UNIVERSIDAD DEL MAR

Campus Puerto Escondido

Estructura genética y endogamia poblacional de iguana negra *Ctenosaura pectinata* (reptilia: squamata: iguanidae) en cautiverio

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Genómicas

Presenta:

María Reyna Félix Ortiz

Director de Tesis:

Dr. José Luis Arcos García

Puerto Escondido, Oaxaca
2016

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. José Luis Arcos García, la co-dirección del Dr. Víctor Hugo Reynoso Rosales y la asesoría del Dr. Roberto López Pozos.

El trabajo de campo se llevó a cabo en el Centro de Conservación y Reproducción de Iguanas (CECOREI-UMAR) de la Universidad del Mar, Campus Puerto Escondido. Una fase del trabajo de laboratorio se realizó en el laboratorio de Química de la misma Universidad. El mayor esfuerzo de trabajo de laboratorio se desempeñó en el laboratorio de Biología Evolutiva de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en el laboratorio de Biología Molecular del departamento de Zoología, y en el laboratorio de Biología Molecular y de la Salud del Instituto de Biología de la UNAM.

Agradezco a la Universidad del Mar, Campus Puerto Escondido por ser mi casa en este largo caminar para obtener mi grado de maestría.

Al Instituto de Biología por cobijarme durante mi estancia en la Universidad Nacional Autónoma de México.

Muchas gracias al Dr. José Luis Arcos García, por mostrarse entusiasta en el área de la genética desde mi primer acercamiento y plantearme la problemática en el campo experimental con las iguanas mantenidas en cautiverio. Por brindarme apoyo económico, ser un gran profesor, guía y amigo infinitamente paciente con este trabajo de maestría. Agradezco enormemente su labor de tutoría en este proyecto, revisión y observaciones en del escrito.

Especialmente agradezco al Dr. Victor H. Reynoso por aceptar con mucho gusto ser mi co-asesor, por brindarme el apoyo de formación y económico para llevar a cabo la presente tesis, por brindarme su amistad y consejos en momentos de aridez. Pero sobre todo por permitirme formar parte de su familia herpetológica.

Al Dr. Roberto López Pozos por su asesoría en el proyecto de tesis, la paciente revisión del escrito y observaciones para enriquecerlo.

A mis revisores de tesis el Dr. Serafín Jacobo López Garrido y la Maestra Julieta Karina Cruz Vázquez por sus observaciones y colaboración con prontitud y amabilidad en el proceso de revisión.

Mi agradecimiento al M. en C. León Velez Hernández, por su enseñanza en la extracción de sangre en iguana negra, así como por fomentar en mí la confianza en la manipulación de las iguanas.

Al Dr. Serafin Jacobo López Garrido, responsable técnico del CECOREI-UMAR por su disposición en colaboración de este proyecto, al Lic. en zootecnia Diego Ramos, técnico en el CECOREI-UMAR, agradezco su ayuda con la manipulación de las iguanas, la extracción de sangre y el registro de los datos morfométricos.

A los trabajadores del CECOREI-UMAR, en especial a Chuy y Alfredo, por hacer del trabajo de campo una grata experiencia y estar siempre dispuestos a aclarar cualquier duda en mi primer acercamiento con las iguanas.

Gracias al Biól. Rafael Hintze, Instituto de Biología-UNAM, quién me enseñó la técnica de extracción del DNA y me tuvo paciencia con su extravagante personalidad.

Un reconocimiento a la Dra. Fabiola Ramírez Corona, del Departamento de Biología Evolutiva, Facultad de Ciencias, UNAM, por permitirme trabajar un semestre en el laboratorio para estandarizar la técnica de PCR, gracias por sus consejos, su paciencia y su apoyo.

A mi amiga M. en C. Andrea Jiménez Marín, Técnico Laboratorio de Biología Molecular de Zoología del IB-UNAM, excelente técnico y una gran persona que me ayudó con el trabajo de laboratorio en la etapa de PCR y Electroforesis capilar, gracias por los tips y por la infinita disposición.

Enormemente agradecida con la M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar, responsable del Laboratorio de Biología Molecular y de la Salud, quién siempre me recibió con una sonrisa y me ayudó en la labor de secuenciación.

A Eugenia Zarza por permitirme emplear sus datos de iguana negra (*C. pectinata*) en medio silvestre y *C. acanthura*, así como por sus recomendaciones para el uso de sus datos con los míos.

Gracias a Yocelyn Gutiérrez Guerrero, del Instituto de Ecología por su ayuda desinteresada en dudas de genética de poblaciones y por facilitarme su tesis de Licenciatura.

Parte del financiamiento de este proyecto fue auspiciado por PAPPIT, UNAM, IN206911-3 y IN210315 "Las iguanas del Golfo de California y sus islas” Fases 1 y 2 al Dr. Reynoso y a ISBio, A. C. proyecto 2014/001 que apoyaron en reactivos, consumibles y secuencias.

Agradecimientos personales

De corazón mi gratitud a la Familia Ortiz, a mi abuelo y a mi abuela que con amor me educaron y que me bendicen día a día desde su condición intangible.

Con amor a Mamá, con quién estaré en deuda por el resto de mis días. Gracias por ser mi orgullo como mujer y profesionista, así como por su apoyo económico y su preocupación por que nunca me falte nada. Te quiero mucho, gracias por permitirme ser parte de la familia Ortiz.

Como regalo especial para Tío Estanis, por ser un padre y quererme ilimitadamente desde que nací. Eres ejemplo de disciplina, gracias incalculables por haberme apoyado económicamente y sin reserva, dándome un lugar en tu “casa de piedra”.

A Frida (mono), por ser mí otra parte sensible y la mejor hermana del mundo.

A mis primos, por estar siempre unidos a mí y ser mi punto de fuga en momentos difíciles, siempre mis amigos, hermanos y cómplices.

Osciel, compañero de gran parte de mi vida, quién también me ayudó con la caracterización y extracción de sangre de las iguanas.

Amigos de la UMAR: Gaby (mi profesora de inglés favorita), Gabriel, Lencho, MariCruz, Eloisa, Pili y Erika por ser causa de muchas alegrías y carcajadas dentro y fuera de la uni.

Amigos del IB-UNAM: Nohelia por ser una excelente compañera de clases y de laboratorio, así como por mostrarme un poquito de la cultura culinaria de Sonora; Canek porque eres tan distraído que me entrenaste en el sentido de responsabilidad en un laboratorio, gracias por tu loca amistad, complicidad y ayuda desinteresada siempre; Fauno

y Mirna por ser tan alivianados y brindarme su buena vibra para los momentos de relax fuera del instituto; millones de gracias Alfonso, por tu aportación con la elaboración del mapa del área de estudio, al ser un chico con energía positiva me enseñaste con ejemplo que “el trabajo duro derrota al talento natural”.

Omar gracias por tu apoyo incondicional y por enseñarme que la amistad y el cariño son lazos que no se rompen por más que se estiren. Me has hecho reír aún en tiempos de incertidumbre, espera y adversidades.

Godzilla, Lucas y Molly siempre fieles compañeros en el frío de la casa.

ÍNDICE

I RESUMEN……1
II ABSTRACT……..……3
III. INTRODUCCIÓN……....5
IV. JUSTIFICACIÓN……..……7
V. OBJETIVOS…….……8
5.1 Objetivo general……..…….……...8
5.2 Objetivos particulares……..……..8
VI. HIPÓTESIS……...9
VII. ANTECEDENTES…….....……10
7.1 Herpetofauna y el género *Ctenosaura* en México……..……..…...10
7.2 *Ctenosaura pectinata*…….……12
7.3. Fundamentos de la genética de poblaciones……...……16
7.3.1 Variacion genética y sus estimadores……19
7.3.2 Parentesco……...23
7.3.3 Estructura genética……23
7.4 El problema de la endogamia……..…….……25
7.5 Regiones microsatélites como marcadores moleculares…….…….……..28
7.6 Biología de la conservación……..…….....33
VIII MATERIALES Y MÉTODOS…….……....……36
8.1 Área de estudio……..….36
8.2 Selección de la muestra de la población de *Ctenosaura pectinata*……..……37
8.3 MÉTODO……..……..37
8.3.1 Caracterización morfométrica……..……37
8.3.2 Caracterización genotípica…….……..40
8.4 Análisis……....45
8.4.1 Caracteres morfométricos……45
8.4.2 Regiones microsatélites……46
8.4.3 Variación genética……...47

8.4.4 Heterocigosis y equilibrio H – W……..47
8.4.5 Análisis de parentesco……..47
8.4.6 Estructura genética……48
IX RESULTADOS…..……..50
9.1 Caracterización morfométrica……50
9.1.1 Caracteres morfométricos selectos……..50
9.1.2 Análisis factorial de componentes principales……53
9.2 Caracterización genotípica……..57
9.2.1 Amplificación de regiones microsatélites..……..57
9.3 Variación genética……..……62
9.3.1 Proporción de loci polimórficos……....62
9.3.2 Riqueza alélica……62
9.4 Heterocigosis……...67
9.5 Parentesco……...70
9.6 Estructura genética……73
X DISCUSIÓN……...74
10.1 Caracterización fenotípica……..……..75
10.2 Relación entre la morfometría y la genética……..……76
10.3 Caracterización genotípica……..……..77
10.3.1 Variación genética……77
10.3.2 Comparación de la endogamia entre la población cautiva y la población silvestre…81
10.3.3 Análisis de parentesco……84
10.3.4 Estructura genética……...85
XI. CONCLUSIONES……..……..88
XII. REFERENCIAS……..90
Apéndice 1……102
Apéndice 2……122
Apéndice 3……125

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de siete especies del género Ctenosaura que habitan en México (Fuente: Köhler, 2002).....11

Figura 2. Ejemplar macho de iguana negra (*Ctenosaura pectinata*) del Centro de Conservación y Reproducción de Iguanas de la Universidad del Mar (CECOREI-UMAR).12

Figura 3. Área de estudio CECOREI-UMAR, Puerto Escondido, Oaxaca..……...……..36

Figura 4. Variables más explicativas en función de dos factores sún el análisis multivariado, que corresponden a 11 caracteres morfométricos……..……..……..54

Figura 5. Número de observaciones que corresponden a cada uno de los individuos de iguana negra……..……..…….....55

Figura 6. Microsatélite Pec 01. Rango de amplificación: 93-101 bp. Muestras 38-54, carriles 2-19. Marcador de peso molecular 100 bp (carril 1)…….....58

Figura 7. Microsatélite Pec 16, rango de amplificación: 214-239 bp. Muestras 1-19 en carriles 2-20. Marcador de peso molecular 100 pb (carril 1)..…….....58

Figura 8. Microsatélite Pec 16 (muestras 1-38), rango de amplificación: 214-239bp. Muestras 20-38 en carriles 2-20. Marcador de peso molecular 100 pb (carril 1)……..59

Figura 9. Microsatélite Pec 16, rango de amplificación: 214-239 bp. Muestras 39-54 en carriles 2-19. Marcador de peso molecular 100 bp (carril 1)…….....59

Figura 10. Microsatélite Pec 03, rango de amplificación: 219-221bp. Muestras 1-19 en carriles 2-20. Marcador de peso molecular 100 pb (carril 1)…….60

Figura 11. Microsatélite Pec 03, rango de amplificación: 219-221bp. Muestras 21-38 en carriles 2-20. Marcador de peso molecular 100 pb (carril 1)…….60

Figura 12. Microsatélite Pec 24, rango de amplificación: 390-438bp. Muestras 1-19 en carriles 2-20. Marcador de peso molecular 100 pb (carril 1).....……..……..61

Figura 13. Microsatélite Pec 24, rango de amplificación: 390-438bp. Muestras 20-35 en carriles 2-16. Marcador de peso molecular 100 pb (carril 1).....…….....61

Figura 14. Esquema de la relación de parentesco, ejemplo 1.....……..71

Figura 15. Esquema de la relación de parentesco, ejemplo 2..……..……..72

Figura 16. Esquema de la relación de parentesco, ejemplo 3.....……..72

Figura 17. Asignación de los individuos empleando el programa Structure. Se observan cuatro grupos génicos: grupo 1 (rojo), grupo 2 (verde, amarillo y azul) y grupo 3 (azul)....73

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Regiones microsatélites caracterizadas en *C. pectinata* (Zarza et al., 2009)..32

Cuadro 2. Microsatélites empleados como marcadores moleculares de iguana negra…43

Cuadro 3. Mezcla de reacción de la PCR, reactivos expresados en microlitros (µl)……43

Cuadro 4. Temperatura y condiciones para la amplificación…..…….....44

Cuadro 5. Estadística descriptiva de 35 caracteres morfométricos selectos en 50 individuos de iguana negra, de una población mantenida en cautiverio.....50

Cuadro 6. Locus amplificado, número total de alelos por locus y número de individuos en los que amplificó cada locus en la población de iguana negra cautiva (Software Genepop)……..……..62

Cuadro 7. Frecuencias alélicas por locus en la población de iguana negra cautiva (Software Genepop)…..…….…….…….64

Cuadro 8. Índices de diversidad estándar en la población de iguana negra cautiva…….65

Cuadro 9. Estimación de las frecuencias de alelos nulos por locus, empleando el software Genepop……..……..…...66

Cuadro 10. Prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg de los 10 loci evaluados en la población de iguana negra en cautiverio con dos software……...……..67

Cuadro 11. Coeficientes de engodamia total o desviación del equilibrio de H-W….....69

I. RESUMEN

La iguana negra (*Ctenosaura pectinata*) es una especie endémica de México catalogada en la categoría de amenazada en la NOM 059 (2010). Una estrategia para su conservación ha sido la implementación de criaderos. En el estado de Oaxaca, la Universidad del Mar cuenta con un centro de conservación y reproducción de esta especie, siendo indispensables los estudios de tipo genético como punto de partida para la conservación y el establecimiento de poblaciones saludables en cautiverio. Con la finalidad de determinar si los individuos de la población cautiva corresponden a la especie predicha se realizó una caracterización fenotípica de la población de iguana negra mantenida en cautiverio mediante 39 caracteres morfométricos selectos. Se amplificaron 10 regiones de DNA microsatélites para determinar la estructura genética de la población en cautiverio y evaluar si el cautiverio ha impuesto un proceso endogámico, disminuyendo la variación genética. El análisis factorial de componentes principales aplicado a los resultados obtenidos de la caracterización morfométrica mostró que existen 11 caracteres que determinan el 51% de la variabilidad fenotípica de la población de iguana negra cautiva, se generó un archivo visual de los caracteres morfométricos evaluados y una base de datos de estadística descriptiva. Se realizaron análisis de variación genética que revelaron el polimorfismo de los 10 loci empleados con un número de alelos por locus promedio de 12. Se evidenció desviación del equilibrio de H-W y se determinó el grado de endogamia de la población con un coeficiente Fis = 0.37-0.45. Se estableció que los individuos muestreados en la población de iguana negra en cautiverio presentan un total de 138 relaciones de parentesco (40 en la categoría padre-hijo, 27 de la categoría hermanos y 71 relaciones

de medios hermanos) y que la estructura genética de acuerdo al valor de F_{ST}=0.26, así como el resultado del análisis realizado con Structure reflejan la existencia de diferencias en las frecuencias alélicas entre la población cautiva y la silvestre por lo que se concluye que la población en cautiverio se encuentra estructurada.

Ahora esta población debe ser considerada como una entidad genéticamente diferenciada de la especie en vida silvestre y su manejo debe ser cauteloso de manera que permita evadir el proceso endogámico para fines de conservación y reintroducción.

II. ABSTRACT

The black iguana (*Ctenosaura pectinata*) endemic to Mexico is classified as threatened in the NOM 059 (2010). As part as a conservation strategy, many captive programs have been created. In the state of Oaxaca, the Universidad del Mar has a center of conservation and reproduction of this iguana, being necessary genetic studies as key for the establishment of healthy populations. To determine whether captive population individuals are of the expected species, a phenotypic characterization of the captive black iguana population was done using 39 selected morphometric characters. Ten DNA microsatellite regions were amplified to assess the genetic structure and to know whether the captivity has imposed an inbreeding process, reducing genetic variation. The principal components factor analysis applied to the morphometrics showed that there are 11 characters that determine 51% of the phenotypic variability of the captive black iguana population. A visual file morphometric characters was generated and evaluated based on descriptive statistics data. Analysis of genetic variation in the 10 loci employees revealed polymorphism with an average number of 12 alleles per locus. It was evidenced a deviation from HW equilibrium and the degree of inbreeding was determined with Fis coefficient = 0.37 to 0.45.

With genetic information kinship of individuals in the captive population of black iguana, a total of 138 kin relationships was established in 53 individuals of the black iguana captive population (40 in the father-son category, 27 of the brothers category and 71 relationships half-brothers category). According the value of FST = 0.26, and the results of analysis performed with Structure was reflected the existence of differences in allele frequencies between captive and wild population so it is concluded that the captive population its genetically structured.

Now this captive population should be considered a genetically distinct entity to the species in the wild and should be managed with caution for conservation and reintroduction purposes. The population of black iguana held in captivity requires a management plan that avoids inbreeding processes.

III. INTRODUCCIÓN

El cambio ambiental más visible ocasionado por el crecimiento demográfico de la especie humana es la modificación y pérdida de hábitats, afectando de manera directa a todas las especies de vida silvestre y llevando a la disminución e incluso la desaparición de las poblaciones, como en el caso de los reptiles (Cooke, 1981; Harris, 1982; Zug *et al.,* 2001). Con el objetivo de conservación y restablecimiento de estas poblaciones, se han implementado estrategias, mediante la creación de Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (SEMARNAT, 2009). No obstante, los resultados obtenidos son poco alentadores debido a la escasa productividad y pobre beneficio ecológico (Weber *et al.*, 2006).

Las iguanas son reptiles importantes en términos económicos, alimenticios, medicinales, como mascotas y en peletería (Cooke, 1981; Suazo & Alvarado, 1994; Alvarado & Suazo, 1996; Hernández, 2003). Las especies de iguanas con mayor uso comercial en México son *C. acanthura, C. pectinata* y *C. similis*, que se distribuyen ampliamente en el territorio nacional (Köhler, 1996 en: Reynoso & González, 2005).

Particularmente para la especie de iguana negra (*Ctenosaura pectinata)*, catalogada como amenazada y endémica de México (DOF, 2009), se han llevado a cabo investigaciones descriptivas y taxonómicas desde 1928 (Bailey, 1928); otras relacionadas al tipo de dieta (Pough, 1973; Throckmorton, 1973; Arcos-García *et al*., 2005a; Arcos-García *et al.*, 2007; Zurita-Carmona *et al*.,2009; Arcos & López, 2009); la temperatura ambiental (McGinnis & Brown, 1966; Arcos-García *et al*., 2005a), caracterización y modelos de crecimiento (Arcos-García *et al.*, 2002; Arcos-García *et al*., 2005b; Machorro *et al*., 2009). Actualmente existen estudios genéticos con iguanas del medio silvestre que han sentado las bases para la utilización de microsatélites como

marcadores moleculares, en la descripción de la estructura genética poblacional, el alcance del flujo genético en zonas de contacto geográfico, el estudio de sistemas de apareamiento de las especies, así como en la dirección de estrategias genéticas de conservación *(*Zarza *et al.*, 2009).

La característica de las poblaciones en manejo intensivo es la que se realiza sobre ejemplares o poblaciones de especies silvestres en condiciones de cautiverio o confinamiento (DOF, 2011). Inician generalmente con un número reducido de individuos; es por ello que, evolutivamente están sujetas a mecanismos como la endogamia y/o fenómenos como el cuello de botella que genera cambios en el tamaño efectivo de la población, debido a fenómenos demográficos (Allendorf & Luikart, 2007). Aunado a esto, el ambiente cautivo en el que se desarrollan les confiere cierta adaptación genética, lo que reduce aún más la variación genética y la sobrevivencia de los individuos al ser liberados a las condiciones naturales (Frankham, 2008). Con base en lo anterior, se considera importante realizar estudios que pongan de manifiesto la condición genética y las repercusiones de los procesos microevolutivos como la endogamia en las poblaciones de iguana negra mantenidas en condiciones de cautiverio. El Centro de Conservación y Reproducción de Iguanas de la Universidad del Mar (CECOREI-UMAR), es un modelo de estudio donde la población de *Ctenosaura pectinata* se ha mantenido sin flujo genético desde su fundación en 1999.

IV. JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales factores en la problemática de las Unidades de Manejo de poblaciones silvestres amenazadas o en peligro de extinción en México, es el tamaño reducido de la población que repercute directamente en el manejo para su reproducción. La ocurrencia de cruzas endogámicas trata de evitarse ya que representa un obstáculo para el mantenimiento de la variabilidad genética. Es importante conocer y caracterizar la estructura genética de las poblaciones en condiciones de cautiverio, como es el caso de la especie de iguana negra (*Ctenosaura pectinata)*, población establecida en el Centro de Conservación y Reproducción de Iguanas (CECOREI-UMAR) en ausencia de flujo genético. Es indispensable determinar la variación existente en el acervo genético y evaluar si dicha población sufre un proceso endogámico que comprometa su supervivencia. Esto permitirá la planeación y manejo adecuado en estrategias de reproducción e investigación de la especie con fines de conservación en dicho centro.

V.-OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar la población de *Ctenosaura pectinata* mediante morfometría y evaluar la variación genética para determinar si existe un proceso endogámico como consecuencia del cautiverio.

5.2 Objetivos particulares

- Caracterizar morfométricamente la población cautiva de *Ctenosaura pectinata,* mediante caracteres selectos para la especie del Centro de Conservación y Reproducción de la Universidad del Mar.
- Conocer la variación genética (condición de la heterocigosis) en la población de iguana negra del Centro de Conservación y Reproducción de la Universidad del Mar.
- Determinar la presencia y el grado de endogamia como consecuencia del cautiverio del Centro de Conservación y Reproducción de la Universidad del Mar.
- Establecer el parentesco de los individuos muestreados dentro de la población de iguana negra del Centro de Conservación y Reproducción de la Universidad del Mar.
- Conocer la estructura genética de la población de iguana negra del Centro de Conservación y Reproducción de la Universidad del Mar.

VI.-HIPÓTESIS

Mediante la caracterización morfométrica de los individuos de la población de *Ctenosaura pectinata*, será posible establecer los caracteres fenotípicos mayormente informativos en la identificación de la especie, con el objetivo de ser utilizados como caracteres en la herencia fenotípica de la población cautiva.

Debido a que esta población de iguana negra se encuentra en condiciones de cautiverio, donde el flujo genético ha sido nulo, se considera que el apareamiento entre individuos relacionados por ancestría (endogamia) ocasiona pérdida de variación genética (disminución de genotipos heterocigotos).

El conocimiento de las frecuencias alélicas por individuo permitirá establecer las relaciones de parentesco entre los individuos muestreados, creando el primer estudio de parentesco-genético para la población.

Se espera que la estructura genética de la población cautiva sea diferente a la que podemos encontrar en poblaciones silvestres.

VII.-ANTECEDENTES

7.1 Herpetofauna y el género *Ctenosaura* en México

Oaxaca muestra el mayor número y proporción de especies endémicas en cuanto a herpetofauna se refiere, las regiones que destacan por su endemismo son: la Sierra Madre de Oaxaca, la Sierra Madre del Sur, la Sierra Atravesada, el Istmo de Tehuantepec y la Mixteca Alta (Flores-Villela & García-Vázquez, 2014).

Las iguanas son predominantemente terrestres de hábitats meridionales a xéricos. Únicamente los géneros *Iguana* y *Brachylophus* son de hábitat árboreo, y raramente descienden a tierra. En su mayoría son herbívoros, se alimentan de gran variedad de plantas, incluyendo las flores y frutas, así como del follaje (Zug *et al*., 2001). Las especies del género *Ctenosaura* (Weigmann, 1828) son iguanas de talla moderada a grande que habitan en México y Centro América. Forman parte de un grupo monofilético conocido como *Iguanidae* (Köhler & Streit, 1996). La familia *Iguanidae* se conforma de individuos que van de una talla de 30 mm a 750 mm de longitud hocico-cloaca (LHC). La mayoría de los iguánidos están cubiertos en dorso y vientre por escamas grandes quilladas que se sobrelapan, el resto se encuentran cubiertos por escamas granulares pequeñas (Zug *et al*., 2001).

Actualmente en el país se reconocen 40 especies de iguanas de los géneros: *Ctenosaura*, *Dipsosaurus*, *Iguana* y *Sauromalus*. El entendimiento del género *Ctenosaura* se inició formalmente por Bailey (1928), quién escribió sobre la distribución y las características morfológicas de 11 especies en México. Sitúa a la especie *C. acanthura* como la más primitiva, a partir de la cual se diversificaron: *C. brachylopha, C. brevirostris, C. pectinata, C. parkeri, C. clarki, C. quinquecarinata, C. similis, C. bakeri, C. palearis* y *C. defensor*.

El género con mayor riqueza de especies es *Ctenosaura*, con 10 especies endémicas de México (incluida *C. pectinata*) (Reynoso, 2008). De éstas, las de mayor uso comercial son *C. acanthura, C. pectinata* y *C. similis*; iguanas que se distribuyen ampliamente en México (Köhler, 1996 en: Reynoso & González, 2005). *C. acanthura* se encuentra en la costa del Golfo de México, del centro de Tamaulipas hasta el Istmo de Tehuantepec en Oaxaca; *C. pectinata* se distribuye en las costas del Pacífico, del sureste de Sinaloa al Istmo de Tehuantepec, ampliando su distribución hacia la depresión del Balsas; y *C. similis*, tiene una distribución, que va del Istmo de Tehuantepec a Centro América, en ambas vertientes de Guatemala y Panamá (Reynoso & González, 2005). En la Figura 1 se puede observar la distribución de 7 especies del género *Ctenosaura*, dentro de las que encontramos a la iguana negra *Ctenosaura pectinata* (Köhler, 2002).

Figura 1. Distribución de siete especies del género *Ctenosaura* que habitan en México (Fuente: Köhler, 2002).

El hábitat natural de la iguana negra se encuentra en las regiones de selva mediana subperennifolia y selva baja caducifolia, caracterizada por clima Am (clima de bosque tropical con un período de sequía relativa) y Aw (clima de sabana con un período de sequía en invierno). Dentro de estos climas la iguana se desarrolla en regiones tropicales y subtropicales de 0 a 1000 m snm y temperaturas con un rango de 20 a 26 °C (Casas, 1982 en: Arcos-García *et al*., 2001), aunque a nivel del mar la temperatura puede alcanzar los 30 °C o más.

7.2 *Ctenosaura pectinata*

Las características particulares de la especie *Ctenosaura pectinata* en estado adulto (Figura 2) documentadas en Bailey (1928), Suazo & Alvarado (1994), Alvarado & Suazo (1996) y Arcos-García & López-Pozos (2009) se enlistan a continuación:

Figura 2. Ejemplar macho de iguana negra (*Ctenosara pectinata*) del Centro de Conservación y Reproducción de Iguanas de la Universidad del Mar (CECOREI-UMAR).

- El cuerpo es casi cilíndrico y comprimido (Suazo & Alvarado, 1994; Arcos-García & López-Pozos, 2009).
- Coloración base negra que puede presentar manchas blancas, amarillas, anaranjadas o azul turquesa (Bailey, 1928; Suazo & Alvarado, 1994; Alvarado & Suazo, 1996; Arcos-García & López-Pozos, 2009).
- Cuerpo relativamente grande, en adultos más de 200 mm de LHC (Alvarado & Suazo, 1996) y llegan a medir alrededor de 1200 mm incluyendo la cola (Suazo & Alvarado, 1994).
- Cabeza alargada de forma triangular, plana anteriormente (Suazo & Alvarado, 1994; Alvarado & Suazo, 1996; Arcos-García & López-Pozos, 2009) cubierta con escamas pequeñas hexagonales (Bailey, 1928).
- Membrana timpánica casi tan grande como la órbita del ojo (Bailey, 1928).
- Las escamas del hocico son suaves y más largas que las del resto de la cabeza (Bailey, 1928).
- Las fosas nasales son grandes, cercanas al hocico (Bailey, 1928).
- Pliegue gular transverso pronunciado (Bailey, 1928; Suazo & Alvarado, 1994; Arcos-García & López-Pozos, 2009).
- Garras afiladas y fuertes (Bailey, 1928).
- Dedos muy largos, especialmente en las patas traseras (Bailey, 1928).
- Las escamas de las patas carecen de espinas (Bailey, 1928).
- Cresta dorsal continua (hilera de escamas a lo largo de la línea media dorsal del cuerpo), que se extiende desde el cuello hasta la base de la cola (Bailey, 1928; Suazo & Alvarado, 1996), compuesta de 63 a 75 espinas dorsales (Bailey, 1928).

