

Genética de la conservación y toxinología de las especies de
fauna amenazadas de extinción en el bosque seco del Valle del
Motagua

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Genética de la conservación y toxínología de las especies de
fauna amenazadas de extinción en el bosque seco del Valle del
Motagua

Trabajo de graduación presentado por:

Erick Manuel Andrade Zúñiga, y

Kervin Adolfo Cardona Ramírez

para optar al grado académico de Licenciados en Biología;

Edwin Estuardo Castañón Castillo,

José Santiago Rodas Martínez y

Guido Rolando Rossi Herring

para optar al grado académico de Licenciados en Bioquímica y
Microbiología.

Guatemala,

2017

Vo.Bo.

(f)  _____

M.Sc. Daniel Ariano Sánchez

Tribunal evaluador.

(f)  _____

M.Sc. Daniel Ariano Sánchez

(f)  _____

Ph. D. Pamela Pennington

(f)  _____

M.Sc. Gabriela Alfaro Marroquín

Fecha de aprobación: Guatemala, 9 de noviembre de 2017

PREFACIO

Por Edwin Castañón

Antes de comenzar quiero agradecer a Dios por haberme permitido llegar a esta etapa de mi vida, ayudarme a continuar con mis estudios y por guiarme en esta etapa de mi vida. A mi madre y mi padre por darme la vida, por sus sabios consejos y por todo el apoyo que me brindaron durante mi carrera, y a pesar de que muchas veces se veía difícil, nunca se rindieron.

Mi agradecimiento a M. Sc. Daniel Ariano y Lic. Miguel Morales por haberme brindado su confianza y paciencia. Gracias a M. Sc. Daniel Ariano, por todo el asesoramiento en cuanto temas sobre ecología, conservación, análisis de datos y estadística. Gracias Lic. Miguel Morales por todo el asesoramiento en laboratorio, ayuda en la creación de la metodología, elección de kits de extracción, amplificación y purificación, y por *troubleshooting*.

Agradecimientos a la organización Zootropic por el apoyo financiero y permitir la recolección de muestras. De igual manera, gracias a *International Iguana Foundation* (IIF) por el apoyo económico. A la Universidad del Valle de Guatemala, el departamento de Bioquímica y Microbiología, y Biología por el apoyo en reactivos y uso de los laboratorios y equipo de los mismos. A INACIF por haber brindado del papel Whatman® FTA para el almacenamiento de las muestras.

A Gilberto Salazar por su apoyo y esfuerzo en todo el trabajo de campo, así como a su esposa e hijos por la gran ayuda en la recolección de muestras y trabajo en campo. Gracias a Lic. Elena Dardón por todo el asesoramiento en la compra de cebadores y el procedimiento para mandar a secuenciar los productos de PCR. A la Dra. Pamela Pennintong, M. Sc. Daniel Ariano y Lic. Miguel Morales, por la colaboración en la revisión de mi protocolo de trabajo de graduación y por la revisión de este documento.

Por último, gracias a mis compañeros y amigos de este Megaproyecto: Santiago Rodas, Guido Rossi, Kervin Cardona y Erick Andrade.

Por Guido Rossi

Este trabajo representa el fin de una etapa de mi vida, una etapa que presentó dificultades, frustraciones, y un sinnúmero de alegrías y amistades que, sin duda, son para toda la vida. Al entrar en la Universidad pensaba en la gran cantidad de temas que aprendería, sin darme cuenta de que hay cosas que no se aprenden en un salón de clases. Existen cosas que van más allá de lo académico, y tiene que ver con la vida misma; por cómo percibimos nuestro entorno y experimentamos sentimientos, tales como: amor, amistad, pasión, alegría; forjando amistades que sobrepasan un salón de clase y se involucran en todo aspecto de la vida.

El presente trabajo de investigación lo dedico en primer lugar a Dios, por ser la iluminación en cada paso de mi vida; a Don Bosco, quién marcó mi vida y ha sido mi inspiración para buscar la excelencia “*Ad astra*”. También dedico este trabajo a mis padres: Guido y Balesca, por su apoyo incondicional en cada etapa, y su fortaleza en las dificultades del camino. Quienes, sin haberlo pedido, me dieron todo. A mi hermano, Ángel, por obligarme a ser un ejemplo que seguir, y por ser esa persona que nunca falla. A mis abuelitos, Rolando y América, y Guido y Mariaelena; por ser guías y fuentes de sabiduría en cada momento. A mis tíos: Anjeanette, Hugo, Carlos, Hipólita y Gino, por su cariño y apoyo. A mis primos: Carlo, Antonella, Sebastián, Juandiego y Hugo, con amor. Y a las familias: Malouf Comas y López González, por su cariño durante todos estos años. A mis amigos: Santiago, Edwin, Kervin, Erick, Miguel, Diane, Pablo, Andrea C, Luisa, Jorge P, Carlo, Isa, Mariana, Ana, y Jhoselyn

Agradezco de forma muy especial a la Universidad del Valle de Guatemala, por la educación brindada durante estos años, especialmente al Departamento de Biología, por permitirme la realización del trabajo de graduación haciendo uso de sus instalaciones para la parte experimental, al Departamento de Bioquímica y Microbiología, por ser fundamental en mi formación académica durante estos años. El presente trabajo no hubiera sido posible sin la contribución económica de International Iguana Foundation. Así mismo, agradezco a la Reserva Natural para la Conservación del Heloderma (RNH) y Zootropic (en especial a M.Sc. Daniel Ariano) por apoyar este proyecto presentando instalaciones y material: a INACIF (especialmente Lic. Estuardo Solares) por la donación de papel filtro Whatman® FTA, facilitando en gran medida la obtención de muestras en campo. Por último, agradezco a Paola por su enseñanza en la recolección de sangre periférica, agilizando la extracción de muestras.

Por último, agradezco a mis asesores, M.Sc. Daniel Ariano y Lic. Miguel Morales, por la asesoría, guía y amistad brindada durante la realización de este proyecto, su apoyo fue fundamental para la realización correcta de la investigación, contribuyendo también a mi formación como investigador. Así mismo agradezco a Gilberto Salazar por su ayuda en campo, haciendo posible la recolección de la gran mayoría de muestras; con quién también aprendí muchas cosas.

Por Kervin Cardona

Al finalizar este trabajo, también estoy finalizando una etapa de mi vida. El haber trabajado con cada una de las personas que me apoyaron y me extendieron una mano cuando lo necesitaba representó uno de los mejores momentos de mi vida. He tenido una gran cantidad de experiencias a lo largo de mi vida universitaria, sin embargo, pocas se pueden comparar al momento en que estamos finalizando este proyecto, por lo que me gustaría agradecer a todas aquellos que estuvieron con nosotros a lo largo del camino.

Quiero agradecer a Dios el haberme dado la oportunidad de permanecer con vida y lograr culminar con éxito esta increíble faena. A mis padres, María del Carmén Ramírez y Gustavo Cardona, que a pesar de no entender lo que estaba realizando siempre me apoyaron de forma incondicional y estuvieron allí para animarme cuando lo necesitaba. Me gustaría dar un agradecimiento especial a la Fundación Juan Bautista Gutiérrez, gracias a la cual tuve la oportunidad de cursar mis estudios universitarios en la Universidad del Valle de Guatemala.

Agradezco también a las International Iguana Foundation, gracias a la cual pudimos obtener los fondos necesarios para la investigación. A la Universidad del Valle de Guatemala, la cual nos apoyó con los laboratorios y equipos sin los cuales este estudio no podría haberse llevado a cabo. También un agradecimiento a la Reserva Natural para la Conservación del Heloderma y el Bosque Seco, especialmente al Sr. Gilberto Salazar, ya que sin su apoyo no habría sido posible completar la recolección de especímenes para los estudios. A Zootropic, que nos brindó su ayuda a lo largo del proyecto para poder llevarlo a buen término.

También quisiera agradecer a mis asesores, el M. Sc. Daniel Ariano Sánchez y el Lic. Miguel Morales, quienes nos acompañaron desde el inicio de nuestro proyecto, desde que solamente era la idea de unos cuantos jóvenes, hasta este momento, en el que vemos culminado todo nuestro esfuerzo.

Finalmente, agradezco a mis compañeros de megaproyecto: Erick Andrade, Edwin Castañón, Guido Rossi y Santiago Rodas. Amigos sin los cuales todo esto probablemente no habría sido posible.

Por Santiago Rodas

La ciencia forma parte de la vida de todos, está involucrada en cada aspecto de lo que se experimenta, y por lo tanto es importante siempre estarla estudiando. Esta investigación se realizó como parte de un megaproyecto, para poder realizar descubrimientos multidisciplinarios. Esto no hubiera sido posible sin el apoyo de mis asesores, Daniel Ariano y Miguel Morales quienes siempre estuvieron pendientes de nuestros avances, y aportaron todo lo que pudieron para que el proyecto fuera exitoso. Además, del apoyo del Departamento de Biología, por parte de Gabriela Alfaro, Priscila Juárez, y Ericka Santos, del Departamento de Bioquímica y Microbiología, por parte de Pamela Pennington, Marlen Sulet, Nohemy Zelada, y Lucía Nitsch; y del Departamento de Química, por parte de Ángel Ramírez, Irma Orellana y José Carlos Chiquín.

De la misma manera, quisiera agradecer a la Asociación Zootropic, a Gilberto Salazar, y a Erick López, por apoyarnos con la obtención de muestras, para su estudio. Además, estas personas permitieron que las experiencias en el campo fueran posibles y exitosas. Su conocimiento y trabajo fue indispensable para la realización de esta investigación. También quisiera agradecer a mis compañeros, Guido Rossi, Erick Andrade, Edwin Castañón, y Kervin Cardona, por el apoyo que me brindaron, no solamente durante el megaproyecto, sino también durante toda la vida universitaria, es un privilegio trabajar con ellos.

Igualmente, agradecer a la Universidad del Valle de Guatemala, mi formación académica en esta institución fue invaluable en mi formación como científico. A mis maestros José Carlos, Dalia, Gonzalo, Daniel, Luis M, y Andrés por inspirar mi curiosidad científica; y a Miguel, Irma, Angelika, y Elena, por darme la oportunidad de formarme como auxiliar de sus cursos, y apoyar mi sueño como futuro catedrático. Sus enseñanzas fueron más allá del salón de clases.

Quisiera dedicar este trabajo a mi abuelo, Pedro Rubén Rodas Barrios, principalmente. Él inspiró en gran medida, el entusiasmo con el cuál yo realicé mis viajes de campo, y la riqueza de mis experiencias, me permitía compartir mucho con él; espero que descanse en paz. Además, le dedico y agradezco esta experiencia a mi familia, mis papás, Vinicio Rodas y Hilda Martínez, hicieron posible que llegara hasta aquí, espero hacer que se sientan orgullosos del fruto de su trabajo. También mis hermanos, Juan Pablo y Soledad, que me apoyaron durante todo este recorrido para fortalecer mi pasión por la ciencia.

Asímismo, quisiera dedicar esto a mis compañeros, Augusto, Carlo, Diane, Pablo, Andrea, Jhoselyn, Jorge, Luisa, Nina, Elena, Paula, Cristian, Sofía, Ninoshka, y especialmente a Lucía. Les agradezco siempre estar allí apoyándome en mi formación académica y personal. También por siempre recordarme que se debe buscar la excelencia, y que siempre puedo mejorar. Quiero recordarles que, como científicos, tenemos un deber con la sociedad; porque vivimos para adquirir conocimiento y distribuirlo.

Por Erick Andrade

Esta investigación se realizó entre julio 2016 y octubre 2017 gracias al apoyo de la Universidad del Valle de Guatemala, Zootropic y The International Iguana Foundation.

Agradezco a mi asesor, M. Sc. Daniel Ariano por su valiosa orientación, enseñanzas y ayuda en trabajo de campo y logística de las distintas fases de este proyecto. De igual forma al Lic. Miguel Morales, por su apoyo y guía durante el trabajo de laboratorio, así como por sus sugerencias de mejora a lo largo de todo el desarrollo del proyecto. A Gilberto Salazar, por su invaluable apoyo en trabajo de campo y siempre haber estado dispuesto a compartir sus conocimientos y experiencia conmigo. A mis compañeros de megaproyecto, Kervin Cardona, Edwin Castañón, Santiago Rodas y Guido Rossi, por su apoyo durante los viajes de campo, así como por su compañía durante cada fase de este proyecto. Agradezco también a mis compañeros y amigos, Gerardo Estrada, Ninoshka López, Cecilia Pira y Alejandra López, por su apoyo y compañía durante trabajo de campo y laboratorio.

En el plano personal, agradezco a mi madre Eva Zúñiga, quien me ha apoyado incondicionalmente a lo largo de mi carrera universitaria. Sin su ayuda en todos los ámbitos de mi vida, nunca podría haber culminado este proyecto. Dedico esta investigación a mi padre, Erick Andrade, cuyo legado vive en mí y a quien debo mucho de la persona que soy. Agradezco al resto de mi familia por siempre alentarme en el ámbito académico.

ÍNDICE

Cóntenido	Página
PREFACIO	v
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE CUADROS	xvi
RESUMEN	xviii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO	4
A. Descripción del bosque seco del Valle del Motagua y factores de amenaza.	4
1. Bosque seco del Valle del Motagua.....	4
2. Fragmentación de hábitat.....	5
3. Cambio de uso de suelo.	6
B. Descripción de las especies estudiadas.	6
1. Descripción de la especie de Heloderma (<i>Heloderma charlesbogerti</i>)	6
2. Descripción de la especie Iguana de órgano (<i>Ctenosaura palearis</i>)	8
3. Descripción de <i>Crotalus simus</i>	10
4. Características de orioles y picogrueso amarillo.....	11
C. Genética de la conservación como una ciencia multidisciplinaria.	13
1. Genética poblacional y uso de genes mitocondriales para la explicación de eventos evolutivos.	13
D. Toxinología	16
1. Defensa química.	16
2. Toxicidad en aves.	17
3. Veneno de <i>Crotalus simus</i>	17
4. Veneno de <i>Heloderma charlesbogerti</i>	18
5. Fosfolipasas A ₂	19
III. JUSTIFICACIÓN.....	21
IV. OBJETIVOS.....	24
A.General:	24
B.Específicos:	24
V. HIPÓTESIS.....	25
A.Genética poblacional	25
1. Genética poblacional del lagarto escorpión, <i>Heloderma charlesbogerti</i> (Sauria: Helodermatidae) e iguana del órgano, <i>Ctenosaura palearis</i> (Sauria: Iguanidae) en el bosque seco del Valle del Motagua, Guatemala.	25
2. Implicaciones de genética poblacional para el desarrollo de estrategias de conservación de la iguana de órgano, <i>Ctenosaura palearis</i> (Sauria: Iguanidae), y lagarto	

escorpión, <i>Heloderma charlesbogerti</i> (Sauria: Helodermatidae), en el bosque seco del Valle del Motagua	25
B. Toxinología	25
1. Síntesis verde de un inhibidor de fosfolipasa A2 y evaluación de su utilidad para reducir la actividad hemolítica del veneno de serpiente de cascabel (<i>Crotalus simus</i>) y lagarto escorpión (<i>Heloderma charlesbogerti</i>).....	25
2. Evaluación de la toxicidad de extractos de plumas de <i>Pheucticus chrysopeplus</i> (Aves: Cardinalidae) mediante ensayo de letalidad con <i>Artemia salina</i> (Anostraca: Artemiidae) como modelo <i>in vivo</i>	25
VI. DESARROLLO POR COMPONENTES DE MEGAPROYECTO	26
A.Genética poblacional de lagarto escorpión <i>Heloderma charlesbogerti</i> (Sauria: Helodermatidae) y la iguana de órgano <i>Ctenosaura palearis</i> (Sauria: Iguanidae), en bosque seco del valle del Motagua, Guatemala.	26
1. Metodología compartida para el estudio de ambas especies (<i>H. charlesbogerti</i> y <i>Ctenosaura palearis</i>).....	26
2. Resultados del estudio de genética poblacional de <i>H. charlesbogerti</i>	31
3. Discusión de resultados obtenidos del análisis de muestras de <i>H. charlesbogerti</i>	38
4. Resultados del estudio de genética poblacional de <i>C. palearis</i>	44
5. Discusión de resultados obtenidos del análisis de muestras de <i>C. palearis</i>	55
B. Implicaciones de la genética poblacional para el desarrollo de estrategias de conservación de la iguana de órgano, <i>Ctenosaura palearis</i> (Sauria: Iguanidae), y el lagarto escorpión, <i>Heloderma charlesbogerti</i> (Sauria: Helodermatidae), en el bosque seco del Valle del Motagua.	63
1. Metodología	63
2. Resultados obtenidos del análisis de amenazas de ambas especies en el bosque seco del Valle del Motagua	64
3. Discusión de resultados obtenidos del análisis de amenazas a las especies en el bosque seco.	67
C. Síntesis verde de un inhibidor de fosfolipasa A2 y evaluación de su utilidad para reducir la actividad hemolítica en el veneno de serpiente de cascabel (<i>Crotalus simus</i>) y lagarto escorpión (<i>Heloderma charlesbogerti</i>).	72
1. Metodología.	72
2. Resultados obtenidos de la síntesis del inhibidor y del ensayo enzimático realizado con veneno de ambas especies.....	75
3. Dicusión de resultados obtenidos de la síntesis del inhibidor y del ensayo enzimático.	80
D. Evaluación de la toxicidad de extractos de plumas de <i>Pheucticus chrysopeplus</i> (Aves: Cardinalidae) mediante ensayo de letalidad con artemia salina (Anostraca: Artemiidae) como modelo <i>in vivo</i>	82
1. Metodología	82
2. Resultados obtenido y discusión de la toxicidad de plumas de <i>P. chrysopeplus</i>	84
VII. CONCLUSIONES	86

A.Genética de la conservación	86
B.Toxinología	88
VIII. RECOMENDACIONES.....	89
A.Genética de la conservación	89
B.Toxinología	90
IX. LITERATURA CITADA	91
X. ANEXOS.....	102
Anexo 1. Protocolo de extracción de sangre periférica de reptiles.	102
Anexo 2. Licencia de colecta emitida por CONAP a asesor de trabajo de graduación y colaboradores.	103
Anexo 3. Carta de aprobación para el manejo de animales por parte del Comité de ética para el uso y cuidado de animales de la Universidad del Valle de Guatemala (CEUCA-UVG).	105
Anexo 4. Protocolo de extracción de ADN con kit comercial GenElute™Mammalian Genomic DNA Miniprep (G1N70).	106
Anexo 5. Protocolo de reacción en cadena de polimerasa (PCR) con kit comercial ReadMix™ Taq PCR Reaction Mix (P4600).	107
Anexo 6. Protocolo de purificación de productos de PCR con kit comercial SpinPrep PCR Clean-up marca Millipore (70976-3).	108
Anexo 7. Datos de colecta de todas las muestras de <i>H. charlesbogerti</i> y <i>C. palearis</i> en las distintas localidades del Valle de Motagua.	109
Anexo 8. Geles de agarosa 1.5% con productos purificados de gen <i>atpasa-6</i> para <i>Heloderma charlesbogerti</i> . Los geles fueron corridos a 90 volts/cm durante 60 minutos. ...	111
Anexo 9. Geles de agarosa 1.5% con productos purificados de genes <i>nadh4</i> y <i>ladhA</i> para <i>Ctenosaura palearis</i> . Los geles fueron corridos a 90 volts/cm durante 60 minutos.	112
Anexo 10. Muestra de electroferogramas obtenidas de la secuenciación del producto de PCR correspondiente al gen <i>atpasa-6</i> de <i>H. charlesbogerti</i> . El producto fue secuenciado por Macrogen, Inc, Corea; mediante secuenciación por método de Sanger.....	114
Anexo 11. Muestra de electroferogramas obtenidas de la secuenciación del producto de PCR correspondiente al gen <i>nadh4</i> de <i>C. palearis</i> . El producto fue secuenciado por Macrogen, Inc, Corea; mediante secuenciación por método de Sanger.	115
Anexo 12. Muestra de electroferogramas obtenidas de la secuenciación del producto de PCR correspondiente al gen <i>ladhA</i> de <i>C. palearis</i> . El producto fue secuenciado por Macrogen, Inc, Corea; mediante secuenciación por método de Sanger.	116
Anexo 13. Archivo “.nexus” del gen <i>atpasa-6</i> analizado en el programa PopArt para la generación de la red de haplotipos mediante el método de inferencia TCS.....	117
Anexo 14. Archivo “.nexus” del gen <i>nadh4</i> analizado en el programa PopArt para la generación de la red de haplotipos mediante el método de inferencia TCS.....	124
Anexo 15. Archivo “.nexus” del gen <i>ladhA</i> analizado en el programa PopArt para la generación de la red de haplotipos mediante el método de inferencia TCS.....	136
Anexo 16. Protocolo de síntesis para el bromuro de p-bromofenacilo a partir de 4-bromoacetofenona.....	147

Anexo 17. Caracterización del producto de la síntesis.	154
Anexo 18. Resultados de los ensayos <i>in vitro</i>	155
Anexo 19. Resultados de los ensayos de hemólisis indirecta.	155
Anexo 20. Protocolo operacional estándar (SOP; por sus siglas en inglés) para el manejo y descarte de veneno.	157
Anexo 21. Trabajo de campo realizado y equipo de trabajo involucrado en el muestreo y recolección de datos.	164

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema sobre la composición de cada componente del megaproyecto.	1
Figura 2. Ubicación del Valle del Motagua (morado) en Guatemala.....	4
Figura 3. Bosque seco del Valle del Motagua durante temporada húmeda en Cabañas, Zacapa.....	5
Figura 4. Lagarto escorpión (<i>Heloderma charlesbogerti</i>).	8
Figura 5. Iguana de órgano o shero (<i>Ctenosaura palearis</i>)..	10
Figura 6. Serpiente de cascabel (<i>Crotalus simus</i>).....	10
Figura 7. Sitio de ruptura entre los distintos tipos de fosfolipasas.	19
Figura 8. Sitio activo de las fosfolipasas A2 (Fernandes <i>et al.</i> 2010). Se observa la histidina 48, distintos tipos de sustratos, y una molécula de agua (verde) necesaria para la hidrólisis.....	19
Figura 9. Reacción de la inhibición de una fosfolipasa por medio del pBPB. Se muestran los residuos de His49 y Aspartato 48 (Asp48) de la estructura, demostrando el sitio de unión del inhibidor para reducir la actividad enzimática.	20
Figura 10. Reserva Natural para la Conservación del Heloderma, Cabañas, Zacapa.	26
Figura 11. Localidades estudiadas como parte del muestreo de genética poblacional de <i>Heloderma charlesbogerti</i> en el Valle del Motagua, Guatemala.	27
Figura 12. Localidades estudiadas como parte del muestreo de genética poblacional de <i>Ctenosaura palearis</i> en el Valle del Motagua, Guatemala.....	28
Figura 13. Lugar de inserción de aguja para obtención de sangre periférica en el animal.	29
Figura 14. Posicionamiento del heloderma para la extracción de sangre y posterior almacenamiento en papel FTA.	29
Figura 15. Medición de datos morfológicos del animal para su registro en bitácora. Mediciones de SVL y TL fueron haciendo uso de un metro convencional.	30
Figura 16. Prueba de eficiencia de cebadores de <i>H. charlesbogerti</i> . Gel de agarosa 1.5% con 3 μ L de productos de PCR purificados, 60 minutos a 90 volts/cm	34
Figura 17. Red de haplotipos del gen <i>atpasa-6</i> por medio del método de inferencia TCS y su distribución con las localidades correspondientes. Los círculos representan los haplotipos, y sus áreas son directamente proporcionales al número de individuos que presentan ese haplotipo en particular. Las líneas cruzadas representan el número de variaciones o mutaciones encontradas en las secuencias. Tres haplotipos fueron identificados occidental (n=8), central (n=16) y oriental (n=2).	35
Figura 18. Cladograma generado con el algoritmo de máxima verosimilitud (Maximum likelihood) usando a <i>Heloderma suspectum</i> como outgroup en el análisis. CI (consistency index): 0.979, HI (homoplasy index): 0.021, RI (retention index): 0.931, RC (rescaled consistency index): 0.911.....	38
Figura 19. Prueba de eficiencia de cebadores de <i>C. palearis</i> . Gel de agarosa 1.5% con 3 μ L de productos de PCR purificados, 60 minutos a 90 volts/cm. Prueba de eficiencia de cebadores. Gel de agarosa 1.5% con 3 μ L de productos de PCR purificados, 60 minutos a 90 volts/cm.....	46
Figura 20. Red de haplotipos del gen <i>nadh4</i> por medio del método de inferencia TCS y su distribución con las localidades correspondientes. Los círculos representan los haplotipos,	

y sus áreas son directamente proporcionales al número de individuos que presentan ese haplotipo en particular. Las líneas cruzadas representan el número de variaciones o mutaciones encontradas en las secuencias. Cinco haplotipos fueron identificados Motagua Norte (1), Cabañas (25), Cabañas Sur (14), Oriental (1) y Occidental (1).	47
Figura 21. Red de haplotipos del gen <i>ladhA</i> por medio del método de inferencia TCS y su distribución con las localidades correspondientes. Los círculos representan los haplotipos, y sus áreas son directamente proporcionales al número de individuos que presentan ese haplotipo en particular. Las líneas cruzadas representan el número de variaciones o mutaciones encontradas en las secuencias. Cinco haplotipos fueron identificados Motagua Norte A (1), Motagua Norte B (1), Jícaro (1), Cabañas A (38), y Cabañas B (1). y Cabañas B (1). y Cabañas B (1). y Cabañas B (1). y Cabañas B (1).	49
Figura 22. Cladograma generado con el algoritmo de máxima verosimilitud (Maximum likelihood) del gen <i>nadh4</i> usando individuos <i>C. similis</i> como outgroup en el análisis. CI (índice de consistencia): 0.745, HI (índice de homoplasia): 0.255, RI (índice de retención): 0.826, RC (índice de consistencia reescalada): 0.615. CI (índice de consistencia): 0.745, HI (índice de homoplasia): 0.255, RI (índice de retención): 0.826, RC (índice de consistencia reescalada): 0.615.	51
Figura 23. Cladograma generado con el algoritmo de máxima verosimilitud (Maximum likelihood) del gen <i>ladhA</i> usando individuos <i>C. similis</i> como outgroup en el análisis. CI (índice de consistencia): 0.817, HI (índice de homoplasia): 0.183, RI (índice de retención): 0.521, RC (índice de consistencia reescalada): 0.426.	52
Figura 24. Diagrama realizado en Miradi 4.1.3 para el reconocimiento y análisis de amenazas para las especies de <i>H. charlesbogerti</i> y <i>C. palearis</i>	66
Figura 25. Sistema de reacción. Consiste en un balón de 50mL conectado a un adaptador en Y. Éste a su vez se conecta con un condensador y un embudo de decantación a través del cual se agregó el peróxido de hidrógeno.	73
Figura 26. Diagrama de las placas a utilizadas en los ensayos cualitativos.	74
Figura 27. Diagrama de las placas utilizadas para los ensayos cualitativos, comparando veneno de <i>C. simus</i> y <i>H. charlesbogerti</i>	74
Figura 28. Producto sólido de la reacción.	75
Figura 29. Espectros infrarrojos del sustrato y el producto impuro. Se muestra en azul el espectro del producto con sus picos identificados. Se muestra en negro el espectro del sustrato. C=O: carbonilo; Ar: aromático (arilo); Sust: impureza de sustrato; Prod: pico distintivo del producto.	76
Figura 30. Espectros infrarrojos del sustrato y el producto puro disuelto en etanol. Se muestra en azul el espectro del producto con sus picos identificados. Se muestra en negro el espectro del sustrato. C-H: enlace carbono-hidrógeno de un alcano sp ³	77
Figura 31. (a) Inhibición del veneno de <i>C. simus</i> por el pBPB. (b) Inhibición del veneno de <i>H. charlesbogerti</i> por el pBPB. En azul se muestran los datos del veneno (100%) y en rojo los datos del veneno modificado con el inhibidor.	80
Figura 32. Dispersión de datos para mortalidad de <i>A. salina</i> luego de ser expuestas por 24 horas a cada tratamiento.	84

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Especies de orioles y picogrueso amarillo presentes en la Reserva Natural Privada para la Conservación del Heloderma.	12
Cuadro 2. Composición del veneno de <i>C. simus</i>	18
Cuadro 3. Composición del veneno de <i>H. charlesbogerti</i>	18
Cuadro 4. Cebadores diseñados y utilizados para la amplificación del gen <i>atpasa-6</i> de <i>H. charlesbogerti</i>	32
Cuadro 5. Resultados de extracción de ADN de tres muestras de sangre periférica impregnada en discos de papel Whatman® FTA de <i>H. charlesbogerti</i>	32
Cuadro 6. Resultados de extracción de ADN utilizando dos discos de papel Whatman® FTA, junto con agitación en columna mediante palillo estéril de <i>H. charlesbogerti</i>	33
Cuadro 7. Número de individuos de cada localidad encontrados en los diferentes haplotipos de <i>H. charlesbogerti</i> en el Valle del Motagua. Las localidades están colocadas en orden de ubicación geográfica, de oeste a este.	36
Cuadro 8. Análisis de variación molecular (AMOVA) de las secuencias obtenidas mediante secuenciación Sanger, y análisis de variación molecular especial (SAMOVA) con tres grupos de <i>H. charlesbogerti</i>	37
Cuadro 9. Cebadores diseñados y utilizados para la amplificación de los genes <i>nadh4</i> y <i>ladha</i> de <i>C. palearis</i>	44
Cuadro 10. Resultados de extracción de ADN utilizando dos discos de papel Whatman® FTA, junto con agitación en columna mediante palillo estéril de <i>C. palearis</i>	45
Cuadro 11. Número de individuos de cada localidad encontrados en los diferentes haplotipos de <i>C. palearis</i> con el gen mitocondrial <i>nadh1</i> en el Valle del Motagua. Las localidades están colocadas en orden de ubicación geográfica, de oeste a este en el Valle del Motagua. en el Valle del Motagua.	48
Cuadro 12. Número de individuos de cada localidad encontrados en los diferentes haplotipos de <i>C. palearis</i> con el gen mitocondrial <i>ladhA</i> en el Valle del Motagua. Las localidades están colocadas en orden de ubicación geográfica, de oeste a este en el Valle del Motagua. en el Valle del Motagua.	50
Cuadro 13. Análisis de variación molecular (AMOVA) de las secuencias obtenidas mediante secuenciación Sanger de <i>C. palearis</i>	53
Cuadro 14. Resultados de los análisis del SAMOVA simple realizado a partir de la información sobre la población de <i>C. palearis</i>	54
Cuadro 15. Estadísticos que muestran la diversidad genética de la especie con respecto a los genes de análisis de <i>C. palearis</i>	55
Cuadro 16. Parámetros utilizados para determinar los niveles en que cada amenaza afecta a las poblaciones de <i>H. charlesbogerti</i> y <i>C. palearis</i>	64
Cuadro 17. Análisis de amenazas presentes para <i>Heloderma charlesbogerti</i> y <i>Ctenosaura palearis</i> llevado a cabo en Miradi 4.1.3	65

Cuadro 18. Rangos de fusion determinados para el pBPB. El punto de fusion inicial es la temperature a la que el sólido empieza a fundirse. El punto de fusion final es la temperatura a la cual el sólido se funde por completo.	75
Cuadro 19. Diámetros de los halos de hemólisis de los ensayos cualitativos en placas de agar sangre.	78
Cuadro 20. Placas de agar sangre antes y después de 36h de incubación. Las diferentes concentraciones del inhibidor fueron utilizadas para verificar la reducción de la actividad hemolítica del veneno.	78
Cuadro 21. Placas de agar sangre antes y después de 24h de incubación a 37°C.	79
Cuadro 22. Promedios de los diámetros de hemólisis provocados por cada tratamiento.	79
Cuadro 23. Composición soluciones empleadas para cada tratamiento.	83

RESUMEN

El bosque seco del Valle del Motagua es una región con una alta diversidad y riqueza de especies. Por lo tanto, es crítico mantener esta diversidad por medio de la conservación de las especies que allí se encuentran. El conocimiento acerca de la genética y la toxicología de estas especies, permite la mejora de manejo de estrategias de manejo y conservación de las mismas. Por lo tanto, el presente megaproyecto busca determinar la autoecología y toxicología de algunas especies del clado Sauria en esta región. Este, se divide en dos grandes fragmentos. El primero, genética de la conservación, está centrado en el estudio de *Heloderma charlesbogerti* y *Ctenosaura palearis*. El segundo es la toxicología, basada en la síntesis de un inhibidor sintético, el bromuro de p-bromofenacilo, de la fosfolipasa A₂ (PLA₂, por sus siglas en inglés) del veneno de *Crotalus simus* y *H. charlesbogerti* observar la efectividad del mismo mediante distintos bioensayos; y la determinación de toxicidad de extractos de plumas de picogruaso amarillo, *Pheucticus chrysopeplus* y la determinación de la misma utilizando *Artemia salina* como modelo *in vivo*.

Con respecto a la genética de la conservación, se generaron las redes de haplotipos para sus especies concernientes a estudiar. Se encontraron tres haplotipos distintos para *H. charlesbogerti*, la presencia de una Unidad de Singificancia Evolutiva (ESU, por sus siglas en inglés) y no se mostro estructuga genetica marcada ($\Phi_{ST}= 0.09$, $p=0.12$) lo que significa que existe una baja diversidad genética. En cuanto a *C. palearis*, analizando el gen *nadh4*, se determinó la presencia de 5 haplotipos distintos, la presencia de 4 ESUs para este gen, estructura genética definida para las poblaciones de *C. palearis* en el bosque seco del Valle del Motagua ($\Phi_{ST}= 0.1858$, $p=0.048$), encontrándose un 18.59% de variación interpoblacional en la especie.

