. Así mismo en la tabla 2 aparecen los resultados obtenidos a nivel poblacional del análisis de equilibrio de Hardy - Weinberg, cinco loci presentaron diferencias significativas para tres de los loci por lo que se rechaza la hipótesis nula de que la población está en equilibrio, así mismo los coeficientes de endogamia (F_{IS}), con el índice $W \& C =$ Weir & Cockerham, presentó valores positivos en todos los loci. Las frecuencias alélicas por locus y los genotipos correspondientes conforman el Anexo 5.

Tabla 2. Valores de los análisis Hardy - Weinberg, F_{IS} , $W \& C$.

Locus	Prob. Val.	E. S.	F_{IS} $W \& C$
ZT 2	0.0533	0.0032	+ 0.467
ZT 6	0.0380*	0.0104	+0.234
ZT 7	0.1128	0.0145	+0.306
ZT 9	0.0000*	0.0000	+0.229
ZT 43	0.0398*	0.0165	+0.150

$W \& C =$ Weir & Cockerham, E. S = error estándar. * Estadísticamente significativas.

En la tabla 3 se muestra un resumen con el número de heterocigotos observados y esperados para cada locus.

Tabla 3. Número de heterocigotos observados y esperados a nivel intrapoblacional por locus.

Locus	H_E	H_O	F_{IS} $W \& C$
ZT2	9.2424	5	+0.4667
ZT6	15.5454	12	+0.2335
ZT7	12.8485	9	+0.3060
ZT43	15.4545	12	+0.2289
ZT9	16.3939	14	+0.1499

Resultados

H_E = heterocigotos esperados y H_O heterocigotos observados.

En esta tabla se observa que para todos los casos los valores de F_{IS} son positivos, dado que el número de homocigotos es mayor al número de heterocigotos. Así mismo, en todos los casos el número de heterocigotos esperados es mayor que el esperado.

Interpoblacional

Los resultados a nivel interpoblacional, señalan que existe una diferenciación significativa entre poblaciones $P = 0.0485$ ($Chi^2 = 26.408$, $DF = 8$). Además, se llevó a cabo un análisis de Hardy – Weinberg, para las cuatro poblaciones y los cinco loci. En la tabla 4 se hallan los valores de los loci en la población del río Grande de Morelia. Donde no se rechaza la hipótesis nula, ya que las diferencias no son significativas, por lo tanto la población se encuentra en equilibrio a pesar de tener valores positivos de F_{IS} .

Tabla 4. Análisis de Hardy – Weinberg de los cinco loci de la población del río Grande Morelia.

Locus	Prob. Val.	E. S.	F_{IS} W & C
ZT2	0.1946	0.0020	+1
ZT6	1	0.0000	+0.000
ZT7	0.2042	0.0047	+0.500
ZT9	1	0.0000	+0.000
ZT43	0.1900	0.0113	+0.333

W & C = Weir & Cockerham, E. S = error estándar. * Estadísticamente significativas.

La tabla 5 se conforma con los valores obtenidos por locus para la población del Borbollon, en donde de manera similar a la del río Grande Morelia se acepta la hipótesis

nula de que la población mantiene el equilibrio de Hardy – Weinberg, pues los valores de P son mayores de 0.05.

Tabla 5. Análisis de Hardy – Weinberg de los cinco loci de la población del Borbollon.

Locus	Prob. Val.	E. S.	F _{IS} W & C
ZT2	1	0.0000	+0.077
ZT6	0.0629	0.0051	+0.333
ZT7	1	0.0000	-0.280
ZT9	0.8003	0.0117	+0.059
ZT43	0.1707	0.0034	-0.667

W & C = Weir & Cockerham, E. S = error estándar. * Estadísticamente significativas.

En la tabla 6 se muestran los valores obtenidos por locus para la población del río Turbio en Corralejo, donde el único locus que no se encontró en equilibrio fue el ZT9, el cual presento una P = 0.0446.

Tabla 6. Análisis de Hardy – Weinberg de los cinco loci de la población del río Turbio en Corralejo

Locus	Prob. Val.	E. S.	F _{IS} W & C
ZT2	0.3332	0.0019	+0.600
ZT6	0.3354	0.0098	+0.294
ZT7	0.4612	0.0094	+0.273
ZT9	0.0446*	0.0078	+0.368
ZT43	0.2153	0.0120	+0.226

W & C = Weir & Cockerham, E. S = error estándar. * Estadísticamente significativas.

Resultados

En la tabla 7 se muestran los valores obtenidos en el análisis de Hardy – Weinberg para la población de Salamanca, donde de manera similar a los casos anteriores, sin embargo el locus ZT9 presentó un mayor número de heterocigotos que de homocigotos, teniendo valores de Fis negativos.

Tabla 7. Análisis de Hardy – Weinberg de los cinco loci de la población del río Lerma en Salamanca.

Locus	Prob. Val.	E. S.	F _{IS} W & C
ZT2	0.4280	0.0018	+0.571
ZT6	0.1406	0.0170	+0.250
ZT7	0.1459	0.0041	+0.625
ZT9	1	0.0000	-0.043
ZT43	0.1323	0.0068	+0.478

W & C = Weir & Cockerham, E. S = error estándar. * Estadísticamente significativas.

En el gráfico 1 se muestran los resultados de diferenciación genética y la distribución de los alelos para el locus ZT2, en las cuatro poblaciones, donde se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas ($P = 0.5271$, E. S. = 0.00764).

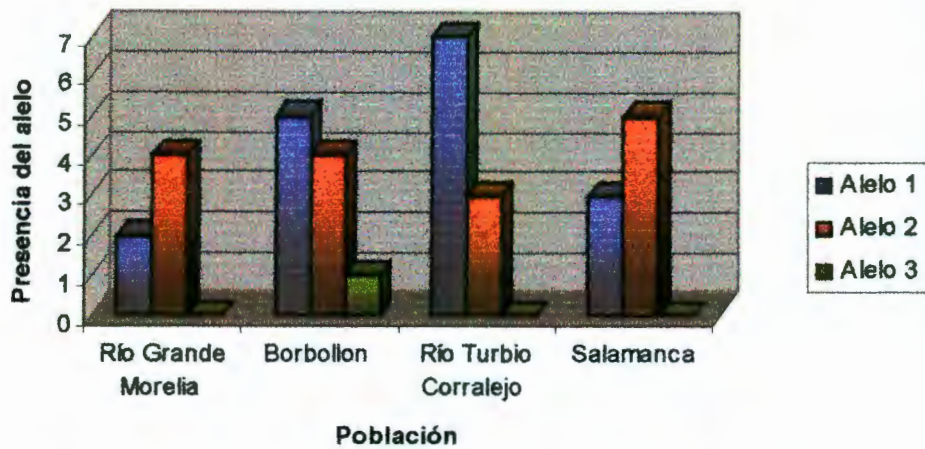


Gráfico 1. Presencia de alelos por población del Locus ZT2.

En el gráfico 2 se observa la distribución de los alelos en cada población para el locus ZT6 de cada población, el cual tampoco presentó diferencias significativas ($P = 0.1177$, E. S. = 0.00950).

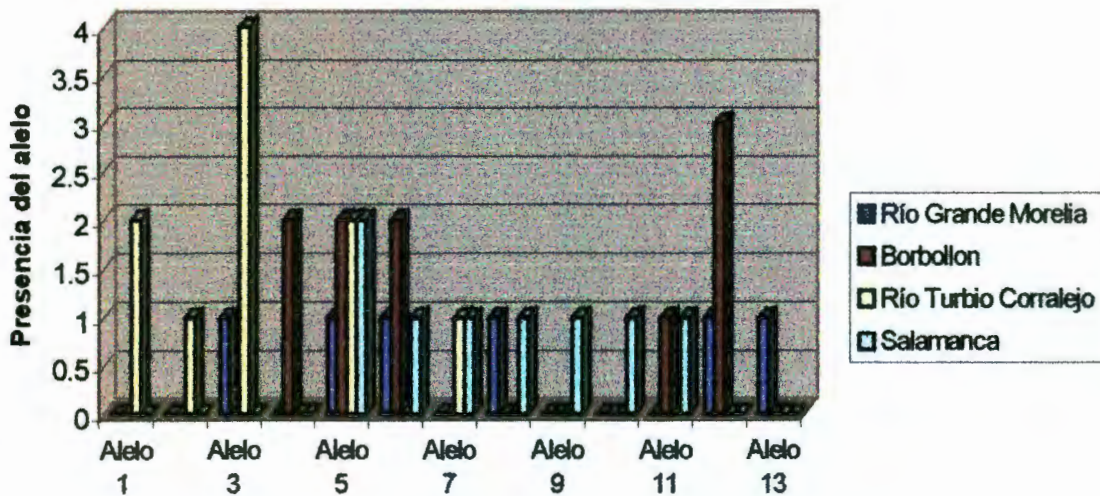


Gráfico 2. Presencia de alelos para el Locus ZT6 en cada población.

Resultados

En el gráfico 3 se muestra el número de veces que se presentó cada alelo para el Locus ZT7 por población, en el cual se presentan diferencias significativas entre poblaciones ($P = 0.0171$, E. S. = 0.00331).

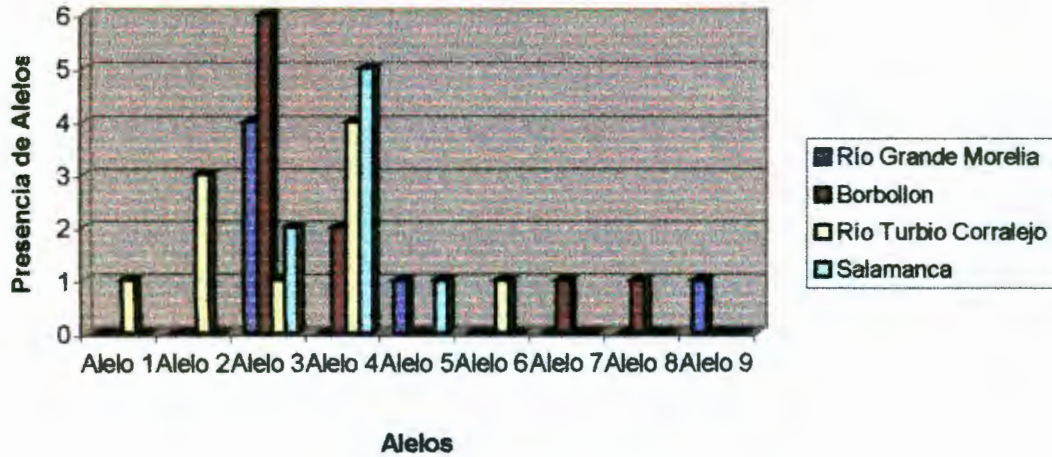


Gráfico 3. Presencia de alelos para el Locus ZT7 en cada población.

En el gráfico 4 se muestra la presencia de los alelos para el locus ZT9, donde se encontraron diferencias significativas entre poblaciones ($P = 0.00119$, E. S. 0.00068).

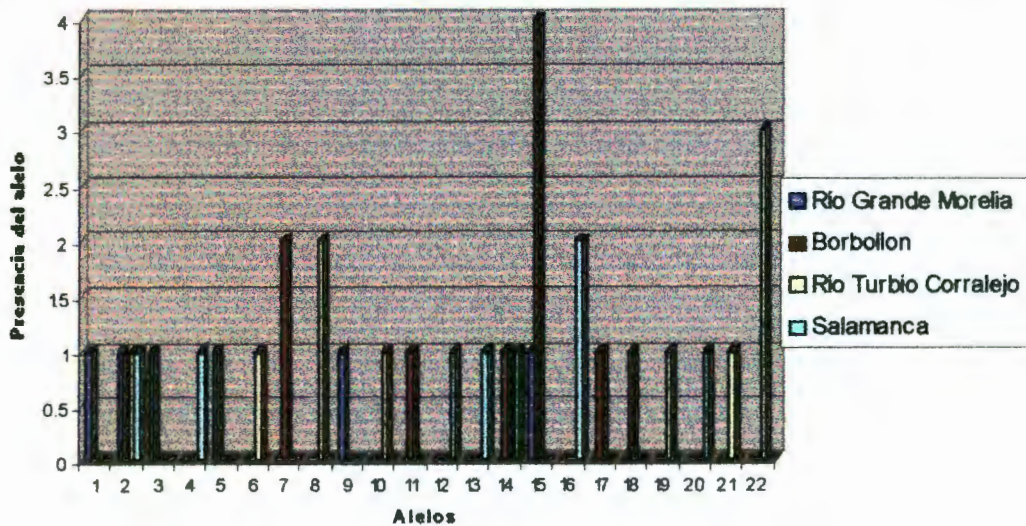


Gráfico 4. Presencia de alelos para el locus ZT9 en cada población.

Las diferencias entre poblaciones para el locus ZT43, las cuales también fueron significativas ($P = 0.0000$, E. S. 0.000) y aparecen en el gráfico 5.