Esta característica es fácilmente apreciable a simple vista para la identificación del sexo en iguanas adultas, ya que es más grande en machos (Suazo & Alvarado, 1994; Alvarado & Suazo, 1996; Arcos-García & López-Pozos, 2009).

- En machos viejos las espinas dorsales alcanzan un tamaño de 10 mm de longitud (Bailey, 1928).
- Posee poros femorales que durante la estación reproductiva se desarrollan más en machos (Suazo & Alvarado, 1994; Arcos-García & López-Pozos, 2009) y varían en número, de 5-5 a 7-7 de acuerdo a Bailey (1928), o de 4-4 a 13-13 de acuerdo con Alvarado & Suazo (1996).
- La cola es casi cilíndrica (Bailey, 1928; Suazo & Alvarado, 1994).
- La cola presenta escamas arregladas en anillos, de dos tipos: 1) Alargadas: grandes y espinosas, 2) Intercalares: pequeñas y planas (Bailey, 1928; Alvarado & Suazo, 1996).
- Al menos alguno de los primeros 10 anillos caudales de escamas grandes espinosas están separados dorsalmente por dos o más hileras de escamas intercalares (Alvarado & Suazo, 1996).
- Los primeros 5 ó 6 anillos de escamas espinosas están separados por 3 hileras de escamas planas intercalares (Bailey, 1928).
- Los siguientes 5 ó 6 anillos están separados por 2 hileras (Bailey, 1928).

La clasificación taxonómica de la iguana negra es la siguiente:

Reino: Animal

Filo: Cordados

Clase: Sauropsida

Subclase: Diapsida

Orden: Squamata

Familia: Iguanidae

Género: *Ctenosaura*

Especie: *Ctenosaura pectinata*

Las crías de iguana negra miden en promedio 54 mm de longitud hocico-cloaca, pesan en promedio 5 g, son de color verde en el dorso y amarillo-verdoso en el vientre; esta coloración va tornándose más oscura conforme llegan al estado adulto (González, 2002).

Suazo & Alvarado (1994), así como Arcos-García *et al.* (2005) mencionan que difícilmente se puede determinar el sexo en iguana negra recién nacida, de tal forma que el dimorfismo sexual se distingue claramente entre los 21 y 24 meses de edad por las características fenotípicas, como el tamaño de los poros femorales, la cresta dorsal, el peso, la longitud de la cabeza y el abultamiento de hemipenes. González (2002) estableció que la iguana negra posee 36 cromosomas y el sexo puede determinarse cariotípicamente por la presencia de cromosomas sexuales heteromórficos XX para las hembras y XY para los machos (presentes en el par 18 de los microcromosomas). Es importante señalar que no existe efecto de la temperatura en la determinación del sexo como ocurre en otros reptiles (tortugas y cocodrilos), sino que las crías se encuentran

diferenciadas sexualmente al momento de eclosionar (Díaz-Juárez G. & Reynoso-Rosales V., 2008). Otras maneras de distinguir el sexo en reptiles incluyen el ultrasonido y radiografías (Wissman, 2006).

La técnica de sexado quirúrgico implementada por González (2002), es un método no letal que permite determinar el sexo en las crías sin tener que esperar a que se exhiban las características fenotípicas. La técnica consiste en revisar la presencia o ausencia de hemipenes a través de una pequeña incisión cercana a la cloaca. Mediante esta técnica se pueden determinar las proporciones sexuales en el nido y las diferencias observadas se deben a que los machos tienen una menor probabilidad de supervivencia que las hembras (Reynoso, 2008).

7.3. Fundamentos en la genética de poblaciones

En la naturaleza los miembros de una especie se distribuyen de manera general en un mismo espacio geográfico. Una población es un grupo de organismos de la misma especie que tienen la capacidad de cruzarse entre sí, porque comparten una misma localización espacio-temporal. Se considera como una unidad que se define por un reservorio o acervo genético característico, es decir, los alelos de todos los genes de todos los individuos o serie de informaciones genéticas de todos los individuos (Curtis & Barnes, 2000; Klug *et al.*, 1999).

Las poblaciones son dinámicas, tienen la capacidad de incrementar o disminuir su tamaño conforme a las tasas de natalidad y mortalidad, o debido a fenómenos de migración y/o fusión con otras poblaciones (Klug *et al*., 1999). En éstas, algunos alelos incrementan su frecuencia de una generación a la siguiente a expensas de otros cuya frecuencia disminuye. La existencia de variaciones entre los individuos es necesaria para que el proceso evolutivo pueda suceder, dado que son la materia prima sobre las

que operan las fuerzas evolutivas y permiten que poblaciones sometidas a condiciones cambiantes se adapten y preserven a la especie. Cada especie está representada entonces, por una gama de variantes que va cambiando en el tiempo y en el espacio (Curtis & Barnes, 2000).

La selección es la reproducción diferencial de algunos fenotipos/genotipos sobre otros bajo ciertas condiciones ambientales que prevalecen en un momento determinado. Es un mecanismo evolutivo que genera un cambio en las frecuencias relativas de los fenotipos/genotipos, de acuerdo a su adaptación relativa dentro de la población (Eguiarte *et al*. 2007). Así, si un individuo posee una combinación favorable de alelos en su genotipo, es más probable que sus alelos estén presentes en mayor frecuencia en la siguiente generación (aptitud) (Curtis & Barnes, 2000).

Los resultados de toda una serie de trabajos de genética de poblaciones con diferentes organismos arrojaron información acerca de la naturaleza de la variación a nivel molecular y evidencian que existe una gran variación genética contenida en las proteínas y genes, misma que no puede ser justificada del todo por efecto de la selección natural (Kimura, 1968). La variación o diversidad genética es la materia prima sobre la cual puede actuar la selección natural y dar origen a adaptaciones. Su presencia se considera como indicador de “buena salud” de una población; mientras que su ausencia limita la capacidad de respuesta de la población a un medio cambiante a corto y largo plazos (Cruzan, 2001; Frankham *et al.*, 2009).

De manera general, como la distribucion geográfica de las especies es mayor que la capacidad de dispersión de los individuos, las poblaciones con frecuencia están genéticamente diferenciadas mediante el aislamiento por distancia. Así, las poblaciones más cercanas geográficamente, son más similares genéticamente que las poblaciones

más distantes. El flujo génico es favorable en la variación genética porque genera nuevos polimorfismos en las poblaciones e incrementa el tamaño efectivo de la población, creando nuevas combinaciones genéticas en las que la selección potencialmente puede actuar (Balloux & Lugon-Moulin, 2002).

El proceso evolutivo no ocurre si la diversidad genética es pobre o nula y la supervivencia de las especies depende en gran medida de la variación genética; por el contrario, si en una población o especie existe una gran diversidad genética, entonces, es posible que ocurra una respuesta frente a algún cambio abrupto o gradual en el ambiente, permitiendo su supervivencia (Frankham *et al.*, 2009). En este contexto, es de esperarse que un tamaño efectivo de la población reduzca la pérdida de variación por deriva génica y se mantenga la diversidad por largo tiempo, así como la efectividad de la selección natural sobre dicha variación (Cruzan, 2001).

La genética de poblaciones se desarrolló para poder evaluar la variación genética de las poblaciones y las especies como aspecto fundamental de la biodiversidad existente (Piñero *et al.*, 2008). Uno de los puntos centrales de ésta, radica en el estudio de los niveles de variación genética que se presentan en las poblaciones naturales. Se ha descubierto que casi todas las poblaciones tienen niveles relativamente altos de variación; pero las excepciones más notables a esta generalidad, corresponden a especies con distribuciones muy restringidas o que han pasado recientemente por cuellos de botella (Eguiarte & Piñero, 1990). Durante los últimos años se ha hecho un enorme esfuerzo para ampliar el conocimiento de la estructura genética en poblaciones naturales en México. Las preguntas más importantes que se han planteado incluyen la cantidad de variación que hay en poblaciones naturales, la estructuración de esa variación en diversas poblaciones y las consecuencias que tiene

la rareza de especies para la adaptación, la especiación y la extinción (Piñero *et al.*, 2008).

7.3.1 Variación genética y sus estimadores

La variación genética se define por las frecuencias génicas y se refiere a la variedad de alelos, genotipos y fenotipos presentes en las poblaciones, especies o grupos de especies propias de una generación. Es posible evaluar su presencia en proteínas, enzimas y secuencias de ADN de todos los linajes, y es producto de los cambios en las frecuencias alélicas y genotípicas generados por las distintas fuerzas evolutivas (Nei, 1977; Frankham *et al.*, 2009; Hamilton, 2009; Hedrick, 2010).

Actualmente en genética de poblaciones los estadísticos más empleados son: **Porcentaje de loci polimórficos.** Un locus se considera polimórfico si podemos detectar más de un alelo en una población. El criterio más utilizado es del 1%; es decir, un locus es polimórfico si el alelo más común presenta una frecuencia menor al 99% en la población de estudio (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005).

Proporción de loci polimórficos. El polimorfismo genético es la concurrencia de encontrar en una misma población dos o más alelos diferentes en un locus, con una frecuencia apreciable (Hedrick, 2010). La proporción de polimorfismos por loci se calcula:

$$P = \frac{x}{m}$$

Donde *x* es el número de loci polimórficos en una muestra de *m* loci.

Riqueza alélica. La riqueza alélica, se define como el número de alelos observados en un locus en una población (Hedrick, 2010). Se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$A = \frac{n}{N}$$

Donde *n* es el número de alelos observados en todos los loci y *N* es el número total de loci muestreados.

Esta medida es muy sensible a la pérdida de variación en poblaciones pequeñas. El número de alelos que pueden encontrarse depende del tamaño de la muestra y de la frecuencia de cada alelo.

Fenómeno de cuello de botella. Las poblaciones que han experimentado una reducción drástica en su tamaño efectivo, muestran una correlación positiva entre la reducción del número de alelos y la heterocigosis en loci polimórficos. La diversidad alélica se reduce mucho más rápido que la heterocigosis bajo el supuesto de equilibrio mutación-deriva. Esto se ha demostrado en loci que evolucionan bajo el modelo mutacional de alelos infinitos (IAM), donde la heterocigosis observada es mayor que la heterocigosis esperada habiendo un exceso de heterocigosis. Si el locus en cuestión evoluciona bajo el modelo de paso a paso o SMM (Stepwise Mutation Model), puede ocurrir que no se observe este exceso de heterocigosis. Sin embargo, pocos loci siguen el modelo SMM, y mientras más se alejen de éste y se acerquen hacia el modelo IAM, entonces mostrarán exceso de heterocigosis como consecuencia de un cuello de botella reciente en la población (Cornuet & Luikart, 1997).

Heterocigosis y equilibrio de Hardy-Weinberg. La variación genética de una población, puede cuantificarse a través de la heterocigosis esperada en el equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W). Esta es una medida biológica que permite conocer la cantidad de genotipos heterócigotos en las poblaciones ideales y a partir de ella, se puede conocer el efecto de las fuerzas evolutivas sobre la diversidad genética de las

poblaciones a través del tiempo, predecir los efectos que genera la reducción en el tamaño poblacional, identificar la respuesta de las poblaciones a la selección natural y estimar así los coeficientes de endogamia en los individuos y la población (Hedrick, 2010).

El equilibrio de H-W se basa en el supuesto de una población grande de individuos diploides, con reproducción sexual aleatoria, sin selección, mutación y migración, donde las frecuencias génicas y genotípicas permanecen constantes de generación en generación. Pero la cantidad de variación se ve reflejada en la proporción de genotipos heterocigotos presentes en la población. La heterocigosis observada (H_O) se define como la frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en la muestra para cualquiera de los loci y se calcula por cómputo directo; mientras que la heterocigosis esperada (H_E), desde el punto de vista matemático, es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes. Cuando la población se desvía de manera significativa de dichas proporciones, se habla de desequilibrio H-W (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005).

En la actualidad se siguen empleando los estadísticos F de Nei (1977), que conciernen a la relación que existe entre las frecuencias genotípicas en el total de la población y las subpoblaciones para un locus dado. Se definen como una función de la heterocigosis observada y esperada y se aplican a cualquier situación donde exista selección o no, sin importar cuántos alelos segregan en el locus analizado. F_{IS} y F_{IT}, se conocen comúnmente como índice de fijación y pueden ser negativos, mientras que el conocido como índice de diferenciación ó F_{ST} siempre es positivo. F_{IS} y F_{IT} miden la desviación de las frecuencias genotípicas, de las proporciones en equilibrio H-W, en las subpoblaciones y en el total de la población, respectivamente (Nei, 1977).

Particularmente, el índice de fijación F_{IS} describe la distribución de los genotipos dentro de las poblaciones e indica qué tan lejos se encuentra una población del equilibrio de Hardy-Weinberg. Este toma un valor de 0, si las poblaciones se encuentran en las proporciones esperadas; es decir, cuando los apareamientos han sido consecuencia del azar y revela que la población está en equilibrio. Si por el contrario, es diferente de cero de forma positiva, muestra que existe un déficit de individuos heterocigotos e incluso puede tomar el valor máximo de 1, si sólo se encuentran individuos homócigos en la población; que generalmente ocurre por endogamia extrema. Este estadístico es negativo cuando la población cuenta con un exceso de individuos heterocigotos (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005; Eguiarte *et al*., 2010; Hedrick, 2010).

Existe una variedad de causas que ocasionan desviación del equilibrio H-W; si los resultados muestran exceso de heterocigotos, podría ser atribuida a la presencia de una selección sobredominante o la ocurrencia de migraciones en la población estudiada. Si por el contrario los hallazgos son déficit de heterocigotos, podría deberse a cuatro factores principalmente: 1) que el locus esté bajo selección, 2) a la presencia de alelos nulos dando falsa lectura de un exceso de homocigotos, 3) altos niveles de consanguinidad en la población, producto de apareamiento entre individuos emparentados y 4) se atribuiría a la presencia de una cierta subestructuración reproductiva de la población conocida como efecto “Wahlund”, cuando dos subpoblaciones que han estado separadas mediante barreras físicas o ecológicas son analizadas en conjunto y si existen diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones, entonces existirá déficit de genotipos heterocigotos aún cuando cada

submuestra se encuentre en proporciones H-W (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005; Hedrick 2010).

7.3.2 Parentesco

El análisis de parentesco se basa en la observación de las frecuencias alélicas y a partir de los alelos compartidos entre los individuos. Se realizan simulaciones pareadas en la identificación de las posibles relaciones. El conocimiento del pedigree y/o genealogía y el registro de las tasas demográficas de una población cautiva es de suma importancia en los programas de reproducción y crianza, ya que permite proponer estrategias y con ello evitar los apareamientos entre individuos consanguíneos (Blouin, 2003; Van-Horn *et al.*, 2008).

En la actualidad es de gran interés conocer la información genealógica de grandes poblaciones silvestres que se encuentran en alguna categoría de riesgo o de aquellas que se destinen a algún tipo de manejo *ex situ* para fines de conservación. Existen muchos factores que pueden interferir con un seguimiento preciso basado únicamente en censos o tasas demográficas, por lo que se emplean métodos que analizan la información contenida en el ADN de los individuos (Knapp & Malone, 2003).

7.3.3 Estructura genética

La mayoría de las poblaciones se encuentran agrupadas en subpoblaciones más pequeñas dentro de las cuales ocurren los apareamientos, esta agrupación se conoce como estructura de la población o subdivisión de la población. Cuando existe subdivisión en la población, inevitablemente se presenta diferenciación genética entre las subpoblaciones (Hartl & Clark, 2007), y se caracteriza por las diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones, constituyendo lo que en genética se conoce como estructura genética (Hartl & Clark, 2007; Eguiarte *et al.*, 2010).

Las frecuencias alélicas de una población, son la proporción de cada uno de los alelos en un gen dado y en la naturaleza, son diferentes entre las poblaciones que están formadas por una especie dada. Las frecuencias alélicas son consecuencia de la acción de las fuerzas evolutivas a lo largo del tiempo y funcionan como un archivo evolutivo. Una especie presenta alta estructura genética cuando se considera que se pueden detectar fuertes diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones. En contraste, una especie con baja estructura genética presenta poblaciones casi idénticas, con pocas o nulas diferencias en sus frecuencias alélicas. Al analizar poblaciones, si se detecta que son muy distintas genéticamente, entonces se dice que los tamaños de las poblaciones han sido pequeños a través del tiempo (la deriva génica ha sido intensa) y/o que ha existido poco flujo génico (migración) entre estas poblaciones por mucho tiempo (Eguiarte *et al.*, 2010).

Un paso crucial en genética de poblaciones es la elección de un grupo de poblaciones, con el objetivo de alcanzar, por ejemplo: 1) una muestra de individuos de los cuales se desea conocer las propiedades de las poblaciones y 2) un grupo de poblaciones predefinidas de las cuales se desea clasificar individuos de origen desconocido. Esta estructura poblacional se puede evaluar con el estadístico F_{ST}, que es la medida estándar y puede emplearse como una medida relativa de la divergencia poblacional (Neigel, 2002).

F_{ST} compara los niveles menos incluyentes con los más incluyentes de la jerarquía poblacional y mide todos los efectos de la estructura poblacional combinada. Los parámetros para la interpretación de F_{ST} son los siguientes: 1) 0-0.05: poca o baja diferenciación genética, 2) 0.05-0.15: moderada diferenciación genética, 3) 0.15-0.25:

grande o alta diferenciación genética y 4) 0.25 y más: muy grande o muy alta diferenciación genética (Balloux & Lugon-Moulin, 2002; Hartl & Clark, 2007).

El software comúnmente más usado para medir la diferenciación entre las poblaciones se conoce como Structure, fue diseñado para asignar de manera probabilística a los individuos con base en sus genotipos a una o más poblaciones (K > 1), donde K refleja el número de grupos o subpoblaciones en la muestra (Pritchard *et al.*, 2000; Hedrick, 2010).

7.4 El problema de la endogamia

La endogamia es una fuerza evolutiva que actúa cuando los apareamientos no son al azar sino entre individuos relacionados en su historia genealógica (Curtis & Barnes, 2000; Hartl, 2000; Eguiarte, 2007). La progenie resultante se le conoce como endogámica. Por definición, los individuos comparten uno o más ancestros en común (Hartl & Clark, 2007). Cuando se aparean individuos emparentados (endogámicos), su progenie posee una mayor probabilidad de recibir los mismos alelos de ambos ancestros, lo que les confiere a su vez mayor probabilidad de poseer un genotipo homocigoto (Hamilton, 2009), en relación a las frecuencias que se esperarían con apareamientos al azar, ya que afecta todos los genes en el genoma de un organismo (Hartl, 2000; Hartl & Clark, 2007).

El incremento de individuos homocigotos se debe a que los alelos idénticos por ascendencia se encuentran juntos en una mayor frecuencia en la población (Hedrick, 2010). Los efectos detrimentales de la endogamia se conocen como “depresión por endogamia” (DE); una población que experimenta endogamia se caracteriza por la reducción en la adecuación de los individuos, debido a que las mutaciones deletéreas

se acumulan de manera recesiva, provocando una carga genética en la población (Hartl & Clark, 2007; Hedrick, 2010).

Se ha observado que en aves y mamíferos la DE afecta el peso al nacer, la sobrevivencia, la reproducción, la resistencia a enfermedades, al estrés ambiental y la depredación (Crnokrak & Roff, 1999; Hedrick & Kalinowski, 2000 en: Eguiarte, 2007).

En poblaciones muy pequeñas, como en las que se tienen en zoológicos y muchas reservas, las cruzas endogámicas pueden representar un problema muy grave, por lo que es necesario hacer cuidadosos análisis genéticos. Un primer paso para el estudio de la endogamia en cualquier población, debe ser la estimación del grado de consanguinidad de un individuo, o coeficiente de consanguinidad (F) (Eguiarte & Piñero, 1990). El coeficiente F, usualmente se conoce como coeficiente de endogamia y se define como la probabilidad de que dos alelos en un individuo endogámico sean idénticos por ascendencia (Hartl & Clark, 2007). Los efectos de la endogamia se pueden cuantificar en términos de la reducción en la heterocigosis, mediante la relación (Ho – H)/Ho (donde Ho es la heterocigocis observada y H es la heterocigosis esperada)(Hartl, 2000).

En una población finita la probabilidad de endogamia incrementa a través del tiempo (Hartl & Clark, 2007), en poblaciones silvestres ocurre de un nivel moderado a alto y afecta los rasgos adaptativos mediante depresión por endogamia. Sin embargo, en su mayoría los efectos no son significativos debido a dos razones principales: 1) los animales en su medio natural son capaces de evadir la endogamia; y, 2) incluso si ocurre endogamia, los animales son capaces, tanto conductual como fisiológicamente, contender con los efectos genéticos deletéreos antes de que se manifiesten en un nivel

fenotípico. Mientras que las especies en condiciones de cautiverio, están en desventaja porque no pueden responder de la misma manera (Crnokrak & Roff, 1999).

En condiciones de cautiverio, los alelos que son raros y deletéreos en condiciones silvestres, se ven favorecidos y quedan expuestos a la acción de la selección natural; disminuyen la variación genética y forman la base principal de la adaptación genética a este ambiente aislado (Cruzan, 2001; Frankham, 2008).

La susceptibilidad de las poblaciones pequeñas de las islas es atribuida a eventos estocásticos demográficos y ambientales, pero dicha susceptibilidad puede predecirse con fundamentos genéticos. Las poblaciones de reptiles insulares sufren un incremento en la endogamia de la misma manera que las poblaciones en cautiverio, debido a eventos de cuello de botella en su fundación y por el tamaño poblacional relativamente pequeño. En estas poblaciones la endogamia ocurre como consecuencia de una población de tamaño finito, se reduce la adaptabilidad o éxito reproductivo y se incrementa el riesgo de extinción de la población (Frankham, 1998).

En suma, la fragmentación y pérdida de hábitat, pueden generar problemas en las poblaciones amenazando su supervivencia. Por otro lado, factores como la estocasticidad demográfica, endogamia y deriva génica, pueden alterar la diversidad genética de una población y reducir su supervivencia (Zug *et al.*, 2001). De esta manera se crea un foco de atención en poblaciones que se encuentran en áreas perturbadas y que además reúnen alguno de estos factores, para la creación y el establecimiento de refugios, reservas, áreas protegidas y unidades de manejo.

7.5 Regiones microsatélites como marcadores moleculares

El ácido desoxirribonucléico (ADN) es la molécula encargada de guardar la información sobre las características de un ser vivo y es transmitida de generación en generación. Se almacena en el núcleo y en algunos organelos (mitocondrias y cloroplastos) de las células que forman un organismo. Existen regiones de ADN nuclear conocidas como microsatélites que varían mucho entre individuos y de una generación a otra, haciendo posible asignar una secuencia única a cada individuo análogamente a una “huella digital” (Zarza-Franco *et al.*, 2005).

Los microsatélites se definen como secuencias simples de ADN que varían en el número de repeticiones, son altamente polimórficas y ofrecen un mayor entendimiento de la estructura poblacional (Slatkin, 1995). Estas secuencias son cortas, en las que un motivo o unidad de repetición tiene de uno a seis pares de bases (Li *et al.*, 2002; Schlötterer, 2000). Son marcadores nucleares codominantes que segregan de manera mendeliana. La causa de la variación de los microsatélites entre distintos genomas es que cada locus tiene un número diferente de unidades de repetición o alelos. Estas son causadas debido a que la maquinaria de la replicación del ADN tiene dificultad copiando secuencias cortas de nucleótidos repetidos, (un solo nucleótido, di, tri o tetra nucleótidos) dispuestos en tándem (el más común es la secuencia repetida del dinucleótido citosina-adenina (CA)) y con frecuencia se equivoca, dando como resultado el incremento o disminución en el número de copias de la secuencia repetida (Lewin, 2008). Así, la longitud de la unidad de repetición en un locus particular es altamente polimórfico en una población dada (Watson *et al.*, 2004).

En genética de poblaciones, el principal objetivo que se persigue es estudiar, determinar y medir la variación existente, entre y dentro de los individuos de una

población. Esta variación se conoce como “polimorfismo”. Los marcadores de ADN, y en especial los microsatélites, están rápidamente reemplazando o complementando a otros marcadores o metodologías genéticas dado su elevado nivel de polimorfismo, resultan útiles para definir un único genotipo multilocus (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005).

Un polimorfismo se define como la presencia de dos o más variantes heredables para una misma característica que coexisten dentro de la población (Curtis & Barnes, 2000). Los microsatélites al ser polimórficos son un conveniente marcador molecular, en el mapeo de mutaciones heredadas que incrementan el riesgo a una enfermedad en particular (Watson *et al.*, 2004), así como en la identificación de la herencia de manera muy exacta debido a que se pone de manifiesto el 50% de las bandas de ADN en un individuo que derivan de un progenitor específico (Lewin, 2008).

Debido a la abundancia genómica y alta mutabilidad de las secuencias simples repetidas (SSR´s) o regiones microsatelitales, se cree que los cambios en el tamaño del microsatélite puede servir como una fuente rica de variación en características relacionadas con la adaptabilidad a condiciones que varían en el espacio y el tiempo en las poblaciones naturales (Li *et al.*, 2002). Además, permiten medir la variación genética de un loci que no se encuentra bajo selección (neutral), ya que generalmente las repeticiones están localizadas en regiones no codificantes del ADN, por lo que se consideran marcadores evolutivamente neutros (Li *et al.*, 2002; Frankham *et al.*, 2009).

Esta neutralidad es relativa, porque se hallan en gran cantidad en regiones no codificantes, el 14% de todas las proteínas (en eucariotas) contienen secuencias repetidas que pueden conferir cierta ventaja evolutiva de mayor adaptación a ambientes cambiantes o nuevos (Li *et al*., 2002). Se han planteado hipótesis que buscan

establecer una funcionalidad biológica en estas regiones informativas, dado que los microsatélites están más o menos distribuidos a lo largo de todo el genoma de los eucariotas. La hipótesis más aceptada es en la que se plantea que pueden estar relacionados con el empaquetamiento y la condensación del ADN en los cromosomas (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005).

Cabe destacar que la distribución genómica de las SSR´s tanto en las regiones codificantes como en las no codificantes no es de forma azarosa. Estos hallazgos no son consistentes con la hipótesis de Ohta y Kimura (1978) basada en una teoría neutra o casi neutra, debido a que el proceso evolutivo que conduce a la variabilidad en la longitud de las SSR´s no sigue un modelo de mutación simple. Los mecanismos de mutación de mayor ocurrencia son la recombinación y la replicación pausada o interrumpida; la dependencia de estos mecanismos bajo condiciones de estrés pueden ser de gran importancia en adaptaciones genéticas rápidas y especiación (Li *et al.*, 2002).

Wytenbach & Fredga (1999) realizaron un estudio en *Sorex araneus*, para determinar el efecto de un río como barrera geográfica en la estructura genética y el flujo genético en las zonas de contacto entre dos razas cromosómicas de la misma especie. Estos autores, emplearon microsatélites que son más sensibles en la detección de patrones de hibridación en contraste con el uso de aloenzimas.

MacAvoy *et al.* (2007) mencionan que los microsatélites que eligieron en poblaciones de tuátara (*Sphenodon* spp.) en islas de Nueva Zelanda son marcadores moleculares altamente informativos con un poder de resolución mayor que el obtenido con aloenzimas o ADN mitocondrial, además revelan información filogenética minimizando el riesgo de ser malinterpretada. Detectaron alto grado de estructura

genética en las poblaciones, e indican que se consideren como poblaciones separadas en el manejo enfocado a la conservación, y determinaron en sus poblaciones fenómenos como cuellos de botella y endogamia.

Brede & Beebee (2004) contrastaron la estructura poblacional entre dos especies de anfibios *Bufo bufo* y *Rana temporaria*, encontrando que la primera mostró una diversidad mucho más baja respecto a la sunda en los ocho microsatélites empleados en el estudio. Esta diferencia es posiblemente consecuencia del flujo genético alto en *R. temporaria*, y porque la población de *B. bufo* presenta un flujo genético menor así como una estructura genética más dispersa.