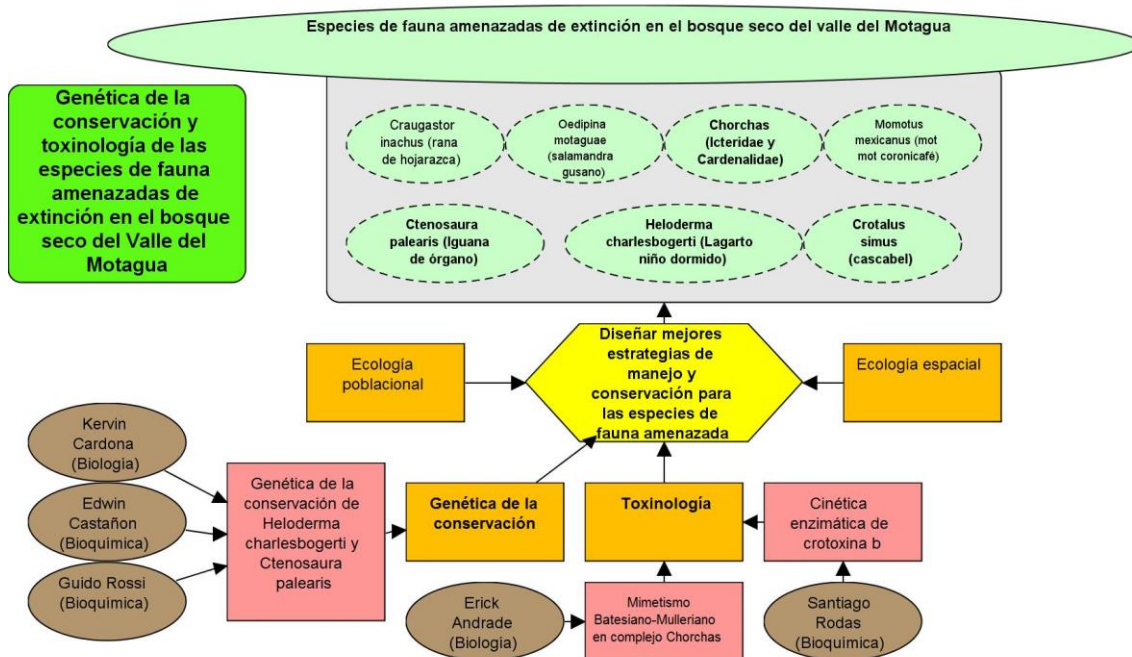
Con respecto a la toxicología, se sintetizó de manera exitosa el inhibidor de PLA₂. Se demostró su utilidad para disminuir la actividad hemolítica de las fosfolipasas A₂ *in vitro*. También se observó la disminución la actividad hemolítica del veneno de *C. simus*; sin embargo, no se observó la disminución de la respectiva a *H. charlesbogerti*. Esto debido a la baja concentración relativa de la enzima, y debido a que no se trabajó en condiciones óptimas para la misma. También se evaluó toxicidad en los extractos metanólicos de las plumas de *P. chrysopeplus*. Se demostró que existía diferencia significativa en el tratamiento de *A. salina* con extractos metanólicos de estas plumas, y metanol ($p < 0.0001$) Esta es la primera vez que se reporta un ave tóxica en Guatemala. De la misma manera, se resalta la existencia de mimetismo entre esta especie, y dos especies de orioles (*Icterus pectoralis*, e *I. pustulatus*).

I. INTRODUCCIÓN

El presente megaproyecto está orientado a evaluar algunas especies en el bosque tropical estacionalmente seco del Valle del Motagua. Con esto, se pretende aumentar el conocimiento sobre dichas especies y así poder generar planes de manejo adecuados, aumentar incentivos de investigación y conservación, y mejorar la comprensión de algunas de sus características ecológicas y fisiológicas.

El enfoque de este megaproyecto se centra en dos ejes principales de investigación: genética poblacional y toxinología. Cada uno de estos ejes se subdivide en componentes específicos de las especies evaluadas. Los elementos principales del megaproyecto se resumen en el siguiente esquema:

Figura 1. Esquema sobre la composición de cada componente del megaproyecto.



La genética poblacional permite conocer la estructura genética que presenta una población determinada, con lo cual es posible identificar su diversidad y composición genética. Esta información permite generar estrategias de manejo adecuadas en función del estado actual de dichas poblaciones, por lo que es una herramienta fundamental de la biología de la conservación. Dentro de este eje se encuentran tres componentes, detallados a continuación:

- Genética poblacional de la iguana de órgano, *Ctenosaura palearis* (Saura: Iguanidae), en el bosque seco del Valle del Motagua, Guatemala; a cargo de Edwin Castañón.

En este componente se determinó una red de haplotipos y cladogramas y se identificaron posibles unidades de significancia evolutiva (ESU) en poblaciones de *C. palearis* del Valle del Motagua. Con este fin se amplificaron dos genes mitocondriales: NADH deshidrogenasa subunidad 4 (*nadh4*) y lactato deshidrogenasa subunidad 1 (*ldha*). Se obtuvieron 4 ESU para el gen *nadh4*, mientras que para el gen *ldha* se determinó que la poca variabilidad que presenta indica que no es apto para estudios de genética poblacional en esta especie.

- Genética poblacional de lagarto escorpión *Heloderma charlesbogerti* (Sauria: Helodermatidae) en el bosque seco del Valle del Motagua; a cargo de Guido Rossi.

Este componente se centró en determinar la estructura genética de poblaciones de *H. charlesbogerti* del Valle del Motagua. Para ello, se generó una red de haplotipos y se identificaron unidades de significancia evolutiva (ESU) de esta población con base en una amplificación del gen *atpasa-6*. Se identificaron tres haplotipos (occidental, central y oriental) y una sola ESU.

- Implicaciones de la genética poblacional para el desarrollo de estrategias de conservación de la iguana de órgano, *Ctenosaura palearis* (Sauria: Iguanidae) y lagarto escorpión *Heloderma charlesbogerti* (Sauria: Helodermatidae) en el bosque seco del Valle del Motagua; a cargo de Kervin Cardona.

Este componente se centró en el análisis de la genética poblacional, tanto de *Heloderma charlesbogerti* como de *Ctenosaura palearis* para determinar los mejores caminos a seguir durante el planteamiento y aplicación de las diferentes estrategias de conservación. Esto tomando en cuenta los efectos y consecuencias en la genética poblacional de ambas especies. Por ello se determinó que para *H. charlesbogerti* el mejor camino se centra en la reproducción de individuos y expansión del hábitat, mientras que para *C. palearis* es mejor concientizar a los ciudadanos y mejorar la conectividad entre poblaciones.

Por su parte, el eje de toxicología corresponde a la evaluación de toxinas biológicas o venenos producidos por animales, plantas y microorganismos. Estas toxinas suelen ser mezclas complejas principalmente de proteínas y péptidos. Su evaluación resulta importante para comprender sus efectos fisiológicos sobre organismos vivos, así como para identificar posibles aplicaciones de las mismas en favor del bienestar humano. Este eje incluye dos componentes, detallados a continuación:

- Síntesis verde de un inhibidor de fosfolipasa A₂ y evaluación de su utilidad para reducir la actividad hemolítica en el veneno de serpiente de cascabel (*Crotalus simus*) y lagarto escorpión (*Heloderma charlesbogerti*).

Este componente presenta el efecto inhibitorio de p-bromofenacilo sobre la fosfolipasa A₂ (PLA₂) presente en veneno de *C. simus* y *H. charlesbogerti*. El porcentaje de inhibición se determinó mediante un ensayo de hemólisis directo. Se encontró una inhibición de 20% para veneno de *C. simus*, mientras que dicha inhibición fue mínima para veneno de *H. charlesbogerti*.

- Evaluación de la toxicidad de extractos de plumas de *Pheucticus chrysopeplus* (Aves: Cardinalidae) mediante ensayo de letalidad con *Artemia salina* (Anostraca: Artemiidae) como modelo *in vivo*; a cargo de Erick Andrade.

En este componente se determina la toxicidad de extractos de plumas de *P. chrysopeplus*. Para ello, se realizó un ensayo de letalidad utilizando *A. salina* como modelo *in vivo*, en donde se evaluó la mortalidad luego de exposición a extractos de plumas por 24 horas. Se determinó que dichos extractos presentan actividad tóxica, indicando presencia de toxinas en plumas de *P. chrysopeplus*.

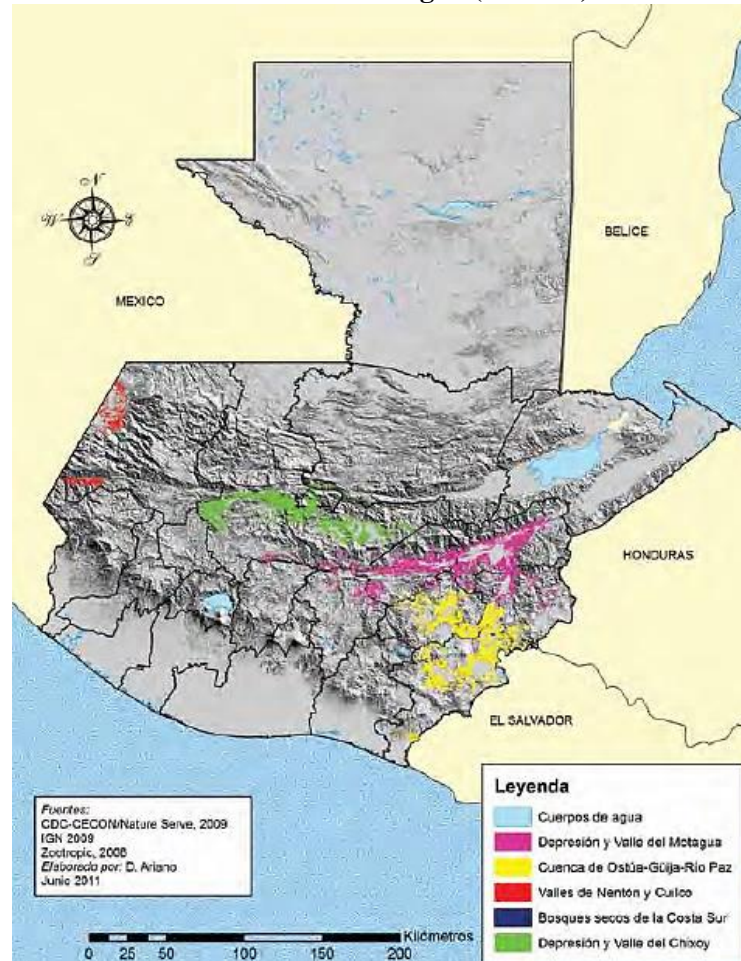
II. MARCO TEÓRICO

A. Descripción del bosque seco del Valle del Motagua y factores de amenaza.

1. **Bosque seco del Valle del Motagua.** Esta zona presenta una precipitación anual de aproximadamente 815mm, humedad relativa del 71% y una evapotranspiración de 1,798.8mm (CONAP-Zootropic-CECON-TNC, 2011). Esta zona está cubierta por el bosque lluvioso estacionalmente seco, en la zona de vida de Monte espinoso subtropical (Holdridge, 1978).

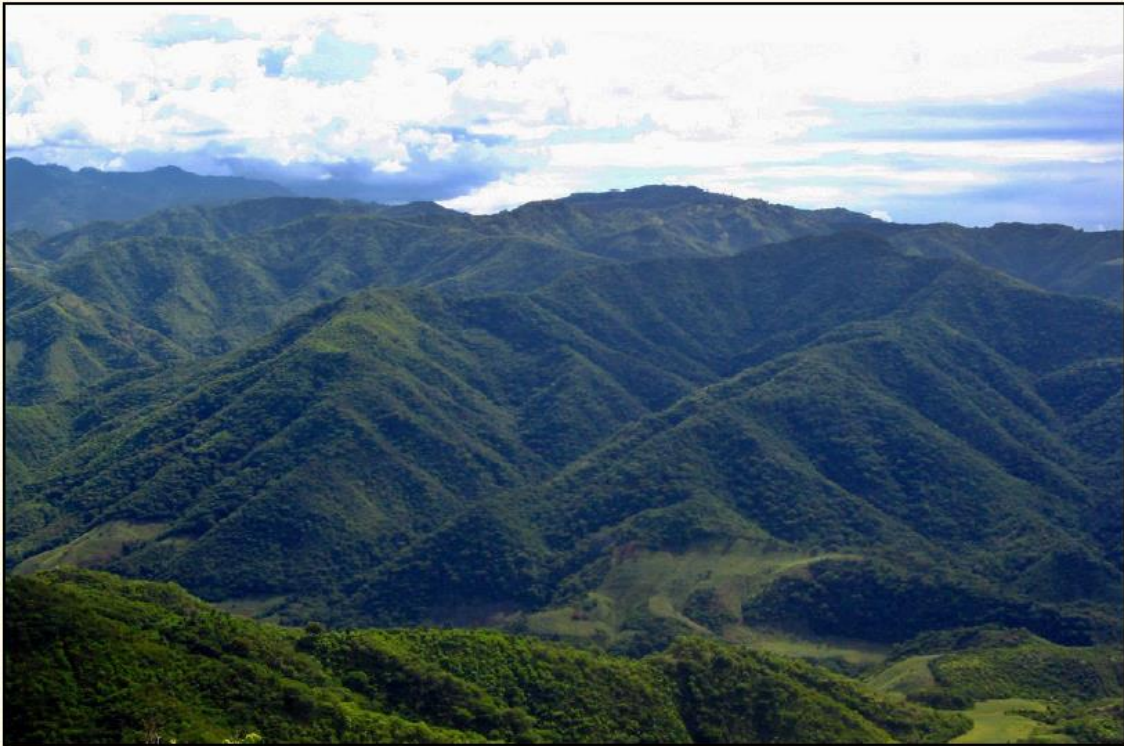
Esta área presenta una marcada estacionalidad con una época lluviosa de cinco meses, de junio a octubre, y una época seca de siete meses, de noviembre a Mayo (Nájera, 2006). Presenta una vegetación variada, con especies distintivas de bosque seco como *Plumeria rubra* (Apocynaceae); *Pilosocereus leucocephalus*, *Opuntia decumbens* (Cactaceae); *Bursera simaruba* (Burseraceae) (Ariano-Sánchez & Salazar, 2015).

Figura 2. Ubicación del Valle del Motagua (morado) en Guatemala.



(CECON-TNC, 2011)

Figura 3. Bosque seco del Valle del Motagua durante temporada húmeda en Cabañas, Zacapa.



(Ariano-Sánchez y Salazar, 2015)

2. Fragmentación de hábitat. El término fragmentación de hábitat es utilizado para referirse a proceso ecológicos, patrones de cobertura vegetal, las respuestas bióticas que acompañan las alteraciones en los paisajes causada por los seres humanos (Lindermayer y Fisher, 2010). La fragmentación del hábitat natural de las especies es el mayor reto que debe afrontar la biología de la conservación; su efecto radica en la disminución del hábitat total disponible y cambios en la configuración espacial (Dixo, *et. al*, 2009).

La fragmentación del hábitat es la causa principal de la pérdida de especies; sin embargo, la tasa de extinción puede acelerarse por otras causas, como invasión por otras especies, sobreexplotación, cambio climático, y deterioro del hábitat (Krauss, *et. al*, 2010). La colonización de especies en nuevos hábitats tiene un rol importante en el manejo y éxito de la especie; favoreciendo la selección natural mediante la adaptación de genotipos (Rius y Darling, 2014).

Dentro de la fragmentación de hábitat es necesario tomar en cuenta el efecto del cambio climático global en la diversidad genética intraespecífica; siendo este el nivel más importante de biodiversidad. Los efectos del cambio climático en la diversidad genética son: cambios en las variaciones de distribución genética en espacio y tiempo, cambios en niveles de fenotipos de individuos y poblaciones, como una respuesta a las nuevas condiciones ambientales; y adaptación evolutiva al cambio de condiciones ambientales (Pauls, *et. al*, 2013).

La fragmentación del hábitat afecta la biodiversidad reduciendo la cantidad de hábitat adecuado disponible para los organismos. además, implica tanto la destrucción del hábitat como la subdivisión del hábitat previamente continuo, lo cual amenaza las especies (Fahrig, 2003). Esto debido a que la existencia de un hábitat viable es fundamental para la supervivencia de cualquier especie y, en muchos casos, la fragmentación de cualquier hábitat remanente puede llevar a decisiones difíciles para los biólogos de conservación (Frankham & Ballou & Briscoe, 2009). La colonización de especies en nuevos hábitats tiene un rol importante en el manejo y éxito de la especie; favoreciendo la selección natural mediante la adaptación de genotipos (Rius y Darling, 2014).

3. Cambio de uso de suelo. El cambio en el uso del suelo se refiere la práctica de la agricultura, deforestación e intensidad de desarrollo. Este concepto, también se puede referir al cambio de praderas y forestación nativa, por suelo de cultivo o urbanización (Polasky, *et. al.*, 2011; Chazal & Rounsevell, 2008). Junto con la fragmentación de hábitat, el cambio de uso de suelo, son puntos clave en los cambios de diversidad de un ecosistema (Chazal y Rounsevell, 2008).

Si bien, el cambio de uso de suelo y su mantenimiento, incrementan la producción y el valor de algunos servicios, disminuye otros. Por lo tanto, para la toma de decisión para la implementación de la práctica de agricultura en un área específica, se debe tomar en cuenta el efecto, y la relación que éste tendrá con la disminución en los servicios disponibles para las especies endémicas de una región (Polasky, *et. al.*, 2011).

B. Descripción de las especies estudiadas.

1. Descripción de la especie de Heloderma (*Heloderma charlesbogerti*). El Heloderma del Valle del Motagua. también conocido como escorpión, florecilla o niño dormido, *Heloderma charlesbogerti* fue recientemente elevado a nivel de especie (Reiserer *et al.* 2013) pues anteriormente era considerado una subespecie de la especie ampliamente distribuida *H. horridum* (Campbell y Vannini, 1988). El Heloderma del Motagua es una especie de reptil endémico con una distribución muy restringida al bosque seco del Valle del Motagua en Guatemala (Ariano-Sánchez y Salazar, 2007) y la cual se encuentra en grave peligro de extinción principalmente debido a la pérdida de hábitat (Domínguez-Vega *et al.*, 2012).

Este pertenece a la familia Helodermatidae, la cual forma parte del grupo de reptiles con glándulas orales secretoras de veneno (Fry *et al.*, 2006). Esta especie constituye la especie con distribución más alopátrica de las otras especies de *Heloderma* y difiere de las otras especies en cuanto a coloración y tamaño, siendo esta la de menor talla (Campbell y Vannini, 1988).

El lagarto escorpión o niño dormido, *Heloderma charlesbogerti* puede ser diferenciado de la población más cercana geográficamente de *Heloderma alvarezzi* por tener un dorso negro en

adultos distintivamente marcado con puntos amarillo pálido, dispuestos de forma irregular. Se presentan desde las patas delanteras y se vuelven más grandes y numerosas conforme se llega a la cola del animal (Ariano, 2003). Presenta de 5 a 6 anillos amarillos en la cola (Figura 4)

H. charlesbogerti se encuentra distribuido en la zona este y central de Guatemala con una distribución potencial de 17,534 hectáreas (CONAP-Zootropic, 2013), principalmente en el Valle del Motagua entre El Rancho, departamento de El Progreso, y Gualán, Departamento de Zacapa. También en el pasado presentaba poblaciones de menor tamaño más al sur entre los departamentos de Guatemala, Escuintla y Santa Rosa (Anzueto y Campbell, 2010), sin embargo, esas poblaciones se consideran actualmente extintas debido a la pérdida del hábitat natural en estas zonas.

Esta especie presenta un período de inactividad durante la época seca llamado estivación, el cual puede durar cerca de cinco meses, reiniciando la actividad en superficie con inicio de la temporada lluviosa, siendo de junio a octubre los meses de mayor actividad, disminuyendo su actividad conforme avanza la temporada seca (Ariano y Salazar, 2015).

El Heloderma normalmente habita en refugios subterráneos, principalmente madrigueras excavadas por otros animales y es en estos refugios subterráneos donde pasa el período de estivación. Ariano y Salazar (2012) reportan que los tipos de refugios utilizados por *H. charlesbogerti* son principalmente nidos excavados por aves de la familia Momotidae en las paredes de las pendientes de las quebradas, cuevas abandonadas excavadas posiblemente por iguanas del género *Ctenosaura* y cuevas abandonadas excavadas por mamíferos menores, probablemente por zorrillos y armadillos. La dieta de *H. charlesbogerti* consiste principalmente de huevos de reptiles y aves (Campbell y Vannini, 1988), así como pichones de palomas e insectos (Ariano y Salazar, 2015).

Figura 4. Lagarto escorpión (*Heloderma charlesbogerti*).



(Fotografía: Ariano, 2013)

Esta especie tiene interés terapéutico ya que en sus glándulas ubicadas en la mandíbula inferior (Irwin, 2012) secretan una toxina llamada exendín. Esta toxina está presente en todos los pertenecientes del género *Heloderma*, está constituida por cuatro péptidos similar a una hormona. Las primeras en caracterizarse fueron exendín-1 y -2, llamados helospectina y helodermina respectivamente; con actividad de péptidos intestinales vasoactivos y péptido histidina isoleucina (Irwin, 2012). Por otro lado, exendín-3 y exendín-4, tienen efecto de ser péptido receptor similar a glucagón (GLP-1, por sus siglas en inglés) (Dickson, *et al*, 2012). Por lo anterior, estas poseen efecto sobre el metabolismo de los carbohidratos, y son de gran interés en el ámbito de investigación.

Existen dos trabajos relacionados con genética poblacional de la especie, aunque ambos se centraron en análisis de ADN nuclear de individuos provenientes principalmente de una sola población central, denominada Cabañas. Schrei (2014) encontró que la diversidad genética de la población de helodermas en Cabañas (Zacapa) presenta valores muy bajos. Gonzales (2017) encontró también baja diversidad genética en donde se analizaron 12 marcadores microsatélites de la misma población analizada por Schrei en 2014.

2. Descripción de la especie Iguana de órgano (*Ctenosaura palearis*). El género *Ctenosaura* (Iguanidae) está formado por diferentes especies de iguanas autóctonas de Mesoamérica. Las especies pertenecientes a este género habitan en lugares por debajo de 1,200 m de altitud, en bosques secos, ya sea de México o América Central (Buckley *et al.*, 1997). En el caso específico de *C. palearis* su localidad se encuentra en Gualán, Guatemala, cuya distribución está en el Sudeste de Guatemala en el valle de Motagua (Pasachnik *et al.*, 2010). Esta especie tiene una ocurrencia menor de 930 km² y el área de ocupación se estima de 598 km² hasta el 2008 pero se espera que esté disminuyendo por la caza de la misma. La población está altamente

fragmentada y se ve amenazada por la pérdida de hábitat. El tamaño total de la población no se conoce, pero se piensa que puede haber menos de 2.000 individuos maduros con la subpoblación más grande numerando alrededor de 150 iguanas maduras (Pasachnik, 2011).

Este género de iguanas es uno de los más diversos, ya que cuenta con 18 especies reconocidas (Buckley *et al.* 2011). La especie *C. palearis*, está considerada como amenazada (EN) según la lista roja de la UICN (UICN, 2014). Hay una continua disminución debido a la caza y el comercio, y la calidad del hábitat también está disminuyendo debido a la agricultura y el aumento de la mortalidad de los cactus (su fuente principal de alimentos y refugio) (Pasachnik, 2011).

Ctenosaura palearis se alimenta principalmente de hojas, insectos, frutos y flores, incluyendo el fruto del cactus de órgano (*Stenocereus pruinosus*). Se ha reportado que la ingesta de las semillas del cactus de órgano por *C. palearis* aumenta más de un 30% la eficiencia de germinación de la semilla (Vásquez, Ariano, 2016) Y comúnmente utiliza como refugio el interior de los tallos secos de éste mismo cactus (Coti y Ariano, 2008).

La iguana de cola espiga de Motagua se encuentra en áreas de bosques secos y matorrales espinosos. Las especies de plantas predominantes en las áreas donde las iguanas están presentes son los cactus de los árboles, incluyendo Pitayo Cactus Pipe de Órgano (*Stenocereus pruinosus*) y Viejo Cactus (*Pilosocereus leucocephalus*), y especies arbóreas como el Yellow Prun (*Ximena americana*), Yellow Bells (*Tecoma stans*) y *Licania hypoleuca*. Las áreas sin iguanas están dominadas por los árboles Cacho de Toro (*Bucida macrostachya*), Cabra negra (*Lonchocarpus rugosus*), Guayaba (*Psidium sp.*) y *Stenmadenia obovata*. Los refugios utilizados por esta especie son troncos huecos o ramas de los cactus y árboles (Cotí y Ariano, 2008),

Los huevos de la iguana de cola espinosa de Motagua son una de las principales fuentes de alimento para el Lagarto con cuentas de Motagua (*Heloderma horridum charlesbogerti*) (Ariano-Sánchez 2007). Por lo tanto, mantener una población estable de la iguana puede ser relevante para conservar las poblaciones silvestres del lagarto con cuentas.

La Iguana de Cola Espinosa del Motagua, es una especie clave para los bosques secos del Valle del Motagua porque su presencia se considera crucial para mantener la organización de la comunidad ecológica por su posición en la cadena alimentaria y su importante papel como dispersor de semillas (Cotí, Ariano 2008).

El tamaño máximo de la cola para esta iguana es 57 cm (un macho) y el tamaño promedio (incluyendo la cola) para cada sexo es de 36.40 ± 4.45 cm para las hembras y 46.31 ± 9.0 cm para los machos (Cotí & Ariano, 2008). La máxima longevidad registrada para esta iguana es de 10.2 años en cautiverio, con la primera reproducción a los dos años (De Magalhães y Costa 2009). La

duración de la generación se estima en seis años. Según los cazadores locales, esta especie pone entre 6 y 12 huevos cada año y el período de incubación es de tres meses (Cotí, Ariano 2008).

Figura 5. Iguana de órgano o shero (*Ctenosaura palearis*).



(Fotografía: Ariano 2015)

3. Descripción de *Crotalus simus*. *Crotalus simus* es una especie de serpiente de cascabel encontrada en México y Centroamérica (Figura 6). Estas poseen escamas dorsales acentuadas, y llegan a medir aproximadamente 130cm o más. Hasta 2004, eran clasificados junto a *Crotalus durissus* como una misma especie (Campbell y Lamar, 2004).

Figura 6. Serpiente de cascabel (*Crotalus simus*).



(Fotografía: Ariano 2011)

La especie se encuentra desde México hasta Costa Rica en regiones semiáridas (Castro *et al.* 2013) y bosques tropicales secos. La serpiente posee una amplia distribución en Guatemala, encontrándose entre los 0 y 166 metros sobre el nivel del mar (msnm). Además, esta posee tres subespecies, de las cuales dos se encuentran en Guatemala, *C. s. simus* y *C. s. tzabcan* (Castro *et al.* 2013).

4. Características de orioles y picogruoso amarillo

a. Taxonomía y descripción. La especie de estudio, *Pheucticus chrysopeplus*, pertenece al género *Pheucticus*, de la familia Cardinalidae. Poseen un color amarillo sólido en cabeza y pecho, con alas negras y cola ligeramente moteada de blanco. Presentan un pico negro masivo característico. Habitan en México y Guatemala, apareciendo sólo ocasionalmente en la frontera con Estados Unidos. Las poblaciones al norte y sur de México y Guatemala se encuentran aisladas. Suelen encontrarse en zonas boscosas despejadas y áridas (NeotropicalBirds, 2010; Brewer, 2017; BirdLife International, 2017). Se considera una especie amenazada en base a su inclusión en la Lista de Especies Amenazadas (LEA) de Guatemala (CONAP, 2009).

Por su parte, las especies de orioles con plumajes similares (*Icterus pectoralis* e *I. pustulatus*) pertenecen al género *Icterus*, familia Icteridae. También se les llama orioles del nuevo mundo. No se encuentran estrechamente relacionados a los orioles del viejo mundo (Oriolidae), si bien sus plumajes, tamaño, dieta y comportamiento son bastante parecidos. Este grupo se caracteriza por presentar plumajes negros con amarillo o naranja y marcas blancas. Son de cuerpos esbeltos, cola larga y pico punteagudo. Suelen poseer dimorfismo sexual, en donde los machos presentan colores fuertes y las hembras tonos más opacos. Mudan sus plumas una vez al año (All About Birds, 2015; Beauty of Birds, 2011).

b. Patrones de plumaje. Los patrones de plumaje presentes en orioles parecen haber evolucionado muchas veces de manera independiente, presentándose regresiones y convergencias en muchas especies (Omland y Lanyon, 2000; Preece, Friedman y Omland, 2007). Esto quiere decir que los patrones de plumaje de algunas especies poco relacionadas genéticamente son muy parecidos entre sí, contrario a otros grupos de aves en donde mientras más emparentados se encuentren los organismos, más parecidos son los plumajes que presentan. Dicho efecto es posible debido a la rápida evolución del plumaje por ser un carácter seleccionado sexualmente. Esto implica que el patrón de plumaje es definitorio para que un macho pueda aparearse y pasar dichos genes a la siguiente generación. Por esto, un patrón que se vuelve atractivo permite una selección rápida por la preferencia de hembras a aparearse con machos que posean dicho patrón.

Cuadro 1. Especies de orioles y picogrueso amarillo presentes en la Reserva Natural Privada para la Conservación del Heloderma.

Especie	Foto	Ecología
<p><i>Icterus pectoralis</i> Spot-breasted oriole Oriol de pecho manchado</p>		<p>En su rango natural, se encuentran restringidos a la costa del Pacífico. Prefieren habitats abiertos y bosques poco densos. Forrajean en parejas o en grupos familiares. Su dieta es principalmente néctar y frutos, pero alimentan a crías con artrópodos. Única especie con puntos en su pecho.</p>
<p><i>Icterus pustulatus</i> Streak-backed oriole Oriol dorso rayado</p>		<p>Mayormente restringido a la costa del Pacífico. Poblaciones del norte presentan migración y dimorfismo sexual (machos muy brillantes y hembras opacas), mientras que no existen diferencias entre sexos en poblaciones del Sur. Se distinguen por las manchas en su espalda.</p>
<p><i>Pheucticus chrysopheplus</i> Yellow grosbeak Picogrueso amarillo</p>		<p>Posee un pico masivo y negro distintivo. La especie presenta dos poblaciones, una en el noroeste de México y otra entre la frontera de Guatemala y México. Suelen habitar en ambientes áridos y bosques secos con áreas abiertas.</p>

(Cornell Lab of Ornithology, 2015; NeotropicalBirds, 2010)

Se plantea que la presencia de toxinas en alguna de las especies de este grupo puede ser la razón de este parecido. La coloración de estas especies, que al presentar tonos contrastantes (amarillo o naranja en contraste con negro) sugiere la implementación de aposematismo como advertencia de contener algún tipo de toxina o como una señal de tener mal sabor a sus depredadores (Weldon, 2000; Skelhorn y Rowe, 2007). Esto traería una ventaja ecológica a presentar patrones de plumaje específicos, aumentando la supervivencia y la tasa de reproducción de aves con estos patrones. Por consiguiente, la convergencia en patrones de plumaje puede

deberse a un mecanismo de mimetismo en el grupo. El mimetismo se define como un mecanismo por el cual un organismo desarrolla parecido con otro debido a que le otorga una ventaja en depredación o defensa contra depredadores, por ejemplo (Audesirk, Audesirk y Byers, 2003). En este caso, la ventaja de presentar plumajes parecidos radica en una tasa reducida de depredación en caso alguna de las especies parecidas presentes en su hábitat presente algún mecanismo de defensa químico. El mismo caso fue reportado para *Pitohui dichrous* y *P. kirhocephalus*, en donde el patrón de plumaje de ambas especies era más parecido en ciertas áreas donde coexistían (Dumbacher y Fleischer, 2001).

C. Genética de la conservación como una ciencia multidisciplinaria.

La genética de la conservación se puede definir como aplicación teórica y práctica de la genética en la conservación de especies como entidades dinámicas capaces de evolucionar para poder hacer frente a los cambios ambientales y reducir el riesgo de extinción (Frankham, *et al.*, 2003).

Uno de los acercamientos que se tiene en este campo es la estimación de la estructura y flujo genético de las metapoblaciones. Sin embargo, a pesar de los avances e innovaciones en la cantidad y tipos de datos que se pueden obtener, muchos de los métodos utilizados se basan en fundamentos descritos hace más de 50 años (Pearse & Crandall, 2003).

El flujo de genes entre poblaciones ya sea por el intercambio de individuos en animales, polen o semillas en el caso de las plantas, esporas, etc. es necesario para mantener la viabilidad de las poblaciones (Segelbacher, *et al.*, 2010). De esta forma, se puede contrarrestar de cierta manera la deriva genética y ayuda a la propagación de genes que pueden ser beneficiosos (Pearse & Crandall, 2003).

Para el estudio y la conservación de especies, se utiliza el sistema de una unidad biológica, sin embargo, esta puede variar en gran medida dependiendo del ámbito de interés (Crandall *et al.*, 2000). Por ejemplo, para poblaciones salvajes, la unidad puede establecerse como la especie o subespecie, aunque para plantas o animales domesticados puede ser la raza.