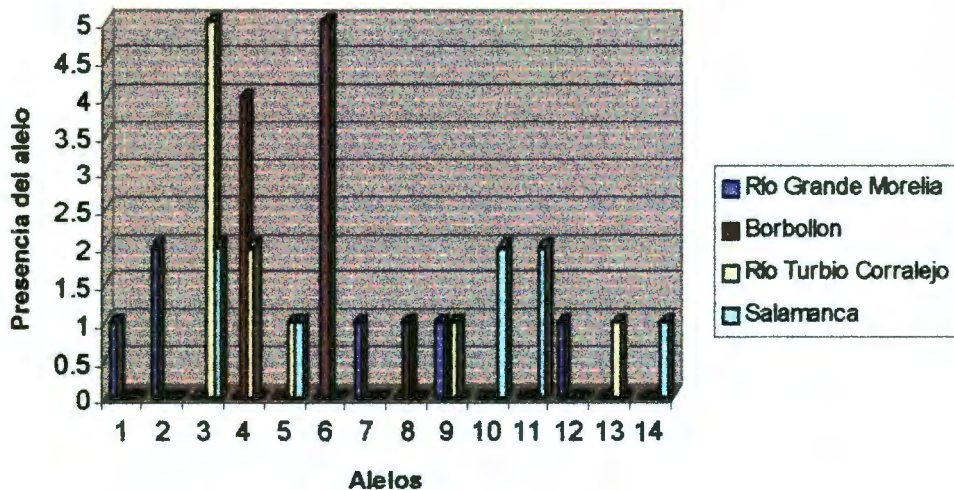


Gráfico 5. Presencia de alelos para el locus ZT43 en cada población.

Los resultados del análisis permiten determinar que no existen alelos exclusivos por población. Con respecto a las frecuencias alélicas poblacionales, en el gráfico 6 se muestra la frecuencia de los dos alelos para el locus ZT2 para la población de Río Grande Morelia, en donde el alelo A tiene una frecuencia menor (0.333) a la del alelo B (0.6667), y cuyos valores de F_{IS} para el índice de W & C es de + 1.00 y R & H +1.50, indicando la presencia de un alto número de homocigotos.

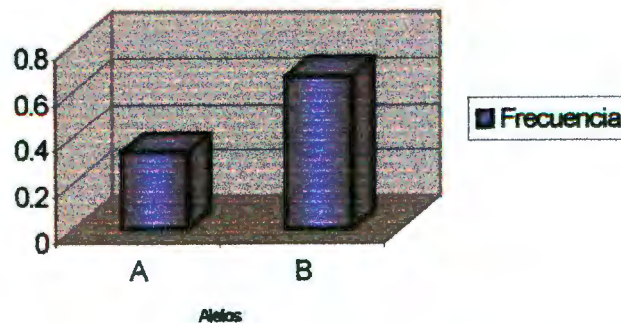


Gráfico 6. Frecuencia de alelos para el locus ZT2 en el Río Grande Morelia.

Resultados

Las frecuencias de los seis alelos para el locus ZT6 del Río Grande Morelia, se presentan en el gráfico 7, en donde la frecuencia de los alelos es igual para todos (0.1667) y los valores de Fis para el índice de W & C y R & H son negativos -0.00 , señal de un mayor número de heterocigotos.

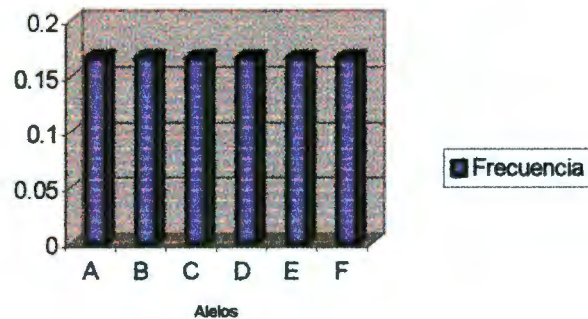


Gráfico 7. Frecuencia de alelos para el locus ZT6 Río Grande Morelia.

En el gráfico 8 se presentan las frecuencias de los tres alelos para el locus ZT7 del Río Grande Morelia en donde se puede observar que el alelo A tiene una mayor frecuencia (0.6667), que los otros dos alelos (0.1667). Con respecto a los valores de Fis se en el índice de W & C $+0.50$ y R & H $+0.25$, por lo que el número de homocigotos es mayor que el de heterocigotos.

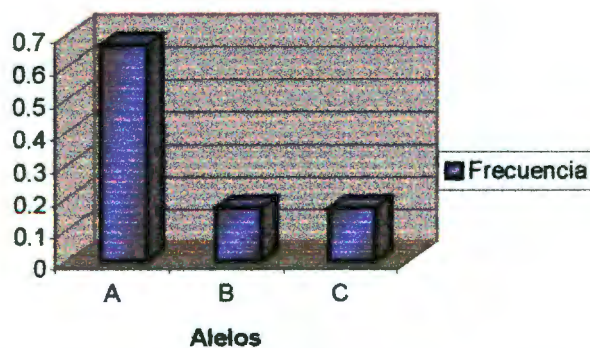


Gráfico 8. Frecuencia de alelos para el locus ZT7 del Río Grande Morelia.

En el gráfico 9 aparecen las frecuencias del locus ZT9 para el Río Grande Morelia, en donde los seis alelos presentan la misma frecuencia (0.1667) y el valor de W & C es de -0.000, y de R & H +0.000, indicativo de que el número de homocigotos es ligeramente más alto que el de homocigotos.

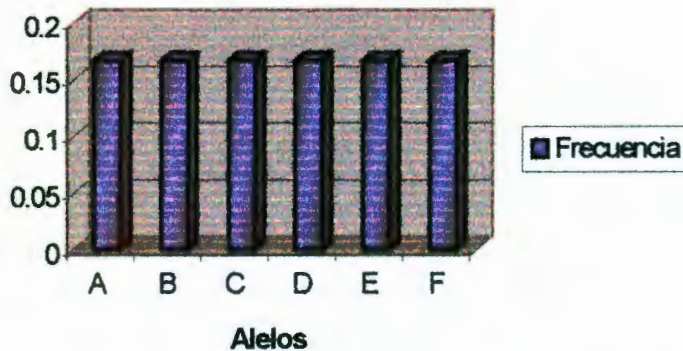


Gráfico 9. Frecuencia de alelos para el locus ZT9 del Río Grande Morelia.

Las frecuencias de los cinco alelos para el locus ZT43 de la población Río Grande Morelia señalan que el alelo B tiene aproximadamente el doble de frecuencia (0.333) que el resto de los alelos (0.1667), (gráfico 10).

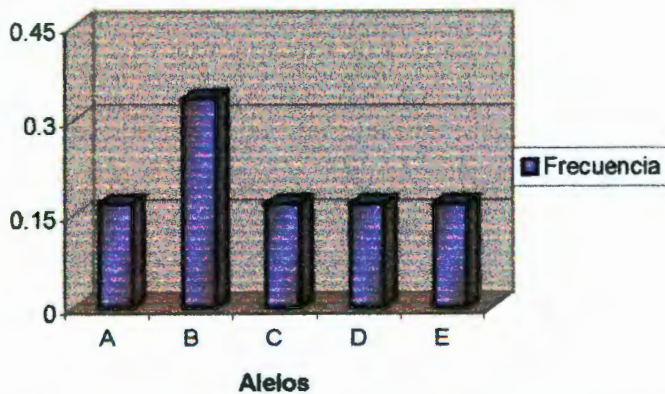


Gráfico 10. Frecuencia de alelos para el locus ZT43 de la población Río Grande Morelia.

El resultado del análisis de las frecuencias para los tres alelos del locus ZT2 para la población del Borbollón se resumen en el gráfico 11 presenta, además de los alelos de la población del río Grande Morelia, el alelo C (0.1), cuya frecuencia es la más baja, en cambio mientras la del alelo A es mayor (0.5). Los valores de W & C y R & H son +0.0769 y + 0.0688, por lo tanto el número de homocigotos es mayor que el de heterocigotos.

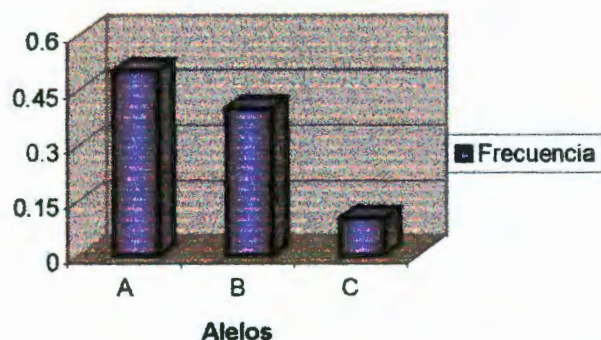


Gráfico 11. Frecuencia de alelos para el locus ZT2 de la población del Borbollón.

En el gráfico 12 se muestran las frecuencias para los cinco alelos del locus ZT6 de la población del Borbollón, en donde aparecen los alelos G, H e I, mismos que no se presentan en la población del Río Grande Morelia, el alelo I es el que tiene la frecuencia más alta en la población (0.30), mientras que al H le corresponde la más baja (0.10). El valor de W & C y R & H son +0.3333 y +0.4062 respectivamente, por lo que el número de homocigotos es mayor.

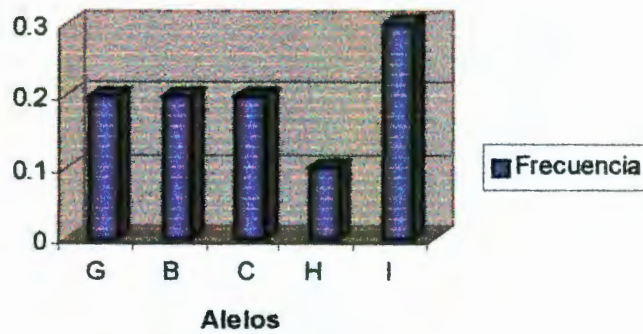


Gráfico 12. Frecuencias de alelos para el locus ZT6 para la población del Borbollón.

El estudio de las frecuencias de los cuatro alelos del locus ZT7 en la población del Borbollón, señala que los alelos D, E y F no se habían presentado en la población del Río Grande Morelia, además de que el alelo A presenta la frecuencia más alta (0.60) mientras que los E y F tienen la más baja (0.10) (gráfico 13). Los valores de W & C y R & H son de -0.280 y -0.125 respectivamente, por lo que el número de heterocigotos es mayor que el de homocigotos.

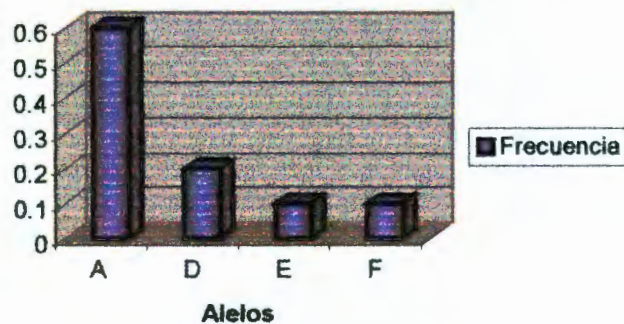


Gráfico 13. Frecuencia de alelos para el locus ZT7 de la población del Borbollón.

En el gráfico 14 aparecen las frecuencias para los seis alelos del locus ZT9 en la población del Borbollón, cuyo único alelo que se repite en la población del Río Grande

Resultados

Morelia es F, mismo que tiene la frecuencia más alta (0.40). El valor de $W & C$ es +0.0588, por lo que hay un mayor número de homocigotos.

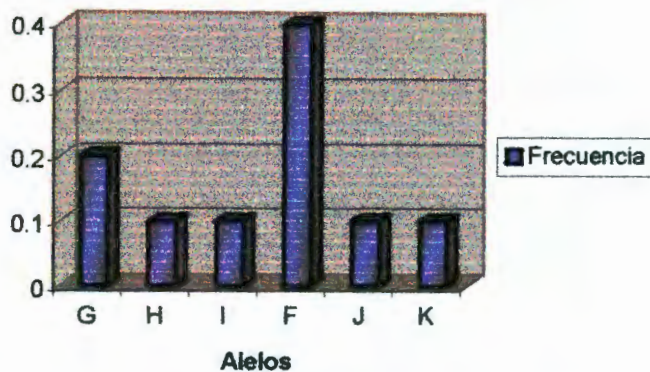


Gráfico 14. Frecuencia de alelos para el locus ZT9 del Borbollon.

Las frecuencias de los tres alelos para el locus ZT43 de la población del Borbollón, aparece en el gráfico 15, se observa que no comparte alelo alguno con la población del Río Grande Morelia, e indica que el alelo G es el que presenta la frecuencia más alta (0.5), mientras que el H la más baja (0.10). El valor de $W & C$ -0.6667 por lo tanto el número de heterocigotos es mayor.

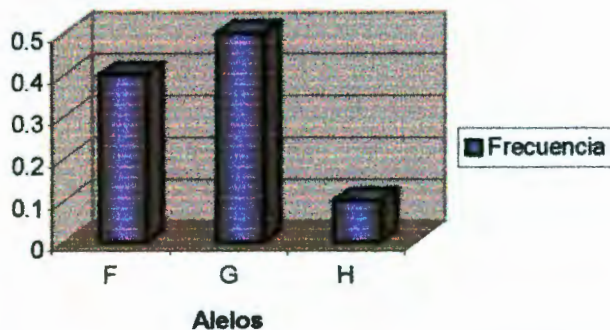


Gráfico 15. Frecuencia de alelos para el locus ZT43 del Borbollon.

El gráfico 16 muestra la frecuencia de los dos alelos para el locus ZT2 de la población del Río Turbio Corralejo, donde nuevamente el alelo A nuevamente presenta mayor

frecuencia (0.70). El valor de $W \& C$ es +0.600 por lo tanto el número de heterocigotos es mayor.

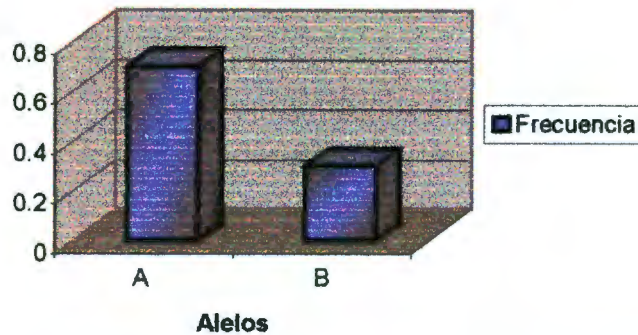


Gráfico 16. Frecuencia de alelos para el locus ZT2 para la población Río Turbio Corralejo.