Para examinar la estructura genética poblacional y los patrones de dispersión en salamandras (*Plethodon cinereus*) machos y hembras en el bosque nacional Jefferson en Virginia U.S.A., se emplearon seis microsatélites y se encontró una distribución continua de la población con dispersión limitada para ambos sexos. A pesar de esta limitante, la población no mostró evidencia de endogamia, al parecer porque las salamandras son capaces de distinguir entre individuos emparentados mediante el olor, lo que se considera un mecanismo de evasión de la endogamia (Cabe *et al.*, 2007).

Zarza *et al.* (2009) aislaron y caracterizaron 10 secuencias polimórficas de microsatélites en *Ctenosaura pectinata* (Cuadro 1) en individuos pertenecientes a cinco localidades a lo largo de la costa del Pacífico en México. Estos microsatélites se utilizaron como marcadores moleculares para poder describir la estructura genética, el flujo genético entre zonas de contacto geográfico, estudiar sistemas de apareamiento y en la dirección de estrategias genéticas para la conservación de la especie, así como en otras especies del género *Ctenosaura* (por ejemplo, *C. hemilopha, C. similis, C. oaxacana*).

Cuadro 1. Regiones microsatélites caracterizadas en *C. pectinata* (Zarza et al., 2009).

Locus (No. Acceso)	Secuencias de amplificación (primer)	Motivo de repetición	Ta(°C)	*N*	N_a	Rango de tamaño (bp)	H_O/H_E
Pec01	F:[H]GGGTCTGTGAAGTAGATGC	(AC)12	55	27	4	93–101	0.48/0.48
EU878555	R:GCAGTATATCCCCTCAAAGAC						
Pec03	F:[H]CCAGAGCAAATTCACAGATC	(CACG)4 + (AC)5	60	27	2	219–221	0.41/0.50
EU878556	R:GGTCAGATGTAGTCCAGCATAG						
Pec16	F:[H]GGCCTGGTAAAAATACTTCAG	(AC)18	55	27	8	214–239	0.85/0.80
EU878557	R:GTTTCGGGAAAAAGATTGTTGTG						
Pec20	F:[F]CTGGACAAAACTCTCACTCATC	(AC)10	55	27	2	226–228	0.52/0.50
EU878558	R:GTTTCCGCACAAACACTACAGATC						
Pec21	F:[F]CCTCACAGAAGTTGAGTAGTTTC	(CT)8C(AC)5 + (CT)9C(AC)11	55	22	11	283–314	0.45/0.71*
EU878559	R:GTTTGTTATGTTTCTGTGTGCAAGAC						
Pec24	F:[H]ACACATGCCCGGAAG	(GGAA)8(GGGA)3 + (AC)12	55	27	19	390–438	0.96/0.90
EU878560	R:GCTTCACCCATTCTCAC	(AT)6(ACAT)2(AC)10					
Pec25	F:[H]GGCTGTATATGTGATGAGAG	(AC)11	53	27	4	186–194	0.41/0.38
EU878561	R:CTGTGTTTGTGGGTATTG						
Pec73	F:[N]GCAATGGAAACGAGGCTGGAC	(AC)10	58	27	3	186–190	0.78/0.68
EU878562	R:ATGACATACACGGGCACAACTG						
Pec89	F:[F]TCTTCCCTGACTTCCATTC	(AC)12AT(AC)4	53	27	3	246–254	0.15/0.14
EU878563	R:GCTGACTGCCATCTGTAAG						
PecTN1	F:[F]ATGGGTGACTGTAATGCG	(CA)2(CG)4(CA)7 +	56	26	3	195–207	0.52/0.51
EU878564	R:GTTCCCTTTACGAAGATCC	(CAG)5A(TGA)5					

Temperatura óptima de alineamiento (Ta). Las marcas fluorescentes se indican como [H] (5HEX), [F] (6FAM) y [N] (NED). Modificación tipo "PIG-tail" se indica en itálicas; n, número de individuos exitosamente genotifipicados; N_a, número de alelos; H_O, heterocigosis observada; H_E, Heterocigosis esperada; ∗ desviación del equilibrio Hardy-Weinberg y déficit de heterocigosis ($p<0.05$).

Empleando estos 10 microsatélites en el estudio del sistema de apareamiento en *C. pectinata* a partir de muestras de ADN de individuos capturados en la localidad de Nizanda, Oaxaca, Faria *et al.* (2010) obtuvieron el primer hallazgo de la predominancia de paternidad única en iguana negra y no paternidad múltiple como se ha observado en otros reptiles. Esto sugiere que la especie mencionada es más susceptible a la pérdida de la variación genética debida a la presión impuesta por la caza de hembras grávidas.

7.6 Biología de la conservación

El desarrollo tecnológico en la genética molecular como la secuenciación de ADN y el uso de diferentes marcadores moleculares, permiten evaluar si las poblaciones presentan problemas en su composición genética (Guttiérrez-Guerrero, 2014); ayudando a detener la extinción de las mismas y adecuar su manejo con bases genéticas que no supongan un fracaso en cualquier acción establecida (Eguiarte *et al.*, 2007).

La biología de la conservación tiene como objetivo el mantenimiento de la biodiversidad a escala mundial; la biodiversidad es el resultado de la evolución orgánica y los procesos biológicos desde el nivel molecular y del ADN, a los de la biósfera (Zug *et al.*, 2001). La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) reconoce la necesidad de conservar la biodiversidad bajo tres niveles: 1) diversidad genética dentro de las especies, 2) diversidad de especies y 3) diversidad de ecosistemas (Frankham *et al.*, 2009).

La necesidad de conservar la diversidad genética se basa en dos argumentos: 1) es necesaria para que las poblaciones evolucionen en respuesta a los cambios ambientales; y, 2) los niveles de heterocigosis están relacionados directamente a la reducción de la adaptabilidad de la población como consecuencia de la depresión por endogamia (Reed & Frankham, 2003).

El impacto ecológico por parte de los humanos, se ha visto incrementado dramáticamente en sinergia con el crecimiento exponencial de la población (Zug *et al.*, 2001), lo que desencadena la crisis por la que atraviesa la diversidad de los seres vivos. Muchas especies se encuentran amenazadas o en peligro de extinción y en el peor de los casos, ya se han extinguido (DOF, 2009), porque la modificación y pérdida

del hábitat, afecta de manera directa a las poblaciones de anfibios y reptiles, que como consecuencia desaparecen de dichas áreas (Zug *et al.*, 2001).

Los programas de manejo y conservación de especies se asocian con frecuencia a poblaciones pequeñas y la aplicación de datos genéticos se ha vuelto muy importante en la formulación de estos programas, en especial en aquellos que involucran reproducción en cautiverio, reintroducción o translocación. Los métodos de translocación y reintroducción son implementados por manejadores de iguanas, como medida preventiva de las extracciones causadas por eventos estocásticos o perturbaciones antropogénicas (Knapp & Malone, 2003).

Las especies en riesgo son aquellas que sus poblaciones han ido disminuyendo debido a actividades humanas como la transformación de su hábitat, sobreexplotación, interacciones con especies invasoras, efectos de la contaminación, al punto que se considera necesario protegerlas. En México, el instrumento legal que protege a las especies animales se conoce como Norma 059 (NOM-059-SEMARNAT-2010). La mayoría de las especies de iguanas del género *Ctenosaura* se encuentran enlistadas dentro de ella; *Ctenosaura pectinata* se encuentra en la categoría de especie amenazada (A), por lo que está prohibida la captura y comercialización de las especies en vida libre y además está catalogada como especie endémica de México (DOF, 2010).

En México se han creado Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre como estrategia en la conservación de las especies (SEMARNAT, 2009). Existen ocho Áreas Naturales Protegidas (ANP) donde *C. pectinata* es la especie con mayor número de registros: La Reserva de la Biósfera Islas Marías, Nayarit; Chamela-Cuixmala, Jalisco; Sierra de Manantlán, Jalisco y Colima; Tehuacán-Cuicatlán, Puebla y

Oaxaca; La Sepultura, Chiapas; los Parques Nacionales El Veladero, Guerrero y El Tepozteco en Morelos y D. F.; y en el Área de Protección de Flora y Fauna Corredor Biológico Chichinautzin, Morelos (Reynoso & González, 2005). No obstante dichas estrategias de conservación, se han obtenido resultados poco alentadores, debido a la escasa productividad y pobre beneficio ecológico (Weber *et al.*, 2006).

El entendimiento de la información genética y los procesos que ésta dirige permiten integrar diversas disciplinas (biología molecular, biología celular, fisiología, evolución, ecología, sistemática y etología) encargadas del conocimiento, clasificación, comportamiento, historia de los organismos, así como del mantenimiento y solución de problemas de la biósfera (Klug *et al.*, 1999). La labor de la genética en los últimos años, ha sido entender y disminuir los problemas genéticos enfrentados por las poblaciones pequeñas y especies en peligro; es crucial la estimación de la diferenciación entre las poblaciones, porque de manera general, las poblaciones pequeñas aisladas están sujetas al efecto de la deriva génica, la cual afecta el potencial evolutivo mediante la fijación de mutaciones deletéreas (Balloux & Lugon-Moulin, 2002).

Existen numerosos ejemplos donde los factores genéticos parecen estar implicados en la disminución de poblaciones de animales como las panteras de Florida (*Felis concolor*), los pericos de Puerto Rico (*Amazona vittata*), los lobos de la isla Royal (*Canis lupus*), el borrego cimarrón (*Ovis canadensis*), el pájaro carpintero *(Dendrocopos medius)* y los leones asiáticos (*Panthera leo persica*), entre otros (Hedrick, 1995; O'Brien, 1994; Frankham *et al.*, 2002 en: Eguiarte, 2007). Entre los factores genéticos que se han reconocido y recibido la mayor atención son la pérdida de variación genética y la depresión por endogamia.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Área de estudio

La población de iguanas analizada en este estudio, se localiza en el Centro de Conservación y Reproducción de Iguanas-UMAR (CECOREI-UMAR), ubicado en el Campo Experimental de la Universidad del Mar (Figura 3). Con coordenadas geográficas 15°55’23.1’’ N y 97°09’05’’ O y una elevación de 12 msnm. Este se encuentra en Bajos de Chila, Municipio de San Pedro Mixtepec, Puerto Escondido, Oaxaca, sobre la Carretera Federal No. 200 Acapulco (Guerrero) – Puerto Escondido (Oaxaca), en el kilómetro 128.1 (Pinacho *et al*., 2010).

Figura 3. Área de estudio CECOREI-UMAR, Puerto Escondido, Oaxaca.

8.2 Selección de la muestra de la población de *Ctenosaura pectinata*

Garza & Williamson (2001) establecieron que para llevar a cabo análisis genéticos, el tamaño de la muestra poblacional debe ser igual o dos veces mayor, al número de alelos encontrados en el locus más polimórfico; y Zarza *et al.*, (2009) indican que el locus más polimórfico para *C. pectinata*, es Pec 24 con 19 alelos (Cuadro 1). Por lo tanto se seleccionaron un total de 50 iguanas negras (*C. pectinata*), 27 hembras y 23 machos, durante los meses de junio y julio del año 2011, en edades de dos a trece años, rango dentro del cual se encontraban organismos potencialmente fértiles.

8.3 Método

8.3.1 Caracterización morfométrica

Los cincuenta individuos seleccionados de la población de *C. pectinata*, se evaluaron fenotípicamente mediante 39 caracteres morfométricos selectos por Reynoso, *com. pers.* (2011) para esta especie (se describe el procedimiento en el Apéndice 1). Involucran medidas del cuerpo, las extremidades y la cabeza; así como, diversos patrones de escutelación (escamas de la cabeza, la cola y el cuerpo). A continuación se enlistan los caracteres:

1. Sexo.
2. Longitud hocico-cloaca.
3. Longitud de la cola.
4. Longitud de la pierna.
5. Longitud de la cabeza.
6. Ancho de la cabeza.
7. Longitud del hocico.

8. Número mínimo de escamas entre los semicírculos supraorbitales.
9. Número mínimo de escamas ente los semicírculos supraorbitales e interparietales.
10. Número mínimo de escamas entre suboculares y supralabiales.
11. Número de supralabiales (incluyendo la escama oblicua).
12. Número de escamas entre las dos cantales.
13. Número de escamas entre la cantal o superciliar y la escama subocular agrandada central.
14. Número de escamas entre nasales.
15. Número de escamas entre nasal y rostral.
16. Número de escamas infralabiales.
17. Número de escamas postmentales.
18. Número de espinas agrandadas de la cresta dorsal media.
19. Número de filas de escamas entre las escamas nucales y la primera espina de la cresta dorsal media.
20. Número de filas de escamas entre la cresta dorsal media y el primer verticilio de las escamas caudales espinosas agrandadas.
21. Número de intercalares con filas incompletas de escamas caudales.
22. Número de intercalares con solo una fila completa de escamas caudales.
23. Número de intercalares con dos filas completas de escamas caudales.
24. Número de intercalares con tres filas completas de escamas caudales.
25. Ángulo de las quillas de las escamas caudales: 1) <20°; 2) >30°.
26. Forma en la que se arreglan hacia afuera las escamas caudales espinosas: 1) recto en medio de la escama; 2) oblicuo.

27. Condición de la espinosidad de las escamas caudales paramedias: 1) ninguna espinosa; 2) paramedias internas más espinosas que las exteriores; 3) paramedias internas menos espinosas que las exteriores.
28. Condición de las escamas paramedias del séptimo verticilio caudal: 1) todas planas; 2) una plana y el resto con abultamientos; 3) dos planas y el resto con abultamientos; 4) todas espinosas; 5) dos espinosas y una con abultamientos; 6) una espinosa y dos con abultamientos.
29. Número de verticilios caudales con escamas paramedias espinosas.
30. Número de verticilios caudales totales.
31. Número de lamelas subdigitales en el dedo cuatro.
32. Número de escamas dorsales paramedias en una cabeza de longitud.
33. Número de escamas midventrales en una cabeza de longitud.
34. Número de escamas alrededor de la mitad del cuerpo.
35. Número de poros femorales.
36. Bandas transversales dorsales oscuras sobre el cuerpo: 1) presentes a lo largo del dorso; 2) restringidas a la porción anterior del dorso; 3) ausentes.
37. Bandas transversales dorsales oscuras sobre el cuerpo: 1) con centro pálido en la región vertebral; 2) sin centro pálido.
38. Número de bandas transversales dorsales oscuras sobre el cuerpo.
39. Marcas/Áreas-pálidas/blancas: 1) presentes a lo largo del dorso; 2) restringidas a la porción anterior del dorso; 3) restringidas a la porción posterior del dorso; 4) ausentes.

8.3.2 Caracterización genotípica

Toma de muestras de sangre. Se tomaron muestras sanguíneas de todos los individuos de *C. pectinata*, mediante punción en la vena caudal empleando jeringas estériles. De cada individuo se obtuvieron 0.5 ml de sangre, de la cual se depositó 25 µl en un tubo eppendorf y se llevó a un volumen total de 1.5 ml con etanol absoluto. Las muestras se almacenaron a 4 °C para su uso posterior en el laboratorio (Zarza *et al*., 2008).

Extracción de ADN genómico total. Se implementaron dos métodos de extracción de ADN:

1) Protocolo de extracción de ADN por precipitación salina de Sunnucks & Hales (1996) y Aljanabi & Martínez (1997) modificado por Zarza *et al.* (2009).

Se resuspendió cada tubo eppendorf (muestra de sangre, preservada en etanol absoluto a 4 °C, volumen total de 1.5 ml) en vortex, se tomaron 25 microlitros y se pasaron a tubos nuevos con 300 µl de solución tampón de lisis TEN + SDS 2 % (añadidos previamente a cada tubo) (Apéndice 3). Se agregaron 20 µl de proteinasa K líquida (SIGMA ALDRICH®) a cada tubo y se dejaron incubando toda la noche en bloque de calor a 56 °C. Al día siguiente se añadieron 100 µl de cloruro de sodio (NaCl) 5M, se mezclaron durante 30 s con ayuda del vortex y se centrifugaron durante 7 min 30 s a 14,000 rpm a 4 °C. Posteriormente se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos y se añadieron 800 µl de etanol 100% frío (-20°C), se mezcló cada tubo mediante un ligero toque en el vortex o bien se invertía suavemente de 4-7 veces por tubo. Se dejó incubando durante toda la noche a -20°C. Al tercer día del procedimiento, los tubos se centrifugaron durante 20 min 30 s a 14,000 rpm a 4 °C. Luego se decantó el exceso de

alcohol en un vaso de precipitado (cuidando de no tirar el pellet) y se añadieron 800 µl de etanol 70% frío (-20°C). Se llevó a cabo una sunda centrifugación durante 7 min 30 s a 14,000 rpm a 4 °C y se decantó el exceso de alcohol. Se dejó secar cada uno de los tubos dentro de una cajita de unicel con tapa, a temperatura ambiente, toda la noche. Una vez secas las muestras, se añadió 200 µl de agua inyectable (o agua MQ; o solución tampón TE (Apéndice 3)) y se guardaron a -20°C para uso posterior, en la técnica de electroforesis.

2) Protocolo de extracción de ADN de Amaru *et al.* (2006) modificado en este estudio y empleado para obtener una mayor concentración de DNA por muestra.

Se resuspendió un volumen de 250 µl de muestra sanguínea refrigerada en 900µl de NLB-SDS y se agregó 300 µl de cloruro de sodio (NaCl) 6M, luego se agitó en vortex durante un minuto. El volumen total se dividió en dos tubos (725 µl c/u) y a cada uno se le agregaron 300 µl de cloroformo, se mezcló por inversión durante 5 min hasta observar una solución homogénea. Se centrifugó a 7000 rpm durante 5 min. De cada tubo se tomaron 1000 µl y se pasaron independientemente a un tubo nuevo (2 tubos de una misma muestra). Posteriormente a cada tubo se agregaron 300 µl de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y se mezcló por inversión durante 5 min hasta observar una solución homogénea. Se llevó a cabo una sunda centrifugación a 10000 rpm durante 10 min para luego dividir el volumen de cada tubo (650 µl) (en total 4 tubos por muestra), se cuidó de no tomar el pellet formado por la centrifugación. Se agregó 30 µl de acetato de sodio (CH_3COONa) 3M por tubo y 1 ml de alcohol absoluto frío (a -20 °C). Se guardó a -20˚C al menos durante 20 min y se centrifugó a 13800 rpm durante 15 min. Se decantaron y resuspendieron en 1 ml de etanol al 70% (a -20 °C). Se centrifugó a 13800 rpm durante 15 min y se desechó el sobrenadante. Se dejó secar el ADN a

temperatura ambiente durante una noche y al día siguiente se resuspendió en 100 µl de agua tridestilada para luego reunir en un solo tubo el volumen total de cada muestra. Se guardó a 4 °C durante un día y posteriormente se mantuvo a -20 °C para análisis posteriores.

Para la visualización del ADN obtenido de la extracción de ambos protocolos, se realizaron geles de agarosa al 1 %. Para un volumen de 30 ml de buffer TBE 0.5X, se pesaron 0.3 g de agarosa (grado molecular). Se virtió el buffer en un matraz, se añadió la agarosa, se tapó con plástico adherente y se introdujo al microondas durante 30 s o bien hasta que se observara una solución transparente. Después, se añadió 0.4 µl de RED-GEL (o bromuro de etidio) (1 µl por cada 100 ml) y se mezcló suavemente. Finalmente se virtió esta solución en la cámara de eletroforesis y se dejó solidificar hasta que se formó el gel.

Cada muestra se pasó por vortex y se tomaron 4 µl de cada una. Se tomaron 4 µl de buffer de carga (Loading Buffer) y se mezcló con el volumen de la muestra sobre un corte de parafilm. Para el marcador de peso molecular (1 Kb), se tomaron 8 µl. Una vez el gel en la cámara de electroforesis, se depositó cada una de las muestras en cada uno de los carriles. El marcador de peso molecular se colocó en el primer carril del gel. La electroforesis se realizó a 100 volts/50mAmp, durante 25 min y la visualización de los geles se realizó en un transiluminador UV marca Kodak® (High Performance UV transilluminator UVP). Las muestras también se cuantificaron en NanoDrop marca Thermo® (NanoDrop 2000 Spectrophotometer).

Microsatélites y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como marcadores moleculares se emplearon 10 regiones microsatélites, caracterizados para *C. pectinata*: Pec01, Pec03, Pec16, Pec20, Pec21, Pec24, Pec25, Pec73, Pec89 y

PecTN1 (Zarza *et al.*, 2009). En el Cuadro 2, se muestran las características moleculares de cada uno de los microsatélites consideradas en esta técnica de PCR.

Cuadro 2. Microsatélites empleados como marcadores moleculares de iguana negra.

Nombre	Ta(°C)	Tamaño (pb)	Marca
Pec 01	55	93-101	5 Hex
Pec 16	55	214-239	5 Hex
Pec 20	55	226-228	6 Fam
Pec 21	55	283-314	6 Fam
Pec 24	55	390-438	5 Hex
Pec 25	53	186-194	5 Hex
Pec 89	53	246-254	6 Fam
Pec TN1	56	195-207	6 Fam
Pec 03	60	219- 221	5 Hex
Pec 73	60	186-190	Tamra

Temperatura de alineamiento (Ta), tamaño del amplicón en pares de bases y marca fluorescente de cada microsatélite. Modificado de Zarza *et al*. (2009).

La mezcla de reacción se realizó con agua bidestilada, buffer de reacción 10X, cloruro de magnesio ($MgCl_2$) 50 mM (SIGMA-ALDRICH®), desoxinucleótidos (dNTPs) 10 mM (Applied Biosystems®), dos secuencias de amplificación (primers) 10 mM (SIGMA-ALDRICH®), taq ADN polimerasa 5 u/µl (Invitrogen®), y el ADN "templado" 3 µl (a una concentración promedio de 14ng/µl) obtenido de la extracción a partir de las muestras de sangre (Cuadro 3).

Cuadro 3. Mezcla de reacción de la PCR, reactivos expresados en microlitros (µl).

	Vol. de reacción 15 µl (1X)	**Vol. de reacción 25 µl (1X)**
Agua	4.75	15.2
Buffer 10X	2.5	2.5
$MgCl_2$ (50mM)	3	3
dNTP´s (10mM)	0.5	0.5
Primer F (10mM)	0.5	0.5
Primer R (10mM)	0.5	0.5
Taq Pol (5u/µl)	0.3	0.3
ADN	3	3

La amplificación de los fragmentos se realizó en un termociclador marca Applied Biosystems® 2720, en las condiciones de temperatura y tiempo mostradas en el Cuadro 4. Para el locus Pec 24 los pasos de alineación y extensión fueron 10 sundos más largos que para los demás loci.

Cuadro 4. Temperatura y condiciones para la amplificación.

	Para la mayoría de los loci		**Para el locus Pec 24**	
Paso	**Temp.**	**Tiempo**	**Temp.**	**Tiempo**
Incubación Inicial	94°C	5 min	94°C	5 min
Desnaturalización	94°C	30 s	94°C	30 s
Ciclos	30		30	
Alineación	Ta (Temperatura óptima de alineación, Cuadro 3.)	30 s	Ta (55°C)	40 s
Extensión	72°C	30 s	72°C	40 s
Incubación Final	72°C	5 min	72°C	5 min

Para la visualización de los productos de PCR se realizaron geles de agarosa al 1.5%. Para 100 ml de solución tampón TBE 0.5X (Apéndice 3), se pesaron 1.5 g de agarosa (grado molecular). En un matraz se virtió el la solución de TBE y se añadió la agarosa, se tapó con plástico adherente y se metió al horno de microondas hasta que se observó una solución transparente. Se virtió en la cámara de electroforesis y se dejó solidificar.

De cada muestra se tomaron 10 µl y se mezclaron sobre un corte de parafilm con 2 µl de buffer de carga (Loading Buffer), que contenía reactivo RED-GEL. Para el marcador de peso molecular (100 bp), se tomó 5 µl y se mezcló con 1 µl de buffer de carga. Una vez que se colocó el gel dentro de la cámara de electroforesis, se depositó cada una de las muestras en su carril correspondiente. El marcador de peso molecular se colocó en el primer carril del gel. La electroforesis se realizó a 150 volts/50mAmp, durante 30 a 45 min y se visualizó con ayuda del transiluminador.

Secuenciación de regiones microsatélites y su genotipificación. Los productos de la amplificación fueron secuenciados de manera automatizada en el Analizador Genético 3500 xl Applied Biosystems® del Laboratorio de Biología Molecular y de la Salud del Instituto de Biología, UNAM. Se agregaron 9.5 µl de Formamida (Applied Biosystems®), 0.5 µl de Rox-500 ó LIZ-500 (Applied Biosystems®) dependiendo del color del marcador empleado en las secuencias de amplificación (primers) y de 1 a 2 µl de producto de PCR dependiendo de la intensidad de la banda observada en los geles de agarosa para cada set de muestras. Todas las muestras se sometieron a desnaturalización a 95°C previo a la secuenciación.

Una vez que estos productos de la amplificación fueron separados y detectados, se utilizó el software GeneMapper V.4.0 Applied Biosystems® que procesa los datos y arroja una serie de picos en un electrofenograma. La información de los picos debe ser convertida a un lenguaje común conocido como genotipo STR (Short Tandem Repeat), que se reporta como el número de unidades repetitivas presentes en el alelo (Butler, 2010). Dado que los microsatélites son marcadores moleculares codominantes, la presencia de un sólo pico indica que para ese locus el individuo es homocigoto y si se detectan dos picos el individuo para ese locus es heterocigoto.

8.4 Análisis

8.4.1 Caracteres morfométricos. Se generó una base de caracteres morfométricos descriptivos para la población de iguana negra, mediante el programa IBM SPSS Statistics V. 20. (2011). Posteriormente se llevó a cabo un análisis factorial de componentes principales en el paquete estadístico SAS V. 9.2 (2010).

8.4.2 Regiones microsatélites. Mediante el uso del software GeneMapper V.4.0 Applied Biosystems® se genotipificaron los 10 loci amplificados en las muestras de iguana negra, los datos fueron trabajados en formato Excel y luego se transformaron en el programa Convert versión 1.31 (Glaubitz, 2004) a formato Genepop versión 4.3 (Raymond & Rousset, 1995), para poder analizarlos en el software Micro Checker (Oosterhout *et al.*, 2004). Generándose una base de datos conformada de los diferentes tamaños de los alelos presentes en cada uno de los loci para cada una de las muestras.

Convert es un programa que facilita la conversión de archivos con datos genéticos de condición diploide en fomatos que pueden ser leídos directamente por varios programas computacionales usados en genética de poblaciones: GDA, Genepop, Arlequin, Popgene, Microsat, Phylip y Stucture. Produce una tabla de frecuencias alélicas en un formato conveniente y permite visualizar la comparación de las frecuencias alélicas entre poblaciones (Glaubitz JC, 2004).

El software Micro Checker permite evaluar los datos y verificar que no existan errores asociados a “sttuter” (tartamudeo: artefactos de la técnica de PCR). Detecta la presencia de alelos nulos (alelos no amplificados) en los datos, además de que es posible generar la información de las frecuencias alélicas y hace un ajuste de los alelos observados y genotipados (Oosterhout *et al.*, 2004).

Una vez realizados estos análisis, se realizó una prueba de desequilibrio de ligamiento con ayuda del programa Genepop versión 4.3 (Raymond & Rousset, 1995) que permite verificar que los loci empleados sean independientes, emplea como hipótesis que los genotipos de un locus son independientes de los genotipos de los otros loci. Una de las formas para detectar recombinación, es a través de pruebas de

desequilibrio de ligamiento, el cual nos permite identificar que tan asociados están los alelos de distintos loci en una muestra (Salas 2005 en: Gutiérrez-Guerrero, 2014).

8.4.3 Variación genética. En los análisis de variación genética se emplearon los programas Genepop versión 4.3 (Raymond & Rousset, 1995) y Arlequin v 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) para obtener las frecuencias alélicas por loci, así como los índices de diversidad estándar para la población de iguana negra en condiciones de cautiverio.

8.4.4 Heterocigosis y equilibrio H-W. Mediante el uso de los software Genepop versión 4.3 (Raymond & Rousset, 1995) y Arlequin v 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) se calcularon los estadísticos de Homocigosis y Heterocigosis esperados bajo el equilibrio H-W, empleando la corrección de Levene. El coeficiente de endogamia (Fis) se calculó de acuerdo con Weir & Cockerham (1984) y Robertson & Hill (1984) para identificar si alguno de los loci evaluados presentan desviaciones al equilibrio H-W.

