



Universidad Autónoma del Estado de México



Facultad de Ciencias

BIOLOGÍA

Estructura y diversidad genética de una salamandra micro
endémica (*Pseudoerycea robertsi*) y críticamente amenazada del
Nevado de Toluca.

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIOLOGA

PRESENTA:
Arlene Aguilera Hernández

DIRECTORES:
Dr. Armando Sunny García Aguilar
Dr. Javier Manjarrez Silva

Toluca, Estado de México, 2017

Agradecimientos

“Si he visto más lejos es porque estoy sentado sobre los hombros de gigantes”

Isaac Newton

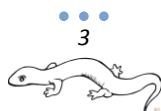
La realización de este trabajo de tesis es la suma de los esfuerzos no solo míos, sino de muchas personas que han tenido la visión de ayudar a estos pequeños seres que habitan esta tierra y la mayoría de la gente los deja desapercibidos, como lo son las salamandras.

En primera instancia quisiera agradecer por todo el apoyo ofrecido de mi coasesor Sunny Armando, que no solo me enseñó todo sobre genética de poblaciones sino que colaboro en la cada parte y cada paso de este trabajo, desde la colecta de campo, las pruebas de laboratorio, la realización de todas las pruebas estadísticas y en la revisión de este trabajo, por ello creo que merece más que mi agradecimiento. Gracias por tu confianza y aceptarme en este gran proyecto sin apenas conocerme y todos los consejos para la realización de este trabajo.

También quisiera agradecer a Andrea por todas las horas de trabajo de campo, aunque a veces tuviéramos que ir por los caminos más arduos e intransitables del Nevado; nunca olvidare todo el apoyo que me diste en las largas horas de laboratorio esperando los resultados, siempre me diste ánimos para seguir con los experimentos hasta que salieran bien.

A mi asesor Javier Manjarrez gracias por todos sus consejos y valiosos comentarios, también por colaborar en la realización de este proyecto, creo que no hubiera sido posible sin su ayuda.

A mi amigo Esponja, siempre te agradeceré por todos tus consejos tanto en la tesis como en las crisis existenciales, un amigo es quien te da la mano aunque todo este de cabeza y tu siempre me has brindado tu ayuda, se que llegarás muy lejos por la gran persona que eres. Erika y Pilar amigas de la carrera y de la vida, han sido una parte fundamental en mi carrera, por todas las locuras y los consejos que nos ayudaron a sobrellevar las presiones de la carrera y la tesis, gracias. También a mis amigos Memo, David, Diana, Ariana, Angel, Mario, Víctor, America, Zulay por toda su buena vibra y por animarme a terminar este proyecto y echarle cada vez más ganas; se que faltan mas amigos de mencionar que no acabaría, pero eso me hace sentir muy



agradecida por también ser parte de su vida y que siempre me han ayudado cuando los he necesitado.

A mis padres, gracias por permitirme cumplir todos mis sueños y darme las bases para desarrollarme en el mundo actual, gracias por apoyarme para realizar una carrera y más que nada por inculcarme ser mejor siempre, hasta ser mejor que ustedes.

A Diego Ivar muchas gracias por todos los ánimos que me das siempre, por tu confianza y por siempre escucharme, nunca olvidare todo lo bien que me hace estar junto a ti.

A Fabiola Ramírez Corona muchísimas gracias por permitirnos trabajar en su laboratorio de la UNAM donde pudimos realizar todos los experimentos y por prestarnos todos los equipos, siempre dispuesta a ayudarnos en cada duda que nos surgía en el laboratorio y siempre estar al pendiente de que nos salieran bien los experimentos.

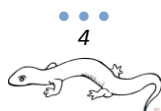
A mi revisor Octavio Monroy por sus valiosos comentarios en el trabajo escrito y por enseñarme tantas cosas en la carrera, desde bioestadística hasta manejo de fauna, siempre recordare esas clases. A Ulises Aguilera, que no solo fue mi maestro y revisor, sino mi tutor; siempre apoyándome desde el principio de la carrera, gracias por esas pláticas motivacionales y todos los conocimientos que me transmitió.

A la UAEMex mi casa de estudios que me acogió desde la prepa y gracias a ello conocí a las personas más importantes en mi vida, y a todos los maestros que se tomaron el arduo trabajo de transmitirme sus diversos conocimientos y sus experiencias en este camino que es la biología.

A David Cortés por ayudarme en todos los trámites de la titulación.

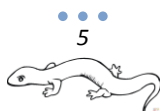
Al COMECYT por la beca de tesis otorgada para la realización de este proyecto.

Como cite con anterioridad he llegado lejos porque estoy sentada en hombros de gigantes y para mí esos gigantes son mis maestros, mis padres y mis amigos que han aportado su ladrillo en la construcción de mí misma y a la vez de esta tesis, y ahora yo quiero aportar mi granito de arena en la conservación de esta salamandra, porque si no las estudiamos y no hacemos nada para asegurar su sobrevivencia, en unos años ya no las podremos volver a ver.



Índice General

Resumen	8
Introducción.....	11
<i>Declive global de los anfibios.....</i>	<i>11</i>
<i>Procesos en poblaciones reducidas</i>	<i>12</i>
<i>Diversidad y estructura genética.....</i>	<i>14</i>
Antecedentes	18
<i>Pseudoeurycea robertsi</i>	<i>19</i>
<i>Estudios genéticos anteriores</i>	<i>20</i>
Hipótesis	22
Objetivos	22
<i>Objetivos Particulares.....</i>	<i>22</i>
Materiales y Métodos.....	23
<i>Área de estudio</i>	<i>23</i>
<i>Colecta y preservación de muestras.....</i>	<i>25</i>
<i>Extracción de DNA.....</i>	<i>25</i>
<i>PCR y secuenciación.....</i>	<i>25</i>
Análisis genéticos	28
<i>Alelos nulos, errores de lectura y errores de amplificación</i>	<i>28</i>
<i>Definición de grupos genéticos.....</i>	<i>29</i>
<i>Equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) y desequilibrio de ligamiento.....</i>	<i>31</i>
<i>Diversidad genética.....</i>	<i>34</i>
<i>Estructura genética</i>	<i>36</i>
<i>Demografía histórica.....</i>	<i>42</i>
Resultados.....	45
<i>Definición de grupos genéticos.....</i>	<i>45</i>
<i>Equilibrio de Hardy-Weinberg y Desequilibrio de Ligamiento</i>	<i>46</i>
<i>Diversidad genética.....</i>	<i>47</i>
<i>Estructura genética</i>	<i>53</i>
<i>Demografía Histórica.....</i>	<i>58</i>



Discusión.....	62
Implicaciones en la conservación.....	70
Conclusiones.....	73
Literatura citada.....	74
Anexos.....	91

Índice de figuras

Figura 1. Vórtice de extinción. Extraído de Rocha y Gasca (2007).....	13
Figura 2. Fotografía de <i>Pseudoeurycea robertsi</i> en el Nevado de Toluca.....	20
Figura 3. Mapa del Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca.....	24
Figura 4. Programa para llevar a cabo el PCR para la amplificación de los 9 loci.....	27
Figura 5. Amplificación del microsatélite PLT 064 en el software Peak Scanner v1.0.....	28
Figura 6. A. Grafica de barras con las 3 poblaciones. B. Distribución de las poblaciones.....	46
Figura 7. Mapa de las localidades de los muestreos.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 8 Frecuencias alélicas para cada uno de los locus en las poblaciones.....	49
Figura 9. Correlacion entre los índices de diferenciación F_{ST} y $Dest$	54
Figura 11. Árbol construido por el método de N-J.....	56
Figura 10. Análisis de componentes principales discriminante.....	56
Figura 12. Árbol construido utilizando las distancias de Bruvo <i>et al.</i> (2004).....	57
Figura 13. Prueba de Mantel con valor de correlación.....	57
Figura 14. Media del coeficiente de entre todas las poblaciones de <i>P. robertsi</i>	59

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Clasificación de las tres familias de microsatélites.	18
Cuadro 2. Descripción de 9 microsatélites polimórficos desarrollados para <i>P. leprosa</i>	26
Cuadro 3. Equilibrio de Hardy-Weinberg y los coeficientes de endogamia (W&C).....	46
Cuadro 4. Número total de alelos por población y locus.....	48
Cuadro 5. Número de genotipos por locus para el total de las poblaciones y para cada población.	50
Cuadro 6. Valores de diversidad genética por cada locus en todas las poblaciones.	51
Cuadro 7. Valores de diversidad genética por población y por cada locus.	52
Cuadro 8. Índices de diferenciación de todas las poblaciones y para cada locus..	53
Cuadro 9. Diferenciación genética para cada población.	54
Cuadro 10. Análisis de varianza molecular en base en los valores de F_{ST}	55
Cuadro 11. Análisis de varianza molecular con base en los valores de R_{ST}	55
Cuadro 12. Relaciones de parentesco	58
Cuadro 13. Tamaño efectivo poblacional en cada una de las poblaciones.....	60
Cuadro 14. Prueba de cuello de botella para todas las poblaciones	61
Cuadro 15 Exceso de heterocigosis en cada una de las poblaciones	61
Cuadro 16. Estudios anteriores con el uso de microsatelites.	64

Estructura y diversidad genética de una salamandra micro endémica (*Pseudoerycea robertsi*) y críticamente amenazada del Nevado de Toluca.

Resumen

Los anfibios están sufriendo la peor crisis de extinción en su historia evolutiva, se considera que recientemente ha ocurrido una reducción drástica de sus poblaciones y áreas de distribución. El factor que más impacta en la disminución de las poblaciones de anfibios mexicanos es la deforestación y transformación del hábitat; esta fragmentación provoca en muchos casos el aislamiento de las poblaciones, generando una depresión por endogamia. Favoreciendo que las poblaciones o especies sean vulnerables a procesos estocásticos que pueden llevar a extinciones locales o totales, ya que debajo de un cierto tamaño poblacional se reduce la adecuación y se genera un ciclo de deriva génica.

Pseudoerycea robertsi es una salamandra microendémica (familia Pletodontidae), con hábitat restringido dentro del Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca (APFFNT). En los últimos años, el cambio en las prácticas de uso de suelo, el aumento de los asentamientos humanos y el cambio de protección del APFFNT ha provocado la disminución y calidad del hábitat donde radica *P. robertsi*. Estas características favorecen procesos de pérdida de diversidad genética, cuellos de botella y por lo tanto deriva génica que podrían poner en riesgo a la especie. Para evaluar la hipótesis de que la fragmentación antropogénica y la distancia geográfica repercute en la diversidad genética y la estructura poblacional de *P. robertsi*, se colectaron 96 individuos de 6 poblaciones utilizando 9 loci de microsatélites. Así mismo se determinó el posible efecto del tamaño efectivo y la endogamia dentro y entre las poblaciones, para proponer estrategias de conservación que aseguren la conservación de esta salamandra.

En general la especie presentó niveles de diversidad genética moderados similar a lo observado en otras especies de anfibios con distribuciones restringidas, sin embargo la población de Palo Seco presentó bajos niveles de diversidad genética comparada con las otras poblaciones de estudio, así como también se encontró fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg debido a una deficiencia de heterocigotos.

El análisis de estructura genética revela que existen tres grupos genéticos, con una estructuración débil. Las localidades de Amanalco, Amanalco C, Mesón Viejo y Carretera son un grupo genético, Rancho y Palo seco representan otro grupo genético cada una. El tamaño poblacional efectivo para



el total de las poblaciones es bajo pero similar a lo observado en otros anfibios, siendo menor a 50 individuos dependiendo de la frecuencia alélica empleada. Se encontraron evidencias de endogamia en 3 de las poblaciones estudiadas, lo que refuerza la hipótesis de que *P. robertsi* pasa por un proceso de endogamia, deriva génica o un sesgo reproductivo que está incrementando el parentesco. Dado que se ha encontrado un cuello de botella reciente tomando el total de las poblaciones y en tres de las seis poblaciones bajo estudio, es evidente que se inicia el declive de la población por lo que es necesario aplicar urgentemente estrategias de conservación que garanticen la sobrevivencia de *P. robertsi*.

Palabras Clave: fragmentación antropogénica, endogamia, tamaño poblacional, microsatélites, especie amenazada, conservación.

Structure and genetic diversity of a micro endemic salamander threatened (*Pseudoerycea robertsi*) in the Nevado de Toluca.

Abstract

Amphibians are suffering the worst crisis of extinction in their evolutive history, it is considered a recently and drastic reduction of their populations and areas of distribution. Possibly, deforestation and vegetation transformation are the factors that most impacts on the decline of Mexican amphibian populations inducing habitat fragmentation. This fragmentation in many cases caused the isolation of the populations, generating a endogamic depression, the species become extremely vulnerable to extinction below a certain population size because fitness is reduced and a cycle of high genetic drift is generated, with population vulnerable to stochastic events until they reach extinction

Pseudoerycea robertsi is a microendemic salamander (family Pletodontidae), its habitat is restricted within the “Area of protection of flora and fauna Nevado de Toluca” (APFFNT). In recent years, the change in land use practices, human settlements and the new category of protection from “Nevado de Toluca” to APFFNT has led to a decrease in the area and quality of the habitat where *P. robertsi* inhabit. To evaluate the hypothesis that anthropogenic fragmentation and geographic distance affect genetic variation and population structure of *P. robertsi*, 96 individuals were collected and 9 microsatellite loci were used from 6 localities within the APFFNT: Amanalco, Amanalco C, Mesón Viejo, Carretera, Rancho, Palo Seco. Likewise, the possible effect of effective size and inbreeding

within and among populations was determined to propose measures to ensure the conservation of this salamander.

Pseudoeurycea robertsi presents moderate levels of genetic variation similar to other species of amphibians with restricted distributions, however the population of Palo Seco presented low levels of genetic variation compared to the other study populations, as well as outside Hardy-Weinberg equilibrium due to a deficiency of heterozygotes.

The analysis with Geneland reveals that there are three genetic groups, although with a weak structuring in the populations but detectable when allocating the populations of Amanalco, Amanalco C, Mesón Viejo and Carretera within a genetic group populations, while Rancho and Palo Seco represent the rest of the groups. The effective population size for the total population is low but similar to that observed in other amphibians, being less than 50 individuals depending on the allelic frequency used. Evidence of endogamy was found in 3 of the studied populations, reinforcing the hypothesis that the species is undergoing a process of inbreeding or gene drift that is increasing kinship. And since a recent bottleneck has been found by taking the total populations and in three of the six populations under study, it is clear that population decline is beginning to occur, and conservation strategies need to be urgently to guarantee the long-term survival of *P. robertsi*.

Key words: anthropogenic fragmentation, inbreeding, population size, microsatellite, Threatened Species, conservation.

Introducción

Declive global de los anfibios

Los anfibios están sufriendo la peor crisis de extinción en su historia evolutiva (Wake y Vredenburg 2008; Parra-Olea *et al.* 2014), con aproximadamente un 40 % de las especies amenazadas en todo el mundo según los criterios de la UICN (Hoffmann *et al.* 2010). Si bien las extinciones son un fenómeno biológico natural, las tasas se han incrementado, especialmente en vertebrados, reportándose para el caso de los anfibios declinaciones poblacionales y reducción drástica de sus áreas de distribución (Wells 2007). Sin embargo, las extinciones que formaron parte de la historia evolutiva se desarrollaron en largos periodos de tiempo; permitiendo el surgimiento de nuevas especies, mientras, que las actuales extinciones suceden tan rápidamente que no permiten que la acción de las fuerzas evolutivas dé origen a nuevas especies (Allendorf y Luikart 2007; Navarrete-Vargas 2008).

Se han propuesto varias causas que por separado o conjuntamente podrían contribuir al declive de los anfibios (Corn 2001), como el cambio climático y las alteraciones atmosféricas, introducción de especies exóticas, enfermedades infecciosas emergentes y modificaciones antropogénicas de sus hábitats naturales (Pounds *et al.* 1999; Kucken *et al.* 1994; Blaustein *et al.* 1998; Berger *et al.* 1998; Noël *et al.* 2007). La mayor parte de las especies tienen asociados límites de tolerancia abióticos que influyen en su fenotipo (Velázquez 2002). En consecuencia se predice que las alteraciones de la temperatura y las precipitaciones asociadas al cambio climático, modificarán los hábitats de numerosas especies ampliando o disminuyendo su rango de distribución (Lorente *et al.* 2004). Los anfibios son especialmente sensibles a cambios ambientales al tener sus fases metamórficas y procesos fisiológicos muy dependientes de las condiciones hídricas y térmicas del hábitat (Marco 2003). Se han encontrado evidencias que los niveles de radiación UV-B (280-320 nanómetros) en regiones templadas han contribuido a la declinación de algunas especies de anfibios; las más vulnerables son aquellas que depositan sus huevos en aguas abiertas y superficiales, ya que los huevos de la mayor parte de los anfibios carecen de cubierta dura que pueda bloquear la radiación, los rayos UV o la contaminación (Blaustein y Wake 1995; Molina y Péfaur 2010). Por otro lado, la introducción de especies exóticas puede afectar a las especies nativas ya sea por depredación, competencia o transmisión de enfermedades o parásitos (Lavilla 2001). Como el hongo *Batrochytrium dendrobatidis*, que está afectando a poblaciones de todo el mundo (Berger *et al.*



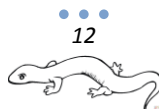
1998; Bosch *et al.* 2001); y la infección por ranavirus, que fue documentada en Asturias (2007) en larvas de sapo *Alytes obstetricans* (Balseiro *et al.* 2009; García-González 2012).

El factor que más impacta en la disminución de las poblaciones de anfibios mexicanos es la deforestación y transformación de vegetación (Frias-Alvarez 2010; Parra-Olea *et al.* 2014), esta sobreexplotación de los recursos naturales, provoca la pérdida, degradación y fragmentación del hábitat de numerosas especies; llevándolas a estados críticos de supervivencia, y en los peores casos, a su extinción (Navarrete-Vargas 2008). El desarrollo urbano ha sido el principal factor en el cambio del paisaje y en la fragmentación del hábitat. Durante la segunda mitad del siglo XX, la proporción de la población humana que vive en las zonas urbanas ha aumentado de 29% en 1950 a 47% en el 2000 (Miller y Hobbs 2002; Noel *et al.* 2007). La urbanización amenaza actualmente a más de un tercio de las especies conocidas de anfibios en el mundo y, además, se trata de un proceso en expansión (Hamer y McDonnell 2008).

Además de su vulnerabilidad fisiológica, su ecología también contribuye a su sensibilidad a alteraciones del hábitat. Los anfibios presentan un ciclo de vida complejo con una fase larvaria con requerimientos de hábitat y nutricionales diferentes al adulto (Pechmann y Wilbur 1994), de manera que su condición y abundancia podría reflejar los efectos combinados o sinérgicos de interacciones entre ecosistemas (Blaustein y Wake 1995; García-González 2012). Por otro lado, sus poblaciones funcionan como un sistema metapoblacional (Marsh y Trenham 2001) en el cual la distribución de las especies cambia frecuentemente entre años incluso en ambientes inalterados (Skelly *et al.*, 1999), lo cual determina que la eliminación de un punto concreto de reproducción o de dispersión, condiciona la viabilidad de núcleos reproductivos próximos, conectados con éste. Estos núcleos pueden verse implicados a modo de efecto dominó, desapareciendo igualmente aunque las alteraciones no incidan directamente sobre ellos (Gill 1978; Berven y Grudzien 1990; Sinsch 1992; Marsh y Trenham 2001).

Procesos en poblaciones reducidas

De acuerdo con Frankham *et al.* (2002) la fragmentación del hábitat involucra dos procesos: 1) la reducción en el área total del hábitat; y 2) la generación de parches aislados a partir de una distribución continua (Castellanos-Morales 2009). En muchos casos la fragmentación ha provocado el aislamiento de las poblaciones, las especies se hacen extremadamente vulnerables a la extinción por debajo de un cierto tamaño poblacional (Van de Zande *et al.* 2000) y la reducción de la migración



entre los parches imposibilita el rescate por individuos colonizadores provenientes de otros fragmentos de manera que se afectan la composición genética de las especies (Noël *et al.* 2007; Castañeda-Rico 2008; Blanché 2011). Los fragmentos de hábitat pequeños solamente pueden sustentar poblaciones pequeñas, cuando baja el tamaño poblacional, la estocasticidad demográfica y ambiental, generan una pérdida de diversidad genética, disminuyendo la abundancia hasta llegar a fenómenos donde la población se encuentre en peligro (Blanché 2011; Gallina y López-González 2011), como los llamados vórtices de extinción o los cuellos de botella. Los primeros ocurren cuando en poblaciones pequeñas, demográficamente inestables y con altos niveles de endogamia se presenta una reducción de la adecuación y un ciclo de alta deriva génica (Primack *et al.* 2001; Frankham *et al.* 2002)., lo que refuerza el decline, aumentando la depresión por endogamia y la susceptibilidad a eventos estocásticos reduciendo aun más el tamaño poblacional hasta llegar a la extinción (Castellanos-Morales 2009; Rocha y Gasca 2007; Fig. 1.)

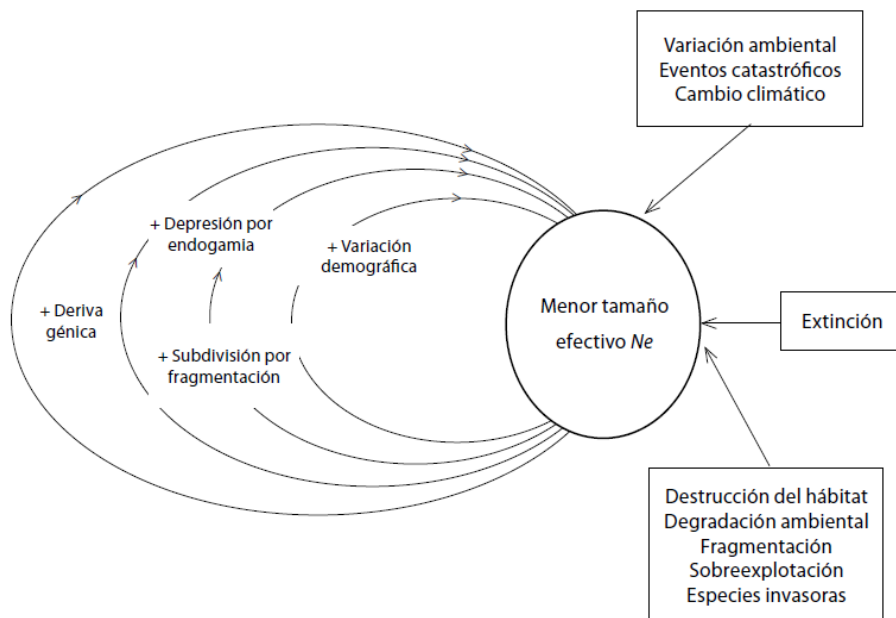


Figura 1. Cuando una población es muy pequeña, los fenómenos estocásticos incrementan el efecto de los problemas genéticos, por lo que la población sufre un vórtice de extinción. Extraído de Rocha y Gasca (2007).

Los cuellos de botella, por otra parte, son reducciones drásticas en los tamaños efectivos y pueden repercutir en los niveles de variación genética (Rocha y Gasca 2007). Las poblaciones pueden experimentar la pérdida de alelos raros y una disminución en la heterocigocidad a través de la endogamia (Reed y Frankham 2003). Por lo tanto, si las poblaciones permanecen pequeñas por largos periodos de tiempo, el efecto de error de muestreo es acumulativo, generando cambios al



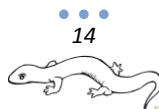
azar en las frecuencias alélicas, lo que se conoce como deriva génica (Hartl y Clark 1999). Por el contrario, en poblaciones de mayor tamaño las fluctuaciones no son tan grandes, se espera que mantengan niveles de variación genética mayores que en las poblaciones pequeñas (Rocha y Gasca 2007).

Otro problema de las poblaciones pequeñas es el llamado colapso mutacional “*mutational meltdown*”, en el cual las mutaciones deletéreas se van acumulando por que la selección es menos eficiente; mientras que en poblaciones grandes las mutaciones deletéreas son removidas por la selección natural y esta elimina a los individuos con mayor carga genética (Lynch 1993). Si la población comienza a declinar, el número de individuos disponible para que se eliminen las mutaciones deletéreas disminuye, la purga se vuelve cada vez menos eficiente, aumenta la carga genética de la población y la adecuación disminuye (Lynch 1993; Lande 1995; Lynch *et al.* 1995).

Diversidad y estructura genética

La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) reconoce tres niveles jerárquicos de diversidad para conservar la naturaleza: la diversidad genética, la diversidad de especies y la diversidad de ecosistemas (McNeely *et al.* 1990). Se puede definir a la variación genética como “la capacidad genética para variar”, y por ende, la capacidad a responder a variaciones de índole ambiental. Por ello, la diversidad genética constituye la base del progreso genético y el motor que impulsa la evolución (Rochambeau *et al.* 2000; Wayne y Miyamoto 2006).

Los niveles de diversidad genética dentro de las poblaciones y la divergencia entre éstas varía de acuerdo con el grado de fragmentación que presentan (Garner *et al.* 2005), es decir, a mayor distancia geográfica entre los fragmentos y/o a mayor tiempo de aislamiento, se espera que la diversidad genética disminuya y, por tanto, las poblaciones presenten una mayor divergencia (Frankham *et al.* 2005). También examinar estas variaciones genéticas permite elucidar sus asociaciones históricas y los procesos de reestructuración genética que pueden conducir a la especiación (Kirchman *et al.* 2000). La variación genética se da por cambios en secuencias de DNA resultado de mutaciones nucleotídicas, inserciones o deleciones de fragmentos como los transposones, duplicaciones, o por cambios en la estructura y el número de cromosomas (Wayne y Miyamoto 2006; Mendoza-Martínez 2011); la recombinación también genera variación a través de



procesos como la conversión génica y la hibridación de hebras de DNA (Lewin 2008). El flujo de genes puede ser considerado como una tercera fuente de variación; se define como el intercambio de genes entre poblaciones diferentes, generalmente contiguas o, a la introducción de nuevos genes en una población desde fuentes externas (Solbrig 1970; Donoso *et al.* 2004). Las fuerzas evolutivas que disminuyen la variación genética dentro de las poblaciones son la deriva genética que disminuye la variación a través de la fijación de alelos, y algunas formas de selección natural, como la selección direccional (Pierce 2009).

La diversidad genética representa un balance entre la mutación, la deriva génica y la selección natural, y altos niveles de variación son considerados “sanos” ya que confieren a las poblaciones la habilidad de responder a cambios temporales y espaciales que ocurren en el ambiente (Amos y Harwood 1998; Primack *et al.* 2001). Al reducirse el tamaño efectivo poblacional se observa un incremento en el efecto de la endogamia y la deriva génica, lo cual implica una tendencia hacia la pérdida y fijación de alelos y una disminución en la heterocigosidad (Frankham 1997; Frankham *et al.* 2005). Los niveles de diversidad genética en una población están determinados por el número de genes con más de un alelo (genes polimórficos) y por el número de alelos para cada gen polimórfico. La existencia de un gen polimórfico permite a algunos individuos de una población diploide ser heterocigotos para ese gen, esto es, reciben un alelo diferente del gen de cada uno de sus padres. Por lo ello la heterocigosis es una medida que permite describir la proporción de heterocigotos en un único locus o en un número determinado de loci en una población (Gillespie 2004; Hedrick 2005).

La mayoría de las poblaciones se encuentran agrupadas en subpoblaciones más pequeñas dentro de las cuales ocurre el apareamiento (Hartl y Clark 2007) por lo que, muestran diferentes grados de estructuración genética. Se entiende por estructura genética a la cantidad y distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones de una determinada especie (Gillespie 2004), y puede ser el resultado de la interacción entre factores ambientales, historias de vida (Sistemas de apareamiento), fuerzas azarosas (Deriva genética, mutación) y deterministas (Selección natural) (Hartl y Clark 1999 y Freeland 2005). Dicha estructura genética tiene un patrón temporal (cambia a lo largo del tiempo), ya que las proporciones de los individuos con un genotipo y otro cambian tanto en tiempos cortos (ecológicos) como largos (evolutivos) (Vázquez- Domínguez 2007). Asimismo, existe un patrón espacial de la estructura genética, que se refleja en las diferencias genotípicas o fenotípicas entre individuos de la misma especie que se encuentran en sitios diferentes (Hartl y Clark 1999; Hedrick 2005).



La estructura genética de las poblaciones puede describirse bajo alguno de los dos modelos poblacionales generales: continuo o discreto. El primero asume que las poblaciones naturales presentan una distribución no interrumpida como la predicha por panmixia (reproducción al azar), lo que implica alta homogeneidad en la frecuencia y distribución de los alelos. Por otro lado, el modelo discreto, asume que las poblaciones se encuentran distribuidas de manera discontinua y más o menos independiente (Kimura 1953; Valdivia-Carrillo 2014). Este segundo modelo, a su vez, puede tener dos modalidades: 1) el de islas de Wright, en este modelo cada población local (subpoblación) es lo suficientemente grande como para que el efecto de la deriva génica sea mínimo, y asume que la migración entre cada subpoblación se da de tal forma que las frecuencias alélicas entre los migrantes igualan al promedio de la frecuencias alélicas entre subpoblaciones (Slatkin 1995; Esquer-Garrigós 2008); y 2) el modelo de saltos “*stepping Stone*”, en donde los organismos de cada población solo tienen acceso a las poblaciones adyacentes (Kimura 1953). Debido a que las especies generalmente presentan un área de distribución de mayor extensión que la capacidad de dispersión de los individuos que la conforman, las poblaciones generalmente muestran un patrón de aislamiento genético por distancia (poblaciones más cercanas son genéticamente más similares que poblaciones geográficamente más distantes; Balloux y Lugon-Moulin 2002).