1. Genética poblacional y uso de genes mitocondriales para la explicación de eventos evolutivos. Mediante el estudio de la genética poblacional, es posible estimar el tamaño y distribución de loci específicos dentro de una o varias poblaciones; haciendo uso de técnicas de biología molecular. Para el enfoque genético es necesario el uso de la información genética de la especie de interés; lo cual, en la actualidad es posible obtener hasta de organismos muy relacionados, con algunas excepciones (Allendorf, Hohenlohe, & Luikart, 2010). El estudio de la genética poblacional es uno de los componentes que involucra la biología de la conservación; cuyo fin es proporcionar bases para el manejo correcto e informado de ecosistemas perturbados. Esto

lleva a entender el funcionamiento de estos ecosistemas para mantener su diversidad frente a la expansión de la población humana que generan fragmentación del hábitat (Loo, 2011). La diversidad genética es un concepto que ha sido ligado comúnmente a la complejidad de un organismo, la recuperación de un ecosistema, y la habilidad de una especie para responder a cambios ambientales (Bazin *et al.*, 2006). La falta de diversidad genética está ligada a poblaciones pequeñas o en declive, las cuales podrían llegar a ser poblaciones en peligro (Amos y Balmford, 2001).

La variación genética de una población consiste en la suma de todas las variaciones genéticas existentes entre los individuos de una población (Young *et al.*, 1996). Esta variación genética se puede medir de acuerdo con parámetros como la riqueza alélica y la diversidad génica, normalmente entendida como heterocigosidad (Pierce, 2010). Muchos factores pueden afectar la diversidad genética de una población, entre los que se pueden contar la estructura poblacional, cuellos de botella genéticos, selección natural, ciclo de vida y métodos de apareamiento (Bazin *et al.*, 2006). El tamaño de la población, sin embargo, es uno de los factores que más varía dependiendo de las especies o taxa. Así, normalmente se pensaría que una mayor población presentaría más caracteres polimórficos que escasos, a pesar del ruido introducido por otras fuerzas evolutivas (Loo, 2011).

Otro de los objetivos de la genética poblacional, es lograr identificar la estructura genética con el set de genotipos individuales de una población; de esta forma es posible inferir la relación que tiene poblaciones entre sí; o su lejanía (Pool, *et. al*, 2010).

Los análisis de genética poblacional se basan, primero, en la gran cantidad de marcadores polimórficos de ADN, y segundo, en métodos estadísticos que permiten identificar el número de poblaciones en un grupo de muestras y/o asignar a individuos su población de origen (Waples y Gaggiotti, 2006). Los índices genéticos de conectividad entre poblaciones son indispensables para determinar el flujo de genes y las consecuencias evolutivas de la dispersión (Lowe y Allendorf, 2010).

Una forma de medir la segmentación de las poblaciones es mediante el uso de unidades significantes evolutivas (ESU; por sus siglas en inglés). Estas unidades están asociadas por la segmentación de distintas poblaciones; cuya definición se basa en poblaciones que son recíprocamente monofiléticas para los alelos de ADN mitocondrial (ADNmt) y muestran divergencia significativa de las frecuencias de los alelos en los loci nucleares (Crandall, *et. al*, 2000).

El ADN mitocondrial (ADNmt), es de forma circular y se encuentra de funciona de forma independiente al ADN nuclear. El ADNmt codifica 13 de las aproximadamente 80 subunidades conservadas de la cadena transportadora de electrones (Bogenhaden, 2011). Sin embargo, el

ADNmt no codifica ninguna de las enzimas involucradas en el proceso de replicación, transcripción y reparación de ADNmt; por esta razón, se caracteriza por tener altas tasas de mutaciones (Zink y Barrowclough, 2008).

La variación en las secuencias de ADNmt se ha asociado con cambios evolutivos de una población, esto en base a estudios recientes sobre genética poblacional; ya que antes se pensaba que los genes del ADNmt eran espectadores de los cambios evolutivos. Las mutaciones que se dan en una población en específico son arreglos que se dan mediante selección o mediante el proceso de deriva genética; el cual, hace que dos poblaciones difieran entre sí (Dowling, *et al*, 2008).

Es posible visualizar estas variaciones en las secuencias de ADNmt, mediante redes de haplotipos, siendo éste el método más común de análisis de secuencias. Las redes ofrecen una representación clara de las relaciones, siendo mejor que los árboles; ya que provee información sobre bifurcaciones lineales entre poblaciones o especies (Teacher y Griffiths, 2010). Generalmente se utilizan softwares donde se introducen secuencias alienadas, y éstos generan redes en donde se pueden identificar los haplotipos; los más comunes son: Arlequin, Network y HapStar (Schneider, *et al*, 2000; Teacher y Griffiths, 2010).

Por otra parte, otro análisis muy utilizado es el AMOVA es una prueba estadística que analiza las poblaciones de estudio. Quiere decir análisis de la varianza molecular (AMOVA – Analysis of molecular variance por sus siglas en ingles). Es un método para detectar la diferenciación de poblaciones utilizando marcadores moleculares. Este procedimiento se creó para el análisis de los diferentes haplotipos en una población sin embargo también puede ser utilizado para marcadores moleculares. (Excoffier & Smouse & Quattro, 1992). Este análisis está basado en el mismo principio de un análisis de varianza (ANOVA; por sus siglas en inglés), con la diferencia de que este utiliza una medida de distancia evolutiva entre los haplotipos, siendo representado en cantidades análogas a la estadística clásica (Holsinger & Weir, 2009).

Otra forma de forma de analizar las poblaciones de una especie es con la prueba estadística SAMOVA la cual analiza las poblaciones de estudio haciendo subdivisiones por grupos, estos grupos pueden definirse según la conveniencia, pueden ser grupos por poblaciones aisladas, según las localidades o bien según barreras biogeográficas. SAMOVA quiere decir análisis espacial de la varianza molecular (SAMOVA- spatial analysis of molecular variance por sus siglas en ingles). Si vemos que la mayor parte de la varianza ocurre entre las muestras dentro de las poblaciones (según los grupos) o entre las poblaciones, entonces hay evidencia de que tenemos algún tipo de estructura poblacional (Cardoso *et al*, 2015)

D. Toxinología

La toxinología es la ciencia que estudia las toxinas producidas por organismos vivos (mediLexicon, 2017). El fin de esta rama de la biología es generar información sobre toxinas y antitoxinas, en especial por su potencial aplicación como recurso clínico. También involucra la investigación de microorganismos, animales, plantas, hongos y otros organismos tóxicos a detalle para tratar de comprender el mecanismo de acción y objetivo de sus toxinas (Gopalakrishnakone, 2015). Una técnica relevante a este campo es la evaluación de la toxicidad de una sustancia. En este caso, se emplearán bioensayos de extractos de plumas de *P. chrysopeplus* para evaluar la toxicidad de los mismos. Un bioensayo se define como una prueba utilizada para evaluar la potencia de un químico en un organismo vivo (Mendoza, 2008; Rand, 1995).

1. Defensa química. La defensa química se refiere a cualquier mecanismo de plantas y animales por la cual se utilice alguna sustancia química, ya sea generada por sí mismo o captada de alguna fuente externa, para evitar ser depredado o detener un ataque luego de que este ha iniciado (Wilsdon, 2009).

a. Tipos de defensa química. Existen dos tipos básicos de defensa química: primaria y secundaria. La defensa primaria hace referencia a mecanismos de defensa intrínsecos al organismo, independientemente de si se encuentre bajo amenaza o no. Por ejemplo, una planta tóxica mantiene toxicidad, aunque no esté siendo depredada. La defensa secundaria, en cambio, se distingue en que el agente utilizado como defensa química sólo se secreta o sintetiza cuando el organismo está siendo amenazado. Este es el caso del zorrillo, por ejemplo (Wilsdon, 2009).

El método para adquirir toxicidad también incluye dos variantes principales. El organismo puede sintetizar toxinas a partir de su propio material genético y metabolismo, o bien utilizar el de otros organismos para producir dichas toxinas. A su vez, la síntesis intrínseca puede dividirse en dos tipos.

Ya sea la síntesis directa de un péptido o proteína tóxica a partir del genoma, o a través de una ruta metabólica compleja que incluya varios pasos y reacciones con enzimas específicas que resulten en un metabolito secundario u otra molécula con actividad tóxica. Por su parte, la adquisición de toxinas de una fuente externa puede darse por el consumo de organismos tóxicos, o desarrollando una relación simbiótica en la que el organismo hospedero se aprovecha de las toxinas producidas por su simbionte huésped. Ambos mecanismos presentan ventajas y desventajas. Si bien la adquisición de toxinas de una fuente externa resulta más económica, metabólicamente hablando, que sintetizarlas de cero, el organismo receptor debe generar cambios importantes en su propio metabolismo para poder resistir o volverse insensible a dichas toxinas.

Esto puede involucrar cambios a nivel de canales iónicos o generación de estructuras de almacenamiento de la toxina, lo cual compensa el gasto energético de no producir la toxina (Mebs, 2001).

2. Toxicidad en aves. La defensa química se encuentra presente en varios animales. Se han reportado muchos casos en invertebrados, pero existen varios ejemplos en donde algún mecanismo de defensa química es utilizado por vertebrados, principalmente en anfibios y reptiles. Los compuestos involucrados se sintetizan a partir de algún precursor o son directamente acumulados por el organismo luego de adquirirlos del ambiente (Savitzky *et al.* 2012). Recientemente, se han documentado más casos de este fenómeno en tetrápodos, siendo las aves uno de estos grupos. Investigaciones de Dumbacher *et al.* en 1992 confirmaron a *Pitohui*, un género endémico de Nueva Guinea, como el primer caso reportado de toxinas presentes en un ave. Desde entonces se han descubierto varias otras, entre ellas *Ifrita kowaldi*, *Plectropterus gambesis*, *Ergaticus ruber*, *Bonasa umbellus*, *Phaps elegans* y *Phaps chalcoptera* (Bartram y Boland, 2001). Dado que existen otros casos reportados, resulta factible que los orioles o el picogruoso amarillo puedan poseer algún tipo de toxina.

3. Veneno de *Crotalus simus*. El veneno de *Crotalus simus* consta de un coctél de varias proteínas, entre las cuales se encuentran metaloproteasas, hemotoxinas y neurotoxinas (Cuadro 2). De estas subespecies, *C. s. simus* posee la mayor toxicidad, mientras que la *C. s. tzabcan* posee la menor (Castro *et al.* 2013). La venómica de estos cambia dependiendo de la edad del organismo (Calvete *et al.* 2010). En los neonatos, los componentes principales son fosfolipasas, mientras que en los adultos son las metaloproteasas (SVMP). La crotoxina es el componente mayoritario en el veneno de *C. simus* (Bon *et al.* 1979, Faure *et al.* 2011, Marchi-Salvador *et al.* 2008), y constituye un 14.3% del veneno (Castro *et al.* 2013). Esta es un heterodímero que consta de dos subunidades: un componente no tóxico (crotoxina A) y uno tóxico (crotoxina B).

Cuadro 2. Composición del veneno de *C. simus*.

Componente	Porcentaje	Función
Serina proteasas	30	Inflamación, ruptura de fibrinógeno
Metaloproteasas	27	Ruptura de enlaces peptídicos en componentes membranales, y necrosis muscular.
Fosfolipasas	22	Hemólisis, parálisis muscular.
Péptidos vasoactivos	7	Inflamación.
L-amino oxidasas	6	Inducción de apoptosis, edema, inhibición de la agregación plaquetaria.
Disintegrinas	2	Inhibición de la agregación plaquetaria.
CRiSP	-	Parálisis muscular.
Factor de crecimiento nervioso (NGF)	-	Inflamación

(Castro *et al.* 2013)

Se ha encontrado en varios estudios que la subunidad A solamente posee una actividad de chaperona que aumenta el efecto tóxico de la subunidad B (Bon *et al.* 1979, Rübsamen *et al.* 1971). Esta actúa por medio de la prevención de uniones no específicas con el sitio activo de la subunidad catalítica; sin embargo, reduce la actividad enzimática de la misma (Canziani *et al.* 1982).

Por otro lado, se encuentra la crotoxina B. Esta es una neurotoxina con actividad de fosfolipasa (grupo II). Este componente de la crotoxina se enlaza a receptores específicos en las áreas presinápticas y postsinápticas de la unión neuromuscular. Esto evita la liberación de acetilcolina y también la respuesta hacia agonistas colinérgicos (Marchi-Salvador *et al.* 2008).

4. Veneno de *Heloderma charlesbogerti*. El veneno de *H. charlesbogerti* está compuesto de diversos componentes peptídicos, entre los cuales se encuentra el exendin, la helofensina, la gilatoxina (una kalikreína), la proteína secretora rica en cisteínas (CRiSP, por sus siglas en inglés), la helokinestatina, y una fosfolipasa A2 (grupo III) (Cuadro 3) (Koludarov, 2014). La función de esta última es principalmente hemotóxica.

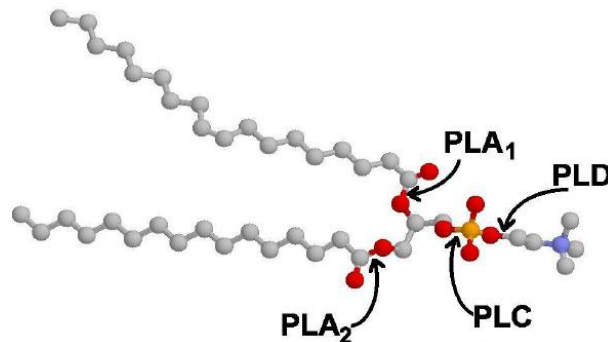
Cuadro 3. Composición del veneno de *H. charlesbogerti*.

Componente	Función
Serina proteasas	Incrementan permeabilidad vascular, inflamación, y ruptura de fibrinógeno.
Fosfolipasas	Inhibición del agregamiento plaquetario.
Semaforinas	Inflamación.
Exendin	Hipotensión e hipoglicemia.
Hialuronidasas	Degradación del ácido hialurónico.
Helofensina	Inhibe la estimulación eléctrica del diafragma.
Péptidos vasoactivos	Hipotensión.
CRiSP	Parálisis muscular, hipotermia.

(Koludarov *et al.* 2014; Saangaard *et al.* 2015)

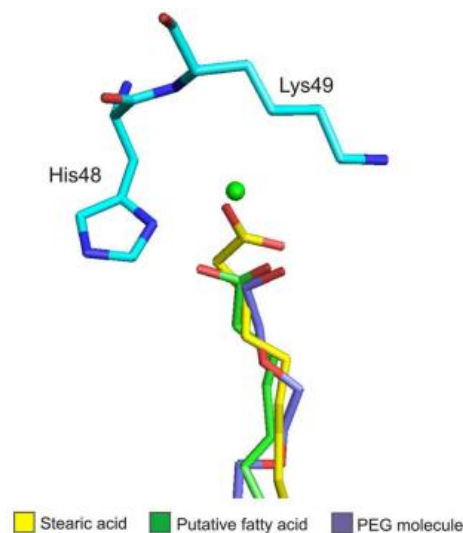
5. Fosfolipasas A₂. Las fosfolipasas A₂ (PLA₂, por sus siglas en inglés) (EC 3.1.1.4) son enzimas que hidrolizan los fosfolípidos, produciendo un lisofosfolípido. Debido a esto, poseen propiedades hemolíticas. Estas enzimas hidrolizan el enlace éster entre el ácido graso y el grupo fosfato (Figura 7) (Stábeli *et al.* 2012).

Figura 7. Sitio de ruptura entre los distintos tipos de fosfolipasas.



El mecanismo por el cual estas enzimas hidrolizan el fosfolípido es por medio del ataque nucleofílico. Este lo realiza un residuo de histidina en la posición 48 del sitio activo (Figura 8). Un cofactor necesario para la acción de esta enzima es el calcio, el cual estabiliza la carga del grupo fosfato, facilitando la hidrólisis (Fernandes, *et al.* 2010).

Figura 8. Sitio activo de las fosfolipasas A₂. Se observa la histidina 48, distintos tipos de sustratos, y una molécula de agua (verde) necesaria para la hidrólisis.



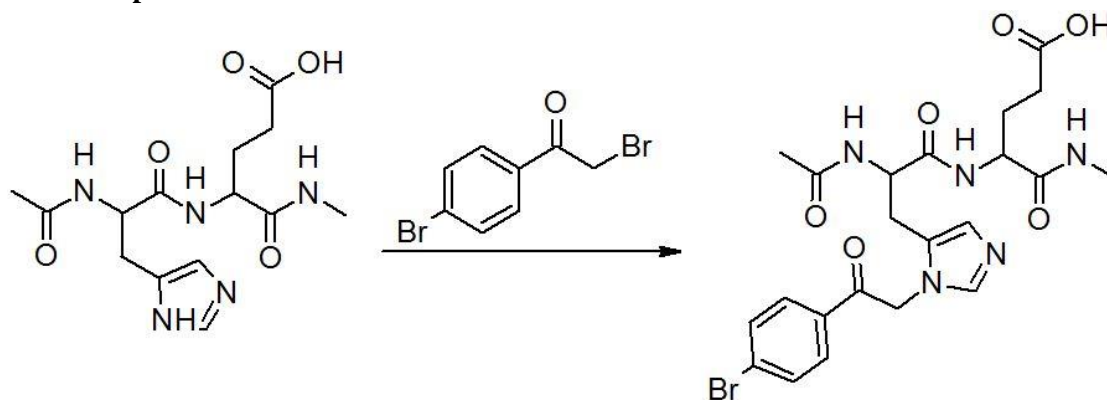
(Fernandes *et al.* 2010)

Existen distintos tipos de PLA₂, dependiendo del patrón de los puentes disulfuro que tengan estas enzimas. Esto diferencia su estructura terciaria y, por lo tanto, su función. Existen al menos 15 tipos de fosfolipasas clasificados en cuatro grandes grupos. Los tipos I, II, III, V, y X pertenecen al grupo de PLA₂ secretadas (sPLA₂). Las citosólicas (cPLA₂) fueron descritas por primera vez en macrófagos, y comprenden al tipo IV. Otro tipo de fosfolipasas, son las

independientes de calcio (iPLA₂), entre las que se encuentra el tipo VI. Aquellas que son activadoras de plaquetas, o asociadas a lipoproteínas (PAF/Lp PLA₂) contienen al tipo VIII (Burke y Dennis, 2009).

6. Inhibidores sintéticos de PLA₂. Jeng y Fraenkel-Conrat (1978) reportaron por primera vez que el bromuro de p-bromofenacilo (pBPB) es un inhibidor directo de la fosfolipasa A₂. Este alquila un residuo de histidina (His49) en el sitio activo (Figura 9). La inhibición por medio de esta molécula posee una cinética de primer orden (Canziani *et al.* 1982).

Figura 9. Reacción de la inhibición de una fosfolipasa por medio del pBPB. Se muestran los residuos de His49 y Aspartato 48 (Asp48) de la estructura, demostrando el sitio de unión del inhibidor para reducir la actividad enzimática.



(ACD/ChemSketch, versión 14.01.76694, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com, 2015.)

III. JUSTIFICACIÓN

Este megaproyecto tiene como enfoque de estudio la genética de la conservación y la toxicología de las especies de fauna amenazadas de extinción en el bosque seco del Valle del Motagua. El objetivo del mismo es diseñar mejores estrategias de manejo y conservación para las especies de fauna amenazadas de extinción en esta área.

El megaproyecto se centra en el estudio de dos de los cuatro componentes que están involucrados en la genética de la conservación, genética poblacional y toxicología. Todas las especies de fauna estudiadas se encuentran presentes en el bosque seco del Valle del Motagua. La genética de la conservación fue estudiada para dos especies, *Ctenosaura palearis* y *Heloderma charlesbogerti*. Ambas especies son endémicas de la región del Valle del Motagua (Stejneger, 1899; Reiserer, 2013).

En el caso de *C. palearis*, el estudio de la genética poblacional es de suma importancia ya que no se tiene un registro detallado de la diversidad de haplotipos en el bosque tropical estacionalmente seco del Valle del Motagua. Los únicos estudios genéticos que se han realizado de esta especie se basan en la identificación y separación de este clado con respecto a las demás especies encontradas en el resto de Centro América, de tal manera conocer sobre la filogenie de la especie (Pasachnik; Echternacht, 2010).

Este estudio es importante para la conservación de la especie, ya que a pesar de encontrarse amenazada (Ariano-Sánchez y Pasachnik, 2011), juega un rol muy importante en la ecología del bosque seco ya que ayuda en la dispersión de semillas de varias especies de frutas y cactus, específicamente de *Stenocereus pruinosus*. Se ha reportado que las semillas de *S. pruinosus* ingeridas y digeridas por *C. palearis* tienen una mayor tasa de germinación y desarrollo (Vasquez- Contreras y Ariano-Sánchez, 2016). En 2010, *C. palearis* fue incluida en el Apéndice II de la Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestre. Encontrarse en esta categoría indica que debe de controlarse su comercialización mas no se encuentra en peligro de extinción (CITES 2010).

Otra de las especies con las que se trabajó en el ámbito de la genética poblacional es *Heloderma charlesbogerti*, conocido también como lagarto escorpión. El Lagarto escorpión es una especie bastante conocida en la región del Valle del Motagua, sin embargo, actualmente es visto por muy pocas personas (Ariano, 2003). Muchos mitos se han asociado a la naturaleza venenosa de este lagarto, entre los que se puede destacar su capacidad para secar los árboles en los que se trepan, o que inyecta su veneno con la cola (Ariano, 2003). Debido a todas estas creencias, su población ha disminuido con los años, Ariano (2003), sugería una densidad poblacional de un individuo/3.61 ha.

Por otro lado, en la Estrategia Nacional para la Conservación del Heloderma y su Hábitat (CONAP-Zootropic, 2013) se establece para el objetivo 2, estrategia 2.1.1 que se realizará un estudio serio del componente genético del Heloderma con fines de conservación. Sin embargo, hasta el momento no se ha llevado a cabo el análisis de su diversidad a nivel de toda su área de distribución. Desde 2007, *H. charlesbogerti*, se encuentra en el Apéndice I de la Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestre (Ariano-Sánchez, *et al.*, 2014).

H. charlesbogerti también participó en un estudio más detallado de sus toxinas. Por mucho tiempo, la investigación de venenos se ha centrado principalmente en el clado Toxicófera de los reptiles (Koludarov *et al.* 2017; Fry *et al.* 2006). Dentro de este grupo se encuentra una variedad de especies de serpientes y lagartos, dentro de esta se encuentra *Crotalus simus* (Serpiente de cascabel) y *H. charlesbogerti*. Es importante la conservación de estas especies. El estudio de sus venenos puede expandir el conocimiento necesario para el manejo adecuado de las mismas, debido a que son especies peligrosas.

Gran parte de los casos de envenenamiento por mordida de serpiente se debe a los Crotálicos (Chippaux, 1998, Saravia *et al.* 2002). En los Estados Unidos se reportan aproximadamente entre cincuenta y cien incidentes mayores (por cada mil mordidas) debido a mordidas de cascabel (Walter *et al.* 2009). Mientras que en Costa Rica se reportaron entre quinientos y seiscientos casos anuales entre 1990 y 2000 (Gutiérrez, 2010). Por otro lado, los casos de envenenamiento por morida de Heloderma son principalmente accidentales (Ariano-Sánchez, 2008). Sin embargo, no existe un tratamiento específico para este veneno, solamente para el alivio de los síntomas.

Por esto es importante el estudio de la cinética de acción de toxinas como estas, de manera que pueda tratarse un caso de mordedura a tiempo. Este estudio es crítico para mejorar el manejo y las estrategias de conservación de esta especie. La cinética de las fosfolipasas A₂ (PLA₂, por sus siglas en inglés) no presenta estudios previos para el veneno de *C. simus* ni para el veneno de *H. charlesbogerti*. Debido a que las enzimas poseen una actividad neurotóxica y hemotóxica, es importante determinar la rapidez a la cual ocurren estos efectos y cómo un inhibidor puede modificarlos.

De la misma manera, existe una tendencia creciente al uso de tratamientos sintéticos para venenos. Aunque los tratamientos tradicionales con antiveneno sigan siendo utilizados de forma efectiva, algunos casos presentan efectos adversos en la piel, tracto gastrointestinal, y en los sistemas respiratorio y circulatorio. Estos efectos pueden evitarse por medio del uso de inhibidores sintéticos (Carvalho *et al.* 2013). También, debido a que el tratamiento se administra

por vía intravenosa, la neutralización de los efectos locales no se realiza de manera que se contrarreste la rápida acción del veneno, por lo que inhibidores sintéticos pueden complementar de forma local el tratamiento a estos accidentes (Preciado y Pereañez, 2017).

La importancia de poder determinar si el picogruaso amarilllo (*P. chrysopeplus*) posee alguna toxina recae en la información que esto aportaría sobre sus relaciones ecológicas y evolutivas con orioles (*Icterus spp.*). La convergencia en plumaje de este grupo de aves, así como su aparente aposematismo son dos factores a determinar como parte de este enfoque. La presencia de toxinas en la especie a evaluar brindaría información hasta ahora desconocida que permitiría sugerir nuevas hipótesis sobre las razones ecológicas de patrones de plumaje de este grupo. Lo mismo ya se ha realizado con otras especies de aves (Omland y Lanyon, 2000; Price, Friedman y Omland, 2007) y se pretende continuar con la generación de información innovadora con este proyecto. Asimismo, resalta la importancia de realizar estudios para poder identificar estas sustancias tóxicas que incluso podrían llegar a tener aplicaciones, por ejemplo, en medicina o pesticidas. Esto involucra el potencial que presenta este proyecto en el campo toxinológico, en donde la información sobre toxinas presentes en alguno de los organismos a evaluar podría impulsar futuras investigaciones para emplear dichos compuestos con aplicaciones médicas (medicamentos, analgésicos, antídotos) o agrícolas (pesticidas, fungicidas) (Gopalakrishnakone, 2015; Rand, 1995).

Ampliar el conocimiento sobre la ecología de estas especies puede resultar en un incentivo de conservación para las mismas, puesto que supondría que de existir sustancias tóxicas en alguna(s) especie(s), las mismas podrían tener aplicaciones para el bienestar humano. De ser el caso, esto aportaría especial relevancia a la conservación de *Pheuctucus chrysopeplus*, especie amenazada de esta zona según la Lista de Especies Amenazadas (CONAP, 2009), al mismo tiempo que aumentaría el interés de investigación en este grupo.

La información relativa a todas las especies mencionadas anteriormente en el bosque seco del Valle del Motagua es muy limitada, por lo que es importante ampliar estos conocimientos para dar lugar a nuevas y mejoradas estrategias de conservación que sean efectivas, tanto de forma específica para la especie, como a nivel de paisaje. En la actualidad se ha hecho difícil determinar a un nivel de región cuáles son las especies que actúan como los pilares que sostienen el ecosistema en el bosque seco. Estudios como los presentados para *C. palearis* en el que se analiza su rol ecológico son de gran importancia, por lo que lo presentado en este proyecto puede sentar las bases para estudios posteriores con estas especies en la región.

IV. OBJETIVOS

A. General:

Diseñar mejores estrategias para el manejo y la conservación de las especies de vida silvestre amenazada del bosque tropical estacionalmente seco del Valle del Motagua.

B. Específicos:

1. Determinar la estructura genética poblacional de *Heloderma charlesbogerti* en el bosque tropical estacionalmente seco del Valle del Motagua.
2. Determinar la estructura genética de *Ctenosaura palearis* en el bosque tropical estacionalmente seco del Valle del Motagua.
3. Sintetizar el bromuro de p-bromofenacilo (pBPB) y evaluar su utilidad para reducir la actividad hemolítica del veneno de *Crotalus simus* y *Heloderma charlesbogerti*.
4. Describir la actividad enzimática de las fosfolipasas de *Crotalus simus* y *Heloderma charlesbogerti*; y comparar éstas al utilizar un inhibidor sintético.
5. Evaluar la toxicidad de plumas de *Pheucticus chrysopleplus*.

V. HIPÓTESIS

A. Genética poblacional

1. **Genética poblacional del lagarto escorpión, *Heloderma charlesbogerti* (Sauria: Helodermatidae) e iguana del órgano, *Ctenosaura palearis* (Sauria: Iguanidae) en el bosque seco del Valle del Motagua, Guatemala.** Existen al menos dos Unidades de Significancia Evolutiva para *Heloderma charlesbogerti* y *Ctenosaura palearis* en el bosque tropical estacionalmente seco del Valle del Motagua.

2. **Implicaciones de genética poblacional para el desarrollo de estrategias de conservación de la iguana de órgano, *Ctenosaura palearis* (Sauria: Iguanidae), y lagarto escorpión, *Heloderma charlesbogerti* (Sauria: Helodermatidae), en el bosque seco del Valle del Motagua** La estructura genética de las especies *Heloderma charlesbogerti* y *Ctenosaura palearis* puede ayudar a determinar las estrategias de conservación requeridas.

B. Toxinología

1. **Síntesis verde de un inhibidor de fosfolipasa A2 y evaluación de su utilidad para reducir la actividad hemolítica en el veneno de serpiente de cascabel (*Crotalus simus*) y lagarto escorpión (*Heloderma charlesbogerti*).** Se observará diferencia en la actividad hemolítica de los venenos al ser tratados con el bromuro de p-bromofenacilo sintetizado.

2. **Evaluación de la toxicidad de extractos de plumas de *Pheucticus chrysopeplus* (Aves: Cardinalidae) mediante ensayo de letalidad con *Artemia salina* (Anostraca: Artemiidae) como modelo *in vivo*.** Extractos de plumas de *P. chrysopeplus* presentarán toxicidad al evaluar su efecto sobre la mortalidad de *A. salina*.

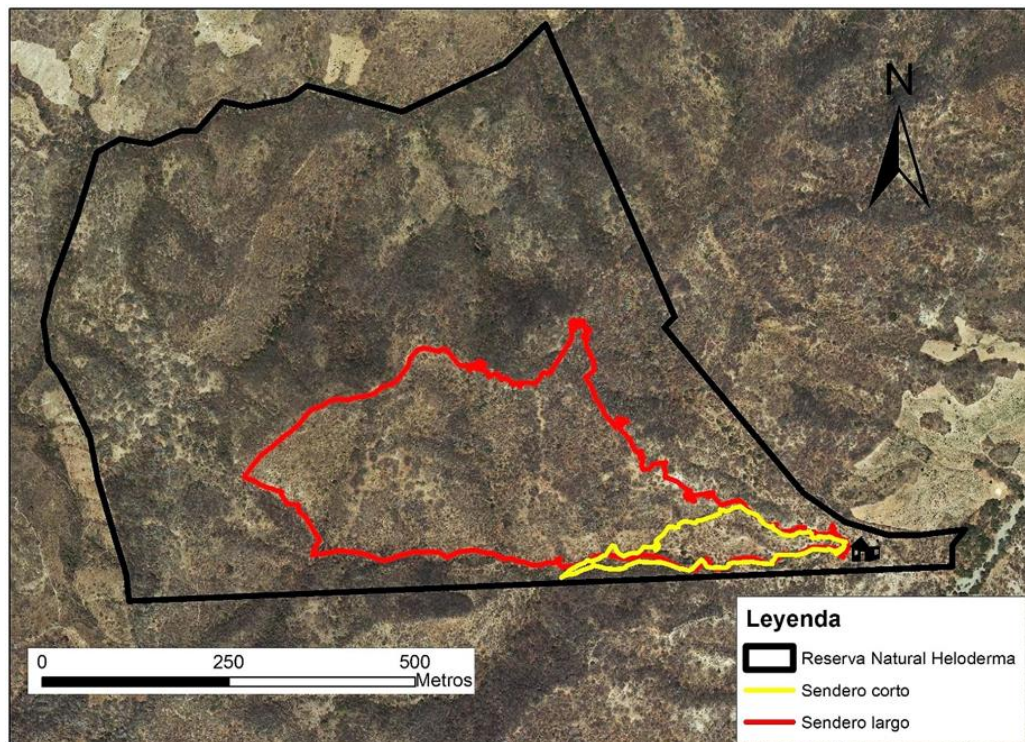
VI. DESARROLLO POR COMPONENTES DE MEGAPROYECTO

A. Genética poblacional de lagarto escorpión *Heloderma charlesbogerti* (Sauria: Helodermatidae) y la iguana de órgano *Ctenosaura palearis* (Sauria: Iguanidae), en bosque seco del valle del Motagua, Guatemala.

1. Metodología compartida para el estudio de ambas especies (*H. charlesbogerti* y *Ctenosaura palearis*).

a. **Área de estudio.** El estudio se llevó a cabo en el bosque seco del Valle del Motagua, usando como base logística la Reserva Natural para la Conservación del Heloderma (RNH); La RNH se encuentra en el municipio de Cabañas, departamento de Zacapa (14°53'N, 89°47'W); localizada en el Valle del Motagua en el Este de Guatemala (Figura 10). Esta zona presenta una precipitación anual de aproximadamente 15mm, humedad relativa del 71% y una evapotranspiración de 1,798.8mm (CONAP-Zootropic-CECON-TNC, 2011). Esta zona está cubierta por el bosque lluvioso estacionalmente seco, en la zona de vida de Monte espinoso subtropical (Holdridge, 1978).