Se empleó el programa Bottleneck V 1. 2. 02 (Cournuet & Luikart, 1996). Este programa ayuda a detectar reducciones recientes del tamaño efectivo de la población a través de la reducción del número de alelos (riqueza alélica) y el exceso de heterócigos. Asumiendo equilibrio mutación-deriva bajo el Modelo de Mutación Stepwise (SMM: Ohta & Kimura, 1978) que es adecuado para microsatélites. Una vez que todos los loci de la muestra poblacional fueron procesados, se realizan tres pruebas independientes para este modelo mutacional y la distribución de las frecuencias alélicas se estableció de acuerdo a una distibución de tipo L esperada bajo equilibrio mutación-deriva; o no, cuando hay cuellos de botella recientes que provocan una desviación del modelo.

8.4.5 Análisis de parentesco. Los métodos de análisis de parentesco pueden dividirse en dos categorías: *Relatedness (r)*, que se traduce como parentesco y se basa en la estimación y asignación de pares o grupos de individuos a diferentes categorías o

relaciones de parentesco; y, *Relationship* que son relaciones genealógicas específicas y generan siempre árboles o pedigrees (Blouin, 2003). En el presente trabajo empleamos el método de *r*, mediante el programa ML-Relate (Kalinowski *et al*., 2006), el cual se basa en el algoritmo de Milligan (2003) de Máxima Verosimilitud y estima las relaciones genealógicas y entre individuos (parentesco) de ancestría desconocida. Empleando la prueba de parentesco de verosimilitud (ML-Relate), con los valores de parentesco (r), se realizaron asignaciones de parentesco en 4 categorías: 1) relación Padre-Hijo (PO) con valores de r> 0.55, 2) relación de Hermanos (FS) con valores de 0.55 >r>0.4, 3) relación Medios Hermanos (HS) con valores de 0.35 >r> 0.20, y 4) la categoría U, con valores de r< 0.125 que establece la ausencia de parentesco entre los individuos.

8.4.6 Estructura genética. La estructura genética de la población de iguana negra cautiva y la asignación de los individuos a una o más poblaciones debido a la posible presencia de distintas poblaciones genéticas dentro de la misma, es decir, una subestructuración en la población se estableció mediante el uso del software Structure versión 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2010). Este programa implementa un método basado en el agrupamiento en *clusters* para inferir la estructura de la población usando genotipos que consisten en marcadores no ligados. Sus aplicaciones incluyen la comprobación de la presencia de estructura genética poblacional, la identificación de distintas poblaciones genéticas, la asignación de los individuos a poblaciones y la identificación de migrantes e individuos mezclados. Structure utiliza la distribución de la probabilidad posterior a través de Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) asumiendo un modelo en el que existen K poblaciones (donde se desconoce el valor de K), cada uno de las cuales se caracteriza por un conjunto de frecuencias alélicas por locus. Los individuos

en la muestra se asignan a las poblaciones en dependencia de sus genotipos, bajo el supuesto que dentro de las poblaciones los loci analizados se encuentran en equilibrio H-W y equilibrio de ligamiento.

Para conocer la estructura de la población de iguana negra en cautiverio del CECOREI se emplearon 53 individuos. Estos datos se compararon con información de iguana negra en el medio silvestre (293 individuos) y datos de iguanas de la especie *Ctenosaura acanthura* como grupo externo (18 individuos) ambos proporcionados por E. Zarza (Moore Laboratory of Zoology Occidental College, 2014) considerando 6 loci (Pec01, Pec03, Pec16, Pec20, Pec73, Pec89,). Se realizaron tres análisis independientes de la siguiente manera:

1) Entre las tres poblaciones (364 individuos, 6 loci).
2) Entre la población en cautiverio y la población silvestre de iguana negra (346 individuos, 6 loci).
3) Entre la población en cautiverio de iguana negra y la población de *C. acanthura* (71 individuos, 6 loci).

El modelo que se empleó en los análisis fue el de *no admixture* el cual supone que no hay frecuencias alélicas correlacionadas entre las poblaciones, lo cual se ajusta al presente caso de estudio ya que la población en cautiverio se encuentra en ausencia de flujo génico. Se empleó un periodo de *burn-in* = 100,000 cadenas y 500,000 MCMC y 10 repeticiones para cada *K* (número de poblaciones) de 1 a 5. Una vez realizados los análisis en Structure, los resultados se examinaron con el programa en línea Structure Harvester (Earl & vonHoldt, 2012) que implementa el método de Evano para la elección del valor de *K*.

IX. RESULTADOS

9.1 Caracterización morfométrica

9.1.1 Caracteres morfométricos selectos. Se registró un total de 35 caracteres en la identificación fenotípica de *Ctenosaura pectinata*. Mediante los cuales se generó un archivo visual de cada una de las iguanas (Apéndice 1) y una base de datos con la estadística descriptiva, en los caracteres cuantitativos discretos se describe la moda en lugar de la media (Cuadro 5).

Cuadro 5. Estadística descriptiva de 35 caracteres morfométricos selectos en 50 individuos de iguana negra, de una población mantenida en cautiverio.

	Min	Max	Med/Moda	D.E.
Longitud hocico-cloaca (cm).	21.50	38.50	27.68	4.32
Longitud de la cola (cm).	15.50	59.50	39.19	11.65
Longitud de la pierna (cm).	4.26	7.03	5.26	0.73
Longitud de la cabeza (cm).	5.12	10.75	6.79	1.54
Ancho de la cabeza (cm).	3.04	6.01	4.01	0.85
Longitud del hocico (cm).	2.49	5.26	3.28	0.75
Número mínimo de escamas entre los semicírculos supraorbitales.	2	10	5	1.61
Número mínimo de escamas entre semicírculos supraorbitales e interparietales.	1	3	1	0.52
Número mínimo de escamas entre suboculares y supralabiales.	1	4	2	0.62
Número de supralabiales.	9	21	12	1.73

Número de escamas entre las dos cantales.	3	13	7	1.61
Número de escamas entre la cantal y la escama subocular agrandada central.	2	5	2	0.84
Número de escamas entre las nasales.	4	10	7	1.24
Número de escamas entre la nasal y rostral.	1	3	2	0.51
Número de escamas infralabiales.	11	20	13	1.47
Número de escamas postmentales.	2	7	3	0.93
Número de espinas agrandadas de la cresta dorsal media.	12	76	56	12.85
Número de filas de escamas entre las nucales y la primera espina de la cresta dorsal media.	0	40	0	7.92
Número de filas de escamas entre la última espina de la cresta dorsal y el primer verticilio de escamas caudales espinosas agrandadas.	13	35	25	4.66
Número de intercalares con filas incompletas de escamas caudales.	3	11	8	1.74
Número de intercalares con dos filas completas de escamas caudales.	5	22	15	4.22
Número de intercalares con tres filas completas de escamas caudales.	0	7	4	1.75

Ángulo menor de las quillas de las escamas caudales: 1) < 20° 2) entre 20 y 30 3) >30°.	1	3	1	0.58
Forma en la que se arreglan hacia afuera las escamas caudales espinosas: 1) recto 2) oblicuo.	1	2	2	0.50
Condición de la espinosidad de las escamas caudales paramedias.	2	3	2	0.27
Condición de las escamas paramedias del séptimo verticilio caudal: 1) planas 2) abultadas.	1	2	1	0.43
Número de verticilios caudales con escamas paramedias espinosas.	8	27	16	4.57
Número de verticilios caudales totales.	8	27	16	4.40
Número de lamelas subdigitales en el dedo cuatro.	30	44	40	2.52
Número de escamas dorsales paramedias en una cabeza de longitud.	34	114	57	17.55
Número de escamas midventrales en una cabeza de longitud.	24	61	42	7.86
Número de escamas alrededor de la mitad del cuerpo.	89	120	100	6.45
Númer de poros femorales muslo izquierdo.	4	10	5	1.17
Número de poros femorales muslo derecho.	4	9	5	1.16

Marcas/Áreas-pálidas/blancas: 1) a lo largo del dorso, 2) restringidas a la porción anterior, 3) restringidas a la porción posterior, 4) ausentes.	1	4	1	0.69
N = 50				

Rango del caracter (R), valor mínimo (Min) valor máximo (Max), media y moda (Med/Moda), desviación estándar (D.E.) de cada caracter.

9.1.1 Análisis Factorial de Componentes Principales. Se obtuvieron dos gráficas a partir del análisis de componentes principales. La primera (Figura 4) muestra los 11 caracteres morfométricos que determinan el 51% de la variabilidad fenotípica de la población de iguana negra mantenida en cautiverio en el CECOREI-UMAR.

Las variables indicadas en la Figura 4 se describen a continuación, en el paréntesis se indica el número que corresponde a cada carácter morfométrico. AA: Número de verticilios caudales con escamas paramedias espinosas (caracter número 29). BB: Número de verticilios caudales totales (caracter 30). DD: Número de escamas dorsales paramedias en una cabeza de longitud (caracter 32). EE: Número de escamas midventrales en una cabeza de longitud (caracter 33). I: Número mínimo de escamas entre suboculares y supralabiales (caracter 10). J: Número de escamas supralabiales, incluyendo la escama oblicua (caracter 11). Q: Número de espinas agrandadas de la

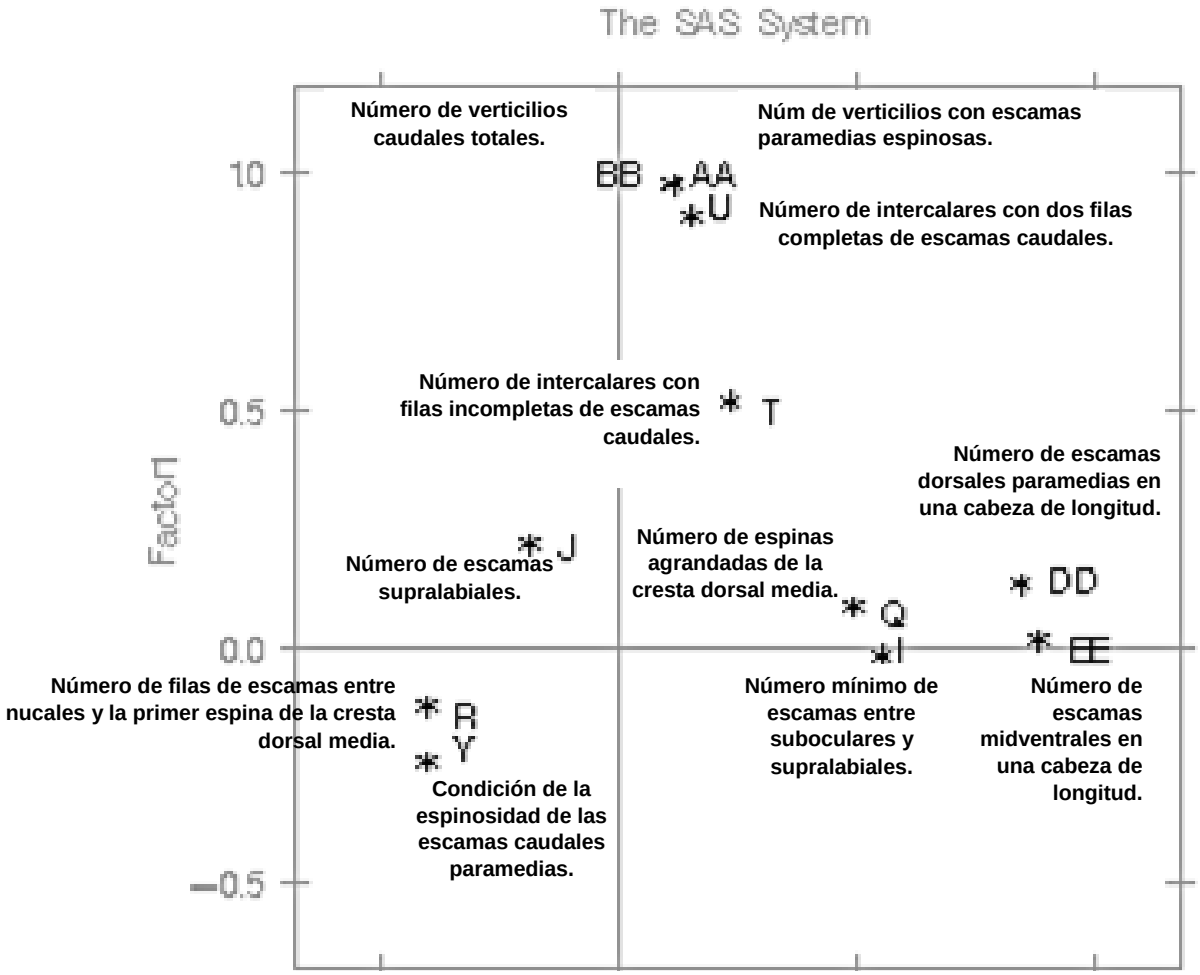


Figura 4. Variables más explicativas en función de dos factores según el análisis multivariado, que corresponden a 11 caracteres morfométricos.

cresta dorsal media (caracter 18). R: Número de filas de escamas entre las nucales y la primera espina de la cresta dorsal media (caracter 19). T: Número de intercalares con filas incompletas de escamas caudales (caracter 21). U: Número de intercalares con dos filas completas de escamas caudales (caracter 23). Y: Condición de la espinosidad de las escamas caudales paramedias (caracter 27).

La segunda figura obtenida del análisis (Figura 5) se empleó para observar la pertenencia de los individuos de acuerdo a los 11 caracteres morfométricos ya descritos en la Figura 4.

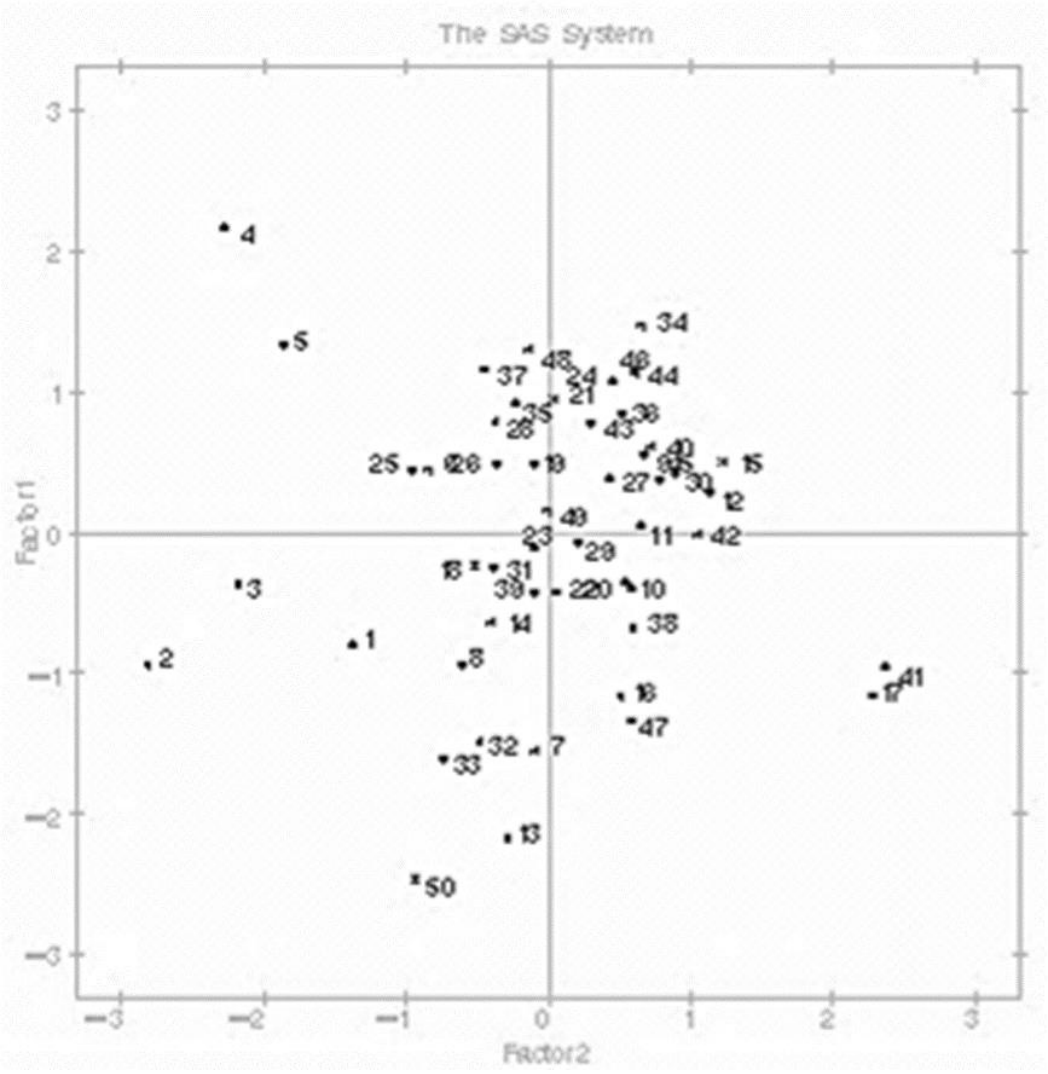


Figura 5. Número de observaciones que corresponden a cada uno de los individuos de iguana negra.

De acuerdo a la conjunción realizada con ambas figuras (4 y 5), las iguanas atípicas, corresponden a machos y hembras con edades de 11 a 13 años.

El número de escamas supralabiales, incluyendo la escama oblicua típico de las iguanas machos fue de 13 y 14 escamas, en un amplio rango de edades.

El número de filas de escamas entre las nucales y la primera espina de la cresta dorsal media corresponde con hembras porque en su mayoría el conteo fue deficiente o nulo, posiblemente a causa de que en etapa reproductiva los machos las sujetan de esa área, provocando la pérdida de escamas.

La condición de la espinosidad de las escamas caudales paramedias, en términos generales en las hembras y machos, se caracterizan porque las escamas paramedias internas son más espinosas que las exteriores.

En relación con el número de verticilios caudales totales en ambos sexos, el más característico es de 23 a 24, en ejemplares con edades de dos a cuatro años.

En los machos de *Ctenosaura pectinata* el número de verticilios caudales con escamas paramedias espinosas es más importante y constante que en las hembras.

La cantidad característica de escamas intercalares con dos filas completas de escamas caudales es de seis a nueve en los machos de dos a cuatro años de edad.

El rango de seis a nueve escamas intercalares con filas incompletas de escamas caudales es característico en ambos sexos de dos a seis años de edad.

El número mínimo de escamas entre las suboculares y supralabiales en ambos sexos es de dos a tres.

El número de escamas dorsales paramedias en una cabeza de longitud es variable, no obstante, el valor más característico presenta un rango de 70 a 90 escamas en ambos sexos.

Otra característica importante fue el número de escamas midventrales en una cabeza de longitud con 50 escamas en los machos.

Los números 17 y 41, corresponden a individuos machos de las generaciones 1997 y 1999 respectivamente, con el mayor número de escamas midventrales en una cabeza de longitud, lo que sugiere que a mayor edad existe una mayor longitud de la cabeza y como consecuencia un mayor número de escamas son contabilizadas en función de dicha longitud.

Las iguanas 1, 2 (ambas de la generación 1997) y 3 (generación 2005) son individuos hembras con el mayor número de escamas nucales. Se diferencian del resto por que no presentaban lesiones en la nuca, siendo mayor el número de escamas que se pudieron contabilizar. Las lesiones en la nuca se deben al comportamiento propio de la especie en etapa reproductiva cuando los machos pelean por las hembras o bien sujetan a las hembras para aparearse. Esta característica en animales mantenidos en cautiverio puede representar un sesgo por lo que se recomienda no incluirse como carácter informativo.

9.2 Caracterización genotípica

9.2.1 Amplificación de regiones microsatélites.

Visualización de la amplificación de las regiones microsatélites Pec 01, Pec 16, Pec 03 y Pec 24 en geles de agarosa al 1.5%. En la Figura 6 se observa la amplificación de la región microsatélite Pec 01, en los carriles 2-10 se observan dos bandas que corresponden a los alelos en condición de heterocigosis y en los carriles 11-19 se observa solamente una banda que indica la presencia de los alelos en condición de homocigosis.

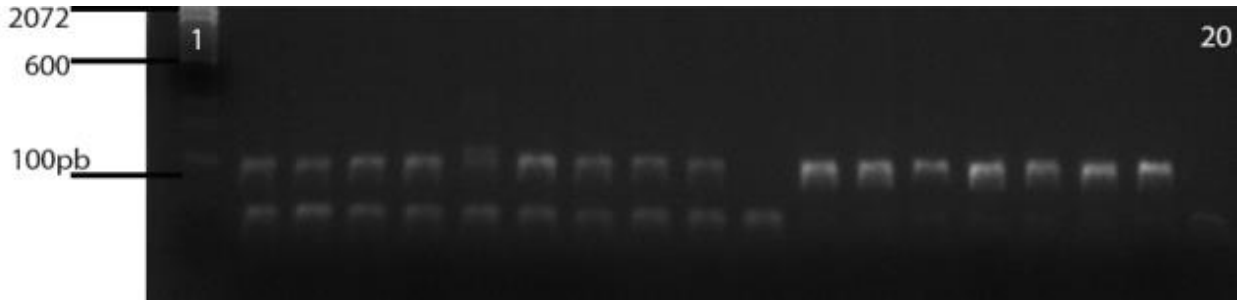


Figura 6. Microsatélite Pec 01. Rango de amplificación: 93-101 bp. Muestras 38-54, carriles 2-19. Marcador de peso molecular 100 bp (carril 1).

En los carriles 3 y 4 de la Figura 7, la región microsatélite Pec 16 no fue amplificada. Las bandas correspondientes a los carriles 2-20 muestran alelos de condición homocigota. Se observa la amplificación inespecífica de una banda de 600bp en el carril 14 que no corresponde al locus Pec 16.

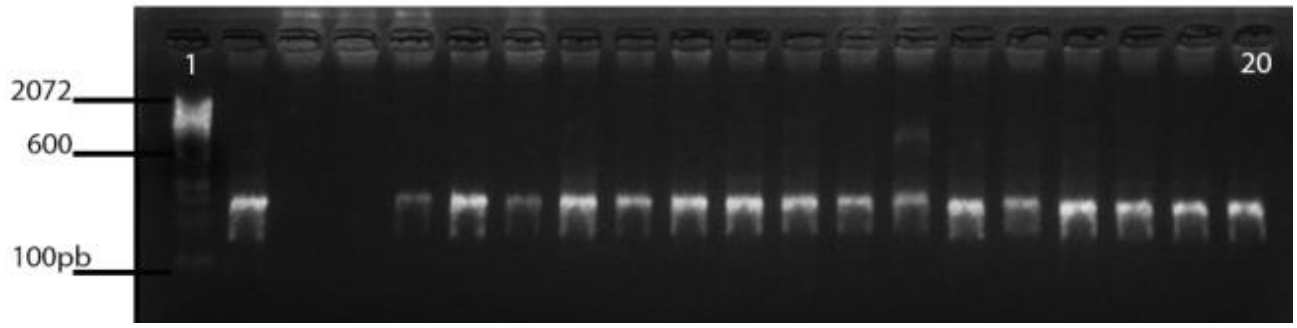


Figura 7. Microsatélite Pec 16, rango de amplificación: 214-239 bp. Muestras 1-19 en carriles 2-20. Marcador de peso molecular 100 pb (carril 1).

En la Figura 8 todas las muestras amplificadas muestran condición alélica homocigota para el locus Pec 16 y de igual manera existe una banda inespecífica en el carril 9 que no corresponde al locus sondeado.

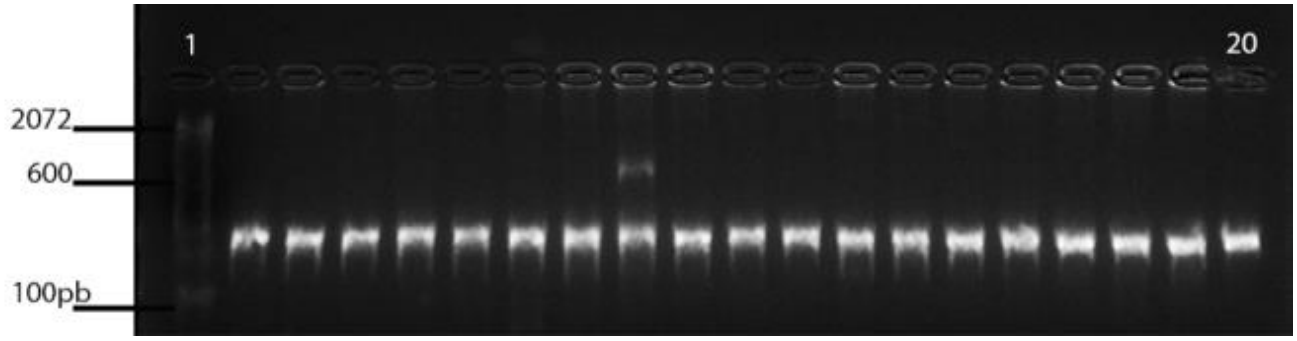


Figura 8. Microsatélite Pec 16 (muestras 1-38), rango de amplificación: 214-239bp. Muestras 20-38 en carriles 2-20. Marcador de peso molecular 100 pb (carril 1).

En la Figura 9 se muestra la amplificación de la región microsatélite Pec 16 en los carriles 2-15 de condición homocigota, en los carriles 16 y 17 se observa un bandeo de condición heterocigota y las muestras de los carriles 18 y 19 no amplificaron.

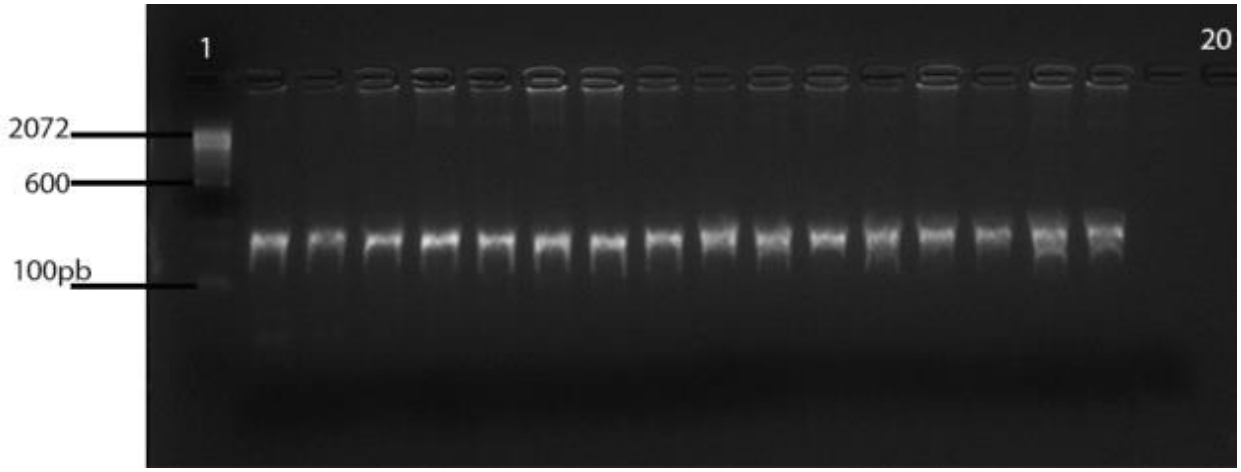


Figura 9. Microsatélite Pec 16, rango de amplificación: 214-239 bp. Muestras 39-54 en carriles 2-19. Marcador de peso molecular 100 bp (carril 1).

La Figura 10 muestra la amplificación de la región microsatélite Pec 03, la muestra del carril 3 no amplificó y el bandeo observado no permite discernir entre condición homocigota y heterocigota, debido a que el rango de amplificación es muy estrecho.