En el gráfico 17 se muestran las frecuencias de alelos para el locus ZT6 de la población del río Turbio Corralejo, cuyos dos alelos con frecuencia más alta son A y G (0.20). El valor de $W \& C$ es +0.2941 por lo tanto el número de homocigotos es mayor.

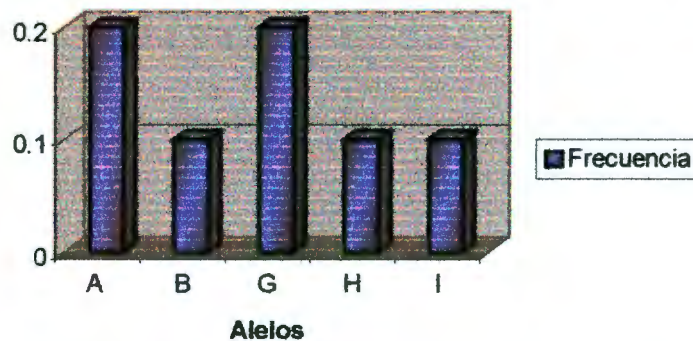


Gráfico 17. Frecuencias de alelos para el locus ZT6 para la población Río Turbio Corralejo.

Las frecuencias de los cinco alelos del locus ZT7 para la población Río Turbio Corralejo, mismos que también se presentaron en la población de río Grande de Morelia y el río Turbio en Corralejo, aparecen en el gráfico 18, el alelo I presentó la frecuencia más alta en la población (0.40), este alelo junto con los alelos G, H, y J, no hallaron en las

Resultados

dos poblaciones anteriores. El valor de $W & C$ es $+0.2727$ en consecuencia predomina el número de homocigotos.

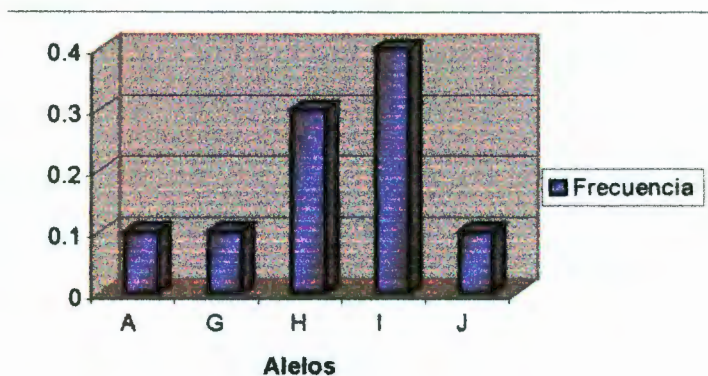


Gráfico 18. Frecuencias de alelos ZT7 para la población del Río Turbio Corralejo.

En el gráfico 19 se muestran las frecuencias de alelos para los siete alelos, del locus ZT9 para la población Río Turbio Corralejo, donde solo el alelo B se había presentado en las poblaciones anteriores, el alelo que presenta una mayor frecuencia en la población es el O (0.30). El valor de $W & C$ $+0.300$ por lo tanto el número de homocigotos es mayor.

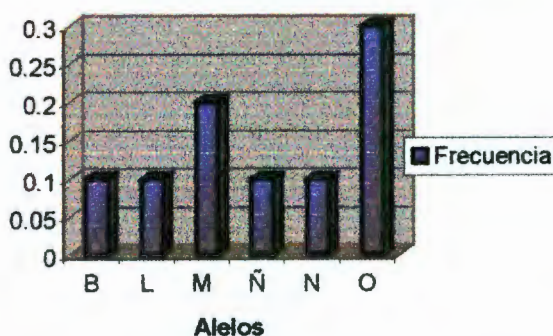


Gráfico 19. Frecuencia de alelos para el locus ZT9 de la población del Río Turbio Corralejo.

En el gráfico 20 se muestran las frecuencias de alelos para cinco alelos, del locus ZT43 para la población Río Turbio Corralejo, los alelos I, J y K no se habían presentado en las dos poblaciones anteriores, y el alelo I fue el que presentó la frecuencia más alta de la

población (0.50). El valor de $W & C$ es +0.2258, por lo tanto el número de homocigotos es mayor.

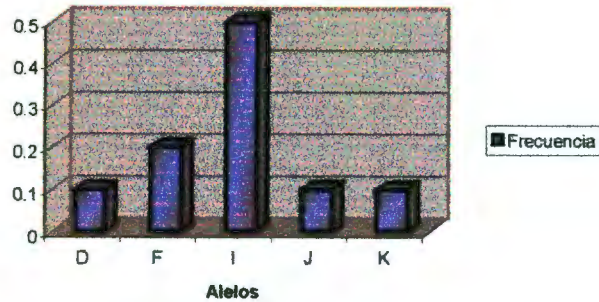


Gráfico 20. Frecuencias de alelos para el locus ZT43 de la población Río Turbio Corralejo.

En el gráfico 21 se muestran las frecuencias de los dos alelos para el locus ZT2 de la población de río Lerma en Salamanca. En donde de manera similar a la población del Río Grande de Morelia el alelo más frecuente fue el alelo B (0.625). El valor de $W & C$ es de +0.5714 por lo tanto el número de homocigotos es mayor.

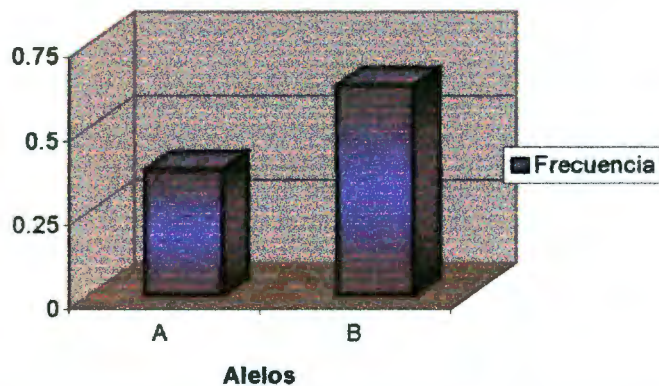


Gráfico 21. Frecuencia de alelos para el locus ZT2 de la población de Salamanca.

Las frecuencias de los dos alelos para el locus ZT6 de la población de río Lerma en Salamanca se presentan en gráfico 22. Donde los alelos J, K y L no se habían presentado

Resultados

anteriormente y es el alelo B el que presentó la mayor frecuencia en la población (0.25).

El valor de $W \& C$ es +0.2500 por lo tanto el número de homocigotos es mayor.

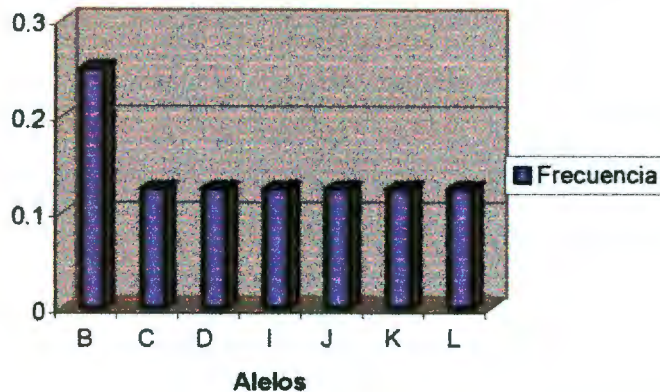


Gráfico 22. Frecuencia de alelos para el locus ZT6 de la población de Salamanca.

El gráfico 23 muestra las frecuencias de los tres alelos, del locus ZT7 para la población

de Salamanca. El alelo D es el que presentó la frecuencia más alta (0.625). El valor de W

$\& C$ +0.62500 por lo tanto el número de homocigotos es mayor.

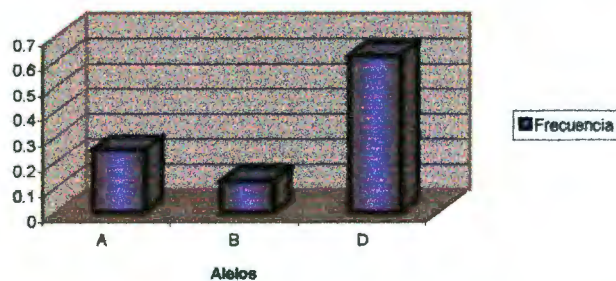


Gráfico 23. Frecuencia de alelos para el locus ZT7 de la población de Salamanca.

En el gráfico 24 se muestran las frecuencias para los siete alelos del locus ZT9 de la población de Salamanca, donde los alelos Q, R, S, T y U no se habían presentado en las

tres poblaciones anteriores. El alelo S es el que presentó la frecuencia más alta en la

población (0.25). El valor de $W \& C$ es -0.04350 por lo tanto el número de heterocigotos es mayor.

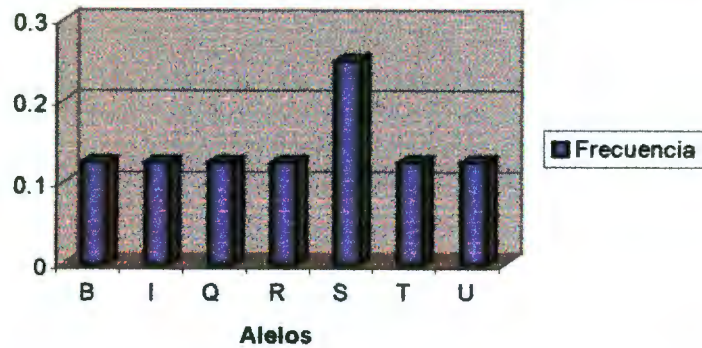


Gráfico 24. Frecuencias de alelos para la población de Salamanca, del locus ZT9.

En el gráfico 25 se muestran las frecuencias para los cinco alelos del locus ZT43 de la población de Salamanca, donde los alelos L, M y N no se habían presentado en las tres poblaciones anteriores. Los alelos I, L y M presentaron las frecuencias más altas en la población (0.25). El valor de $W \& C$ es $+0.4783$, respectivamente por lo tanto el número de homocigotos es mayor.

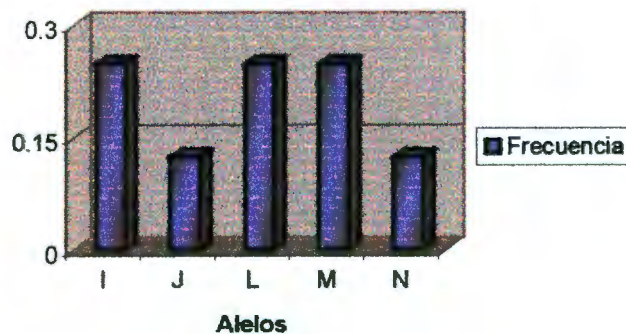


Gráfico 25. Frecuencia de alelos para el locus ZT43 de la población de Salamanca.

En el gráfico 26 se presenta un resumen de la cantidad de homocigotos y heterocigoto observados y esperados para cada población. Los loci ZT2, ZT7 y ZT43 presentaron

Resultados

valores de $W \& C$ positivos, lo que indica que el número de homocigotos es mayor que el de heterocigotos. En los loci ZT6 y ZT9 el índice $W \& C$ es de -0.0000 , y por lo tanto el número de heterocigotos es mayor. La población del Borbollón, los loci ZT7 y ZT43 presentó valores $W \& C$ negativos, lo que indica que el número de heterocigotos es mayor, mientras que para los loci ZT2, ZT6 y ZT9 los valores son positivos, por lo tanto el número de homocigotos es mayor. En la población del río Turbio en Corralejo, los valores de $W \& C$ son positivos, consecuentemente la cantidad de homocigotos es mayor. Por último en la población de Salamanca, en el locus ZT9 aparecen valores negativos $W \& C$ por lo tanto tiene un mayor número de heterocigotos que de homocigotos.

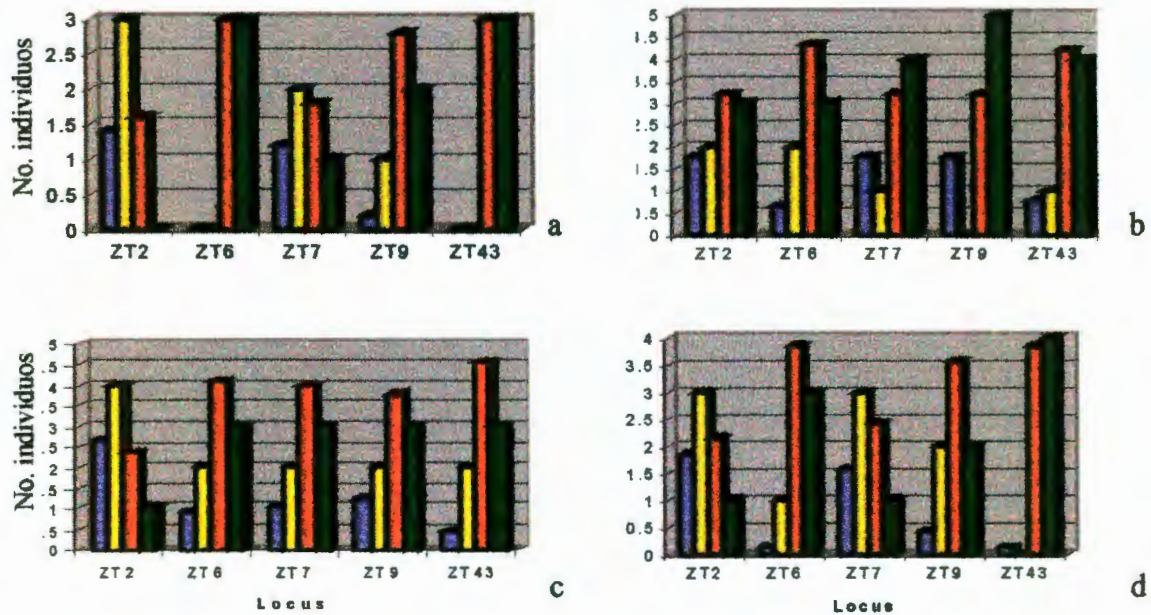


Gráfico 26. a) río Grande Morelia, b) Borbollon, c) río Turbio Corralejo y d) Salamanca. En azul son los homocigotos esperados, amarillos homocigotos observados, rojo heterocigotos esperados y en verde heterocigotos observados.