La principal fuerza evolutiva responsable de la estructuración genética de las poblaciones es el flujo genético (Valdivia-Carrillo 2014). Debido a que la estructura genética refleja el número de alelos que son intercambiados entre y dentro de las poblaciones, el intercambio de genes entre éstas homogeniza las frecuencias alélicas (Balloux y Lugon-Moulin 2002). Si el flujo génico entre poblaciones de una especie es alto, es decir, hay una alta conectividad poblacional, todas ellas evolucionan de manera conjunta (a menos que sea contrarrestado por selección o deriva génica) generando nuevos polimorfismos e incrementando el tamaño efectivo de las poblaciones, y así, favorece la adaptación; pero si es bajo el flujo génico, empiezan a divergir, lo que puede contribuir al aislamiento reproductivo y al establecimiento de linajes evolutivamente independientes (Slatkin, 1994). Cuanto flujo se requiere para impedir la evolución independiente en poblaciones locales diferentes depende de que otras fuerzas evolutivas se encuentren actuando, como la selección natural y la deriva génica (Balloux y Lugon-Moulin; Godinho *et al.* 2006; Eguiarte *et al.* 2007); así mismo las características del paisaje modelan la estructura genética de las poblaciones mediante la interrupción de los patrones de dispersión, además de que acentúan la subdivisión poblacional, y en combinación con las características biológicas de las especies, pueden reducir la panmixia, por



tanto, el conocimiento de las barreras geográficas que afectan el flujo genético es esencial en los programas de conservación (García-González 2012; Templeton 2006). Con el avance de las técnicas moleculares, surge la genética de la conservación que se centra en la aplicación de la genética de poblaciones y la genética cuantitativa para preservar a las especies como entidades dinámicas capaces de acoplarse al cambio ambiental a partir del manejo genético de poblaciones pequeñas, de la definición de unidades de manejo dentro de las especies y la comprensión de la biología de las especies (Frankham *et al.* 2002; Rocha y Gasca 2007; Castellanos-Morales 2009).

Una herramienta importante para estudios de conservación de especies a nivel poblacional son los marcadores moleculares (Goldstein y Schlotterer 1999; Percino-Daniel *et al.* 2008). Se denominan marcadores moleculares a aquellas biomoléculas, básicamente DNA o proteínas, que pueden funcionar como caracteres cualitativos o cuantitativos (relacionados con diferentes rasgos genéticos heredables), permitiendo detectar diferencias y similitudes (polimorfismos), presentes en los organismos de los que provienen. Estos marcadores permiten evaluar entonces la variación presente entre organismos de poblaciones de una especie (Avice 1994; Li 2000; Freeman y Herron 2002; Suárez-Atilano 2009).

Hay diferentes marcadores moleculares como las aloenzimas, el DNA mitocondrial (DNAmt), los RFLP “restriction fragment length polymorphisms”, minisatélites y microsatélites (Hedrick y Miller 1992; Kohn y Wayne 1997; Frankham *et al.* 2002; Allendorf y Luikart 2007). Uno de los más empleados por los ecólogos y en estudios de genética de poblaciones son los microsatélites, debido principalmente a su alto grado de polimorfismo (Lima-Rosa *et al.* 2000), incluso en poblaciones pequeñas y en especies en peligro de extinción (Allendorf y Luikart 2007). Estos nos permiten identificar poblaciones con una diversidad genética reducida y generalmente más vulnerables ante un posible cambio ambiental. Además nos permiten distinguir subpoblaciones genéticamente diferenciadas para dirigir esfuerzos de conservación hacia ellas, entre otras aplicaciones (Jehle y Arntzen 2002; Percino-Daniel *et al.* 2008).

Los microsatélites o secuencias de repetición simple SSRs “Simple Sequence Repeats” son regiones de DNA con secuencias cortas de una a seis pares de bases (pb) repetidas en tándem, es decir, la misma secuencia una tras otra, llegando a mediar toda la región hasta 100 pb (Schlotterer 2000). Estos fueron descubiertos en los genomas eucariontes alrededor de 1980 y desde entonces han sido utilizados para estudios de genética de poblaciones (Jarne y Lagoda 1996; Scotti *et al.*

1999). Estos se clasifican en tres familias: puros, compuestos e interrumpidos, por ejemplo en el caso de un microsatélite trinucleótido (Cuadro 1):

Cuadro 1. Clasificación de las tres familias de microsatélites.

Puro	Compuesto	Interrumpido
CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG	CAGCAGCAGCAG CATCATCATC	CAGCAG TTCAG CAGCAG TTCAG

Los microsatélites presentan herencia mendeliana y son marcadores codominantes lo que permite definir loci y diferenciar individuos homocigotos y heterocigotos, estimar su porcentaje y las frecuencias alélicas de las diferentes variantes en una población (Jarne y Lagoda 1996; Esquer Garrigós 2008).

El alto grado de polimorfismo presente en este tipo de marcadores se debe a la existencia de errores en el apareamiento durante la replicación “slippage misparing”, generados a su vez por un alto número de repeticiones de nucleótidos cercanas entre sí, lo que provoca duplicaciones o deleciones de segmentos en el DNA y cambios en el número de repeticiones (polimorfismo en el longitud de éstos), distinguibles por electroforesis (Griffiths *et al.* 2004, Selkoe y Tioonen 2006).

Un locus de microsatélite varía típicamente en 5 a 40 repeticiones, de dinucleótidos, trinucleótidos o tetranucleótidos, siendo los primeros los más encontrados en diversidad de especies (Goldstein y Schlotterer 2000, Li 2000, Selkoe y Tioonen 2006). Su polimorfismo radica en las diferencias en el número de repeticiones, que permite diferenciar alelos por su longitud (Suárez-Atilano 2009).

Antecedentes

En México hay representantes de 4 familias del Orden Caudata: *Ambystomatidae*, *Plethodontidae*, *Salamandridae* y *Sirenidae*, siendo la familia *Plethodontidae* la que contiene el mayor número de géneros y especies. De los pletodóntidos, el grupo más diverso es el género *Pseudoeurycea*, el cual se distribuye desde Sonora y Chihuahua hasta Guatemala (Windfield 2008). Existen 118 especies descritas, de las cuales 84 se consideran en alguna categoría de riesgo (71.2 %) según la IUCN (Wilson *et al.* 2013).

Se considera que los anfibios de la familia *Plethodontidae*, y en especial las especies del género *Pseudoeurycea*, son grupos representativos de diversidad y endemismo de especies que han colonizado por muchos años los hábitats de México (aprox. 30 millones de años para *Pseudoeurycea*, Wiens *et al.* 2007), siendo los bosques de niebla y bosques templados del centro y sur de México que se localizan entre 1000 y 2800 msnm los que albergan una alta diversidad de especies de salamandras (Wake *et al.* 1992). Estos bosques son hábitat que presentan tasas de evaporación reducidas, conservando la humedad la mayor parte del año, lo cual se relaciona con la presencia de troncos caídos, piedras y suelos porosos, que son lugares idóneos para las salamandras de hábitos terrestres (Windfield 2008).

La familia *Plethodontidae* es importante para el análisis de la quitridiomycosis, ya que refleja el efecto de la enfermedad en las poblaciones de anfibios completamente terrestres y porque se ha determinado que toleran altos grados de infección, por lo que pueden ser vectores del patógeno y causantes de la prevalencia de la infección en los ecosistemas (Martel *et al.* 2013; Mendoza-Almeralla *et al.* 2015). Aun no hay reportes en la Faja Neovolcanica Transmexicana de dicho hongo en *P. robertsi*, sin embargo hay registros de otras especies como *P. leprosa* y *P. belli* con dicho patógeno (Van Rooij *et al.* 2011), lo cual es alarmante ya que hay 4 especies de salamandras conocidas en el Nevado de Toluca, *Pseudoeurycea belli*, *Ambystoma rivulare*, *Pseudoeurycea leprosa*, *Pseudoeurycea robertsi* (Bille 2009).

La relación genética entre especies de *Pseudoeurycea* basado en alozimas (Lynch *et al.* 1983) con siete poblaciones de *P. leprosa*, y una población de *P. longicauda*, *P. robertsi* y *P. altamontana* reveló que *P. leprosa* presenta una variación sustancial entre sus poblaciones, mientras que, *P. robertsi* y *P. altamontana* aunque anteriormente se situaban en diferentes grupos, se determinó que son muy similares genéticamente (Lynch *et al.* 1983), lo cual concuerda con la filogenia basada en DNA mitocondrial del genero *Pseudoeurycea* (Parra-Olea *et al.* 2010).

Pseudoeurycea robertsi

Pseudoeurycea robertsi se caracteriza por ser una especie de tamaño medio, muestra una variación en el patrón dorsal y el color, los cuales parecen estar relacionados con la altitud, individuos de altitudes mayores poseen un patrón dorsal constante, mientras que individuos de altitudes bajas muestran un alto grado de variabilidad (Bille 2009).





Figura 2. *Pseudoeurycea robertsi* en el Nevado de Toluca.

Dentro de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 de Protección Ambiental se considera a *P. robertsi* como especie amenazada, la cual además es micro endémica del APFFNT (SEMARNAT 2010). Mientras que la IUCN la considera como en peligro crítico debido a que la especie solo se ha encontrado en una pequeña área de la región del Nevado de Toluca (IUCN 2016), entre 2900-3600 msnm (Bille 2009), además su área de distribución se considera de 8 km² (IUCN 2016).

Los sitios donde se han colectado individuos de *P. robertsi* son muy pocos, siendo en la localidad de “Raíces” del Nevado de Toluca, donde se han encontrados 13 individuos (Lynch *et al.* 1983) y la secuencia publicada en GeneBank (AF380831) corresponde a esta misma localidad (Parra-Olea y Wake 2001; GeneBank 2016). Por lo tanto, *P. robertsi* al ser una especie endémica con distribución restringida podría presentar una disminución en la diversidad genética por lo cual es necesario realizar estudios que analicen la estructura poblacional, así como la diversidad genética que se presenta en las poblaciones estudiadas.

Estudios genéticos anteriores

En los últimos años se han realizado estudios de genética de poblaciones para conocer el estado de las poblaciones de diversas especies de anfibios. Percino-Daniel *et al.* (2016) estudio las salamandras *Ambystoma velasci* y *Ambystoma taylori*, esta última es endémica del lago de Alchichica y considerada como especie críticamente amenazada, debido a que su distribución es muy restringida (menor a 100km²). *A. taylori* exhibe un patrón de diversidad genética diferente al que presentan las poblaciones de *A. velasci*. A diferencia de lo esperado, *A. taylori* exhibe gran diversidad genética, expresada como alta riqueza alélica, además de que presenta un tamaño



efectivo grande, el cual probablemente contribuye al mantenimiento de la diversidad genética alta que presenta; mientras que las poblaciones de *A. velasci*, exhiben un patrón de diversidad genética variable, desde poblaciones con alta diversidad genética hasta poblaciones con una reducida diversidad, por lo que muy probablemente estén operando procesos de endogamia (Percino-Daniel *et al.* 2016). El grado de endogamia que resulta de la fragmentación de una población puede indicar la estructuración y diferenciación entre poblaciones (Suárez-Atilano 2009). Como en *Ambystoma leorae*, salamandra con distribución reducida, en la cual se estimó la diversidad y estructura genética, tamaño efectivo poblacional, presencia de cuellos de botella y el porcentaje de endogamia de la única población de esta especie. Esta presentó niveles de endogamia bajos así como poco flujo genético, se detectaron eventos de cuello de botella ancestrales en la población en general así como presencia de pocos alelos y genotipos comparados con otras especies de salamandras. Sin embargo, presentó valores de diversidad genética elevada expresada como heterocigosidad, comparables con los observados en otras especies de *Ambystomas* y anfibios con distribuciones restringidas (Sunny *et al.* 2014).

La diversidad genética resultó baja en *Pseudoeurycea leprosa*, especie endémica de bosques a lo largo de la Faja Neovolcánica Transmexicana, con desviaciones en el equilibrio Hardy-Weinberg y una alta frecuencia de homocigotos (Velo-Antón *et al.* 2009). En estudios posteriores de Velo-Antón *et al.* (2013) acentuó la importancia de medir la habilidad de dispersión, clima y la conectividad en el paisaje, encontró un aislamiento espacial y genético en *P. leprosa* permitiendo inferir predicciones a través del tiempo en esta especie con baja tasa de dispersión.

Los cambios del paisaje pueden hacer que algunas regiones sean inhabitables o inalcanzables, creando manchas en la distribución de hábitats óptimos. Como por ejemplo Marsh *et al.* (2008) encontró que la construcción de carreteras causan que cambien la estructura genética por reducción del flujo genético de las poblaciones, siendo poco frecuente a través grandes carreteras y si las poblaciones de salamandras son atravesadas por dichas barreras geográficas es propenso a que se separen genéticamente, mientras que el efecto de los caminos pequeños en la estructura poblacional es menor (Marsh *et al.* 2008). La estructura genética de poblaciones aisladas de salamandras como *Plethodon cinereus* en un área metropolitana es diferente a poblaciones con hábitats continuos, la riqueza de alelos, heterocigosidad son más bajas en poblaciones urbanas y genéticamente diferenciadas (Noel *et al.* 2007). Rittenhouse y Semlitsch (2006) observaron que los individuos de *Ambystoma maculatum* tanto adultos como juveniles evitan dispersarse por lugares



con zonas descubiertas, en cambio, prefieren dispersarse por zonas boscosas. Lo que concuerda con Rothermel (2004) el cual encontró que la dispersión en juveniles no depende de la distancia sino de la cantidad de bosque conservado.

El presente trabajo representa el primer estudio genético de *P. robertsi* en el APFFNT, mediante 9 microsatélites se evaluará la estructura y diversidad genética de dicha población amenazada, así como también, se evaluará su estado de conservación para proponer acciones que aseguren su conservación antes de que desaparezca, ya que al ser una especie microendémica podría presentar poca diversidad genética con un tamaño efectivo poblacional pequeño, una estructura genética marcada y altos niveles de endogamia al estar en una distribución reducida y fragmentada como lo es el APFFNT.

Hipótesis

Pseudoeurycea robertsi es una especie micro endémica amenazada por la fragmentación y reducción de hábitat, la cual se encuentra también bajo la presión de actividades antropogénicas, por lo tanto esperamos que sus poblaciones presenten poca diversidad genética, estructura genética marcada, un tamaño efectivo poblacional pequeño y altos niveles de endogamia.

Objetivos

Determinar el estado genético de *Pseudoeurycea robertsi* en el APFFNT del Estado de México, mediante el uso de 9 loci microsatélites.

Objetivos Particulares

- Evaluar la variación genética de la salamandra *P. robertsi*, especie microendémica y amenazada
- Conocer los niveles de estructuración genética entre las poblaciones, así como el flujo génico y diferenciación entre poblaciones
- Determinar el posible efecto del tamaño poblacional y la endogamia.
- Proponer estrategias para la conservación de *P. robertsi* basadas en la diversidad y estructuración genética

Materiales y Métodos

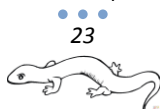
Área de estudio

El volcán denominado Xinantécatl o Nevado de Toluca, en el Estado de México, ocupa el cuarto lugar entre las cumbres más altas del país con una elevación de 4,680 metros sobre el nivel del mar (msnm) (Sanchez-Jasso y Cebrian-Abellán 2015). Originalmente esta área natural protegida fue declarada como Parque Nacional el 25 de enero de 1936, con el objetivo fundamental de proteger la belleza escénica y la importancia hidrológica del macizo montañoso (DOF 1936). La Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, a través de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, realizó el estudio previo justificativo para modificar el Decreto y cambiar la categoría del área natural protegida Parque Nacional “Nevado de Toluca”, del que se concluye que la montaña denominada “Nevado de Toluca” reúne los requisitos para declararla como área de protección de flora y fauna (CONANP 2013).

Así, recientemente el APFFNT fue decretada el 1 de octubre de 2013, cuenta con una superficie de 53,590.67 hectáreas, se encuentra en la porción centro Sur del Estado de México (19°06'30" N; 99°45'30" W) a 23 km al Sureste de la ciudad de Toluca (CONANP 2013) con altitudes entre 3,000 y 4680 msnm. El Nevado de Toluca constituye un área biogeográfica relevante a nivel nacional y representativa de varios ecosistemas que, aún no están alterados significativamente, además, una tercera parte de su superficie requiere ser preservada y restaurada, que es hábitat de especies representativas de la biodiversidad nacional (incluyendo endémicas, amenazadas o en peligro de extinción (Ceballos 2011).

La conjunción de las regiones neártica y la neotropical donde se encuentra ubicada esta área hace que sus características climáticas y de vegetación favorezcan la diversidad de la fauna, de la cual sobresalen los grupos de mamíferos, aves, reptiles y anfibios, coexistiendo así especies consideradas neárticas y tropicales (Vaca *et al.* 2007).

La diversidad de anfibios dentro del área natural protegida corresponde a 13 especies pertenecientes a seis géneros agrupados en cinco familias. El número de especies reportadas, 10 se encuentran en alguna categoría de riesgo según la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010); siredón del Ajusco, ajolote, siredón de Zempoala (*Ambystoma altamirani*), el siredón de Toluca, ajolote (*Ambystoma rivulare*), el tlaconete pinto (*Pseudoeurycea bellii*), el tlaconete leproso, (*Pseudoeurycea leprosa*), el tlaconete de Robert (*Pseudoeurycea robertsi*), tlaconete regordete,



salamandra pinta (*Aquiloerycea cephalica*) y la rana de árbol plegada o surcada (*Hyla plicata*) se encuentran listada en la categoría de amenazada, mientras que la rana de Moctezuma (*Lithobates montezumae*), salamandra pie plano común (*Chiropetrotriton chiropetrus*) y salamandra, ajolote tigre de meseta (*Ambystoma velasci*) sujetas a protección especial (CONANP 2013).

No obstante, es uno de los ecosistemas más deteriorados de la entidad, ya que esta bajo constantes presiones antropogénicas que le han conferido impactos ambientales negativos severos, entre las principales causas de degradación se encuentran cambios en el uso de suelo, plagas, enfermedades forestales, deforestación, incendios y prácticas agropecuarias descontroladas (Ávila 2009; Sánchez-Jasso *et al.* 2013; Heredia Bobadilla *et al.* 2016).

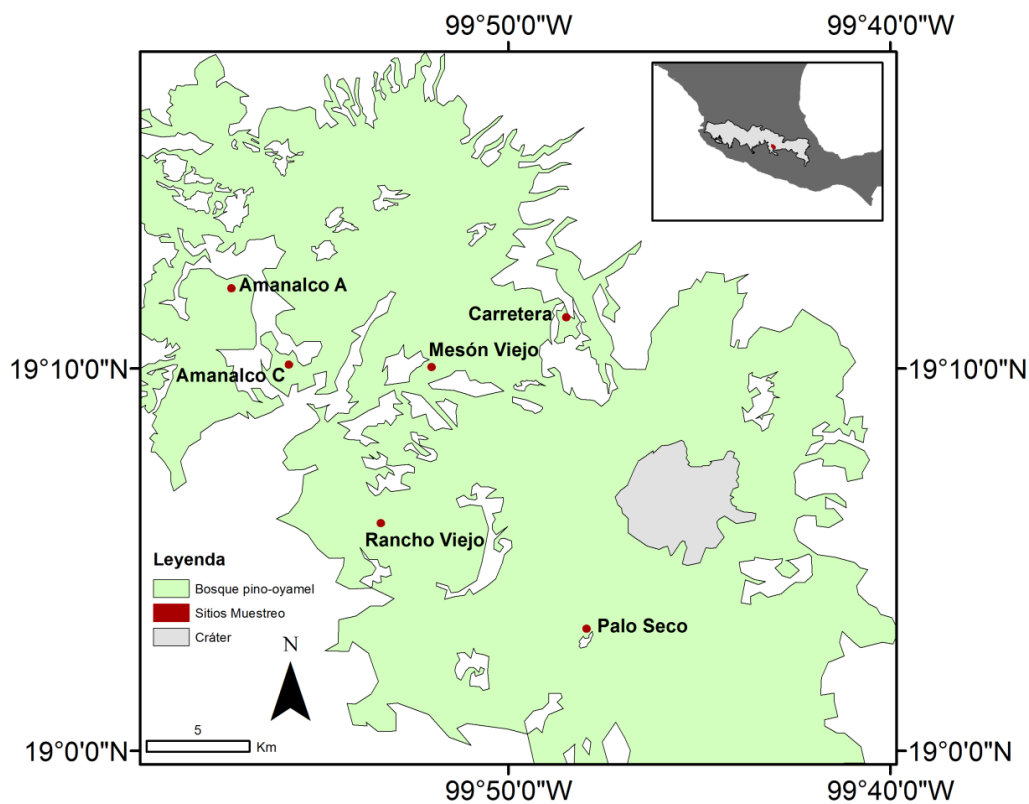


Figura 3. Mapa del Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca donde fue muestreada la salamandra *P. robertsi*.

Colecta y preservación de muestras

Se realizaron muestreos durante las temporadas de lluvias, de mayo a noviembre de 2016 con el permiso de colecta número SGPA/DGVS/05701/16. La colecta fue manual, buscando dentro de las cortezas de árboles caídos y debajo de rocas, así mismo se tomaron las coordenadas geográficas de la localidad de colecta.

Se tomó una muestra de tejido por ectomización de 2mm² de la cola. Esta metodología ha demostrado ser de bajo impacto porque no afecta la supervivencia y crecimiento de las salamandras (Arntzen *et al.* 1999; Polich *et al.* 2013). Los tejidos se preservaron en etanol a 90% en tubos eppendorf, y se congelaron a -20° C hasta ser utilizadas para la extracción de DNA. Posteriormente, las salamandras fueron liberadas donde fueron colectadas.

Extracción de DNA

Se utilizó Vivantis GF-1 Tissue DNA extraction kit para las muestras de tejido, para comprobar la integridad del DNA de cada muestra se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Para identificar que las muestras contienen DNA se utilizó un marcador de peso molecular el cual se aplicó en el último carril del gel, así como un control negativo. Los geles se tiñeron con RedGel a 0.5 µg/ml, los cuales permiten visualizar el DNA al pasar por luz UV. Para medir la concentración de DNA (ng/µl) se utilizó un NanoDrop™.

PCR y secuenciación

Se utilizaron 9 pares de oligonucleótidos de microsatélites diseñados por Velo-Antón *et al.* (2009) para *Pseudoeurycea leprosa*, una salamandra endémica del Eje Neovolcánico Transversal (Cuadro 2).

Cuadro 2. Descripción de 9 microsatélites polimórficos desarrollados para *P. leprosa*. Extraído de Velo-Antón et al. 2009.

Locus	Secuencias del primer (5' - 3')	Motivo de repetición	de	T°(°C)	Rango del Alelo (bp)	No. GenBank
PLD005	F: NED GCCTGGAGGGTTTTGGAGCAC R: GTGGAGACTGGGCAACATCAAGAAG	(CA) ₂₄		56	249-257	FJ873180
PLT009	F: VIC GAAGCCTCTCAATGAAGCAACA R: ATAGTAGAAGGACAGAAAGATGATTA	(GAA) ₇₉		50.5	239-397	FJ873181
PLT109	F: VIC ATATACGATGTGGCAGATGCTGGATGGTC R: TACTGTGGCTTGAAGGCTTAAGGTAATTTGACTG	(TCAA) ₆ (TCAAA) ₄		53	132-149	FJ873182
PLT087	F: 6FAM TGTAGCCTTGAGTGACAATGCACAAAGAGA R: GCTTACTATAACTCCGGACTGCTCACCACCTTGAC	(AG) ₃₉		49	241-307	FJ873183
PLT039	F: VIC CTAGCCTGTCCGCTGGTATTAGAATTAGCACATCT R: CTCCTGGCCTCCATCCCTTGATTGAAC	(TATC) ₂₄		53	229-289	FJ873184
PLT064	F: 6FAM CTAAGGATGGTTCTCAATGGCAAGATAG R: CATTTTATGTGCGATTCTGGTTATTTTTAT	(TAGA) ₁₇		56	163-215	FJ873185
PLT107	F: VIC ATATAAGGAATGAATGAACGAACGAATCAATG R: GTGTGGATCGCTGACTTTCTGACC	(TAAG) ₄₀		56.5	387-427	FJ873186
PLT042	F: 6FAM GCCACTTCCTGCATGCCTTGTTT R: GGCTGGGCTGGTTGGAGGTGGGATGG	(TAGA) ₁₁		56	144-165	FJ873187
PLT045	F: VIC TCCCATGAAGATTGCCAGAAACA R: GGCATACTAAGTCACCAAAATCCCTCAAT	(GA) ₁₄		56	267-285	FJ873188

Para cada locus, enlistamos el par del primer, el motivo de repetición del clon original, la temperatura de alineación (°C) y el tamaño del rango de los alelos presentes en ambas poblaciones, el número de genotipos individuales (N), el número de alelos (NA) y los heterocigotos observados (H_o) y esperados (H_e) entre ambas poblaciones.

Los microsatélites se estandarizaron, utilizando un volumen de reacción de 8µL. Para mejorar las condiciones de la amplificación, se utilizó una concentración de 1.0µg/µL de la solución Q (QIAGEN^{MR}). La amplificación de las muestras se realizó en un termociclador Apollo Touchscreen modelo ATC201, donde se programaron los siguientes pasos para nueve loci cambiando la temperatura de alineación según el locus (Figura 4).

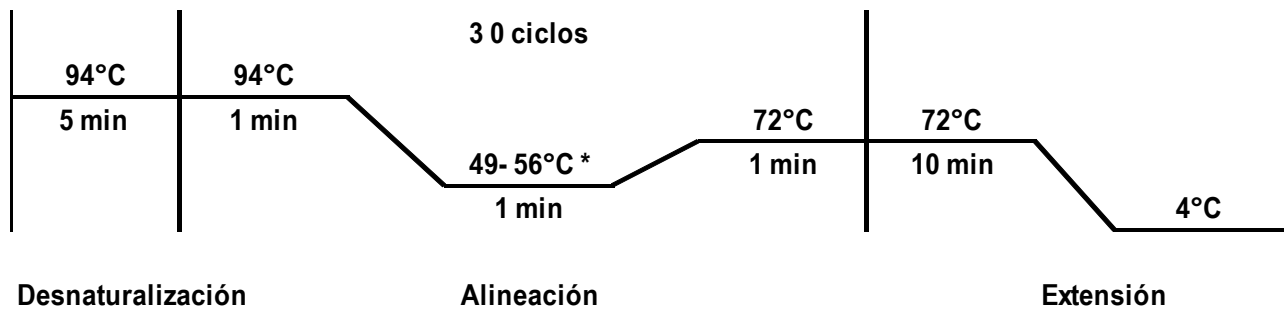


Figura 4. Programa para llevar a cabo el PCR para la amplificación de los 9 loci descritos anteriormente para *P. leprosa*. * La temperatura de alineación se realizó de acuerdo a Velo-Antón et al. 2009.

Para verificar la calidad y el tamaño del producto amplificado se corrieron en un gel de agarosa teñido con RedGel, con un marcador de peso molecular de 100pb para comprobar la presencia del fragmento esperado. La visualización se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta. Según el rango de los fragmentos esperados y el fluoróforo del oligonucleótido se combinaron 1µL de nueve loci para hacer lecturas multiplex. La secuenciación de los microsatélites se realizó en un secuenciador ABI Prism 3730xl Analyzer (Applied Biosystems®) por un laboratorio comercial (Roy. J. Carver Biotechnology Center de la Universidad de Illinois, USA).

Se realizaron controles negativos durante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para cada oligonucleótido. Por otro lado también se realizaron controles positivos para asegurar que se están amplificando las secuencias de los oligonucleótidos bajo las condiciones propuestas en el experimento.

Con el software PEAK SCANNER™ v1.0 se obtuvo el tamaño de los alelos calibrando y comparando las muestras con la escalera propia del software GS500 para todos los microsatélites. Se construyó una base de datos donde se registro el tamaño de los alelos de cada uno de los individuos y todos los microsatélites. Se redondeo el tamaño de los alelos (pb) con el software TANDEM 1.08 (Matschiner y Salzburger 2009). Todos los valores pares se conservaron sin los decimales (e.g. 302.35 pb, queda como alelo 302); en el caso de valores impares, si el decimal es ≤ 4 (e.g. 301.4 pb) se redondeó al par inferior próximo (300 en el ejemplo) y si el decimal es ≥ 5 se redondeó al par superior próximo (e.g. 301.5 pb se redondea a 102), siguiendo una convención para dinucleótidos o tetranucleótidos según fuera el caso.

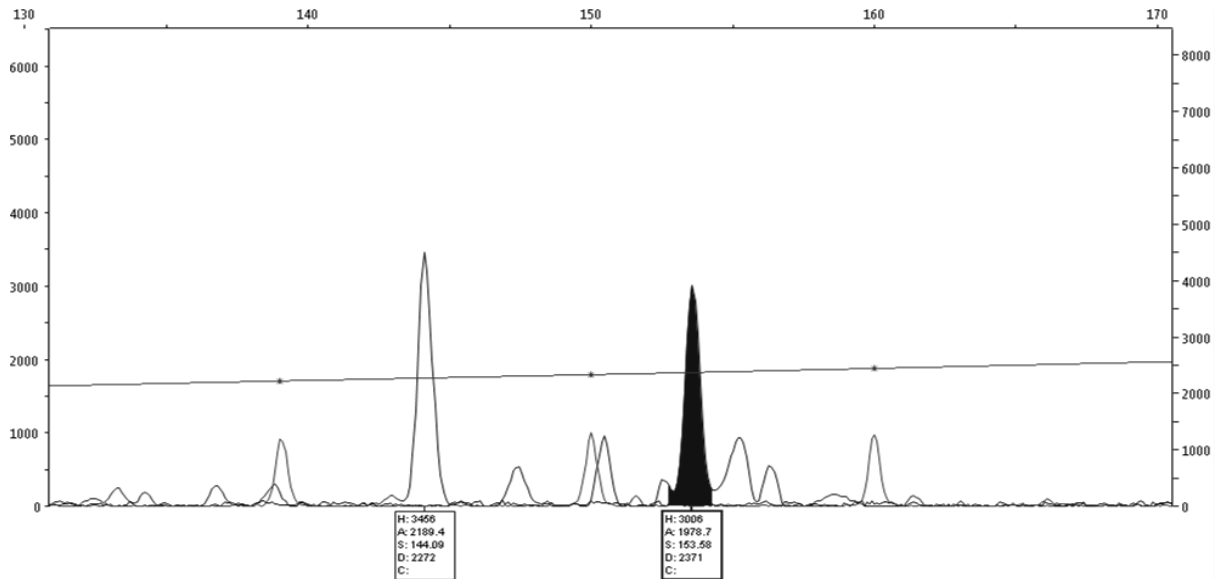
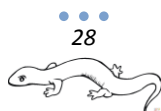


Figura 5. Amplificación del microsatélite PLT 064. Se observa el locus heterocigoto con un tamaño de 144 - 155 pb en el software Peak Scanner v1.0.