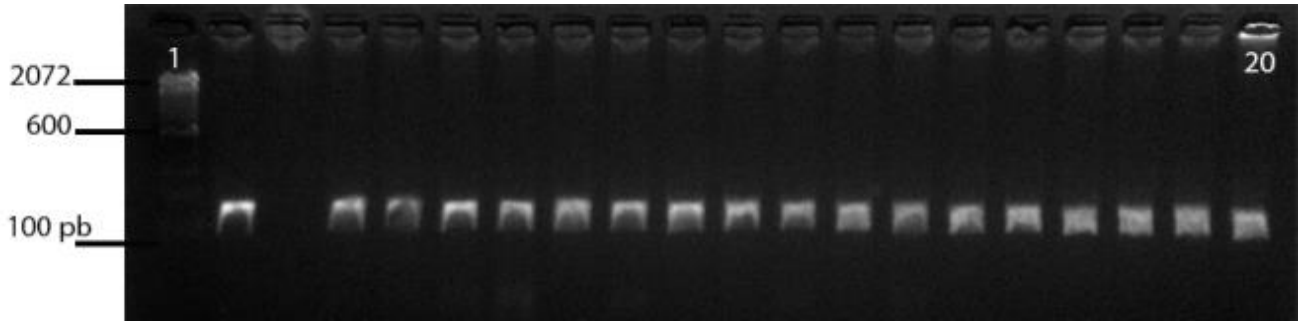


Figura 10. Microsatélite Pec 03, rango de amplificación: 219-221bp. Muestras 1-19 en carriles 2-20. Marcador de peso molecular 100 pb (carril 1).

La Figura 11 contiene la amplificación del microsatélite Pec 03, las muestras de los carriles 2-4 y 13-18 sugieren la presencia de alelos en condición heterocigota. El resto de las muestras son de condición homocigota.

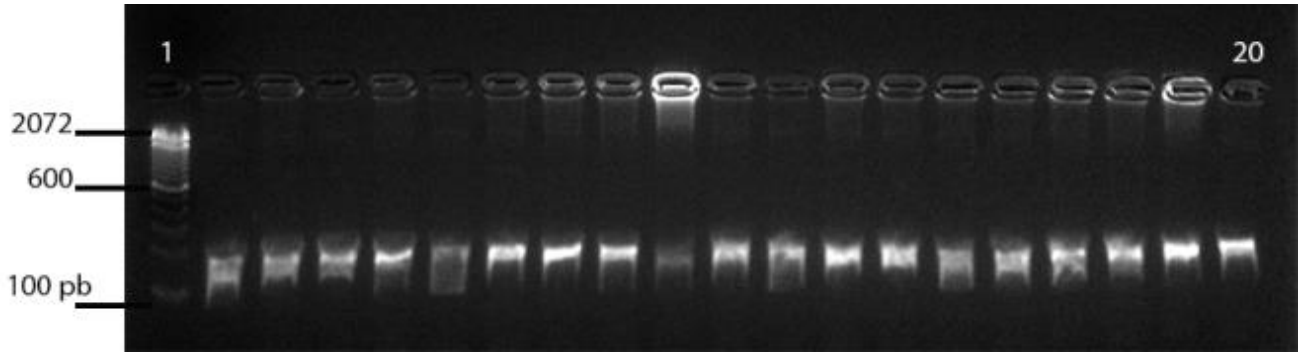


Figura 11. Microsatélite Pec 03, rango de amplificación: 219-221bp. Muestras 21-38 en carriles 2-20. Marcador de peso molecular 100 pb (carril 1).

En la Figura 12 se observa la amplificación de la región Pec 24, con ausencia de amplificación en los carriles 5, 7, 9 y 16.

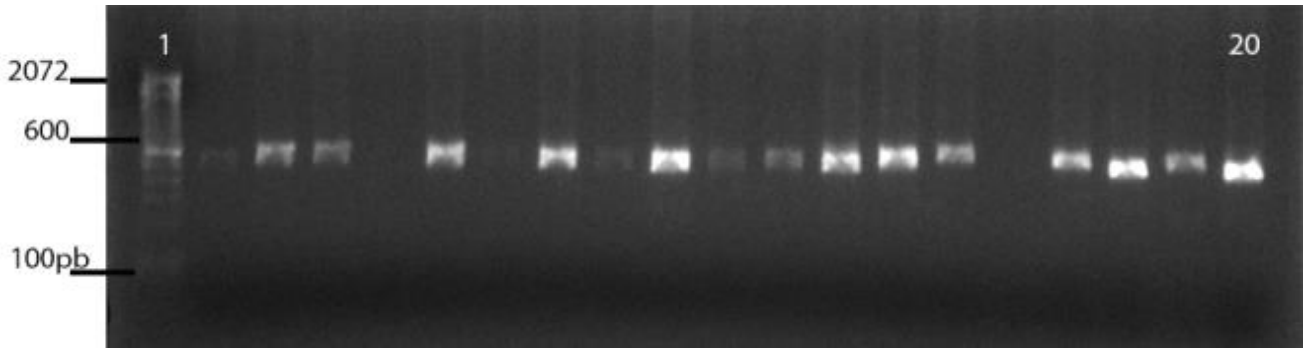


Figura 12. Microsatélite Pec 24, rango de amplificación: 390-438bp. Muestras 1-19 en carriles 2-20. Marcador de peso molecular 100 pb (carril 1).

La Figura 13 muestra claramente la condición alélica de heterocigosis del microsatélite Pec 24 en el carril 11. La muestra del carril 13 no amplificó.

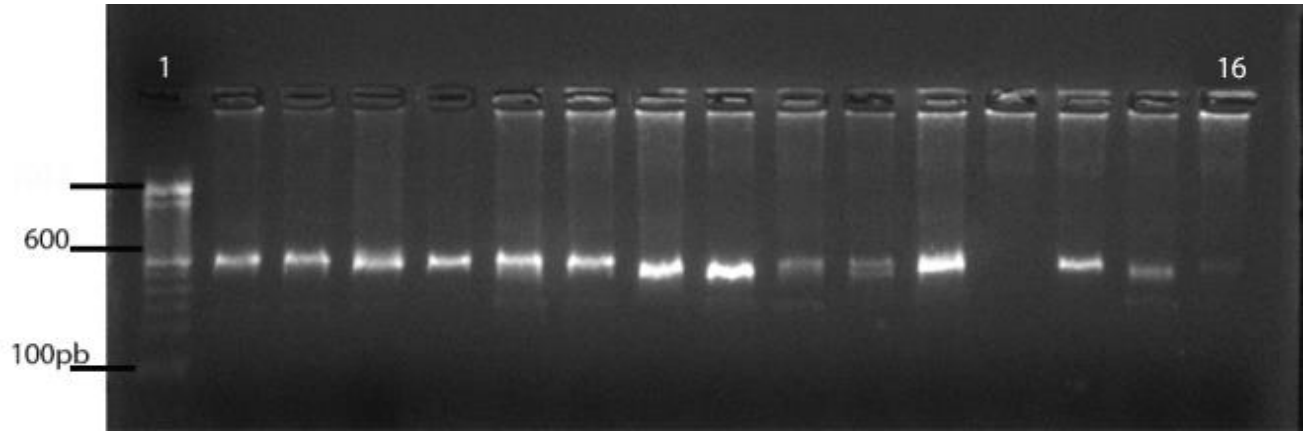


Figura 13. Microsatélite Pec 24, rango de amplificación: 390-438bp. Muestras 20-35 en carriles 2-16. Marcador de peso molecular 100 pb (carril 1).

9.3 Variación genética

9.3.1 Proporción de loci polimórficos. Todos los loci de las regiones microsatélites amplificadas mostraron ser polimórficos en la población de iguana negra mantenida en cautiverio, teniendo una proporción del 100% de polimorfismo, con más de dos alelos por locus muestreado. El locus menos polimórfico resultó ser Pec 73 y los dos más polimórficos fueron Pec 24 y Pec 25 (Cuadro 6).

9.3.2 Riqueza alélica. Dentro de la población de iguana negra se observaron de 4 a 19 alelos por locus, con un promedio de 12 alelos por locus (Cuadro 6).

Cuadro 6. Locus amplificado, número total de alelos por locus y número de individuos en los que amplificó cada locus en la población de iguana negra cautiva (Software Genepop).

Locus	No. Alelos	Individuos
Pec 01	14	44
Pec 03	9	31
Pec 16	11	49
Pec 20	8	30
Pec 21	11	42
Pec 24	19	43
Pec 25	19	44
Pec 73	4	50
Pec 89	15	41
Pec TN1	9	43
Promedio	12	42

Los resultados de las frecuencias alélicas de los diez locus muestreados en la población de iguana negra, se observan en el Cuadro 7. El locus Pec 01 muestra 4 alelos con las mayores frecuencias, el alelo 110 (0.27), el alelo 93 (0.17), el alelo 99 (0.14) y el alelo 88 (0.10). El locus Pec 03 tiene el alelo 220 con la mayor frecuencia

(0.33), el alelo que le sigue es el 216 (0.25) y el 212 (0.22). Las mayores frecuencias alélicas del locus Pec 16 fueron para los alelos 214 (0.42), 212 (0.17) y 218 (0.16). En el locus Pec 20 se obtuvo la mayor frecuencia alélica en el alelo 222 (0.65), seguida del alelo 220 (0.13). El locus Pec 21 tiene 3 alelos de mayor frecuencia, el alelo 293 (0.32) seguido del alelo 279 (0.23) y 297 (0.20). En el locus Pec 24 los alelos con mayores frecuencias fueron el 394 (0.17) y el 410 (0.10). Para el locus Pec 25 se observan el alelo 188 (0.15) y el alelo 201 (0.10) como los más frecuentes. De los cuatro alelos encontrados en el locus Pec 73 los de mayor frecuencia son el 190 (0.48) y el 191 (0.39). En el locus Pec 89 se tiene el alelo 237 como el más frecuente (0.28), seguido del alelo 239 (0.13) y 242 (0.12). Las mayores frecuencias alélicas del locus PecTN1 se muestran en los alelos 194 (0.34), 204 (0.23) y 196 (0.11).

Cuadro 7. Frecuencias alélicas por locus en la población de iguana negra cautiva (Sotware Genepop).

Alelos	Frecuencia Alélica	Alelos	Frecuencia Alélica	Alelos	Frecuencia Alélica	Alelos	Frecuencia Alélica	Alelos	Frecuencia Alélica
Locus: **Pec01**		Locus: **Pec03**		Locus: **Pec16**		Locus: **Pec20**		Locus: **Pec21**	
88	0.102	198	0.016	196	0.02	206	0.017	268	0.024
93	0.17	202	0.016	200	0.02	208	0.017	273	0.024
95	0.034	205	0.032	206	0.02	212	0.017	279	0.238
96	0.011	208	0.032	212	0.173	214	0.083	281	0.036
97	0.011	212	0.226	214	0.429	220	0.133	282	0.036
98	0.011	214	0.016	218	0.163	222	0.65	293	0.321
99	0.148	216	0.258	220	0.092	226	0.033	297	0.202
101	0.045	218	0.065	222	0.041	228	0.05	299	0.048
102	0.023	220	0.339	226	0.01			301	0.024
104	0.011			239	0.01			303	0.024
106	0.08			248	0.02			309	0.024
110	0.273								
112	0.023								
116	0.057								
Locus: **Pec24**		Locus: **Pec25**		Locus: **Pec73**		Locus: **Pec89**		Locus: **PecTN1**	
374	0.035	171	0.045	184	0.03	237	0.28	183	0.023
394	0.174	173	0.045	188	0.1	239	0.134	194	0.349
400	0.035	178	0.091	190	0.48	241	0.061	196	0.116
402	0.081	180	0.034	191	0.39	242	0.122	200	0.093
405	0.012	182	0.023			244	0.061	201	0.023
410	0.105	184	0.034			246	0.073	202	0.128
411	0.07	186	0.091			247	0.037	204	0.233
415	0.07	188	0.159			248	0.024	208	0.012
420	0.023	190	0.023			250	0.049	210	0.023
423	0.058	192	0.011			252	0.037		
428	0.07	194	0.057			254	0.037		
432	0.012	195	0.091			256	0.024		
436	0.012	197	0.045			257	0.012		
438	0.023	199	0.011			258	0.037		
440	0.023	201	0.102			261	0.012		
448	0.07	203	0.045						
450	0.035	205	0.011						
455	0.081	207	0.057						
457	0.012	208	0.023						

La variación genética obtenida para la población de iguana negra cautiva se muestra en el Cuadro 8. El mayor número de copias génicas se presentó en el locus Pec 73 (100) y el menor número de copias génicas se obtuvo en el locus Pec 20 (60). Se observa que la heterocigosis observada es menor que la heterocigosis esperada en cada uno de los diez loci analizados y en conjunto. El rango alélico promedio se sitúa en 17 alelos por locus.

Cuadro 8. Índices de diversidad estándar en la población de iguana negra cautiva.

Locus	NCG	NA	HO	HE	RA	G-W*
Pec01	88	12	0.65	0.85	14	0.8
Pec25	88	18	0.72	0.92	18	0.94
Pec89	82	12	0.53	0.85	12	0.92
PecTN1	86	8	0.09	0.78	13	0.57
Pec16	98	11	0.71	0.75	26	0.4
Pec24	86	18	0.32	0.91	41	0.42
Pec21	84	11	0.5	0.8	20	0.52
Pec20	60	8	0.3	0.55	11	0.66
Pec03	62	9	0.38	0.77	11	0.75
Pec73	100	3	0.26	0.23	3	0.75
Media	83.4	11	0.45	0.74	16.9	0.67
D.E.	13.13	4.54	0.21	0.2	10.46	0.19

Número de copias génicas (NCG), Número de alelos (NA), Heterocigosis observada (HO), Heterocigosis esperada (HE), Rango alélico (RA), Índice G-W (G-W) *Garza J.C., & Williamson E.G., 2001. Software Arlequin.

Los análisis tanto con el software Micro Checker así como con el software Genepop, detectaron presencia de alelos nulos para 9 de los 10 loci empleados. Las

frecuencias estimadas con Genepop van de 0.13 (Pec 25) hasta 0.48 (Pec 03). El locus Pec 16 no mostró evidencia de alelos nulos (Cuadro 9).

Cuadro 9. Estimación de las frecuencias de alelos nulos por locus, empleando el software Genepop.

Locus	Frecuencia
Pec 01	0.18
Pec 03	0.48
Pec 16	0.06
Pec 20	0.22
Pec 21	0.18
Pec 24	0.32
Pec 25	0.13
Pec 73	0.36
Pec 89	0.18
Pec TN1	0.40

En ninguno de los loci se detectaron errores en la genotipificación asociados a “stutter”, no se detectó evidencia de “dropout alélico” (cuando por azar un alelo de un genotipo heterocigoto no puede ser amplificado por la PCR) (Johnson & Haydon, 2007) y se indicó el exceso de genotipos homocigotos en la mayoría de los loci, no así en el locus Pec 16 de acuerdo a Micro Checker (datos no mostrados).

El software Arlequin encontró evidencias de desequilibrio de ligamiento ($p<0.05$) entre 4 de los posibles pares de loci: par 1 y 3 (locus Pec 01 y Pec 89), par 2 y 3 (locus Pec 25 y Pec 89), par 3 y 8 (locus Pec 89 y Pec 20) y par 7 y 8 (locus Pec 21 y Pec 20) ($p<0.001$) (datos no mostrados).

9.4 Heterocigosis

Mediante el uso de los software Genepop y Arlequin, encontramos que la heterocigosis esperada fue mayor que la heterocigosis observada; esto es, existe déficit de genotipos heterocigotos (o exceso de genotipos homocigotos). De los 10 loci analizados, 9 mostraron desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg ($p<0.05$), lo que se traduce como presencia de endogamia. En el Cuadro 10 se muestran los valores de heterocigosis observada, heterocigosis esperada, los coeficientes de endogamia y la significancia estadística para cada uno de los locus evaluados, así como los coeficientes de endogamia promedio del total de los loci (Software Genepop: 0.37; Software Arlequin: 0.45).Se realizó una prueba de t-student que mostró, que las diferencias evaluadas son estadísticamente significativas al comparar los resultados del software Genepop, de heterocigosis esperada (33.07) respecto la heterocigosis observada (21.1) ($t=2.83$) ($p<0.05$).

Cuadro 10. Prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg de los 10 loci evaluados en la población de iguana negra en cautiverio con dos software.

Locus	**#Genot**	**S. Genepop**			**Arlequin**			
		HE. O.	**HE. E.**	**Fis (W & C)**	**HE. O.**	**HE. E.**	**Fis**	**Sign. E. (p)**
Pec01	44	29	37.82	0.23*	0.65	0.85	-0.24	0
Pec03	31	12	23.96	0.50*	0.38	0.77	0.85	0
Pec16	49	35	37.01	0.05*	0.71	0.75	-0.24	0
Pec20	30	9	16.72	0.46*	0.3	0.55	0.6	0
Pec21	42	21	33.63	0.37*	0.5	0.8	0.59	0
Pec24	43	14	39.88	0.65*	0.32	0.91	0.48	0

Pec25	44	32	40.96	0.22*	0.72	0.92	0.73	0
Pec73	50	33	30.63	-0.07	0.26	0.23	-0.09***	1.00(n.s.)
Pec89	41	22	35.96	0.39*	0.53	0.85	0.62	0
PecTN1	43	4	34.1	0.88*	0.09	0.78	0.95	0

Software Genepop: Coeficiente de endogamia (Fis) para cada locus, Heterocigosis Observada (HE. O.), Heterocigosis Esperada (HE. E.). * locus que mostraron desviación del equilibrio H-W, ** diferencias estadísticamente significativas entre los valores esperados vs los valores observados. Software Arlequin: Coeficientes de endogamia por locus (Fis), significancia estadística y coeficiente de endogamia promedio (Fis:0.4569) mediante el índice Guo, S. & Thompson, E. 1992; Levene H. (1949), *** no significativo para el locus Pec73.

El análisis con Genepop no mostró presencia de alelos privados en la población (datos no mostrados).

Al analizar los datos en el sotware Bottleneck v. 1.2.02 (Cournuet & Luikart, 1996), se obtuvo un total de 8 loci con deficiencia de heterócigos y 2 loci con exceso de heterócigos (Sign Test $p < 0.05$). Todos los loci se adecuaron al modelo mutacional Stepwise Mutation Model (SMM), con un número de loci esperados con exceso de heterócigos de 5.86 y de acuerdo a la prueba de Wilcoxon no hay evidencia de una reciente reducción del tamaño efectivo de la población; es decir, esta población no ha atravezado por un evento de cuello de botella (Test de Wilcoxon ($_{SMM}$) $p < 0.05$) (datos no mostrados).

Comparación de la endogamia entre la población cautiva y la población silvestre

Los resultados muestran que ambas poblaciones poseen indíces de endogamia estadísticamente significativos en la mayoría de los loci, estimados mediante el índice Weir & Cockerham empleado por el Software Genepop (Fis W&C) ($p<0.05$). Sin embargo los índices de endogamia son de mayor grado para la población mantenida en cautiverio, en los loci Pec 01, Pec 03, Pec 20 y Pec 89 (Cuadro 11).

Fue de gran importancia estimar la cantidad de diferenciación dentro y entre las poblaciones y de acuerdo a lo establecido por Wright. Se obtuvieron tres coeficientes F, empleados para asignar la variabilidad genética al total de la población (T), subpoblaciones (S) e individuos (I) (Hedrick, 2010). Tanto F_{IS} como F_{IT} son positivos debido a la ocurrencia de déficit de genotipos heterocigotos en ambas poblaciones. Y aunque existen diferencias significativas entre los coeficientes de endogamia de las dos poblaciones, las hay únicamente de un lado de la curva (una cola). F_{ST} es una medida de diferenciación genética entre las subpoblaciones con un valor diferente de cero (F_{ST} = 0.20), lo que indica que hay diferencias entre las frecuencias alélicas y existe diferenciación genética entre las poblaciones (Cuadro 11).

Cuadro 11. Coeficientes de engodamia total o desviación del equilibrio de H-W.

Locus	**Fis (W & C)**		**Ambas poblaciones**		
	***C. pectinata* población en cautiverio**	***C. pectinata* población silvestre**	**F_{is}**	**F_{IT}**	**F_{ST}**
Pec 01	0.23	0.08	0.10	0.18	0.08
Pec 03	0.50	0.10	0.16	0.55	0.46
Pec 16	0.05	0.18	0.16	0.23	0.08
Pec 20	0.46	0.34	0.35	0.47	0.18
Pec 73	-0.07*	0.31	0.25	0.52	0.36
Pec 89	0.39	0.21	0.23	0.32	0.12
Todos los loci			0.20	0.37	0.20

Coeficientes de endogamia (Fis W & C) para cada una de las poblaciones (población cautiva y población silvestre) de iguana negra. Endogamia entre las subpoblaciones (F_{IS}), endogamia en el total de la población (F_{IT}) y diferenciación genética entre las poblaciones (F_{ST}), obtenidos mediante el software Genepop. Locus Pec 16 estadísticamente no significativo* (p>0.5).

9.5 Parentesco

Los resultados obtenidos para establecer las de relaciones de parentesco entre 53 individuos de la población de iguana negra en cautiverio, muestran un total de 40 relaciones en la categoría de padre-hijo, 27 relaciones de hermanos y 71 asignaciones en relación de medios-hermanos. La asignación de estas categorías se logró mediante dos matrices de correlación, mostradas en el Apéndice 2, entre los 53 individuos genotipificados. En las matrices se observa la relación genética (que corresponde a la categoría) entre cada individuo pareado y su coeficiente r asociado a cada una de estas relaciones.

Se realizaron tres esquemas que ejemplifican las relaciones de parentesco. Mediante flechas rojas, se indica la relación padre-hijo, con flechas verdes se encuentra la relación de hermanos y las flechas azules establecen la relación medios-hermanos. Cada círculo representa un individuo, donde se indica el sexo de la iguana, el número de individuo (indicado dentro del paréntesis) y la generación a la que corresponde. En la Figura 14 se representa una iguana macho, individuo marcado con el número 7, del año 1997. Este individuo posee tres relaciones de parentesco padre-hijo (dos machos y una hembra), una relación de hermanos y dos relaciones de medios-hermanos.

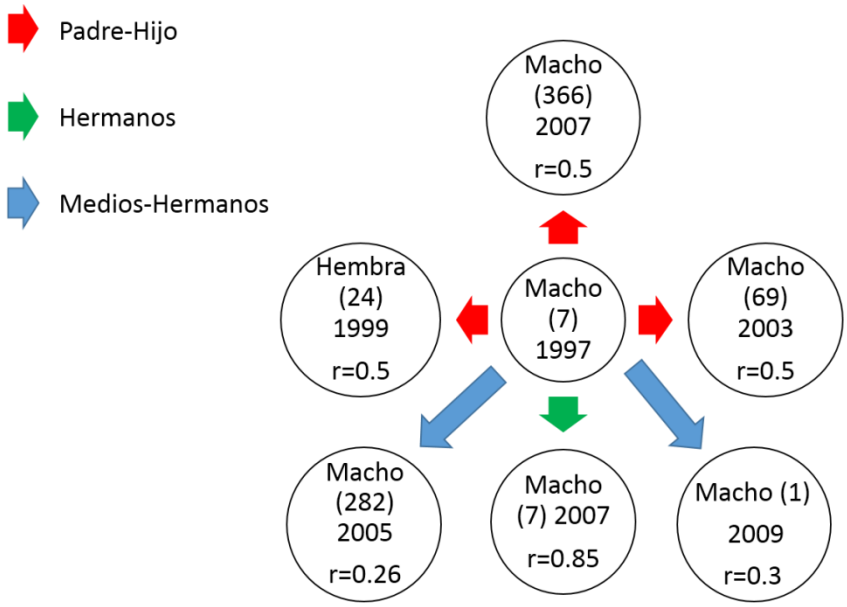


Figura 14. Esquema de la relación de parentesco, ejemplo 1.

La Figura 15 muestra otro individuo macho (5, generación 1997) tiene cuatro relaciones dentro de la categoría padre-hijo, una de hermanos y cinco relaciones de medios-hermanos.

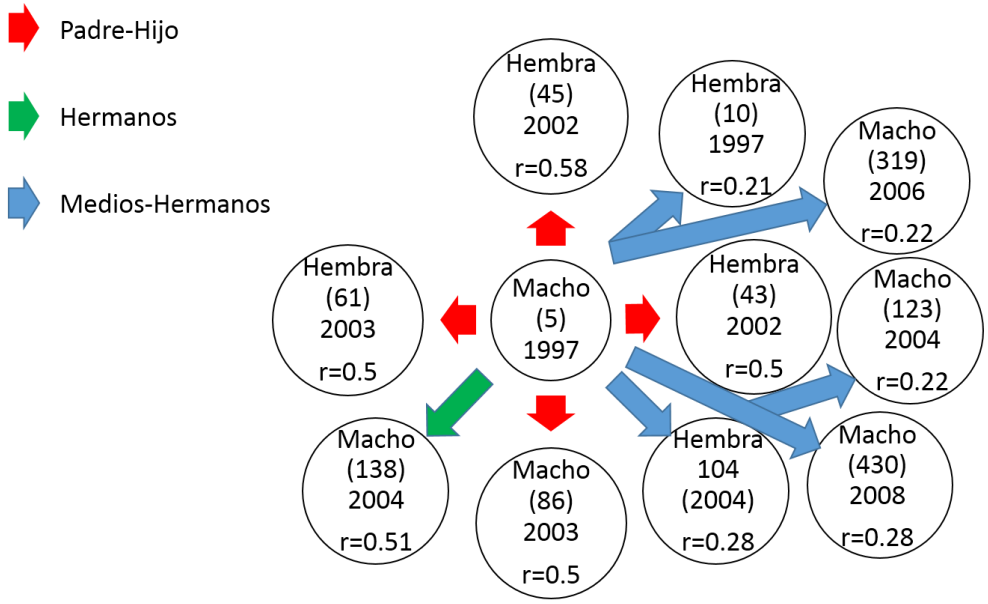


Figura 15. Esquema de la relación de parentesco, ejemplo 2.

El último ejemplo de igual manera muestra un individuo macho (55), de la generación 2002 con tres relaciones padre-hijo y dos de medios-hermanos (Figura 16).

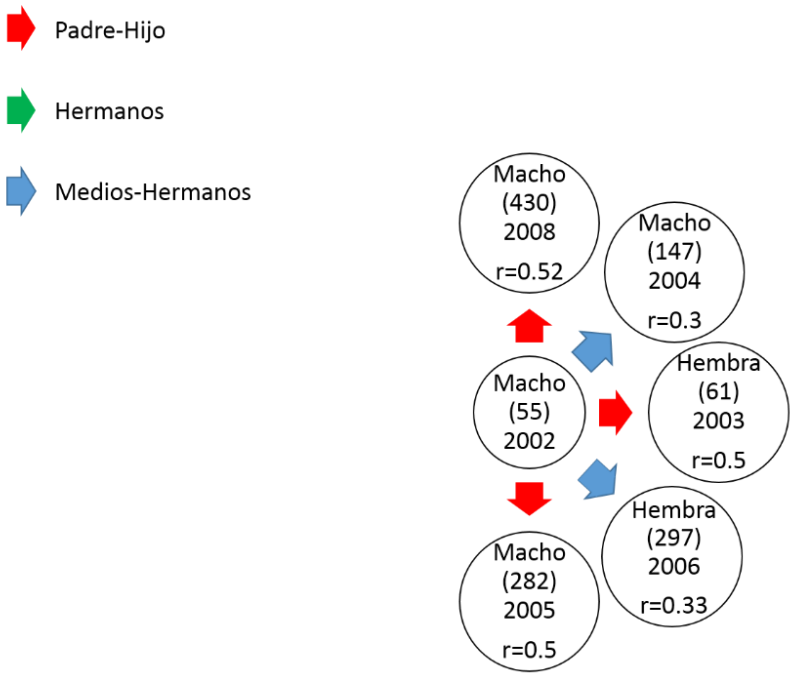


Figura 16. Esquema de la relación de parentesco, ejemplo 3.

9.6 Estructura genética

La estructura genética establecida con Structure evaluando las tres poblaciones de manera simultánea se obtuvo una K = 4 (con una probabilidad posterior de -7096.2 y una varianza de 329.3). Del total de individuos (N = 364), el 99% de los individuos de la población en cautiverio se asignaron al grupo 1 (representado por el color rojo), la población silvestre se asignó al grupo 2, pero se observa que está subdividida en colores verde, amarillo y azul, con asignaciones del 36%, 43% y 21% respectivamente. La población de *Ctenosaura acanthura*, considerado como grupo externo se asignó al grupo 3 (color amarillo con 21% de los individuos y color azul 79% de los individuos) (Figura 17).