La diferenciación genética se muestra en la tabla 7, es posible observar los valores obtenidos del índice de fijación de alelos (F_{st}) entre pares de poblaciones, con una media de 0.526, que se interpreta como un valor alto de variación genética interpoblacional.

Tabla 7. Valores del índice de fijación de alelos (F_{st}), entre pares de poblaciones.

<i>Población</i>	Borbollón	Río Turbio Corralejo	Salamanca
Río Grande Morelia	0.2975	0.7072	0.3291
Borbollón		1.0404	0.6844
Río Turbio Corralejo			0.4295

La correlación entre las F_{st} con el Ln de la distancia geográfica, se muestra en el gráfico 27, los datos se ajustan a un modelo lineal con una $r^2 = 0.6451$, $P = 0.05$ ($F_{st} = -2.2643 + 0.65947 \text{ Ln Dist. Km.}$), en donde hay una correlación positiva entre ambas variables.

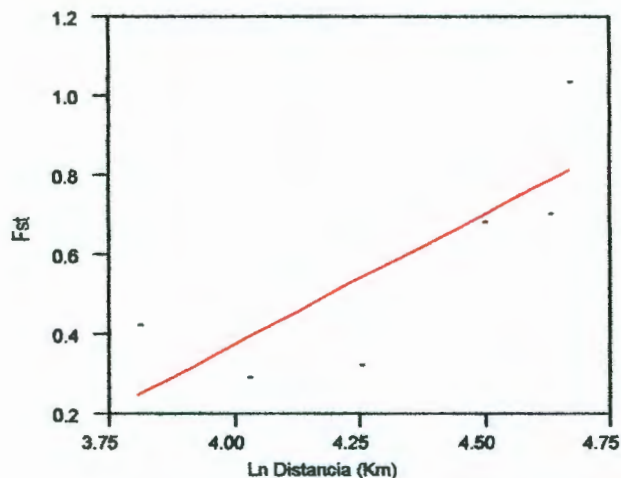


Gráfico 33. Correlación entre F_{st} y el Ln de las distancias Geográficas. $r^2 = 0.6451$ ($F_{st} = -2.2643 + 0.65947 \text{ Ln Dist. Km.}$).

VIII. DISCUSIÓN

Distribución de la especie

El trabajo de campo permitió determinar que la restricción en la amplitud de distribución de *Skiffia bilineata*, con respecto a los registros históricos, derivada la alta degradación ambiental, que se presenta en la parte media de la cuenca Lerma – Chapala y en las últimas décadas un acelerado como resultado de las actividades agrícola – ganadera e industrial, así como por la disminución en la calidad y cantidad de agua y la introducción de especies exóticas (Díaz–Pardo y col. 1993, Soto–Galera y col. 1999 y López–López y Paulo–Maya 2001).

También, fue posible corroborar la fragmentación de las poblaciones de *S. bilineata* que ha sido propuesta por Díaz–Pardo y Gutiérrez–Hernández (2002), así como ratificar lo reducido de sus densidades.

Aún las cuatro poblaciones estudiadas son susceptibles a los efectos antes mencionados, pues se encuentran en zonas que presentan un fuerte impacto derivado de las actividades humanas. De esta manera, la población de Salamanca se encuentra situada en un área industrial (refinería de PEMEX entre otras), poco antes de la ciudad del mismo nombre, además de los aportes urbanos y agrícolas de la subcuenca de la Laja. En el caso de la población del río Grande Morelia también presenta evidencias de vertimiento de desechos urbanos. La población del río Turbio en Corralejo, puede verse afectada por el deterioro principalmente producido por la actividad agrícola – ganadera, que favorece un marcado incremento en las concentraciones de nutrimentos del río y por lo tanto acelera los procesos de eutroficación.

Análisis de las poblaciones con el Citocromo b

Con respecto a los análisis de secuencias del citocromo b, existe una ligera agregación de los organismos en la parte cercana a Morelia, pues tanto la población del río Grande de Morelia como la del Borbollón se agrupan, aunque no con un buen soporte (bootstrap 55); en cambio, el resto de los ejemplares estudiados no pueden resolverse con los análisis empleados, lo que se explica debido a que la tasa de mutación del citocromo b es menor que en los microsatélites y por lo tanto se requiere de un mayor número de generaciones para acumular diferencias en poblaciones geográficamente aisladas, hecho que ha sido observado en otros trabajos (Churikov y Gharrett 2002, Drew y col. 2003, Johnson y col. 2003, Alarcón y col. 2004,). No obstante, es posible que con la aplicación del análisis “Nested clade”, se pueda llevar a cabo un análisis mucho más detallado de la relación entre los haplotipos y la localización geográfica de poblaciones que han divergido de manera reciente, como parece ser el caso de *S. bilineata* (Templeton A. 1998 y Volckaert y col. 2002).

Análisis de poblaciones con los microsatélites

El análisis de Hardy – Weinberg intrapoblacional determinó que para cuatro de los cinco loci estudiados, se rechazó la hipótesis nula en cuanto a que la población se encuentra en equilibrio. Aún así, los valores de endogamia (F_{IS}) señalan una deficiencia de heterocigotos, lo cual puede estar relacionado con un con el efecto de Wahlund, donde el número de homocigotos observados es mayor al esperado, y/o hay una selección negativa por los heterocigotos (Strecker y col. 2003). Con respecto al análisis interpoblacional, se presentaron diferencias significativas entre las cuatro poblaciones estudiadas, lo podría deberse a la interrupción del flujo genético entre las mismas. En

Discusión

estos análisis no se rechazó la hipótesis nula y por lo tanto a pesar de presentar, de manera similar a los análisis intrapoblacionales, valores positivos de F_{IS} , la población se encuentra en equilibrio. No obstante cabe resaltar que en otras poblaciones se ha observado un decremento de heterocigotos está relacionado con la endogamia, la cual incrementa significativamente el riesgo de extinción de especies que suelen presentar poblaciones locales pequeñas como resultado de una pérdida y fragmentación de hábitat (Saccheri y col. 1998). Estos resultados pueden estar influenciados por el número de individuos, por lo que tal vez al aumentar el número por población posiblemente se podría tener una mejor resolución de los análisis, sin embargo es de considerar que por ser una especie que se encuentra amenazada no es abundante en la naturaleza y por tanto el uso de un número mayor de individuos debe ser tomado con precaución.

El número de alelos por locus varió entre 3 a 22 alelos, con una media de 10.16 y el número de heterocigotos observados tuvo un intervalo de 0 a 5, con una media de 2.6. En cuanto a la distribución de alelos por locus, la población del Borbollón presentó para el locus ZT2 un alelo exclusivo (diagnóstico), mientras que para el locus ZT6 las cuatro poblaciones tuvieron al menos un alelo exclusivo. Para el caso del locus ZT7, la población del río Turbio en Corralejo mostró tres alelos exclusivos, siendo esta población la que más alelos tuvo para el locus, mientras que la del Borbollón mostró dos. Con respecto al locus ZT9, las cuatro poblaciones presentaron entre cuatro y cinco alelos exclusivos, con diferencias significativas entre las poblaciones. Por último, la población del río Grande de Morelia fue la que tuvo el mayor número de alelos exclusivos. Todo lo anterior destaca la diferenciación que existe entre las poblaciones en

cuanto a su estructura genética, debido a la restricción en su dispersión (Turgeon y Bernatchez 2001).

La diferenciación genética obtenida por medio de los índices de fijación (F_{st}) fue alta, con una media de 0.526. Este patrón sugiere poco movimiento de los organismos entre poblaciones, (Turgeon y Bernatchez 2001), que se explica por una reciente diferenciación entre ellas derivada de posibles interrupciones del flujo genético, debido a que han quedado aisladas como resultado del cambio en la calidad del agua y por consecuencia de la fragmentación del hábitat, generando así una microvicarianza, que también ha sido observada en otras especies como resultado de oscilaciones ambientales (Schultheis A. S. y col. 2002). Además debido a sus peculiaridades las cuatro poblaciones debido a sus peculiaridades, se consideran como unidades evolutivas significativas (ESU), ya que presentan áreas geográficas limitadas y muestran un patrón genético característico. Lo anterior debe ser considerado en los mecanismos de gestión que se implementen para la conservación del patrimonio genético de las poblaciones de *S. bilineata* (Waples 1998).

La correlación entre las distancias genéticas (F_{st}) y las geográficas es positiva, lo que sugiere un aislamiento por distancia y por lo tanto las poblaciones presentan un equilibrio entre deriva génica y flujo genético (Johnson y col. 2003, Turgeon y Bernatchez 2001). Lo anterior es importante de considerar para que en programas de manejo no se mezclen estas poblaciones, con el fin de preservar la identidad genética de las mismas.

Conclusiones

IX. CONCLUSIONES

Deben llevarse a cabo análisis de “Nested Clade” con los datos de las secuencias mitocondriales, en los que se incluya la medición de la distancia espacial como una variable, lo que pudiera esclarecer la variación genética con respecto a su distribución geográfica.

Los análisis de microsatélites permitieron detectar el efecto de Wahlund, ya que se presenta una mayor cantidad de homocigotos observados que esperados, tanto a nivel interpoblacional como intrapoblacional. Los valores de diferenciación genética parecen corroborar un aislamiento por distancia relacionado con la deriva génica que, debido al deterioro del hábitat, ha provocado la interrupción de flujo genético entre poblaciones.

Todas las poblaciones presentaron por lo menos un alelo exclusivo o diagnóstico, mismos que resaltan la importancia de la conservación de estas poblaciones para el mantenimiento de la diversidad genética de la especie.

Es importante considerar a *Skiffia bilineata*, como una especie sumamente vulnerable debido a la disminución y fragmentación que han presentado sus poblaciones, que aunado a su situación genética, pueden favorecer su extinción. Por lo anterior, es de vital importancia tomar medidas de conservación, en las que se prevenga una degradación mayor de los ríos donde se encuentra la especie en estudio, participando en conjunto con las dependencias gubernamentales para disminuir la contaminación de los ríos, así como por medio de programas de educación para la población.

Además, para el mantenimiento del acervo genético de las poblaciones de *S. bilineata* en el medio silvestre debe ser considerada la generación de *Zonas de Refugio*, las cuales sean áreas con un manejo y gestión especial con el objeto de mantener en su hábitat

natural a futuro, por lo anterior el Borbollon y río Turbio Corralejo pueden ser dos zonas de refugio debido a que son sitios cuyo impacto puede ser moderado y se pueden implementar programas de gestión. También resulta importante la consideración de producir “stocks” reproductivos de sus poblaciones que permitan su preservación en cuativerio, teniendo en consideración la temporalidad de estos cultivos y el tamaño efectivo, con el fin de evitar una pérdida de alelos debido a la consanguinidad entre los individuos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcón J. A., A. Magoulas, T. Georgakopoulos, E. Zouros y M. C. Alvarez. 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*. 230: 65 – 80.
- Alda P. F., I. Rey y I. Doadrio. 2004. Caracterización Molecular de la Población de Urogallo en Asturias. Segunda Memoria Parcial. Consejería del Medio Ambiente, Principado de Asturias.
- Álvarez del Villar J. 1970. Peces Mexicanos (Claves). Serie de Investigación Pesquera. No. 1. Instituto Nacional de Investigaciones Biológico Pesqueras. México. 100 p.
- Allendorf F. W. y R. F. Leary. 1986. *Conservation Biology*. Ed. Soulé M. E. Sinauer Associates, Inc. U.S.A.
- Boto L. y I. Doadrio. 2003. Polymorphic microsatellites in two different species of the genus *Zoogoneticus* Meek, 1902 (Goodeidae, Actynopterygii). *Molecular Ecology Notes*. USA. 3:70-72.
- Churikov D. y A. J. Gharrett. 2002. Comparative phylogeography of the two pink salmon broodlines: an analysis based on a mitochondrial DNA genealogy. *Molecular Ecology*. 11: 1077 – 1101.
- Díaz-Pardo E. y D. Ortiz-Jiménez. 1986. Reproducción y ontogenia de *Girardinichthys viviparus* (Pisces Goodeidae). *An. Esc. Nac. Cienc. Biol. Méx.* 19:145-153.
- Díaz-Pardo E., M. A. Godinez-Rodríguez, E. López-López y E. Soto-Galera. 1993. Ecología de los Peces de la cuenca del Río Lerma, México. *An. Esc. Nac. Cienc. Biol.* 39: 103-127.
- Díaz-Pardo E. y A. Gutiérrez-Hernández. 2002. *Skiffia bilineata*. Ficha Técnica. Comisión Nacional para el Conocimiento de la Biodiversidad.
- Díaz-Pardo E. En prensa. The gonopodial suspension of Girardinichthynae fish. *Proceedings of II Symposium of Livebearing Fishes*. University of Florida.