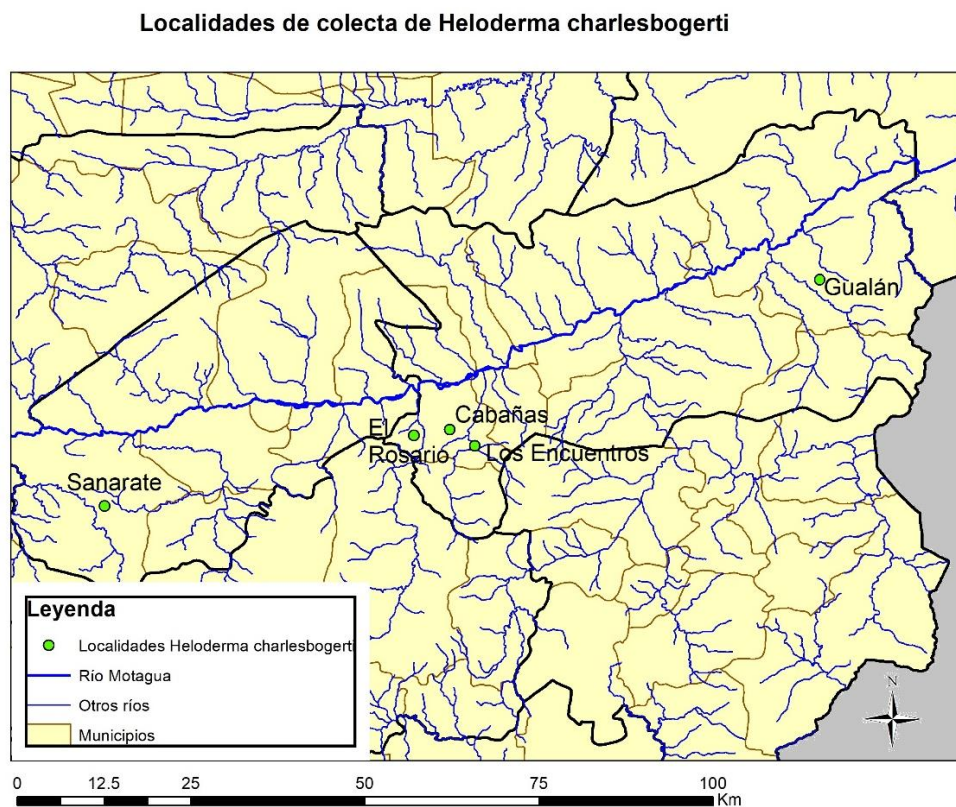
Figura 10. Reserva Natural para la Conservación del Heloderma, Cabañas, Zacapa.



Esta área presenta una marcada estacionalidad con una época lluviosa de cinco meses, de Junio a Octubre, y una época seca de siete meses, de Noviembre a Mayo (Nájera, 2006). Presenta una vegetación variada, con especies distintivas de bosque seco como *Plumeria rubra* (Apocynaceae); *Pilosocereus leucocephalus*, *Opuntia decumbens* (Cactaceae); *Bursera simaruba* (Burseraceae), etc (Ariano-Sánchez & Salazar, 2015).

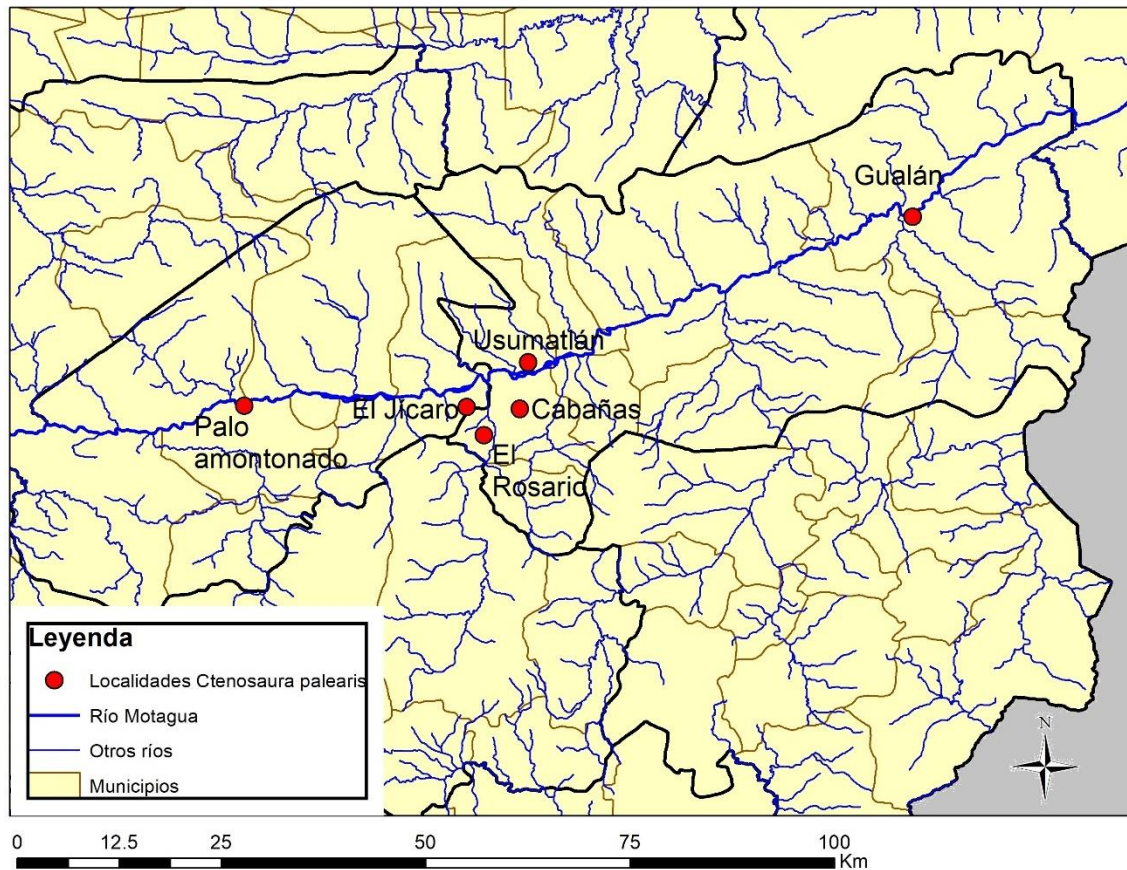
Para el estudio de *Heloderma charlesbogerti*, se obtuvieron muestras de cuatro localidades distintas; Gualán, El Rosario y Cabañas-Los Encuentros en Zacapa; y Sanarate en El Progreso (Figura 11).

Figura 11. Localidades estudiadas como parte del muestreo de genética poblacional de *Heloderma charlesbogerti* en el Valle del Motagua, Guatemala.



Para el estudio de *Ctenosaura palearis*, se obtuvieron muestras de seis localidades distintas; Gualán, El Rosario y Cabañas, Usumatlán y El Jícaro en Zacapa; y Paloamontonado en El Progreso (Figura 12).

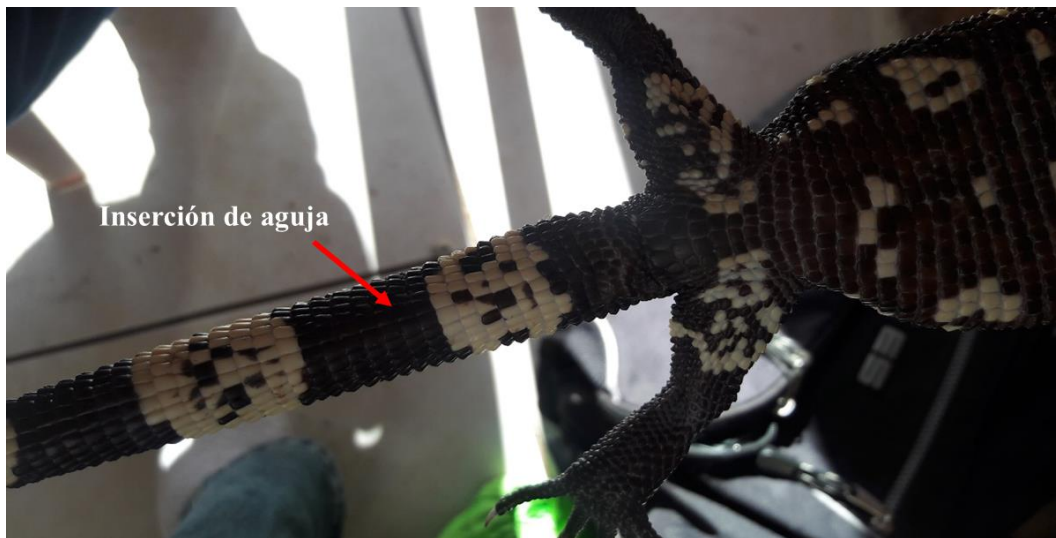
Figura 12. Localidades estudiadas como parte del muestreo de genética poblacional de *Ctenosaura palearis* en el Valle del Motagua, Guatemala.



b. Muestreo. Para la obtención de muestras de ambos animales (*H. charlesbogerti* y *C. palearis*) se utilizó el protocolo de recolección y preservación de sangre para genética; así como almacenamiento en papel filtro de Wildlife Conservation Society (2014). (Anexo 1).

La metodología consistió en realizar una esterilización del área de donde se obtendrá la sangre (área subcaudal) con etanol al 95%. Se insertó la aguja (de 1cc) entre las escamas de forma perpendicular a la piel sobre la línea media de la superficie ventral de la cola. La extracción se llevó a cabo lentamente con la jeringa hasta que se pueda observar sangre fluyendo. Con la sangre fluyendo por la jeringa, esta se retiró del animal y se vació sobre papel filtro Whatman® FTA donado por INACIF para la conservación de la muestra hasta su análisis.

Figura 13. Lugar de inserción de aguja para obtención de sangre periférica en el animal.



La inserción de la aguja se realizó con el animal en posición vertical para favorecer el flujo de sangre hacia la cola.

Figura 14. Posicionamiento del heloderma para la extracción de sangre y posterior almacenamiento en papel FTA.



También se tomaron datos morfológicos del animal: longitud de hocico-cloaca (SVL; por sus siglas en inglés), longitud de cola (TL; por sus siglas en inglés), con una metro y medidas de hocico con un vernier.

**Figura 15. Medición de datos morfológicos del animal para su registro en bitácora.
Mediciones de SVL y TL fueron haciendo uso de un metro convencional.**



El proceso de muestreo se llevó a cabo con personal de la Reserva Natural para la Conservación del Heloderma, que presentan licencia de colecta emitida por el Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP) (Anexo 2). Además, se contó con la autorización del Comité de Ética en Cuidado y Uso de Animales de la Universidad del Valle de Guatemala (CEUCA-UVG) (Anexo 3)

c. Extracción de ADN y amplificación de genes. Las extracciones de ADN de las muestras almacenadas en papel Whatman® FTA, se llevaron a cabo en base al protocolo establecido en el kit comercial GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep marca Sigma-Aldrich (número de catálogo: G1N70) (Anexo 4). Y la cuantificación del ADN extraído se realizó en el Biofotómetro Plus marca Eppendorf.

Para la reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se realizó con base al protocolo establecido por el kit comercial Ready Mix Taq PCR Reaction Mix, marca Sigma-Aldrich (número de catálogo: P4600) con 25µL de Ready Mix, 1µL de ADN plantilla, 1µL de cebador sentido, 1µL de cebador antisentido y 22µL de agua ultrapura. El programa de amplificación se detalla en el Anexo 5, donde se utilizaron 30 ciclos.

El gen mitocondrial amplificado fue *atpasa-6* con código de acceso en GenBank: GU599952.1, su secuencia fue publicada por Douglas *et al.* en 2010, sin embargo, parte del objetivo del presente trabajo fue el diseño de cebadores específicos para la especie *H. charlesbogerti*; de igual forma cebadores para los genes *nadh4* con código de acceso en GenBank: GU906220.1 y *ldhA* con código de acceso en GenBank: GU331974.1, los cuales habían sido reportados previamente (Pasachnick, 2011), sin embargo, fueron diseñados. Por lo tanto, para la amplificación se utilizaron cebadores diseñados en Integrated DNA Technologies y Primer 3 Bioinfo (Untergasser *et al.*, 2012). Dentro de los parámetros para la selección del par de cebadores que serían utilizados, se encontraba la especificidad, temperaturas de fusión muy parecida y amplificación de un producto de gran tamaño.

Los cebadores fueron sintetizados por Macrogen en Corea en base al análisis bioinformático realizado; la concentración de éstos fue de 100pmol/µL en stock.

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con gel TBE (Tris, borato y EDTA), separados por 60 (para la prueba de cebadores) y 45 (para el resto de muestras) minutos con tinción directa del producto con una dilución 100x de GelRed™ marca Biotium y visualización en un transiluminador marca UVP.

d. Purificación y secuenciación. La purificación de los productos amplificados por PCR se llevó a cabo en base al protocolo establecido en el kit comercial SpinPrep PCR Clean-up, marca Millipore (número de catálogo: 70976-3) (Anexo 6). Luego de su purificación fueron enviados a Corea del Sur para su secuenciación de solamente una hebra con el cebador sentido por método de Sanger en la empresa MacroGen. Los diferentes haplotipos presentes en las poblaciones analizadas se determinaron mediante el análisis de los fragmentos secuenciados.

e. Análisis de resultados. Las secuencias fueron limpiadas en el programa Chromas Pro y fueron alineadas utilizando el programa MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) y posteriormente se realizó el análisis de varianzas molecular (AMOVA; por sus siglas en inglés), SAMOVA, D de Tajima, diversidad de nucleótidos, número de sitios de segregación y número de sitios informativos de Parsimonia en PopArt 1.7. Una vez conocido el alineamiento de las secuencias, se generó la red de haplotipos, utilizando el método de inferencia TCS (Clement *et al.* 2002) en el programa PopArt 1.7 y el cladograma mediante el análisis máxima verosimilitud (Maximum Likelihood), con el algoritmo TBR (tree-bisection-reconnection), 1000 cladogramas con 500 réplicas en el programa PAUP (Bandelt *et al.*, 1995; Pasachnik, *et al.*, 2011).

La determinación de las ESU se realizó a partir de la generación de las redes de haplotipos, por lo que aquellos haplotipos que presentan una cantidad mayor que 2 mutaciones con respecto al haplotipo más diverso, se tomó como una ESU.

2. Resultados del estudio de genética poblacional de *H. charlesbogerti*.

a. Diseño y evaluación de cebadores para el gen mitocondrial *atpasa-6* de la especie *Heloderma charlesbogerti*. Los cebadores diseñados se muestran en el Cuadro 4, los cuales permiten la amplificación de un producto de 473 pares de bases. Ambos cebadores presentan temperaturas de fusión muy parecidas, haciendo que su uso sea más versátil y el porcentaje de GC, se encuentra en el rango óptimo.

Cuadro 4. Cebadores diseñados y utilizados para la amplificación del gen *atpasa-6* de *H. charlesbogerti*

Gen	Cebadores	Longitud	Tm	%GC
<i>atpasa-6</i>	F 5'-ACGTACCCACCTAATACACAATC-3'	23	62°C	43.5%
	R 5'-GAAGGGTGGTTGTTGGTATAGT-3'	22	62°C	45.5%

Para la evaluación de los cebadores se realizaron reacciones en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) *in silico* con el gen mitocondrial *atpasa-6* en Primer 3, obteniendo resultados positivos.

b. Extracción de ADN y cuantificación. En total, se obtuvieron 29 muestras de *H. charlesbogerti* de cuatro localidades diferentes (Anexo 7). Donde 10 fueron hembras y 19 machos. Para probar el rendimiento de kit comercial, se realizaron tres extracciones de ADN, en donde se utilizó un disco de 1cm de diámetro, los resultados se muestran a continuación.

Cuadro 5. Resultados de extracción de ADN de tres muestras de sangre periférica impregnada en discos de papel Whatman ® FTA de *H. charlesbogerti*.

MUESTREA	[NG/μL]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
HE1	31	1.31	0.57
HE2	40	1.37	0.52
HE3	33	1.35	0.62

Los resultados anteriores muestran la presencia de muchas impurezas y baja cuantificación de ADN; así como presencia de sales residuales de la extracción por columna.

Por lo tanto, se decidió realizar el mismo procedimiento con dos discos de papel Whatman ® FTA junto con agitación del papel dentro de la columna de extracción mediante palillos estériles; de esta forma, además de aumentar la concentración de ADN, aumentó la pureza del ADN extraído, siendo este el factor más importante. Los resultados de cuantificación y pureza se muestran en la siguiente tabla.

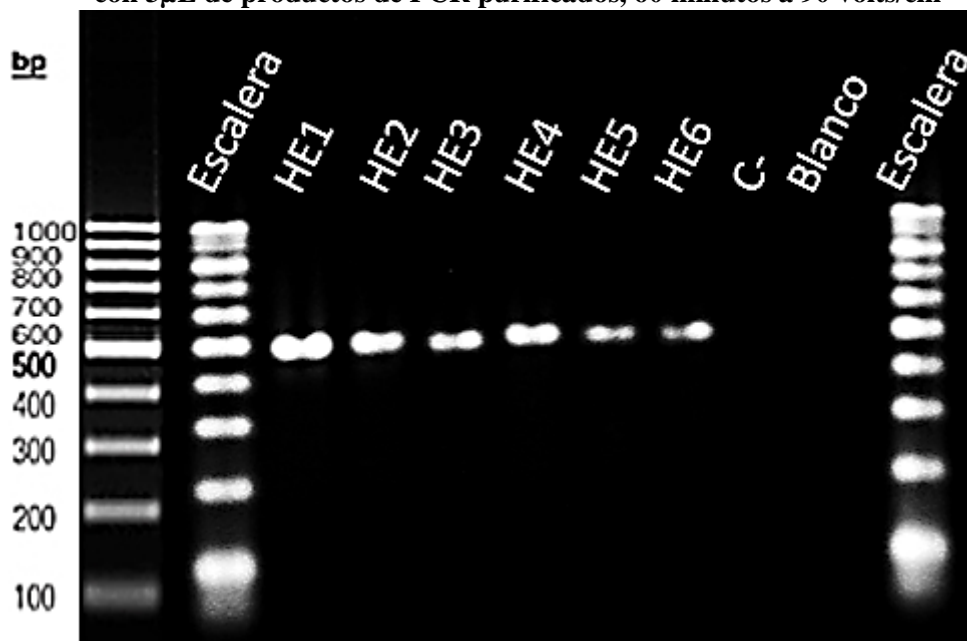
Cuadro 6. Resultados de extracción de ADN utilizando dos discos de papel Whatman® FTA, junto con agitación en columna mediante palillo estéril de *H. charlesbogerti*.

Muestrea	[ng/ μ L]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Muestrea	[ng/ μ L]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
HE1	135	2.07	0.39	HE16	94	1.49	0.32
HE2	97	1.76	0.31	HE17	114	1.59	0.39
HE3	90	1.64	0.31	HE18	93	1.62	0.33
HE4	112	1.58	0.35	HE19	123	1.63	0.35
HE5	105	1.62	0.39	HE20	131	1.62	0.39
HE6	91	1.66	0.34	HE21	131	0.69	0.45
HE7	111	1.60	0.32	HE22	120	1.63	0.40
HE8	76	1.71	0.31	HE23	119	1.65	0.40
HE9	95	1.77	0.42	HE24	20	1.30	0.45
HE10	88	1.66	0.30	HE25	16	1.93	0.56
HE11	128	1.37	0.36	HE26	15	1.86	0.47
HE12	89	1.52	0.31	HE27	22	0.90	0.58
HE13	135	1.52	0.35	HE28	13	0.69	0.51
HE14	98	1.46	0.33	HE29	271	1.41	0.59
HE15	96	1.56	0.32				

A pesar de que algunas extracciones de ADN presentan pureza (A₂₆₀/A₂₈₀) menor a 1.6, se decidió trabajar con ellas en la amplificación del gen *atpasa-6* por reacción en cadena de polimerasa (PCR). La baja concentración de ADN para las muestras HE25, HE26, HE27, y HE28 fue a causa de una muy baja cantidad de muestra. No fue posible obtener dos discos de papel filtro con sangre, por lo que únicamente se trabajó con uno.

c. Amplificación de gen *atpasa-6* con cebadores diseñados. Los cebadores diseñados (Cuadro 5) fueron eficientes en la amplificación del gen *atpasa-6* con tamaño de fragmento aproximado de 500 pares de bases. A continuación, se muestra el gel de agarosa al 1.5% en donde se cargaron los productos de PCR correspondientes al gen *atpasa-6* purificados.

Figura 16. Prueba de eficiencia de cebadores de *H. charlesbogerti*. Gel de agarosa 1.5% con 3 μ L de productos de PCR purificados, 60 minutos a 90 volts/cm



En la Figura 16 se muestra los productos de PCR correspondientes al gen *atpasa-6*, con cebadores diseñados (Cuadro 5), el tamaño del producto es de aproximadamente 500 pares de bases, correspondiendo al tamaño esperado de 473 pares de bases. El control negativo utilizado fue la mezcla de todos los reactivos de PCR utilizando ADN de *C. palearis* como plantilla. El blanco estuvo constituido por únicamente agua.

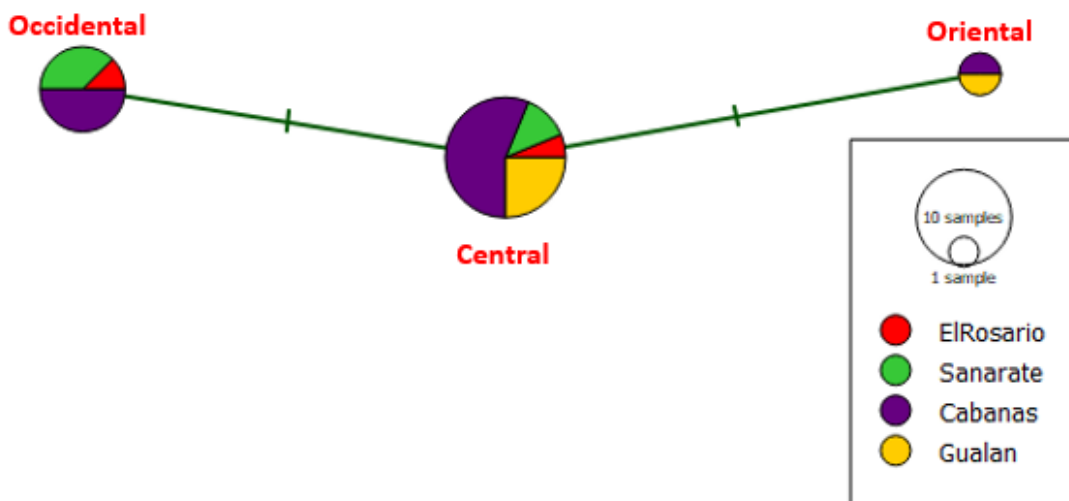
Las 29 muestras de ADN extraído amplificaron de forma eficiente para el gen *atpasa-6* en base a los cebadores diseñados, por lo que fueron purificados y observados en gel de agarosa 1.5% separado por 45 minutos a 90 volts/cm (Anexo 8).

En general, todos los productos purificados presentaron banda visible, por lo que no fue necesaria su cuantificación (100% de eficiencia en amplificación), estos fueron enviados a Macrogen, Inc, Corea para su secuenciación mediante el método Sanger.

Los electroferogramas obtenidos se muestran en el Anexo 10; estas secuencias presentan señales de nucleótidos de baja calidad al inicio por lo que fue necesario realizar su limpieza, dejando únicamente la secuencia de interés que fue analizada. Las secuencias de las muestras: HE10, HE12 y HE27 no fueron utilizadas en análisis posteriores; ya que no fue posible su secuenciación confiable, generando electroferogramas de baja calidad y resolución.

d. Baja diversidad genética poblacional de *Heloderma charlesbogerti* en el Valle del Motagua según red de haplotipos. Las secuencias únicamente muestran el contenido de nucleótidos presente en el producto de PCR; sin embargo, estas secuencias son informativas en este caso, alineándolas en búsqueda de haplotipos. La red de haplotipos se generó en base al alineamiento de las secuencias (Anexo 14), por lo que se obtuvo la siguiente red de haplotipos

Figura 17. Red de haplotipos del gen *atpasa-6* por medio del método de inferencia TCS y su distribución con las localidades correspondientes. Los círculos representan los haplotipos, y sus áreas son directamente proporcionales al número de individuos que presentan ese haplotipo en particular. Las líneas cruzadas representan el número de variaciones o mutaciones encontradas en las secuencias. Tres haplotipos fueron identificados occidental (n=8), central (n=16) y oriental (n=2).



La única muestra obtenida de Los Encuentros fue agrupada como perteneciente a Cabañas ya que prácticamente son la misma localidad. Fue posible la identificación de tres haplotipos distintos, los cuales se denominó occidental, central y oriental. Estos haplotipos se diferencian entre sí por una única mutación, por lo que solo una Unidad de Significancia Evolutiva (ESU, por sus siglas en inglés) fue encontrada, sin estructura genética claramente definida en las poblaciones de la especie.

La red de haplotipos generada muestra también la distribución de los tres haplotipos encontrados con respecto a la localidad de origen de los ejemplares analizados (Figura 17). Como se muestra en el Cuadro 5, los ejemplares provenientes de la localidad de Cabañas presentan los tres haplotipos encontrados. Además, se observa un claro gradiente en la distribución espacial de estos haplotipos, estando el haplotipo occidental distribuido en las poblaciones del oeste y centro del Valle del Motagua y el haplotipo oriental restringido a las poblaciones del centro y este del Valle del Motagua. La

población del centro de la distribución (Cabañas-Los Encuentros) presenta individuos del haplotipo occidental, así como del oriental, sumados al haplotipo típico de dicha localidad que es el haplotipo ancestral o central.

Cuadro 7. Número de individuos de cada localidad encontrados en los diferentes haplotipos de *H. charlesbogerti* en el Valle del Motagua. Las localidades están colocadas en orden de ubicación geográfica, de oeste a este.

Localidad	Haplotipo		
	Occidental	Ancestral	Oriental
Sanarate	3	3	
El Rosario	1	1	
Cabañas-Los Encuentros	4	5	1
Gualán		4	1

e. **Una única Unidad de Significancia Evolutiva (ESU) de la especie *Heloderma charlesbogerti*.** Esto fue posible confirmarlo mediante el análisis de varianza molecular (AMOVA); prueba que evalúa la existencia de diferencias entre secuencias de ADN (*atpasa-6*) analizadas.

El resultado del análisis estadístico AMOVA (Cuadro 8) muestra que no hay diferencia significativa entre los diferentes haplotipos encontrados ($\Phi_{ST} = 0.09$, $p=0.12$) para *Heloderma charlesbogerti* en las cuatro localidades de muestreo; indicando que no existe una estructura genética diferenciada a nivel de poblaciones para el gen *atpasa-6*

Cuadro 8. Análisis de variación molecular (AMOVA) de las secuencias obtenidas mediante secuenciación Sanger, y análisis de variación molecular especial (SAMOVA) con tres grupos de *H. charlesbogerti*.

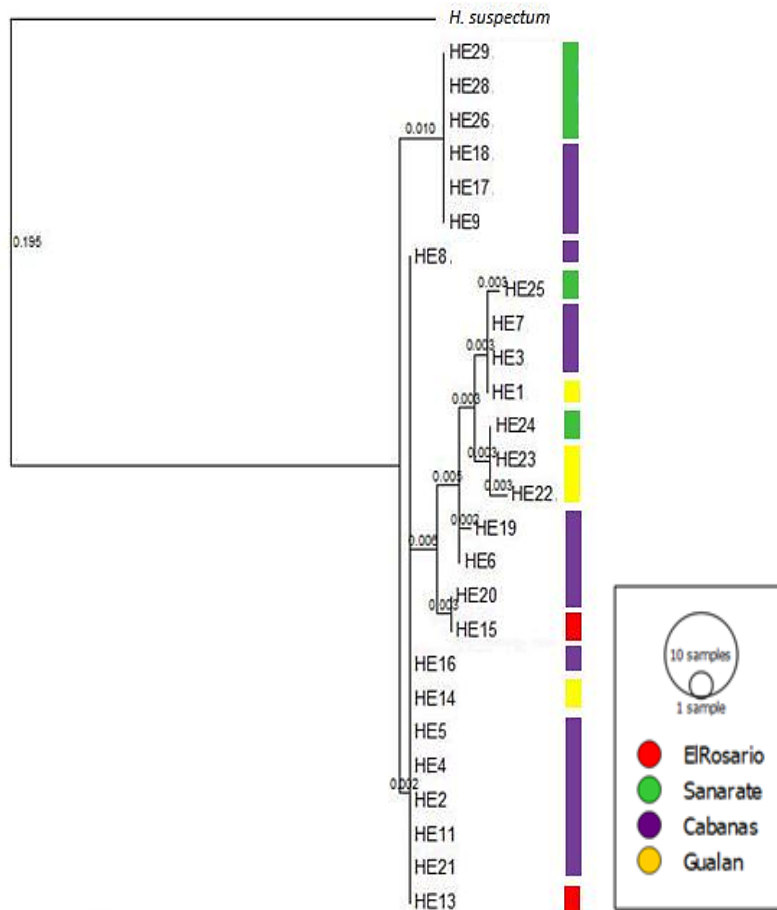
	Gen <i>atpasa-6</i>
AMOVA simple	0.092 (p = 0.12)
Φ_{ST}	
Grupo occidental	Sanarate
Grupo central	Cabañas, El Rosario
Grupo oriental	Gualán
Entre grupos	30.08%
Φ_{ST}	0.17 (p = 0.10)
Entre las poblaciones dentro de los grupos	-12.88%
Φ_{SC}	-0.18 (p = 0.16)
Dentro de las poblaciones	82.71%
Φ_{CT}	0.30 (p = 0.16)
D Tajima's	0.0963
Diversidad de nucleótidos	0.0013
Número de sitios de segregación	2
Número de sitios informativos de parsimonia	2

Además, tampoco se encontró una estructura genética marcada a nivel intrapoblacional ($\Phi_{ST}= 0.17$, $p=0.10$), ni a nivel interno de cada localidad geográfica ($\Phi_{SC}=-0.18$, $p=0.16$), ni entre las localidades geográficas ($\Phi_{CT}=0.30$, $p=0.16$).

Otro estadístico de importancia es la D de Tajima, la cual compara la diferencia genética media observada entre individuos con respecto a la esperada para la población. Los valores negativos indican un barrido selectivo que redujo la variación poblacional o una expansión reciente de la población luego de haber pasado por un cuello de botella genético, mientras que los valores positivos indican selección balanceada entre los diferentes haplotipos que mantienen la variación o una contracción poblacional reciente. La D de Tajima obtenida fue de 0.0963, lo que indica que la población en general de *H. charlesbogerti* en el Valle del Motagua ha pasado por una contracción poblacional reciente

El cladograma del análisis de probabilidades máximas verosimilitud (maximum likelihood) fue generando, a continuación, se muestra

Figura 18. Cladograma generado con el algoritmo de máxima verosimilitud (Maximum likelihood) usando a *Heloderma suspectum* como outgroup en el análisis. CI (consistency index): 0.979, HI (homoplasy index): 0.021, RI (retention index): 0.931, RC (rescaled consistency index): 0.911.



El cladograma a pesar de presentar alta consistencia (CI=0.979), los nodos no son sólidos, haciendo que el cladograma no encuentre una clara diferenciación de clados, lo que es congruente con los resultados de muy baja estructura genética encontrada con el AMOVA y la red haplotipos.

3. Discusión de resultados obtenidos del análisis de muestras de *H. charlesbogerti*.

a. **Extracción de ADN, amplificación y secuenciación.** En total 29 ejemplares de *Heloderma charlesbogerti* fueron muestreados, de cuatro localidades distintas (Anexo 7). Un factor limitante en todo el proceso de extracción fue la cantidad de muestra; ya que algunas presentaban muy poca cantidad de sangre disponible para realizar los discos usados en la extracción de ADN. Esto se pudo evidenciar en la baja cuantificación de prueba del kit realizada sobre tres muestras (Cuadro 6), donde fue necesario utilizar un disco extra (dos en total) para aumentar la concentración de ADN extraída del papel filtro. A pesar de aumentar la concentración

de ADN, se aumentó a su vez, la cantidad de impureza debido a la agitación del papel en la solución de resuspensión.

Para las muestras HE24, HE25, HE26, HE27 y HE28, la baja concentración se atribuye a que se contaba con muy escasa muestra; haciendo posible la utilización de un único disco, sin tener el total del área cubierta por sangre periférica del animal.

A pesar de que las primeras muestras fueron recolectadas en el mes de noviembre de 2016, el papel FTA resultó ser bastante eficiente para el almacenamiento de las muestras; se ha reportado que el papel FTA puede almacenar muestras por largos períodos de tiempo y aun así ser eficientes para extracción de ADN y amplificación de genes (Rahikainen, Palo, de Leeuw, Budowle, & Sajantila, 2016).

En el Cuadro 6 se muestran valores de A_{260}/A_{230} bajos (<0.50), los cuales se deben a la presencia de residuos de guanidina (presente en la columna de extracción de ADN), o carbohidratos (Wilfinger, Mackey, & Chomczynski, 1997). La presencia de carbohidratos posiblemente se deba a residuos de papel FTA que lograron pasar por los poros de la columna. Es importante mencionar que valores de A_{260}/A_{230} no están relacionados con la eficiencia de amplificación de ADN (Lebuhn *et al.*, 2016).

La electroforesis en gel de agarosa (Figura 16), muestra efectividad de los cebadores diseñados (Cuadro 5) para el gen *atpasa-6*. Este gen fue descrito por Douglas en 2010, sin embargo, los cebadores utilizados (Perdices & Doadrio, 2001) no son específicos, ya que fueron diseñados para el gen *atpasa-6* de peces pertenecientes a la familia Cobitida. Por lo tanto, la utilización de los cebadores reportados en la presente investigación puede ser utilizados para investigaciones posteriores donde se esté analizando este gen en *H. charlesbogerti*.

Las secuencias de ADN eliminadas de los análisis (HE10, HE12 y HE27) presentaron electroferogramas con mucho ruido y baja calidad; esto fue a causa de la alta cantidad de contaminantes orgánicos (Cuadro 7). o mala manipulación del producto de PCR purificado; por lo tanto, únicamente 26 muestras fueron analizadas. Las tres muestras que no fueron analizadas posiblemente sean un sesgo en los resultados obtenidos, ya que corresponden a localidades distintas (El Rosario, Cabañas y Sanarate, respectivamente). En vista de esto, es recomendable volver a extraer ADN y realizar la amplificación en estas muestras, junto con la secuenciación de estas muestras. De esta forma, no existe sesgo en los resultados obtenidos del muestreo realizada en cada localidad.

b. **Genética poblacional.** En la red de haplotipos generada se determinó la presencia de tres haplotipos (occidental, ancestral o central y oriental) (Figura 17), de los cuales el occidental y oriental difieren del central o ancestral por una mutación. En base a esto es posible determinar la presencia de una Unidad de Significancia Evolutiva (ESU; por sus siglas en inglés) ya que de acuerdo con el SAMOVA no existía diferencia significativa en la estructura genética entre las localidades geográficas ($\Phi_{CT}=0.30$, $p=0.16$), debiéndose un 9.22% de la variación encontrada a variación interpoblacional y un 90.78% a variación intrapoblacional.