Análisis genéticos

Alelos nulos, errores de lectura y errores de amplificación

Antes de realizar los análisis genéticos se debe detectar la presencia de alelos nulos o errores en la amplificación y lectura que puede causar interpretaciones erróneas de los datos. En el caso de los alelos nulos “*null allele*” solo uno de los alelos de un individuo heterocigoto es detectado, produciendo un falso homocigoto (Navarrete-Vargas 2008). En términos de los loci microsatélites, éstos son resultado de mutaciones en las regiones flanqueantes al motivo, que impiden la unión de los primers a dicha región (Brookfield 1996, Allendorf y Luikart 2007) impidiendo que se lleve a cabo la amplificación. Mientras que los errores de lectura “*Slutters*” se dan durante el PCR, generando fragmentos de un tamaño diferente del alelo real, que puede producir numerosas bandas que dificultan la genotipificación dando estimaciones erróneas en los estudios genéticos, como un exceso de homocigotos (van Oosterhout *et al.* 2004; Sunny *et al.* 2014). Otro error de lectura es la generación de falsos alelos durante el PCR, los cuales pueden ser interpretados como verdaderos alelos, registrando alelos inexistentes y en el caso de un individuo homocigoto, éste puede ser registrado como heterocigoto (Navarrete-Vargas 2008). Y por último la dominancia corta en los alelos “*large allele dropout*” se presenta cuando los alelos de tamaño grande se amplifican en un número escaso de copias respecto a los alelos de tamaño menor (Sunny *et al.* 2014).



Se utilizó el programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (van Oosterhout *et al.* 2004) para detectar la presencia de estos alelos nulos; los parámetros que se consideraron fue un tamaño máximo esperado de un alelo de 320 pb con un intervalo de confianza de 95% y 1,000 repeticiones. Este programa también corrige las frecuentes alélicas y genotípicas en caso de encontrar alelos nulos. Se eligió el estimador Brookfield 1 (Brookfield 1996), el cual supone que no existen homocigotos con alelos nulos y permite descartar las muestras que no amplificaron debido a DNA degradado o poca cantidad de DNA templado, así como detectar errores en el genotipado (Van Oosterhout *et al.* 2004).

La presencia de alelos nulos en un locus, puede causar desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg (Percino-Daniel 2008). Estas desviaciones son muy similares a las que se presentan por endogamia, selección y efecto Wahlund (Miller *et al.* 2002; Miller y Waits 2003).

Varios estudios han sugerido que la incidencia de alelos nulos en loci microsatélite puede afectar las estimaciones de diferenciación poblacional mediante la reducción de la diversidad genética intrapoblacional, afectando los estimadores de F_{ST} y R_{ST} (Paetkau y Atrobeck 1995, Slatkin 1995) y generando una particular deficiencia de heterocigotos (Shaw *et al.* 1999).

Definición de grupos genéticos

Existen varios algoritmos que con base en el genotipo infieren grupos de individuos que están más relacionados entre sí y podrían ser considerados como una población. En este proyecto se determinó el número de poblaciones en el Nevado de Toluca con el software GENELAND 3.1.4 (Guillot *et al.* 2005a, 2005b; Guillot 2009), el cual está desarrollado para la plataforma de análisis estadístico R (R Development Core Team 2017). Geneland permite detectar el número de “poblaciones” presentes en una determinada área, así como la ubicación de discontinuidades genéticas entre las mismas, para ello, implementa un algoritmo de agrupación bayesiana similar a Structure y utiliza un método de re-muestreo mediante simulación de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) para estimar parámetros desconocidos incluyendo el número de grupos poblacionales (Guillot *et al.* 2009; Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez 2013). Además incorpora los datos espaciales (coordenadas geo-referenciadas y en su caso capas ambientales SIG) y de los genotipos multilocus para cada individuo.

El principal supuesto es que existe dependencia espacial entre los individuos del presente, por lo que es necesario conocer “*a priori*” como están distribuidos espacialmente. Además de detectar las



discontinuidades genéticas entre las poblaciones, el algoritmo se enfoca en minimizar la incertidumbre asociada a las coordenadas geográficas de cada individuo, estimar el número de grupos genéticos en el área de estudio, cuantificar la cantidad de dependencia espacial de los datos, asignar individuos a grupos probables de origen y detectar migrantes entre poblaciones (Guillot *et al.* 2005^a; Morales-García 2012). Se basa en un modelo espacial que divide aleatoriamente un conjunto de datos en un número de polígonos, por medio del diagrama de *Voronoi* homogenizado por un proceso de *Poisson*. A partir de este modelo se asignan al azar un número K de posibles grupos espaciales. La estimación de K poblaciones y la probabilidad de pertenencia de un individuo a cada K población se obtiene a partir de cadenas MCMC bajo el algoritmo de Metrópolis-Hasting (Guillot *et al.* 2005a, b). Así, la delimitación de las poblaciones a partir de la unión de estos polígonos depende directamente de la probabilidad de cada individuo de pertenecer a una población u otra.

Se trató a las frecuencias alélicas bajo el modelo “ F ”, el cual asume una correlación de las frecuencias alélicas de cada población vía la existencia de una población hipotética ancestral (“ F -model, *allelic frequencies correlated*”; Falush *et al.* 2003, Guillot 2005). Se ha observado que usar el modelo “ F ” puede presentar mayor resolución para detectar poblaciones, sin embargo, este modelo tiende a crear errores mientras se computa el algoritmo generando poblaciones inexistentes, razón por la cual es recomendable empezar el análisis con el modelo “ D ” y posteriormente correr el “ F ” para verificar si las diferencias son significativas (Guillot *et al.* 2009a). Asimismo, se consideró un modelo espacial verdadero, el cual asume la existencia de una delimitación espacial entre las poblaciones “*Spacial Model True*”. Esta combinación de modelos es recomendable para aquellos datos que sugieran una diferenciación espacial entre las poblaciones debida a rasgos en el paisaje, tanto naturales como generados por el hombre (e.g. tipos de corriente, caminos y elevación altitudinal en el caso de ríos), así como para aquellos datos donde se espera una baja diferenciación genética relacionada con un evento ecológico reciente (Guillot *et al.* 2005a).

Para definir el valor de K grupos genéticos se realizaron 10 corridas independientes con 1000000 interacciones, *thinking*=100 y un *burning* (calentamiento)= 100 con un número mínimo de $K= 1$ y máximo de $K= 20$, no considerando alelos nulos y sin valor de incertidumbre asociado a las coordenadas. La tasa máxima del proceso de *Poisson* fijado a 1000, la incertidumbre asociada a las coordenadas espaciales fijas en 10 metros, el número máximo de núcleos en el teselado de *Poisson-Voronoi* fijado a 3,000, y un “*burning*” de 100,000 en el post-procesamiento. La incertidumbre asociada con las coordenadas espaciales fue asignada a 10 M. Mientras que para el

procesamiento de los gráficos y mapas, se empleó la opción de 100 píxeles para el eje x y 100 píxeles para el eje y. Se calculó la media del logaritmo de la probabilidad posterior de cada corrida independiente y se eligió aquella que presentó los valores más altos.

Equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) y desequilibrio de ligamiento

El principio de H-W nos permite estimar las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas y es la base de la teoría de la genética de poblaciones (Hartl y Clark 2007). El postulado fue desarrollado por el matemático Godfrey Harold Hardy y el físico Wilhem Weinberg en 1908, el cual describe las condiciones genéticas de las poblaciones cuando éstas se encuentran en equilibrio, es decir, sin cambios en las frecuencias alélicas a través de las generaciones (Griffiths *et al.* 2004). Asume que el tamaño poblacional es infinito (sin acción de la deriva génica), los organismos son diploides con generaciones que no se sobrelapan y el apareamiento es aleatorio. (Hedrick 2005; Allendorf y Luikart 2007).

El equilibrio de H-W es expresado como:

$$AA = p^2 \quad Aa = 2pq \quad aa = q^2$$

Donde p^2 , $2pq$ y q^2 son las frecuencias de los genotipos AA, Aa y aa en los cigotos de una generación dada, y p y q son las frecuencias de los alelos A y a en los gametos de la generación previa, de manera que (Hartl y Clark 2007):

$$p + q = 1$$

Las frecuencias genotípicas esperadas de acuerdo al modelo de H-W para un locus dos alelos (p y q) se encuentran en la proporción (Hedrick 2005):

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

y describe la frecuencia genotípica para los homocigotos, así como la del heterocigoto

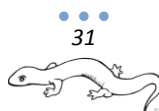
$p = f(A)$ frecuencia del alelo A

$q = f(a)$ frecuencia del alelo a

$p^2 = f(AA)$ frecuencia del genotipo AA

$q^2 = f(aa)$ frecuencia del genotipo aa

$2pq = f(Aa)$ frecuencia del genotipo heterocigoto Aa



Así, una población con frecuencias génicas y genotípicas constantes, se dice que está en equilibrio H-W ya que ningún proceso evolutivo como la mutación, migración o selección están actuando sobre la población (Aranguren-Méndez *et al.* 2005). A partir de esta comparación, se pueden investigar y deducir las causas que originan que una población se desvíe de dicho equilibrio, prediciendo las fuerzas evolutivas que afectan la estructura genética en las poblaciones (Freeman y Herron 2002, Allendorf y Luikart 2007) Este análisis no indica qué supuestos son los que se rompen y, por lo tanto, qué fuerzas evolutivas son las que actúan, de manera que es necesario realizar otros análisis que ayuden a identificarlas (Hartl y Clark 2007).

En una población natural, las frecuencias genotípicas necesitan ser comparadas con las de una población ideal “esperada” para conocer si ésta se encuentra o no en equilibrio de H-W. Para ello se requieren estadísticos que permitan inferir qué tan “suficientemente” semejantes o diferentes son las frecuencias reales de las teóricas. Los métodos de comparación de frecuencias genotípicas se clasifican en dos grandes grupos: pruebas de bondad de ajuste (Hedrick 2000, Freeman y Herron 2002, Allendorf y Luikart 2007) y pruebas exactas (Chapco 1976).

Las pruebas de bondad y ajuste como el estadístico X^2 , la G^2 o estadísticos de verosimilitud y una prueba condicional de X^2 (Li 1955; Arroyo-Lamber 2008) detectan la discordancia de las frecuencias genotípicas para cada combinación locus/población. Sin embargo, cuando el tamaño de la muestra es pequeño, existen frecuencias alélicas bajas o cercanas a cero, o cuando se trabajan con loci hipervariables que presentan 10 o más alelos o de cero, los valores de no son muy fiables (Chatfield, 1983).

Otras pruebas como el test exacto o de probabilidad de Fisher, consiste en observar todos los posibles lotes de frecuencias genotípicas para un determinado lote de frecuencias alélicas y rechazar la hipótesis de H-W si las frecuencias genotípicas resultan ser inusuales. Si hay más de cuatro alelos para un locus, se realiza un cálculo no sesgado del la probabilidad de H-W usando el método en cadena de Monte Carlo-Markov con miles de iteraciones (Guo y Thompson 1992).

Con marcadores moleculares como RFLP's y microsatélites que presentan genes con 10 o más alelos, si el tamaño de la muestra es moderadamente grande, el número de genotipos es tan grande que algunas frecuencias genotípicas serán de cero, especialmente cuando las frecuencias alélicas correspondientes sean bajas, es recomendable el uso de una prueba exacta (Arroyo-Lamber 2008, Sunny 2010).

Con el software GENEPOP 4.2 (Raymond y Rousset 1995; Rousset 2008) se evaluó si las localidades presentaban desviación del equilibrio H-W; esta prueba se realizó por cada locus en cada localidad y su significancia se estimó con el algoritmo de cadenas de Markov (MC) (Guo y Thompson, 1992) con 10000 dememorizaciones, 5000 batches y 10000 interacciones por batch.

El valor de significancia de los valores de p fue evaluada mediante la prueba FDR (False Discovery Rate, por sus siglas en inglés). Se ha demostrado que esta prueba es más efectiva al rechazar errores tipo I en comparación con la corrección secuencial de Bonferroni (Verhoeven *et al.* 2005). El valor de q corresponde al valor de p recalculado con la prueba FDR (Sunny *et al.* 2014). La hipótesis nula para esta prueba es “la unión aleatoria de los gametos” es rechazada cuando $p \leq 0.05$. Para corregir los valores de q se utilizó el programa SGoF + (Carvajal-Rodríguez y Uña-Alvarez 2011)

La presencia de alelos nulos y desequilibrio de ligamiento producen artefactos que se observan como una desviación del equilibrio de H-W (Van Oosterhout *et al.* 2004). El desequilibrio de ligamiento consiste en la asociación no aleatoria entre alelos de diferentes pares de loci (Hedrick 2000, Allendorf y Luikart 2007). El desequilibrio de ligamiento es resultado de la historia, ya que refleja la ancestría común entre los haplotipos presentes en cualquier población. Éste se presenta cuando dos o más alelos se encuentran en una posición muy cercana dentro de un cromosoma y la segregación no es independiente, provocando que sus frecuencias alélicas y genotípicas se comporten de la misma manera, es decir, estén asociados estadísticamente (Frankham *et al.* 2005; Hedrick 2005).

Para garantizar la segregación independiente entre los alelos de los distintos loci, se estimó la probabilidad de que cada par de loci se encuentren ligados mediante el uso de cadenas de Markov de 10,000 permutaciones, aplicando una prueba exacta de Fisher en el programa GENEPOP 4.0 (Raymond y Rousset 1995; Rousset 2008) con 10000 dememorizaciones, 5000 batches y 10000 interacciones por batch. La hipótesis nula para esta prueba es “la independencia de los distintos loci entre los diferentes genotipos”, esta prueba es significativa si $p \leq 0.05$ y se ajustó empleando la prueba de FDR descrita anteriormente con el programa SGoF + (Carvajal-Rodríguez y Uña-Alvarez 2011).

Diversidad genética

Existe una gran gama de estadísticos para cuantificar la diversidad genética y resumir la información a términos más manejables (Aranguren-Méndez et al 2005). Los estadísticos más empleados son: frecuencias alélicas, número efectivo de alelos, la heterocigosidad esperada (H_E) y observada (H_O)

Para estimar las frecuencias alélicas se utilizó la siguiente fórmula. Donde X_i es la frecuencia del i ésimo alelo (i th) dado en un locus específico N_{ii} es el número de individuos homocigos para este alelo, N_{ij} es el número de individuos heterocigos para este alelo y N es el tamaño de muestra.

$$x_i = \frac{(2N_{ii} + N_{ij})}{2N}$$

Se estimaron y graficaron las frecuencias alélicas con el software GENALEX 6.5 (Peakall y Smouse 2012). También se realizó un listado de los alelos observados (N_a), el número efectivo de alelos (N_e), los alelos privados (p_a) y genotipos en cada locus y población.

El número efectivo de alelos (N_e) es el número de alelos igualmente frecuentes en una población ideal, los cuales producirían la misma heterocigosidad u homocigosidad observada en la población actual (Allendorf y Luikart 2007) y se calcula como el inverso de la homocigosidad esperada:

$$N_e = \frac{1}{\sum P_i^2}$$

donde P_i es la frecuencia del i ésimo alelo (i th) para un locus en una población.

La heterocigosidad es una de las medidas de diversidad genética a nivel poblacional más ampliamente utilizada, como los individuos de especies diploides pueden ser heterocigos u homocigos para un locus dado podemos describir la variación genética en un único locus o en un número determinado de loci (Hedrick 2000; Castañeda-Rico 2008) La heterocigosidad la podemos estudiar como H_O y H_E :

La heterocigosidad observada (H_O) es simplemente el número de heterocigotos en un locus entre el número total de individuos muestreados. Estima la probabilidad, en organismos con cruzamiento al azar, de que dos alelos escogidos en una población sean diferentes (Frankham et al. 2009; González-González 2011)

La heterocigosidad observada puede calcularse mediante la expresión:

$$H_o = \frac{N_{ij}}{N}$$

donde N_{ij} es el número de heterocigos observados para un locus dado y N es el total de los individuos muestreados.

La homocigosis esperada, es la frecuencia de homocigotas esperados en equilibrio Hardy-Weinberg, se puede expresar como:

$$J = \sum P_i^2$$

donde P_i es la frecuencia del i ésimo alelo (i th) para un determinado locus en una población.

Mientras que la heterocigosidad esperada (H_e) bajo el equilibrio de H-W en un loci dentro de una población se puede calcular como uno menos la homocigosis bajo equilibrio de H-W (frecuencias alélicas al cuadrado):

$$H_e = 1 - \sum P_i^2$$

Este estimador se basa en el análisis de las frecuencias alélicas por locus y población y representa la frecuencia de heterocigotos que se esperarían en una población bajo el modelo de Hardy-Weinberg (Freeland 2005).

Según Zapata (1987), la H_E es un buen estimador de la diversidad, dado que se aplica a cualquier especie, independientemente de su estructura reproductiva o genética y es menos sensible al tamaño muestral que la heterocigosidad observada (H_o ; Frankham *et al.* 2009)

Nei (1974) sugirió que cuando se trata de muestras pequeñas debe de hacerse una pequeña corrección en la fórmula:

$$H_{NEI} = \frac{2N}{2N - 1} \left(1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 \right)$$

Donde N es el tamaño de la muestra y P_i es la frecuencia el i ésimo alelo (i th) para un locus en una población (Hedrick 2005).

La heterocigosis total de los grupos genéticos o diversidad genética de Nei (HT est) se calculo con el software SMOGD 1.2.5 (Crawford 2010), utilizando 1000 réplicas de Bootstrap. Esta prueba es una

corrección para tamaños de muestra pequeños (Nei y Chesser 1983), calculándose con la siguiente formula:

$$H_t + \frac{H_s \text{ est}}{2 \cdot \tilde{N} \cdot n}$$

Estructura genética

Las poblaciones de la mayoría de las especies muestran diferentes grados de estructuración genética (Hewitt 2004). Algunas se encuentran agrupadas en subpoblaciones más pequeñas dentro de las cuales ocurre el apareamiento, por lo que habrá diferenciación genética entre las poblaciones (Hartl y Clark 2007).

A partir de la ley de H-W, se pueden investigar y deducir las causas que originan que una población se desvíe de manera significativa de las proporciones de H-W, prediciendo las fuerzas evolutivas que afectan la estructura genética en las poblaciones (Freeman y Herron 2002, Allendorf y Luikart 2007).

Uno de los causantes de dicha desviación es el grado de endogamia, que resulta de la fragmentación de una población y puede ser usado como una medida de diferenciación entre los fragmentos o subpoblaciones (Castañeda-Rico 2008). Sewall Wright desarrolló el estadístico F como medida de diferenciación, que se basa en la partición de la varianza genética intra e interpoblacional, midiendo el grado de endogamia y aislamiento, mediante el análisis de las frecuencias de los heterocigotos observados y esperados. Esta aproximación consiste en tres diferentes coeficientes de F (coeficiente de endogamia), en tres niveles jerárquicos: diversidad total de la población (T), en subdivisiones (S) y en individuos (I) (Hedrick 2000).

Los índices de fijación F_{IS} y F_{IT} se utilizan como medidas de la endogamia, que se refiere al apareamiento no aleatorio en donde la probabilidad de que un individuo sea autócigo (con alelos idénticos por descendencia) es mayor que para una población panmíctica (Moreno Letelier 2007).

F_{IS} o coeficiente de endogamia es una medida de la desviación existente entre las subpoblaciones respecto a las proporciones de H-W determina el exceso o deficiencia de heterocigosidad de los individuos al interior de las subpoblaciones (Frankham *et al.* 2005, Allendorf y Luikart 2007). Se puede expresar como:

$$F_{IS} = 1 - \left(\frac{H_O}{H_S} \right)$$

Donde H_O es el promedio de la heterocigosidad observada en todas las subpoblaciones, y H_S es el promedio de la heterocigosidad esperada en todas las subpoblaciones. Si F_{IS} es positivo indica un déficit de heterócigos y si es negativo, un exceso. ($F_{IS} = 0$, no hay endogamia; $F_{IS} = 1$, hay endogamia).

Mientras que F_{IT} o coeficiente de endogamia total de un individuo es la medida de diferenciación de los individuos con respecto a la población en conjunto (Hedrick 2000) evalúa la desviación total respecto a las proporciones de H-W, por tanto mide la reducción de heterocigosis del individuo con respecto al resto de la población (Wright 1978; Hedrick 2005; Allendorf y Luikart 2007).

$$F_{IT} = 1 - \left(\frac{H_O}{H_T} \right)$$

Donde H_O es el promedio de la heterocigosidad observada en todas las subpoblaciones, y H_T es la heterocigosidad esperada en toda la población bajo los supuestos de H-W. Pueden tener valores de -1 a 1, donde valores positivos indican deficiencia de heterócigos y negativos exceso de heterócigos

La F_{ST} o índice de fijación es una medida de divergencia entre las poblaciones mediante la comparación de las frecuencias alélicas de los individuos dentro de una subpoblación con respecto a toda la población, y mide la varianza de las frecuencias alélicas entre poblaciones, estandarizada al valor máximo posible dada la media observada de frecuencias alélicas (Valdivia-Carrillo 2014). Este coeficiente se refiere al efecto de la subdivisión poblacional en la endogamia y es la probabilidad de que dos alelos obtenidos al azar de una población sean idénticos por descendencia (Frankham *et al.* 2005; Hedrick 2005; Hartl y Clark 2007).

$$F_{ST} = 1 - \left(\frac{H_S}{H_T} \right)$$

Donde H_T es la heterocigosidad esperada en toda la población bajo los supuestos de H-W y H_S la heterocigosidad esperada dentro de las subpoblaciones. El valor de F_{ST} siempre es positivo y puede variar entre 0 cuando todas las subpoblaciones muestran frecuencias alélicas iguales (sin diferenciación o estructura), y 1 cuando todas las subpoblaciones están fijadas para diferentes alelos (poblaciones completamente diferenciadas o hay estructura).

Estos tres índices fueron calculados con el programa GENALEX v6.5 (Peakall y Smouse 2012) con 999 permutaciones y 1000 replicas Bootstraps. Sin embargo, los valores de diferenciación genética pueden variar dependiendo del método de estimación y del modelo de mutación supuesto. Por lo que no es posible fijar un valor de estructuración para todos los métodos (Morales-García 2012).

Si la población está en equilibrio de H-W, entonces $F_{ST} = 0$; esta definición se ajusta a un modelo de mutación de alelos infinitos (IAM; Li 2000) el cual supone que la mayoría de nuevas mutaciones dan lugar a nuevos alelos distinguibles, es decir, los nuevos alelos mutantes son siempre diferentes a los que ya existían en la población original (Aranguren-Méndez *et al.* 2005)

Con loci tan variables como los microsatélites, tanto H_T como H_S pueden ser cercanos a 1, y con ello, la F_{ST} pequeña, por lo que no considera que en dos poblaciones la heterocigosis sea alta debida a la existencia de alelos diferentes, a pesar de que la diferenciación sea clara entre ambas poblaciones (Escalante 2001).

Por ello el estadístico R_{ST} es más adecuado para evaluar los microsatélites (Slatkin 1995) ya que utiliza la varianza de los tamaños de los alelos debido a la diferencia existente entre las poblaciones y se basa en el modelo de mutación paso a paso (SMM), el cual presenta una alta tasa de mutación y asume que éstas ocurren solamente a estados adyacentes (Ohta y Kimura 1973; Ellegren 2004). Se puede definir de la siguiente manera:

$$R_{ST} = \frac{(\hat{S} - S_W)}{S}$$

Donde \hat{S} es el promedio de la diferencia cuadrada entre todos los pares de copias de los alelos y S_W es el promedio de la suma de cuadrados de las diferencias de los tamaños de los alelos. En ambos casos, se determinó la significancia del valor obtenido mediante 1,000 permutaciones. Sin embargo, Gaggiotti *et al.* (1999) hallaron que cuando el tamaño de muestra ($N < 50$) y el número de loci analizados (< 20) son pequeños, es mejor utilizar el estimador de F_{ST} que utiliza el modelo IAM ya que con el R_{ST} se pueden obtener datos erróneos.

Hedrick (2005) y Jost (2008) propusieron otro índice de diferenciación (D_{est}) para casos con una elevada diversidad genética ($H_O > 0.9$), donde las mutaciones pueden tener el mismo o mayor orden de magnitud que el flujo génico. Este valor se calcula a partir de los alelos privados de cada grupo y es adecuado para estimaciones con loci muy variables. El índice de D_{est} se calculó con el programa

SMOGD versión 1.2.5 (Crawford 2010) con 1000 replicas Bootstrap. También se calcularon la diferenciación genética (G_{ST_est}) según Nei y Chesser (1983), la diferenciación genética (G'_{ST_est}) según Hedrick (2005) el componente de diversidad entre grupos genéticos o número efectivo de grupos genéticos distintos (ΔS) según Jost (2008), la diferenciación actual (D) según Jost (2008) el estimado de la heterocigosidad entre las subpoblaciones (H_{s_est}) según (Nei y Chesser 1983), el estimado de la heterocigosidad del total de las subpoblaciones (H_{t_est}) según (Nei y Chesser 1983), el estimado de la heterocigosidad entre las subpoblaciones (H_{st_est}) según (Nei y Chesser 1983) y la media armónica (\bar{N}).

En diversos estudios de genética de poblaciones ha sido común observar niveles de heterocigosidad observada significativamente menores a lo esperado. Este déficit de heterocigotos puede resultar consistente con factores como el efecto Wahlund ó la endogamia poblacional (Chapuis *et al.* 2005, Carlsson *et al.* 2006). El efecto Wahlund o rompimiento del aislamiento, se presenta cuando dos o más subpoblaciones se fusionan o son consideradas como una sola población (por un error en el muestreo); por lo que si existen diferencias en las frecuencias alélicas de las subpoblaciones consideradas como una sola población habrá deficiencia de heterocigotos y un exceso de homocigotos aún cuando las frecuencias alélicas de cada subpoblación se encuentren en equilibrio de H-W (Hedrick 2005).

También se evaluó los valores de estructuración baja, media y alta en cada índice de diferenciación, para ello se calcularon los coeficientes de correlación entre los valores de F_{ST} contra $Dest$. Si la correlación era significativa, los criterios propuestos por Wright (1951) de diferenciación alta cuando F_{ST} es mayor a 0.1, diferenciación media cuando F_{ST} oscila entre 0.05- 0.1 y una diferenciación baja cuando F_{ST} es menor de 0.05 (Morales-García 2012).

La estructura genética de una especie está relacionada con la distribución de la diversidad entre y dentro de las poblaciones. Su estudio se lleva a cabo normalmente mediante un análisis de varianza que permite comprobar la bondad de una estructura genética jerárquica propuesta a priori (Moreno-Vazquez 2001). AMOVA es un estadístico específicamente diseñado para este tipo de análisis cuando se cuenta con datos moleculares (Excoffier *et al.* 1992) el cual permite analizar la distribución de la varianza genética, mediante la partición de la varianza en componentes de covarianza dados por las diferencias entre poblaciones y entre los individuos de la población. El AMOVA utiliza métodos permutacionales no paramétricos entre los subgrupos, dentro grupos y entre



ellos, realizando un análisis jerarquizado con una matriz de distancias (Excoffier *et al.* 1992) a partir de los estadísticos F de Wright (Weir y Cockerham 1984). Se calculó por medio de F_{ST} como estimador de las diferencias alélicas entre poblaciones y su análogo R_{ST} , que como ya se mencionó, es más adecuado para los microsatélites, ya que está basado en la varianza de los tamaños alélicos. Comparar los estimados de R_{ST} y F_{ST} puede ser útil para determinar los cambios en la diferenciación genética entre poblaciones a diferentes escalas de tiempo (Slatkin 1995).

La diversidad genética puede ser descompuesta usando una modelo multivariado estándar ANOVA como: Total de la variación= (varianza entre grupos)+(varianza dentro de los grupos). O más simple:

$$VAR(X) = B(X) + W(X)$$

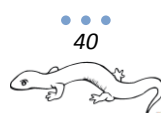
Los métodos usuales como el análisis de componentes principales (PCA) o el análisis de coordenadas principales (PCoA) se enfocan solo en la $VAR(x)$, solo describen la diversidad global; por el contrario, el análisis de componentes principales discriminante (DAPC) optimiza $B(X)$ mientras minimiza $W(X)$: busca variables sintéticas, las funciones discriminantes que muestran las diferencias entre grupos lo mejor posible, minimizando la variación dentro de los clusters (Jombart y Collins 2017). Curiosamente, este método también permite una asignación probabilística de los individuos a cada grupo, como en los métodos de agrupamiento bayesiano (Jombart *et al.* 2010).

El DAPC consiste en un procedimiento de 2 pasos: Primero, los datos genéticos son transformados y sometidos a un PCA. En segundo lugar, los componentes principales de PCA se someten a un Análisis Discriminante Lineal (LDA). Una operación matricial trivial permite expresar funciones discriminantes como combinación lineal de alelos, permitiendo por tanto calcular las contribuciones de alelos (Jombart *et al.* 2010). El DAPC fue analizado en Adegnet (Jombart 2008) 2.0.0 en R (R Development Core Team 2017).

Uno de los índices más utilizados es el de la distancia genética de Nei que puede estimar el número de genes o codones sustituidos por locus entre poblaciones (Nei 1987).

Nei (1972) definió el concepto de “identidad genética” entre dos poblaciones como la probabilidad de que dos alelos (uno de cada población) sean idénticos. Una vez calculado el valor para la identidad genética, la distancia genética se obtiene mediante el logaritmo de la primera (Gonzalez-Gonzalez 2011).

$$D_n = -\ln(I_n)$$



Donde I_n es el índice de similitud genética de Nei, que se define como:

$$I_n = \sum_{i=1}^m (P_{ix} P_{iy}) / \left[\left(\sum_{i=1}^m P_{ix^2} \right) \left(\sum_{i=1}^m P_{iy^2} \right) \right]^{1/2}$$

Donde P_{ix} es la frecuencia del alelo i en la población (especie o individuo) x y P_{iy} es el alelo i en la población (especie o individuo) y m es el número de alelos presentes en el locus.