- Doadrio I. y O. Domínguez. 2004. Phylogenetic relationships within the fish family Goodeidae Based on Cytochrome B sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 31: 416 – 430.
- Drew R. E., J. G. Hallett, K. B. Aubry, K. W. Cullings, S. M. Koepfs y W. J. Zielinski. 2003. Conservation genetics of the fisher (*Martes pennanti*) based on mitochondrial DNA sequencing. *Molecular Ecology*. 12: 51 – 62.
- Farrington W. L. y C. M. Austin. 2000. Allozyme variation and stock structure in the black bream, *Acanthopagrus butcheri* (Munro) (Sparidae) in southern Australia: implications for fisheries management, aquaculture and taxonomic relationship with *Acanthopagrus australis* (Günther). *Fisheries Management and Ecology*. Vol. 7: 265–279.
- Garrigan D., P. Marsh y T. E. Dowling. 2002. Long – term effective population size of three endangered Colorado River fishes. *Animal Conservation*. Vol. 5: 95–102.
- Hartl D. L. y A. G. Clark. 1989. Principles of population Genetics. Sinauer Associates. Inc. Sunderland. Massachusetts.
- Hendrick P. W., T. J. Kim y K. M. Parker. 2001. Parasite resistance and genetic variation in the endangered Gila topminnow. *Animal Conservation*. Vol. 4: 103–109.
- Hubbs C. L. y L. Turner. 1939. Studies of the Fishes of the Order Cyprinodontes XVI. A revision of the Goodeidae. University of Michigan Press. No. 9: 7–23.
- Johnson J. A., J. E. Toepfer y P. Dunn. 2003. Contrasting patterns of mitochondrial and microsatellite population structure in fragmented populations of greater prairie – chickens. *Molecular Ecology*. 12:3335: 3345.
- Kraft R., J. Tardiff, K. S. Krauter y L. A. Leinwand. 1988. Using miniprep plasmid DNA for sequencing double – stranded templates with sequenase. *Biotechniques*. 6: 544 – 547.
- López-López E. y E. Díaz-Pardo. 1991. Cambios distribucionales en los peces del río de La Laja (Cuenca Río Lerma), por efecto de disturbios ecológicos. *An. Esc. Nac. Cien. Biol. México*. Vol. 35: 91–116.

Referencias Bibliográficas

- López-López E. y J. Paulo-Maya. 2001. Changes in the fish Assemblages in the Upper Río Ameca, México. *Journal of Freshwater Ecology*. Vol. 16: 179–187.
- Machordom A., I. Doadrio. 2001. Evidence of cenozoic Bentic-Kabilian connection based on freshwater fish phylogeography (*Luciobarbus*, Cyprinidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 18: (2), 252 – 263.
- Marshall T. C.; P. Sunnucks; J. A. Spalton, A. Greth y J. M. Pemberton. 1999. Use of genetic data for conservation management: the case of the Arabian oryx. *Animal Conservation*. Vol. 2: 269 – 278.
- Mejía Guerrero H. O. 2000. Diversidad Genética de la Lamprea de agua dulce *Lamprea (Tetrapleurodon) geminis* (Álvarez del Villar, 1996). Tesis Maestría en Ciencias (Biología), Instituto Politécnico Nacional. México.
- Posada D. y K.A. Crandall. 1998. MODELTEST. Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics (Oxford)*. 14: 817 – 818.
- Norma Oficial mexicana, PROY-NOM-059-ECOL-2001. Protección Ambiental – Especie de Flora y Fauna Silvestres de México – Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio – Lista de especies en riesgo. Secretaría del Medio Ambiente, recursos naturales y pesca. Diario Oficial de la Federación. 55 pp.
- Raymond M. y F. Rousset. 2001. GENEPOP (versión 3.3): Microsoft Windows – Base Software for Population Genetics. (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop.html>).
- Rowe G.; T. J. C. Beebee y Burke T. 1999. Microsatellite heterozygosity, fitness and demography in natterjack toads *Bufo calamita*. *Animal Conservation*. Vol. 2: 85 – 92.
- Saiki R. K., D. H. Geldfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuch, G. T. Horn, K. B: Mullis y H. A. Erlich. 1988. Primer – directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerasa. *Science*. 239: 487 – 491.
- Sambrook J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. In: Harbor, C. S. (Ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

- Sambrook J. y D. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3ra ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Schultheis A. S., L. A. Weigt y A. C. Hendricks. 2002. Gene flow, dispersal, and nested clade analysis among populations of the stonefly *Peltoperla tarteri* in the southern Appalachians. *Molecular Ecology*. 11: 317 – 327.
- Soto – Galera E. 1989. Estudio Ictiofaunístico de la subcuenca del Río Turbio – Silao – Guanajuato. Tesis de Licenciatura (Biólogo). Instituto Politécnico Nacional. México.
- Soto – Galera E.; E. Díaz – Pardo; E. López – López y J. Lyons. 1998. Fish as indicators of environmental quality in the Río Lerma Basin, México. *Aquatic Ecosystem Health and Management*. 1 (3): 267 – 276.
- Soto-Galera E.; J. Paulo-Maya; E. López-López y J. A. Serna-Hernández. 1999. Change in Fish Fauna as Indication of Aquatic Ecosystem Condition in Río Grande de Morelia – Lago de Cuitzeo Basin, México. *Environmental Management*. Vol. 24: 133–140.
- Strecker U., L. Bernatchez y H. Wilkens. 2003. Genetic divergence between cave and surface populations of *Astynax* in Mexico (Characidae, Teleostei). *Molecular Ecology*. 12: 699 – 710.
- Swofford D. L. PAUP. 1998. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other Methods)*. Beta Version. 4.0b6. Sinauer Associates Sunderland M. A.
- Turgeon J. y Bernatchez L. 2001. Clinal variation at microsatellite loci reveals historical secondary intergradation between glacial races of *Coregonus artedii* (Teleostei: Coregoninae). *Evolution*. 55 (11): 2274 – 2286.
- Voleckaert F. A. M., B. Hänfling, B. Hellemans y G. R. Carvalho. 2002. Timing of the population dynamics of bullhead *Cottus gobio* (Teleostei: Cottidae) during Pleistocene. *J. Evol. Biol.* 15: 930 – 944.

Referencias Bibliográficas

- Waples R. 1998. Evolutionary Significant Unit, Distinct Population Segments, and Endangered Species Act: Reply to Pennock and Dimmick. *Conservation Biology*. 12: 718 – 721.
- Webb S. A. 1998. A phylogenetic analysis of the Goodeidae (Teleostei: Cyprinodontiformes). Tesis Doctoral. Universidad de Michigan. Michigan.
- Webb S. A., J. A. Graves, C. Macías – García, A. E. Magurran, D. Ó. Foighil y M. G. Ritchie. 2004. Molecular Phylogeny of the livebearing Goodeidae (Cyprinodontiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 30: 527 – 544.
- Weir BS, 1990. Genetic data analysis. Sinauer Publ., Sunderland, MA.
- Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F – statistics with special regard to system of mating. *Evolution*. 19: 395 – 420.

Anexo 1

Relación de los individuos

Especie	No. Ind.	Localidad	Extracción de ADN	Secuencia de Citocromo b.
S. bilineata	4331	Río Gde. Morelia	Fenol-cloroformo	Si
S. bilineata	4332	Río Gde. Morelia	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4333	Río Gde. Morelia	Fenol-cloroformo	Si
S. bilineata	4334	Río Gde. Morelia	Fenol-cloroformo	Si
S. bilineata	4335	Río Gde. Morelia	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4336	Río Gde. Morelia	Fenol-cloroformo	Si
S. bilineata	4337	Río Gde. Morelia	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4338	Río Gde. Morelia	Fenol-cloroformo	Si
S. bilineata	4343	Borbollon	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4344	Borbollon	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4349	Borbollon	Fenol-cloroformo	Si
S. bilineata	4350	Borbollon	Fenol-cloroformo	Si
S. bilineata	4360	Borbollon	Fenol-cloroformo	Si
S. bilineata	4361	Borbollon	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4362	Borbollon	Fenol-cloroformo	Si
S. bilineata	4363	Borbollon	Fenol-cloroformo	

S. bilineata	4364	Río Turbio Corralejo	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4365	Río Turbio Corralejo	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4366	Río Turbio Corralejo	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4367	Río Turbio Corralejo	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4368	Río Turbio Corralejo	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4369	Río Turbio Corralejo	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4370	Río Turbio Corralejo	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4371	Río Turbio Corralejo	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4372	Río Turbio Corralejo	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4373	Río Turbio Corralejo	Fenol-cloroformo	Si
S. bilineata	4374	Río Turbio Corralejo	Fenol-cloroformo	Si
S. bilineata	4375	Río Turbio Corralejo	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4376	Río Turbio Corralejo	Fenol-cloroformo	Si
S. bilineata	4377	Río Turbio Corralejo	Fenol-cloroformo	Si
S. bilineata	4378	Salamanca	Fenol-cloroformo	Si
S. bilineata	4379	Salamanca	Fenol-cloroformo	Si
S. bilineata	4380	Salamanca	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4381	Salamanca	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4382	Salamanca	Fenol-cloroformo	Si
S. bilineata	4383	Salamanca	Fenol-cloroformo	Si
S. bilineata	4384	Salamanca	Fenol-cloroformo	

S. bilineata	4385	Salamanca	Fenol-cloroformo	Si
S. bilineata	4386	Salamanca	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4387	Salamanca	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4388	Salamanca	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4389	Salamanca	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4390	Salamanca	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4391	Salamanca	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4392	Salamanca	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4393	Salamanca	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4394	Salamanca	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4395	Salamanca	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4396	Salamanca	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4397	Salamanca	Fenol-cloroformo	
S. bilineata	4398	Salamanca	Kit – Extracción	
S. bilineata	4399	Salamanca	Kit – Extracción	
S. bilineata	4400	Salamanca	Fenol-cloroformo	

Anexo 2

Soluciones

Ácido acético glacial

CH₃COOH 60.05 gr / mol

Densidad de 1.05 gr mol

AcNa 3 M y pH 7

En 200 mL de H₂O MilliQ se disuelven 82.03 gr. de AcNa 1 M. Se esteriliza y se baja el pH con ácido acético glacial.

Ampicilina 50 mg/ml

En 10 ml de H₂O MilliQ se agregan 500 mg de ampicilina (0.5 gr). Se filtra con papel micropore de 0.2 micras.

Azul de Carga 0.25% de azul de bromofenol (SIGMA)

En 40% Glicerol en TAE (40 mL de glicerol en 60 mL TAE) se agregan 0.25 gr. de Azul de bromofenol.

Bromuro de Etidio 10 mg/mL

BSA suero bovino albumina acetilado 10 mg / mL

Cloruro de Magnesio (MgCl₂)

En 1 L de H₂O MilliQ, se agregan 203.3 gr. de MgCl₂ 1 M. Se filtra con papel micropore 0.2 micras.

CTAB

En 100 ml de Tris - ClH 0.1 M (100 mM) pH 8, se agregan 2 gr. CTAB 2%. Hexadecyltri - Methylammonium Bromide (SIGMA), 8.181 gr. de NaCl 1.4 M y 0.7444 gr. EDTA 20 mM. Se disuelven y se le agregan 200 µl de Mercaetanol. Se esteriliza en la autoclave.

Estándar para medir la concentración de ADN

Se mezclan 20 μ l del estándar de DNA 1 mg / ml, 20 μ l TNE 10 X y 160 μ l H₂O MilliQ estéril.

Fenol

Añadir al frasco 400 mL de Hidroxifuinolelina 0.1% y agitar.

Geles de Agarosa al 1.5%.

Se disuelven 1.5 gr. de agarosa (Biotools) en 100 mL de TAE 1 X.

Glicerol 10 %.

En 90 ml de H₂O MilliQ, se agregan 10 ml de glicerol.

IPTG

IPTG (Isopropytio - β - Galactosidasa). Se disuelve 0.25 gr. de IPTG en 8 mL de agua. Se ajusta el volumen a 10 mL y se filtra. Se almacena a -20° C.

LB líquido

En 950 ml de H₂O desionizada se añaden 10 gr. de triptona, 5 gr. de extracto de levadura y 10 gr de NaCl, se disuelve y se ajusta el volumen a 1 Lto. Se esteriliza en autoclave.

LB sólido

Por cada litro de LB líquido se le añaden 15 gr. de agar Bacto.

LB ampicilina

Al medio LB sólido o líquido se le agrega 1 volumen y medio $\times 10^{-3}$ de ampicilina 50 mg/ml.

Marcador de peso molecular 0.5 mg/ml

Al tubo se le añaden 100 μ l de azul de carga y se agita.

Sulfato de Magnesio (MgSO₄) 1 M

En 1 L de H₂O MilliQ, se agregan 246.49 gr. MgSO₄ 1 M. Se filtra con papel micropore de 0.2 micras.

TNE 10 X Buffer

En 100 ml de H₂O MilliQ, se disuelven 1.211 gr. de Tris base, 0.372 gr. de EDTA, 11.689 gr. de Cloruro de Sodio y se ajusta el pH a 7.4 con HCl. Se almacena a 4° C.

Tris HCl pH ((para la solución del CTAB)

En un litro de H₂O MilliQ se disuelven 12,11 gr. de Tris 1 M para quedar en una concentración final de 0.1 M, se ajusta el pH con HCl y se esteriliza.

X-Gal 20 mg / ml

Se disuelven 200 mg. de X – Gal en 10 ml de dimetil formamida. Se almacena a 4°C.

Anexo 3

Tabla. 1. Relación de individuos y las diluciones para cada uno de los microsatélites.