Estos resultados muestran baja diversidad genética de *H. charlesbogerti* en el bosque seco del Valle del Motagua; siendo congruentes con los resultados obtenidos del análisis de ADN nuclear realizado por Gonzales (2017), donde únicamente se analizó la población del Municipio de Cabañas. También se determinó la D de Tajima con valor positivo (0.0963), indicando la existencia de más sitio de segregación que haplotipos (Sabeti, 2006); lo cual indica que la población de *H. charlesbogerti* en el Valle del Motagua ha pasado por un proceso reciente de contracción poblacional.

Esta contracción poblacional pudo deberse principalmente a dos procesos que llevaron a la especie al borde de la extinción a finales del siglo pasado: la severa pérdida y degradación de hábitat del bosque seco en el Valle del Motagua (Ariano-Sánchez, 2006) y la extracción de ejemplares de las poblaciones silvestres principalmente debido al tráfico ilegal de ejemplares para el comercio de mascotas exóticas (Ariano-Sánchez, 2003; Auliya *et al.* 2017) y a la matanza sistemática debido al temor de los pobladores de la región ante la exageración de su peligro por ser un reptil venenoso (Ariano-Sánchez, 2008).

Se estima que se ha perdido cerca del 80% del hábitat original de la especie en lapso de 1900 a la actualidad (CONAP-ZOOTROPIC-CECON-TNC, 2011; CONAP-ZOOTROPIC, 2013), lo cual seguramente se vio reflejado en una drástica disminución de la población remanente de *H. charlesbogerti* en la región, con la consiguiente pérdida de diversidad genética.

Sin embargo, en este contexto resalta la importancia de la conservación de la población de Cabañas-Los Encuentros, pues esta población presenta los tres haplotipos encontrados para la especie. La conservación de esta población es fundamental para mantener la diversidad genética remanente (aunque sea escasa) de *H. charlesbogerti*, sobre todo en el contexto de cambio climático global. Asimismo, la identificación de una sola ESU conformada por tres haplotipos diferenciados por tan solo una mutación entre sí, disminuye la importancia del establecimiento de programas de reproducción en cautiverio basados en manejo genético poblacional, así como se considera que el establecimiento de programas de translocación de ejemplares entre las poblaciones no presenta beneficios adicionales pues todos provienen de una misma base genética. Lo que, si se puede recomendar, en caso de considerarse deseable el aumentar la diversidad

genética de las poblaciones del límite este y oeste de la distribución de la especie (Gualán y Sanarate, respectivamente), es la translocación de ejemplares entre estas dos localidades. Se espera que a futuro las poblaciones periféricas diverjan de las poblaciones centrales como resultado de los efectos interconectados del aislamiento, la deriva genética y la selección natural.

La conservación a largo plazo de las especies depende probablemente de la protección de las poblaciones genéticamente distintas. Adicionalmente, las poblaciones periféricas son potencialmente importantes para eventos de especiación futuros. Lesica y Alendorf (1995) consideran que, bajo algunas circunstancias, la conservación de poblaciones periféricas podría ser beneficiosa para la protección de los procesos evolutivos que probablemente generen la diversidad evolutiva futura.

Tomando en cuenta que en 2013 se tenía el estimado de 360 ± 40 ejemplares (CONAP-Zootropic, 2013), la baja diversidad genética encontrada podría estar asociada a altas tasas de endogamia, expresión de alelos recesivos perjudiciales, reducción en resistencia a enfermedades y ruptura de heterocigocidad (Tsangaras *et al.*, 2012). Además, poblaciones pequeñas son más vulnerables a deriva genética y desaparición de bases de los genes mitocondriales, y en eventos de migración, el ADNmt presenta mayor efecto fundador (Hay, Daugherty, Cree, & Maxson, 2003). Sin embargo, a pesar del mal panorama avizorado en cuanto a la diversidad genética de *H. charlesbogerti*, el hecho que anualmente se incrementen los números de ejemplares juveniles encontrados en la población silvestre y que no se hayan encontrado deformaciones en ejemplares de la especie, puede indicar que, a pesar de la baja diversidad genética, la especie se encuentra en proceso de recuperación poblacional.

Este fenómeno de buen estado poblacional a pesar de tener una muy baja diversidad genética, se ha reportado con anterioridad en aves como el cernícalo de la isa de Mauricio *Falco punctatus* (Groombridge, Jones, Bruford, & Nichols, 2000) y el albatros errante *Diomedea exulans* (Milot, Weimerskirch, Duchesne, & Bernatchez, 2007), mamíferos como el koala *Phascolarctos cinereus* (Wynen *et al.*, 2000) y otros reptiles como los tuátaras *Sphenodon punctatus* y *S. guentheri* (Hay *et al.*, 2003) y la tortuga de caja del desierto *Terrapene ornata* (Kuo & Janzen, 2004).

Para analizar el caso del lagarto escorpión, es importante establecer el origen de esta especie. Es sabido que *H. charlesbogerti* se separó de *H. alvarezi* hace aproximadamente 3.2 millones de años, por especiación alopátrica; esto en base a análisis moleculares de genes *atpasa-8* y *-6* (Douglas, *et al.*, 2010; Reiserer, Schuett, & Beck, 2013). La clave para el entendimiento de la evolución y biogeografía de las especies de *Heloderma* es el reconocimiento de los biomas que ocupan (Reiserer, *et al.*, 2013); presentando distribución a bajas elevaciones en bosque tropical estacionalmente seco en la costa del pacífico desde el norte de México hasta el este de Guatemala

(Ariano-Sánchez, 2003; Reiserer, *et al.*, 2013). Para *H. alvarezii* no es la excepción, con distribución en el bosque seco de Depresión Central (Rio Grijalva) y Rio Lagartero en Chiapas, hasta el occidente de Guatemala (Beck, 2005; Campbell & Lamar, 2004). Por lo tanto, tomando en cuenta la alta relación filogenética y la biología de ambas especies (*H. charlesbogerti* y *H. alvarezii*), se ha comprobado que la población actual de *H. charlesbogerti* entró al Valle del Motagua por el corredor del Pacífico pasando por tierras bajas de Santa Rosa y Jalapa. Esto fue posible debido a que la presencia de la Sierra Madre de Chiapas, junto con los volcanes que atrapan la humedad, generaron las condiciones de bosque seco donde la especie puede habitar (Anzueto & Campbell, 2010).

El inicio de la explotación de recursos en los departamentos de la zona sur del país inició durante la época de la colonia en el siglo XVI (CENGICANÁ, 2014) Desde entonces, el avance de la frontera agrícola ha causado gran pérdida de los bosques del país, avanzando cada vez más al norte. Actualmente, la gran mayoría del territorio de la Costa Sur pertenece a plantaciones de caña de azúcar. Tal cultivo no es apto para el desarrollo de la especie, lo que lo limitó a su actual distribución, pues las poblaciones reportadas durante el período de 1940 a 1960 en la Costa Sur del país (Anzueto y Campbell, 2010) se encuentran extintas actualmente (Domínguez-Vega *et al.* 2012). Por lo tanto, se cree que la razón por la cual la distribución de *H. charlesbogerti* se limita al Valle del Motagua, es por la desaparición del bosque seco de la costa sur por el desarrollo de actividades agrícolas. Esto conllevó a una enorme reducción poblacional de la especie. Además, se estima que se ha perdido cerca del 80% del hábitat original de la especie en el Valle del Motagua durante el lapso de 1900 a la actualidad debido principalmente al cambio de uso de suelo para cultivos de agroexportación como melón, sandía y tabaco (CONAP-ZOOTROPIC-CECON-TNC, 2011). Esto, junto con la extracción de ejemplares para comercio y matanza por temor, se sumaron causando una drástica disminución de la población remanente de *H. charlesbogerti* en la región, con la consiguiente pérdida de diversidad genética.

Normalmente la alta diversidad genética está asociada a menor riesgo de depresión por endogamia, aumento en el éxito reproductivo y mayor potencial de evolución que las especies con baja diversidad genética (Sherwin & Moritz, 2000). Sin embargo, Milot *et al.* (2007) consideran que la biología de las especies es un factor fundamental que determina la diversidad genética óptima de una especie. Estos autores mostraron que ciertas especies pueden ser capaces de evitar el exceso de depresión endogámica y erosión de potencial evolutivo a pesar de tener bajos tamaños poblaciones y diversidad genética reducida (Milot, *et al.*, 2007). Relacionado con la endogamia, los resultados muestran alto porcentaje de endogamia (82.71%, $\Phi_{CT}=0.30$), sin embargo, se ha mostrado en albatros (*Diomedea exulans* y *Diomedea amsterdamensis*) que es posible el desarrollo de mecanismos para la reducción de la depresión por endogamia, indicando

que ésta es más severa en especies con alta variabilidad genética natural, causando súbito decaimiento en el tamaño de la población (Milot, *et al.*, 2007).

Además, en poblaciones endogámicas, como *H. charlesbogerti*, alelos deletéreos pueden ser purgados rápidamente después de su primera aparición; reduciendo la carga de mutaciones (Crnokrak & Barrett, 2002; Milot, *et al.*, 2007). Otro factor a tomar en cuenta es la biología de la especie, ya que se tiene reportado que su tiempo de vida es hasta 50 años (Beck, 2005); sin embargo, en la vida silvestre se estima que pueden vivir hasta 80 años (Ariano-Sánchez, 2017).

Douglas *et al.* (2010) reportaron una muy baja diferenciación genética (menos del 1%) entre *H. charlesbogerti* y *H. alvarezii* (en ese entonces considerado como subespecies) estimando su divergencia hace aproximadamente 3 millones de años. Esto indicaría que el número de generaciones que han transcurrido es muy bajo, haciendo que las poblaciones existentes no hayan estado divididas el tiempo suficiente como para producir mutaciones que permitan la diferenciación de poblaciones en base al gen mitocondrial *atpasa-6*, el cual posee una tasa de mutación de 1.3% por millón de años (Gupta *et al.*, 2013).

La fragmentación del hábitat tiene un efecto negativo en el flujo de genes de una población; para el caso del lagarto escorpión, reduce su capacidad de dispersión, y poco hábitat disponible, llevando a un flujo de genes bajo (Dixo, Paul, Morgante, & Zamudio, 2009; Reiserer, *et al.*, 2013). La baja dispersión se ha comprobado según la ecología espacial de la especie, Ariano-Sánchez y Salazar (2015) han mostrado que los ámbitos de hogar y patrones de movimiento son especiales en esta especie. En época lluviosa (junio a octubre) son mayores (aproximadamente 94 hectáreas); siendo cinco veces mayor a la dispersión de los mismos individuos durante época seca (noviembre a mayo), teniendo época reproductiva únicamente durante septiembre y octubre (Ariano-Sánchez & Salazar, 2015).

La baja dispersión de las hembras entre poblaciones, disminuida aún más por la extrema pérdida y fragmentación del hábitat disponible, podría explicar el bajo número de haplotipos encontrados (Figura 7) para el gen mitocondrial analizado.

En base a los resultados obtenidos se puede sugerir que a pesar de la baja diversidad genética de *H. charlesbogerti*, es una especie de dispersión relativamente reciente en el Valle del Motagua, por lo que posiblemente lo observado en la actualidad es el efecto fundador de aquella población separada alopatricamente de *H. alvarezii* hace aproximadamente 3.2 millones de años, junto con una drástica disminución poblacional debido a pérdida y fragmentación de hábitat, y exterminación sistemática de ejemplares durante décadas por parte de los comunitarios debido al temor a su veneno.

4. Resultados del estudio de genética poblacional de *C. palearis*.

a. **Diseño y evaluación de cebadores para los genes mitocondriales *nadh4* y *ldhA* de la especie *Ctenosaura palearis*.** Los cebadores diseñados se muestran en el Cuadro 9, el primer par de cebadores permiten la amplificación del gen mitocondrial *nadh4* generando un producto de 483 pares de bases; el segundo par de cebadores permiten la amplificación del gen mitocondrial *ldhA* generando un producto de 298 pares de bases. Ambos cebadores presentan temperaturas de fusión muy parecidas, haciendo posible el uso de un mismo programa de amplificación para ambos genes y el porcentaje de GC, se encuentra en el rango óptimo.

Cuadro 9. Cebadores diseñados y utilizados para la amplificación de los genes *nadh4* y *ldhA* de *C. palearis*.

Gen	Cebadores	Longitud	Tm	%GC
<i>nadh4</i>	F 5'- GAGGCATCGTAATAACCAGC -3'	20	53.4°C	50%
	R 5'- GGTCTGTGGTGATGATGTGAA -3'	21	54.8°C	47.6%
<i>ldhA</i>	F 5'- GAATGGGTCTCAGTGGATTGT -3'	21	54.6°C	47.6%
	R 5'- GGAAGACTGATTGAGCAGTGA -3'	21	54.5°C	47.6%

Para la evaluación de los cebadores se realizaron reacciones en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) *in silico* con ambos genes mitocondriales en Primer 3, obteniendo resultados positivos.

b. **Extracción de ADN y cuantificación.** Realizada la extracción de ADN se debía de llevar a cabo la cuantificación de las muestras de ADN obtenidas para conocer la concentración del ADN y la pureza del mismo. La pureza del ADN se conoce según la relación 260 nm/280nm. Las muestras se identificaron como IG (iguana) y se fueron numerando según el orden de captura.

En el Cuadro 10 se pueden observar las concentraciones determinadas por medio del biofotómetro. Como se puede observar las concentraciones fueron muy bajas excepto por las últimas muestras (IG 43 – 45), de igual manera el radio 260/280, el cual da información sobre la contaminación presente en la extracción, en el caso de las primeras muestras se observa ser muy alta (mayor que 2), mientras que en las muestras 43 a 45 son de aproximado 1.42. Se esperaba esto para que, a la hora de realizar la amplificación de los genes de interés, la concentración de ADN y la pureza no fueran factores que inhibieran la reacción en cadena de la polimerasa.

**Cuadro 10. Resultados de extracción de ADN utilizando dos discos de papel Whatman
® FTA, junto con agitación en columna mediante palillo estéril de *C. palearis*.**

Muestra	[ng/μL]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Muestra	[ng/μL]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
IG 1	56	-----	0.25	IG 26	89	1.52	0.35
IG 2	53	4.96	0.20	IG 27	121	0.68	0.29
IG 3	79	1.87	0.23	IG 28	70	1.61	0.29
IG 4	106	1.69	0.30	IG 29	86	2.45	0.27
IG 5	92	1.66	0.30	IG 30	64	3.01	0.23
IG 6	84	2.23	0.34	IG 31	91	2.04	0.35
IG 7	67	2.58	0.29	IG 32	96	1.79	0.33
IG 8	49	2.90	0.23	IG 33	88	1.55	0.27
IG 9	114	1.65	0.40	IG 34	22	1.49	0.60
IG 10	77	2.14	0.29	IG 35	25	2.07	0.71
IG 11	78	1.99	0.31	IG 36	14	2.27	0.66
IG 12	99	1.67	0.37	IG 37	24	2.32	0.68
IG 13	91	1.89	0.31	IG 38	27	2.74	0.50
IG 14	95	1.76	0.37	IG 39	38	1.95	0.61
IG 15	89	1.82	0.30	IG 40	25	2.22	0.87
IG 16	83	1.92	0.33	IG 41	27	2.35	0.74
IG 17	88	2.03	0.34	IG 42	40	1.89	0.67
IG 18	109	1.93	0.41	IG 43	313	1.43	0.55
IG 19	120	1.79	0.43	IG 44	322	1.41	0.66
IG 20	100	1.81	0.35	IG 45	310	1.42	0.54
IG 21	87	2.12	0.30				
IG 22	81	1.96					
IG 23	76	1.71					
IG 24	95	1.56					
IG 25	91	1.54					

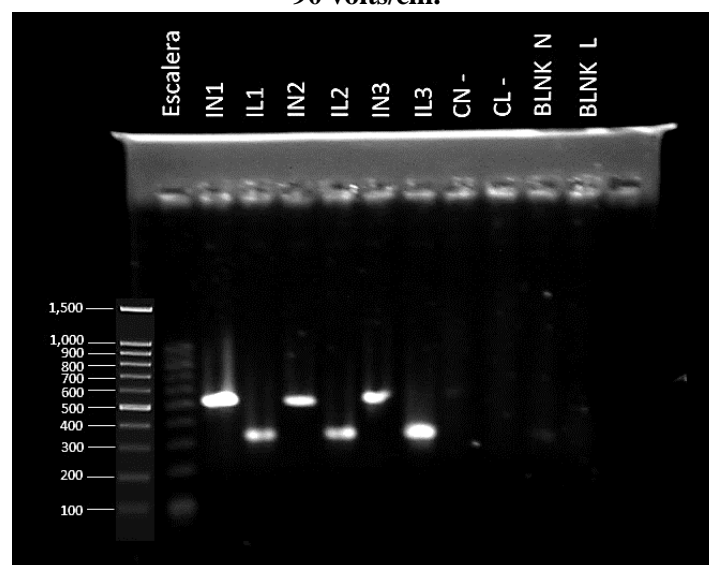
c. Amplificación de los genes con cebadores diseñados. Tras la cuantificación se procedió a llevar a cabo la amplificación de cada uno de los genes de interés para *C. palearis*. En la Figura 19 se puede observar el gel de agarosa al 1.5% de electroforesis, comprobando la amplificación correcta de cada uno de los genes, se puede comprobar la amplificación de todas las muestras en Anexo 9. Lo que se esperaba era un amplicon y una banda para el gen *nadh4* de 483 pares de bases y se esperaba un amplicon y una banda del gen *ldhA* de 298 pares de bases. En cada una de las amplificaciones realizadas se tomó en cuenta un control negativo para cada uno de los genes (CN- para el gen *nadh4* y CL- para el gen *ldhA*), para la composición del control negativo se utilizó ADN de *Heloderma charlesbogerti*, lo cual se esperaba que no hubiera amplificación, tal y como se observa en la Figura 19. Además de controles negativos, se realizaron blancos para cada uno de los genes (BLNK N- para el gen *nadh4* y BLNK L- para el gen *ldhA*).

En la Figura 19 se observa la presencia de seis bandas intensas correspondiente a tres muestras diferentes, comprobando la amplificación de ambos genes en cada una de las muestras. En el primer pozo se observan las bandas correspondientes a la escalera de ADN (100bp) utilizada. En

el Anexo 9 se puede observar cada uno de los geles utilizados para comprobar la amplificación del resto de las muestras. En todos los geles se espera observar una banda intensa del peso ideal correspondiente al amplicon obtenido de cada uno de los genes.

Se puede observar que en los pozos cada uno de los productos presenta un barrido producido por degradación de los productos o bien por ARN que no fue posible quitar en los tratamientos de la extracción de ADN, sin embargo, estos barridos no deberían de ser problema a la hora de secuenciar, ya que previo a mandar a secuenciar se realizará una purificación de los productos.

Figura 19. Prueba de eficiencia de cebadores de *C. palearis*. Gel de agarosa 1.5% con 3µL de productos de PCR purificados, 60 minutos a 90 volts/cm. Prueba de eficiencia de cebadores. Gel de agarosa 1.5% con 3µL de productos de PCR purificados, 60 minutos a 90 volts/cm.



d. Diferentes Unidades de Significancia Evolutiva (ESU) encontradas para la especie *C. palearis*. Según las secuencias obtenidas de ambos genes (Anexo 11 y 12), se realizó la red de haplotipos correspondiente cada gen. Tanto en la Figura 20 y 21 se observa la distribución de los haplotipos generados según las localidades muestreadas. Las localidades muestreadas fueron Gualán, Usumatlán y Cabañas en el departamento de Zacapa y la aldea Palo Amontonado y El Júcaro en el departamento de El Progreso. Los haplotipos se organizaron según las localidades geográficas, por lo que aquellos haplotipos de Cabañas estarían sobre la localidad geográfica de Cabañas en el mapa, y así con cada uno de los haplotipos.

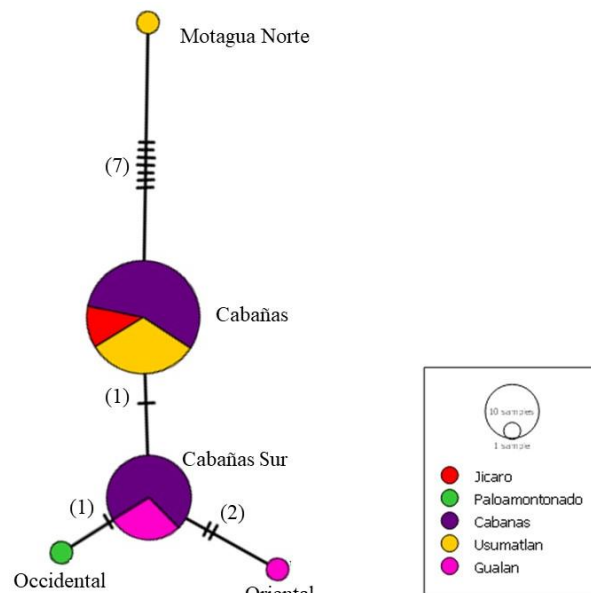
En la Figura 20 se puede observar los haplotipos determinados por el gen *nadh4*, para la generación de esta red de haplotipos se utilizaron las 42 muestras obtenidas de *C. palearis*, no se utilizaron los individuos de *C. similis*, ya que no son necesarios para la generación de este tipo de diagrama debido a que no se necesita de ningún *outgroup*.

Como puede observar en esta figura, existen cinco haplotipos de *C. palearis* en total, los cuales fueron denominados Motagua Norte, Cabañas, Cabañas sur, Occidental y Oriental. Se

puede observar que el haplotipo Central sur contiene individuos de otras regiones como Usumatlán y El Jícaro, y otro haplotipo de Cabañas contiene individuos de Gualán. En esta red de haplotipos se puede determinar la presencia de 4 ESU. La primer ESU generada por el haplotipo Motagua Norte que está aislado, el cual presenta una cantidad mayor de 2 mutaciones con respecto al haplotipo de Cabañas, la segunda ESU generada por el haplotipo Occidental, la tercer ESU generada por el haplotipo Oriental y la cuarta ESU sería la generada por los haplotipos centrales de Cabañas y Cabañas sur.

Con el fin de conocer cuál es el área que presenta mayor cantidad de haplotipos, se realizó el Cuadro 12 el cual demuestra los haplotipos que presenta cada una de las áreas de muestreo. El propósito de haber realizado el mismo está relacionado a la creación de planeas de conservación de la especie, ya que si se necesita preservar la diversidad genética de la misma. Como se puede observar en el cuadro, el haplotipo de Cabañas es el que se encuentra en mayor diversidad de lugares geográficos.

Figura 20. Red de haplotipos del gen *nadh4* por medio del método de inferencia TCS y su distribución con las localidades correspondientes. Los círculos representan los haplotipos, y sus áreas son directamente proporcionales al número de individuos que presentan ese haplotipo en particular. Las líneas cruzadas representan el número de variaciones o mutaciones encontradas en las secuencias. Cinco haplotipos fueron identificados Motagua Norte (1), Cabañas (25), Cabañas Sur (14), Oriental (1) y Occidental (1).



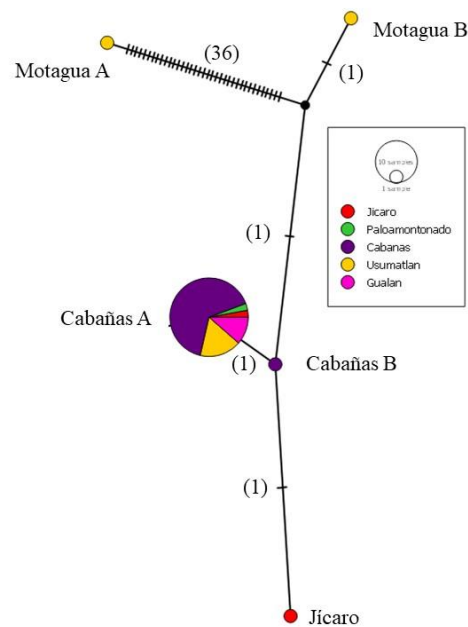
Cuadro 11. Número de individuos de cada localidad encontrados en los diferentes haplotipos de *C. palearis* con el gen mitocondrial *nadh1* en el Valle del Motagua. Las localidades están colocadas en orden de ubicación geográfica, de oeste a este en el Valle del Motagua. en el Valle del Motagua.

Localidad	Haplotipo				
	Occidental	Motagua Norte	Cabañas	Cabañas Sur	Oriental
Palo Amontonado	1				
Usumatlán		1	8		
El Júcaro			3		
Cabañas			14	10	
Gualán				4	1

En la Figura 21 se puede observar la red de haplotipos determinado por el gen *ldhA*, para la generación de esta red se utilizaron 39 muestras obtenidas de *C. palearis*, de igual forma que la red anterior (Figura 20) no se tomaron en cuenta los individuos de *C. similis* para llevar a cabo el análisis. Las regiones de muestreo fueron las mismas que con el gen anterior. En este caso se puede observar la presencia de cinco haplotipos.

Como se puede observar en esta figura, la distribución de los haplotipos no es tan grande como en el caso del gen *nadh4* sino que prácticamente todo está centralizado a la misma región donde se encuentra Cabañas, Usumatlán y el Júcaro. Este fenómeno da información sobre el gen de estudio y el alcance que puede tener en este tipo de estudio sobre genética poblacional. Se determinó la presencia de tres ESU para el gen *ldhA* en la especie *C. palearis*, la primera generada por los haplotipos Motagua Norte A y Motagua Norte B, la segunda ESU generada por el haplotipo Júcaro y la tercer ESU generada por los haplotipos centrales Cabañas A y Cabañas B.

Figura 21. Red de haplotipos del gen *ladhA* por medio del método de inferencia TCS y su distribución con las localidades correspondientes. Los círculos representan los haplotipos, y sus áreas son directamente proporcionales al número de individuos que presentan ese haplotipo en particular. Las líneas cruzadas representan el número de variaciones o mutaciones encontradas en las secuencias. Cinco haplotipos fueron identificados Motagua Norte A (1), Motagua Norte B (1), Jícaro (1), Cabañas A (38), y Cabañas B (1). y Cabañas B (1). y Cabañas B (1). y Cabañas B (1). y Cabañas B (1).



Con el fin de conocer cuál es el área que presenta mayor cantidad de haplotipos, se realizó el Cuadro 13, el cual demuestra los haplotipos que presenta cada una de las áreas de muestreo. El propósito de haber realizado el mismo está relacionado a la creación de planeas de conservación de la especie, ya que si se necesita preservar la diversidad genética de la misma. Como se puede observar en el cuadro, el haplotipo de Cabañas A se encuentra en todas las localidades muestreadas, por lo que este es el que presenta mayor cantidad de individuos.

Cuadro 12. Número de individuos de cada localidad encontrados en los diferentes haplotipos de *C. palearis* con el gen mitocondrial *ladhA* en el Valle del Motagua. Las localidades están colocadas en orden de ubicación geográfica, de oeste a este en el Valle del Motagua. en el Valle del Motagua.

Localidad	Haplotipo				
	Motagua Norte A	Motagua Norte B	Jícara	Cabañas A	Cabañas B
Palo Amontonado				1	
Usumatlán	1	1		7	
El Jícara			1	2	
Cabañas				23	1
Gualán				5	

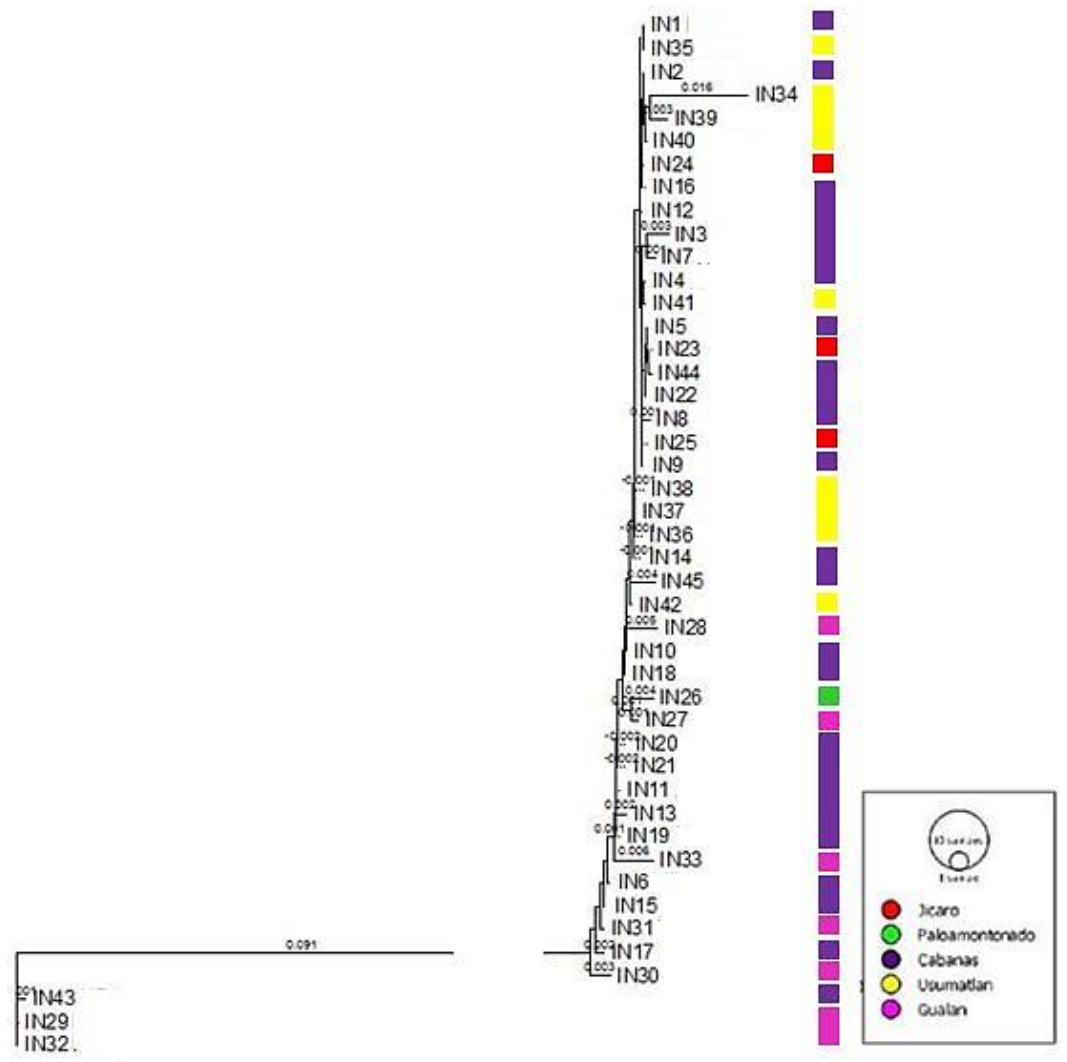
En el Cuadro 12 se puede observar los distintos ejemplares muestreados para el estudio, y estos se les agrego cada uno de los haplotipos que presenta el individuo. Se realiza esto con el fin de que, a futuro, a la hora de la creación de planes de conservación, se conozca el haplotipo que presenta cada organismo para la conservación de la diversidad genética de la especie, este cuadro se puede observar en Anexo 7

e. Cladogramas generados para ambos genes en la especie *C. palearis* con análisis estadístico de respaldo. Para observar y analizar las relaciones que existían entre los individuos, grupos y la población, se realizaron cladogramas por cada uno de los genes. Para la elaboración de los cladogramas se utilizó el algoritmo Neighbouring joining, generando 1000 cladogramas con 500 réplicas.

En la Figura 22 se puede observar el cladograma compuesto de la información genética sobre el gen *nadh4*. Como *outgroups* los individuos de *C. similis* (los individuos 29, 32 y 43). En la figura se puede observar que todos los individuos están relacionados entre sí, pero no se observa la existencia de grupos fuertemente diferenciados, ya que los organismos de distintas áreas geográficas están agrupados entre sí. Por lo que quiere decir que no hay una clarificación de las relaciones entre los individuos.

Ya que los valores *bootstrap* son muy cercanos a cero, esto indica que no hay soporte entre los diferentes nodos, lo que quiere decir prácticamente que el soporte en la diferenciación de los nodos es básicamente nulo. Con estos índices del cladograma (Figura 22) se puede evidenciar que las relaciones presentadas en este cladograma son fuertes sin embargo por los valores *bootstrap* se observa que la estructura del cladograma no tiene soporte.

Figura 22. Cladograma generado con el algoritmo de máxima verosimilitud (Maximum likelihood) del gen *nadh4* usando individuos *C. similis* como outgroup en el análisis. CI (índice de consistencia): 0.745, HI (índice de homoplasia): 0.255, RI (índice de retención): 0.826, RC (índice de consistencia reescalada): 0.615. CI (índice de consistencia): 0.745, HI (índice de homoplasia): 0.255, RI (índice de retención): 0.826, RC (índice de consistencia reescalada): 0.615.