La distancia de Nei o distancia genética estándar (DS) es proporcional al tiempo durante el cual dos poblaciones que se comparan han evolucionado independientemente. Considera cambios en las frecuencias alélicas derivados tanto de mutaciones como de efectos de deriva genética. Es por tanto una distancia adecuada para estudios filogenéticos y construcción de dendrogramas (Moreno-Vázquez 2001). Con GENALEX 6.5 se calculó la distancia genética de Nei (Nei 1972) y también se construyó un árbol de Neighbour-Joining (N-J) con el estimado de distancias genéticas estándar de Nei: DS (Nei 1972) para todas las poblaciones aplicando una prueba de bootstrap con 1000 repeticiones.

Otro método más reciente para estimar la distancia genética es el método de Bruvo *et al.* (2004) que específicamente permite el análisis de poliploidías y el cual toma en cuenta el modelo mutacional por pasos. La distancia de Bruvo entre dos alelos es calculada como:

$$d = 1 - \left(2^{-\text{abs}(x)} \right)$$

donde x es el número de unidades repetidas entre dos alelos. Estas distancias son calculadas sobre todas las combinaciones de alelos en un locus y luego la distancia media mínima entre las combinaciones de alelos se toma como la distancia de ese locus; y a continuación se promedian todos los loci para obtener la distancia entre dos muestras. El análisis se desarrolló bajo la plataforma de análisis estadístico R (R Development Core Team 2017) con el paquete POPPR v2.4.1 (Kamvar *et al.* 2014) a partir del *minimum spanning networks* (MNS) para visualizar las relaciones entre los individuos de los datos.

Se realizó una prueba de Mantel para probar si existe una correlación entre las distancias geográficas con las distancias genéticas, mediante el programa computacional GENALEX 6.5 (Peakall y Smouse 2012) bajo la hipótesis nula de independencia entre las dos variables. Este programa determina el aislamiento por distancia a partir de 10000 permutaciones probando la



relación entre una matriz de F_{ST} pareadas y una matriz de distancia geográfica al distribuir los datos de manera aleatoria y evalúa la probabilidad de que la correlación entre las dos matrices sea mayor que la encontrada por azar.

Demografía histórica

Relaciones de Parentesco

Las relaciones de parentesco reflejan la historia compartida entre miembros de una misma familia o población (Weir *et al.* 2006). Existen diversos métodos estadísticos para realizar análisis de parentesco a partir de marcadores moleculares (Blouin 2003). Estos pueden ser divididos en 2:

a) Método de conectividad “*Relatedness* r_{qq} ” el cual se expresa en términos de probabilidades de que un conjunto de alelos desciendan de un único alelo ancestral, determinando la probabilidad de que dos alelos idénticos lo sean por descendencia. Se dice que dos individuos están relacionados cuando el alelo de uno de ellos es idéntico por descendencia de aquel que tiene el otro (Weir *et al.* 2006). Con el software GENALEX 6.1 se calculó el estimador de relatedness r_{qq} de Queller y Goodnight (1989). El cual es una medida de endogamia donde se evalúa el grado de relación genética (relatedness) entre individuos dentro de cada población. Se estimaron intervalos de confianza al 95% de r_{qq} con un bootstrap de 999 y 999 permutaciones para cada población. Si los valores de r_{qq} de cada población caen arriba de los intervalos de confianza esperados, indica que procesos como endogamia, deriva génica o un sesgo reproductivo están incrementando el parentesco genético.

b) Métodos de relación “*Relationship*”, que permiten determinar relaciones de parentesco (genealógicas) como lo son los padres, hijos, hermanos y medios hermanos (Blouin 2003)

Este método está implementado en el programa ML-RELATE (Kalinowski *et al.* 2006). Este calcula las probabilidades de máxima verosimilitud para estimar r , el cual posee un error cuadrático medio menor que otros estimadores (Kalinowski *et al.* 2006). Este programa, especialmente diseñado para microsatélites, incorpora el cálculo de alelos nulos (Wagner *et al.* 2006), para reducir el error posible (Kalinowski *et al.* 2006).



Tamaño efectivo

El tamaño efectivo poblacional (N_e) es un importante parámetro de interés en el estudio de la biología evolutiva así como el monitoreo de especies de interés para la conservación (Jones *et al.* 2016), el N_e es la porción de individuos en una población que se pueden reproducir exitosamente, aportando a la generación siguiente en términos demográficos y genéticos (Hedrick 2000). Para determinarlo se utilizó el programa Nestimator v2.01 (Do *et al.* 2014). Se puede estimar a partir de diferentes métodos en relación con diferentes cualidades de las poblaciones, en este caso se utilizan métodos indirectos que emplean marcadores moleculares, los cuales se basan en los cambios en la diversidad y estructura genética o en la teoría de coalescencia. Dentro de este, el desequilibrio de ligamiento es el estimador genético más comúnmente usado para determinar N_e , su popularidad se debe a su habilidad de crear estimaciones poderosas a partir de muestras sencillas, mientras que los llamados métodos temporales requieren de dos o más muestras de poblaciones separadas en el tiempo (Jones *et al.* 2016).

Como el análisis se basa en una distribución χ^2 escalada, el número correspondiente de grados de libertad no está bien definido debido a las correlaciones intrínsecas entre las estimaciones individuales de desequilibrio de ligamiento que se combinan para estimar N_e , por lo que los intervalos de confianza se verían afectados. En la formulación original del método no se proporciona un método directo para determinar los intervalos de confianza para las estimaciones del N_e a partir del desequilibrio de ligamiento (Hill, 1981). NeEstimator v2.01 provee dos métodos para generar los intervalos de confianza, el primero, el método paramétrico, está basado para los métodos temporales (Waples 2006); mientras que la segunda es una corrección basada en Jackknife (Waples y Do 2008) a este método, es usado para ajustar los grados de libertad en la distribución χ^2 en el intervalo de confianza.

La opción de selección de alelos raros que utiliza valores críticos tiene como objetivo facilitar la evaluación de los efectos de los alelos de baja frecuencia sobre las estimaciones de tamaño efectivo, que han sido documentadas tanto para los métodos temporales como de desequilibrio de ligamiento (LD) excepto en el modelo de coancestria (Nomura 2008) en el cual la frecuencia alélica no es un problema. Se utilizaron los valores de default (0.01, 0.02 y 0.05) en NeEstimator v2.01, los alelos raros son excluidos solo si ocurren a una frecuencia menor que los valores default y todos los



alelos cuyas frecuencias son iguales o mayores que el valor especificado se utilizarán en el análisis (Do *et al.* 2014).

Cuello de botella

Las poblaciones que han sufrido reducciones sustanciales o recientes en el tamaño poblacional, como cuellos de botella, son sujetas a incrementar la probabilidad de identidad por descendencia, aumentar el efecto de factores estocásticos como la deriva génica y generar un decremento en la variación genética, lo que resulta en una limitante en el potencial evolutivo (Garza y Williamson 2001, Palstra y Ruzzante 2008). Para detectar si ocurrió un reciente cuello de botella, se empleó el programa BOTTLENECK v. 1.2.02 (Cornuet y Luikart 1997), que detecta los cuellos de botella que pudo experimentar las poblaciones a través de desviaciones significativas del equilibrio mutación-deriva, por medio de coalescencia y comparando la heterocigosidad esperada (H_{e}) con la heterocigosidad observada (H_{o}).

Las poblaciones que han experimentado recientemente una reducción de su tamaño efectivo presentan una disminución en el número de alelos, heterocigosidad y loci polimórficos. Cabe resaltar que la diversidad alélica (número de alelos) se pierde más rápido que la diversidad genética en conjunto (heterocigosis observada), por lo que si la heterocigosis esperada es igual a la heterocigosidad observada, la población no ha sufrido un cuello de botella reciente. Sin embargo, si ésta es mayor a la heterocigosidad esperada, el equilibrio mutación-deriva ha sido roto e indica la presencia de un cuello de botella reciente (Cornuet y Luikart 1997).

Para la estimación es importante el modelo mutacional utilizado; el modelo de alelos infinitos (IAM) se supone que la mayoría de nuevas mutaciones dan lugar a nuevos alelos distinguibles, es decir, los nuevos alelos mutantes son siempre diferentes a los que ya existían en la población original, mientras que el modelo mutacional por pasos (SMM) que considera que las mutaciones sólo pueden ocurrir en lugares adyacentes y se pueden presentar alelos iguales a los que ya están presentes en la población (Aranguren-Méndez *et al.* 2005). Debido a que los microsatélites presentan predominantemente el modelo de mutación paso a paso (SMM) pero con un cierto porcentaje de mutación tipo IAM, se recomienda considerar un tipo de mutación denominado de dos fases (TPM, Di Renzo *et al.* 1994, Cornuet y Luikart 1997). En este modelo se pueden dar «mutaciones viejas» (alelos ya existentes en la población), pero también «mutaciones nuevas» (alelos nuevos en la población) (Aranguren-Méndez *et al.* 2005).



Se calculo la presencia de cuellos de botella en las 6 poblaciones, mediante la heterocigosidad observada y esperada bajo el modelo de TPM con un 90% de SMM y un 10% de IAM y una varianza de 10%, de la misma manera se emplearon los valores de default (70% SMM, 30% IAM y varianza de 10%), ambos con 10,000 replicaciones. Para probar si la diferencia entre la H_e y la H_{eq} era significativa, se realizó una prueba de Wilcoxon de una cola para exceso de heterócigos.

Existe la misma probabilidad de que un locus presente un exceso o déficit de heterocigosidad, cuando una población se encuentra en equilibrio entre deriva y mutación (el tamaño efectivo constante). Para determinar qué población presenta un número significativo de loci con exceso de heterocigosidad, este software utiliza tres pruebas: “*Sign test*”, prueba estandarizada de diferencias “*standardized differences test*” (Cornuet y Luikart 1997), y prueba de Wilcoxon (Luikart *et al.* 1997^a) ya que ésta puede usarse con pocos loci y sin importar el tamaño de muestra, además se realizó el estimador de la distribución de las frecuencias alélicas; “*Mode-shift*” *indicator*, que indica las poblaciones que sufrieron cuellos de botella (Luikart *et al.* 1997b). La porción de individuos en una población que puede reproducirse exitosamente, ya que estos son los que contribuyen a la generación siguiente en términos demográficos y genéticos (Hedrick 2000).

Resultados

Se analizaron un total de 96 individuos, con 16 individuos en cada localidad provenientes de Amanalco, Rancho, Mesón Viejo, Amanalco C, Carretera y Palo Seco. Todos los microsatélites fueron polimórficos en todas las poblaciones.

Definicion de grupos genéticos

GENELAND

Se obtuvieron tres grupos genéticos $\text{LnPr}(K=3) = -608.062$, con una probabilidad de 45.99% después de diez corridas simultaneas (figura 6a). En la figura 6b, se observa que cuatro poblaciones están más estrechamente relacionadas por lo que podrían ser una sola (área gris) mientras que las poblaciones en el área verde y amarillo son grupos genéticos diferentes.

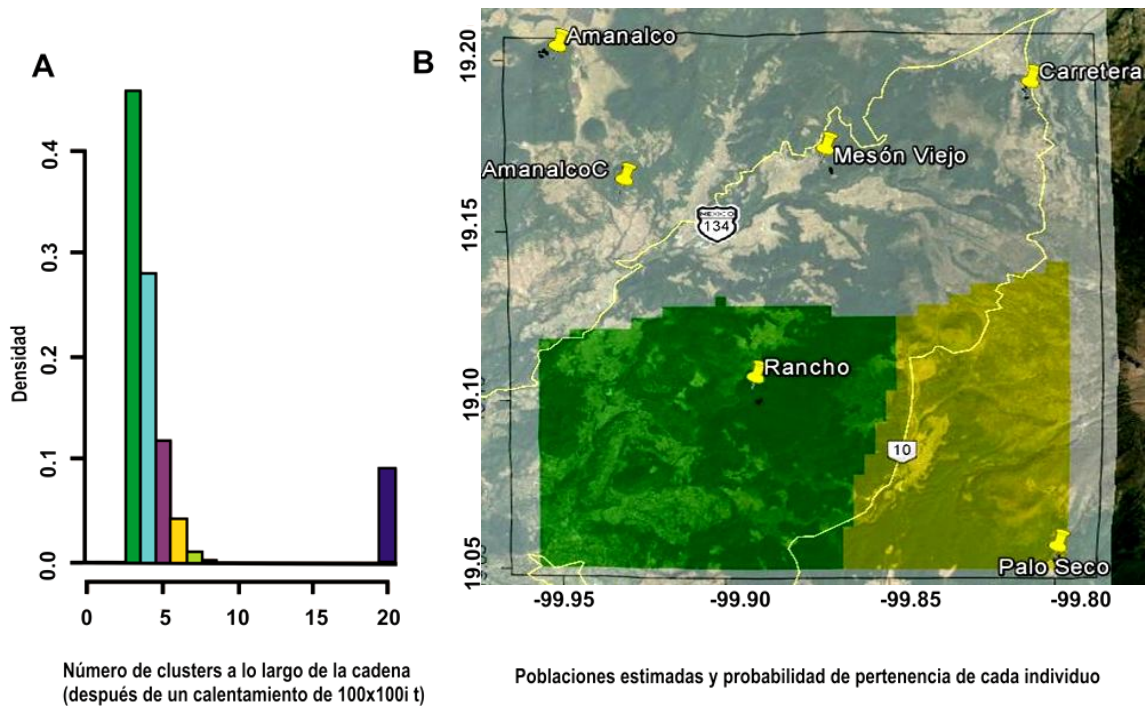


Figura 6. A. Grafica de barras se muestra el 45.99% de probabilidad de que los individuos correspondan a tres clusters o grupos genéticos (barra verde). **B.** Distribución espacial de los tres grupos genéticos tras el análisis de agrupación; Amanalco, Amanalco C, Mesón Viejo y Carretera son el grupo genético 1 (área gris), Rancho es el grupo genético 2 (área verde) y Palo Seco el grupo genético 3 (área amarilla).

Equilibrio de Hardy-Weinberg y Desequilibrio de Ligamiento

Dos locus se encontraron fuera del equilibrio H-W en todas las poblaciones, el locus PLD005 y PLT109 (Cuadro 3) debido a una deficiencia de heterocigotos, los dos presentes en la población de Palo Seco; obtuvieron valores significativos ($p \leq 0.05$) después de la corrección de FDR, lo que indica que las frecuencias observadas difirieron de las esperadas por lo que se rechaza la hipótesis nula y algún proceso evolutivo está actuando en esa población. Los valores del coeficiente de endogamia (F_{IS}) según el cálculo de Weir y Cockerham variaron desde -0.875 a 0.627.

Cuadro 3. Equilibrio de Hardy-Weinberg y los coeficientes de endogamia de Weir y Cockerham (W&C) para cada población, los valores resaltados fueron significativos para una deficiencia de heterocigotos después de la corrección de FDR ($p \leq 0.01$).

Locus	Amanalco		Rancho		Meson Viejo		Amanalco C		Carretera		Palo seco	
	Fis		Fis		Fis		Fis		Fis		Fis	
	p	W&C	p	W&C	p	W&C	p	W&C	p	W&C	p	W&C
PLD005	0.218	-0.077	0.480	-0.118	0.267	-0.204	0.996	-0.327	0.020	0.186	0.002	0.627
PLT009	1	-0.500	1	-0.875	1	-0.429	0.999	-0.612	0.816	-0.098	0.987	-0.398
PLT109	0.471	0.018	0.967	-0.320	0.994	-0.471	0.690	-0.047	0.222	0.172	0.001	0.579
PLT087	0.919	-0.220	0.687	-0.010	0.987	-0.398	0.817	-0.149	0.873	-0.132	0.026	0.605
PLT039	1	-0.673	0.243	-0.101	0.791	-0.159	1	-0.364	1	-0.311	1	-0.119
PLT064	0.599	-0.265	0.420	0.032	0.350	0.105	0.944	-0.261	0.248	-0.006	0.015	0.373
PLT107	1	-0.364	0.613	0.063	1	-0.579	1	-0.452	1	-0.200	1	-0.071
PLT042	0.992	-0.442	1	-0.667	0.987	-0.383	1	-0.667	0.976	-0.377	0.675	-0.081
PLT045	0.999	-0.612	0.028	0.007	0.991	-0.495	1	-0.429	0.931	-0.245	0.565	0.118

Con la prueba de desequilibrio de ligamiento se encontró que de las 216 comparaciones posibles entre los 9 loci, ninguna presento valores significativos de desequilibrio de ligamiento en ninguna de las poblaciones después de realizar la corrección de FDR ($p \leq 0.01$).

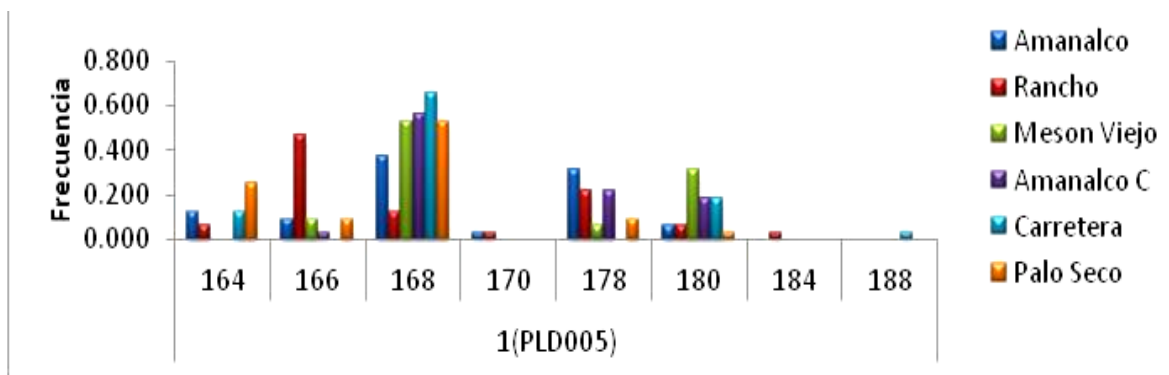
Diversidad genética

Frecuencias alélicas

Se observaron un total de 42 alelos para los 9 loci analizados (Cuadro 4). El locus PLT005 obtuvo un mayor número de alelos 8 en total, siguiéndole el locus PLT064 con 7 alelos, el locus PLT109 presento 5 alelos, mientras que el locus PLT042 y el PLT039 presentaron 4 alelos, el locus PLT107 y el locus PLT087 obtuvieron 3 alelos y por último el locus PLT009 presento solo 2 alelos (figura 7). Se detectaron 14 alelos privados, la población Rancho obtuvo el mayor número de alelos privados, 5 alelos en 5 individuos y la población de palo seco que obtuvo 4 alelos privados, estos se presentaron en 10 individuos (Anexo 5), mientras que las poblaciones 1 y 3 no presentaron ningún alelo privado; el loci PLT009 y PLT087 tampoco obtuvieron ningún alelo privado. Se encontró que las poblaciones Meson Viejo, Amanalco C, Palo seco presentan 20 alelos efectivos, y Rancho presento 23, el mayor número de alelos efectivos.

Cuadro 4. Número total de alelos por población y locus. Na: Número total de alelos, Ne: Número de alelos efectivos según Dyer (2008) y pa: alelos privados

	Amanalco			Rancho			Mesón V.			Ama. C			Carretera			Palo Seco			Poblaciones		
	Na	Ne	pa	Na	Ne	pa	Na	Ne	pa	Na	Ne	pa	Na	Ne	pa	Na	Ne	pa	Na	Ne	pa
PLD005	6	3.7	0	7	3.41	1	4	2.5	0	4	2.5	0	4	2.07	1	5	2.75	0	8	2.84	2
PLT009	2	1.8	0	2	1.99	0	2	1.8	0	2	1.99	0	2	1.99	0	2	1.93	0	2	1.91	0
PLT109	4	3.1	0	4	2.04	0	4	2.7	0	3	2.09	0	4	2.89	0	5	3.39	2	5	2.7	2
PLT087	2	2	0	3	1.72	0	2	1.9	0	3	2.12	0	2	1.75	0	2	1.82	0	3	1.89	0
PLT039	3	2.1	0	4	2.96	1	3	1.7	0	2	1.68	0	3	1.72	0	3	1.37	0	4	1.92	1
PLT064	4	3.1	0	6	4	1	4	3.1	0	4	3.1	0	5	2.96	1	4	3.01	0	7	3.2	3
PLT107	2	1.7	0	2	1.82	0	2	1.9	0	3	2.03	1	2	1.44	0	2	1.2	0	3	1.68	1
PLT042	3	2.8	0	3	2.46	0	3	2.4	0	3	2.46	0	3	2.65	0	4	3.07	2	4	2.63	2
PLT045	2	2	0	5	2.56	2	3	2.4	0	2	1.75	0	3	1.96	0	2	1.52	0	6	2.02	3
Total	28	22	0	23	23	5	27	20.3	0	26	19.7	1	28	19.4	2	29	20.1	4	42	20.8	14



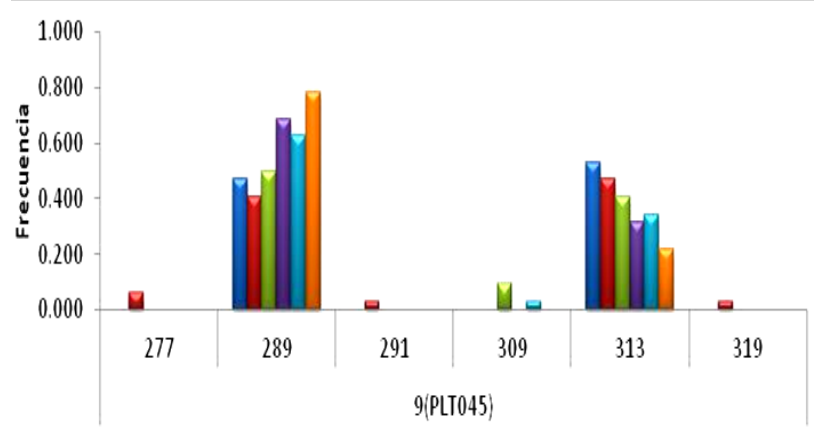
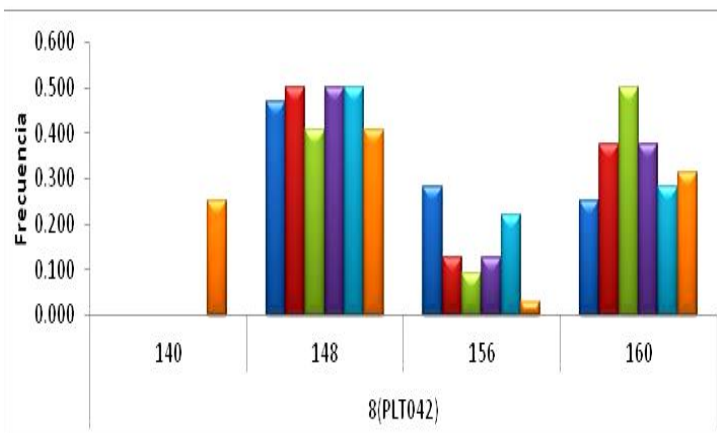
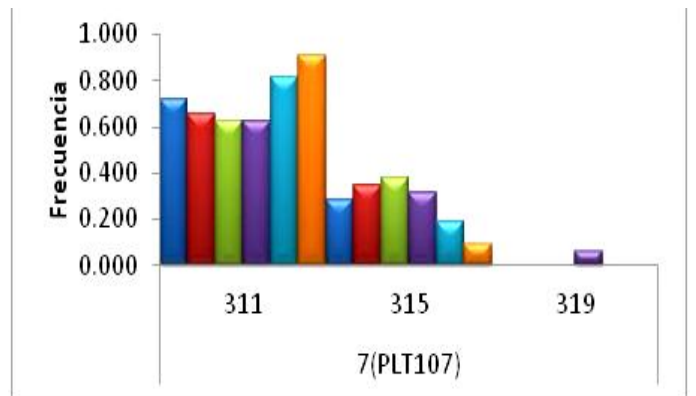
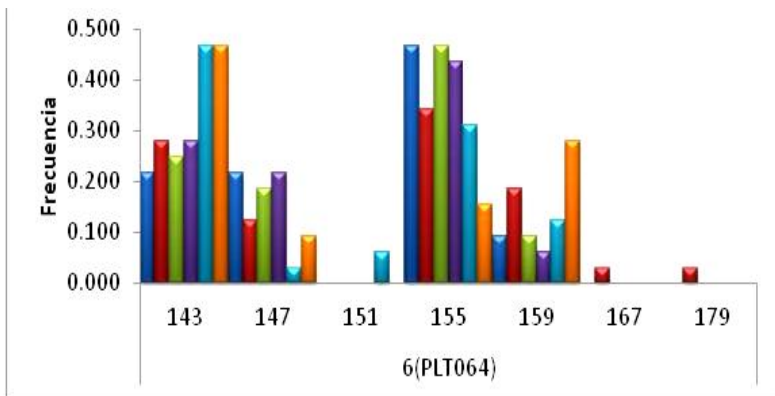
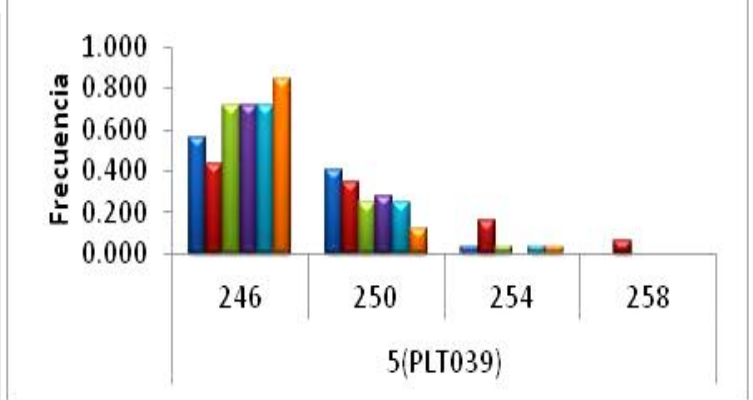
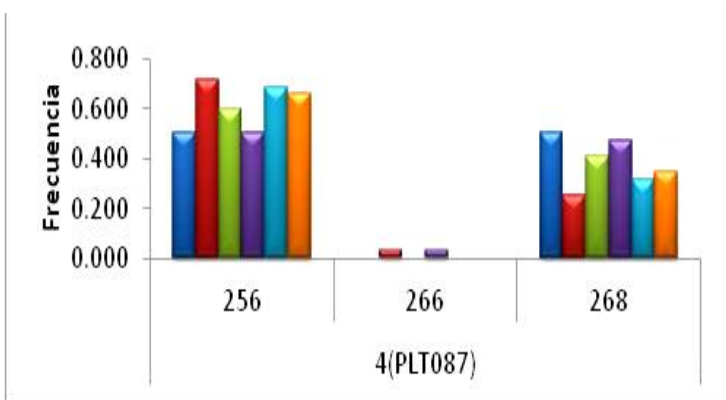
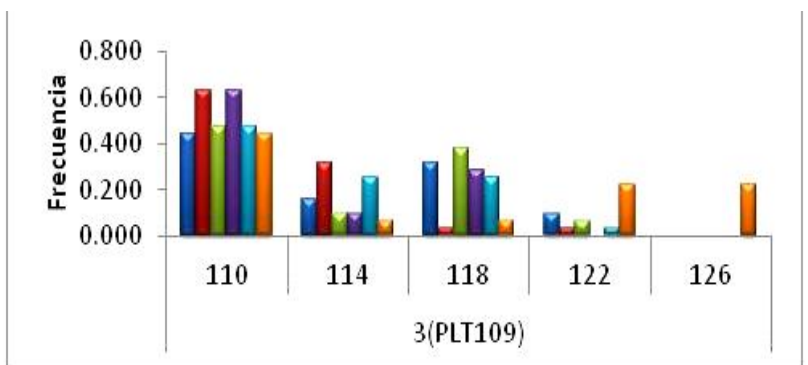
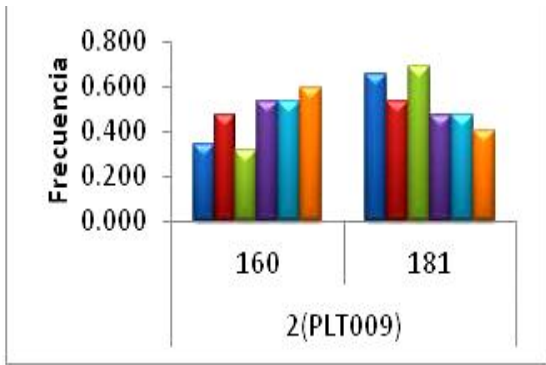


Figura 7 Frecuencias alélicas para cada uno de los locos en las poblaciones. Azul fuerte: Amanalco, Rojo: Rancho, Verde: Mesón Viejo, Morado: Amanalco C, Azul claro: Carretera, Naranja: Palo Seco.



Distribución y frecuencias genotípicas

Se encontraron un total de 63 genotipos para el total de la población (Cuadro 5, Anexo 4). El mayor número de genotipos se encontró en PLD005, PLT109, PLT064 con un total de 11, mientras que el loci PLT009 presento el número mas bajo con 3 genotipos. El loci PLT064 obtuvo un total de 22 heterocigotos, siendo el que obtuvo el mayor número, por el contrario el locus PLT107 obtuvo el menor número con 6 heterocigotos. Los loci que presentaron el menor y mayor cantidad de genotipos homocigotos, fueron el loci PLT042 con 6 y PLT064 con 15 respectivamente. Las poblaciones más destacadas son Rancho con el mayor número de heterocigotos, un total de 24, Amanalco C con pocos heterocigotos, un total de 14; la población de Palo Seco con 20 homocigotos obtuvo el mayor número y Mesón Viejo el menor número de homocigotos al obtener 13.