N° catálogo	MicrosatéliteS	Marcaje	Dilución
32	ZT6, ZT43, ZT9	FAM, TET, HEX	01:20
34	ZT6, ZT43, ZT9	FAM, TET, HEX	01:20
38	ZT6, ZT43, ZT9	FAM, TET, HEX	01:20
49	ZT6, ZT43, ZT9	FAM, TET, HEX	01:20
50	ZT6, ZT43, ZT9	FAM, TET, HEX	01:20
60	ZT43, ZT9	TET, HEX	01:20

61	ZT43	TET	01:20
62	ZT6, ZT43, ZT9	FAM, TET, HEX	01:20
64	ZT6, ZT43, ZT9	FAM, TET, HEX	01:20
65	ZT6, ZT43, ZT9	FAM, TET, HEX	01:20
66	ZT6, ZT43, ZT9	FAM, TET, HEX	01:20
67	ZT6, ZT43, ZT9	FAM, TET, HEX	01:20
68	ZT6, ZT43, ZT9	FAM, TET, HEX	01:20
78	ZT6, ZT43, ZT9	FAM, TET, HEX	01:20
79	ZT6, ZT43, ZT9	FAM, TET, HEX	01:20
80	ZT6, ZT43, ZT9	FAM, TET, HEX	01:20
98	ZT6, ZT43, ZT9	FAM, TET, HEX	01:20
32	ZT2, ZT7	FAM	1:2, 1:10
34	ZT2, ZT7	FAM	1:50, 1:40
38	ZT2, ZT7	FAM	1:50, 1:50
49	ZT2, ZT7	FAM	1:2, 1:20
50	ZT2, ZT7	FAM	1:2, 1:20
60	ZT2, ZT7	FAM	1:2, 1:50
61	ZT2, ZT7	FAM	1:50, 1:20
62	ZT2, ZT7	FAM	1:10, 1:40
64	ZT2, ZT7	FAM	1:30, 1:10
65	ZT2, ZT7	FAM	1:30, 1:30
66	ZT2, ZT7	FAM	1:30, 1:2
67	ZT2, ZT7	FAM	1:30, 1:2
68	ZT2, ZT7	FAM	1:10, 1:30
78	ZT2, ZT7	FAM	1:20, 1:30
79	ZT2, ZT7	FAM	1:20, 1:10
80	ZT2, ZT7	FAM	1:2, 1:40
98	ZT2, ZT7	FAM	1:2, 1:2

Anexo 4

Tabla 2. Alelos de tres dígitos para cada uno de los individuos por microsatélite.

No. Muestra	MICROSATÉLITES				
	ZT2	ZT6	ZT7	ZT43	ZT9
4332	262262	307317	153177	189150	411398
4334	262262	350355	145145	153153	427454
4338	260260	330315	145145	178221	395407
4349	262262	317317	145161	166176	450454

4350	260262	311311	145150	166176	454462
4360	260262	350315	145150	166176	435454
4361	260260	340350	145145	166176	418418
4362	260271	315350	145160	176186	454465
4364	262262	293293	141145	166189	498498
4365	260262	307307	143150	166174	422422
4366	260260	307315	150150	158158	413469
4367	260260	301307	150157	158227	494498
4368	260260	315323	143143	158158	398431
4378	262262	317337	150153	158158	442450
4379	260262	323335	150150	196196	410461
4380	260260	315315	150150	174213	438461
4398	262262	340330	145145	213229	398473

Anexo 5.

Tabla 3. Frecuencias alélicas observadas y esperadas para el locus ZT2.

Genotipos	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada
1,1	6	4.121
2,1	4	8.242
2,2	6	3.636
3,1	1	0.515
3,2	0	0.485

3,3	0	0.000
-----	---	-------

Tabla 4. Frecuencias de alelos y Fis para el locus ZT2.

Alelo	Frecuencia	Fis
		W & C
1	+0.5000	+0.4366
2	+0.4706	+0.5493
3	+0.0294	-0.000
Total		+0.4667

Tabla 5. Frecuencias alélicas observadas y esperadas para el locus ZT6.

Genotipos	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada
1,1	1	0.030
2,1	0	0.061
2,2	0	0.000
3,1	0	0.303
3,2	1	0.152
3,3	1	0.303
4,1	0	0.121
4,2	0	0.061
4,3	0	0.303
4,4	1	0.030
5,1	0	0.424
5,2	0	0.212
5,3	1	1.061
5,4	0	0.424
5,5	1	0.636
6,1	0	0.242
6,2	1	0.121
6,3	1	0.606
6,4	0	0.242

6,5	0	0.848
6,6	1	0.182
7,1	0	0.121
7,2	0	0.061
7,3	0	0.303
7,4	0	0.121
7,5	1	0.424
7,6	0	0.242
7,7	0	0.030
8,1	0	0.121
8,2	0	0.061
8,3	0	0.303
8,4	0	0.121
8,5	1	0.424
8,6	0	0.242
8,7	0	0.121
8,8	0	0.030
9,1	0	0.061
9,2	0	0.030
9,3	0	0.152
9,4	0	0.061
9,5	0	0.212
9,6	0	0.121
9,7	1	0.061
9,8	0	0.061
9,9	0	0.000
10,1	0	0.061
10,2	0	0.030
10,3	0	0.152
10,4	0	0.061
10,5	0	0.212
10,6	1	0.121
10,7	0	0.061
10,8	0	0.061
10,9	0	0.030
10,10	0	0.000
11,1	0	0.121
11,2	0	0.061

11,3	0	0.303
11,4	0	0.121
11,5	0	0.424
11,6	0	0.242
11,7	1	0.121
11,8	0	0.121
11,9	0	0.061
11,10	0	0.061
11,11	0	0.030
12,1	0	0.242
12,2	0	0.121
12,3	0	0.606
12,4	0	0.242
12,5	2	0.848
12,6	0	0.485
12,7	0	0.242
12,8	0	0.242
12,9	0	0.121
12,10	0	0.121
12,11	1	0.242
12,12	0	0.182
13,1	1	0.061
13,2	0	0.030
13,3	0	0.152
13,4	0	0.061
13,5	0	0.212
13,6	0	0.121
13,7	0	0.061
13,8	0	0.061
13,9	0	0.030
13,10	0	0.030
13,11	0	0.061
13,12	1	0.121
13,13	0	0.000

Tabla 6. Frecuencias de alelos y Fis para el locus ZT6.

Alelo	Frecuencia	Fis
		W & C
1	+0.0588	+1.0000
2	+0.0294	-0.0000
3	+0.1471	+0.3239
4	+0.588	+1.0000
5	+0.2059	+0.1304
6	+0.1176	+0.4576
7	+0.0588	-0.0323
8	+0.0588	-0.0323
9	+0.0294	-0.0000
10	+0.0294	-0.0000
11	+0.0588	-0.0323
12	+0.1176	-0.1034
13	+0.0294	-0.0000
Total		+0.2335

Tabla 7. Frecuencias alélicas observadas y esperadas para el locus ZT7.

Genotipos	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada
1,1	0	0.000
2,1	0	0.091
2,2	1	0.091
3,1	1	0.394
3,2	0	1.182

3,3	4	2.364
4,1	0	0.333
4,2	1	1.000
4,3	2	4.333
4,4	3	1.667
5,1	0	0.061
5,2	0	0.182
5,3	0	0.788
5,4	1	0.667
5,5	0	0.030
6,1	0	0.030
6,2	0	0.091
6,3	0	0.394
6,4	1	0.333
6,5	0	0.061
6,6	0	0.000
7,1	0	0.030
7,2	0	0.091
7,3	1	0.394
7,4	0	0.333
7,5	0	0.061
7,6	0	0.030
7,7	0	0.000
8,1	0	0.030
8,2	0	0.091
8,3	1	0.394
8,4	0	0.333
8,5	0	0.061
8,6	0	0.030
8,7	0	0.030
8,8	0	0.000
9,1	0	0.030
9,2	0	0.091
9,3	0	0.394
9,4	0	0.333
9,5	1	0.061
9,6	0	0.030
9,7	0	0.030

13,6	0	0.152
13,7	0	0.030
13,8	0	0.030
13,9	0	0.061
13,10	0	0.061
13,11	0	0.061
13,12	0	0.030
13,13	0	0.000
14,1	0	0.030
14,2	0	0.061
14,3	0	0.212
14,4	0	0.182
14,5	0	0.061
14,6	0	0.152
14,7	0	0.030
14,8	0	0.030
14,9	0	0.061
14,10	0	0.061
14,11	1	0.061
14,12	0	0.030
14,13	0	0.030
14,14	0	0.000

Tabla 10. Frecuencias de alelos y Fis para el locus ZT43.

Alelo	Frecuencia	Fis
		W & C
1	+0.0294	-0.0000
2	+0.0588	+1.0000
3	+0.2059	+0.8298
4	+0.1765	+0.1852
5	+0.0588	-0.0323

6	+0.1471	-0.1429
7	+0.0294	-0.0000
8	+0.0294	-0.0000
9	+0.0588	-0.0323
10	+0.0588	+1.0000
11	+0.0588	-0.0323
12	+0.0294	-0.0000
13	+0.0294	-0.0000
14	+0.0294	-0.0000
Total		+0.2289

Tabla 11. Frecuencias alélicas observadas y esperadas para el locus ZT9.

Genotipos	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada
1,1	0	0.000
2,1	0	0.091
2,2	0	0.091
3,1	1	0.030
3,2	0	0.091
3,3	0	0.000
4,1	0	0.030
4,2	0	0.091
4,3	0	0.030
4,4	0	0.000
5,1	0	0.030
5,2	1	0.091
5,3	0	0.030
5,4	0	0.030

10,7	0	0.061
10,6	0	0.030
10,5	0	0.030
10,4	0	0.030
10,3	0	0.030
10,2	1	0.091
10,1	0	0.030
9,9	0	0.000
9,8	0	0.061
9,7	0	0.061
9,6	0	0.030
9,5	0	0.030
9,4	0	0.030
9,3	0	0.030
9,2	0	0.091
9,1	0	0.030
8,8	1	0.030
8,7	0	0.121
8,6	0	0.061
8,5	0	0.061
8,4	0	0.061
8,3	0	0.061
8,2	0	0.182
8,1	0	0.061
7,7	1	0.030
7,6	0	0.061
7,5	0	0.061
7,4	0	0.061
7,3	0	0.061
7,2	0	0.182
7,1	0	0.061
6,6	0	0.000
6,5	0	0.030
6,4	0	0.030
6,3	0	0.030
6,2	0	0.091
6,1	0	0.030
5,5	0	0.000

10,8	0	0.061
10,9	0	0.030
10,10	1	0.000
11,1	0	0.030
11,2	0	0.091
11,3	0	0.030
11,4	0	0.030
11,5	0	0.030
11,6	0	0.030
11,7	0	0.061
11,8	0	0.061
11,9	0	0.030
11,10	0	0.030
11,11	0	0.000
12,1	0	0.030
12,2	0	0.091
12,3	0	0.030
12,4	0	0.030
12,5	0	0.030
12,6	0	0.030
12,7	0	0.061
12,8	0	0.061
12,9	0	0.030
12,10	0	0.030
12,11	0	0.030
12,12	0	0.000
13,1	0	0.030
13,2	0	0.091
13,3	0	0.030
13,4	0	0.030
13,5	0	0.030
13,6	0	0.030
13,7	0	0.061
13,8	0	0.061
13,9	0	0.030
13,10	0	0.030
13,11	0	0.030
13,12	0	0.030

13,13	0	0.000
14,1	0	0.061
14,2	0	0.182
14,3	0	0.061
14,4	0	0.061
14,5	0	0.061
14,6	0	0.061
14,7	0	0.121
14,8	0	0.121
14,9	0	0.061
14,10	0	0.061
14,11	0	0.061
14,12	0	0.061
14,13	1	0.061
14,14	0	0.030
15,1	0	0.152
15,2	0	0.455
15,3	0	0.152
15,4	0	0.152
15,5	0	0.152
15,6	0	0.152
15,7	0	0.303
15,8	0	0.303
15,9	1	0.152
15,10	0	0.152
15,11	1	0.152
15,12	0	0.152
15,13	0	0.152
15,14	1	0.303
15,15	0	0.303
16,1	0	0.061
16,2	0	0.182
16,3	0	0.061
16,4	1	0.061
16,5	0	0.061
16,6	0	0.061
16,7	0	0.121
16,8	0	0.121

16,9	0	0.061
16,10	0	0.061
16,11	0	0.061
16,12	1	0.061
16,13	0	0.061
16,14	0	0.121
16,15	0	0.303
16,16	0	0.030
17,1	0	0.030
17,2	0	0.091
17,3	0	0.030
17,4	0	0.030
17,5	0	0.030
17,6	0	0.030
17,7	0	0.061
17,8	0	0.061
17,9	0	0.030
17,10	0	0.030
17,11	0	0.030
17,12	0	0.030
17,13	0	0.030
17,14	0	0.061
17,15	1	0.152
17,16	0	0.061
17,17	0	0.000
18,1	0	0.030
18,2	0	0.091
18,3	0	0.030
18,4	0	0.030
18,5	0	0.030
18,6	0	0.030
18,7	0	0.061
18,8	0	0.061
18,9	0	0.030
18,10	0	0.030
18,11	0	0.030
18,12	0	0.030
18,13	0	0.030