En la Figura 23 se puede observar el cladograma compuesto de la información genética sobre el gen *ldhA*. Como outgroups los individuos de *C. similis* (los individuos 29 y 32). Además, se puede observar que todos los individuos están relacionados entre sí, pero no se observa la existencia de grupos fuertemente diferenciados, ya que los organismos de distintas áreas geográficas están agrupados entre sí. Por lo que quiere decir que no hay una clarificación de las relaciones entre los individuos, ya que los valores bootstrap son muy cercanos a cero, esto indica que no hay soporte entre los diferentes nodos, lo que quiere decir prácticamente que el soporte en la diferenciación de los nodos es básicamente nulo. Se determinaron los siguientes índices que

Progreso – Palo Amontonado), luego se crearon tres grupos (Sur – Cabañas, El Júcaro, Gualán, El Progreso – Palo Amontonado, Norte del Motagua – Usumatlan), y por último se crearon dos grupos (Sur del Motagua – Cabañas, El Júcaro, Gualán, Palo Amontonado, Norte del Motagua – Usumatlan).

En el Cuadro 13 se puede observar el análisis realizado sobre toda la muestra tomándola como una sola población (AMOVA) estudiando la posible variación interpoblacional e intrapoblacional. Como se puede observar en el caso del gen *Nadh4*, que resultó ser estadísticamente significativo, significando que hay variación genética entre las poblaciones de *C. palearis*, se observa que la variación 81.41% de la variación es intrapoblacional, mientras que solamente un 18.59% es interpoblacional. Esto mismo se observa con el gen *LdhA* donde se observa una variación intrapoblacional bien marcada.

Cuadro 13. Análisis de variación molecular (AMOVA) de las secuencias obtenidas mediante secuenciación Sanger de *C. palearis*.

	<i>C. palearis</i> <i>Nadh4</i>	<i>C. palearis</i> <i>LdhA</i>
AMOVA	$\Phi_{st} = 0.1858$ Valor-p = 0.048	$\Phi_{st} = -0.00378$ Valor-p = 0.329
Variación interpoblacional	18.59%	-0.377%
Variación intrapoblacional	81.41%	100.377%

En el caso del análisis del SAMOVA, el cual es el análisis de varianza molecular comparando la información de distintos grupos, se repitió el análisis varias veces, analizando en cada oportunidad una cantidad diferente de grupos. La finalidad de este cambio en la formación de grupos era evaluar si había una diferencia genética entre las poblaciones de distintas áreas geográficas. Se observa que, con cuatro grupos, cerca del 40% de la variación genética encontrada se explica por estas áreas geográficas diferenciadas. Incluso, cuando se analiza solo la población del norte del Motagua con respecto a las poblaciones del sur (dos grupos), cerca de un 27% de la variación genética encontrada se explica por la barrera biogeográfica del río Motagua. Como se puede observar, los valores-p resultaron ser positivos para cada uno de los diferentes grupos.

Cuadro 14. Resultados de los análisis del SAMOVA simple realizado a partir de la información sobre la población de *C. palearis*.

	<i>C. palearis</i> <i>Nadh4</i>	<i>C. palearis</i> <i>LdhA</i>
Cuatro grupos		
Entre grupos Φ_{st} (Valor-p)	39.90% 0.3120 (0.036)	-54.77% -0.0682 (0.489)
Entre las poblaciones dentro de los grupos Φ_{sc} (Valor-p)	-8.697% -0.1447 (0.032)	47.95% 0.3098 (0.078)
Dentro de las poblaciones Φ_{ct} (Valor-p)	68.79% 0.3990 (<0.001)	106.82% -0.5477 (0.799)
Tres grupos		
Entre grupos Φ_{st} (Valor-p)	27.69% 0.3508 (0.023)	-14.37% -0.0578 (0.391)
Entre las poblaciones dentro de los grupos Φ_{sc} (Valor-p)	7.387% 0.1021 (0.007)	8.587% 0.0751(0.202)
Dentro de las poblaciones Φ_{ct} (Valor-p)	64.91% 0.2769 (0.109)	105.8% -0.1437 (0.478)
Dos grupos		
Entre grupos Φ_{st} (Valor-p)	26.56% 0.3592 (0.025)	0.957% -0.0026 (0.384)
Entre las poblaciones dentro de los grupos Φ_{sc} (Valor-p)	9.355% 0.1274 (0.004)	-1.219% -0.0123 (0.248)
Dentro de las poblaciones Φ_{ct} (Valor-p)	64.07% 0.2656 (<0.001)	100.26% 0.0095 (0.191)

Por último, en el Cuadro 14 se puede observar ciertos estadísticos que nos dan información sobre la diversidad genética de los genes estudiados. Se puede observar que la diversidad de nucleótidos en el caso del gen *ldhA* es cero, mientras que en el gen *nadh4* es de 0.00116. Un estadístico que da mucha información sobre la especie es la D de Tajima, la cual da información sobre la situación genética en la que se encuentra la población de *C. palearis*.

La D de Tajima, la cual compara la diferencia genética media observada entre individuos con respecto a la esperada para la población. Los valores negativos indican un barrido selectivo que redujo la variación poblacional o una expansión reciente de la población luego de haber pasado por un cuello de botella genético, mientras que los valores positivos indican selección balanceada entre los diferentes haplotipos que mantienen la variación o una contracción poblacional reciente.

El valor de la D de Tajima obtenida fue de -2.2882 para *nadh4* y de -3.7158 para *ldhA*, lo que indica que la población en general de *C. palearis* en el Valle del Motagua puede haber pasado por alguno de estos dos procesos: un barrido selectivo que redujo la variación poblacional lo cual

puede ser causado por competencia con la especie emparentada *C. similis* o una expansión reciente de la población luego de haber pasado por un cuello de botella genético.

Cuadro 15. Estadísticos que muestran la diversidad genética de la especie con respecto a los genes de análisis de *C. palearis*.

	<i>C. palearis</i> <i>Nadh4</i>	<i>C. palearis</i> <i>LdhA</i>
Diversidad de nucleótidos (π)	0.00116	0
Número de sitios de segregación	9	167
Número de sitios informativos de Parsimonia	1	43
D de Tajima	-2.2882	-3.7158

5. Discusión de resultados obtenidos del análisis de muestras de *C. palearis*.

La cuantificación de la concentración de ADN después de una extracción es esencial sobre todo para llevar a cabo la realización de PCR. Además, es muy importante la determinación de la relación 260nm/ 280 nm, ya que con esta relación se puede conocer la pureza de la mezcla.

El conocimiento de la concentración de ADN antes de realizar PCR es para evitar algún tipo de inhibición de la Taq Polimerasa utilizada, por una inhibición por saturación de sustrato (Rossen *et al*, 1992). Para determinar la concentración de ADN en la muestra, la misma se lee con el espectro a una longitud de onda de 260 nm, mientras que para la lectura de proteínas presentes se realiza a 280 nm. Lo que se desea es que la división entre ambas longitudes de onda (relación 260nm/280nm) de un valor entre 1.7 – 2, significando que hay aproximadamente el doble de concentración de ADN con respecto a las proteínas.

Cuando los valores de la relación son mayores a 2 esto quiere decir que la muestra puede estar muy degradada provocando que solamente se encuentre porciones pequeñas del ADN o que la contaminación con ARN es muy alta. Mientras que cuando los valores son menores a 1.7 significa que hay contaminación por sales o agentes orgánicos (Desjardins & Conklin, 2010) (Yeates *et al*, 1998).

En el caso del Cuadro 9 se puede observar que las últimas tres muestras (IG 43 – 45) presentan una cuantificación muy alta (el triple de concentración de las demás muestras), la diferencia con respecto a las demás muestras fue un pequeño cambio en el procedimiento de extracción de ADN. En las últimas muestras después de exprimir el papel Whatman ® FTA con las orillas del tubo y la adición de todos los reactivos, y antes de la transferencia de la muestra a las columnas, se realizó una centrifugación de 1 minuto a una velocidad mayor de 3000g, de tal manera que solamente se transfiriera el sobrenadante a las columnas. Esto no se realizó en las

demás muestras, por lo que restantes del papel Whatman ® FTA tapaban los poros de la columna provocando que el rendimiento de la extracción fuera mucho menor.

El uso del papel Whatman ® FTA para la preservación de las muestras sanguíneas es muy efectivo ya que no se necesita de anticoagulantes, preservantes o refrigeración, por lo que el almacenamiento de las muestras es muy fácil. En el caso de la extracción de ADN, la concentración de ADN obtenida es elevada, pero se tuvo que optimizar el método para el kit de extracción que se utilizó. Esto concuerda con lo presentado por González (2017) donde utilizó papel Whatman ® FTA donde concluye que la efectividad de este método es alta sin embargo se debe de optimizar el método para cada tipo de extracción.

En el Cuadro 9 se puede observar irregularidades en las concentraciones y las purezas de las muestras, ya que hay muestras que presentan concentraciones muy altas y concentraciones muy bajas, esto se debió a que el equipo que se utilizó para la determinación de las mismas no había sido calibrado, por lo que este es una fuente de error.

Por medio de los distintos geles de electroforesis se determinó la amplificación de los genes de interés. En la Figura 17 y en Anexo 9 se pueden observar la amplificación de los mismos, en algunas muestras no se logró observar la banda correspondiente, esto se pudo ocasionar por distintas razones como una mala amplificación, mala preparación de la reacción, mal estado del equipo, concentración de ADN utilizada muy alta provocando inhibición o bien muestras de ADN muy contaminados (Schrader *et al*, 2012). En los casos que no presentaron banda, se procedió a realizar de nuevo la amplificación de los genes por medio de PCR.

Con la obtención de los distintos amplicones, se determinó la funcionalidad de los cebadores diseñados para el estudio. Por la intensidad de las bandas obtenidas se demuestra que la efectividad de los cebadores es muy alta. Estos cebadores no requieren condiciones especiales en cuanto al programa del termociclador, si no con un programa estándar (presentado en metodología) se logra la amplificación efectiva. Algunas de las muestras presentan bandas corridas o con una morfología atípica, esto se debe a que, por condiciones de las fuentes de poder, no se mantiene constante el amperaje, por lo que la irregularidad del mismo provoca este fenómeno (Polsky, 1978). Todas las muestras que por alguna razón no presentaron banda, se repitieron hasta asegurar que se tuviera el amplicón deseado, ya que es de suma importancia asegurarse de la amplificación para poder secuenciar las muestras.

El análisis de las redes de haplotipos generadas según cada uno de los genes mitocondriales utilizados y los resultados de la AMOVA realizada, ayudan a saber el estado de la diversidad genética de la población de *C. palearis* en el bosque estacionalmente seco del Valle de

Motagua, Guatemala. Tras la amplificación y secuenciación de los genes mitocondriales *ldhA* y *nadh4*, se generaron cladogramas utilizando el algoritmo Neighbour Joining y redes de haplotipos de cada uno de los genes (Figura 18 y 19).

En la Figura 18 se puede observar la red de haplotipos generado para el gen *nadh4* que evidencia la presencia 5 haplotipos diferentes. Como se puede observar el haplotipo de Cabañas que posee mayor cantidad de individuos y estos de distintas localidades (Cabañas, Usumatlán, El Jícaro). Este haplotipo es considerado como el haplotipo ancestral ya que está presente en mayor proporción de la población. Se encuentran haplotipos bien diferenciados como los de Usumatlán (Motagua Norte), Palo Amontonado (Occidental) y Gualán (Oriental), demostrando así que las barreras biogeográficas son muy importantes ya que son las que generan la formación de distintos haplotipos. Esto se resalta en el haplotipo muy diferenciado denominado Motagua Norte (Usumatlán), cuya barrera biogeográfica que lo separa de los demás haplotipos es el río Motagua. Esto es similar a lo reportado para la especie *Ctenosaura melanosterna* en Honduras, donde se demostró que el Río Aguán es una barrera biogeográfica que provocaba la formación de distintos haplotipos y por ende también la formación de dos distintas ESU para la esa especie (Pasachnik, 2011). Lo mismo se observa en *Ctenosaura pectinata* donde una barrera biogeográfica importante es el Anillo Volcánico Mexicano que provoca la formación de distintas ESU para la especie (Zarza *et al*, 2008).

De igual manera se puede observar la presencia de los haplotipos de Gualán y Palo amontonado. La formación de estos distintos haplotipos se puede deber a las distancias que hay entre cada uno de los grupos y de las localidades. Para la especie *Ctenosaura pectinata* se realizó un estudio para la identificación de haplotipos en México con el uso de microsátélites, en el estudio descubrieron que hay una diferencia entre los haplotipos de las zonas nortes a las zonas sur (Zarza & Reynoso & Emerton, 2011). Esto mismo se observa para *C. palearis* en el bosque seco del Valle del Motagua, donde las zonas este (Gualán) y la zona oeste (Palo Amontonado – El Progreso) presentan distintos haplotipos.

En cuanto a la Figura 21, se puede observar la presencia de cinco haplotipos distintos, en este caso, al igual que con la Figura 20, el haplotipo de Cabañas norte posee mayor cantidad de individuos y de diferentes localidades, lo cual este haplotipo sería el haplotipo ancestral para la población de *C. palearis*. De igual manera que en la Figura 20, se puede determinar la presencia de un haplotipo diferenciado de Usumatlán, evidenciando de igual manera que el Río Motagua es una barrera biogeográfica que provoca la formación de distintos haplotipos.

En el caso de esta Figura 20, se realizó la eliminación de las muestras IG25, 31 y 39, debido a que las secuencias enviadas por Macrogen Corea, no presentaban una lectura correcta o no presentaban ninguna lectura.

En la Figura 21 se puede observar que todos los haplotipos generados están concentrados en la misma área, por lo que estos haplotipos están estrechamente relacionados entre sí. Esto demuestra que este gen tiene muy poca tasa de mutación y por ende no hay muchos haplotipos distintos. Este mismo comportamiento para este gen fue reportado por Pasachnik (2010), donde demuestra que el porcentaje de variación para el gen *ldhA* es menor al de *nadh4*. Además, en el Cuadro 14 se puede observar la diversidad de nucleótido donde para el gen *ldhA* es básicamente nula, por lo que esto hace solida la afirmación de que este gen no es óptimo para el estudio de la genética poblacional para esta especie ya que no da información sobre el estado genético de la misma.

Tanto en la Figura 20 y 21, se puede encontrar que hay un haplotipo diferenciado que corresponden a muestras de Usumatlán diferenciado y hay muestras de Usumatlán que comparten un haplotipo. Esto se puede deber a que las mutaciones en esta población están comenzando a ser significativas para diferenciar a este grupo sin embargo aún son muy prematuras y no se encuentran dispersas en varios organismos del área.

El traslado, comercio y caza de las iguanas puede afectar a la distribución de las mismas (Coti, 2008). La reducción de la variación genética y la disminución del flujo de genes a través de grupos puede afectar la distribución de la población. Los disturbios producidos por los humanos pueden provocar que la población este vulnerable (Pasacknik & Hudman, 2016).

La presencia de cuatro ESU's para el gen *nadh4* y de 4 ESU's para el gen *ldhA*, quiere decir que hay cuatro distintos grupos que presentan la cantidad de mutaciones suficientes para ser potenciales formadores de una población aislada y diferenciada a las demás, asegurando la sobrevivencia de la especie (Moritz, 1994). Por lo que una mayor cantidad de ESU puede ser mejor para la especie. Cada una de las ESU es un linaje filogenético divergente que son generados por barreras que no permiten el traspaso genético (Gonzalez *et al*, 2011). Se recomienda que cada uno de los ESU deben de tener planes de conservación distintos ya que cada una de ellas está adaptada a su ecología y a otros factores, que cambiarlos podrían provocar la pérdida irremplazable del ESU (Pasachnik, 2011). Es muy importante crear planes de conservación que se encarguen de asegurar la reproducción efectiva de los individuos de los distintos haplotipos de tal manera que el tamaño del haplotipo aumente y no corra peligro de eliminarse (Wright, 1951) (Slatkin, 1987).

La Figura 22 se puede observar el cladograma obtenido a partir del análisis del gen *nadh4*, se utilizaron como grupo control y como raíz del cladograma muestras de la especie *Ctenosaura similis* que corresponde a la muestra #29, 32 y 43 (ejemplares *C. similis*). En el cladograma es evidente que la existencia de grupos fuertemente diferenciados no existe ya que los organismos

de distintas áreas geográficas están agrupados entre sí, por lo que no hay clarificación de las relaciones entre los individuos.

Se realizó un análisis de los valores *bootstrap* del cladograma, los cuales son muy cercanos a cero, lo que significa que el cladograma no tiene soporte como para diferenciar distintos nodos. Este comportamiento quiere decir que la variabilidad genética de la especie es muy baja como para generar clados bien diferenciados entre sí, por lo que se generan estos valores *bootstrap* provoca que este análisis filogenético produzca una filogenia no resulta (Gonzalez *et al.*, 2011).

Esto mismo ocurre con la Figura 23, donde se puede observar el cladograma obtenido a partir del análisis del gen *ldhA*. Para este gen se utilizó como raíz las muestras IG 29 e IG32. En este cladograma no se observa la existencia de grupos fuertemente diferenciados por área geográfica. Por lo que no hay clarificación en las relaciones entre los individuos. De igual manera los valores *bootstrap* del cladograma son muy cercanos a cero, por lo que el cladograma no tiene soporte como para diferenciar distintos nodos (Crandall, 1994) (Sanderson, 1989).

No obstante, se puede observar que el índice de consistencia de ambos cladogramas (0.745 para *nadh4* y 0.817 para *ldhA*) quiere decir que las relaciones presentadas por el cladograma son muy sólidas y que no importando la cantidad de veces que se repita el cladograma las relaciones se harán de la misma manera (Kluge & Farris, 1969).

Tal y como se observa en el Cuadro 12, los resultados de la AMOVA demuestran que para el gen *nadh4* si existen diferencias significativas entre las poblaciones de *C. palearis* ya que se obtuvo un valor P menor que el alfa estipulado (0.1), sin embargo, para el gen *ldhA* no se demostró diferencia significativa entre las poblaciones de *C. palearis*. El AMOVA simple mostró que no existía diferencia significativa entre los diferentes haplotipos encontrados para *ldhA* ($\Phi_{st} = -0.00378$, $p = 0.329$), pero para el gen *nadh4* ($\Phi_{st} = 0.1858$, $p = 0.048$) si existe. La implicación de esto significa que las poblaciones de *C. palearis* presentan una diferencia significativa en cuanto a su diversidad genética para diferenciar distintas poblaciones según el análisis del gen *nadh4*, significando que las ESU identificadas para *C. palearis* son significativamente diferentes y requieren acciones de conservación específicas.

Sin embargo, según el gen *ldhA* no se puede diferenciar distintas poblaciones, esto se puede deber a que la divergencia a distintas poblaciones no se llevó a cabo hace mucho tiempo provocando que aún no se presenten las suficientes mutaciones como para que el gen *ldhA*, el cual es un gen muy conservado, presente la información necesaria para diferenciar distintas poblaciones.

Sin embargo, el valor de conservación de las poblaciones periféricas depende de su divergencia genética con respecto a otras poblaciones de la misma especie. Como se puede observar en la Figura 20, se generan distintos haplotipos aislados, que pueden ayudar en la futura especiación o adaptación local de la especie, por lo que estos haplotipos requieren planes de conservación aparte y en conjunto al haplotipo ancestral (Lesica & Allendorf, 1995). La conservación a largo plazo de las especies depende probablemente de la protección de las poblaciones genéticamente distintas. Adicionalmente, las poblaciones periféricas son potencialmente importantes para eventos de especiación futuros. Lesica y Allendorf (1995) consideran que, bajo algunas circunstancias, la conservación de poblaciones periféricas podría ser beneficiosa para la protección de los procesos evolutivos que probablemente generen la diversidad evolutiva futura.

El gen *nadh4* presentó una mayor variabilidad genética poblacional concordando con la información presentada por Pasachnik (2010). Debido a la poca variación interpoblacional que presenta el gen *ldhA* en el estudio, este gen no es informativo para determinar la diversidad genética de *C. palearis* mientras que *nadh4* si puede brindar información al respecto, esto debido al grado de conservación que tiene el gen.

En el Cuadro 13 se puede observar los resultados obtenidos después del análisis del SAMOVA. Para el caso de *ldhA* en ni de las distintas agrupaciones se encontró una estructura genética marcada a nivel intrapoblacional (Φ_{st}), ni a nivel interno de cada localidad geográfica (Φ_{sc}), ni entre localidades geográficas (Φ_{ct}). En el caso del gen *nadh4* se puede encontrar una estructura genética que al igual que Pasachnik (2011) con *C. melanosterna*, las barreras biogeográficas y la distancia entre las poblaciones provoca la formación de una estructura genética diferenciada entre las poblaciones y grupos.

Tanto como en el análisis del gen *ldhA*, se observa que el porcentaje de similitud entre las poblaciones es muy alto (Valor Φ_{ct}) y el valor P del mismo resultado no ser estadísticamente significativo (>0.1), por lo que quiere decir que, a pesar de la existencia de distintos grupos o haplotipos, todos provienen de una misma población (González *et al*, 2010). En el caso de *C. palearis*, el aislamiento ha provocado la formación de distintas poblaciones. Esta información se complementa al analizar la diversidad de nucleótidos en la población el cual se puede observar que en ambos genes es muy bajo. Que los estadísticos Φ_{st} , Φ_{ct} , Φ_{sc} resultaran no estadísticamente significativos refuerzan la conclusión de que este gen no es idóneo para realizar estudios sobre genética poblacional ya que la tasa de mutación es muy baja por lo que no se puede observar diferencias entre distintas poblaciones.

Se realizaron distintas agrupaciones para observar si había una diferencia entre localidades o regiones, por ejemplo, el primer análisis se realizó para observar si había diferencia

en la estructura génica a nivel de localidades de muestreo. En el segundo análisis se intentó observar si había diferencia entre regiones tomando en cuenta barreras geográficas y diferentes departamentos. Por último, se intentó determinar si había diferencia génica a nivel de grupos, según barrera geográfica por lo que las agrupaciones se determinaron por el norte del Río Motagua o sur del mismo. Este cambio de agrupaciones se realizó ya que en Pasachnik (2009), al estudiar a *C. melanosterna*, al reducir la cantidad de grupos de interés, logro determinar a qué nivel si se encontraba diferencia génica en la especie para determinar distintas poblaciones en el lugar de estudio.

Para el gen *nadh4* se logró detectar si había una estructura genética bien definida para *C. palearis*. En el Cuadro 13 se puede observar que, al realizar el análisis con cuatro grupos diferentes, el valor Φ_{st} era estadísticamente significativo (Valor-p= 0.036), significando que los distintos grupos están diferenciados genéticamente entre sí, demostrando que si hay una estructura genética. El valor Φ_{sc} demuestra que cada uno de los grupos es diferente genéticamente a la población ya que el valor-p fue estadísticamente significativo (Valor-p=0.032). De igual manera, al analizar el valor Φ_{st} al formar dos grupos (cada grupo dividido por el Rio del Motagua) se puede observar que es estadísticamente significativo (Valor-p= 0.025), demostrando que, si hay variación y diferenciación genética por las diferentes poblaciones formadas por la barrera geográfica, de igual manera el valor Φ_{sc} demuestra que cada uno de los grupos posee varianza genética entre la población (Hartl & Clarck, 1997)

Por ultimo, en el Cuadro 14 se puede observar el índice D de Tajima que como resultado da un valor negativo en ambas ocasiones, significando que en la población de *C. palearis* hay una menor cantidad de haplotipos que de número de sitios de segregación (Gehring, 2012). Las implicaciones biológicas de esto se basan en la afirmación de una alta frecuencia de alelos raros en la población o bien hace mención a que la población está en expansión después de un barrido selectivo o cuello de botella (Hartl y Clark 2007). Estos resultados indican que la población de *C. palearis* se vio fragmentada provocando la formación de distintos grupos aislados y que tales grupos están en expansión. Este cuello de botella pudo deberse principalmente a tres procesos que llevaron a la especie al borde de la extinción a finales del siglo pasado: la severa pérdida y degradación de hábitat del bosque seco en el Valle del Motagua (Coti y Ariano-Sánchez, 2008), la extracción de ejemplares de las poblaciones silvestres destinados al tráfico ilegal de ejemplares para el comercio de mascotas exóticas (Pasachnik y Ariano-Sánchez, 2010; Auliya *et al.* 2017) y la cacería de esta especie para obtener carne y huevos para consumo humano (Coti y Ariano-Sánchez, 2008).

Se conoce que población de *C. palearis* es un grupo monofilético proveniente de una población ancestral en común, significando así que la población *C. palearis* era una sola población

hasta que por la pérdida y fragmentación del hábitat se han generado distintos grupos que, aunque presentan mutaciones, aún no son las suficientes para que se lleguen a formar distintas poblaciones de esta especie (Köhler, 1995; Buckley & Axtell, 1997).

La especiación de *C. palearis* fue rápida y ocurrió hace 2 - 3 millones de años, aproximadamente al mismo tiempo que el cierre del istmo de Panamá. Además, se reporta que la tasa de mutación es del 0.0062 o cerca de un 1.2% de divergencia por millón de años (Pasachnik, 2010). Conociendo que la población original de *C. palearis* era monofilética y que originalmente era una misma población distribuida en el bosque estacionalmente seco del Valle del Motagua, por lo que tiene toda lógica que el análisis haya demostrado que solamente existe una población de esta especie y que por actividad humana se han formado distintos grupos que aún no presentan mutaciones suficientes para que se formen poblaciones distintas.

Se conoce que hay una variación genética notable producida por la fragmentación del hábitat, deriva genética o barrera que no permitan el traspaso genético. La fragmentación del hábitat generando pequeños parches con bosque, provoca una disminución en la cantidad y la diversidad de los haplotipos. La disminución de haplotipos en la población va relacionada con una disminución en el tamaño de la población (Dixo *et al*, 2009).

El inicio de la explotación de los recursos naturales del bosque estacionalmente seco del Valle del Motagua inició durante la época de la colonia en el siglo XVI, después del año 1524. Después de la llegada de los españoles, se impusieron nuevas religiones y prácticas, por lo que pueblos originarios de la zona fueron desplazados y comenzaron con las prácticas agrícolas en la zona. El crecimiento demográfico, avance de la frontera agrícola y la introducción de grandes meloneras han degradado el medio ambiente de esta región (Yoshimoto & Ariano, 2017). Por lo que el avance de la frontera agrícola ha afectado considerablemente el bosque seco del Valle del Motagua ya que el área que esta comprendía se vio afectada y reducida (Cotí, 2008). Este suceso puede ser el cuello de botella de cual va saliendo la especie según lo descrito por el índice D de Tajima.

La pérdida del hábitat de esta especie se debe principalmente al cambio del uso del suelo, ya que aumentaron los cultivos de melón, tabaco y maíz en la región. Ese aumento de las zonas de cultivo provoca fragmentación del bosque, ocasionando la formación de grupos de *C. palearis* que se quedan aislados en los distintos remanentes del bosque. Esta fragmentación del hábitat provoca que *C. palearis* se acerque más a los poblados (Cotí, 2008). Esto se observó al encontrar diferentes grupos o haplotipos, sin embargo, no había distintas poblaciones, significando que efectivamente lo propuesto por Cotí, 2008 es certero ya que hay grupos aislados a lo largo del bosque estacionalmente seco del Valle del Motagua, que tal y como demuestra la D de Tajima, están en crecimiento y expansión.

B. Implicaciones de la genética poblacional para el desarrollo de estrategias de conservación de la iguana de órgano, *Ctenosaura palearis* (Sauria: Iguanidae), y el lagarto escorpión, *Heloderma charlesbogerti* (Sauria: Helodermatidae), en el bosque seco del Valle del Motagua.

1. Metodología. Se realizó la determinación de las amenazas presentes tanto para *H. charlesbogerti* como para *C. palearis* en el cual se analizaron los posibles componentes y factores que afectan a cada especie tanto de forma individual como en conjunto. Esto se realizó a través del análisis en el programa Miradi 4.3.1 (Foundation of Success, 2005). En este se realizó un análisis de las amenazas presentes para determinar el grado en que cada una afecta a las especies. Esto se realizó midiendo el alcance, severidad e irreversibilidad de las amenazas.

El alcance se refiere al porcentaje de la población que la amenaza afecta en un punto determinado en el tiempo. La severidad es, dentro del alcance, el nivel de daño al objetivo que se espera si las circunstancias y tendencias actuales continúan. Puede entenderse también como el grado de destrucción o degradación del objetivo afectado, o el porcentaje de la población afectada que puede desaparecer. La irreversibilidad se refiere al grado en que la población es capaz de recuperarse si se diera el caso que tal amenaza fuera a desaparecer. Esta se mide en el porcentaje de la población que puede recuperarse en una unidad de tiempo. (Foundation of Success, 2005). En el Cuadro 16 se puede observar los niveles utilizados para determinar el nivel de cada una de las amenazas.

Cuadro 16. Parámetros utilizados para determinar los niveles en que cada amenaza afecta a las poblaciones de *H. charlesbogerti* y *C. palearis*

Parámetro	Bajo	Medio	Alto	Muy Alto
Alcance (Porcentaje de la población afectada)	1 – 10%	11 – 30%	31 – 70%	71 – 100%
Severidad (Reducción de la población en 10 años o tres generaciones)	1 – 10%	11 – 30%	31 – 70%	71 – 100%
Irreversibilidad (Esfuerzo necesario para recuperar la población en el tiempo estimado)	Bajo costo / 0 – 5 años	Cantidad razonable de recursos / 6 – 20 años	Técnicamente reversible, pero no costeable / 21 – 100 años	Muy poca probabilidad de ser reversible / >100 años

Con el análisis de amenazas realizado, se procedió a determinar los factores que influyen en estas amenazas, para posteriormente determinar las posibles estrategias a utilizar para reducir su efecto en las poblaciones de las especies estudiadas. Habiendo definido las posibles estrategias, se realizó un análisis del curso de acción más apropiado a tomar, es decir, a cuál se le debe dar prioridad según las necesidades específicas para cada especie.

2. Resultados obtenidos del análisis de amenazas de ambas especies en el bosque seco del Valle del Motagua. En la Figura 24 se puede observar el diagrama realizado para el análisis de amenazas y estrategias. En esta se pueden observar cuáles son las amenazas que más afectan a ambas especies, así como los factores que contribuyen a estas amenazas. Para cada factor se ha incluido al menos una estrategia con la cual se plantea la mejora de la situación de las especies en peligro. Algunas estrategias pueden ser aplicadas a más de un factor por lo que se estima que tales sean más efectivos para el manejo de la amenaza encontrada.

En el Cuadro 17 se puede observar el análisis de amenazas llevado a cabo, en el cual cada una de las amenazas fue evaluada bajo los criterios de alcance, severidad e irreversibilidad. Según el resultado de estas, se determinó el nivel de peligro que representa cada amenaza para la especie que afecta.

Cuadro 17. Análisis de amenazas presentes para *Heloderma charlesbogerti* y *Ctenosaura palearis* llevado a cabo en Miradi 4.1.3

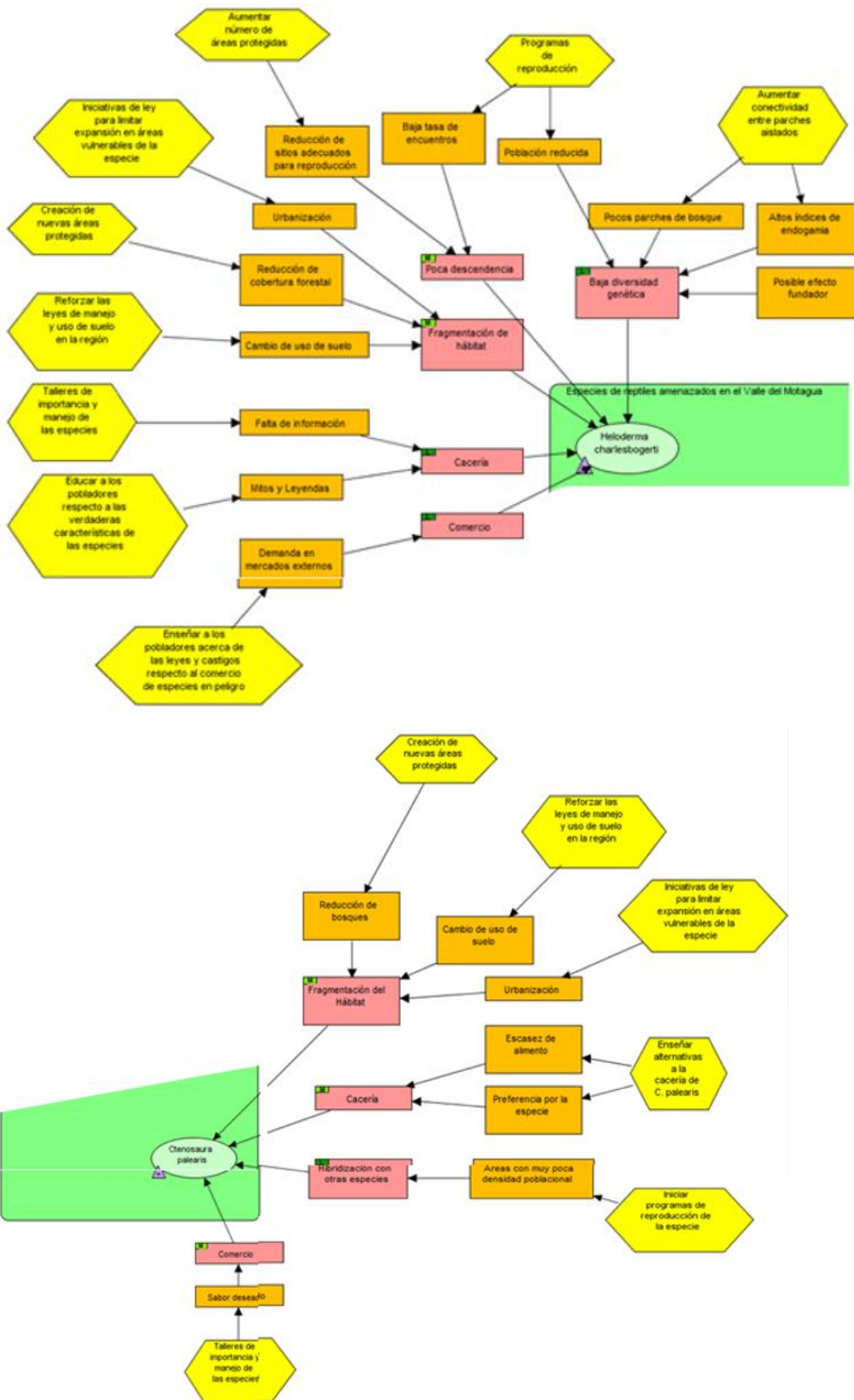
Amenaza	Alcance	Severidad	Irreversibilidad	Resultado
<i>Heloderma charlesbogerti</i>				
Fragmentación de hábitat				
Cacería				
Comercio				
Baja diversidad genética				
Baja cantidad de progenie				
<i>Ctenosaura palearis</i>				
Fragmentación de hábitat				
Cacería				
Comercio				
Hibridación con especies compatibles				

*Rojo: Muy alto – Amarillo: Alto – Verde claro: Medio – Verde fuerte: Bajo

Se puede observar que para *Heloderma charlesbogerti* las amenazas más importantes son la fragmentación de hábitat y la baja cantidad de progenie. Por lo que los esfuerzos de conservación deben ser enfocados a combatir estas dos amenazas.