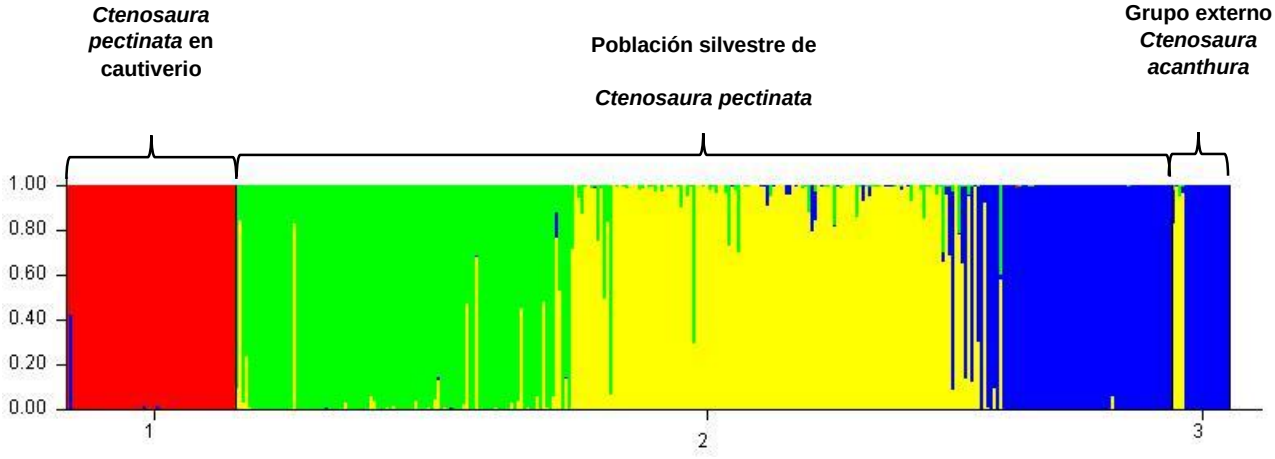


Figura 17. Asignación de los individuos empleando el programa Structure. Se observan cuatro grupos génicos: grupo 1 (rojo), grupo 2 (verde, amarillo y azul) y grupo 3 (azul).

Al evaluar por separado la población silvestre y el grupo externo respecto a la población mantenida en cautiverio y así poder discriminar la asignación de algunos individuos hacia una de ellas, para ambos análisis se obtuvo una K = 2 (datos no mostrados).

X. DISCUSIÓN

10.1 Caracterización fenotípica

En este estudio se muestran por vez primera una serie de fotografías que muestran 35 caracteres morfométricos que sirven de guía en la identificación de la iguana *Ctenosaura pectinata*. Un caracter que destaca en la identificación de *C. pectinata* son las escamas intercalares de la cola, que en 1928 Bailey estableció se pueden hallar tres filas completas de escamas intercalares en los primeros cinco a seis anillos de escalas caudales. Sin embargo, en el estudio realizado por Köhler & Streit (1996) se reportó que esta característica es de un rango mayor que va de tres a ocho escamas intercalares de la cola. Este número es muy similar al que nosotros encontramos en la población de iguana negra cautiva, que fue de tres a siete anillos de escamas caudales que cuentan con tres filas completas de escamas intercalares.

Köhler & Streit (1996) establecieron los caracteres fenotípicos que permiten diferenciar a la iguana negra de las especies filogenéticamente más cercanas (*C. similis* y *C. acanthura*) son:

1) Escamas supra e infralabiales 12.3 y 13.5, respectivamente. En este estudio observamos un promedio de 13.2 escamas supralabiales y 13.5 escamas infralabiales.

2) Cresta dorsal: a) continua hacia la base de la cola (en un 26.3% de un total de 132 individuos) o b) interrumpida por 20 anillos de escamas dorsales. En los 50 individuos observados en este estudio, la cresta dorsal se presentó de manera interrumpida por un promedio de 24 anillos de escamas dorsales.

3) Orientación y ángulo de las quillas de las escamas caudales: a) oblicuas en el centro y relativamente planas o b) con ángulos menores de 20°. En el presente estudio, también se observó que en promedio, los ángulos se presentaban alrededor de los 20°

o menos, pero el 80% de los individuos posee el arreglo de estas escamas en condición recta y un 20% en condición oblicua.

4) Coloración: no existen bandas dorsales oscuras en el dorso. De la misma manera en ninguno de los individuos observamos bandas dorsales oscuras, sino que se observaron patrones de manchas blancas de distribución dorsal a modo de puntilleo, manchas de tamaño regular o bien manchas que abarcaban casi por completo el dorso.

5) Longitud hocico-cloaca (LHC), promedio total: 353 mm. Encontramos una LHC promedio total de 277 mm, en un rango de 215 a 385 mm. Ligeramente superior a la LHC de 200 mm reportada por Alvarado & Suazo (1996) en *C. pectinata*.

El análisis factorial de componentes principales muestra que existen 11 caracteres morfométricos considerados como mayormente explicativos del fenotipo de *Ctenosaura pectinata*. Estos caracteres sólo reflejan a los individuos en cautiverio y es posible que puedan compartirse con iguanas de vida libre. Sin embargo, se sugiere que se realicen estudios en vida libre con miras al establecimiento de los caracteres con mayor poder explicativo en la determinación del fenotipo de esta iguana.

Cuando se cuenta con información morfológica previa en el establecimiento y definición de las poblaciones biológicas de una especie, las herramientas de la genética vienen a complementar o corroborar que estas bases extrínsecas reflejen la estructura genética existente en ellas (Pritchard *et al.*, 2000). En nuestro estudio sustentamos que nuestra población de iguanas está formada por individuos que pertenecen a la especie *Ctenosaura pectinata*, mediante el empleo de caracteres morfométricos y con la aplicación de análisis genéticos, que discutiremos con detalle más adelante.

10.2 Relación entre la morfometría y la genética

Debido a que existe dependencia de las características morfológicas con las variables ecológicas y que determina los diversos morfotipos que pueden encontrarse de manera natural, la heterogeneidad genética observada se debe en gran parte a esta diversidad morfológica que pudo ser detectada previamente (Ciofi *et al.*, 2002). Siendo así fundamental el estudio interdisciplinario entre la morfometría y la genética de iguana negra para poder explicar los patrones de diferenciación morfológica y genética de las poblaciones de una misma especie en función de su residencia geográfica.

Los cambios que suceden en el nivel de la diversidad genética se manifiestan a su vez en la diversidad morfológica. En los genes de regulación (factores de transcripción codificados en elementos regulatorios cis, “cis-regulatory elements”.) que afectan la morfología están implicados con más frecuencia en la evolución de la diversidad, en comparación con nuevos genes o cambios funcionales en las secuencias proteicas. Estos cambios en la diversidad morfológica, ocurren en las secuencias regulatorias que con frecuencia son crípticas y tienen efectos pequeños en la morfología; sin embargo, crean las variaciones genéticas que tienen el potencial de producir una variación morfológica heredable y cuantificable a través del tiempo. Es así, como una variación morfológica sirve de materia prima en el proceso de la evolución (Carrol *et al*., 2005).

Por otro lado, la observación de la carencia de microsatélites de longitud muy grande, sugiere que la selección mantiene microsatélites de un tamaño determinado. La mayoría evolucionan de manera neutral, pero en algunos casos, la variación en las regiones microsatélites se asocia con un fenotipo alterado como se ha observado en algunos desórdenes genéticos en humanos o flanqueando a genes de virulencia en

algunos patógenos (Schlötterer, 2000). El empleo de microsatélites como marcadores moleculares de iguana negra puede conducir al escaneo de algún tipo de afección fenotípica, de predisposición a alguna enfermedad o susceptibilidad parasitaria.

10.3 Caracterización genotípica

10.3.1 Variación genética

La diversidad génica es la medida más importante de la variabilidad genética de una población y puede relacionarse al número de diferencias por locus. Los análisis de diversidad permiten estudiar las variaciones génicas (dentro y entre las poblaciones) con respecto al genoma completo del organismo que se esté analizando (Nei, 1977). Con base en los resultados, de los 10 loci analizados en iguana negra en cautiverio, el 100% mostraron más de un alelo en la población; por ello cumplen que estas regiones microsatélitales son buenos marcadores moleculares de la especie. Zarza *et al*. (2009) reportó al locus Pec 24 como el más polimórfico, con 19 alelos, mismo número que se obtuvo en el presente estudio. Observamos que los locus con menor número de muestras en las que amplificaron las regiones microsatélites, fueron Pec 03 y Pec 20 (x = 30.5); mismos locus indicados por Zarza *et al*. (2009) como menos polimórficos (2 alelos).

En promedio como en la mayoría de los loci, observamos mayor riqueza alélica en contraste con lo reportado por Zarza *et al.* (2009). Es posible que esta diferencia se deba a que el número de individuos de *Ctenosaura pectinata* muestreados en el estudio de 2009 fue de 27 y que la procedencia de los datos fue de tres sitios diferentes.

La ocurrencia de alelos nulos en 9 de los 10 loci de la población muestreada, mediante dos software distintos (Micro Checker y Genepop), es congruente con lo que

se reporta en poblaciones de peces mantenidas en cautiverio (Leary *et al.*, 1993); dónde se encontraron alelos nulos con frecuencias elevadas y que son raros de detectar en poblaciones silvestres. Se sabe que la causa principal de encontrar alelos nulos se debe a dificultades técnicas en la genotipificación de los microsatélites (Mac Avoy *et al*., 2007) y que son el resultado de mutaciones ocurridas en las regiones de unión de los cebadores o "*primers*" (Zarza *et al.*, 2009). La presencia de alelos nulos representa un inconveniente, ya que crea un sesgo en la observación del exceso de genotipos homocigotos (Zarza *et al.*, 2009). En la mayoría de los estudios, se excluyen los loci en los cuales se observa la presencia de alelos nulos, y como segunda opción, está el rediseñar los cebadores (primers) empleados o bien, se pueden ajustar los valores obtenidos conforme lo establecido por Chakraborty *et al.* (1992) y Brookfield (1996) (Ciofi *et al.*, 2002). En este estudio no fue posible excluir los loci, ni rediseñar los cebadores y tampoco empleamos valores ajustados, debido a que la distribución de las frecuencias alélicas "ajustada" para las frecuencias acumuladas de los alelos nulos no fue significativamente distinta de las distribuciones "no ajustadas"; como se observó en el estudio de Ciofi *et al.*, (2002) con tortugas de las islas Galápagos. El rango de las frecuencias de los alelos nulos que ellos obtuvieron fue de 0.04-0.37, rango cercano al que nosotros obtuvimos, que fue de 0.13-0.48. Estos resultados se consideran propios de la dinámica genética en una población cautiva y no representa un sesgo importante en los análisis.

La heterocigosidad representa la variación genética, es precisa y no arbitraria (Hedrick, 2010). Se detectó exceso de genotipos homocigotos en la población de iguana negra mantenida en cautiverio. La heterocigosis esperada en este estudio fue mayor respecto a la heterocigosis observada. Los valores de heterocigosis observada

en este estudio se encontraron en un rango menor que el rango reportado por Zarza *et al.* (2009) para *C. pectinata* (0.15 a 0.96), indicando así que el efecto del cautiverio disminuye los niveles de variación genética.

En el estudio de las tortugas de las islas Galápagos (Ciofi *et al.*, 2002), los valores de heterocigosis que se obtuvieron fueron de 0.54-0.83, rango que se sabe está dentro de los valores de heterocigosis encontrados en reptiles insulares (H=0.25-0.85). Nuestros valores de heterocigosis se sitúan por debajo y dentro de este mismo rango. Por lo que es posible, que la población de iguana negra en cautiverio, se encuentre en una dinámica poblacional muy similar a la de las poblaciones insulares, que muestran evidencia que la depresión por endogamia en aves e iguanas ocasiona nidadas de tamaños pequeños. Sin embargo, las tasas de extinción ocasionadas por endogamia, han mostrado ser mayores bajo condiciones hostiles y de variables ambientales, que bajo condiciones de confort típicas del cautiverio, que pueden tener un menor éxito reproductivo y por lo tanto no son adecuadas para un manejo de reintroducción al medio continental. Un intercambio de inmigrantes entre poblaciones de islas aisladas de la misma especie, debería reducir los riesgos de extinción derivados de la endogamia y de los factores que se le suman a este fenómeno (Frankham, 1998).

En el estudio realizado por Reed & Frankham (2003), por medio de un metanálisis, se observó que tanto los niveles de heterocigosis, el tamaño de la población y la variación genética cuantitativa (cuantificados mediante marcadores moleculares) resultaron tener una correlación significativamente positiva con el tamaño y adaptabilidad de la población. Así los niveles de variación genética cuantitativa pueden proporcionar una mejor estimación de un tamaño poblacional a largo plazo que un censo de individuos en momento determinado. La preocupación sobre la variación

genética está particularmente garantizada a la luz del hecho que las especies amenazadas, de manera general, poseen niveles más bajos de heterocigosis que aquellas no amenazadas, y dado que ahora se sabe que el nivel de heterocigosis no se relaciona únicamente con el potencial evolutivo, sino que está directamente implicado en la adaptabilidad, es de orden prioritario mantener a las poblaciones de un tamaño ideal tal que permita retener la diversidad genética y minimizar los riesgos de extinción (Reed & Frankham, 2003).

Una población con frecuencias génicas y genotípicas constantes, se dice que está en equilibrio Hardy-Weinberg (H-W). En el presente estudio detectamos que la población de iguana negra cautiva se encuentra fuera del equilibrio H-W en 9 loci, destacando que en el estudio de Zarza *et al.* (2009) se reporta desviación del equilibrio de H-W únicamente en el locus Pec 21 en individuos de *C. pectinata*.

Los resultados sitúan a la población de iguana negra cautiva en un escenario alejado de una población ideal, contrario a lo que se observó en la isla Alligator Cay (Knapp & Malone, 2003), dónde se evaluaron 35 iguanas del género *Cyclura* después de haberse llevado a cabo esfuerzos de conservación. Mediante el estudio de 5 loci polimórficos, no se encontraron desviaciones del equilibrio de H-W, el promedio F_{IS} encontrado fue de 0.20 en individuos fundadores y como resultado de la translocación se obtuvo un índice de F_{IS}= 0.038. Estos resultados sugieren que cada individuo sexualmente maduro, contribuye de manera azarosa con gametos a la poza génica para las generaciones que se formarán en el futuro, por lo que se espera, que esta población mantenga la variación genética y continúe creciendo.

Los datos de la población de iguana en cautiverio se ajustaron al modelo SMM y no se detectó cuello de botella reciente en la población. El índice de Garza &

Williamson es sensible para detectar este fenómeno, los valores que se obtuvieron son cercanos a 1, lo que indica que se trata de una población estacionaria (Excoffier *et al.*, 2005). No obstante, estos resultados no son del todo concluyentes ya que a pesar de que los datos no evidencian un cuello de botella, puede existir el sesgo debido a que el número de loci fue insuficiente para detectar este evento (se necesita mínimo 20 loci para que la prueba sea robusta). Frankham *et al.* (2009), indican que las poblaciones que han experimentado reducciones en sus tamaños (cuello de botella), o fueron establecidas con un número reducido de individuos, son más propensas a la fijación de alelos deletéreos, depresión por endogamia y pérdida de variación genética.

10.3.2 Comparación de la endogamia entre la población cautiva y la población silvestre

Al contrastar los resultados de seis loci de microsatélites entre nuestra población cautiva y los de la población silvestre de iguana negra, empleando el programa Genepop, observamos que los indíces de endogamia en la población cautiva son de mayor grado en cuatro de los seis loci analizados, y en promedio el coeficiente F_{IS} de la población cautiva fue ligeramente mayor. Fue sorpresivo encontrar desviación del equilibrio H-W en los datos de iguana negra del medio silvestre, lo cual sugiere que es necesario investigar más a fondo la dinámica poblacional de la especie o bien, las poblaciones silvestres se han fragmentado de tal manera que los individuos están siendo confinados a áreas geográficamente aisladas de pocos individuos.

El valor promedio de F_{ST} revela que existen diferencias entre las frecuencias alélicas de ambas poblaciones, lo cual sugiere una estructuración de la población y que, más adelante, se hace más contundente con el resultado de la asignación (método de Structure). F_{ST} mide la autocigosis resultante de la deriva génica azarosa en una

subpoblación finita y F_{IS} mide la autocigosis resultante de la endogamia por encima y más allá de la evaluada con F_{ST} (Hartl & Clark, 2007).

El estadístico F_{IS} sólo toma en cuenta la autocigosis debida a la endogamia inmediata individual, es necesario considerar el estadístico F_{IT} que toma en cuenta tanto la endogamia como la estructura de la población. F_{IT} mide la probabilidad de autocigosis de un individuo endogámico en relación con la población total, (Hartl & Clark, 2007). Es por ello que los valores de F_{IT} que podemos observar en este estudio, son mayores respecto a F_{IS} y F_{ST} (por locus y en promedio total) es decir, además de que en nuestra población se presenta el fenómeno de endogamia, también nos encontramos con una población que posee estructura genética.

Los índices de endogamia por encima de los que se pueden observar en poblaciones silvestres, se atribuyen al manejo inapropiado y el ambiente cautivo que propician la reproducción entre individuos de manera no azarosa y cercanamente emparentados. Esto es, si los individuos se cruzan endogámicamente por muchas generaciones, se produce una disminución en la proporción de heterócigos, que se expresa como un aumento en el coeficiente de consanguinidad (Eguiarte & Piñero, 1990). Para evitar la endogamia, la acción inmediata es aplicar protocolos esenciales en poblaciones cautivas (Frankham *et al.*, 2009), realizando intercambio de individuos con otros iguanarios para introducir genotipos provenientes de otras poblaciones. O bien, usar cruzas que minimicen esto, empleando la información de los genotipos (Gutiérrez- Guerrero, 2014) obtenidos de la población cautiva y evitando los apareamientos entre individuos que compartan alguna de las relaciones de parentesco analizadas en este trabajo. Además, una vez conocida la consanguinidad de una población o raza, ésta puede utilizarse como su propia probabilidad de extinción,

proporcionando un orden prioritario sobre las razas a conservar (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005).

Las poblaciones endogámicas y linajes de una especie en particular con frecuencia responden de maneras muy diversas al estrés ambiental y/o endogámico. Los linajes endogámicos que poseen altos niveles de adaptabilidad bajo condiciones favorables (en laboratorios o zoológicos), podrían desenvolverse de manera precaria en un ambiente natural y por eso no son los más adecuados para programas de reintroducción. La expresión de los alelos recesivos deletéreos como consecuencia de la depresión por endogamia depende de condiciones ambientales específicas (diferentes tipos de estrés); aunado a ello, la gran cantidad de variación en la forma en la que las poblaciones y las especies responden a los distintos tipos de estrés, hace que las predicciones “a priori” sean casi siempre engañosas o imposibles de establecer (Armbruster & Reed, 2005).

También debe tomarse en cuenta que, los programas de manejo en cautiverio para especies amenazadas, difícilmente o no, revelarán la cantidad de variación genética deletérea, debido a que los “pedrigrees” típicos que se realizan poseen bajo poder estadístico. De tal manera, que el entendimiento de los efectos de la endogamia son casi imposibles o requerirán mucho trabajo experimental; siendo necesario e ideal el evadir por completo la endogamia en dichos programas de conservación (Kalinowski & Hedrick, 1999).

Puede ocurrir que la selección purgue a la población de alelos recesivos deletéreos y por lo tanto puede crear poblaciones endogámicas con mayor adaptabilidad. Esto explica por qué pueden existir poblaciones endogámicas con poca diversidad genética pero con gran adaptabilidad. Siendo cierto, únicamente si la

población no es tan pequeña durante un tiempo lo suficientemente largo para permitir la fijación de los alelos deletéreos (Reed & Frankham, 2003). Esto último es de gran importancia pues no podemos aseverar si la población de iguana negra cautiva aun cuando posee variabilidad genética reducida y es endogámica, se encuentra adaptada a las condiciones del cautiverio de manera tal que el tamaño de la población haya permitido purgar la carga genética.

10.3.3 Análisis de parentesco

De acuerdo al análisis de parentesco realizado con nuestros datos de la población en cautiverio, se observó que no todos los individuos muestreados están relacionados en alguna de las tres categorías de parentesco establecidas. Estos resultados sugieren que a pesar de haberse encontrado endogamia en la población, el número de fundadores (310 individuos) fue suficiente para permitir que aún existan individuos sin alguna relación de parentesco dentro de este encierro.

Para futuros estudios de parentesco se sugiere utilizar también regiones de genoma mitocondrial, porque permiten visualizar algunas relaciones de parentesco que tienen una mayor probabilidad de ser verdaderas (Gutierréz-Guerrero, 2014). Es preciso darle seguimiento a las poblaciones mediante el marcaje de individuos y su comportamiento para describir de manera adecuada las relaciones genealógicas (Van Horn *et al.*, 2008), no basta con poseer la información genética proveniente de los programas que realizan las asignaciones, porque se ha observado que poseen diferentes limitaciones en base al número de loci, número de alelos por locus, errores en la amplificación y la genotipificación (Gutiérrez-Guerrero, 2014).

10.3.4 Estructura genética

Se observó la distribución de los individuos de *Ctenosaura pectinata* de la población cautiva en un grupo genético único y separado de las dos poblaciones con las que se contrastó (población silvestre de *Ctenosaura pectinata* y población de *Ctenosaura acanthura*). Destaca un dato atípico de un individuo que posee el 50% de genoma correspondiente a *C. pectinata* y el otro 50% al genoma de *C. acanthura*, que sugiere la existencia de un híbrido en la muestra de la población, resaltando la importancia de lograr genotipificar al resto de la población en búsqueda de individuos híbridos y hacer la separación entre individuos puros.

Los datos provenientes tanto de la población silvestre, así como de la población considerada como grupo externo mostraron subestructuración. Se observó que dentro de la población silvestre, el porcentaje de individuos dentro del subgrupo de color azul se tratan de iguanas que corresponden a la especie de *C. acanthura* y se asignaron de manera errónea a la especie *C. pectinata*. Y a su vez un porcentaje de individuos identificados como C*. acanthura* (subgrupo de color amarillo, en el grupo 3) en realidad corresponden a iguanas *C. pectinata*. Confirmándose así la necesidad de complementar los datos fenotípicos con datos genéticos en la correcta identificación de la especie y su asignación a poblaciones.

La existencia de estructura poblacional (K>1), refleja la variación de las frecuencias alélicas entre las poblaciones y el número de alelos que son intercambiados entre las poblaciones debida a la nula o baja tasa de migración o dispersión (Pritchard *et al*., 2000; Balloux & Lugon-Moulin, 2002). Como lo que se ha podido observar en poblaciones de tuátara (*Sphenodon* spp.) de islas aisladas por miles de años, en ausencia de flujo génico debido al aislamiento geográfico se encontró un valor de F_{ST} =

0.26. (Mac Avoy *et al*., 2007), este aislamiento geográfico puede representar un equivalente al aislamiento físico impuesto por el ambiente en cautiverio de las iguanas de este estudio.

De manera diferente, se encontró que en 22 poblaciones de iguana marina de las islas Galápagos (*Amblyrhyncus cristatus*) existen niveles altos de flujo génico; el alto grado de diversidad genética en las islas jóvenes se atribuye a grandes tamaños de las poblaciones de reciente formación que ha dado como resultado muchas mutaciones nuevas en combinación con la disminución de los efectos de la deriva génica (Steinfartz *et al*., 2009). Cuando las subpoblaciones se encuentran completamente aisladas del proceso migratorio, entonces todos los apareamientos se llevan a cabo entre individuos dentro de cada subpoblación y una de las consecuencias importantes de la estructura poblacional es la reducción en la proporción promedio de genotipos heterocigotos en relación a lo que se esperaría bajo apareamientos completamente al azar (Hartl & Clark, 2007), los valores de heterocigosis observados en la población de este estudio también reflejan que se halla estructurada genéticamente como consecuencia de la ausencia de flujo génico.

Cuando el flujo génico es reducido, como en las zonas de hibridación o por la presencia de barreras de dispersión, el efecto de la mutación se hace importante en relación a la migración (Balloux & Lugon-Moulin, 2002), siendo una razón más por la cual observamos niveles altos en las frecuencias de alelos nulos y confirmando que el efecto del cautiverio se refleja en una marcada estructura genética.

La diferenciación observada mediante los loci de microsatélites permite reconocer a los individuos de las poblaciones como unidades distintas para la conservación (unidades de manejo) (Ciofi *et al*., 2002). Es posible asegurar que la

población de iguana negra cautiva se encuentra genéticamente diferenciada, pues de acuerdo con Mac Avoy *et al*. (2007) un alto grado de estructuración genética, indica que el manejo para su conservación necesita reconocer a cada población como una entidad genéticamente distinta.

XI. CONCLUSIONES

- Se establecieron once caracteres morfométricos en la identificación de la especie *Ctenosaura pectinata*.

  AA: Número de verticilios caudales con escamas paramedias espinosas (caracter número 29).

  BB: Número de verticilios caudales totales (caracter 30).

  DD: Número de escamas dorsales paramedias en una cabeza de longitud (caracter 32).

  EE: Número de escamas midventrales en una cabeza de longitud (caracter 33).

  I: Número mínimo de escamas entre suboculares y supralabiales (caracter 10).

  J: Número de escamas supralabiales, incluyendo la escama oblicua (caracter 11).

  Q: Número de espinas agrandadas de la cresta dorsal media (caracter 18).

  R: Número de filas de escamas entre las nucales y la primera espina de la cresta dorsal media (caracter 19).

  T: Número de intercalares con filas incompletas de escamas caudales (caracter 21).

  U: Número de intercalares con dos filas completas de escamas caudales (caracter 23).

  Y: Condición de la espinosidad de las escamas caudales paramedias (caracter 27).

- Los individuos de la población de iguana negra mantenidos en cautiverio, se han apareado de forma no aleatoria entre individuos relacionados por ancestría con

un coeficiente de endogamia Fis = 0.37-0.45 en la población, alejada del equilibrio de Hardy-Weinberg.

- Existen 138 relaciones de parentesco (40 en la categoría padre-hijo, 27 de la categoría hermanos y 71 relaciones de medios hermanos) entre los 53 individuos muestreados del total de la población cautiva, creándose así el primer estudio de parentesco-genético para la población.
- El índice F_{ST}=0.26, así como el resultado del análisis realizado con Structure reflejan la existencia de diferencias en las frecuencias alélicas entre la población cautiva y la silvestre, por lo cual ahora se sabe que existe gran estructura genética en la población cautiva.
- La población de iguana negra mantenida en cautiverio debe ser considerada como una entidad genéticamente diferenciada de la especie en vida silvestre.

Consideraciones

Se sugiere realizar acciones para un manejo adecuado en la reproducción, evitando apareamientos entre individuos emparentados y de ser posible establecer el parentesco entre todos los individuos de la población.

Gestionar el flujo de migrantes entre iguanarios o con individuos del medio silvestre para incrementar los niveles de variación genética, con el propósito de obtener una población genéticamente saludable, sin adaptación al ambiente cautivo y capaz de ser considerada para un plan de reintroducción al medio silvestre.

XII. REFERENCIAS

Aljanabí, S.M. & Martínez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic ADN for PCR-based techniques. Nucleic Acids Research, 25: 4692-4693.

Allendorf, F. W. & Luikart, G. 2007. Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing, Malden, Massachusetts, U.S.A. 642 pp.

Alvarado, J. & Suazo, I. 1996. Las iguanas de México. Historia natural y conservación. Utilización y situación actual. Laboratorio tortuga marina y biología de la conservación, Facultad de biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México. Págs. 57-77.

Amaru, R.; Miguez, H.; Peñaloza, R.; Torres, G.; Silvestre, J. & Cuevas, H. 2006. ADN-UMSAgen, extracción de ADN genómico para diagnóstico molecular: método rápido y económico. Revista Cuadernos, 51(2): 11-15.

Aranguren-Méndez, J.A.; Román-Bravo, R.; Isea, W.; Villasmil, Y. & 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): 30-42.

Arcos, J.L. & López, R. 2009. La iguana negra fundamentos de reproducción, nutrición y manejo. Universidad del Mar, Puerto Ángel, Oaxaca. 164 pp.

Arcos-García, J.L.; Cobos, P.M.A.; Hernández, D.; Reynoso, V.H.; Mendoza, M.G.D. & Aguilar, B.C. 2007. Digestibilidad de iguana negra (*Ctenosaura pectinata*) alimentadas con dietas a base de diferentes componentes de insectos y vegetales. Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias-LUZ, XVII: 255-261.