18,14	0	0.061
18,15	1	0.152
18,16	0	0.061
18,17	0	0.030
18,18	0	0.000
19,1	0	0.030
19,2	0	0.091
19,3	0	0.030
19,4	0	0.030
19,5	0	0.030
19,6	1	0.030
19,7	0	0.061
19,8	0	0.061
19,9	0	0.030
19,10	0	0.030
19,11	0	0.030
19,12	0	0.030
19,13	0	0.030
19,14	0	0.061
19,15	0	0.152
19,16	0	0.061
19,17	0	0.030
19,18	0	0.030
19,19	0	0.000
20,1	0	0.030
20,2	1	0.091
20,3	0	0.030
20,4	0	0.030
20,5	0	0.030
20,6	0	0.030
20,7	0	0.061
20,8	0	0.061
20,9	0	0.030
20,10	0	0.030
20,11	0	0.030
20,12	0	0.030
20,13	0	0.030
20,14	0	0.061

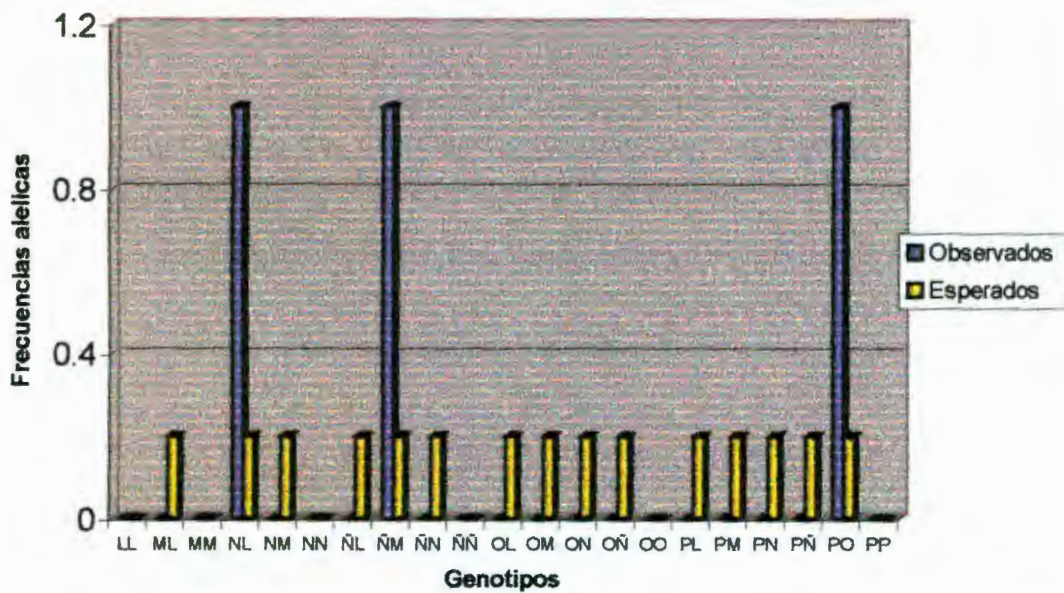


Gráfico 4. Frecuencias alélicas para el locus ZT9 de la población río Grande Morelia.

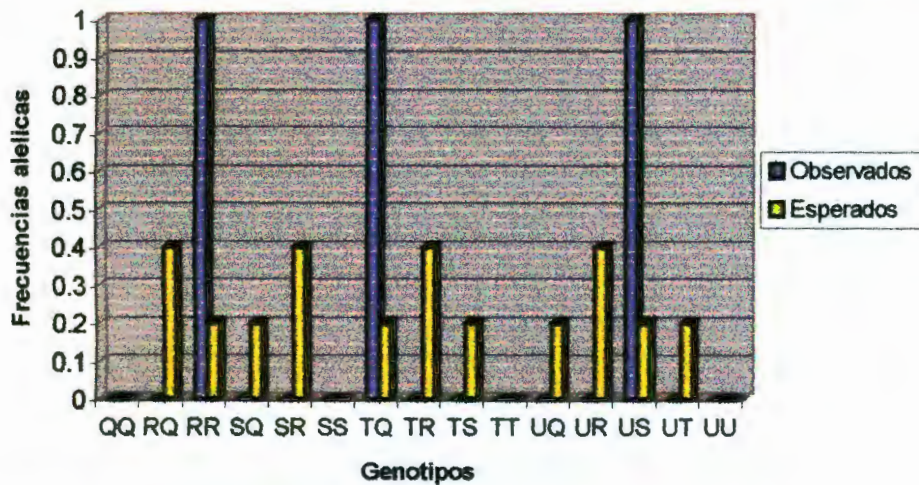


Gráfico 5. Frecuencias alélicas para el locus ZT43 de la población río Grande Morelia.

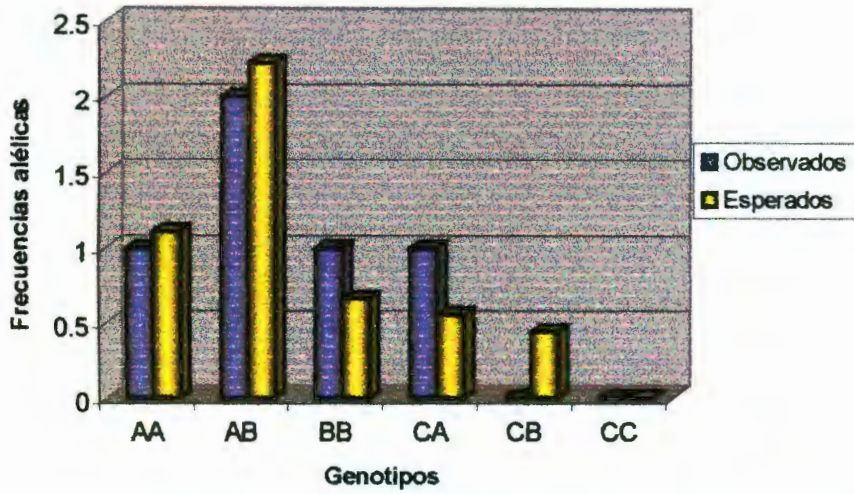


Gráfico 6. Frecuencias alélicas del locus ZT2 de la población del Borbollon.

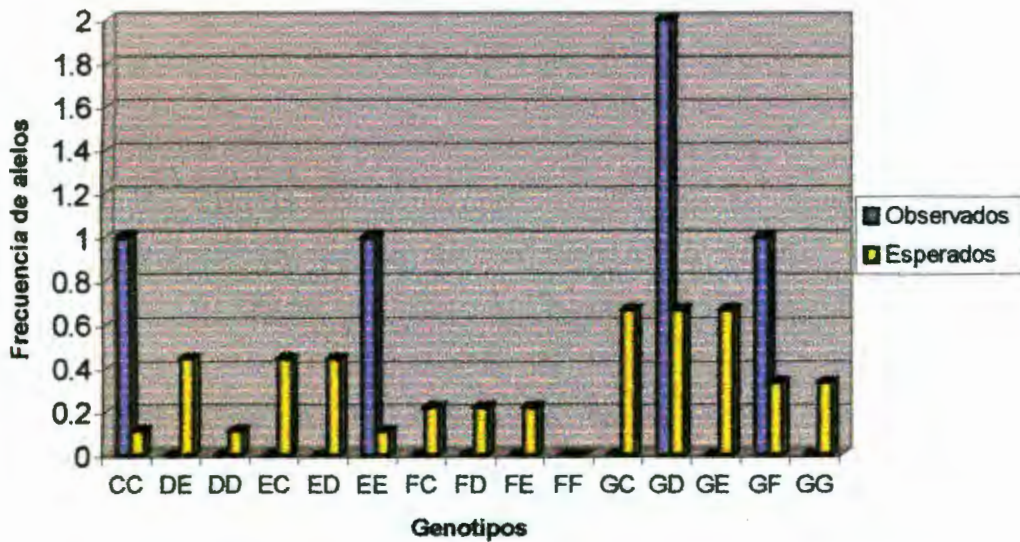


Gráfico 7. Frecuencia de alelos para el locus ZT6 en la población del Borbollon.

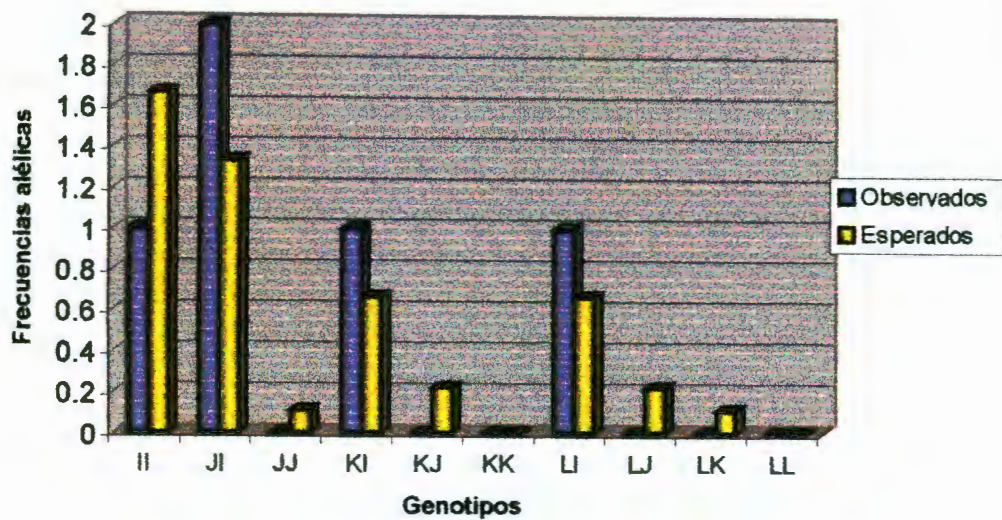


Gráfico 8. Frecuencias alélicas del locus ZT7 de la población del Borbollon.

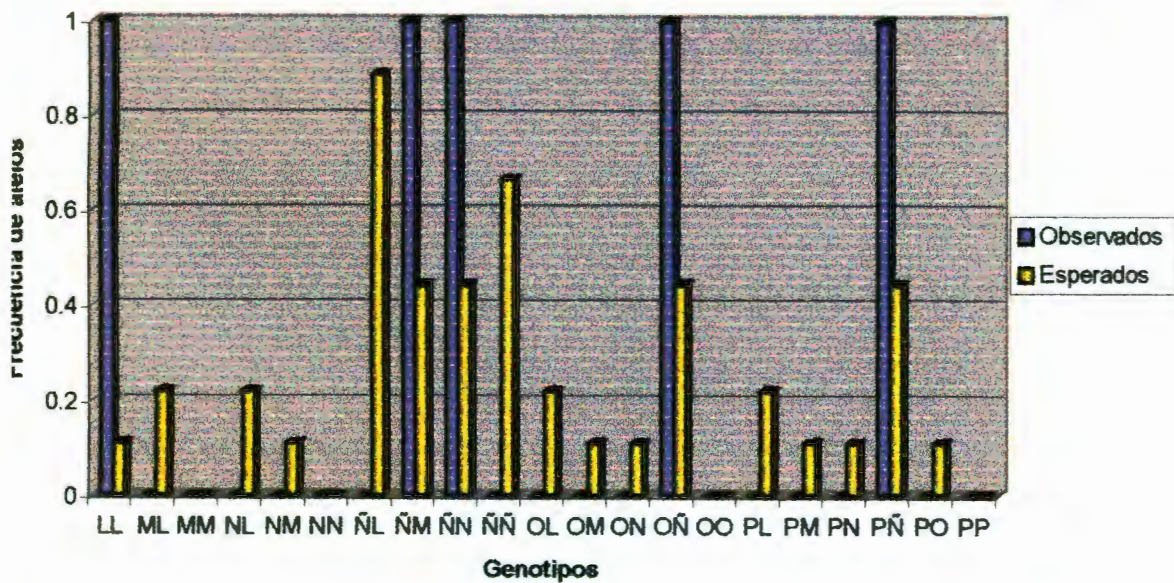


Gráfico 9. Frecuencias alélicas para el locus ZT9 en la población del Borbollon.

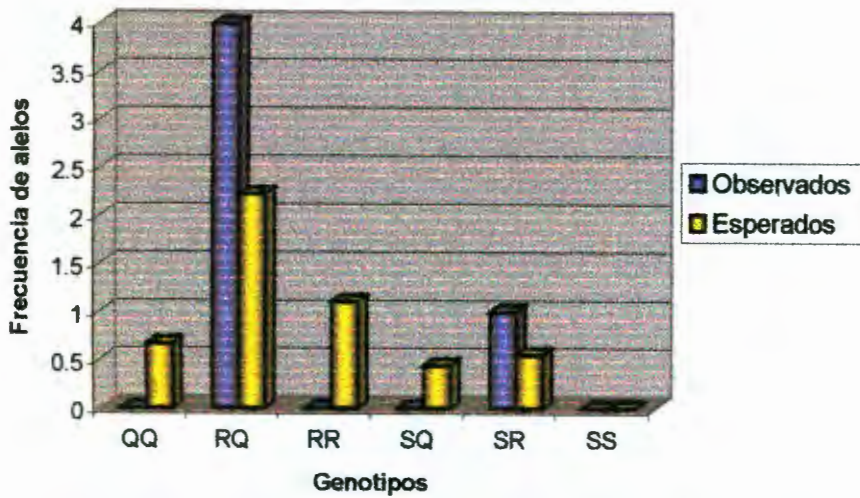


Gráfico 10. Frecuencias alélicas para el locus ZT43 del Borbollon.