Dentro de las amenazas presentes para *Ctenosaura palearis*, las que presentan el mayor grado de importancia son la fragmentación de hábitat, la cacería y el comercio. Estas últimas dos están estrechamente relacionadas, por lo que se puede tomar la oportunidad para estudiarlas como una misma. Estas últimas dos están estrechamente relacionadas, a por lo que se puede tomar la oportunidad para estudiarlas como una misma. Se observa que la fragmentación de hábitat es de suma importancia para ambas especies.

Figura 24. Diagrama realizado en Miradi 4.1.3 para el reconocimiento y análisis de amenazas para las especies de *H. charlesbogerti* y *C. palearis*



3. Discusión de resultados obtenidos del análisis de amenazas a las especies en el bosque seco. Como se puede observar durante la extracción, a pesar de la baja concentración de algunas de las muestras obtenidas durante la misma, no se encontró problema alguno para poder realizar el trabajo. Los oligos diseñados para ambas especies resultaron ser efectivos.

En el caso de *H. charlesbogerti* se obtuvieron tres haplotipos diferentes (occidental, central o ancestral, y oriental) (Figura 17), de los cuales, el occidental y oriental difieren del central por una sola mutación. Esto significa que solamente se pudo determinar una única ESU. Esta baja diferenciación entre los haplotipos de *H. charlesbogerti* puede deberse al poco tiempo que las subpoblaciones han llevado separadas. Con el avance de la frontera agrícola desde el siglo XVI, especialmente en la costa sur, el hábitat de esta especie se ha visto reducido, llegando a ocupar solamente el área que se registra en la actualidad.

Utilizando el gen *nadh4* se obtuvieron cinco haplotipos diferentes para *C. palearis* (Figura 20) De estos, el mayor o ancestral es el de Cabañas, el cual posee no solo la mayor cantidad de individuos, sino que además estos son distintas localidades (Cabañas, Usumatlán y El Jícaro). Entre la red de haplotipos se encuentran algunos bien diferenciados como los de Usumatlán, Palo Amontonado y Gualán, lo cual se puede deber principalmente a las barreras biogeográficas presentes, como el Río Motagua, de forma similar a lo presentado por Pasachnik (2011) con *C. melanosterna* en Honduras; así como a la misma distancia y fragmentación del bosque, como lo encontrado por Zarza *et.al.* (2011) con *C. pectinata*.

El gen *ldhA* de *C. palearis* resultó en una red con una alta concentración de haplotipos en una misma área (Figura 21) los cuales se encuentran muy relacionados entre sí. Esto demuestra que este gen tiene una baja tasa de mutación y, por ello, hay pocos haplotipos. Estos resultados respaldan lo reportado por Pasachnik (2010), donde indica que el porcentaje de variación para el gen *ldh-A* es menor que para el gen *nadh4*.

La conectividad entre las poblaciones es de gran importancia para mantener la variación genética, y las mutaciones son la única fuente potencial de novedades genéticas en las poblaciones (Frankham *et.al.* 2002). La pérdida de la conectividad en una metapoblación resulta en poblaciones pequeñas y aisladas, lo cual aumenta el efecto de la deriva genética, resultando un daño al potencial evolutivo de las especies (Frankham, 2005).

Heloderma charlesbogerti presentó un alto índice de endogamia entre sus poblaciones ($\Phi_{CT}=0.30$, $p=0.16$), la cual puede ser un indicador de expresión de alelos recesivos perjudiciales, reducción en resistencia a enfermedades y ruptura de heterocigocidad (Tsangaras *et al.*, 2012). Esto es preocupante debido a que, en estudios, como el presentado por Crnokrak y Roff (1999)

muestran que las progenies de individuos estrechamente relacionados muestran atributos menos desarrollados que el resto de la población, así también, se disminuye la probabilidad de supervivencia del individuo. *H. charlesbogerti* se ha visto arrinconado a este tipo de comportamiento debido al deterioro de su hábitat. *C. palearis*, de la misma forma, se ha visto implicada en la pérdida del bosque seco en el occidente de Guatemala. A esto, se le deben sumar las amenazas propias de cada especie, la cacería, por miedo o por alimento para cada especie respectivamente, la reducción de recursos disponibles, el tráfico ilegal, todas estas han jugado un papel muy importante en el desarrollo de la situación actual de ambas especies.

Actualmente, las prácticas de conservación, tanto para *H. charlesbogerti* como para *C. palearis* se han enfocado en gran medida a la conservación de áreas de bosque seco. Aunque no es directamente con este propósito, esto ha ayudado a ambas especies a mantener sus poblaciones en los últimos años. En la Estrategia Nacional para la Conservación del Heloderma y su Hábitat (CONAP-Zootropic, 2013) se establecen los objetivos principales y sus respectivas estrategias para la conservación. Estas se centran en tres áreas, aumentar el número de áreas protegidas en el bosque seco, reducir la extracción ilícita de individuos y aumentar el número de investigaciones enfocadas a *H. charlesbogerti*.

Para *H. charlesbogerti*, el valor de la D de Tajima (0.092) positivo indica que hubo una contracción drástica de la población. Esto puede deberse al avance que tuvo la frontera agrícola desde la colonia durante el siglo XVI (CENGICANÑA, 2014). Durante esta época, el bosque seco de la costa sur comenzó a cambiar su tipo de uso al actualmente conocido uso agrícola. Esto restringió el hábitat disponible para *H. charlesbogerti* y por ende también de *C. palearis* únicamente al bosque seco del Valle del Motagua. Dentro del mismo, la explotación de los recursos, en forma de agricultura o en uso de madera del bosque, ha causado una severa fragmentación, lo cual resultó en poblaciones muy reducidas. *C. palearis* obtuvo un valor negativo para la D de Tajima ($nadh4=-3.359$, $ldhA=-3.703$), lo que implica que este sufrió de un cuello de botella genético recientemente, o que la población está saliendo de uno. Lo más probable, es que está saliendo de uno en la actualidad. La iguana de órgano ha sido parte de la dieta de los pobladores de la región por largo tiempo, lo que significa que la baja diversidad de la especie no es resultante de un deterioro repentino de la población.

También hay que tomar en cuenta la biología de la especie. *H. charlesbogerti*, tienen territorios bastante grandes por individuo, especialmente machos, llegando a moverse hasta 50 km (Ariano y Salazar, 2015). Esto significa que esta se ve bastante afectada por la fragmentación, obligando a los individuos a cruzar zonas urbanas o agrícolas, donde son vistos como amenazas. Esto genera poblaciones muy pequeñas que tienden a sufrir de endogamia. La Reserva para la Conservación del Heloderma y el Bosque Seco tiene un programa de reproducción en el que los

individuos son dejados dentro de un recinto durante su época fértil y liberados posteriormente para que depositen sus huevos. Aún no se ha establecido si el nivel del éxito del programa, en parte debido a que *H. charlesbogerti* tiene una esperanza de vida bastante elevada. Beck (2005), reportó que la esperanza de vida de la especie era de 50 años, sin embargo, según las observaciones de Ariano (2017) puede llegar a ser de hasta 80 años. Esto significa que el número de generaciones que ha pasado es muy reducido.

Alberts (1999) utilizó individuos del género *Cyclura* en la isla de Guantanamo Bay que habían sido criados por 18 meses en un estado de semicautiverio. Esta estrategia mostró poca resistencia por parte de los individuos en su adaptación a los ambientes naturales. Este es uno de los posibles acercamientos para disminuir la mortalidad de individuos jóvenes de *H. charlesbogerti* y *C. palearis*, los cuales tienden a ser los más afectados por los depredadores de la región. Esto sería utilizado como una estrategia para aumentar la progenie de ambos grupos, especialmente *H. charlesbogerti*, la cual presenta una probabilidad de encuentros durante la época reproductiva muy baja.

Dentro de las estrategias que se tiene la probabilidad de implementar, se encuentra la de traslocación de individuos, la cual implica el traslado deliberado de individuos de una subpoblación a otra (Moritz, 1999). Aunque este tipo de estrategias tiende a tener éxito, existen varios casos en los que este tipo de aproximación ha fallado, principalmente por falta de monitoreo adecuado (Dodd, 1991; Short *et.al.* 1992).

Dentro de las principales causas del fracaso de traslocación de individuos se encuentra la persistencia de las amenazas presentes (Simberloff, 1996), como la cacería en el caso de *C. palearis*. En este caso se puede asumir que a menos que se reduzca de forma drástica su consumo, cualquier intento de traslocación resultará en fracaso. Sin embargo, también hay que tomar en cuenta que no todas las poblaciones son adecuadas para esta estrategia.

Una de las desventajas que se podrían observar dentro de la traslocación es la reducción del fitness de las generaciones posteriores a la introducción de los individuos. Esto se debe a que existe la posibilidad que los alelos específicos para la adaptabilidad de la población se pierden por la introducción de individuos genéticamente muy diferentes (Moritz, 1999).

Por ello, en el caso de las especies estudiadas en este trabajo, se deben tener muchas consideraciones. Se deben realizar estudios posteriores en los que se resalte la importancia tanto de genes mitocondriales como nucleares para determinar de forma más precisa las poblaciones que pueden ser candidatas. *H. charlesbogerti*, por ejemplo, con la información recopilada de su diversidad genética según el gen *atpasa6* no requiere traslocación de individuos, pues las poblaciones no presentan diferencias entre ellas. *C. palearis*, por otra parte, presenta

poblaciones con diferencias más marcadas, como lo es la del norte del Valle del Motagua (Usulután), la de occidente (Palo Amontonado), o la de oriente (Gualán).

Esto significa que el intercambio puede darse, pero determinando *a priori* cuáles son los parámetros necesarios para considerar a dos poblaciones aptas para intercambio, con el fin de evitar la pérdida de alelos raros.

El principal problema de la traslocación de individuos, que es el hecho que algunas poblaciones son inadecuadas para intercambio, se puede resolver por medio de otra estrategia, el cual es el aumento de la conectividad entre las poblaciones (Moritz, 1994). Vucetich y Waite (2001), describen poblaciones de tipo fuente-sumidero, las cuales podrían ser las más adecuadas para describir los resultados obtenidos para *H. charlesbogerti* y *C. palearis* en este estudio. En este, se estima que mientras más alejadas estén las subpoblaciones de la población principal, menor será la calidad de los recursos que poseen. Como se ha mencionado antes, la actividad agrícola ha fragmentado enormemente las poblaciones de ambas especies, lo que ha dejado grandes extensiones de tierra sin cobertura forestal adecuada para su traslado. Por lo que se necesitaría llegar a un acuerdo con los terratenientes de la región para poder crear corredores biológicos en los que sea posible que individuos logren cruzar.

Esta estrategia juega un papel de gran importancia, especialmente para *H. charlesbogerti*, ya que esta especie tiene la característica que durante la época lluviosa (junio a octubre) tiene una extensión marcada de la dispersión del ámbito de hogar, llegando a ser de hasta 94 ha, lo cual es hasta cinco veces mayor que su distribución durante la época seca (noviembre a mayo) (Ariano-Sánchez y Salazar, 2015).

Aun así, antes de implementar este tipo de estrategias es necesario dar a conocer la importancia de las especies, especialmente de *C. palearis*, que es la más perseguida, y fomentar la utilización de alternativas para la dieta de los pobladores de la región. Un ejemplo de la alternativa es la iguana *Ctenosaura similis*, la cual posee un cuerpo de mayor tamaño que *C. palearis*, aunque no es tan utilizada porque, según los pobladores, no tiene tan buen sabor como la última.

Una de las formas de aumentar la probabilidad de éxito en estrategias como la creación de un corredor biológico, es el uso de las Funciones de Selección de Recursos (RSF por sus siglas en inglés) (Boyce y MacDonald, 1999). Las especies son capaces de seleccionar territorios dependiendo de atributos específicos, como la vegetación, la distancia a cuerpos de agua o fuentes de alimento, presencia de depredadores, etc. (Manly et.al. 2004). Según esto, es necesario determinar cuáles son las zonas preferenciales para ambas especies. Ariano-Sánchez y Salazar (2015) determinaron el ámbito de hogar de *H. charlesbogerti*, con el cual se puede iniciar a

determinar el área de mayor importancia para la conservación de la especie, en la que se pueden encontrar sitios de anidamiento, o de refugio durante la época seca.

En el caso de *C. palearis*, no se tiene una fuente clara en la que se establezca el ámbito de hogar y las zonas preferenciales. Goode *et al.* (2016) realizó un estudio en el que se estableció la distribución preferencial de *Ctenosaura oedirhina*, tomando en cuenta las amenazas presentes y las variables asociadas a la especie. El establecimiento de estas áreas se puede utilizar para crear parámetros de preferencia de la especie y de esta manera, a través de simulaciones, determinar cuáles son las zonas con una mayor probabilidad de albergar poblaciones, tanto de *C. palearis* como de *H. charlesbogerti*. Un ejemplo, es el estudio realizado por Cleve *et al.* (2011), en el que se utilizaron variables ambientales para encontrar una población desconocida de *Vulpes vulpes*, una especie de zorro en Sierra Nevada.

Las cuatro ESU encontradas para *C. palearis* requieren de un manejo individual. El objetivo de la biología de la conservación es mantener los procesos biológicos y evolutivos de las especies, por lo que el manejo adecuado de cada una de las unidades encontradas es vital. La unidad encontrada al norte del Río Motagua, aunque presenta condiciones ambientales similares al resto del grupo, es la más apartada del resto debido a la clara división que representa el Motagua. Además, esta se encuentra en una zona con diferencias marcadas en cuanto a valores, principios y políticos. Según observaciones propias, en la zona de Usumatlán, los pobladores tienden a inclinarse hacia la protección de esta especie, a diferencia de otras áreas visitadas, en las que la primera reacción de los miembros de la comunidad era tomar a la iguana de órgano como alimento.

El área de Usumatlán, además, presentó también diferencias marcadas en cuanto a los lugares en los que se podían encontrar los individuos. Aunque en otras zonas fueron encontrados en pequeños parches de bosque, en Usumatlán estaban presentes también en las casas de algunos pobladores que se dedicaban a cuidarlas. Esto muestra una clara diferenciación con el resto de las zonas, ya que esto complica hasta cierto punto las posibles estrategias a utilizar. Se aconsejaría brindar información y apoyo a los ciudadanos con pequeñas poblaciones de *C. palearis* para evitar daños a las mismas. Hines (2011) mostró que la inclusión de alimentos no propios de la dieta ordinaria en individuos de la especie *Cyclura cyclura*, tenía repercusiones en la salud de los mismos, llegando a observarse diferencias hematológicas en los individuos, lo cual puede ser indicador de una salud deteriorada. Por ello, se debe considerar en esta zona un programa de reproducción en semicautiverio con el fin de liberar los individuos resultantes en un área apta para su supervivencia, la cual debe cumplir con las condiciones necesarias para el mantenimiento a largo plazo de la especie cerca del área donde los individuos parentales fueron encontrados.

A pesar del panorama que se ha planteado para ambas especies, hay que tomar en cuenta que no todos los casos son absolutos. Se ha demostrado que en albatros (*diomedea exulans* y *D. amsterdamensis*) que es posible el desarrollo de mecanismos para reducir el impacto de la depresión por endogamia, mostrando ser más severa en especies con alta variabilidad genética, lo cual resulta en una disminución drástica y súbita de las poblaciones (Milot, *et.al.*, 2007). También se ha reportado en aves (Grombridge, *et.al.*, 2000), mamíferos (Wynen, *et.al.*, 2000) y otros reptiles (Kuo &Janzen, 2004) que es posible que las poblaciones se encuentren en buen estado a pesar de la baja diversidad genética.

C. Síntesis verde de un inhibidor de fosfolipasa A2 y evaluación de su utilidad para reducir la actividad hemolítica en el veneno de serpiente de cascabel (*Crotalus simus*) y lagarto escorpión (*Heloderma charlesbogerti*).

1. Metodología.

a. Extracción del veneno. El veneno crudo se obtuvo de especímenes de *C. simus* y *H. charlesbogerti* de la Reserva Natural para la conservación del Heloderma y Zootropic. Éste fue colectado en un beaker y luego se conservó en tubos eppendorf de 1.5mL a -20°C. La extracción se realizó por parte de Zootropic y se donó al proyecto para su posterior estudio. Se utilizó de forma independiente los venenos extraídos, de manera que los resultados sean congruentes.

b. Síntesis del Bromuro de p-Bromofenacilo. Se colocaron 5g de p-bromoacetofenona en un balón de 50mL cubierto con aluminio. Se agregó 2.5mL de una solución acuosa (47%) de ácido bromhídrico al balón y se agitó por cinco minutos a temperatura ambiente. Se adicionó 1g de cloruro de litio y se agitó por 1min. Por último, se agregó lentamente 5mL de una solución acuosa (30%) de peróxido de hidrógeno. Se utilizó un sistema de reflujo para contener el bromo producido (Figura 25). Se calentó la mezcla a 70°C por 1h por medio de un baño de agua.

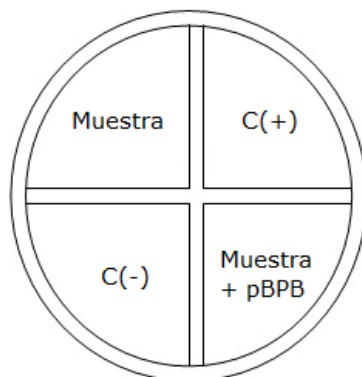
Figura 25. Sistema de reacción. Consiste en un balón de 50mL conectado a un adaptador en Y. Éste a su vez se conecta con un condensador y un embudo de decantación a través del cual se agregó el peróxido de hidrógeno.



Para la purificación, se agregó cuidadosamente 12.5mL de agua, seguido de 12.5mL de hexano y se realizó una extracción líquido-líquido. Se desecó la fase orgánica, que contiene al producto, con sulfato de magnesio anhidro. Se filtró al vacío el material soluble y se evaporó el solvente. Se confirmó la síntesis del inhibidor por medio de una prueba de punto de fusión, un ensayo cualitativo con yoduro de potasio, y un análisis de espectroscopía infrarroja, este último fue realizado por Global Quality.

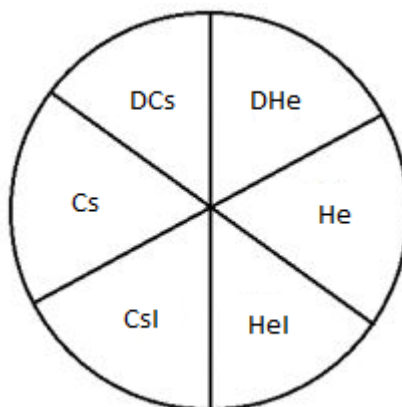
c. Ensayos cualitativos de inhibición enzimática. Se obtuvo las placas de agar sangre por parte de ARQUISA®. Se dividió la placa en 4 partes (Figura 26). Se utilizó una dilución 1:100 del veneno, colocando 5 μ L de esta como muestra y 5 μ L de inhibidor. Se colocó 10 μ L de muestra, siendo veneno puro el control positivo y cloroformo, el solvente, el control negativo. Los resultados se visualizaron a las 36h de incubación a temperatura ambiente, midiendo y comparando los diámetros de la zona de hemólisis.

Figura 26. Diagrama de las placas a utilizadas en los ensayos cualitativos.



Posteriormente, para realizar comparaciones entre la inhibición del veneno de *C. simus* y *H. charlesbogerti*, se realizó otro ensayo. Se dividió la placa en seis partes (Figura 27). Se realizó comparaciones entre una dilución 1:10 del veneno de *C. simus* y *H. charlesbogerti* en agua destilada (DCs y DHe, respectivamente), una dilución 1:10 del veneno en etanol (Cs y He, respectivamente); y una dilución del veneno 1:10 en una solución de pBPB en etanol al 0.5% p/v (CsI y HeI, respectivamente. Las diluciones se prepararon en tubos eppendorf de 0.5mL e incubaron 30min a 37°C. Se colocó 5µL de estas diluciones en las placas. Se midió los halos de hemólisis con un vernier, 24h después de la incubación a 37°C. El ensayo se realizó por triplicado.

Figura 27. Diagrama de las placas utilizadas para los ensayos cualitativos, comparando veneno de *C. simus* y *H. charlesbogerti*.



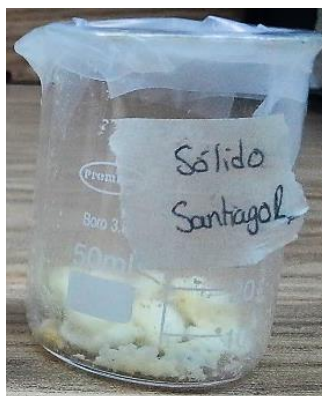
d. Ensayo de hemólisis indirecta. Se utilizó sangre de carnero obtenida de ARQUISA. Se lavó las células con PBS, centrifugando a 800Xg por 5min. Se preparó una suspensión con buffer de fosfatos 20mM, NaCl 100mM, CaCl₂ 10mM, eritrocitos al 3% (1:30 v/v) lecitina de soya 0.1% (1:30 v/v) (PBS). Se colocó en un tubo 870µL de PBS, y 30µL de sangre. Se agregó 10µL de veneno puro (para obtener una dilución 1:100). En el caso del tratamiento con inhibidor, se agregó también 90µL de una solución al 0.5% en etanol (proporción 1:9 veneno:inhibidor) para un volumen final de 1mL. Las muestras se incubaron a 37°C por 30min. Se colectaron alícuotas

de 10 μ L cada 5min y se realizó una dilución 1:100 de éstas en PBS. Posteriormente, se centrifugaron rápidamente, se colectó el sobrenadante, y se determinó la densidad óptica a 405nm (OD405) utilizando PBS como blanco. Los resultados son porcentajes comparando con la hemólisis dada por el veneno.

e. Análisis de datos. Cada ensayo se realizó por triplicado. Se realizó una regresión lineal entre la actividad de la enzima y el tiempo para comparar los resultados de los ensayos cuantitativos. Las regresiones obtenidas se analizaron en el programa R (R Core Team, 2016).

2. Resultados obtenidos de la síntesis del inhibidor y del ensayo enzimático realizado con veneno de ambas especies. La síntesis fue exitosa, obteniendo 4.14g de un compuesto sólido de color amarillo claro. Éste fue identificado como pBPB (Figura 28) con un porcentaje de rendimiento del 58.8%. Esto fue confirmado por el rango de fusión obtenido, desde 100.57 ± 4.92 °C a 105.90 ± 1.39 °C (Cuadro 18). La presencia de un átomo de bromo en posición alfa fue confirmada por la formación de un precipitado después del tratamiento con yoduro de potasio.

Figura 28. Producto sólido de la reacción.



Cuadro 18. Rangos de fusión determinados para el pBPB. El punto de fusión inicial es la temperatura a la que el sólido empieza a fundirse. El punto de fusión final es la temperatura a la cual el sólido se funde por completo.

Muestra	Inicial (°C)	Final (°C)
1	103.0	107.3
2	93.7	104.0
3	105.0	106.4

El análisis de espectroscopía infrarroja indica la presencia del producto, debido a que se encuentran picos característicos del compuesto (Anexo 16) en los espectros obtenidos (Figuras 29 y 30). El Anexo 17 muestra en detalle la identidad de los picos.

Figura 29. Espectros infrarrojos del sustrato y el producto impuro. Se muestra en azul el espectro del producto con sus picos identificados. Se muestra en negro el espectro del sustrato. C=O: carbonilo; Ar: aromático (arilo); Sust: impureza de sustrato; Prod: pico distintivo del producto.

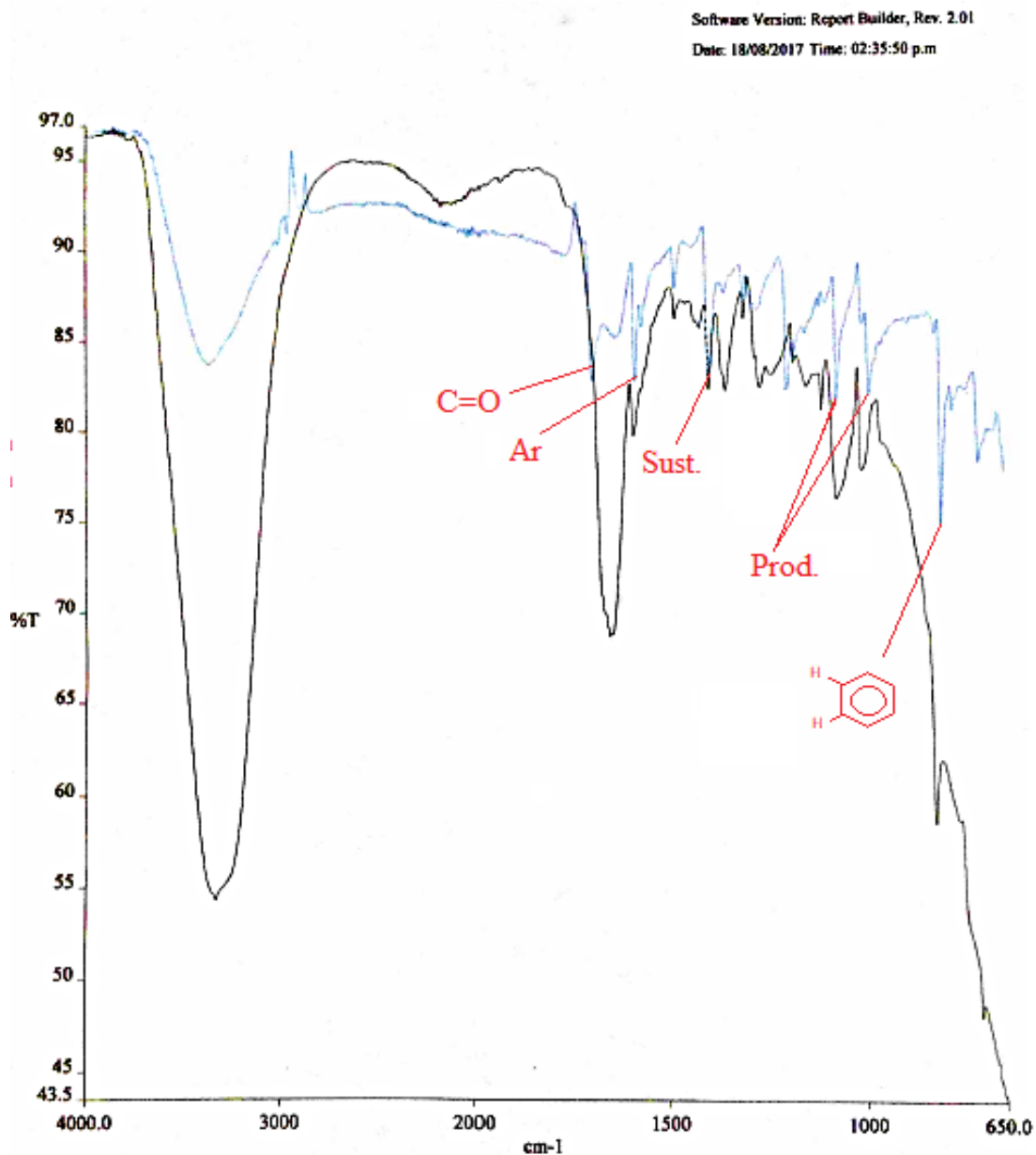
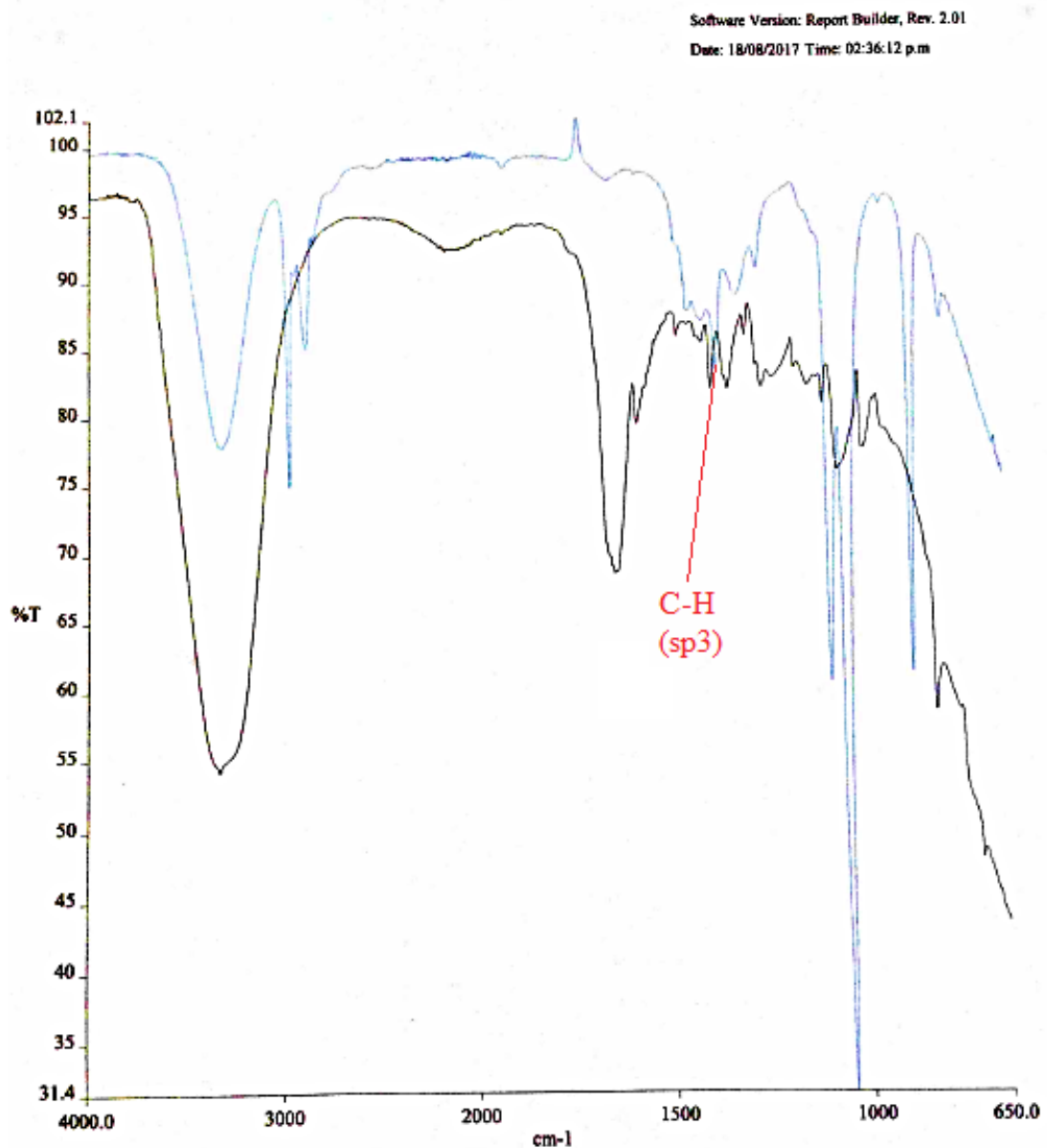


Figura 30. Espectros infrarrojos del sustrato y el producto puro disuelto en etanol. Se muestra en azul el espectro del producto con sus picos identificados. Se muestra en negro el espectro del sustrato. C-H: enlace carbono-hidrógeno de un alcano sp^3 .