Arcos-García, J.L.; Cobos, P.M.A.; Reynoso, V.H.; Mendoza, M.G.D.; Ortega, C.M. & Clemente, S. 2002. Caracterización del crecimiento de la iguana negra (*Ctenosaura pectinata*) en cautiverio. Revista Veterinaria México, 33 (4): 409-419.

Arcos-García, J.L.; Reynoso, V.H.; Mendoza, G.D.; Clemente, S.F.; Tarango, A.L. & Crosby, G.M. 2005a. Efecto del tipo de dieta y temperatura sobre el crecimiento y eficiencia alimenticia de iguana negra (*Ctenosaura pectinata*). Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias-LUZ, XV (4): 338-344.

Arcos-García, J.L.; Reynoso, V.H.; Mendoza, G.D. & Hernández, D. 2005b. Identificación del sexo y medición del crecimiento en iguana negra (*Ctenosaura pectinata*) en las etapas de cría y juvenil. Revista Veterinaria México, 36: 53-62.

Armbruster, P. & Reed, D. H. 2005. Inbreeding depression in benign and stressful environments. Heredity, 95: 235-242.

Bailey, J. W. 1928. A revision of the lizards of the genus *Ctenosaura*. Proceedings of the United States National Museum, United States Government Printing Office, Washington, 73 (12): 1-55.

Balloux, F. & Lugon-Moulin, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. Molecular Ecology, 11: 155-165.

Blouin, M.S. 2003. ADN-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. TRENDS in Ecology and Evolution, 18 (10): 503-511.

Brede, E.G. & Beebee, T.J.C. 2004. Contrasting population structures in two sympatric anurans: implications for species conservation. Heredity, 92: 110-117.

Buckley, L. J.; de Queiroz, K.; Etheridge, R. E.; Hollingsworth, B. D.; Iverson, J. B.; Pasachnik, S. A. & Stephen, C. L. 2011. Iguanas of the World. Iguanidae: Iguaninae. Version 2011.2

Butler, J., 2010. Fundamentals of forensic ADN typing. Elsevier science and technology books. National Institute of Standards and Technology Gaithersburg, Maryland, USA. 485 pp.

Cabe, P.R.; Page, R.B.; Hanlon, T.J.; Aldrich, M.E.; Connors, L. & Marsh, D.M. 2007. Fine-scale population differentiation and gene flow in a terrestrial salamander (*Pletodon cinereus*) living in continuous habitat. Heredity, 98: 53-60.

Ciofi, C; Milinkovitch, M; Gibbs, J.; Caccone, A. & Powell, J. 2002. Microsatellite analysis of genetic divergence among populations of giant Galápagos tortoises. Molecular Ecology, 11: 2265-2283.

Cooke, R.G. 1981. Los hábitos alimentarios de los indígenas precolombinos de Panamá. Rev Med de Panamá, 6: 65-89.

Cornuet, J.M. & Luikart, G. 1997. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. Genetics, 144: 2001-2014. http://www.ensam.inra.fr/URLB/bottleneck/bottleneck.html

Crnokrak, P. & Roff, D. A. 1999. Inbreeding depression in the wild. Heredity, 83: 260-270.

Cruzan, M. B. 2001. Population size and fragmentation thresholds for the maintenance of genetic diversity in the herbaceous endemic *scutellaria montana* (lamiaceae). Evolution, 55 (18): 1569-1580.

Curtis, H. & Barnes, N.S 2000. Biología. Sexta Edición. Editorial Medica Panamericana, Madrid, España. 1491 pp.

Díaz-Juárez G. & Reynoso-Rosales V. 2008. Análisis histológico de las gónadas de *Ctenosaura pectinata* para establecer la confiabilidad del sexado quirúrgico. XI Reunión nacional sobre iguanas. Subcomité técnico consultivo para la

conservación, manejo y aprovechamiento sustentable de las iguanas en México. Puebla, Puebla, 72-79 pp.

DOF. 2009. Diario Oficial de la Federación, Proyecto de modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001, Protección ambiental de especies nativas de México de flora y fauna silvestres en categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio de lista de especies en riesgo. Segunda Sección, Poder Ejecutivo, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

DOF. 2010. Diario Oficial de la Federación, NOM-059-SEMARNAT-2010. México, 30 de Diciembre de 2010.

Earl, Dent A. & vonHoldt, Bridgett M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources, 4 (2): 359-361.

Eguiarte, L.E.; Aguirre-Planter, E.; Scheinvar, E.; González, A.G. & Souza, V. 2010. Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México: 1-30.

Eguiarte, L.E. & Piñero, D. 1990. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. CIENCIAS, 4: 34-47.

Eguiarte, L.E.; Souza, V. & Aguirre, X. Compiladores 2007. Ecología molecular. Semarnat, Inecol, Unam, Conabio, México, D.F. 573 pp.

Excoffier, L.; Laval, G. & Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online, 1: 47-50.

Excoffier, L. & Heckel, G. 2006. Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. Nature Reviews Genetics, 7: 745-758.

Faria, C.M.A.; Zarza, E.; Reynoso, V.H. & Emerson, B.C. 2010. Predominance of single paternity in the black spiny-tailed iguana: conservation genetic concerns for female-biased hunting. Conservation Genetics, 11 (5): 1645-1652.

Flores-Villela O. & García-Vázquez U. 2014. Biodiversidad de reptiles en México. Revista Mexicana de Biodiversidad, 85: 467-475.

Frankham, R. 1998. Inbreeding and extinction: island populations. Conservation Biology, 12 (3): 665-675

Frankham, R. 2008. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. Molecular Ecology, 17: 325-333.

Frankhan, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. & Mclnnes, H.K. 2009. Introduction to conservation genetics. 2°ed, Cambrige University Press. 618pp.

García, E. 1989. Apuntes de climatología. UNAM. México. 155 pp.

García-Grajales, J. 2008. Herpetología-Notas para el estudio de los anfibios y reptiles en Oaxaca. Ciencia y Mar XII (34): 47-56.

Garza, J. C. & Williamson, E.G. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. Molecular Ecology, 10: 305-318.

Glaubitz, J.C. 2004. CONVERT: a user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. Molecular Ecology Notes, 4: 309–310.

González, G. 2002. Desarrollo de métodos no letales de sexado en crías de iguana negra (*Ctenosaura pectinata*) para la obtención de proporciones sexuales al

nacimiento. Tesis de Licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

Goudet, J. 2002. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2).

Guillén, S. F. & Ramírez, C. S. 2004. Opciones de Manejo para Fauna Silvestre en Cautiverio. Programas de manejo para fauna silvestre cautiva y recomendaciones básicas para la sujeción, transporte y mantenimiento de animales decomisados y rescatados. Parque de Conservación de Vida Silvestre Zoo Ave. Fundación Restauración de la Naturaleza. Págs. 0-16.

Gunther, K. 2002. Schwarzleguane, Lebenweise, Pflege, Zucht. Herpeton Verlag Elke Köhler, Offenbach. 142 pp.

Gutiérrez-Guerrero, Y. 2014. Efecto del cautiverio sobre la diversidad genética de una población del perrito de la pradera mexicano (*Cynomys mexicanus*). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Hartl, D. L. 2000. A primer of population genetics. Tercera edición. Sinauer Associates. 221 pp.

Hartl, D. L. & Clark A. G. 2007. Principles of population genetics. Cuarta Edición. Sinauer Associates. 652 pp.

Hedrick, P.W. 2005. A standardized genetic differentiation measure. Evolution, 59 (8): 1633-1638.

Hedrick, P. W. 2010. Genetics of populations. Cuarta Edición. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts. 675 pp.

Hernández, P.R. 2003. Aprovechamiento de iguana negra (*Ctenosaura pectinata*) en la Unidad de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre, el gran saurio de

Axochiapan, Morelos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo. Estado de México, México.

IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IMB Corp.

Kalinowski, S.T. & Hedrick, P.W. 1999. Detecting inbreeding depression is difficult in captive endangered species. Animal Conservation, 2: 131-136.

Kalinowski, S.T.; Wagner, A.P. & Taper, M.L. 2006. ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. Molecular Ecology Notes, 6: 576-579.

Kimura, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. Nature, 217: 624-626.

Kimura, M & Ohta, T. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. Poceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 75 (6): 2868-2872.

Knapp, C. & Malone C. 2003. Patterns of reproductive success and genetic variability in a translocated iguana population. Herpetologica, 59 (2): 195-202.

Köhler, G. & Streit, B. 1996. Notes on the systematic status of the taxa *acanthura*, *pectinata*, and *similis* of the genus *Ctenosaura*. Senckenbergiana biologica, 75: 33-43.

Leary, R.F.; Allendorf, F.W. & Knudsen, K.L. 1993. Null allele heterozygosity at two lactate dehydrogenase loci in rainbow trout are associated with decreased developmental stability. Genetica, 89: 3-13.

Lewin, B. 2008. Genes IX, novena edición., McGraw-Hill Interamericana Editores, México, D.F. 892 pp.

Li, YC.; Korol, A.; Fahima, T.; Beiles, A. & Nevo E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Molecular Ecology, 11: 2453-2465.

MacAvoy, E.; McGibbon, L.; Sainsbury, J.; Lawrence, H.; Daugherty, W.C. & Chambers, G. 2007. Genetic variation in island populations of tuatara (*Sphenodon* spp) inferred from microsatellite markers. Conservation Genetics, 8: 305-318.

Machorro, S.; Martínez, M.; Arcos-García, J.L.; López-Pozos, R.; Mendoza, G.D. & Leyte, G.E. 2009. Aplicación de la regresión polinomial en el modelado de crecimiento hocico-cloaca en relación con el peso en iguana negra *Ctenosaura pectinata* (Reptilia:Squamata:Iguanidae). Ciencia y Mar, XIII (37): 21-28.

McGinnis, S.M. & Brown, C.V. 1966. Thermal behavior of the green iguana, *Iguana iguana*. Herpetol, 22: 189-199.

Mendoza-Quijano, F.; Reynoso-Rosales, V.; Ramírez-Hernández, A. & Köhler, G. 2003. Distribución de las iguanas *Ctenosaura* del istmo de Tehuantepec y depresión central de Chiapas, México. VI Taller sobre Iguanas en México. Págs. 61- 64.

Nei, M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. Annals of Human Genetics, 41 (17): 225-233.

Neigel, J. 2002. Is F_{ST} obsolete?. Conservation genetics, 3: 167-173.

Oosterhout, C.V.; Hutchinson, W.F.; Wills, D.P.M. & Shipley, P.F. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes, 4: 535–538.

Peña, D. 2002. Análisis de datos multivariantes. Ed. McGraw-Hill, Madrid. 495 pp.

Pinacho, S.B.; Arcos-García, J.L.; López-Pozos, R.; Mendoza, M.G.D.; Plata, P.F.X. 2010. Parámetros reproductivos de la iguana verde (*Iguana iguana*) en condiciones de cautiverio en Oaxaca, México. Revista Científica FCV-LUZ, XX (5): 467-472.

Piñero, D.; Barahona, A.; Eguiarte, L.; Rocha, O. A. & Salas, L. R. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO. México: 415-435.

Pough, F.H. 1973. Lizard energetics and diet. Ecology, 54: 837-844.

Pritchard, J.; Stephens, K.M. & Donelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 155: 945-959.

Pritchard, J.; Wen, X. & Falush, D. 2010. Documentation for structure software: Versión 2.3. 38pp. http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html.

Raymond, M. & Rousset, F. 1995. GENEPOP Versión 4.3. Population genetics software for exact test and eumenicism. Heredity, 86: 248-249.

Reed, D. H. & Frankham, R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. Conservation Biology, 17 (1): 230-237.

Reynoso, V. & González, G. 2005. Importancia de las áreas naturales protegidas en la conservación de las especies prioritarias de iguanas del género *Ctenosaura* en México. 7pp, *En*: VIII Reunión Nacional sobre Iguanas en México. Lázaro Cárdenas Michoacán.

Reynoso, V. 2005. Instituto de Biología, *"Ctenosaura pectinata*-IBUNAM: CNAR:AR10445", UNIBIO: Colecciones Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Consultado el 7 de enero de 2011.

Reynoso, V. 2008. Ecología evolución y biología de las iguanas, 6pp In: XI Reunión Nacional sobre Iguanas, Subcomité Técnico Consultivo para el Manejo y Aprovechamiento Sustentable de las Iguanas en México, Puebla, Puebla.

SAS Institute Inc. 2010. Sas education analytical suite for Windows. Release 9.2.

Schlötterer, C. 2000. Evolutionary dinamics of microsatellite DNA. Chromosoma, 109: 365-371.

SEMARNAT. 2009. Sistemas de Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre.

Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. Genetics, 139: 457-462.

Steinfartz, S.; Glaberman, S.; Lanterbecq, D.; Russello, M.; Rosa, S.; Hanley, T.; Marquez, C.; Snell, H. L.; Snell, H. M.; Gentile, G.; Dell'Olmo, G.; Powell, A. & Caccone, A. 2009. Progressive colonization and restricted gene flow shape island-dependent population structure in Galápagos marine iguanas (*Amblyrhynchus cristatus*). BioMed Central Evolutionary Biology, 9: 297.

Suazo, I. & Alvarado, J. 1994. Iguana negra. Notas sobre su historia natural. Situación de la especie. Laboratorio tortuga marina y biología de la conservación. Facultad de biología (ed). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en colaboración con el Fish and Wildlife Service y Ecotonia A. C. México. 32 pp.

Sunnucks, P. & Hales, D.F. 1996. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). Molecular Biology and Evolution, 13 (3): 510-524.

Throckmorton, G. 1973. Digestive efficiency in the herbivorous lizard *Ctenosaura pectinata*. Copeiae, 3: 431-435.

Újvari, B.; Madsen, T.; Kotenko, T.; Olsson, M.; Shine, R. & Wittzell, H. 2002. Low genetic diversity threatens imminent extinction for the hungarian meadow viper (*Vipera ursinii rakosiensis*). Biological Conservation, 105: 127-130.

Van-Horn, C.R.; Altmann, J. & Alberts C.S. 2008. Can't get there from here: inferring kinship from pairwise genetic relatedness. Animal Behaviour, doi: 10.1016/j,anbehav.2007.08.027.

Watson, J. B.; Bell, T.; Gann, S.; Levine, M.A, & Losick, R. 2004. Molecular biology of the gene. Quinta edición. Pearson Education Inc. San Francisco, California. 732 pp.

Weber, M.G.; García-Marmolejo & Reyna-Hurtado, R. 2006. The tragedy of the commons: Wildlife management units in southeastern Mexico. Wildlife Society Bulletin, 34: 1480-1488.

Wiegmann, A. 1834. Herpetologia Mexicana, Berlin. 34 pp.

Wissman, M. 2006. Reptiles: Reproduction From Egg to Adult. Consultado el 7 de enero de 2001.

Wyttenbach, A. & Fredga, N. 1999. Genetic structuring and gene flow in a hybrid zone between two chromosome races of the common shrew (*Sorex araneus*, Insectivora) revealed by microsatellites. Heredity, 82: 79-88.

Zarza-Franco, G.E.; Emerson, B.C. & Reynoso, V.H. 2005. Genética para la conservación de la Iguana negra Ctenosaura pectinata. VIII Reunión Nacional sobre Iguanas en México. Subcomité Técnico Consultivo para la Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de las Iguanas en México, Lázaro Cárdenas, Michoacán. Resúmenes en extenso: 77-83.

Zarza, E.; Pereyra, R.T.; Reynoso, V.H. & Emerson, C. 2009. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the black spiny tailed

iguana (*Ctenosaura pectinata*) and their cross-utility in other *Ctenosaura*. Molecular Ecology Resources, 9 (1): 117-119.

Zarza, E.; Reynoso V. H. & Emerson, B. C. 2008. Diversification in the northern neotropics: mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of the iguana *Ctenosaura pectinata* and related species. Molecular Ecology, 17: 3259-3275.

Zug, G.R., Vitt L. G. & Caldwell, G. P. 2001. Herpetology. An introductory biology of amphibians and reptiles. 2nd Edition, Academy Press. 630 pp.

Zurita-Carmona, M.E.; Aguilar B.; González, A.; Mendoza, G.D. & Arcos-García, J.L. 2009. Composición de la dieta, consumo de proteína y energía en iguana negra, *Ctenosaura pectinata* Wiegmann, 1834, y densidad poblacional en Santos Reyes Nopala, Oaxaca. Universidad y Ciencia, Trópico húmedo, 25: 103-109.

Apéndice 1

Caracteres morfométricos empleados para la caracterización fenotípica de la población de *Ctenosaura pectinata* en cautiverio

1. Sexo de las iguanas. Se consideran caracteres informativos del sexo los poros femorales que en los machos de iguana negra son visiblemente más grandes y están más desarrollados (1A) en comparación a los poros femorales de las hembras (1B). En machos también es posible observar un abultamiento en el área cercana a la cloaca por la presencia de hemipenes (1B). La altura de la cresta dorsal (1C) y la longitud de la cabeza (1E) en iguanas machos son por lo general más grandes, en comparación con hembras de la misma edad (1D y 1F, respectivamente).

1E

1F

2. Longitud hocico-cloaca. Medida que involucra la longitud del cuerpo desde la apertura cloacal hasta la punta del hocico. En la Imagen 2 se observa una longitud hocico-cloaca de 28 cm.

2

4. Longitud de la cola. Medida que va desde la cloaca hasta la punta de la cola. En la Imagen 3 se observa una cola de 50 cm. En las iguanas puede ocurrir pérdida de la cola con ausencia de regeneración, pero en la mayoría de los casos la cola se regenera; donde se mide la longitud de la cola hasta la ruptura y la longitud regenerada, se anota como una suma ambas longitudes (por ejemplo: 24 + 7 cm).

3

5. Longitud de la pierna. Esta característica se midió desde la rodilla hasta la flexión de la pata (la primera región se le denomina muslo y la sunda corresponde a la pierna), como se aprecia en la Imagen 4.

4

6. Longitud de la cabeza. Se realizó la lectura desde la punta del hocico hasta el margen anterior de la apertura del oído (Imagen 5).

5

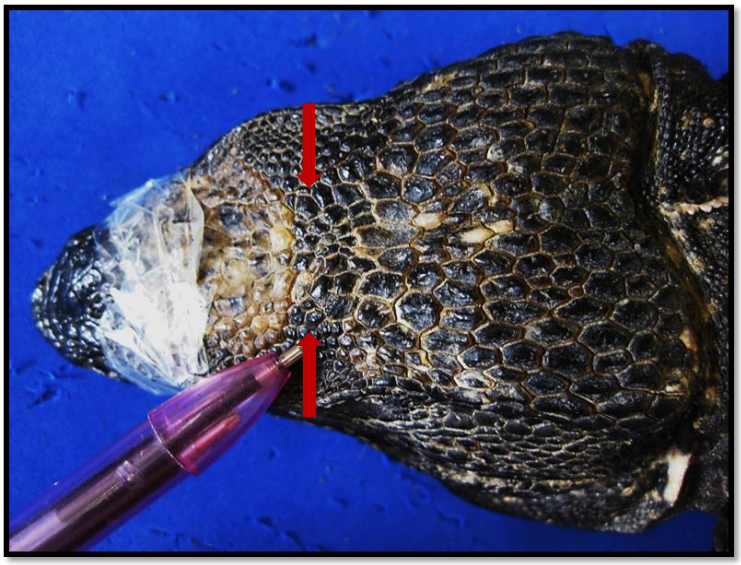
7. Ancho de la cabeza. Se midió la distancia que existe entre el *oral ricti*; es decir, el ancho entre la comisura izquierda y derecha del hocico (Imagen 6).

6

8. Longitud del hocico. Se midió desde la punta del hocico hasta el margen anterior de la órbita (Imagen 7).

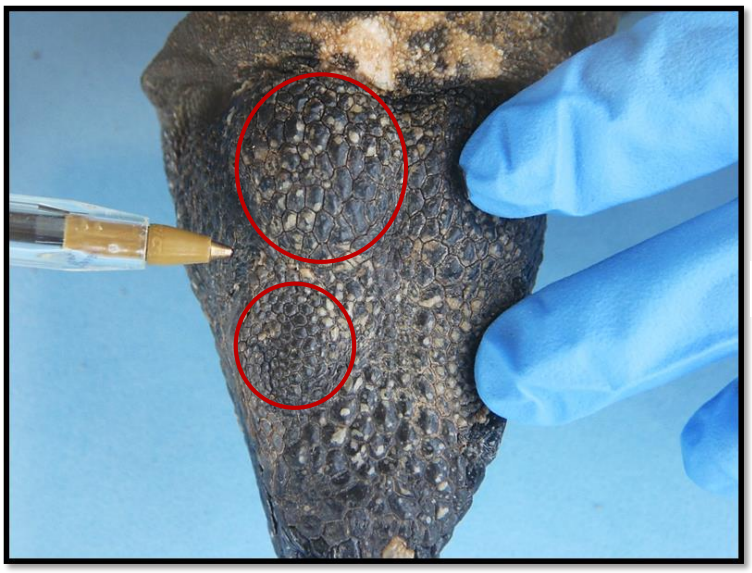
7

9. Número mínimo de escamas entre los semicírculos supraorbitales. Se realizó el conteo del número de escamas que se localizan sobre el hueso frontal, como se observa en el área señalada entre las flechas en la Imagen 8.



8

10. Número mínimo de escamas ente los semicírculos supraorbitales e interparietales. Se contó el número de escamas en el área señalada por el bolígrafo situada sobre el hueso interparietal entre los círculos rojos; el círculo superior indica el semicírculo interparietal y, el círculo inferior indica el semicírculo supraorbital (Imagen 9).

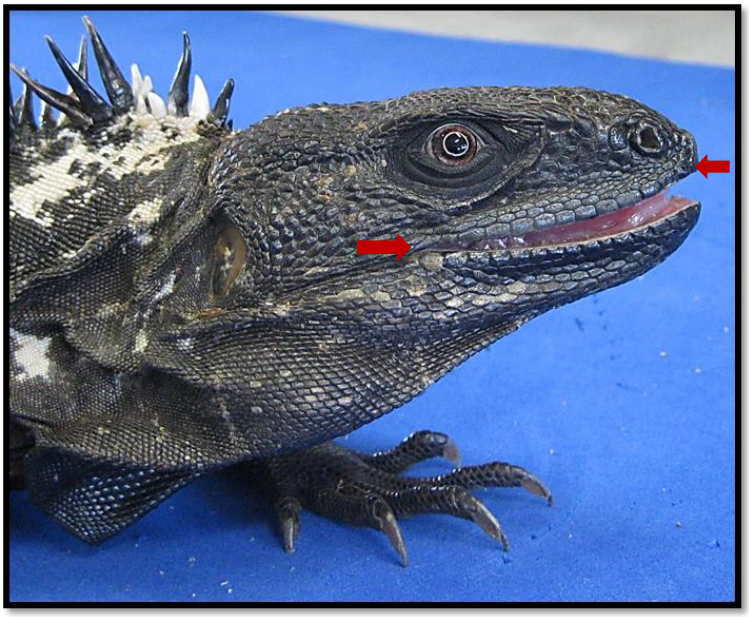


9

11. Número mínimo de escamas entre las escamas suboculares y supralabiales. Se contó el número de escamas encontradas entre el área señalada por las flechas; la flecha superior indica las escamas suboculares y la flecha inferior indica las supralabiales (Imagen 10).

10

12. Número de escamas supralabiales. Se registraron las escamas presentes al margen del hocico incluyendo la escama oblicua. En la Imagen 11 se encuentran delimitadas por las flechas de color rojo, la flecha de lado izquierdo señala la escama oblicua.



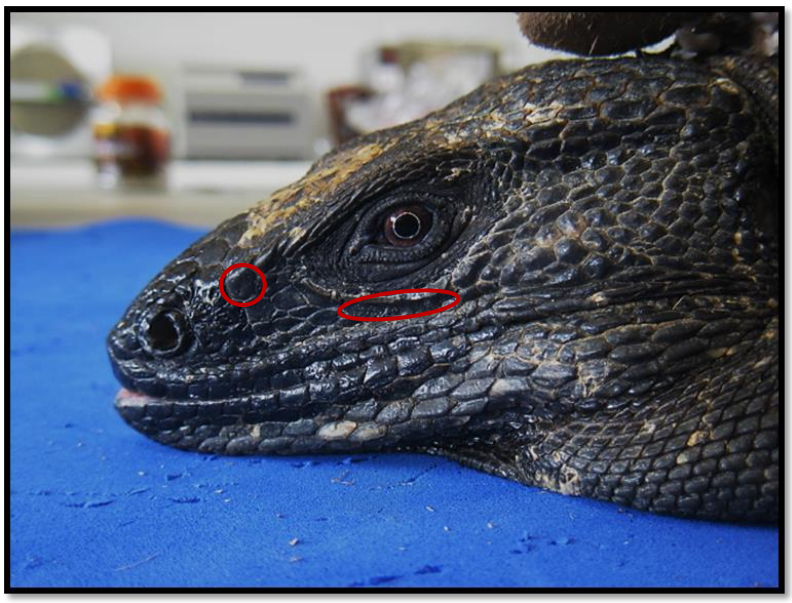
11

13. Número de escamas entre las dos escamas cantales. Se refiere al número de escamas entre la escama cantal derecha y la escama cantal izquierda. En la Imagen 12

se observa la escama cantal derecha encerrada en un círculo rojo y la flecha indica el área sobre la que se realizó el conteo.

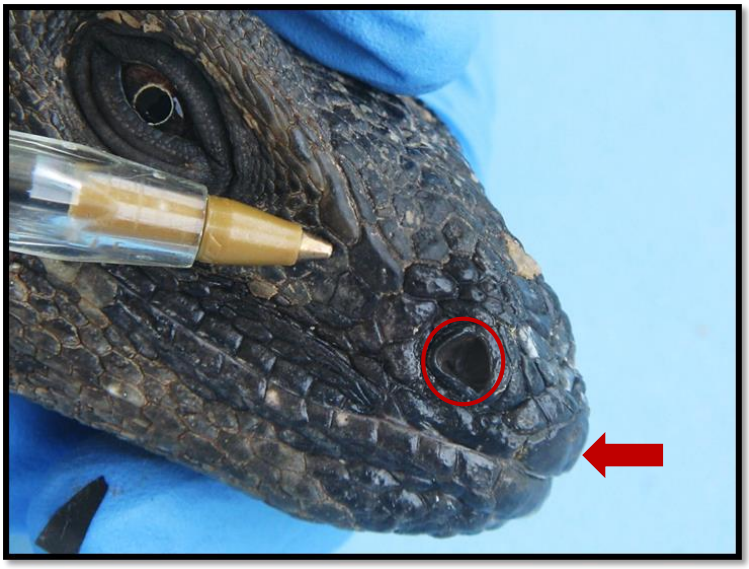
12

14. Número de escamas entre la cantal o superciliar y la escama subocular agrandada central. Son aquellas escamas que se sitúan entre el círculo de color rojo, que delimita la escama cantal del lado izquierdo de la cabeza de la iguana y el óvalo color rojo, que delimita la escama subocular agrandada central (Imagen 13).



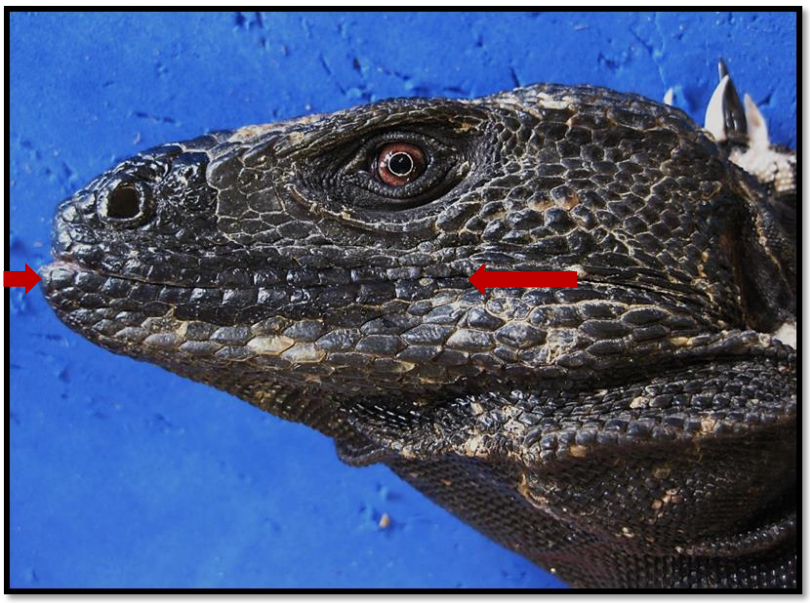
13

15. Número de escamas entre nasal y rostral (Imagen 14). Se contó el número de escamas entre la escama nasal (círculo rojo) y la escama rostral (flecha roja), por lo general se observan de dos a tres escamas.