Cuadro 5. Número de genotipos por locus para el total de las poblaciones y para cada población.

Genotipos	Amanalco		Rancho		Meson Viejo		Amanalco C		Carretera		Palo Seco		Total		
	Total	Het	Hom	Het	Hom	Het	Hom	Het	Hom	Het	Hom	Het	Hom	Het	Hom
PLD005	11	4	2	6	2	3	2	1	1	2	2	3	3	19	12
PLT009	3	1	1	1	1	1	1	2	4	1	2	1	2	7	11
PLT109	11	4	2	3	1	3	1	2	2	4	3	2	4	18	13
PLT087	4	1	2	2	2	1	2	2	1	1	2	1	2	8	11
PLT039	7	2	1	3	3	2	1	1	4	2	1	2	1	12	11
PLT064	11	3	2	4	3	4	2	2	2	5	3	4	3	22	15
PLT107	4	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	6	8
PLT042	6	2	1	2	0	2	1	2	0	2	2	4	2	14	6
PLT045	6	1	2	2	3	2	2	1	1	2	2	1	2	9	12
Total	63	19	14	24	17	19	13	14	17	20	18	19	20	115	99

Heterocigosidad

El valor promedio de la heterocigosidad observada (H_0) para todas las poblaciones fue de 0.650 (Cuadro 6), mientras que para la población de Amanalco fue de 0.764, en Rancho fue de 0.715, en Mesón Viejo fue de 0.729, en Amanalco C fue de 0.736, en Carretera fue de 0.576 y en Palo Seco fue de 0.382 (Cuadro 7). En Amanalco la H_0 se presento desde 0.563 hasta 0.938, en Rancho desde



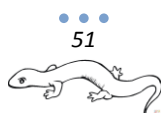
0.438 hasta 1, en Mesón Viejo desde 0.500 hasta 0.938, en Amanalco C desde 0.563 a 1, en Carretera desde 0.375 a 0.875 y en Palo Seco desde 0.188 hasta 0.750.

Por otro lado, el valor promedio de la heterocigosidad esperada (H_E) para todas las poblaciones fue de 0.535, en Amanalco el valor promedio fue de 0.566, en Rancho fue de 0.578, en Mesón Viejo fue de 0.540, en Amanalco C fue de 0.529, en Carretera fue de 0.511 y en Palo Seco fue de 0.489. Con un intervalo de la H_E de 0.404 a 0.732 en Amanalco, en Rancho de 0.420 a 0.750, en Mesón Viejo de 0.420 a 0.674, en Amanalco C de 0.404 a 0.678, en Carretera de 0.305 a 0.662 y en Palo Seco de 0.170 a 0.705.

Y por último la Heterocigosidad esperada de Nei para todas las poblaciones fue de 0.553, pero en Amanalco fue de 0.584, en Rancho de 0.597, en Mesón Viejo fue de 0.558, en Amanalco C fue de 0.546, en Carretera fue de 0.528 y en Palo Seco de 0.505. El loci que presento menor diversidad genética fue el PLT107 ($H_O=0.51$, $H_E=0.384$ y $H_{nei}=0.397$) y la población con menor diversidad genética fue Palo Seco ($H_O=0.382$, $H_E=0.489$ y $H_{nei}=0.505$), por otro lado, el loci con mayor diversidad fue el PLT042 ($H_O=0.896$, $H_E=0.617$ y $H_{nei}=0.636$) y la población con mayor diversidad fue Amanalco ($H_O=0.764$, $H_E=0.566$ y $H_{nei}=0.584$).

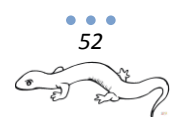
Cuadro 6. Valores de diversidad genética por cada locus en todas las poblaciones. na: promedio del número observado de alelos, ne: número efectivo de alelos (Kimura y Crow 1964), H_O : heterocigosidad observada, H_E : heterocigosidad esperada (Levene 1949), H_{nei} : heterocigosidad esperada de Nei (1978).

	PLD005	PLT009	PLT109	PLT087	PLT039	PLT064	PLT107	PLT042	PLT045	Promedio
Na	5	2	4	2.333	3	4.5	2.167	3.167	2.833	3.222
Ne	2.837	1.914	2.699	1.893	1.922	3.204	1.676	2.628	2.024	2.311
Ho	0.646	0.719	0.625	0.51	0.594	0.708	0.51	0.896	0.646	0.650
He	0.633	0.476	0.616	0.469	0.449	0.685	0.384	0.617	0.491	0.535
H_{Nei}	0.654	0.492	0.636	0.484	0.464	0.707	0.397	0.636	0.507	0.553
H_{T_est}	0.720	0.500	0.662	0.487	0.479	0.722	0.407	0.644	0.523	0.572



Cuadro 7. Valores de diversidad genética por población y por cada locus.

		PLD005	PLT009	PLT109	PLT087	PLT039	PLT064	PLT107	PLT042	PLT045	Promedio
Amanalco	Na	6.000	2.000	4.000	2.000	3.000	4.000	2.000	3.000	2.000	3.111
	Ne	3.737	1.822	3.103	2.000	2.073	3.084	1.679	2.768	1.992	2.473
	Ho	0.813	0.688	0.688	0.625	0.875	0.875	0.563	0.938	0.813	0.764
	He	0.732	0.451	0.678	0.500	0.518	0.676	0.404	0.639	0.498	0.566
	Hnei	0.756	0.466	0.700	0.516	0.534	0.698	0.417	0.659	0.514	0.584
Rancho	Na	7.000	2.000	4.000	3.000	4.000	6.000	2.000	3.000	5.000	4.000
	Ne	3.413	1.992	2.040	1.724	2.960	4.000	1.822	2.462	2.560	2.552
	Ho	0.813	0.938	0.688	0.438	0.750	0.750	0.438	1.000	0.625	0.715
	He	0.707	0.498	0.510	0.420	0.662	0.750	0.451	0.594	0.609	0.578
	Hnei	0.730	0.514	0.526	0.433	0.683	0.774	0.466	0.613	0.629	0.597
Meson Viejo	Na	4.000	2.000	4.000	2.000	3.000	4.000	2.000	3.000	3.000	3.000
	Ne	2.547	1.753	2.681	1.932	1.724	3.066	1.882	2.359	2.359	2.256
	Ho	0.750	0.625	0.938	0.688	0.500	0.625	0.750	0.813	0.875	0.729
	He	0.607	0.430	0.627	0.482	0.420	0.674	0.469	0.576	0.576	0.540
	Hnei	0.627	0.444	0.647	0.498	0.433	0.696	0.484	0.595	0.595	0.558
Amanalco C	Na	4.000	2.000	3.000	3.000	2.000	4.000	3.000	3.000	2.000	2.889
	Ne	2.498	1.992	2.090	2.124	1.679	3.103	2.032	2.462	1.753	2.192
	Ho	0.813	0.813	0.563	0.625	0.563	0.875	0.750	1.000	0.625	0.736
	He	0.600	0.498	0.521	0.529	0.404	0.678	0.508	0.594	0.430	0.529
	Hnei	0.619	0.514	0.538	0.546	0.417	0.700	0.524	0.613	0.444	0.546
Carretera	Na	4.000	2.000	4.000	2.000	3.000	5.000	2.000	3.000	3.000	3.111
	Ne	2.073	1.992	2.893	1.753	1.724	2.960	1.438	2.653	1.962	2.161
	Ho	0.438	0.563	0.563	0.500	0.563	0.688	0.375	0.875	0.625	0.576
	He	0.518	0.498	0.654	0.430	0.420	0.662	0.305	0.623	0.490	0.511
	Hnei	0.534	0.514	0.675	0.444	0.433	0.683	0.315	0.643	0.506	0.528
Palo Seco	Na	5.000	2.000	5.000	2.000	3.000	4.000	2.000	4.000	2.000	3.222
	Ne	2.753	1.932	3.391	1.822	1.373	3.012	1.205	3.066	1.519	2.230
	Ho	0.250	0.688	0.313	0.188	0.313	0.438	0.188	0.750	0.313	0.382
	He	0.637	0.482	0.705	0.451	0.271	0.668	0.170	0.674	0.342	0.489
	Hnei	0.657	0.498	0.728	0.466	0.280	0.690	0.175	0.696	0.353	0.505



Estructura genética

Se encontraron valores negativos de F_{IS} en todos los locus, lo cual indica un exceso de heterocigotos en la población. La F_{IT} indica que los locus PLD005, PLT109, PLT064 presentan un exceso de heterocigotos de los individuos con respecto a la población, mientras que los demás locus muestran una deficiencia de heterocigotos. La media armónica de D_{est} fue de 0.023 mientras que el promedio de F_{ST} fue de 0.056, el número efectivo de grupos genéticamente distintos (Δ_S) calculado para todos los loci fue de 1.092 (Cuadro 8).

Cuadro 8. Índices de diferenciación de todas las poblaciones y para cada locus. F_{IS} , F_{ST} y F_{IT} : Índices de fijación estimados según Weir y Crockerham (1984). G_{ST_est} =Diferenciación genética según Nei y Chesser (1983). G'_{ST_est} = Diferenciación genética según Hedrick (2005). Δ_{ST} = Componente de diversidad entre grupos genéticos o número efectivo de grupos genéticos distintos según Jost (2008). D : diferenciación actual según Jost (2008). D_{est} : estimado diferenciación genética actual según Jost (2008) con una corrección para tamaños de muestra pequeños.

	F_{ST}	F_{IT}	F_{IS}	G_{ST_est}	G'_{ST_est}	Δ_{ST}	D	D_{est}
PLD005	0.116	0.099	0.013	0.092	0.3	1.294	0.272	0.229
PLT009	0.042	-0.445	-0.485	0.017	0.036	1.042	0.048	0.02
PLT109	0.065	0.051	0.017	0.04	0.124	1.126	0.134	0.087
PLT087	0.031	-0.055	-0.057	0.005	0.012	1.03	0.034	0.006
PLT039	0.058	-0.245	-0.293	0.033	0.067	1.053	0.061	0.035
PLT064	0.047	0.014	-0.002	0.021	0.082	1.119	0.128	0.062
PLT107	0.051	-0.26	-0.299	0.026	0.046	1.035	0.041	0.021
PLT042	0.037	-0.399	-0.427	0.011	0.035	1.066	0.075	0.024
PLT045	0.057	-0.241	-0.286	0.032	0.071	1.062	0.07	0.04
Promedio	0.056	-0.165	-0.202	0.031	0.086	1.092	0.096	$\bar{N}=0.023$

Las correlaciones en los valores de F_{ST} con D_{est} fueron significativas con una $R^2= 0.852$ (figura 9). La diferenciación es alta cuando F_{ST} es mayor a 0.1, diferenciación intermedia cuando F_{ST} oscila entre 0.05- 0.1 y una diferenciación baja cuando F_{ST} es menor de 0.05, bajo estos criterios se encontró que las poblaciones tienen una estructura genética baja con una F_{ST} pareada de (0.015-0.64, $x= 0.034$ ($F_{st}<0.05$) y de D_{est} pareada de (0.000-0.083, $x= 0.021$), en las demás poblaciones se

encontró una diferenciación genética débil y solo Palo Seco con una estructura genética intermedia (Cuadro 9).

Cuadro 9. Diferenciación genética para cada población. Debajo de la diagonal F_{ST} y arriba de la diagonal (D_{est}).

	Amanalco	Rancho	Mesón Viejo	Amanalco C	Carretera	Palo Seco
Amanalco		0.010	0.000	0.000	0.009	0.083
Rancho	0.029		0.015	0.014	0.013	0.062
Mesón Viejo	0.018	0.038		0.000	0.007	0.068
Amanalco C	0.020	0.039	0.015		0.001	0.029
Carretera	0.030	0.040	0.025	0.018		0.008
Palo Seco	0.060	0.064	0.055	0.040	0.024	

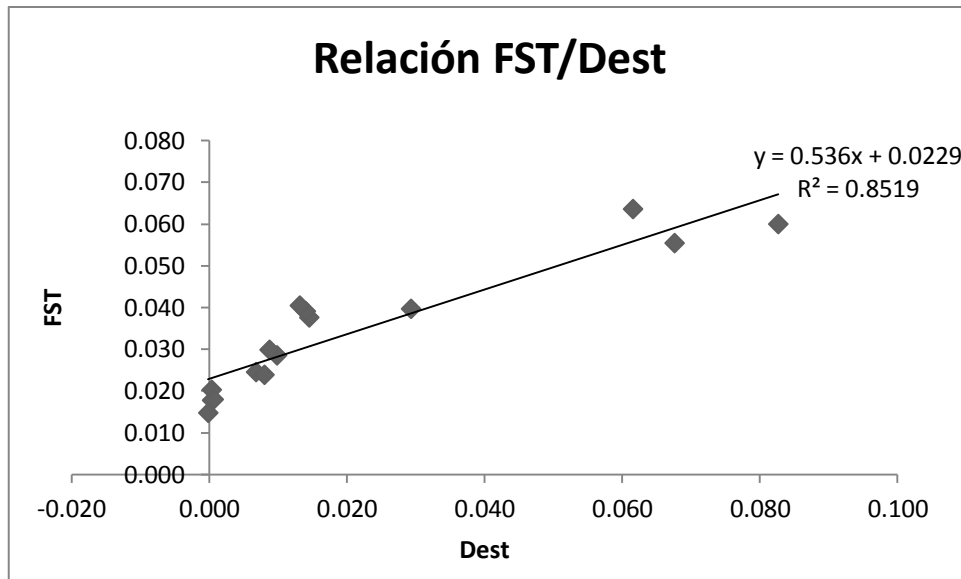


Figura 8. Relación entre los índices de diferenciación F_{ST} y D_{est} .

Los resultados del AMOVA mostraron un valor de $F_{ST}=0.039$ (Cuadro 10) y de $R_{ST}=0.028$ (Cuadro 11). La mayor variación se encontró dentro de las poblaciones en los dos índices, con un porcentaje de 96% para F_{ST} y 97% en R_{ST} , mientras que, la menor variación se presentó entre poblaciones con un 4% para los valores de F_{ST} y un 3% para R_{ST} , siendo muy parecidos los valores de variación. En

cuanto a la significancia, tanto F_{ST} como R_{ST} son significativos con una $p=0.002$ y $p=0.020$ respectivamente.

Cuadro 10. Análisis de varianza molecular en base en los valores de F_{ST} para todas las poblaciones de *P. robertsi*.

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	%
ENTRE poblaciones	5	28.641	5.728	0.101	4%
DENTRO de poblaciones	186	462.719	2.488	2.488	96%
Total	191	491.359		2.589	100%
	$F_{ST}= 0.039$	$p=0.002$			

Cuadro 11. Análisis de varianza molecular con base en los valores de R_{ST} para todas las poblaciones de *P. robertsi*.

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	%
ENTRE poblaciones	5	4084.818	816.964	12.329	3%
DENTRO de poblaciones	186	78573.469	422.438	422.438	97%
Total	191	82658.286		434.767	100%
	$R_{ST}= 0.028$	$p=0.020$			

Mediante la distancia genética estándar de Nei (DS: Nei 1972) se obtuvo un árbol de consenso de N-J (Fig 11), donde se observa que la población ancestral es la de Amanalco C con un soporte de bootstrap de 53% dando origen a dos ramas. Cabe destacar que los individuos de las localidades Palo Seco y Carretera son más estrechamente relacionados con un bootstrap de 94, al igual que Amanalco y Rancho estando más relacionados con un bootstrap de 64.

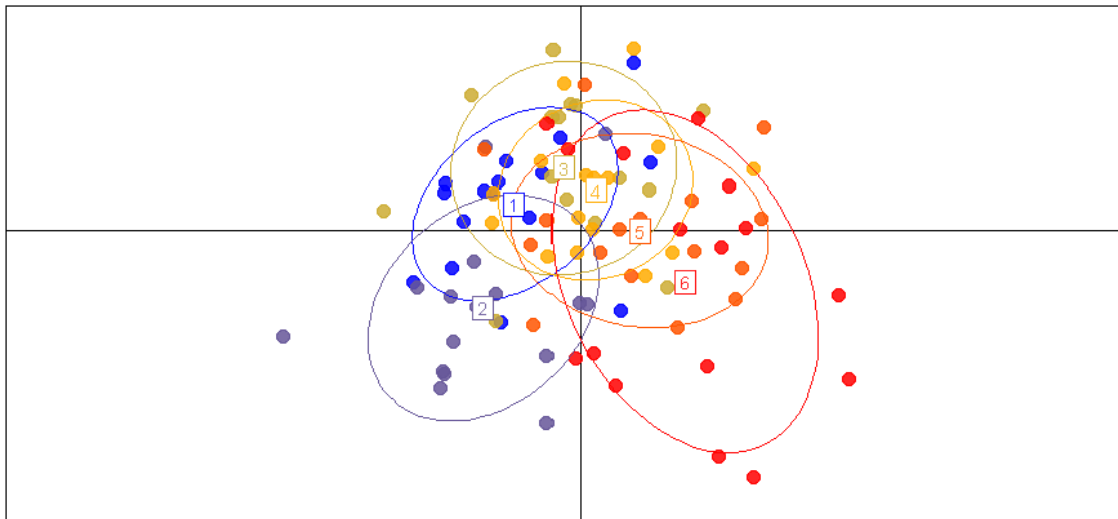


Figura 9. Análisis de componentes principales discriminante en el que se observan las 6 localidades estudiadas: 1=Amanalco (azul), 2= Rancho (Morado), 3= Mesón Viejo (Dorado), 4= Amanalco C (Amarillo), 5= Carretera (Naranja) y 6= Palo Seco (Rojo).

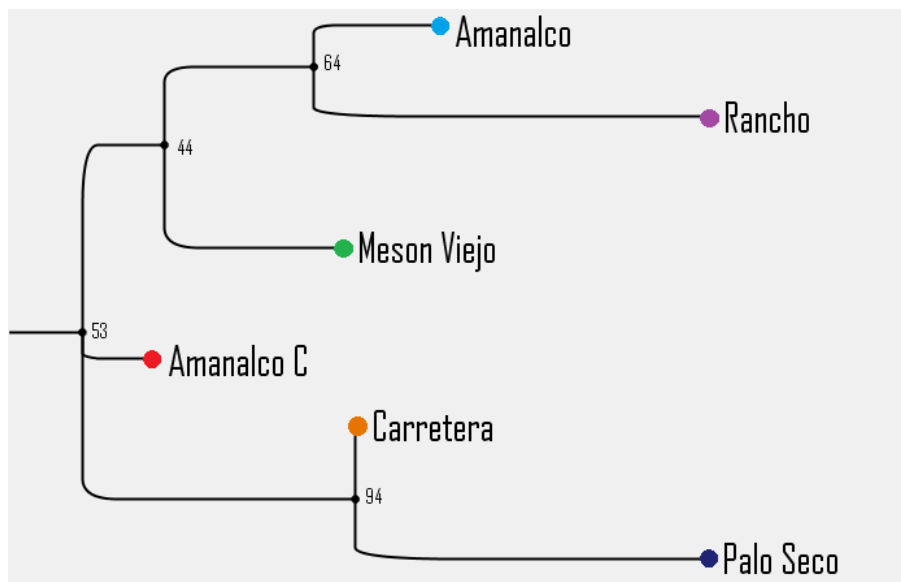


Figura 10. Árbol construido por el método de N-J utilizando el estimado de distancias genéticas estándar de Nei: DS (Nei 1972) entre las localidades de *P. robertsi* utilizando un bootstrap de 1000.

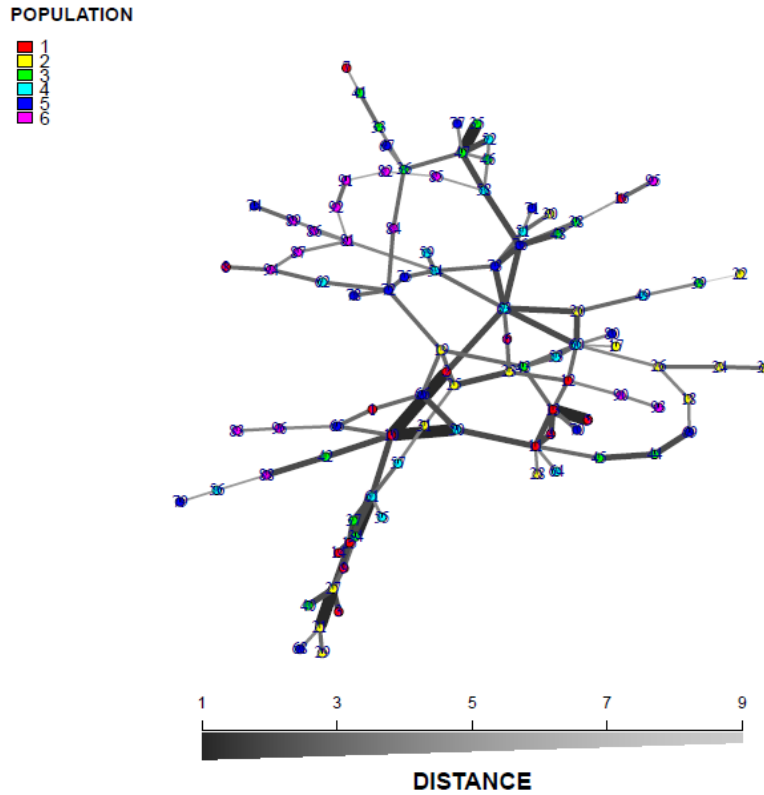


Figura 11. Árbol construido utilizando las distancias de Bruvo *et al.* (2004) a partir de las redes de distribución mínimas (MSN). Localidades 1: Amanalco, 2: Rancho, 3: Mesón Viejo, 4: Amanalco C, 5: Carretera, 6: Palo Seco.

La prueba de Mantel mostró una correlación positiva pero no significativa entre distancia genética y distancia geográfica entre las poblaciones con un $R^2 = 0.0181$, $p = 0.00$ (Figura 13).

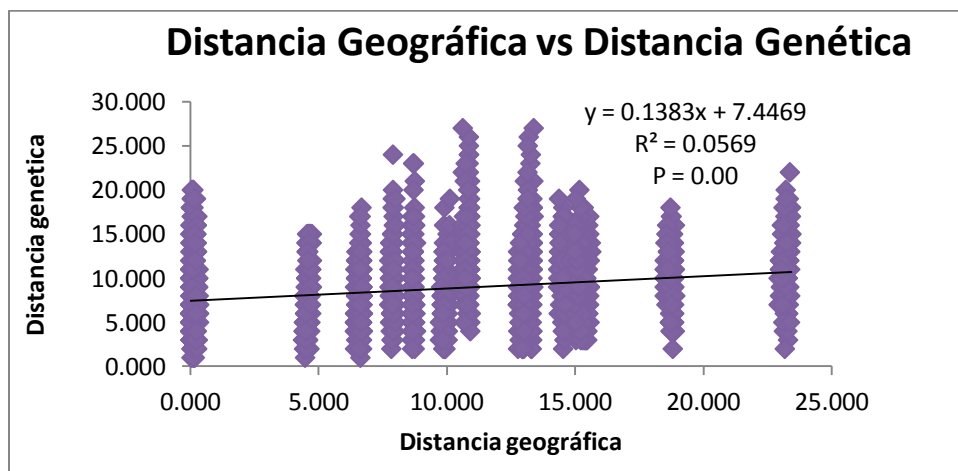


Figura 12. Prueba de Mantel estadísticamente significativa; los puntos representan las comparaciones pareadas entre localidades de colecta

Demografía Histórica

Relaciones de Parentesco

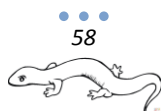
De 4560 combinaciones posibles de los 96 organismos se obtuvieron las relaciones de parentesco, entre los cuales observamos que en el total de las poblaciones los individuos no están relacionados con un 70.4%, los que están relacionados por ser hermanos representan un 12.9%, mientras que los medios hermanos representan un 10.6% y finalmente los relacionados por ser padres e hijos obtuvieron un 6.1%.

En las poblaciones se muestra un patrón semejante, con la mayoría de los individuos no relacionados, siendo Palo Seco el sitio que obtuvo un mayor porcentaje con 81.7% y Amanalco el sitio que obtuvo menor porcentaje de individuos no relacionados con 66.7%. Dentro de los individuos relacionados, se observaron que el mayor porcentaje de medios hermanos se encontró en Carretera con un 10% y el menor porcentaje se observó en Amanalco C con un 2.5%. Por otro lado, el mayor porcentaje de hermanos se observó en Amanalco con un 27.5% y el menor con 5.8% en Carretera. Y por último los Padres e hijos se encontraron con mayor porcentaje en Amanalco C y Carretera con 5.8% en los dos sitios, mientras que en Amanaco se encontró un 0.83% siendo la población menor porcentaje de padres e hijos (Cuadro 12).

Cuadro 12. Relaciones de parentesco en cada una de las poblaciones y para el total de las poblaciones.

	Amanalco	Rancho	Mesón Viejo	Amanalco C	Carretera	Palo Seco	Total Poblaciones
No relacionados	66.7%	72.5%	78.3%	70%	78.3%	81.7%	70.4%
Medios Hermanos	5%	6.7%	3.3%	2.5%	10%	7.5%	10.6%
Hermanos	27.5%	18.3%	15%	21.7%	5.8%	7.5%	12.9%
Padres e Hijos	0.83%	2.5%	3.3%	5.8%	5.8%	3.3%	6.1%

El análisis de parentesco de Queller y Goodnight (1989) demostró que la media del coeficiente de parentesco r_{gg} fue significativamente más alto que los intervalos de confianza esperados de la distribución nula en 3 poblaciones: Amanalco C, Carretera y Palo Seco; lo que indica que procesos



como endogamia, deriva génica o un sesgo reproductivo están incrementando el parentesco genético (Figura 14).

También se observó que la población de Palo Seco presentó los valores de la media de r_{qq} más alta (0.135) seguido por Carretera (0.109) y Amanalco C (0.108), por el contrario Amanalco y Rancho presentaron los valores más bajos de la media de r_{qq} con 0.024 y 0.029 respectivamente.

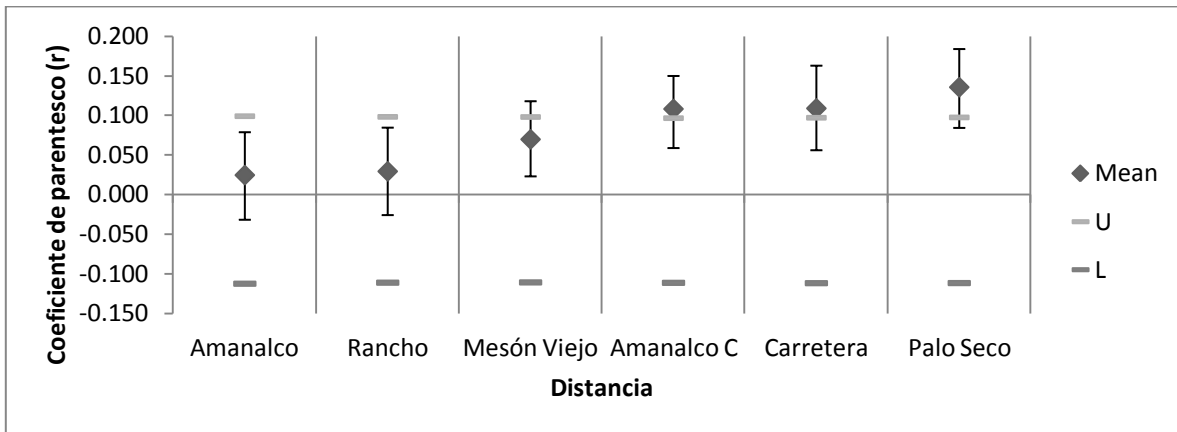


Figura 13. Media del coeficiente de parentesco entre todas las poblaciones de *P. robertsi*. Las barras rojas son los intervalos de confianza superiores y los intervalos de confianza inferiores con un 95% de confianza con una distribución nula, las barras azules son la media observada de parentesco generadas con 9999 permutaciones y 1000 de bootstraps.

Tamaño efectivo y migración

Se obtuvo el tamaño efectivo poblacional (N_e) basado en el desequilibrio de ligamiento para el total de las poblaciones usando diferentes frecuencias alélicas por lo que varía de $N_e=52.9$ a $N_e=13.6$. El mayor tamaño efectivo poblacional se obtuvo en Amanalco C independientemente de las frecuencias alélicas empleadas teniendo una $N_e=19.2$ a $N_e=19.6$, siguiéndole la población de Carretera con una $N_e=16.2$ a $N_e=16.9$. Los valores más bajos en el tamaño efectivo poblacional se obtuvieron para Amanalco con $N_e=1.9$ a $N_e=2.7$, Rancho con $N_e=9.7$ a $N_e=2.7$ y Palo Seco con una $N_e=3.3$ a $N_e=6.3$ individuos (Cuadro 13).

Cuadro 13. Tamaño efectivo poblacional mediante el método de desequilibrio de ligamiento y mediante coancestría en cada una de las poblaciones.

	Frecuencia Alélica Usada			
	0.05	0.02	0.01	0+
Poblaciones	52.9	31.4	25.1	13.6
Amanalco	1.9	2.7	2.7	2.7
Rancho	9.7	2.9	2.9	2.9
Mesón Viejo	8.5	7.7	7.7	7.7
Amanalco C	19.2	19.6	19.6	19.6
Carretera	16.2	12.9	12.9	12.9
Palo Seco	3.3	6.3	6.3	6.3

Cuello de Botella

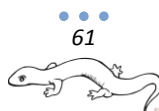
Los resultados mostraron que hay evidencia de cuello de botella ($p \leq 0.05$) asociado a un exceso de heterocigosis bajo el modelo de IAM (90% de SMM, 10% de IAM, varianza de 10%) para el total de las poblaciones ($p=0$), mientras que bajo el modelo de TPM y SMM no fue significativo ($p=0.50$ y $p=0.75$ respectivamente). Bajo el modelo de IAM y TPM se encontró evidencia de cuello de botella (70% de SMM, 30 de IAM, varianza de 30%) con una $p=0.00$ para el IAM y $p=0.01$ para el TPM, por el contrario bajo el modelo de SMM con una $p=0.75$ no se encontró pruebas de cuello de botella (Cuadro 14). Bajo el modelo de TPM (70% de SMM, 30% de IAM, varianza de 10%) no se observó la presencia de cuello de botella en la población de Rancho, ni en Palo seco, mientras que bajo el modelo de SMM tampoco hay presencia de cuello de botella en Rancho, Carretera y Palo Seco, lo cual se asemeja al modelo de SMM y TPM (90% de SMM, 10% de IAM, varianza de 10%) que presentan las mismas poblaciones sin cuello de botella. Por el contrario las poblaciones con evidencias de cuello de botella son Amanalco, Mesón Viejo y Amanalco C en cada uno de los modelos previamente descritos (IAM, TPM y SMM) con el 90% de SMM, 10% de IAM y varianza de 10% con un valor de $p=0.00$ y con el 70% de SMM, 30 de IAM, varianza de 30% también se encontró una presencia de cuello de botella en los 3 modelos usados con una $p=0$ (Cuadro 15).