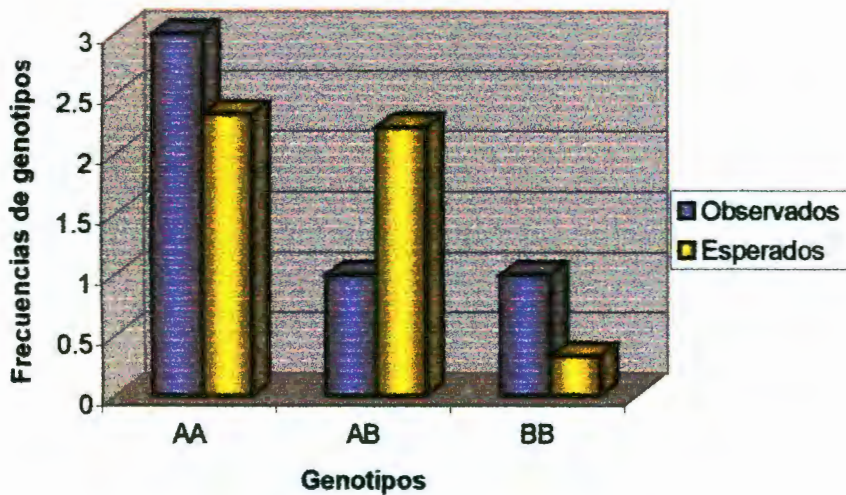


Gráfico 11. Frecuencias de genotipos para el locus ZT2 de la población de Río Turbio

Corralejo.

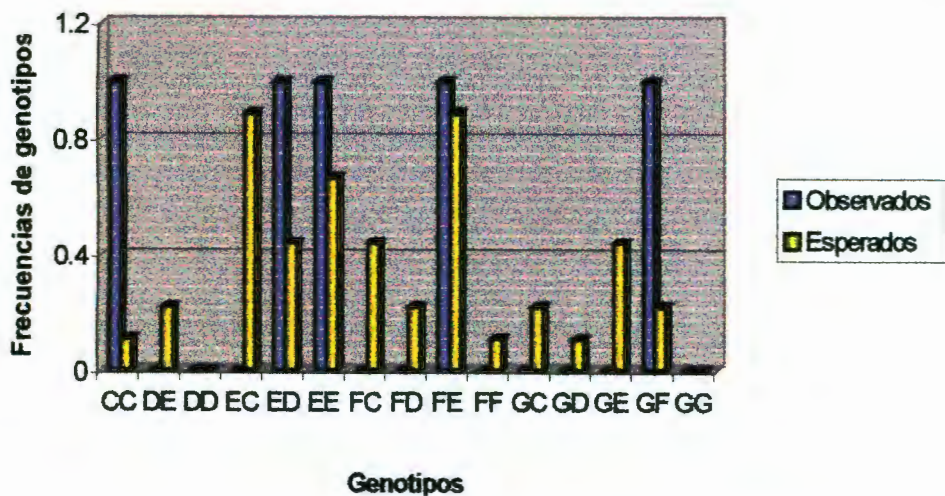


Gráfico 12. Frecuencias de genotipos para el locus ZT6 de la población de Río Turbio Corralejo.

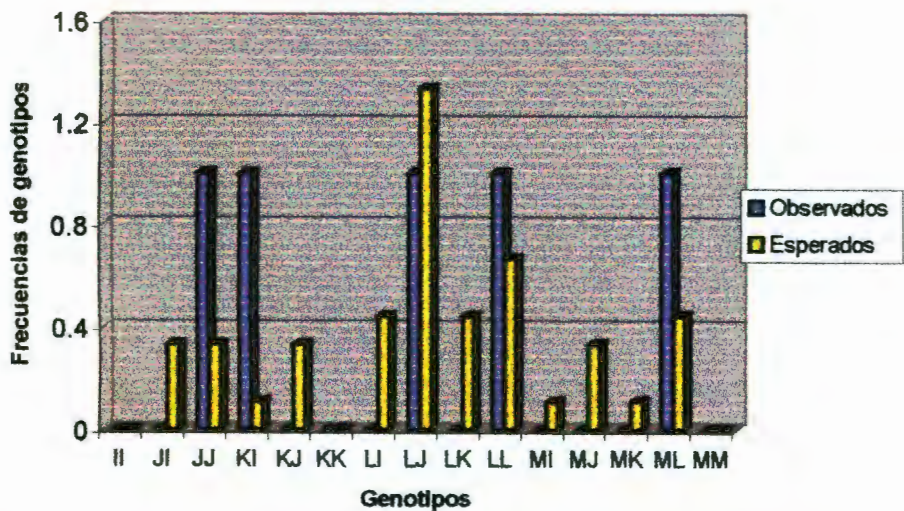


Gráfico 13. Frecuencia de genotipos para el locus ZT7 para el Río Turbio Corralejo.

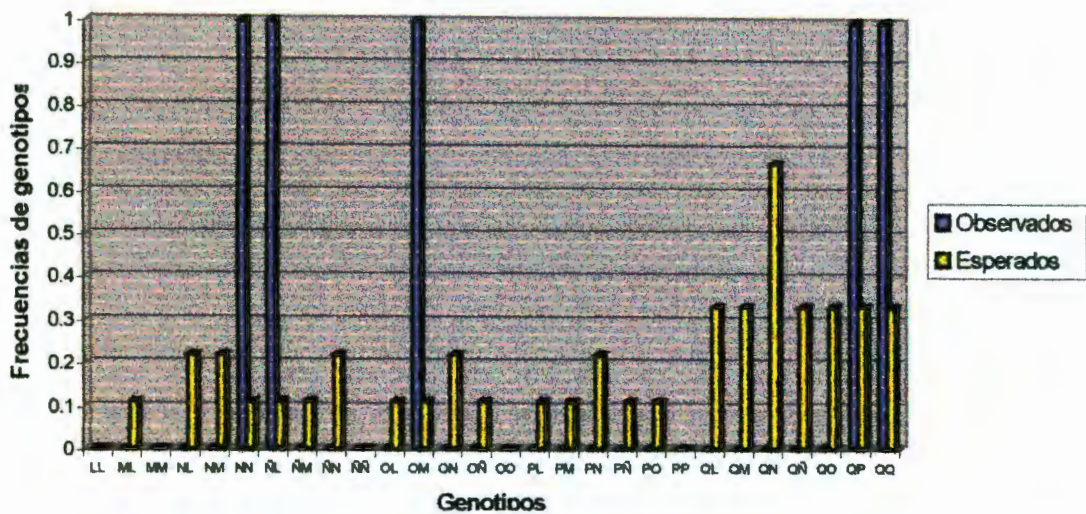


Gráfico 14. Frecuencia de genotipos para el locus ZT9 para el Río Turbio Corralejo.

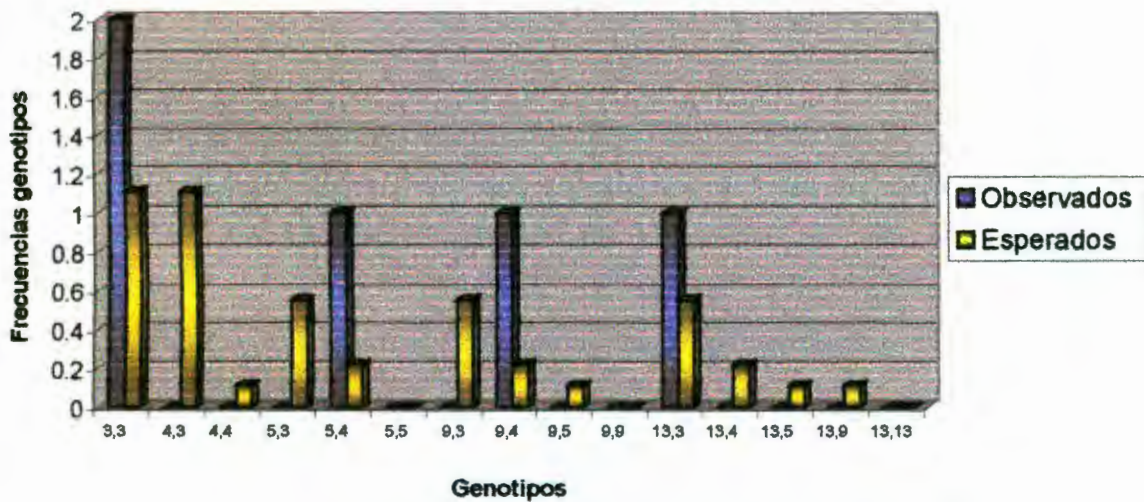


Gráfico 15. Frecuencias de genotipos para el locus ZT43 de la población Río Turbio Corralejo.

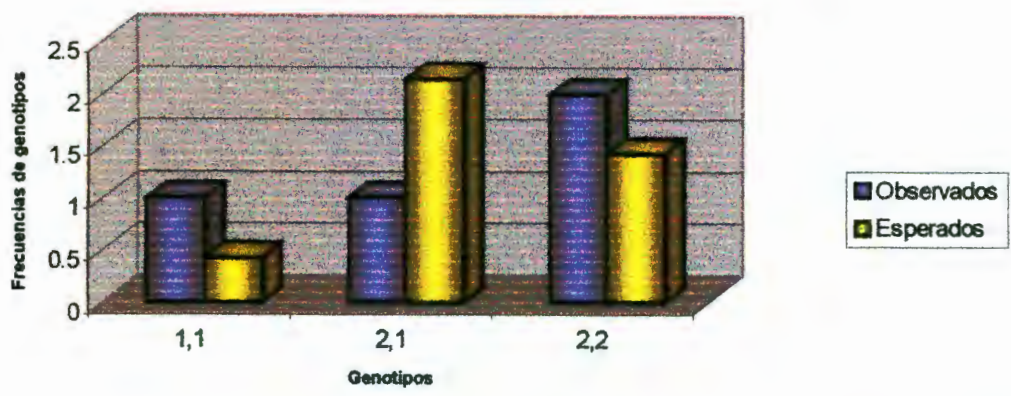


Gráfico 16. Frecuencias de genotipos para el locus ZT2 de la población de Salamanca.

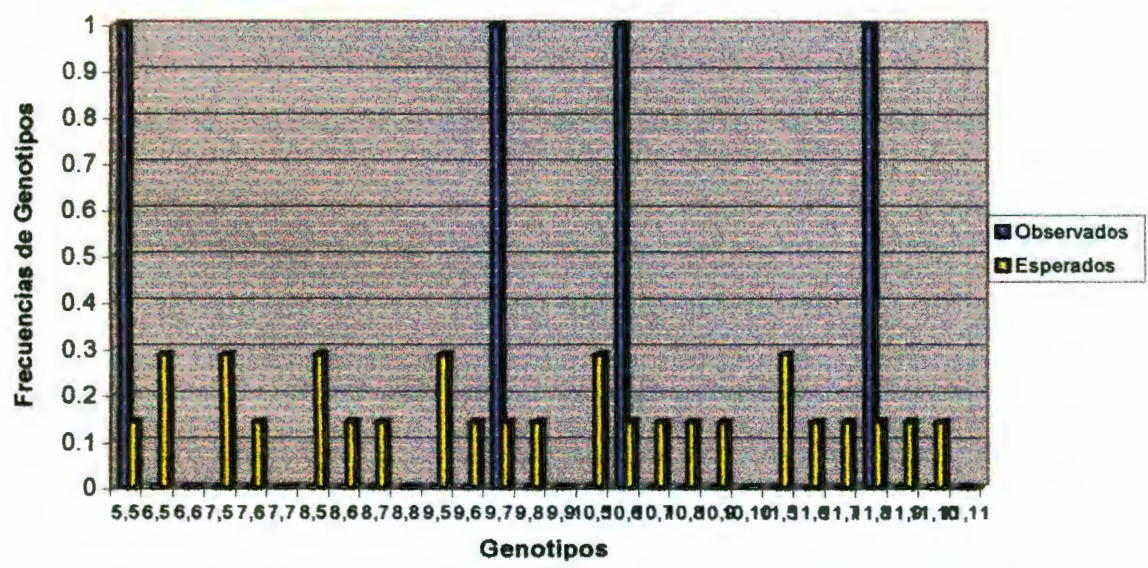


Gráfico 17. Frecuencias de Genotipos para el locus ZT6 de la población de Salamanca.

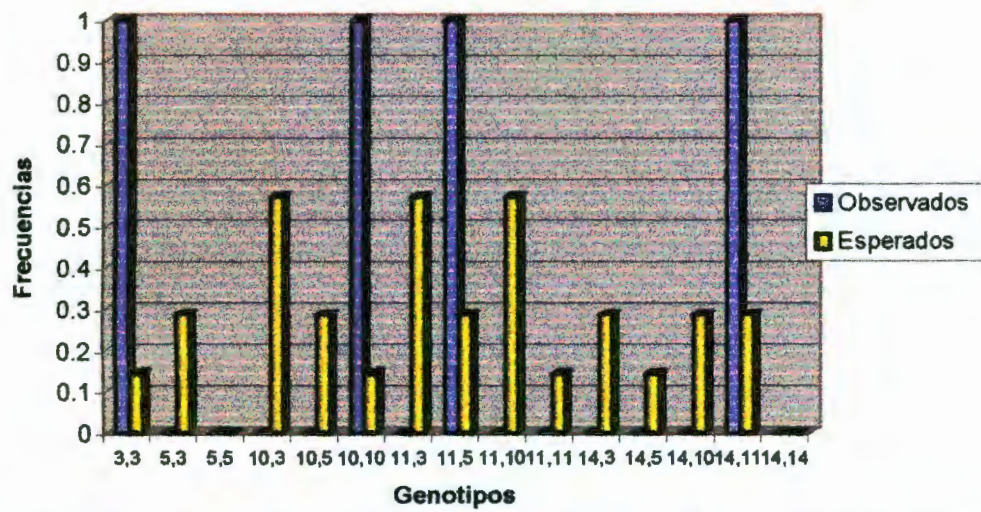


Gráfico 20. Frecuencias de Genotipos para el locus ZT43 de la población de Salamanca.