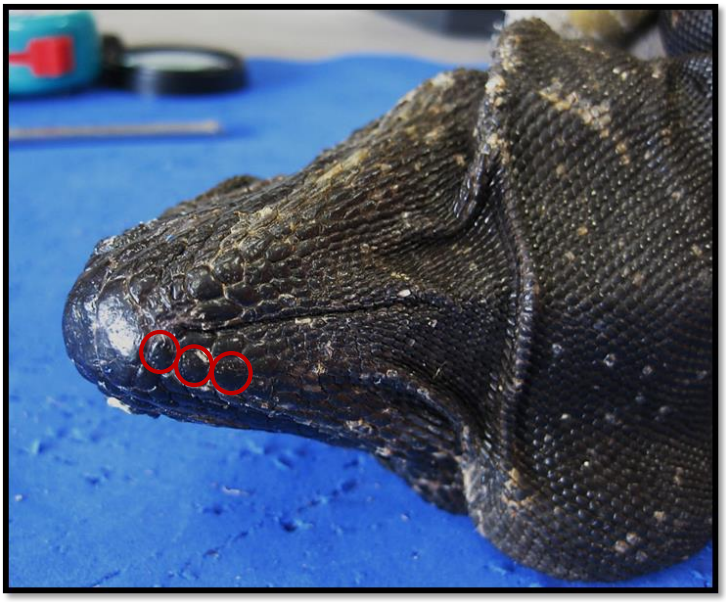
14

16. Número de escamas infralabiales. Estas escamas son distintivamente grandes (Imagen 15). Se realizó el conteo desde la punta hasta la comisura del hocico, indicada por la flecha de lado derecho.



15

17. Número de escamas postmentales. Por lo general son grandes, en la Imagen 16 los círculos delimitan tres escamas postmentales.

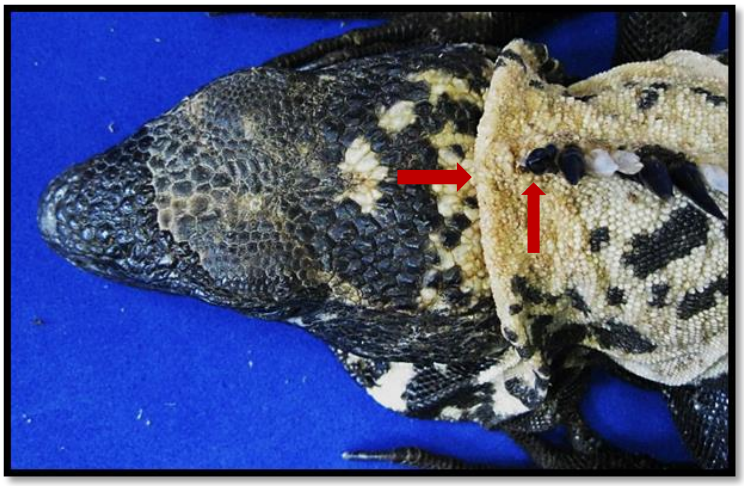


16

18. Número de espinas agrandadas de la cresta dorsal media. En la Imagen 17 se aprecia el conteo de las espinas, las flechas rojas delimitan el inicio y fin de la cresta dorsal.

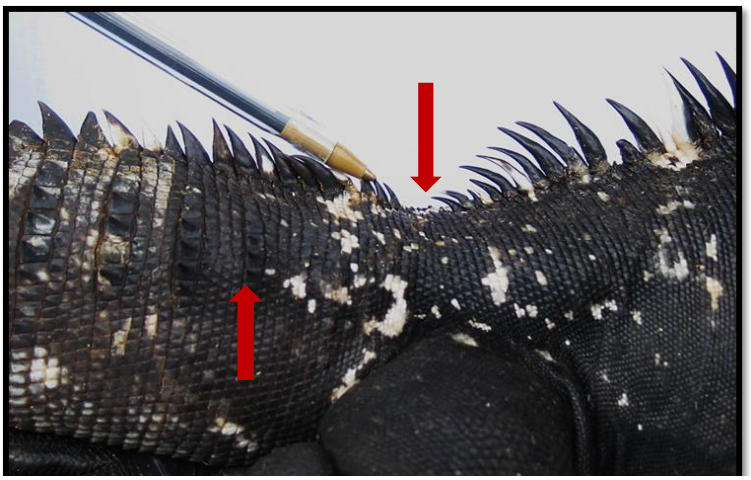
17

19. Número de escamas entre las nucales y la primera espina de la cresta dorsal media. Son unas escamas diminutas para las que se utilizó una lupa, la flecha roja de la izquierda está situada sobre las escamas nucales e indica el inicio de las escamas diminutas, la flecha que señala hacia arriba indica la primera espina de la cresta dorsal, hasta donde se realizó el conteo (Imagen 18).



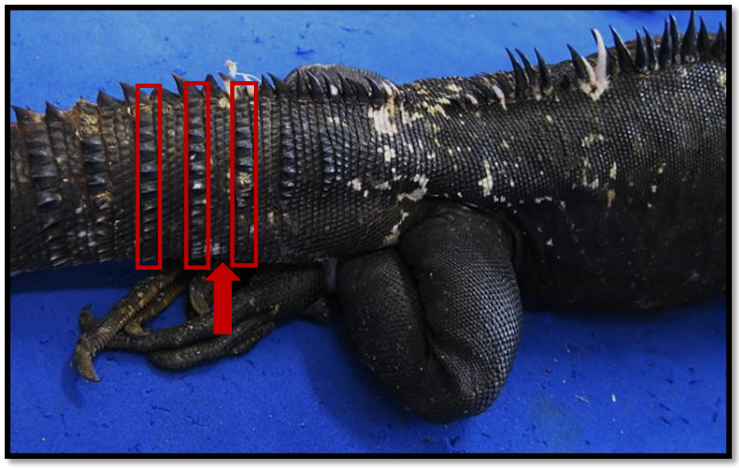
18

20. Número de filas de escamas entre la última espina de la cresta dorsal media (flecha que señala hacia abajo) y el primer verticilio de las escamas caudales espinosas (flecha que señala hacia arriba) (Imagen 19).



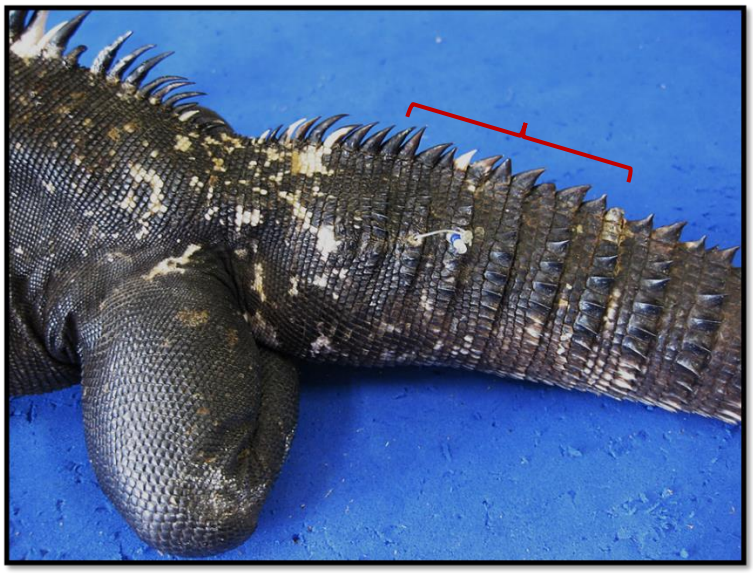
19

21. Escamas intercalares con filas incompletas de escamas caudales. Son escamas planas entre las escamas caudales espinosas. En la Imagen 20, los rectángulos rojos muestras los anillos de escamas caudales espinosas, la flecha roja indica las escamas intercalares planas. Se contaron el número de anillos de escamas intercalares planas con filas incompletas a lo largo de la cola (las que se interrumpen conforme se acercan a la línea media).



20

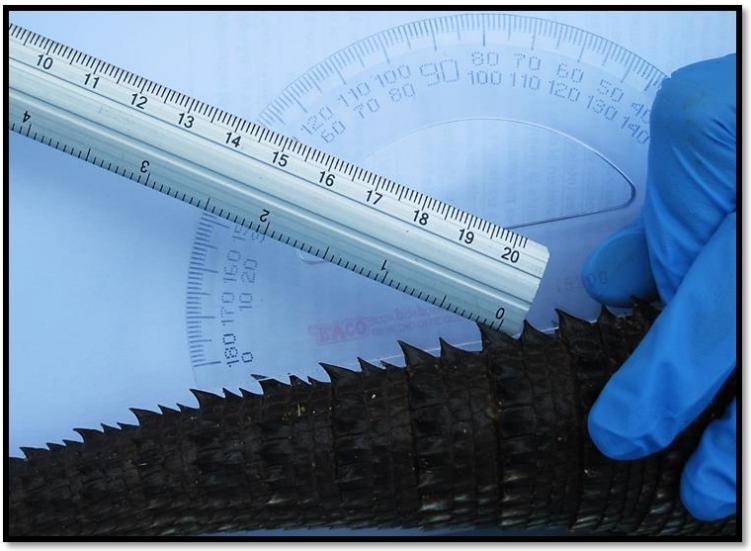
22. Número de intercalares con tres filas completas de escamas caudales. La llave de color rojo, delimita los anillos intercalares con tres filas completas de escamas planas (Imagen 21).



21

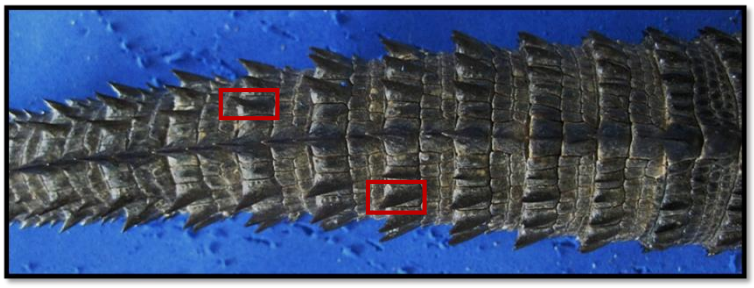
23. Número de intercalares con dos filas completas de escamas caudales. Son las escamas dispuestas en anillos, se ubican después de los primeros anillos que poseen tres filas completas de escamas caudales (caracter número 22). En la Imagen 21 se observan por debajo de la llave color rojo.

24. Ángulo de las quillas de las escamas caudales. Con ayuda de un transportador y una regla evaluamos los ángulos de las quillas, en la Imagen 22, se observa que el ángulo más pronunciado de las quillas de las escamas caudales es de 31°.



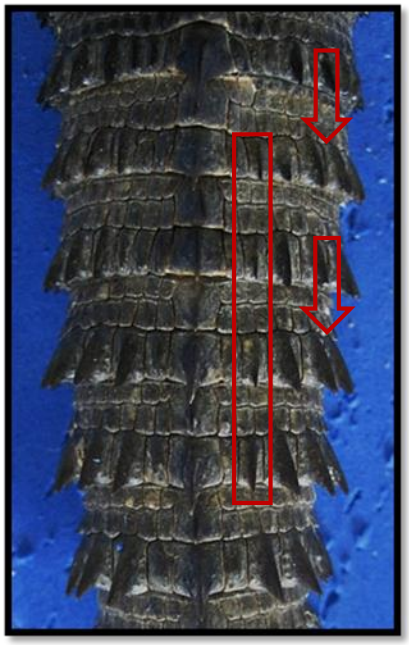
22

25. El arreglo de las escamas caudales espinosas puede ser de dos posibles formas: 1) recto en medio de la escama y 2) oblicuo. En la Imagen 23 se observan dos escamas espinosas de condición oblicua hacia afuera (rectángulos en color rojo).



23

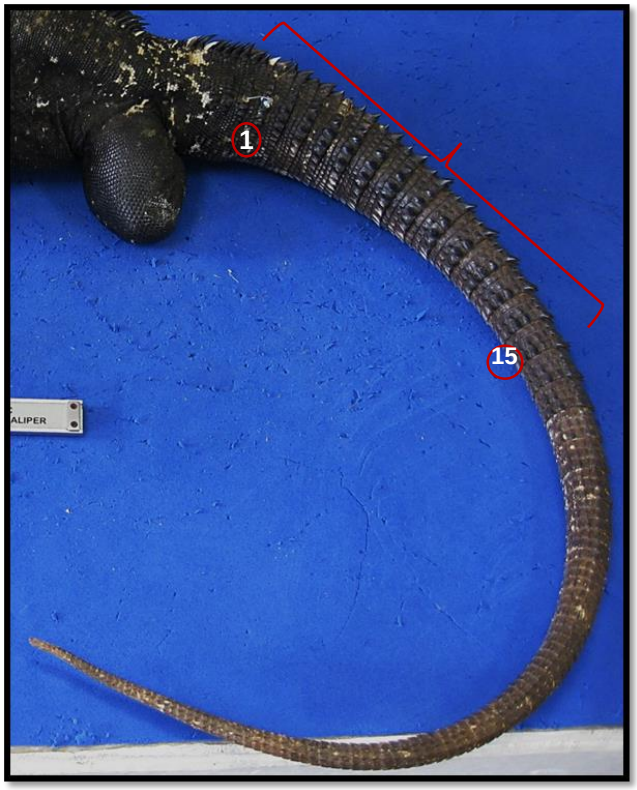
26. La condición de la espinosidad de las escamas caudales paramedias puede presentarse de tres formas: 1) ninguna espinosa, 2) las escamas paramedias internas más espinosas que las exteriores y 3) paramedias internas menos espinosas que las exteriores. En la Imagen 24 se muestra la condición 3, el rectángulo rojo delimita las escamas paramedias internas y las flechas indican las escamas paramedias externas.



24

27. Condición de las escamas paramedias internas del séptimo verticilio caudal. La condición de estas escamas puede ser: 1) planas ó 2) abultadas.

28. Número de verticilios caudales con escamas paramedias espinosas. En la Imagen 25, la llave color rojo delimita el número de verticilios caudales con escamas paramedias espinosas, se observa un total de 15.



25

29. Número de verticilios caudales totales. Para ello, se cuentan los verticilios con escamas paramedias espinosas, así como los verticilios que carecen de ellas. En la Imagen 25, se observa un total de 17.

30. Número de lamelas subdigitales en el dedo cuatro, corresponde al dedo más largo y se cuenta a partir de la uña hasta la unión del dedo con la pata (Imagen 26).

31. Para obtener el número de escamas dorsales paramedias en una cabeza de longitud, se toma la longitud de la cabeza y se traslapa sobre el dorso. Se cuenta la totalidad de escamas que quedan dentro de esta longitud (Imagen 27).

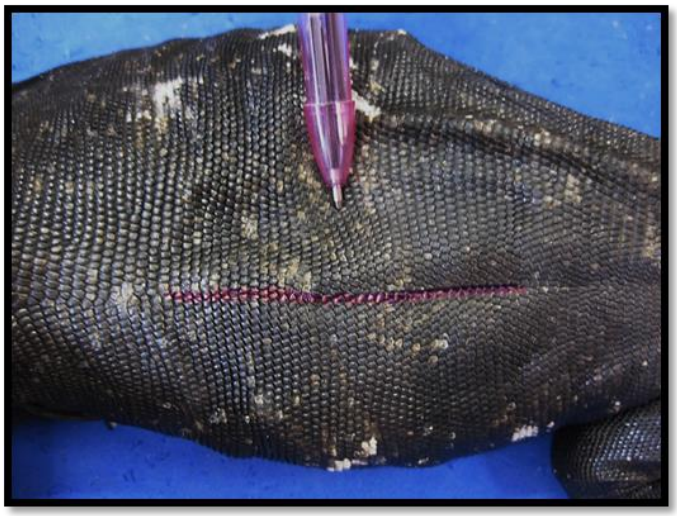
32. El número de escamas midventrales en una cabeza de longitud, se obtiene tomando la medida de la cabeza de la iguana y traslapando esta longitud en la parte ventral (Imagen 28).

28

33. Número de escamas alrededor de la mitad del cuerpo. Esta medida se toma desde la mitad del dorso a la mitad del vientre. Se observa la secuencia de conteo de escamas alrededor de la mitad del cuerpo. Se inicia desde la escama adyacente a la línea de la cresta dorsal espinosa (Imagen 29 A), se continúa sobre las costillas (Imagen 29 B) y se finaliza a la mitad del vientre de la iguana (Imagen 29 C).

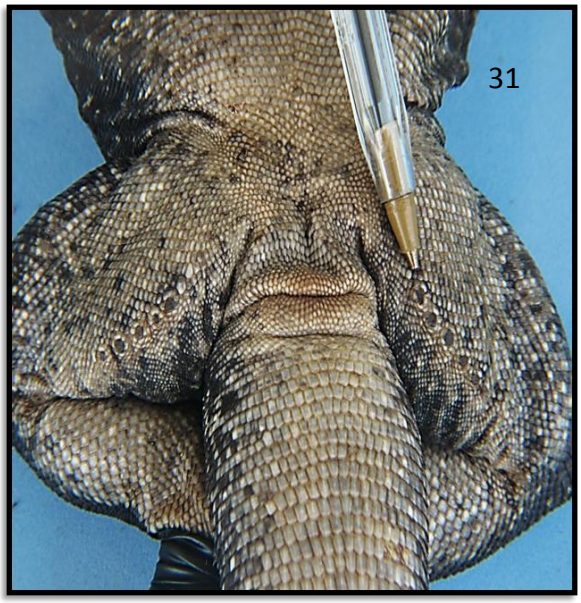
29 A

29 B



29 C

34. Número de poros femorales. En caso de que se encontraran diferencias, se anotó el número de poros en muslo izquierdo y muslo derecho, respectivamente. Se observa un individuo macho de iguana negra con cinco poros femorales en muslo derecho y seis en muslo izquierdo (Imagen 30). Nótese que los poros son más grandes y mucho más fáciles de percibir respecto de las hembras (Imagen 31).



35. Marcas o áreas pálidas/blancas. Se pueden observar de diversos patrones, pero los más comúnes son: 1) presentes a lo largo del dorso, 2) restringidas a la porción anterior del dorso, 3) restringidas a la porción posterior del dorso, o bien, 4) ausentes. En las Figuras 32 A y 32 B se observan pequeñas manchas blancas, distribuidas a lo largo del

dorso de manera irregular. Las manchas blancas pueden llegar a abarcar por completo el dorso (Imagen 33 A), o preferentemente hacia la parte posterior (Imagen 33 B).

32 A

32 B

33 A

33 B

36. Los caracteres ausentes en todas las iguanas evaluadas fueron tres:

1. Número de intercalares con una fila completa de escamas caudales.
2. Bandas transversales dorsales oscuras sobre el cuerpo:
    a) con centro pálido en la región vertebral
    b) sin centro pálido
3. Número de bandas transversales dorsales oscuras sobre el cuerpo.

Apéndice 2

Matrices de correlación obtenidas con el Software ML-Relate para establecer el parentesco de los individuos de la población cautiva de *Ctenosaura pectinata*

En la Figura A2.1 se observan las categorías de relación de parentesco entre cada uno de los individuos. En el Figura A2.2 se observan los valores de r asociados a cada una de estas categorías y en rojo destacan los valores que resultaron estadísticamente significativos.

MATRIX OF RELATIONSHIPS

This report shows the relationship between each pair of individuals
that has the highest likelihood among the four following relationships:

U = Unrelated
HS = Half Sibs
FS = Full Sibs
PO = Parent / Offspring

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53
1	-																																																					
2	U	-																																																				
3	U	U	-																																																		
4	U	U	HS	-																																																	
5	U	U	U	U	-																																																
6	U	U	U	U	U	-																																														
7	HS	U	U	HS	U	U	-																																													
8	U	U	HS	PO	U	U	U	-																																												
9	U	U	U	U	U	U	HS	U	-																																											
10	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	-																																										
11	U	U	HS	U	U	U	HS	U	PO	U	-																																									
12	U	U	U	U	FS	FS	HS	U	U	U	HS	-																																								
13	U	U	U	U	U	U	HS	FS	U	U	PO	U	-																																							
14	U	U	U	U	U	FS	U	U	U	U	U	U	U	-																																						
15	U	U	U	U	HS	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	-																																					
16	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	-																																				
17	U	U	HS	HS	U	U	HS	U	PO	U	PO	U	FS	U	U	U	-																																			
18	HS	FS	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	-																																	
19	U	U	U	HS	U	U	U	HS	HS	U	HS	U	HS	U	U	HS	U	U	-																																
20	U	U	U	PO	U	U	FS	U	U	HS	U	U	HS	U	U	U	U	U	HS	-																															
21	U	FS	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	HS	U	U	U	U	U	HS	HS	-																														
22	HS	U	U	HS	U	U	FS	U	U	U	U	HS	PO	U	U	U	U	U	U	FS	U	-																													
23	U	FS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	FS	U	U	U	U	-																											
24	U	U	FS	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	-																										
25	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	PO	U	-																								
26	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	-																						
27	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	HS	U	U	-																					
28	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	PO	U	U	HS	U	U	U	U	HS	U	FS	HS	U	U	U	U	U	U	-																				
29	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	-																			
30	U	PO	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	U	PO	U	U	PO	FS	U	-																		
31	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	-																		
32	U	U	U	PO	U	U	HS	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	PO	U	-																	
33	U	PO	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	HS	U	HS	U	U	U	U	FS	U	FS	U	U	-															
34	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	HS	-															
35	U	PO	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	HS	U	-														
36	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	-														
37	U	U	U	U	U	U	HS	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	HS	-													
38	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	HS	U	U	U	-												
39	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	PO	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	PO	U	FS	HS	U	HS	U	-										
40	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	HS	U	U	PO	-										
41	U	U	HS	U	U	U	U	U	FS	U	FS	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	FS	HS	U	U	FS	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	HS	-									
42	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	FS	U	HS	U	U	U	-						
43	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	FS	FS	U	U	-						
44	U	U	PO	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	-					
45	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	FS	U	-					
46	U	U	U	PO	PO	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	PO	U	U	U	U	PO	U	U	PO	U	U	U	U	U	U	U	U	PO	U	U	PO	U	U	PO	U	U	-			
47	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	FS	U	U	U	U	U	-				
48	U	U	PO	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	PO	U	PO	U	U	HS	U	U	PO	U	HS	U	U	FS	U	PO	U	U	HS	U	U	U	HS	U	U	PO	FS	PO	U	PO	HS	U	PO	U	-			
49	U	U	U	FS	U	U	U	FS	U	U	U	U	U	U	FS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	HS	U	U	U	U	HS	HS	U	U	U	U	U	-			
50	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	PO	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	HS	U	U	U	U	PO	U	U	PO	U	FS	PO	U	HS	U	-		
51	U	U	U	HS	U	FS	U	U	U	U	U	U	U	FS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	PO	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	-		
52	U	U	U	PO	U	U	U	FS	U	U	U	U	PO	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	U	U	HS	U	U	U	PO	FS	U	U	U	PO	U	U	HS	PO	U	FS	HS	U	U	U	U	FS	HS	FS	U	-	
53	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	U	U	U	U	U	U	PO	FS	U	HS	FS	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	-

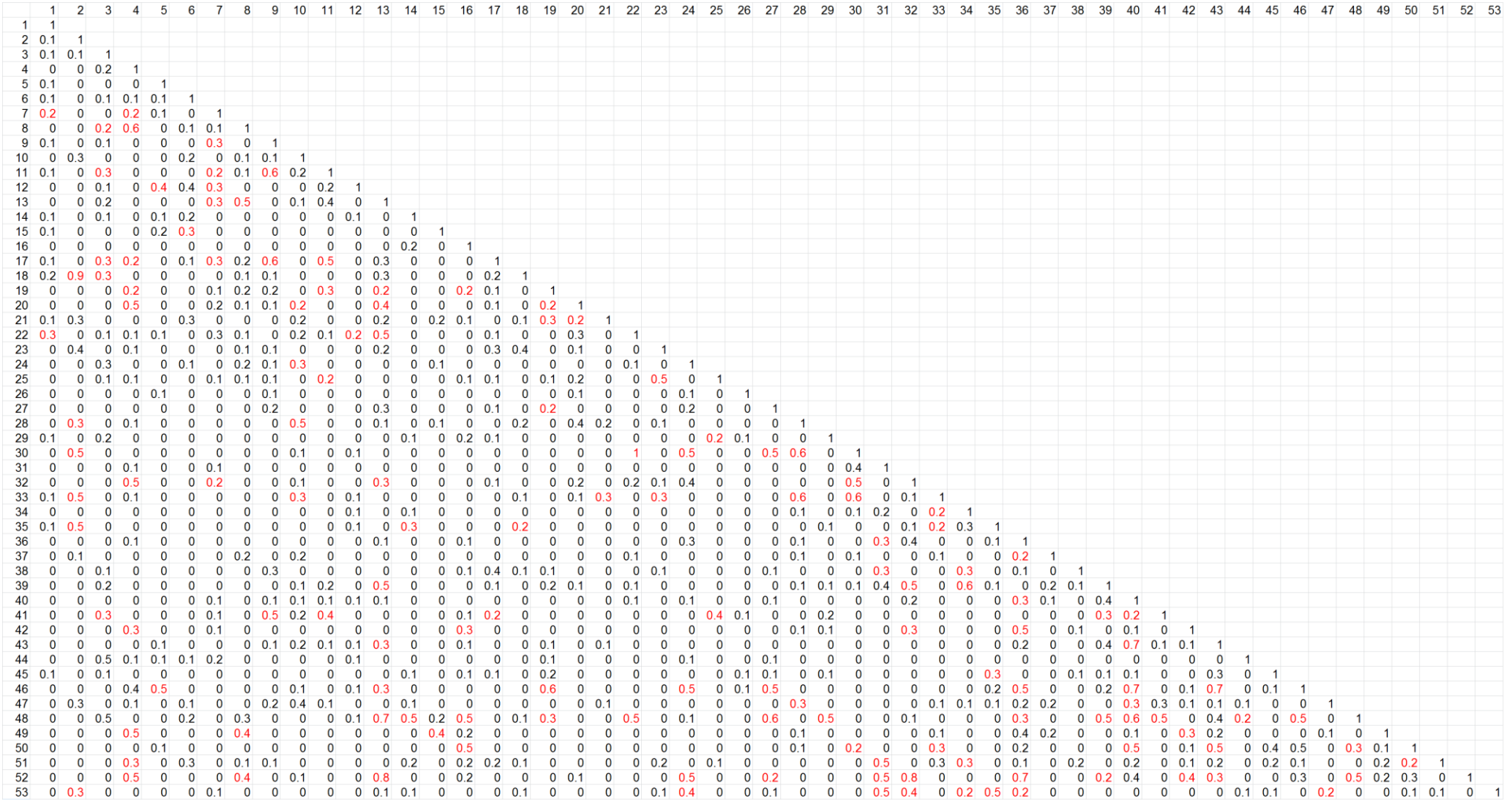


Figura A2.2. Matriz de correlación de valores r, asociados a las categorías de parentesco entre los individuos de la población de iguana negra en cautiverio.

Apéndice 3

Solución tampón de lisis TEN (Para un volumen de 150 ml)

EDTA 2.85 g

NaCl 0.8625 g

SDS 3.15 g

TrisHCl 150ml

Proteinasa K (líquida, SIGMA ALDRICH®) 26.25 μl

Solución tampón TE 1X (Para un volumen de 100 ml)

Tris (1M) , 1 ml

EDTA (0.5M*), 0.2 ml

llevar a pH8 y aforar a 100 ml

Solución tampón TBE 1 X (Para un volumen de 1000 ml)

Tris Base 10.8 g

Ácido Bórico 5.4 g

EDTA (0.5M*) 4 ml

disolver en 700 ml de agua bidestilada (ddH_2O), llevar a pH 8 y aforar a 1000 ml.

*Para preparar EDTA 0.5 M

EDTA 93.05 g

disolver en 200 ml de agua desionizada, llevar a pH 8 y ajustar el volumen a 500 ml