Cuadro 14. Prueba de cuello de botella para todas las poblaciones de *P. robertsi*, bajo los tres modelos: IAM, TPM y SMM, con una probabilidad de 90% y una varianza de 10; una probabilidad de 70% y una varianza de 30.

Locus	90% Probabilidad, 10 Varianza				70% Probabilidad, 30 Varianza			
		I.A.M.	T.P.M.	S.M.M.	I.A.M.	T.P.M.	S.M.M.	
	He	Heq	Heq	Heq	He	Heq	Heq	
PLD005	0.72	0.622	0.761	0.788	0.72	0.623	0.714	0.79
PLT009	0.5	0.164	0.199	0.207	0.5	0.164	0.19	0.205
PLT109	0.662	0.463	0.617	0.655	0.662	0.468	0.561	0.655
PLT087	0.487	0.292	0.409	0.437	0.487	0.291	0.357	0.44
PLT039	0.48	0.389	0.534	0.571	0.48	0.389	0.478	0.571
PLT064	0.722	0.578	0.727	0.756	0.722	0.578	0.674	0.756
PLT107	0.407	0.293	0.408	0.437	0.407	0.293	0.357	0.441
PLT042	0.644	0.387	0.534	0.572	0.644	0.387	0.48	0.57
PLT045	0.523	0.527	0.68	0.713	0.523	0.529	0.625	0.715
Wilcoxon (una cola, exceso de heterosigosidad)		p= 0.00	p= 0.50	p= 0.75	p= 0.00	p= 0.01	p= 0.75	

Cuadro 15 Exceso de heterocigosis en cada una de las poblaciones bajo los diferentes modelos de mutación IAM, TPM, y SMM. Los valores resaltados muestran presencia de cuello de botella ($p \leq 0.05$).

Poblaciones	90% Probabilidad, 10 Varianza			70% Probabilidad, 30 Varianza		
	I.A.M.	T.P.M.	S.M.M.	I.A.M.	T.P.M.	S.M.M.
Amanalco	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Rancho	0.00	0.36	0.50	0.00	0.12	0.5
Mesón Viejo	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Amanalco C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Carretera	0.00	0.10	0.21	0.00	0.01	0.17
Palo Seco	0.01	0.21	0.41	0.01	0.15	0.41



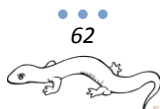
Discusión

Se han realizado algunos trabajos sobre diversidad genética en anfibios, sin embargo este trabajo presenta el primer estudio sobre estructura y diversidad genética en *Pseudoeurycea robertsi* especie microendémica y amenazada, donde por primera vez se emplean 9 microsatélites como marcadores moleculares para analizar su estado genético en 6 localidades del Nevado de Toluca. Estos microsatélites fueron diseñados para *Pseudoeurycea leprosa* (Velo-Antón *et al.* 2009) pero dado que las regiones que flanquean a los microsatélites están altamente conservadas en ocasiones se pueden usar para diferentes especies (Selkoe y Tioonen 2006). Nueve de los once microsatélites descritos para *P. leprosa* se emplearon en este trabajo debido a que los locus PLT028 y PLT066 presentaban alelos nulos y desviaciones en el equilibrio de H-W (Velo-Antón *et al.* 2009).

Diversidad genética

Los análisis mostraron una desviación significativa de las proporciones del equilibrio de H-W en la población de Palo Seco, debido a una deficiencia de heterocigotos en los locus PLD005 y PLT109. Esta desviación de H-W para la población de Palo Seco puede deberse a diversos factores como la heterocigosidad observada y la presencia de alelos exclusivos para esta población, ya que presentan la heterocigosidad mas baja de todas las poblaciones y es la única población en la que la heterocigosidad esperada es mayor a la observada ($H_E > H_O$, Cuadro 7). Esta desviación del equilibrio sugiere que no hay apareamiento aleatorio (Loew *et al.* 2005), lo que puede generar que se pierdan o fijen alelos entre las poblaciones, favoreciendo un incremento en la diferenciación entre dichas poblaciones (Vázquez-Domínguez *et al.* 2012). Otro factor puede ser la deriva genética que se considera la principal causa de pérdida a largo plazo de la variación genética y conduce a una mayor probabilidad de endogamia, el principal factor genético que amenaza la supervivencia a corto plazo de las poblaciones (Frankham *et al.* 2005; Vega *et al.* 2007; Sunny *et al.* 2014b).

Se encontró una diversidad genética de media a baja en el total de las poblaciones, que concuerda con su limitada distribución resultado de un tamaño poblacional pequeño (Percino-Daniel 2008). La diversidad fue mayor a la esperada ($H_O=0.650$, $H_E= 0.535$, $H_{nei}=0.553$) en el total de las poblaciones,

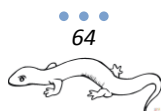


lo que se ha encontrado en otras especies de anfibios donde la heterocigosidad observada es mayor a la esperada ($H_O > H_E$, Sunny *et al.* 2014; Guannan Wen *et al.* 2015; Heredia-Bobadilla *et al.* 2016, Cuadro 16). Lo mismo se observó para las poblaciones Amanalco ($H_O=0.764$, $H_E= 0.566$, $H_{nei}=0.584$), Rancho ($H_O=0.715$, $H_E= 0.578$, $H_{nei}=0.597$), Mesón Viejo ($H_O=0.729$, $H_E= 0.540$, $H_{nei}=0.558$), Amanalco C ($H_O=0.736$, $H_E= 0.529$, $H_{nei}=0.546$) y Carretera ($H_O=0.576$, $H_E= 0.511$, $H_{nei}=0.528$) con una mayor diversidad a lo esperado, contrastando con la población de Palo Seco la cual presentó una baja diversidad genética mostrando heterocigosidad menor a la esperada ($H_O=0.382$, $H_E= 0.489$, $H_{nei}=0.505$) valores similares reportados en *Triturus marmoratus* ($H_O=0.37$, $H_E=0.43$ Jehle *et al.* 2005), la baja diversidad genética se ha reportado por diversas causas como en anuros de las especies *Hyla arborea* debido a un efecto de endogamia y fragmentación de las poblaciones que reducen sus tamaños (Andersen *et al.* 2004) y en salamandras como *Ambystoma tigrinum* que presentan bajos niveles de diversidad genética ($H_E= 31.7$), como resultado de procesos históricos tales como cuellos de botella que han reducido el tamaño efectivo (Spear *et al.* 2006). Es importante destacar que la baja diversidad genética en Palo Seco podría sugerir que la especie está empezando a declinar debido a la fragmentación del hábitat, las actividades antropogénicas y el aislamiento (Noel y Lapointe 2010).

La heterocigosidad observada (0.650) es semejante a la heterocigosidad esperada en *P. leprosa* (0.642; Velo-Antón *et al.* 2013) mientras que el rango de alelos por locus es menor al reportado, las poblaciones de *P. robertsi* presentan un rango de 2 a 8 alelos y *P. leprosa* de 3-33 (Velo-Antón *et al.* 2009). Sin embargo, la medida de variación alélica se considera una estimación pobre, debido a su dependencia por el tamaño de muestra, por lo que el valor de heterocigosidad es un mejor estimador para hacer comparaciones entre otras poblaciones de otros estudios realizados (Percino-Daniel 2008) además al no ser microsatélites específicos para la especie, se espera encontrar menor número de alelos en comparación con los reportados para la especie para los que fueron diseñados (Selkoe y Toonen 2006).

Cuadro 16. Estudios anteriores con el uso de microsatélites, en el que se comparan las estimaciones de variación y diferenciación genética en anfibios. Ho= Heterocigosidad observada, He= Heterocigosidad esperada.

Especie	Rango de Alelos	H _o	H _E	F _{ST}	F _{IS}	Referencia
<i>Plethodon cinereus</i>	6-14	0.55	0.58	0.013-0.050		Marsh <i>et al.</i> 2007
<i>Plethodon websteri</i>	2-10	0.44	0.43			Feist <i>et al.</i> 2016
<i>Pseudoeurycea leprosa</i>	3-33	0.20-0.88	0.22-0.93			Velo-Antón <i>et al.</i> 2009
<i>Plethodon cinereus</i>	5-18	0.38-0.49	0.44-0.66	0.188		Nöel <i>et al.</i> 2007
<i>Ambystoma maculatum</i>	13 - 44	0.534	0.69	0.073		Zamudio y Wieczorek 2007
<i>Ambystoma rivulare</i>	2-7	0.799	0.591	0.076	-0.36	Heredia-Bobadilla <i>et al.</i> 2016
<i>Ambystoma leorae</i>	4-9	0.804	0.613	0.021	-0.294	Sunny <i>et al.</i> 2013
<i>Ambystoma maculatum</i>	8-12	0.488-0.700	0.597-0.729	0.041	0.126	Purrenhage <i>et al.</i> 2009
<i>Ambystoma taylori</i>	4-10	0.476	0.662		0.331	Percino-Daniel <i>et al.</i> 2016
<i>Ambystoma velasci</i>	1-10	0.59	0.618		0.077	
<i>Ambystoma texanum</i>	11-20	0.543	0.798		0.330	Rhoads 2011
<i>Ambystoma tigrinum melanostictum</i>	1 - 5	0.295	0.31		0.072	Spear <i>et al.</i> 2006
<i>Calotriton arnoldi</i>	2-12	0.230-0.560	0.197-0.559		0.380	Valbuena-Ureña <i>et al.</i> 2017
<i>Calotriton asper</i>		0.438-0.641	0.44-0.619		-0.022-0.107	



<i>Rhyacotriton variegatus</i>	1.8-6.5	0.205-0.511	0.247-0.691	0.33	-0.157-0.419	Emel y Storfer 2014
<i>Leptobrachium leishanense</i>	5-19	0.807	0.837		0.035	Zhang <i>et al.</i> 2015
<i>Oophaga pumilio</i>	6-24	0.81			0.029 ± 0.017	Nowakowski <i>et al.</i> 2014
<i>Craugastor bransfordii</i>	23-41	0.81			0.020 ± 0.007	
<i>Bufo gargarizans</i>	4-11	0.5673	0.444	0.316		Wen <i>et al.</i> 2015
<i>Lithobates sylvaticus</i>	11-39	0.64-0.850	0.68-0.86		-0.10-0.18	D'Aoust-Messier y Lesbarreres 2015
<i>Triturus marmoratus</i>		0.37	0.43	0.11		Jehle <i>et al.</i> 2005
<i>Triturus cristatus</i>		0.55	0.59	0.07		

Cabe destacar que se encontraron 5 alelos privados en 5 individuos en la población de Rancho y 4 alelos privados en 10 individuos (Anexo 5) en la población de Palo Seco. Gran cantidad de alelos privados se han observado en otras poblaciones como en *Calotriton arnoldi*, donde la población de sector oriental esta muy genéticamente diferenciado del sector occidental atribuido al gran numero de alelos privados en cada sector (75 y 38, respectivamente; Valbuena-Ureña *et al.* 2017). La expresión de alelos recesivos, que tienen frecuencias alélicas bajas en una población, generalmente son invisibles a la selección hasta que los homocigotos se forman (Hedrick 2005). Una vez que los homocigotos están establecidos, la población se caracteriza por presentar endogamia (Percino-Daniel 2008) lo cual parece estar sucediendo en esta población al presentar el mayor número de homocigotos (20) y encontrar desviaciones del equilibrio H-W. Además un valor indirecto para medir el aislamiento genético es la presencia de alelos privados originados por eventos mutacionales, que al haber poco o nulo flujo genético estos nuevos alelos no se comparten (Hartl y Clark 1999).

Estructura genética

Se encontraron 3 grupos genéticos obtenidas por GENELAND con un $\text{LnPr} (K=3) = -608.062$ y una probabilidad de 45.99% después de diez corridas simultaneas (figura 7a). Las poblaciones Amanalco, Amanalco C, Mesón Viejo y Carretera representan un grupo genético, la población de Rancho es otro grupo y Palo Seco representa el último grupo. Esta división de grupos genéticos se podrían adjudicar a ciertas características del paisaje, las poblaciones de Amanalco, Amanalco C, Mesón Viejo y Carretera se encuentran en un bosque continuo de oyamel, mientras que Rancho y Palo Seco se encuentran entre manchones de bosque rodeados de pastizal inducido (Anexo 6), esta ultima población se encuentra un poco alejada de las demás y su cercanía con la Carretera Estatal 10, podría limitar el paso de migrantes hacia las otras poblaciones. Los caminos o carreteras constituyen barreras recientes que afectan la dispersión al reducir la migración de los individuos, lo que puede llegar a tener consecuencias negativas para la estructura genética de las poblaciones (Marsh *et al.* 2008). Si las carreteras reducen o eliminan el flujo genético entre poblaciones, la diversidad genética puede perderse y las poblaciones aisladas comienzan a ser más divergentes entre sí (Gerlach and Musolf 2000; Epps *et al.* 2005). El efecto negativo de los caminos en anfibios se incrementa dependiendo de la tendencia de las especies a moverse grandes distancias o a la velocidad con la cual los individuos pueden cruzar los caminos (Gibbs 1998; deMaynadier and Hunter 2000). Algunos sapos como *Bufo calamita* actualmente prefieren moverse a través de áreas abiertas o a lo largo de caminos en lugar de hábitats boscosos, aunque usar los caminos como corredores de dispersión podría resultar en una alta mortalidad por los carros (Stevens *et al.* 2004).

Como se observa entre Amanalco C y Mesón Viejo en donde se encuentra la Carretera Federal 135, la cual podría actuar como barrera pero seguramente no ha pasado el tiempo suficiente para que estas poblaciones empiecen a divergir genéticamente, resultados que se ha observado en otros estudios en los cuales poblaciones cercanas a caminos de dos carriles no presentaban diferenciación genética y solo la población cercana a la carretera interestatal presentó diferenciación genética (Marsh *et al.* 2008).

Los valores del coeficiente de endogamia (F_{IS}) para el total de las poblaciones y los loci fue de -0.202, indicando una baja endogamia con exceso de heterocigosis, en otros estudios se han encontrado resultados similares como en Sunny *et al.* 2013 ($F_{IS} = -0.294$), Spear *et al.* 2006 ($F_{IS} = -0.089$ - 0.218) y Heredia-Bobadilla *et al.* 2016 ($F_{IS} = -0.36$). Obteniendo los valores más altos de F_{IS}



0.013 y 0.017, para los locus PLD005 y PLT109 respectivamente, los mismos locus que presentaron desviaciones en el equilibrio H-W en la población de Palo Seco, sugiriendo que esta desviación se pueda explicar por un déficit de heterocigosidad y un cierto grado de endogamia.

Los valores bajos de $F_{ST}=0.056$ permite detectar un débil grado de diferenciación genética en las poblaciones, de la misma manera el $D_{est}=0.023$ muestran una estructuración débil, este ultimo índice es adecuado para este tipo de estudio ya que presenta una corrección para tamaños de muestra pequeños (Jost 2008). Valores de diferenciación genética débil concuerdan con los reportados en estudios de anfibios y en general de salamandras con distribuciones limitadas (Jehle *et al.* 2005; Marsh *et al.* 2007; Zamudio y Wieczorek 2007; Purrenhage *et al.* 2009, Sunny *et al.* 2014, Nowakowski *et al.* 2014; Cuadro 16) lo cual muestra una diferenciación genética fuerte entre las poblaciones o una señal de flujo génico interrumpido.

Los valores pareados de F_{ST} y D_{est} comprueban la débil estructuración de las poblaciones los cuales van de $F_{ST}=0.015$ (dentro de las poblaciones de Amanalco C y Mesón Viejo) a 0.064 (dentro de Palo Seco y Rancho), $x= 0.034$, una similar diferenciación genética es observada en el $D_{est} =0.000$ (dentro de Amanalco C y Mesón Viejo) a 0.083 (en las poblaciones de Palo Seco y Amanalco) $x= 0.021$, valores ya que las regiones montañosas son lugares clave de biodiversidad que albergan un alto número de especies endémicas a menudo altamente diferenciadas (Myers *et al.* 2000).

El análisis de varianza molecular en base a los valores de F_{ST} mostro que solo el 4% de la variación se explica en términos de la diferencia entre poblaciones, mientras la mayoría de la variación se encuentra dentro de las poblaciones con un valor del 96% esto puede explicarse por una gran diferencia genotípica entre individuos ($F_{ST}=0.039$, $p=0.002$); de la misma manera los valores obtenidos con R_{ST} muestran que el mayor porcentaje de la variación se explica dentro de las poblaciones con 97% y el menor porcentaje se explica por la variación entre las poblaciones. Resultados semejantes se encontraron en el Análisis de Componentes Principales Discriminante (DAPC) en la que se observan las poblaciones entremezcladas como una nube de puntos en la que apenas se alcanzan a distinguir las localidades de Rancho y Palo seco (Figura 10).

El árbol de N-J construido a partir de las distancias genéticas de Nei (Nei 1972) nos muestra que la posible población ancestral es Amanalco C, de la cual divergen dos ramajes, uno en el que se agrupan Mesón Viejo, Amanalco y Rancho, resultando más estrechamente relacionados genéticamente Rancho y Amanalco; y por el otro ramaje se agrupan la población de Carretera y Palo Seco, los cuales están estrechamente relacionados (Figura 11). Mediante la distancia genética de

Bruvo apartir de las redes de distribución minimas se muestran los individuos de cada población que están más cercanos genéticamente, mostrando que las poblaciones Amanalco C, Amanalco, Mesón Viejo y Carretera son muy cercanos, mientras que los individuos de las localidades Rancho y Palo Seco se encuentran un poco alejados genéticamente, corroborando la poca diferenciación genética dentro de las poblaciones (Figura 12).

Tamaño efectivo

La perdida de la diversidad genética por deriva genética y endogamia está directamente relacionada con el tamaño efectivo de la población, en grandes poblaciones estables con apareamiento aleatorio y muchos reproductores cada año, la deriva genética y la endogamia son mínimas y la diversidad genética se mantiene a través de generaciones (Allentoft y O'Brien 2010). Tamaños efectivos pequeños pueden ocurrir por una gran variedad de factores como son: cuellos de botella, aislamiento genético, asimetría en las proporciones de hembras y machos y diferencia en el éxito reproductivo entre individuos (Dubois 2004; Tennessen y Zamudio 2003; Myers y Zamudio 2004; Wang 2009).

Se cree que se requiere un tamaño efectivo mínimo en la población de 500 individuos para el mantenimiento a largo plazo de la variación genética para especies silvestres (Lynch y Landa 1998; Frankham 2005). Para minimizar los efectos de la endogamia, el tamaño mínimo efectivo de la población se sugiere que debe ser de 50 individuos (Soule 1980; Lynch y Landa 1998; Zhang et al 2015). Sin embargo, estudios recientes en poblaciones animales han mostrado que los tamaños efectivos son menores a lo que tradicionalmente se pensaba (Frankham 2009), especialmente los anfibios que a menudo tienen bajos tamaños de la población efectiva (Funk *et al.* 1999; Beebee y Griffiths 2005).

El tamaño efectivo para el total de las poblaciones es de $N_e=52.9$ a 13.6 individuos dependiendo de la frecuencia alélica empleada, resultado similar a otros estudios donde el tamaño efectivo es pequeño (Funk *et al.* 1999; Spear *et al.* 2006; Wang 2009; Savage *et al.* 2010; Sunny *et al.* 2014; Valbuena-Ureña *et al.* 2017), sin que se vea comprometida la diversidad genética, como se encontró en *Calotriton arnoldi* especie con uno de los rangos de distribución más pequeños de cualquier anfibio europeo (8km^2) y que muestra un tamaño efectivo pequeño con moderados niveles de diversidad genética y bajos niveles de endogamia (Valbuena-Ureña *et al.* 2017). La población que presento el mayor tamaño efectivo fue Amanalco C con $N_e=19.6$ a 19.2 , seguido de la población de

Carretera $N_e=16.2$ a 12.9 , mientras que las poblaciones con un tamaño menor de N_e fueron Amanalco ($N_e=2.7$ a 1.9) y Palo Seco ($N_e=6.3$ a 3.3), para esta última es posible que la deriva génica pueda estar actuando con mayor intensidad en esta población, dado el tamaño poblacional pequeño, la heterocigosidad baja que presenta y quizá también un proceso de endogamia.

Relaciones de Parentesco

En el análisis de relación de parentesco bajo el modelo de verosimilitud se encontró que de las 4560 combinaciones de los 96 individuos muestreados para la población en total, la mayoría no están relacionados (70.4%), seguidos los hermanos (12.9%), los medios hermanos (10.6%) y finalmente los padres e hijos (6.1%). Esto se puede deber a que las salamandras de la familia Plethodontidae presentan mecanismos para evadir procesos endogámicos a través de reconocimiento de químicos en la piel a través del olfato, con el cual, pueden diferenciar entre parientes, machos y hembras, (Waldman 1988; Walls y Roudebush 1991; Pfennig *et al.* 1994; Masters y Forester 1995; Cabe *et al.* 2007). Sin embargo bajo el modelo de relación de Queller y Goodnight (1989) se encontró que algunas poblaciones presentan valores de la media más altos de los intervalos de confianza esperados como Amanalco C(0.108), Carretera (0.109) y Palo Seco (0.135), indicando que las poblaciones podrían estar en algún proceso de endogamia, deriva génica o un sesgo reproductivo que este incrementando el parentesco; niveles de endogamia bajos a moderados se han encontrado en ambystomas (Heredia-Bobadilla *et al.* 2016) donde los valores de rgq cayeron por encima de los intervalos del 95%, los cuales se atribuyen a que la colecta de individuos se realizó entre marzo y agosto cuando hay una alta prevalencia de crías o juveniles (Sunny *et al.* 2014b; Lemos-Espinal *et al.* 2016).

En otros estudios, Parra-Olea *et al.* (2012) encontraron un alto parentesco en las poblaciones pedomorficas de Ambystomas, aunque la endogamia puede conducir a una disminución en el fitness, el grado en el que las poblaciones sufren de depresión endogámica puede variar ampliamente dependiendo de la historia de la población, los efectos del linaje y el medio ambiente (Keller y Waller 2002). Para el caso particular de Palo Seco que presento los valores de parentesco mas altos, se puede relacionar con la alta frecuencia de alelos privados (4 alelos privados en 10 individuos), el mayor numero de homocigotos que en las otras poblaciones, así como su lejana localización con respecto a las demás poblaciones.

Cuello de botella

Se encontró un cuello de botella en todas las poblaciones bajo el modelo de I.A.M, mostrándonos que hubo un cuello de botella reciente, sin embargo, el modelo IAM no es el más adecuado para detectar cuellos de botella, ya que puede detectar un exceso de heterocigosis incluso en poblaciones que no han sufrido una disminución poblacional reciente (Luikart y Cournet 1998). Como se menciona con anterioridad al usar microsatélites se tiene que considerar que predominantemente presentan el modelo de mutación paso a paso (SMM) pero con un cierto porcentaje de mutación tipo IAM, por lo que se recomienda considerar el tipo de mutación denominado de dos fases (TPM), bajo este contexto solo las poblaciones de Amanalco, Mesón Viejo y Amanalco C presentan cuello de botella.

Pero al considerar el total de las poblaciones también hay evidencia de un cuello de botella reciente, lo que se esperaría dado el grado de fragmentación que se presenta en esta zona, se han demostrado en estudios anteriores (Andersen *et al.* 2004) cómo la fragmentación ha contribuido a que se presenten cuellos de botella, lo que genero endogamia en las poblaciones de la rana Europea *Hyla arborea*; por otro lado un estudio en *Bufo calamita* (Beebee y Rowe 2001) encontró que en las poblaciones grandes, con oscilaciones naturales no se presentaba un cuello de botella, mientras que las poblaciones pequeñas que habían sufrido declives poblacionales, si presentaban evidencias de cuello de botella, y dado que el tamaño efectivo poblacional de *P. robertsi* es bajo es evidente el cuello de botella por el que está pasando la especie.

Implicaciones en la conservación

Los tres grupos genéticos determinados para *Pseudoeurycea robertsi* deben considerarse como unidades evolutivas significativas “*Evolutionarily Significant Units* o ESUs”. Al definir estas unidades se propone reconocer y proteger la herencia evolutiva y así el potencial evolutivo heredable sea mantenido mediante un conjunto de ESUs (Moritz 1994, 1995). Dentro de estas unidades se debe priorizar en conservar las poblaciones de Amanalco y Amanalco C, las cuales tienen los mayores niveles de diversidad genética, así como un alto número de alelos, representando un reservorio de diversidad genética. La preservación de las poblaciones con una alta diversidad genética es

especialmente importante para la preservación de la variación genética adaptativa y potencial evolutivo en la cara del cambio ambiental global (Spielman *et al.* 2004, Willi *et al.* 2007).

Para restablecer la diversidad genética en las poblaciones que se han visto más afectadas por la fragmentación del hábitat como Palo seco y Rancho se puede realizar una reubicación de individuos de otras poblaciones con mayor diversidad genética como Amanalco C, la cual obtuvo el mayor tamaño efectivo poblacional que las demás poblaciones, o establecer poblaciones “ex situ” en cautiverio para asegurar que no se pierdan los alelos raros y se reduzca la endogamia que se presenta en estas poblaciones.

La IUCN menciona que la salamandra *P. robertsi* se encuentra en un solo lugar con amenaza definida y una continua disminución de su extensión y calidad de su hábitat, además se considera que *P. robertsi* tiene un rango de distribución de 8km² (IUCN 2016), sin embargo en este estudio se encontró en otros sitios de los que se reporta en la literatura, presentándose en todos los sitios de muestreo Amanalco, Amanalco C, Mesón Viejo, Carretera, Rancho y Palo Seco, sin embargo el Nevado de Toluca es una de las regiones más perturbadas del cinturón Mexicano Trans-volcanico, con remanentes de solo 1346.9 km² (1,1%) de bosque de *Abies* y 6507.7 km² (5.4%) de bosque de *Pinus* (Sunny *et al.* 2015). La presencia de asentamientos humanos, parques, truchas, tala ilegal y otras actividades humanas son algunas de las amenazas a la biodiversidad en el Nevado de Toluca; el cual fue declarado Área Natural Protegida en 1936, pero recientemente se cambió esta protección a Área de Protección de Flora y Fauna desde 2013 (DOF 2013), estatus de protección que permite implementar una explotación moderada de los recursos, siendo muy probable que aumente la tala indiscriminada y las actividades antropogénicas provocando así un aumento en la fragmentación del hábitat de la salamandra (Candeano y Franco 2007).

Por lo que antes de realizar una reubicación de individuos para incrementar la biodiversidad se debe primero implementar programas de protección a la flora y fauna de las localidades donde se encuentran estos organismos para asegurar su sobrevivencia a largo plazo. Y como menciona Bobadilla *et al.* 2016, los esfuerzos de conservación se deben de realizar integrando a las poblaciones locales para que se fomente la protección a estas especies en peligro y a su ambiente a largo plazo. Como la implementación de tecnologías solares en las casas de las comunidades

cercanas al nevado, como calentadores solares y estufas solares para evitar el consumo de leña de los bosques cercanos que es donde habita *P. robertsi*.

Las salamandras Plethodontidas se distinguen por la falta de pulmones y la conducción de la respiración a través de la piel, por lo que, son propensos a los efectos negativos del aumento de las temperaturas y el CO₂ atmosférico (Bernardo y Spotila 2006), además presentan tolerancias fisiológicas más restringidas y nichos climáticos estrechos, con bajas tasas de dispersión lo cual las hace menos capaces de desplazarse a otras zonas en respuesta al cambio climático y a la pérdida de hábitat. Si persisten, estas especies deben adaptarse a ambientes variables o sobrevivir solo en aquellas áreas donde el clima se mantenga estable a través del tiempo (Hugall *et al.* 2002; Visser 2008). Por ello la conservación del bosque de *Abies-Pinus* es clave debido a que la fragmentación puede segregar los tipos de hábitats esenciales necesarios para diferentes etapas de la historia de vida de los anfibios, elevar los riesgos de desecación, aumentar la mortalidad relacionada con la dispersión y crear barreras de dispersión absolutas. En la salamandra *P. leprosa* habitante de los bosques del Nevado de Toluca se realizó un estudio (Velo-Antón *et al.* 2013) en el que se demostró que el cambio climático ha desempeñado un papel en la conformación y conectividad de la población; y para el año 2050 mediante proyecciones de nicho ecológico se espera que al incrementarse las temperaturas se provoque una pérdida dramática del hábitat, reduciendo la conectividad geográfica y el flujo de genes entre las poblaciones, además se espera una muy baja probabilidad de ocurrencia en la mayor parte de su distribución, así como una extinción local de poblaciones aisladas. Por lo cual se puede esperar que nuestra especie se verá amenazada por los cambios proyectados en las temperaturas globales, lo que reducirá sustancialmente la distribución del hábitat apropiado para su sobrevivencia.

Es necesario un manejo adecuado del suelo y de la vegetación para la conservación de esta y otras especies del APFFNT para mantener un hábitat continuo que sea óptimo a futuro, sería conveniente la implementación de corredores de dispersión entre las poblaciones fragmentadas, algunos estudios indican que los corredores pueden reducir la muerte en carreteras y promover el flujo génico en anfibios y reptiles (Yanes *et al.* 1995; Aresco 2005) y es aún más importante su implementación en especies con capacidades reducidas de dispersión como las salamandras, donde es crucial para que se lleve a cabo el intercambio genético y así impedir la pérdida de la diversidad genética adaptativa (Massot *et al.* 2008).



Conclusiones

Se encontraron 3 grupos genéticos de *P. robertsi*, en el grupo 1 se encuentran las poblaciones de Amanalco, Amanalco C, Mesón Viejo y Carretera, en el grupo 2 se encuentra la población de Rancho y en el último grupo se encuentra la población de Palo Seco.

Pseudoeurycea robertsi presenta niveles de variación genética moderados expresada como heterocigosidad (H_O , H_E y H_{nei}), comparables con los observados en otras especies de anfibios con distribuciones restringidas, sin embargo la población de Palo Seco presento bajos niveles de variación genética comparada con las otras poblaciones de estudio.

La población de Palo Seco mostro una desviación significativa de las proporciones del equilibrio de H-W, debido a una deficiencia de heterocigotos en los locus PLD005 y PLT109. El tamaño efectivo para el total de las poblaciones es bajo (menor a 50 individuos) pero similar a lo observado en otros anfibios, dependiendo de la frecuencia alélica empleada, mientras que la población que presento el mayor tamaño efectivo fue Amanalco C.

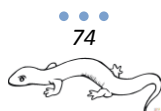
Algunas poblaciones presentan algún grado de endogamia como Carretera y Palo Seco, para el caso particular de Palo Seco que presento los valores de parentesco más altos, se puede relacionar con la alta frecuencia de alelos privados (4 alelos privados en 10 individuos), el mayor numero de homocigotos que en las otras poblaciones.

Se deben realizar urgentemente estrategias que aseguren la conservación de *P. robertsi* ya que se empiezan a observar los efectos de la fragmentación, la preservación de las poblaciones con una alta diversidad genética es especialmente importante para la preservación de la especie. Es necesario un manejo adecuado del uso del suelo y de la vegetación para evitar que las poblaciones de *P. robertsi* sigan declinando hasta llegar a la extinción.



Literatura citada

- Allendorf F y Luikart G. 2007. Conservation and the Genetics of Populations. Blackwell Publishing, Reino Unido.
- Allentoft ME, O'Brien J. 2010. Global Amphibian Declines, Loss of Genetic Diversity and Fitness: A Review. *Diversity*. 2: 47-71
- Amos W, Harwood J. 1998. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Proceedings of the Royal Society of London*. 353: 177-186.
- Andersen LW, Fog K y Damgaard C. 2004. Habitat fragmentation causes bottlenecks and inbreeding in the European tree frog (*Hyla arborea*). *Proceedings of the Royal Society*. 271: 1293-1302.
- Aranguren-Méndez JAR, Román-Bravo W, Isea Y, Villasmil J, Jordana J. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 13:1-6
- Aresco MJ. 2005. Mitigation measures to reduce highway mortality of turtles and other herpetofauna at a north Florida lake. *J Wildl Manage*. 69:549-560
- Arntzen JW, Smithson A, Oldham RS. 1999. Marking and tissue sampling effects on body condition and survival in the newt *Triturus cristatus*. *Journal of Herpetology*. 33(4): 567-576.
- Arroyo-Lamber D. 2008. Estructura genética en poblaciones fragmentadas de *Anolis uniformis* (Reptilia: Squamata) usando secuencias mitocondriales y microsatélites. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología, México.
- Ávila IK. 2009. Programa Municipal de Conservación y Manejo del Parque Nacional Nevado de Toluca (Sección Toluca). Coordinación General de Medio Ambiente. H. Ayuntamiento de Toluca. Estado de México. 200 pp.
- Avise JC. 1994. Molecular markers, the natural history and evolution. Chapman y Hall. USA. 511pp.
- Balloux F y Lugon-Moulin N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol Ecol*. 11(2):155-65.
- Balseiro A, Dalton KP, del Cerro A, Marquez I, Cunningham AA, Parra F, Prieto JM, Casais R. 2009. Pathology, isolation and molecular characterisation of a ranavirus from the common midwife toad *Alytes obstetricans* on the Iberian Peninsula. *Diseases of Aquatic Organisms*. 84: 95-104.
- Beebee TJC y Griffiths RA. 2005. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? *Biol Conserv*. 125: 271-285.
- Beebee TJC y Rowe G. 2001. Application of genetic bottleneck testing to the investigation of amphibian declines: a case study with natterjack toads. *Conservation Biology*. 15(1): 266-270.



- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. y Bonhomme F. 1996-2004 GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Berger L, Speare R, Daszak P, *et al.* 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 95: 9031-9036.
- Bernardo J y Spotila J. 2006. Physiological constraints on organismal response to global warming; mechanistic insights from clinally varying populations and implications for assessing endangerment. *Biology Letters.* 2: 135–139.
- Berven KA, Grudzien TA. 1990. Dispersal in the Wood frog (*Rana sylvatica*): implications for genetic population structure. *Evolution* 44:2047-2056
- Bierregaard RO *et al.* 1997. Key priorities for the study of fragmented tropical ecosystems. En: Laurance WF, Bierregaard RO. *Tropical forest remnants. Ecology, management, and conservation of fragmented communities:* 515-525. Univ. Chicago Press.
- Bille T. 2009. Field observations on the salamanders (Caudata: Ambystomatidae, Plethodontidae) of Nevado de Toluca, Mexico. *Salamandra.* 45 (3): 155-164.
- Blanché CV. 2011. Fragmentación de poblaciones en especies endémicas, raras y amenazadas de la región mediterránea. Universidad de Barcelona.
- Blaustein AR y Wake DB. 1995. The puzzle of declining amphibian population. *Sci. Amer.* 272: 52-57.
- Blaustein AR, Wake DB, Sousa WP. 1994. Amphibian declines—judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conserv. Biol.* 8: 60-71.
- Blaustein AR, Kiesecker JM, Chivers DP, Hokit DG, Marco A, Belden LK, Hatch A. 1998. Effects of ultraviolet radiation on amphibians: field experiments. *Am Zool.* 38:799–812
- Blouin MS. 2003. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends in Ecology and Evolution.* 18: 503-511.
- Bosch J, Martínez-Solano I, Garcia-Paris M. 2001. Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biological Conservation.* 97: 331-337.
- Brookfield JFY. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology.* 5: 453–455.
- Cabe PR, Page RB, Hanlon TJ, Aldrich ME, Connors L, Marsh DM. 2007. Fine-scale population differentiation and gene flow in a terrestrial salamander (*Plethodon cinereus*) living in continuous habitat. *Heredity.* 98: 53–60.



- Candeau DR, Franco MS. 2007. Dinamica y condiciones de vida de la poblacion del Parque Nacional Nevado de Toluca (PNNT) en la generacion de presion a los sistemas circundantes. *InvestigGeogr.* 62:44–68
- Carlsson J, Morrison CL, Reece KS. 2006. Wild and aquaculture populations of the Eastern oyster compared using microsatellites. *Journal of Heredity.* 97: 595-598.
- Carvajal-Rodriguez A y Uña-Alvarez J. 2011. Assessing Significance in High-Throughput Experiments by Sequential Goodness of Fit and q-Value Estimation.
- Castañeda-Rico SS. 2008. Diversidad genética de *Habromys simulatus*, una especie endémica y restringida al bosque mesófilo de montaña. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Castellanos-Morales G. 2009. El efecto de la fragmentación en la diversidad genética de los perros llaneros (*Cynomys ludovicianus*) en Janos – Nuevo Casas Grandes, Chihuahua, México. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Ceballos GJ. 2011. Propuesta de recategorización y decreto del Parque Nacional Nevado de Toluca. Secretaria del Medio Ambiente Gobierno del Estado de México. .
- Chapco W. 1976. An exact test of the Hardy-Weinberg law. *Biometrics.* 32: 183-189.
- Chapuis MP, Loiseau A, Michalakis Y, Leqoc M, Estoup A. 2005. Characterization and PCR multiplexing of polymorphic microsatellite loci for the locust *Locusta migratoria*. *Molecular Ecology Notes.* 5: 554-557.
- Chatfield C. 1983. *Statistics for Technology.* 3rd. Edition. Chapman and Hall Eds. New York.
- Collins JP, Crump ML. 2009. Extinction in our times. Global amphibian decline. Oxford University Press, Oxford.
- CONANP. 2013. Programa de Manejo: Área de protección de flora y fauna Nevado de Toluca. Estado de México.
- Corander J, Sirén J y Arjas E. 2006. Bayesian spatial modelling of genetic population structure. *Computational Statistics.* 23:111-129.
- Corn PS. 2001. Amphibian declines: review of some current hypothesis, pp. 663-696, in: SPARLING, D. W., LINDER, G y BISHOP, C.A. (eds), *Ecotoxicology of amphibians and reptiles.* SETAC Press, Pensacola, FL.
- Cornuet JM y Luikart G. 1997. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics.* 144:2001-2014.
- Crawford NG. 2010. SMOGD: software for the measurement of genetic diversity. *Molecular Ecology Resources.* 10: 556-557.
- D'Aoust-Messier AM y Lesbarrères D. 2015. A peripheral view: post-glacial history and genetic diversity of an amphibian in northern landscapes. *Journal of Biogeography.* 42:2078–2088.
- DeMaynadier PG y Hunter ML. 2000. Road effects on amphibian movements in a forested landscape. *Natural Areas Journal* 20:56–65.



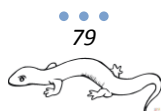
- Di Renzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdés AM, Slatkin M, Fremier NB. 1994. Mutational Processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 31: 66-3170.
- DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN (DOF). 1936. Decreto que declara Parque Nacional el «Nevado de Toluca, 15 de enero de 1936, México, D.F.
- Do C, Waples RS, Peel D, Macbeth GM, Tillett BJ, Ovenden JR. 2014. NeEstimator V2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Resources*. 14(1): 209-214.
- Donoso C, Premoli A, Gallo L, Ipinza R. 2004. Variación intraespecífica en especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Ed Universitaria S. A. Santiago de Chile. 420.
- Dubois A. 2004. Developmental pathway, speciation and supraspecific taxonomy in amphibians 1. Why are there so many frog species in Sri Lanka? *Alytes*. 22: 19-37.
- Eguiarte L y Piñero D. 1999. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. En: Nuñez-Farfán J. y Eguiarte L. *La evolución Biológica*, Universidad Nacional Autónoma de México, México
- Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*. 5: 435-445.
- Emel SL, Storfer A. 2014. Landscape genetics and genetic structure of the southern torrent salamander, *Rhyacotriton variegatus*. *Conserv Genet*
- Epps CW, Palsbll PJ, Wehausen JD, Roderick GK, Ramey RR, McCullough DR. 2005. *Ecol Lett* 8:1029–1038.
- Escalante-Hernández AE. 2001. Estructura genética de poblaciones de *Pinus pinacea*, usando como marcadores microsatélites de cloroplasto (cpSSR's). Tesis de Licenciatura. UNAM. Facultad de Ciencias. México.
- Esquer- Garrigós YS. 2008. Variación y estructura genética en la lagartija de cola rayada *Aspidoscelis hyperythra* (Sauria: Teiidae) mediante el uso de marcadores micro satélites. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C. La Paz B.C.S.
- Excoffier L, Smmosue PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA Haplotypes: Applications to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*. 131: 479-491.
- Fahrig L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 34: 487-515.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*. 164: 1567-1587.



- Feist SM, Mann TM y Mann DL. 2016. Genetic Characterization of Webster's Salamander (*Plethodon websteri*) Within a Fragmented Landscape, Using Novel Microsatellites. *Herpetological Conservation and Biology*. 12:85–95.
- Fischer J, Lindenmayer DB. 2007. Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. *Global Ecology and Biogeography*. 16: 265–280.
- Frankham R, Ballou J y Briscoe D. 2002. *Introduction to conservation genetics*, Cambridge University Press. Cambridge. UK.
- Frankham R, Ballou J y Briscoe D. 2005. *Introduction to conservation genetics*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Frankham R, Ballou JD y Briscoe DA. 2009. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Frankham R. 1997. Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity*. 78, 311-327.
- Frankham R. 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation*. 126: 131–40.
- Frankham R. 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation* 126:131-140
- Frankham R. 2009. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genet Res*. 66:95–107
- Freeland JR. 2005. *Molecular Ecology*. Ed John Wiley and Sons, Ltd. England. 338pp
- Freeman S, Herron JC. 2002. *Análisis Evolutivo*. Prentice Hall. España. 703pp
- Frías-Alvarez P, Zúñiga-Vega JJ y Flores-Villela O. 2010. A general assessment of the conservation status and decline trends of Mexican amphibians. *Biodiversity and Conservation*. 19:3699-3742.
- Funk WC, Tallmon DA y Allendorf FW. 1999. Small effective population size in the long-toed salamander. *Mol. Ecol*. 8: 1633-1640.
- Gaggiotti OE, Lange O, Rassmann K, Gliddons C. 1999. A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene for using microsatellite data *Molecular Ecology*. 8: 1513-1520.
- Gallina S y López-González C. 2011. *Manual de Técnicas para el estudio de la fauna*. Universidad Autónoma de Querétaro- Instituto de Ecología A. C. Querétaro, México. 1: 377.
- García-González C. 2012. *Diversidad genética poblacional de anfibios en hábitats urbanos y rurales. Aplicaciones para la conservación*. Oviedo: Universidad de Oviedo.
- Garner A, Rachlow J y Waits L. 2005. Genetic diversity and population divergence in fragmented habitats: Conservation of Idaho ground squirrels. *Conservation Genetics*. 6: 759-774.
- Garrido-Garduño T y Vázquez-Domínguez E. 2013. Métodos de análisis genéticos, espaciales y de conectividad en genética del Paisaje. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 84: 1031-1054.



- Garza JC, Williamson EG. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*.10: 305-318.
- Genebank. 2016. *Pseudoeurycea robertsi* clone e33.20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial gene for mitochondrial product, National Center for Biotechnology Information, Septiembre 26, 2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/14994582/>
- Gerlach G, Musolf K. 2000. Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision in bank voles. *Cons Biol* 14:1066–1074.
- Gibbs JP. 1998. Amphibian movements in response to forest edges, roads, and streambeds in southern New England. *Journal of Wildlife Management* 62:584–589.
- Gill DE. 1978. The metapopulation ecology of the red-spotted newt, *Notophthalmus viridescens* (Rafinesque). *Ecological Monographs*. 48: 145-166
- Gillespie JH. 2004. Population genetics: A concise guide. The John Hopkins University Press. USA. 223pp.
- Goldstein DB y Schlötterer C. 1999. *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press.
- González-González EA. 2011. Análisis de la diversidad genética en poblaciones naturales de especies vegetales amenazadas: *Ilex perado* ssp. *Lopezlilloi* (Aquifoliaceae), *Silene nocteolens* (Caryophyllaceae) y *Sorbus aria* (Rosaceae). Universidad de las palmas de la gran Canaria.
- Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC. 2004. *Genética Moderna*. McGraw Hill Interamericana España, 676.
- Guillot G, Estoup A, Mortier F, Cosson JF. 2005a. A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics*, 170:1261–1280.
- Guillot G, Mortier F, Estoup A. 2005b. GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*. 5: 712–715.
- Guillot G. 2009. On the inference of spatial structure from population genetics data using the Tess program *Bioinformatics*. In press
- Guo SW y Thompson E A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*. 48: 361-372.
- Hamer AJ, McDonnell MJ. 2008. Amphibian ecology and conservation in the urbanising world: A review. *Biological Conservation* 141: 2432-2449.
- Hartl DL y Clark AG. 2007. *Principles in population genetics*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, EUA
- Hartl DL, Clark AG. 1999. *Principles of Population Genetics*. Third Edition. Ed Sinauer Associates, Inc. United States. 551 pp.
- Hedrick PW y Miller P. 1992. Conservation genetics: Techniques and fundamentals. *Ecological Applications* 2(1): 30-46.



- Hedrick PW. 2000. Genetics of Populations. Jones and Bartlett Publishers. Canada. 544 pp
- Hedrick PW. 2001. Conservation genetics: Where are we now? Trends. Ecol. Evol. 16:629-636.
- Hedrick, PW. 2005. Population Genetics. Jones and Bartlett Publishers, Massachusetts, EUA
- Heredia Bobadilla RL, Monroy-Vilchis O, Zarco-González MM, Martínez- Gómez D, Mendoza-Martinez GD, Sunny A. 2016. Genetic structure and diversity in an isolated population of an endemic mole salamander (*Ambystoma rivulare* Taylor, 1940) of central Mexico. Genetica. 144: 689-698
- Hill WG. 1981. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. Genet Res. 38: 209–216.
- Hoelzel AR. 1998. Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach. Second Edition. IRL Press at Oxford University Press. New York, USA. 445p.
- Hoffmann M, Hilton-Taylor C, Angulo A, Böhm M, Brooks TM, Butchart SHM. 2010. The Impact of Conservation on the Status of the World's Vertebrates. Science. 330: 1503-1509.
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. Molecular Ecology Resources. 9:1322-1332.
- Hugall A, Moritz C, Moussalli A, Stanisic A. 2002. Reconciling paleodistribution models and comparative phylogeography in the Wet Tropics rainforest land snail *Gnarosophia bellendenkerensis* (Brazier 1875). Proceedings of the National Academy of Sciences. 99: 6112–6117.
- Hyatt AD, McDonald KR, Hines HB, Lips KR, Marantelli G, Parkes H. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. Proc Natl Acad Sci USA. 95:9031–9036
- IUCN SSC Amphibian Specialist Group. 2016. *Pseudoeurycea robertsi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T59393A53983925.
- Jarne P, Lagoda P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends in Ecology and Evolution. 11: 424-429.
- Jehle R, Wilson GA, Arntzen JW, Burke T. 2005. Contemporary gene flow and the spatio-temporal genetic structure of subdivided newt populations (*Triturus cristatus*, *T. marmoratus*). Journal of Evolutionary Biology. 18: 619-628.
- Jehle R, Wilson GA, Arntzen JW, Burke T. 2005. Contemporary gene flow and the spatio-temporal genetic structure of subdivided newt populations (*Triturus cristatus*, *T. marmoratus*). Journal of Evolutionary Biology 18, 619-628.
- Jombart T y Collins C. 2017. A tutorial for Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) using adegenet 2.1.0. Imperial College London
- Jombart T, Devillard S y Balloux F. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. BMC Genetics 11: 94.



- Jombart T. 2008. Adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24: 1403-1405.
- Jones AT, Ovenden JR y Wang YG. 2016. Improved confidence intervals for the linkage disequilibrium method for estimating effective population size. *Heredity*. 1–7
- Jost L. 2008. GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*. 17: 4015–4026.
- Kalinowski S, Wagner AP, Taper ML. 2006. ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*. 6: 576-579.
- Kamvar ZN, Tabima JF, Grünwald NJ. 2014. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* 2:e281.
- Keller LF, Waller DM. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Tree* 17:230–241
- Kimura M. 1953. “Stepping-stone” model of population. *Annual Report of the National Institute of Genetics Japan*. 3: 62–63.
- Kirchman JJ, Wrhittingham LA y Sheldon FH. 2000. Relations among Cave Swallow populations (*Petrochelidon fulva*) determined by comparison of microsatellite and cytochrome b data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 4, No. 1, pp.107-121.
- Kohn M y Wayne R. 1997. Facts from feces revisited. *Trends in Ecology and Evolution*. 12(6): 223 227.
- Kucken DJ, Davis JS, Petranks JW, Smith CK. 1994. Anakeesta stream acidification and metal contamination-effects on a salamander community. *J Environ Qual*. 23:1311–1317
- Lande R. 1995. Mutation and conservation. *Conservation Biology*. 9:82-791.
- Lavilla EO. 2001. Amenazas, declinaciones poblacionales y extinciones en anfibios argentinos. *Cuadernos de Herpetología*, 15: 59-82.
- Lemos-Espinal JA, Smith GR, Ruíz AH, Ayala RM. 2016. Stream use and population characteristics of the endangered salamander, *Ambystoma altamirani*, from the Arroyo Los Axolotes, State of Mexico, Mexico. *Southwest Nat*. 61(1):28–32
- Lewin B. 2008. *Genes IX*. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury, Mass, EE UU. 892 pp.
- Li CC. 1955. *Population genetics*. University of Chicago Chicago.
- Li WH. 2000. *Fundamentals of molecular evolution*. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA. 478pp.
- Lima-Rosa CAV, Hurtz MH, Oliveira LFB, Andrades-Miranda J, Mattevi MS. 2000. Heterologous amplification of microsatellite loci from Mouse and Rat in Oryzomyine and Thomasomyine South American rodents. *Biochemical Genetics*. 38: 97-108.
- Loew SS, Williams DF, Ralls K, Pilgrim K, Fleischer RC (2005) Population structure and the genetic variation in the endangered Giant Kangaroo Rat (*Dipodomys ingens*). *Conservation Genetics*. 6: 495 510.



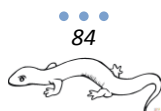
- Lorente I, Gamo D, Gómez JL, Santos R, Flores L, Camacho A, Galindo L, Navarro J. 2004. Los efectos biológicos del cambio climático. *Ecosistemas*. 13(1): 103-110.
- Luikart G, Allendorf FW, Cornuet JM, William BS. 1997b. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity*. 89: 238–247.
- Luikart G, Cornuet JM. 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*. 12: 228-237.
- Luikart G. 1997. Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks and monitoring genetic change PhD. Thesis University of Montana Missoula.
- Lynch JF, Wake DB, Yang SY. 1983. Genic and Morphological Differentiation in Mexican Pseudoeurycea (Caudata: Pletodontidae), with a Description of a New Species. *Copeia*. 4: 884-894.
- Lynch M, Conery J y Burger R. 1995. Mutational meltdowns in sexual populations. *Evolution*. 49:1067-1080.
- Lynch M, Lande R. 1998. The critical effective size for a genetically secure population. *Animal Conservation*. 1, 70–2.
- Lynch M. 1993. The mutational meltdown in asexual populations. *J. Hered.* 84:339-344.
- Marco A. 2003. Impacto de radiación ultravioleta y contaminación en anfibios. *MUNIBE, Donostia/ San Sebastián*. 16: 44-55
- Marsh DM y Trenham PC. 2001. Metapopulation dynamics and amphibian conservation. *Conserv. Biol.* 15: 40-49.
- Marsh DM, Page RB, Hanlon TJ, Bareke H, Corritone R, Jetter N, Beckman NG, Gardner K, Selfert DE, Cabe PR. 2007. Ecological and genetic evidence that low order stream inhibit dispersal by red backed salamanders (*Plethodon cinereus*). *Can J Zool.* 85:319–327
- Marsh DM, Page RB, Hanlon TJ, Corritone R, Little EC, Seifert DE, Cabe PR. 2008. Effects of roads on patterns of genetic differentiation in red-backed salamanders, *Plethodon cinereus*. *Conserv Genet.* 9:603–613.
- Marsh DM, Trenham PC. 2001. Metapopulation dynamics and amphibian conservation. *Conservation Biology* 15(1): 40-49.
- Martel A, Spitzen-Van der Sluijs SA, Blooi M, Bert W, Ducatelle R, Fisher MC, *et al.* 2013. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110:15325–15329.
- Massot M, Clobert J, Ferriere R. 2008. Climate warming, dispersal inhibition and extinction risk. *Global Change Biology*. 14: 461–469.
- Masters BS, Forester DC. 1995. Kin recognition in a brooding salamander. *Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences*. 261: 43–48.



- Matschiner M, Salzburger W. 2009. TANDEM: integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows. *Bioinformatics*. 25: 1982–1983.
- McNeely JA, Miller KR, Reid WV, Mittermeier RA, Werner TB. 1990. Conserving the world's biological diversity. IUCN, World Resources Institute, Conservation
- Mendoza-Almeralla C, Burrowes P, Parra-Olea G. 2015. La quitridiomycosis en los anfibios de México: una revisión. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 86: 238-248.
- Mendoza-Martínez A. 2011. Variabilidad y estructura genética del murciélago zapotero *Artibeus jamaicensis* en tres tipos de vegetación de la isla Cozumel. Universidad Nacional Autónoma de México. 68 pp.
- Miller CR, Joyce P, Waits LP. 2002. Assessing allelic dropout and genotyping reliability using maximum likelihood. *Genetics*. 160: 357–366.
- Miller CR, Waits LP. 2003. The history of effective population size and genetic diversity in the Yellowstone grizzly (*Ursus arctos*) Implications for conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100: 4334–4339.
- Miller JR, Hobbs RJ. 2002. Conservation where people live and work. *Conserv Biol* 16:330–337
- Molina C y Péfaur JE. 2010. Declinación de Anfibios: Una revisión bibliográfica comentada (1960-2000). *Ecol. Lat. Am.* 15(3): 31-46.
- Morales-García AE. 2012. Filogeografía y genética de poblaciones de *Tadarida brasiliensis* (Chiroptera: Molossidae) en México. Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF.
- Moreno Vázquez S. 2001. Análisis de resultados en la caracterización molecular. En: González Andrés F y Pita JM. Conservación y caracterización de recursos fitogenéticos. Publicaciones INEA. España.
- Moreno-Letelier A. 2007. Tamaño Efectivo de la Población in *Ecología Molecular*. Eguiarte L.E., V. Souza, X. Aguirre (compiladores). SEMARNAT-INE-UNAM-CONABIO, 2007. 592pp.
- Moreno-Vazquez S. 2001. Análisis de resultados en la caracterización molecular. En: Gonzalez-Andres y Pita Villamil JM. Conservación y caracterización de Recursos Fitogenéticos. INEA. Valladolid, España.
- Moritz C. 1994. Defining “Evolutionary significant units” for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*. 9: 373-375.
- Moritz C. 1995. Uses of molecular phylogenies for conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 349, 113-118.
- Myers EM, Zamudio KR. 2004. Multiple paternity in an aggregate breeding amphibian: the effect of reproductive skew on estimates of male reproductive success. *Mol Ecol*. 13:1951–1963
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GA, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- Navarrete-Vargas D. 2008. Estructura genética de la nutria de río (*Lontra longicaudis*) en la reserva de Montes azules, Chiapas. México: Universidad Nacional Autónoma de México.



- Nei M y Chesser RK. 1983. Estimation of fixation indices and gene diversities. *Annals of Human Genetics*. 47: 253-259.
- Nei M, Takezaki N. 1994. Estimation of genetic distances and phylogenetic trees from DNA analysis In: *Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production* (Smith et al eds). University of Guelph. Canada. 21: 405-412.
- Nei M, Tarima F y Tateno T. 1987. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal Molecular and Evolution*. 19: 153-170. In: Nei, M. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press. New York.
- Nei M. 1972. Genetic distances between populations. *American Naturalist*. 106: 283-292.
- Nei M. 1974. A new measure of genetic distance In: *Genetic Distance*. (J F Crow and C Denniston eds) Plenum Press Nueva York, pp 63-76.
- Noel S y Lapointe FJ. 2010. Urban conservation genetics: study of a terrestrial salamander in the city. *Biol Conserv*. 143:2823–2831
- Nomura T. 2008. Estimation of effective number of breeders from molecular coancestry of single cohort sample. *Evolutionary Applications*. 1: 462-474.
- Nowakowski AJ, DeWoody JA, Fagan ME, Willoughby JR, Donnelly MA. 2014. Mechanistic insights into landscape genetic structure of two tropical amphibians using field derived resistance surfaces. *Mol Ecol*. (3):580-95
- Noël S, Ouellet M, Galois P, Lapointe F. 2007. Impact of urban fragmentation on the genetic structure of the eastern red-backed salamander. *Conserv Genet*, 8:599-606.
- Ohta T y Kimura M. 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetical Research*. 22: 201-204.
- Paetkau D y Strobeck C. 1995. The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears. *Molecular Ecology*. 4: 519–520.
- Palstra F. P. D. E. Ruzzante. 2008. Genetic estimates of contemporary effective population size: what can they tell us about the importance of genetic stochasticity for wild population persistence? *Molecular Ecology*. 17. 3428-3447.
- Parra-Olea G y Wake DB. 2001. Extreme morphological and ecological homoplasy in tropical salamanders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98 (14): 7888-7891.
- Parra-Olea G, Flores-Villela O y Mendoza-Almeralla C. 2014. Biodiversidad de anfibios en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 460-466.
- Parra-Olea G, Rovito SM, Márquez-Valdelamar L, Cruz G, Murrieta-Galindo R, Wake DB. 2010. A new species of *Pseudoerycea* from the cloud forest in Veracruz, México. *Zootaxa*. 2725: 57-68.



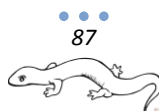
- Parra-Olea G, Wake D, Hanken J. 2008. *Pseudoeurycea robertsi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T59393A11916577.
- Parra-Olea G, Zamudio KR, Recuero E, Aguilar-Miguel X, Huacuz D, Zambrano L. 2012. Conservation genetics of threatened Mexican axolotls (*Ambystoma*). *Anim Conserv*. 15(1):61–72
- Peakall R y Smouse PE. 2012. GENALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*. 28: 2537-2539.
- Pechmann JHK y Wilbur HM. 1994. Putting declining amphibian populations in perspective natural fluctuations and human impacts. *Herpetologica*. 50: 65-84.
- Percino-Daniel R, Recuero E, Vázquez-Domínguez E, Zamudio KR, Parra-Olea G. 2016. All grown-up and nowhere to go: paedomorphosis and local adaptation in *Ambystoma* salamanders in the Cuenca Oriental of México. *Biol J Linn Soc*. 118 (3): 582-597.
- Percino-Daniel R. 2008. Estructura genética y Conservación de poblaciones de *Ambystoma taylori* y *Ambystoma velasci* que habitan en los lagos cráter de Puebla: análisis con Microsatélites. UNAM. México, DF.
- Pfennig DW, Sherman PW, Collins JP. 1994. Kin recognition and cannibalism in polyphenic salamanders. *Behavioral Ecology*. 5:225–232.
- Pierce BA. 2009. Genética: Un enfoque conceptual. 3 ed. Médica Panamericana. España. 832.
- Polich RL, Searcy CA, Shaffer HE. 2013. Effects of tail clipping on survivorship and growth of larval salamanders. *Journal Wildl Manag*. 77 (7): 1420-1425.
- Pounds JA, Fogden MPL, Campbell JH. 1999. Biological response to climate change on a tropical mountain. *Nature*. 398:611–615
- Primack R. 2001. Problemas de las poblaciones pequeñas. En: Primack R. *et al*. Fundamentos de conservación biológica. Fondo de Cultura Económica, México. pp. 363-383.
- Purrenhage JL, Niewiarowski PH, Moore FBG. 2009. Population structure of spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*) in a fragmented landscape. *Mol Ecol*. 18:235–247
- Queller DC, Goodnight KF. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, 43: 258 275.
- R Development Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Raymond M y Rousset F. 1995. GENEPOP (v1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*. 86:248-249
- Reed DH, Frankham R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*. 17: 230–237.



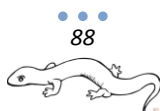
- Rhoads EA. 2011. Landscape genetics of the small-mouthed salamander (*Ambystoma texanum*) in a Fragmented Habitat: impacts of landscape change on breeding populations in Hardin county Ohio forests. PhD Thesis. University of Dayton
- Rippey B, Battarbee RW. 1990. Decline of the natterjack toad *Bufo calamita* in Britain: paleoecological, documentary and experimental evidence for breeding site acidification. *Biol Conserv* 53:1–20
- Rittenhouse TAG, Semlitsch RD. 2006. Grasslands as movement barriers for a forest-associated salamander: Migration behavior of adult and juvenile salamanders at a distinct habitat edge. *Biological Conservation*. 131: 14-22.
- Rocha M y Gasca J. 2007. Ecología Molecular de la conservación. En: Eguiarte LE, Souza V y Aguirre X. Ecología molecular. Instituto Nacional de Ecología UNAM y Conabio, México
- Rochambeau H, Fournet-Hanocq F y Vu Tien Khang J. 2000. Measuring and managing genetic variability in small populations. *Ann. Zootech.* 49: 77-93.
- Rothermel BB. 2004. Migratory success of juveniles: a potential constraint on connectivity for pond breeding amphibians. *Ecological Applications*. 14: 1535-1546.
- Rousset F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources*. 8: 103-106.
- Rovito SM, Parra-Olea G, Vasquez-Almazan CR, Papenfuss TJ, Wake DB. 2009. Dramatic declines in neotropical salamander populations are an important part of the global amphibian crisis. *PNAS* 106:3231–3236
- Sánchez-Jasso JM, Aguilar-Miguel X, Medina-Castro JP, Sierra-Domínguez G. 2013. Riqueza específica de vertebrados en un bosque reforestado del Parque Nacional Nevado de Toluca, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* , 84:360-373.
- Sánchez-Jasso JM y Cebrián-Abellán F. 2015. Turismo de naturaleza en áreas protegidas de México; una propuesta de conservación, aprovechamiento y desarrollo local en el Nevado de Toluca. *Cuadernos de turismo*. 36: 339-365.
- Savage WK, Fremier AK, Shaffer HB. 2010. Landscape genetics of alpine Sierra Nevada salamanders reveal extreme population subdivision in space and time. *Molecular Ecology* 19:3301–3314.
- Schlotterer C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109: 365-371.
- Scotti I, Paglia G, Magni F, Morgante M. 1999. Microsatellite markers as a tool for the detection of intra-and interpopulational genetic structure. En: Guillet EM. *Wich DNA Marker for Wich Purpose? Final proyect of Development and Investigation, optimisation and validation of molecular tolos for assessment of biodiversity in forest tres in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme*



- Selkoe KA, Tioonen RJ. 2006. Microsatellites for ecologist: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*. 9: 615-629.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, México.
- Shaw PW, Pierce GJ, Boyle PR. 1999. Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate the veined squid *Loligo forbesi* demonstrated with microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*. 8:407-417.
- Sinsch U. 1990. Migration and orientation in anuran amphibians. *Ethol. Ecol. Evol.* 1990. 2: 65-79.
- Sinsch U. 1992. Structure and dynamic of a natterjack toad metapopulation (*Bufo calamita*). *Oecologia* 90:489-499.
- Skelly DK, Werner EE y Cortwright SA. 1999. Long-term distributional dynamics of a Michigan amphibian assemblage. *Ecology*. 80: 2326-2337.
- Slatkin M. 1994. Gene flow and population structure. En: *Ecological genetics*, Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457-462.
- Solbrig OT. 1970. *Plant Biosystematics*. The MacMillan Co.
- Sosa P, Batista F, González MA, Bouza N. 2002. La Conservación Genética de las Especies Amenazadas en: *Biología de la Conservación de Plantas Amenazadas: Técnicas de Diagnóstico del Estado de Conservación*. Bañares, A. (Ed.). Organismo Autónomo de Parques Nacionales, España. pp. 133-160.
- Soule ME. 1980. Thresholds for survival: Maintaining fitness and evolutionary potential. In: Soule ME, Wilcox BA, eds. *Conservation Biology: An Evolutionary-ecological Perspective*. Sinauer, MA, pp. 151-70.
- Spear SF, Peterson CR, Matocq MD y Storfer A. 2006. Molecular evidence for historical and recent population size reductions of tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*) in Yellowstone National Park. *Conservation Genetics*. 7: 605-611.
- Spielman D, Brook BW y Frankham R. 2004. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 101:15261-15264.
- Stevens VM, Polus E, Wesselingh RA, Schtickzelle N, Baguette M. 2004. Quantifying functional connectivity: experimental evidence for patch-specific resistance in the natterjack toad (*Bufo calamita*). *Landsc Ecol* 19:829-842



- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, Walter RW. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* (Washington D C). 306: 1783-1786.
- Suárez-Atilano MA. 2009. *Genética de poblaciones de Boa constrictor (Serpentes: Boidae) en la isla Cozumel, Quintana Roo. México: Universidad Nacional Autónoma de México.*
- Sunny A, Monroy-Vilchis O, Fajardo V, Aguilera-Reyes U. 2014. Genetic diversity and structure of an endemic and critically endangered stream river salamander (Caudata: Ambystoma leorae) in Mexico. *Conserv Genet.* 15: 49-59
- Sunny A, Monroy-Vilchis O, Zarco-González MM, Mendoza-Martínez GD, Martínez-Gómez D. 2015. Genetic diversity and genetic structure of an endemic Mexican Dusky Rattlesnake (*Crotalus triseriatus*) in a highly modified agricultural landscape: implications for conservation. *Genetica.* 143:705–716
- Sunny A. 2010. Evaluación de los cambios en la estructura genética de *Oryzomys couesi cozumelae* posterior a los huracanes Emily y Wilma en Cozumel, Quintana Roo. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Templeton AR. 2006. *Population genetics and microevolutionary theory.* Wiley-Liss. UK 705pp.
- Tennessen JA, Zamudio KR. 2003. Early-male reproductive advantage, multiple paternity and sperm storage in an amphibian aggregate breeder. *Mol Ecol.* 12:1567–1576
- Vaca PR, Lugo de la Fuente JA, del Águila JP. 2007. Información geográfica del Estado de México. En: Aguilar-Miguel X. editora. *Vertebrados del Estado de México.* Ed. Universidad Autónoma del Estado de México. México.
- Valbuena-Ureña E, Soler-Membrives A, Steinfartz S, Orozco-terWengel P, Carranza S. 2017. No signs of inbreeding despite long-term isolation and habitat fragmentation in the critically endangered Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*). *Heredity.* 1–12.
- Valdivia-Carrillo T. 2014. Filogeografía y modelación de nicho ecológico en la iguana del desierto *Dipsosaurus dorsalis* (Baird y Girard, 1852) en la península de Baja California. Centro de Investigaciones Biológicas del noreste, S.C.
- Van De Zande L, Van Apeldoorn RC, Blijdenstein AF, De Jong D, Van Delden W, Bijlsma R. 2000. Microsatellite análisis of population structure and genetic differentiation within and between populations of the root vole, *Microtus oeconomus* in the Netherlands. *Molecular Ecology.* 9: 1651-1656.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. 2004. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes.* 4: 535- 538.
- Van Rooij P, Martel A, Nerz J, Voitel S, Van Immerseel F, Haesebrouck F, Pasmansi F. 2011. Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Mexican Bolitoglossine Salamanders Using an Optimal Sampling Protocol. *EcoHealth.* 8: 237–243.



- Vázquez- Domínguez E. 2007. ¿Cuál es el enfoque de la ecología molecular? Ejemplos con un ratón espinoso. En: Sánchez-Rojas G y Rojas-Martínez A. Tópicos en sistemática, biogeografía, ecología y conservación de mamíferos. UAEH. Hidalgo, México.
- Vázquez-Domínguez E, Surárez-Atilano M, Booth W, González-Baca C, Cuarón AD. 2012. Genetic evidence of a recent successful colonization of introduced species on islands: *Boa constrictor imperator* on Cozumel Island. *Biological Invasions*.
- Vázquez-Domínguez E, Vega R. 2006. ¿Dónde estamos y hacia dónde vamos en el conocimiento genético de los mamíferos mexicanos?. Pp. 67-73. En: Vázquez-Domínguez E y Hafner DH, *Genética y mamíferos mexicanos: presente y futuro*. New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin No.32. Albuquerque, New Mexico.
- Velázquez J. 2002. *Agrofitoclimatología*. México, Universidad Autónoma del Estado de México. 338 p.
- Velo-Antón G, Parra JL, Parra-Olea G, Zamudio KR. 2013. Tracking climate change in a dispersal limited species: reduced spatial and genetic connectivity in a montane salamander. *Molecular Ecology*. 22: 3261–3278.
- Velo-Antón G, Windfield JC, Zamudio K, Parra-Olea G. 2009. Microsatellite markers for *Pseudoeurycea leprosa*, a plethodontid salamander endemic to the Transmexican Neovolcanic Belt. *Conservation Genet Resour*. 1:5-7
- Visser ME. 2008. Keeping up with a warming world; Assessing the rate of adaptation to climate change. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 275: 649–659.
- Wagner AP, Creel S, Kalinowski ST. 2006. Estimating relatedness and relationship using microsatellite loci with null alleles. *Heredity*. 93: 504-509.
- Wake DB, Vredenburg V. 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Science*. 105: 11466–11473.
- Wake DB. 1991. Declining amphibian populations. *Science*. 253: 860-860.
- Wake DBT, Papenfuss J, Lynch JF. 1992. Distribution of salamanders along elevational transects in Mexico and Guatemala. *Tulane Studies in Zoology and Botany*. 1: 303-319
- Waldman B. 1988. The ecology of skin recognition. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 19: 543–571.
- Walls SC, Roudebush RE. 1991. Reduced aggression toward siblings as evidence of kin recognition in cannibalistic salamanders. *American Naturalist*. 138: 1027–1038.
- Wang IJ. 2009. Fine-scale population structure in a desert amphibian: landscape genetics of the black toad (*Bufo exsul*). *Mol Ecol*. 18:3847–3856.
- Waples RS, Do C. 2008. LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Mol Ecol Resour*. 8: 753–756.



- Waples RS. 2006. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conserv Genet.* 7: 167–184.
- Wayne ML, Miyamoto MM. 2006. Genetic variation. In C.W. Fox, J.B. Wolf (Eds.). *Evolutionary Genetics*. Oxford University Press. EE UU. 592 pp.
- Weir BS y Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution.* 38: 1358-1370.
- Weir BS, Anderson AD y Hepler AB. 2006. Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges. *Nature Reviews Genetics.* 7:771-780.
- Wells K. 2007. *The Ecology and Behavior of Amphibians*. The University of Chicago Press. 1147pp.
- Wen G, Yang W, Fu J. 2015. Population Genetic Structure and Species Status of Asiatic Toads (*Bufo gargarizans*) in Western China. *ZOOLOGICAL SCIENCE.* 32: 427–434.
- Wiens JJ, Parra-Olea G, García-París M, Wake DB. 2007. Phylogenetic history underlies elevational biodiversity patterns in tropical salamanders. *Proceedings of the Royal Society.* 274: 919-928.
- Willi Y, Van Buskirk J, Schmid B y Fischer M. 2007. Genetic isolation of fragmented populations is exacerbated by drift and selection. *Journal of Evolutionary Biology.* 20: 534–542.
- Wilson DL, Johnson JD, Mata-Silva V. 2013. A conservation reassessment of the amphibians of Mexico based on the EVS measure. *Amphibian y Reptile Conservation.* 7(1): 97-127.
- Windfield JC. 2008. Filogeografía de *Pseudoeurycea leprosa* (CAUDATA: PLETHODONTIDAE) empleando ADN mitocondrial (Citocromo B). Universidad Nacional Autónoma de México. México. DF.
- Wright S. 1951. The genetical structure of natural populations. *Annals of Eugenics.* 15: 323–354.
- Wright S. 1978. *Evolution and genetics of population, variability within and among populations.* Vol.4. The University of Chicago Press. Chicago.
- Yanes M, Velasco JM, Suarez F. 1995. Permeability of roads and railways to vertebrates: the importance of culverts. *Biol Conserv* 71:217–222
- Zamudio KR, Wicczorek AM. 2007. Fine-scale spatial genetic structure and dispersal among spotted salamander (*Ambystoma maculatum*) breeding populations. *Mol Ecol* 16:257–274
- Zapata C. 1987. La diversidad genética de las poblaciones. En: Espinosa de los Monteros, J., Labarta, U. (Eds.). *Genética de la acuicultura.* pp. 33-57. Caicyt-Feuga, Madrid.
- Zhang W, Luo Z, Zhao M, Wu H (2015). High genetic diversity in the endangered and narrowly distributed amphibian species *Leptobranchium leishanense*. *Integrative Zoology* 10, 465–81.
- Zhang W, Luo Z, Zhao M, Wu H. 2015. High genetic diversity in the endangered and narrowly distributed amphibian species *Leptobranchium leishanense*. *Integrative Zoology* 2015; 10: 465–481.

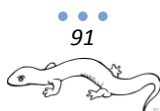
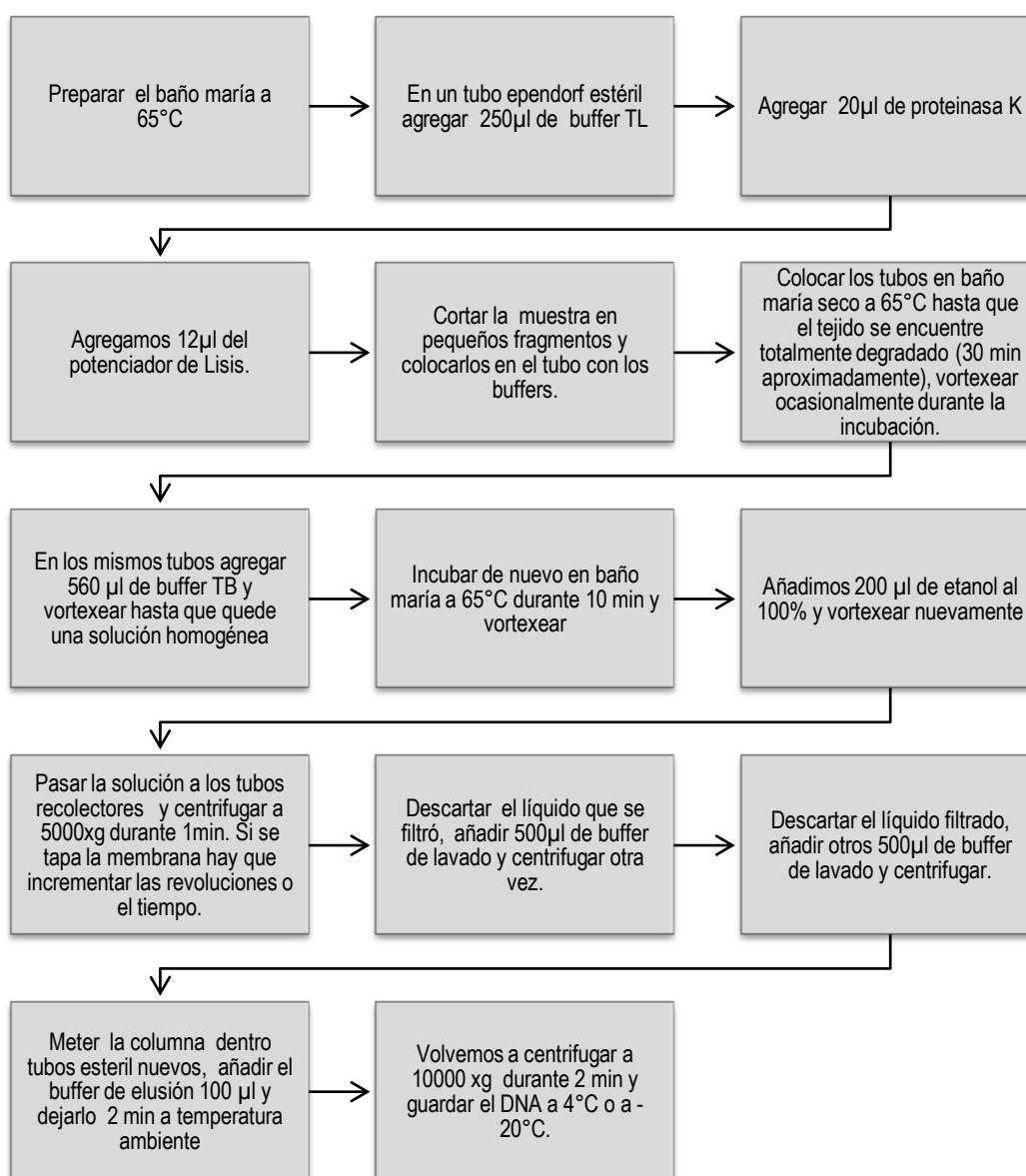


Anexos

Anexo 1. Extracción de DNA GF-1 Tissue DNA Extraction Kit VIVANTIS

Componentes del Kit

GF-1 columnas	100
Tubos colectores.....	100
Buffer de Lisis de tejidos (Buffer TL).....	30ml
Potenciador de Lisis.....	2ml
Buffer TB.....	64ml
Buffer de Lavado (concentrado).....	2x 24 ml
Buffer de elusión.....	20ml
Proteinasas K	2x 1.05ml



Anexo 2. Para preparar el gel de agarosa al 1%

Gel de 40 pozos

TBE (Tris-Borato-EDTA) 0.5%.....75 ml

Agarosa..... 0.74 g

Gel de 20 pozos

TBE (Tris-Borato-EDTA) 0.5%.....30 ml

Agarosa..... 0.291 g

Dependiendo del tamaño del gel de agarosa deseado se agrega la agarosa al TBE 0.5% pH 8.0 en un matraz Erlenmeyer procurando que la agarosa no se quede pegado en las paredes del matraz, tapar el matraz con una película de polietileno con perforaciones y colocarlo en el horno de microondas a máxima potencia durante 40 segundos, agitando hasta que la agarosa se encuentre totalmente disuelta. Tener cuidado de que la agarosa no entre en ebullición ya que se podría derramar o evaporar el buffer. Esperar 5 minutos a que se enfrie la solución y vaciarla en la cámara de electroforesis horizontal previamente nivelada con el peine y dejar solidificar por 20 minutos, ya que cuajo totalmente el gel se puede retirar el peine.

Colocar dentro de los pozos:

2 μ l de escalera de 100pb y 2 μ l de red gel de 1 frente en el primer carril del gel de electroforesis

3 μ l de muestra y 2 μ l de red gel en los demás carriles

Electroforesis

Agregar el gel a la cámara de electroforesis y agregar el buffer TBE al 0.5%, teniendo cuidado de conectar los cables positivo y negativos de manera correcta para que se puedan visualizar correctamente las muestras. El buffer con el que se realizó el gel debe tener la misma concentración que el de la cámara de electroforesis.

Correr a 120 volts, 500 MA, 12 W por 30 min procurando que no se salgan las muestras del gel.



PCR

Para desleofilizar los primers (100 mM)

$10(\text{nano moles del primer}) = \text{cantidad de H}_2\text{O}$ en μl que se adiciona al primer

	1 muestra	15 muestras
H ₂ O	1.96	29.4
MgCl ₂ Buffer	0.84	12.6
Buffer	1.00	15
dNTP's (2mM)	1.40	21
PR (10uM)	0.35	5.25
PF (10uM)	0.35	5.25
Taq (5U)	0.10	1.5
DNA (Cada tubo)	1.00	1.0
Volumen Final	7 μl	

Anexo 3. Frecuencias alélicas observadas en cada uno de los locus y en cada grupo genético

Locus	Alelo	Amanalco	Rancho	Mesón Viejo	Amanalco C	Carretera	Palo Seco
1(PLD005)	164	0.125	0.063	0.000	0.000	0.125	0.250
	166	0.094	0.469	0.094	0.031	0.000	0.094
	168	0.375	0.125	0.531	0.563	0.656	0.531
	170	0.031	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000
	178	0.313	0.219	0.063	0.219	0.000	0.094
	180	0.063	0.063	0.313	0.188	0.188	0.031
	184	0.000	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000
	188	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.031



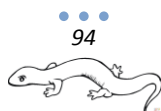
Locus	Alelo	Amanalco	Rancho	Mesón Viejo	Amanalco C	Carretera	Palo Seco
2(PLT009)	160	0.344	0.469	0.313	0.531	0.531	0.594
	181	0.656	0.531	0.688	0.469	0.469	0.406

Locus	Alelo	Amanalco	Rancho	Mesón Viejo	Amanalco C	Carretera	Palo Seco
3(PLT109)	110	0.438	0.625	0.469	0.625	0.469	0.438
	114	0.156	0.313	0.094	0.094	0.250	0.063
	118	0.313	0.031	0.375	0.281	0.250	0.063
	122	0.094	0.031	0.063	0.000	0.031	0.219
	126	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.219

Locus	Alelo	Amanalco	Rancho	Mesón Viejo	Amanalco C	Carretera	Palo Seco
4(PLT087)	256	0.500	0.719	0.594	0.500	0.688	0.656
	266	0.000	0.031	0.000	0.031	0.000	0.000
	268	0.500	0.250	0.406	0.469	0.313	0.344

Locus	Alelo	Amanalco	Rancho	Mesón Viejo	Amanalco C	Carretera	Palo Seco
5(PLT039)	246	0.563	0.438	0.719	0.719	0.719	0.844
	250	0.406	0.344	0.250	0.281	0.250	0.125
	254	0.031	0.156	0.031	0.000	0.031	0.031
	258	0.000	0.063	0.000	0.000	0.000	0.000

Locus	Alelo	Amanalco	Rancho	Mesón Viejo	Amanalco C	Carretera	Palo Seco
6(PLT064)	143	0.219	0.281	0.250	0.281	0.469	0.469
	147	0.219	0.125	0.188	0.219	0.031	0.094
	151	0.000	0.000	0.000	0.000	0.063	0.000



155	0.469	0.344	0.469	0.438	0.313	0.156
159	0.094	0.188	0.094	0.063	0.125	0.281
167	0.000	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000
179	0.000	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000

Locus	Alelo	Amanalco	Rancho	Mesón Viejo	Amanalco C	Carretera	Palo Seco
7(PLT107)	311	0.719	0.656	0.625	0.625	0.813	0.906
	315	0.281	0.344	0.375	0.313	0.188	0.094
	319	0.000	0.000	0.000	0.063	0.000	0.000

Locus	Alelo	Amanalco	Rancho	Mesón Viejo	Amanalco C	Carretera	Palo Seco
8(PLT042)	140	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.250
	148	0.469	0.500	0.406	0.500	0.500	0.406
	156	0.281	0.125	0.094	0.125	0.219	0.031
	160	0.250	0.375	0.500	0.375	0.281	0.313

Locus	Alelo	Amanalco	Rancho	Mesón Viejo	Amanalco C	Carretera	Palo Seco
9(PLT045)	277	0.000	0.063	0.000	0.000	0.000	0.000
	289	0.469	0.406	0.500	0.688	0.625	0.781
	291	0.000	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000
	309	0.000	0.000	0.094	0.000	0.031	0.000
	313	0.531	0.469	0.406	0.313	0.344	0.219
	319	0.000	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000



Anexo 4. Genotipos observados en cada una de las poblaciones y para la población en total

Locus: 1		PlD005											
Genotipo:		164	164	166	168	166	166	168	166	168	166	168	
		164	166	166	168	170	178	178	180	180	184	188	Total
1		2	0	0	1	1	2	8	0	2	0	0	16
2		0	2	2	1	1	5	2	2	0	1	0	16
3		0	0	1	3	0	0	2	1	9	0	0	16
4		0	0	0	3	0	1	6	0	6	0	0	16
5		2	0	0	7	0	0	0	0	6	0	1	16
6		4	0	1	7	0	1	2	0	1	0	0	16
Total:		8	2	4	22	2	9	20	3	24	1	1	96

Locus:2		PLT009			
Genotipo:		160	160	181	
		160	181	181	Total
1		0	11	5	16
2		0	15	1	16
3		0	10	6	16
4		2	13	1	16
5		4	9	3	16
6		4	11	1	16
Total:		10	69	17	96

Locus:3		PLT109											
Genotipo:		110	110	114	110	114	118	110	118	122	122	126	
		110	114	114	118	118	118	122	122	122	126	126	Total
1		2	5	0	3	0	3	2	1	0	0	0	16
2		5	9	0	0	1	0	1	0	0	0	0	16
3		0	3	0	10	0	1	2	0	0	0	0	16
4		6	2	0	6	1	1	0	0	0	0	0	16



5	5	3	1	2	3	1	0	1	0	0	0	16
6	6	0	1	2	0	0	0	0	2	3	2	16
Total:	24	22	2	23	5	6	5	2	2	3	2	96

Locus:4 PLT087					
Genotipo:	256	256	256	268	Total
	256	266	268	268	
1	3	0	10	3	16
2	8	1	6	1	16
3	4	0	11	1	16
4	3	1	9	3	16
5	7	0	8	1	16
6	9	0	3	4	16
Total:	34	2	47	13	96

Locus:5 PLT039								
Genotipo:	246	246	250	246	250	254	246	Total
	246	250	250	254	254	254	258	
1	2	13	0	1	0	0	0	16
2	1	9	1	1	0	2	2	16
3	8	7	0	0	1	0	0	16
4	7	9	0	0	0	0	0	16
5	7	8	0	1	0	0	0	16
6	11	4	0	1	0	0	0	16
Total:	36	50	1	4	1	2	2	96

Locus:6 PLT064												
Genotipo	143	147	143	143	147	155	143	147	155	159	167	Total
	143	147	151	155	155	155	159	159	159	159	179	
1	0	0	0	6	7	1	1	0	0	1	0	16
2	1	0	0	3	4	2	4	0	0	1	1	16



3	2	0	0	3	4	4	1	2	0	0	0	16
4	1	0	0	6	6	1	1	1	0	0	0	16
5	3	0	2	6	1	1	1	0	1	1	0	16
6	5	1	0	3	1	0	2	0	1	3	0	16
Total:	12	1	2	27	23	9	10	3	2	6	1	96

Locus:7		PLT107				
Genotipo:		311	311	315	311	
		311	315	315	319	Total
1		7	9	0	0	16
2		7	7	2	0	16
3		4	12	0	0	16
4		4	10	0	2	16
5		10	6	0	0	16
6		13	3	0	0	16
Total:		45	47	2	2	96

Locus:8		PLT042					
Genotipo:		140	148	148	140	148	160
		148	148	156	160	160	Total
1		0	0	9	0	6	16
2		0	0	4	0	12	16
3		0	0	3	0	10	16
4		0	0	4	0	12	16
5		0	1	7	0	7	16
6		7	1	1	1	3	16
Total:		7	2	28	1	50	96



Locus:9		PLT045						
Genotipo:		277	289	289	289	313	291	
		277	289	309	313	313	319	Total
1		0	1	0	13	2	0	16
2		1	2	0	9	3	1	16
3		0	1	3	11	1	0	16
4		0	6	0	10	0	0	16
5		0	5	1	9	1	0	16
6		0	10	0	5	1	0	16
Total:		1	25	4	57	8	1	96

Anexo 5. Alelos privados

#		PLD005	PLT009	PLT109	PLT087	PLT039	PLT064	PLT107	PLT042	PLT045									
17	RANCHO	168	178	160	181	110	110	256	256	246	250	159	159	315	315	148	160	291	319
18		166	180	160	181	114	118	256	256	246	258	143	159	311	315	148	160	289	313
22		166	170	181	181	110	110	256	266	254	254	167	179	315	315	148	156	277	277
28		166	178	160	181	110	110	268	268	246	258	143	155	311	315	148	156	289	313
29		166	184	160	181	110	114	256	268	246	246	143	155	311	311	148	160	289	313
55	AmaC	168	168	160	181	114	118	268	268	246	246	147	155	311	319	148	160	289	313
56		168	180	160	160	118	118	256	268	246	246	147	155	311	319	148	156	289	313
68	CARR	164	164	160	181	114	118	256	268	246	250	143	151	311	315	148	160	289	313
71		168	180	181	181	114	118	256	268	246	246	143	151	311	315	148	156	289	289
79		168	188	160	160	118	118	256	256	246	246	143	155	311	315	148	156	289	289
81	PALO SECO	168	168	160	160	110	110	256	268	246	246	143	143	311	311	140	148	289	289
83		164	164	160	181	122	126	256	256	246	250	159	159	311	315	160	160	289	289
86		168	168	160	181	110	110	268	268	246	246	147	147	311	311	140	148	289	289
88		168	178	160	181	110	118	256	268	246	246	147	155	311	311	140	148	289	313
89		168	168	160	160	114	114	268	256	246	246	143	155	311	311	140	148	289	313
90		168	168	181	181	110	110	256	256	246	250	155	159	311	311	140	148	289	313
91		166	178	160	181	122	126	256	256	246	246	143	143	311	311	140	148	289	289
92		168	178	160	160	122	126	256	256	246	246	143	143	311	311	140	160	289	289
93		168	168	160	181	126	126	256	256	246	250	143	155	311	311	140	148	289	313
96		164	164	160	181	126	126	256	256	246	250	159	159	311	311	148	160	289	313

Anexo 6. Mapa del uso de suelo y vegetación del Nevado de Toluca en el 2000. Extraído de Mass et al. 2006