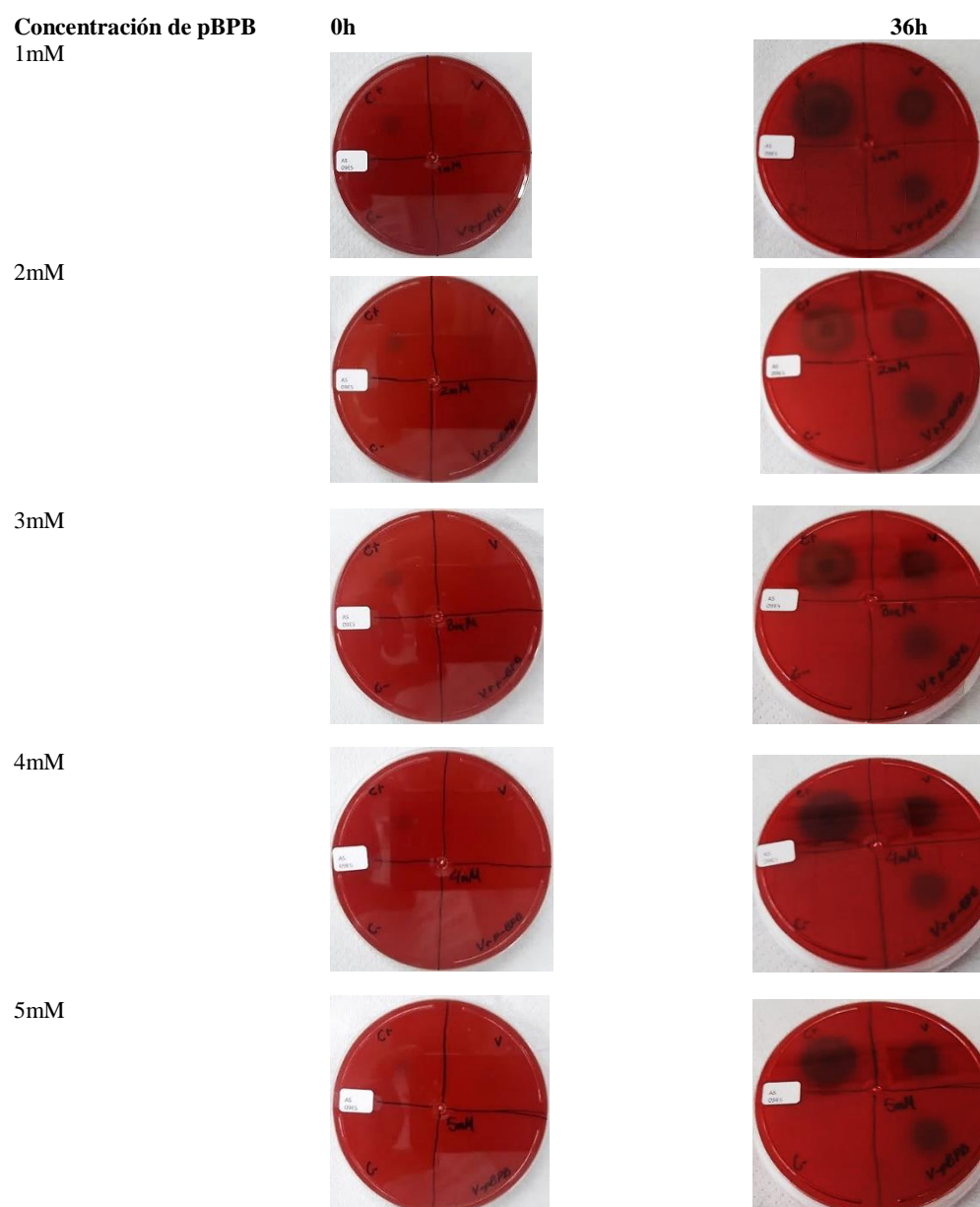


En el ensayo cualitativo, se encontró una disminución en el diámetro de hemólisis. Esto demuestra la reducción de la actividad hemolítica, y la efectividad del inhibidor sintetizado, el resultado se muestra en los Cuadros 19 y 20.

Cuadro 19. Diámetros de los halos de hemólisis de los ensayos cualitativos en placas de agar sangre.

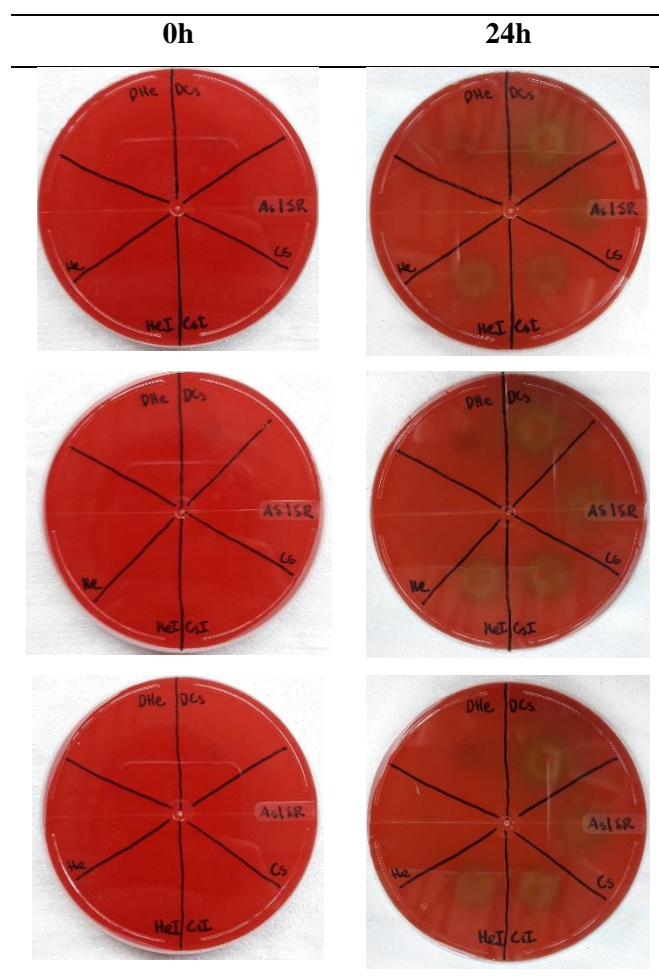
Concentración de pBPB (mM)	Control positivo (cm)	Veneno (cm)	Veneno + inhibidor (cm)	Control negativo (cm)
1	2.2	1.2	0.9	0.0
2	2.0	1.2	0.9	0.0
3	2.1	1.2	0.9	0.0
4	2.1	1.1	0.8	0.0
5	2.0	1.1	0.8	0.0

Cuadro 20. Placas de agar sangre antes y después de 36h de incubación. Las diferentes concentraciones del inhibidor fueron utilizadas para verificar la reducción de la actividad hemolítica del veneno.



Al realizar comparaciones entre el veneno de *C. simus* y *H. charlesbogerti*, se encontró poca diferencia entre los diámetros de hemólisis presentados (Cuadros 21 y 22). Se encontró contaminación bacteriana en las muestras de veneno, por lo que no se permite una comparación adecuada del veneno. También se observa mayor hemólisis en los tratamientos con etanol. Las mediciones de los halos de hemólisis se presentan en el Anexo 18.

Cuadro 21. Placas de agar sangre antes y después de 24h de incubación a 37°C.

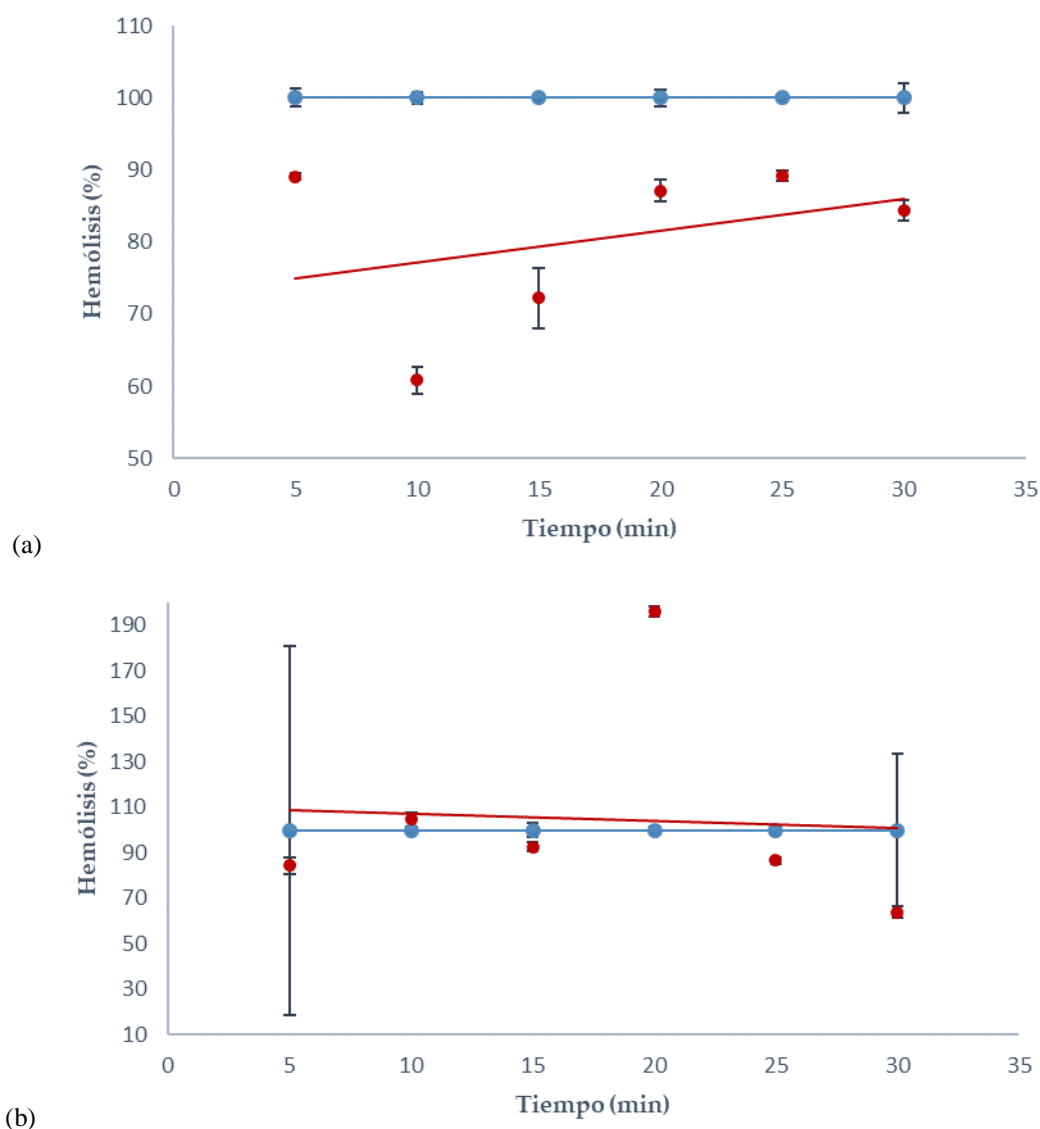


Cuadro 22. Promedios de los diámetros de hemólisis provocados por cada tratamiento.

DCs (mm)	Cs (mm)	CsI (mm)	DHe (mm)	He (mm)	HeI (mm)
13.03±0.52	10.64±0.54	12.95±0.43	8.03±0.54	10.97±0.79	12.47±0.25

La actividad enzimática de *C. simus* fue reducida significativamente por el pBPB, disminuyendo casi un 20%. Sin embargo, este no fue el caso para *H. charlesbogerti*. Los gráficos lineales de este ensayo se muestran en la Figura 31. También se observa una hemólisis creciente en la curva de *C. simus*. Los datos se presentan en el Anexo 19.

Figura 31. (a) Inhibición del veneno de *C. simus* por el pBPB. (b) Inhibición del veneno de *H. charlesbogerti* por el pBPB. En azul se muestran los datos del veneno (100%) y en rojo los datos del veneno modificado con el inhibidor.



3. Discusión de resultados obtenidos de la síntesis del inhibidor y del ensayo enzimático. La síntesis de pBPB obtuvo un rendimiento menor al esperado (88%). Esto podría haber sucedido por la descomposición del producto debido al calor, o pérdida del mismo en la evaporación de la fase orgánica (Moghimi *et al.* 2011). Sin embargo, el rango de fusión obtenido fue más similar al del producto esperado (108-110°C) que al del sustrato (49-51°C) (Moghimi *et al.* 2011).

También, el ensayo cualitativo con yoduro de potasio sustenta esto debido a que produce un yoduro de alquilo insoluble en acetona. Éste es selectivo a un bromuro en posición alfa debido

a su mecanismo (Anexo 17). Los espectros IR (Figuras 28 y 29) confirman aún más la obtención del producto, debido a que se encuentran picos característicos de la molécula (Anexo 17).

Luego de obtener el inhibidor, era necesario confirmar su eficacia. Se esperaba la reducción de los halos de hemólisis provocada por el veneno. Esto se muestra en los ensayos cualitativos, donde la actividad hemolítica del veneno fue disminuida. El Cuadro 18 muestra que el diámetro de hemólisis es reducido al tratar el veneno con pBPB. Esto comprueba la utilidad del producto. Además, se confirma que esta reducción posee una correlación dosis-respuesta lineal (Gutiérrez *et al.* 1995) Por otro lado, los Cuadros 21 y 22 presentan la poca diferencia entre la hemólisis provocada por el veneno y el veneno con inhibidor. Estos resultados no presentan una comparación apropiada, debido a que se encontró contaminación bacteriana en las muestras de veneno, y la hemólisis pudo no ser la óptima. Adicionalmente, se encontró que el tratamiento con etanol provocó un aumento en la hemólisis, posiblemente debido a deshidratación de los eritrocitos. Se recomienda realizar más pruebas para minimizar este efecto hemolítico.

Finalmente, para cuantificar la diferencia entre el veneno y su inhibición, era necesario un ensayo de hemólisis indirecta. En la Figura 31 se observa una gran diferencia entre la inhibición del veneno de *C. simus* y *H. charlesbogerti*. Se considera que esta diferencia puede ser causada por la actividad hemolítica relativa encontrada para cada uno de estos venenos. La crotoxina, siendo el componente principal del veneno de *C. simus*, es más probable que posea mayor actividad en relación a otras toxinas (Calvete *et al.* 2010). Sin embargo, se ha encontrado que varias especies de *Heloderma* no poseen tanta PLA₂ en relación a otras toxinas como la kallikreína, o el exendin (Koludarov, *et al.* 2014; Ariano, 2003). Esto sugiere que la actividad fosfolipasa en el veneno de *H. charlesbogerti* es casi nula a comparación de la actividad en *C. simus*.

En la Figura 31(a) también se puede observar un incremento en la actividad hemolítica del veneno de *C. simus* conforme aumenta el tiempo. Esto puede estar ocurriendo debido a que había un pequeño tiempo entre el muestreo y las mediciones, por lo que la actividad hemolítica podría ser un poco mayor a la esperada. También puede ser debido a otros componentes hemolíticos en el veneno, como metaloproteasas, un grupo de enzimas bastante prevalente en venenos de croalidos (Byrd y Johnson, 1970). De esta manera, se recomienda detener las reacciones con EDTA, para quelar el calcio (el cofactor) e inhibir la PLA₂. Este estudio también implica que puede desarrollarse un método para el tratamiento de mordedura de *C. simus* con pBPB, debido a que se ha demostrado que éste es útil en el tratamiento para mordedura de *Bothrops asper*, y reduciendo su actividad enzimática hasta al 1% y la sensibilidad al dolor (Chacur *et al.* 2003).

En la Figura 31(b) se puede observar que la actividad hemolítica del veneno de *H. charlesbogerti* se mantiene constante y con una inhibición casi nula. Esto se debe a que no se trabajó en el pH óptimo para la PLA₂ de este veneno, el cual es nueve (Gomez, *et al.* 1989). En

otros estudios se ha encontrado que la inhibición por medio de pBPB no es significativa si la toxina también posee poca actividad catalítica (Díaz *et al.* 1993). Adicionalmente, se considera que la inhibición por parte del pBPB puede ser distinta en una fosfolipasa de grupo III, que es más similar a la de las abejas que a la de vipéridos (Burke y Dennis, 2009). Debido a esto, se sugiere también un aumento en el tiempo del ensayo para *H. charlesbogerti*, ya que se ha reportado que la inhibición del veneno de *C. simus* requiere de menor tiempo en comparación a otras especies de serpiente, además del veneno de abeja (Marcussi *et al.* 2007).

Como conclusión, esta investigación demuestra un método verde para la síntesis de pBPB, por medio de una bromación en alfa de la p-bromoacetofenona. Además, que este es útil para la reducción de la actividad hemolítica de *C. simus*. También demuestra que es necesario optimizar las condiciones del ensayo con el veneno de *H. charlesbogerti*, de manera que se pueda evaluar si éste puede ser un tratamiento adecuado para el mismo.

D. Evaluación de la toxicidad de extractos de plumas de *Pheucticus chrysopeplus* (Aves: Cardinalidae) mediante ensayo de letalidad con artemia salina (Anostraca: Artemiidae) como modelo *in vivo*

1. Metodología

a. Trabajo de campo y colecta de muestras. Se colocaron redes de niebla en la Reserva Natural Privada para la Conservación del Heloderma en claros con alto tráfico de aves. Las redes se mantuvieron abiertas durante periodos del día de alta actividad de aves, de 06:00-10:00 hrs. y de 16:00-19:00 hrs. revisando cada 20 minutos las mismas para reducir el riesgo de mortalidad por insolación (Karr, 1981). Se mantuvo sujeción de los organismos mientras se extraían las plumas (aproximadamente 5 minutos) con base a técnicas de manejo de aves de la FAO Animal Production (2007), específicamente el ringer's hold que implica sujeción de la cabeza del ave entre los dedos medio e índice mientras se sostienen las patas entre los dedos anulares y meñique. Se colectaron plumas bajo recomendaciones del Protocolo de Colecta de Plumav de UCLA (2015). Se colectaron plumas debido a que, al ser la primera línea de defensa contra depredadores, son un repositorio funcional lógico para sustancias tóxicas defensivas (Wieldon, 2000). Además, si bien estudios de Dumbacher *et al.* (2009) determinaron que la mayor concentración de toxinas en *Pitohui sp.* se encontraba en piel, dichos resultados pueden deberse a una contaminación de las muestras de piel por plumón incrustado en el tejido (Wieldon, 2000). Se colectaron dos plumas de cola, una central y una distal para cada individuo, así como aproximadamente 0.5 g de plumas de: vientre, espalda y cuello. Para arrancarlas, las plumas se sostienen cerca de la base y se halan suavemente. Posteriormente se almacenaron en bolsas Ziplock separadas por individuo a 4° C, anotando especie, fecha de colecta y hora del día. Cada individuo se marcó utilizando esmalte de uñas para evitar volver a colectar plumas del mismo.

b. Bioética. Todos los procedimientos aquí descritos fueron aprobados por el Comité de Ética, Uso y Cuidado Animal de la Universidad del Valle de Guatemala (CEUCA - UVG) con vigencia del 10 de noviembre de 2016 a 10 de noviembre de 2017. La carta de aprobación se adjunta en Anexos (Anexo 3).

c. Extracción de toxinas. Las plumas se cortaron en pequeñas secciones, se pesaron usando una balanza analítica y se colocaron dentro de un tubo eppendorf de 0.5 mL. Se perforó el tubo con una jeringa cerca de su base. Seguido, se añadió etanol a una razón de 2 mL por cada gramo de pluma y se dejó reposar por 5 minutos para permitir que las toxinas se disuelvan en el etanol. Luego, se colocó el tubo perforado dentro de un tubo eppendorf de 2 mL y se centrifugó la muestra a 13,200 rpm por 5.5 minutos para filtrar el etanol. Este proceso de lavado se repitió tres veces. Se combinaron los extractos y se evaporó el etanol de los mismos en un Shake n' Bake a 60 °C. El residuo se resuspendió en metanol (2 mL por cada gramo de pluma utilizado) (Dumbache *et al.*, 2016).

d. Ensayos de letalidad. Se evaluó la toxicidad de los extractos de pluma de cada especie mediante bioensayos de mortalidad con *Artemia salina*. Su uso es compatible con metanol como solvente según Wu (2014), por lo que el extracto propuesto presenta un modelo ideal. Se utilizaron puntas de micropipeta de 1000 µL selladas con calor como viales para colocar cada grupo de artemias. Dentro de cada vial se colocaron al menos 10 artemias junto con 500 µL de una combinación de agua de pecera, buffer salino de fosfatos, metanol y cada uno de los extractos a evaluar según sea el caso. Las cantidades específicas se resumen a continuación (Cuadro 23). Se determinó la mortalidad registrando la cantidad inicial de artemias en cada vial y la cantidad de artemias vivas (criterio: se mueven al menos 1 vez a lo largo de 10 segundos) luego de 24, 48 y 72 horas (Geetha *et al.*, 2013).

Cuadro 23. Composición soluciones empleadas para cada tratamiento.

Tratamiento	Agua de pecera		Otras sustancias
Control	250 µL	+	250 µL de Buffer salino de fosfatos
Metanol	495 µL	+	5 µL de Metanol
Extracto de plumas	495 µL	+	5 µL de extractos de <i>P. chrysopeplus</i> .

Se utilizó buffer salino de fosfatos en el grupo control para evitar cambios de pH que puedan afectar la mortalidad de *A. salina* (Hamidi *et al.*, 2014). Este grupo permite determinar la mortalidad sin adición de ninguna sustancia. El tratamiento metanol permite determinar la mortalidad de *A. salina* al ser expuesta a metanol, el solvente de los extractos de toxinas

realizados. Por último, el tratamiento de extracto de plumas permite evaluar la mortalidad de *A. salina* al ser expuesta a extracto de plumas de *P. chrysopeplus*.

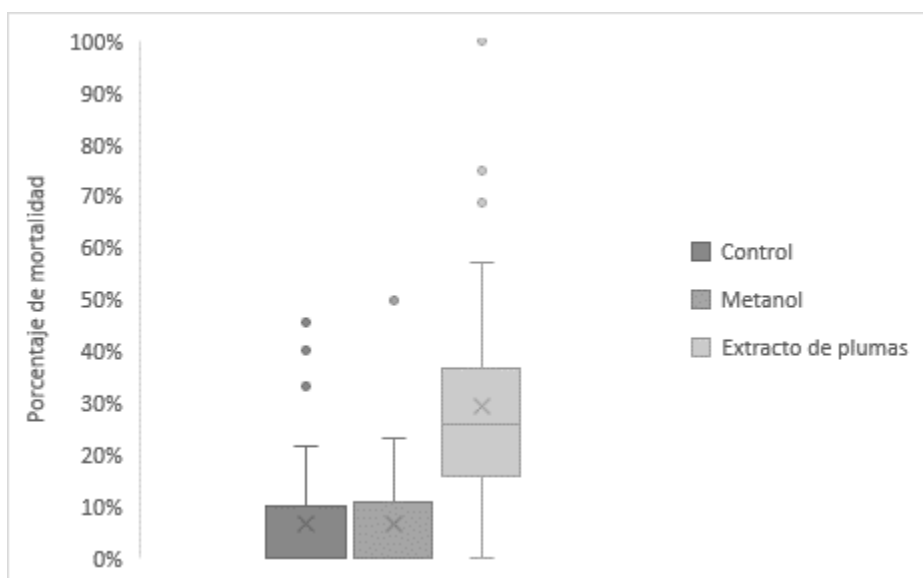
Las sustancias evaluadas se utilizaron a una concentración de 1% (5 en 500 μ L) bajo recomendaciones de Geethaa *et al.* (2013), en donde describen la interferencia de solventes comunes, incluyendo metanol, en bioensayos con *A. salina*. Sugieren 1.25% como concentración máxima al evaluar soluciones que contengan metanol como solvente.

e. Análisis estadístico. Se utilizó el programa JMP 5 para determinar si existían diferencias significativas entre la mortalidad de artemias en cada grupo (control negativo, control metanol y experimental). Se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para determinar si la distribución de los datos era normal. Debido a que no lo era, se realizó entonces una prueba de Wilcoxon/Kruskal-Wallis para determinar si había diferencias significativas entre las medianas de cada tratamiento.

2. Resultados obtenido y discusión de la toxicidad de plumas de *P. chrysopeplus*.

Ensayos de letalidad con *A. salina* indicaron que extractos de plumas de *P. chrysopeplus* producen una mortalidad mayor que a comparación de los tratamientos control y metanol (Fig. 29). Solo se evalúan efectos luego de exposición por 24 horas debido a que al cabo de 48 y 72 horas la mortalidad de *A. salina* en todos los tratamientos se acercaba al 100%. Los tratamientos evaluados presentaron la siguiente media y desviación estándar, respectivamente: Control 6.7% \pm 10.7%; Metanol 6.5% \pm 9.4%; Extracto de plumas 29.3%, \pm 19.1%.

Figura 32. Dispersión de datos para mortalidad de *A. salina* luego de ser expuestas por 24 horas a cada tratamiento.



Se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para determinar si la distribución de datos en cada tratamiento seguía un patrón normal. Con valores-p de <0.0001 (Control), <0.0001 (Metanol) y

0.0006 (Extracto de plumas), podemos concluir que ninguno de los tratamientos seguía una distribución normal. Por ello, evaluamos diferencia entre medianas de cada tratamiento con una prueba de Wilcoxon/Kruskal-Wallis, una prueba no paramétrica. Con $X^2(2) = 65.25$, $p < 0.0001$ y rango de medias de 55.360 para Control, 56.380 para metanol y 114.760 para extracto de plumas, la prueba demostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de mortalidad de los tratamientos.

Con esto, se concluye que exposición a extractos de plumas de *P. chrysopeplus* producen una mortalidad mayor en *A. salina*, a comparación de los tratamientos Control y Metanol. Esta elevada mortalidad es evidencia de cierta toxicidad inherente a plumas de *P. chrysopeplus* (Mendoza, 2008; Rand, 1995). Esto concuerda con lo que se sabe de la especie por conocimiento anecdótico. Poblaciones humanas locales al área de estudio describen como esta especie no suele ser cazada con fines alimenticios debido a que requiere de una cuidadosa preparación para remover sus plumas y ser cocinado. Caso contrario, posee mal sabor y puede causar dolores gastrointestinales, según Salazar (2017). Sus plumas parecen, entonces, contener una o varias sustancias tóxicas que reducen su propensión a ser cazadas por incluso poblaciones humanas. Además, dado que el ensayo de letalidad utilizó un invertebrado como modelo, se puede también intuir efecto tóxico sobre posibles parásitos del ave, brindándole la presencia de toxinas defensa contra por ejemplo ácaros o garrapatas. En conjunto, podemos reportar a *P. chrysopeplus* como la primera especie de ave tóxica conocida para Guatemala y Centroamérica. En América existen sólo otras dos especies conocidas: *Ergaticus ruber* en México y *Bonasa umbellus* en Norteamérica.

a. Patrones de plumaje: aposematismo y mimetismo. El plumaje de *P. chrysopeplus* puede considerarse aposemático en luz de la toxicidad de esta especie y de la coloración contrastante (amarillo con negro) y llamativa que posee (Weldon, 2000; Skelhorn & Rowe, 2007). Considerando que su patrón de plumaje parece alertar sobre su toxicidad, el parecido de esta especie con plumajes de *Icterus pectoralis* e *I. pustulatus* implica un mecanismo de mimetismo en el grupo. A pesar de su parecido, estas especies se encuentran poco relacionadas, perteneciendo incluso a familias diferentes. Esto sugiere que existe un beneficio a parecerse entre sí que los ha llevado a generar plumajes similares en un área donde coexisten (Audesirk, Audesirk & Byers, 2003). Sin embargo, el tipo de mimetismo en juego no puede determinarse, pues esto depende de si alguna de las especies de *Icterus sp.* posee también algún tipo de toxicidad (Batesiano, en caso solo *P. chrysopeplus* posea cierta toxicidad y funja de organismo modelo, o bien Mulleriano en caso alguna o ambas de las especies de *Icterus sp.* también sea tóxica). Más estudios sobre estas especies son necesarios para aclarar este punto y dar una conclusión certera.

VII. CONCLUSIONES

A. Genética de la conservación

1. Los cebadores diseñados para el estudio son eficientes y efectivos para la correcta amplificación de los genes *nadh4* y *ldhA* para la especie *C. palearis*, y *atpasa6* para la especie *H. charlesbogerti*, siendo estos útiles para futuros estudios de esta especie de gran interés biológico, que hagan uso de este gen mitocondrial.
2. La población de *C. palearis* que se ha visto dividida en subpoblaciones debido a la fragmentación del bosque estacionalmente seco del Valle del Motagua.
3. Existen cinco haplotipos diferenciados entre sí (Occidental, Motagua norte, Cabañas, Cabañas sur y Oriental) para el gen *nadh4* en *C. palearis*, así como para el gen *ldhA* (Motagua norte A, Motagua norte B, Jícaro, Cabañas A y Cabañas B).
4. Existen cuatro ESU basadas en el gen *nadh4* en la especie *C. palearis*, la primer ESU generada por el haplotipo Motagua Norte que está aislado, el cual presenta una cantidad mayor de dos mutaciones con respecto al haplotipo de Cabañas, la segunda ESU generada por el haplotipo Occidental, la tercer ESU generada por el haplotipo Oriental y la cuarta ESU sería la generada por los haplotipos centrales de Cabañas y Cabañas sur.
5. Se determinó la presencia de tres ESU para el gen *ldhA* en la especie *C. palearis*, la primera generada por los haplotipos Motagua Norte A y Motagua Norte B, la segunda ESU generada por el haplotipo Jícaro y la tercer ESU generada por los haplotipos centrales Cabañas A y Cabañas B.
6. La presencia de un haplotipo diferenciado en la ribera norte del río Motagua (Usumatlán) en las redes de haplotipos de los genes *Nadh4* y *LdhA*, evidencia que el río Motagua es una eficiente barrera biogeográfica capaz de formar haplotipos diferentes.
7. Tomando en cuenta la cantidad de haplotipos presentes por localidad y las ESU encontradas, las poblaciones de mayor importancia genética para la conservación de *C. palearis* son Usumatlán, Cabañas y Gualán.
8. Basado en el gen *Nadh4*, existe un gradiente en la distribución espacial de estos haplotipos, estando el haplotipo occidental distribuido en las poblaciones del oeste, el haplotipo Motagua Norte distribuido en la población del norte del Motagua, el haplotipo Cabañas distribuido en el norte y centro del Motagua, el haplotipo Cabañas sur distribuido en las poblaciones del centro y este del Motagua y por último, el haplotipo oriental distribuido en las poblaciones del centro y este del valle del Motagua.
9. Basado en el análisis de varianza molecular del gen *nadh4*, existe una estructura genética definida para las poblaciones de *C. palearis* en el bosque seco del Valle del Motagua ($\Phi_{ST}=0.1858$, $p=0.048$), encontrándose un 18.59% de variación interpoblacional en la especie.

10. Existe una estructura genética marcada en *C. palearis* entre localidades geográficas ($\Phi_{st} = 0.3120$, $p = 0.036$) en el gen *nadh4*. Se observó que, con cuatro grupos, cerca del 40% de la variación genética encontrada se explicaba por estas áreas geográficas diferenciadas. Incluso, cuando se analiza solo la población del norte del Motagua con respecto a las poblaciones del sur (dos grupos), cerca de un 27% de la variación genética encontrada se explica por la barrera biogeográfica del río Motagua ($\Phi_{st} = 0.3522$, $p = 0.025$).
11. El gen *nadh4* brinda información pertinente para la realización de un estudio de genética poblacional, mientras que el gen *ladhA* no es ideal para la realización de un estudio de esta índole.
12. Existen tres haplotipos diferenciados entre sí (occidental, ancestral y oriental) por tan solo una mutación.
13. Existe un gradiente en la distribución espacial de estos haplotipos, estando el haplotipo occidental distribuido en las poblaciones del oeste y centro del Valle del Motagua y el haplotipo oriental restringido a las poblaciones del centro y este del Valle del Motagua. La población del centro de la distribución (Cabañas-Los Encuentros) presenta individuos del haplotipo occidental, así como del oriental, sumados al haplotipo típico de dicha localidad que es el haplotipo considerado como ancestral.
14. Existe baja diversidad genética para *H. charlesbogerti* en el bosque seco del Valle del Motagua; presentando únicamente una Unidad de Significancia Evolutiva (ESU).
15. No existe una estructura genética definida para las poblaciones de *H. charlesbogerti* en el bosque seco del Valle del Motagua, esto en base al análisis de varianza molecular ($\Phi_{ST} = 0.09$, $p = 0.12$).
16. La biología de la especie, *H. charlesbogerti*, hace que tenga una evolución lenta, permitiendo alta conservación del gen mitocondrial *atpasa-6*, cuya tasa de mutación es la más alta en comparación a los demás genes mitocondriales.
17. La baja diversidad genética presentada por *H. charlesbogerti* indica que los esfuerzos de conservación deben enfocarse al aumento poblacional en cada subpoblación geográfica, basándose en programas de reproducción en semicautiverio, así como el intentar restablecer la conectividad de hábitat.
18. La baja diversidad genética presentada por *H. charlesbogerti* hace que la translocación de individuos de localidades cercanas no sea relevante.
19. Los esfuerzos de conservación para *C. palearis* deben enfocarse en aumentar el tamaño poblacional local, así como en la concientización de los pobladores de la región on el fin de disminuir la mortalidad por cacería de la especie. También se debe intentar restablecer la conectividad de hábitat.

20. El manejo de cada una de las Unidades de Significancia Evolutiva (ESU's) debe realizarse por separado para evitar interferir con los procesos biológicos y evolutivos propios a cada unidad.
21. La ESU presente al norte del Río Motagua requiere especial atención e involucramiento con los pobladores de la zona debido a su relación con las poblaciones de *C. palearis* presentes en el área.

B. Toxinología

1. Se realizó la síntesis del pBPB por medio de un método verde, como lo es la formación de bromo *in situ*.
2. Se comprobó la producción de pBPB por medio de una prueba con yoduro de potasio, su punto de fusión, y la espectroscopía infrarroja.
3. La utilidad del producto fue determinada por medio de un ensayo cualitativo *in vitro*. En el cual se observó reducción de los halos de hemólisis provocados por el veneno de *C. simus*.
4. Se observó una disminución de la actividad hemolítica de *C. simus* en el ensayo de hemólisis indirecto; sin embargo, no se detectó la disminución de la misma en para el veneno de *H. charlesbogerti*. Esto se debió a que no se trabajó a las condiciones óptimas de la última enzima.
5. Plumas de *P. chrysopeplus* aumentan significativamente la mortalidad de *A. salina* ($X^2=65.25$, $p < 0.0001$) indicando que plumas de *P. chrysopeplus* poseen algún tipo de toxina.
6. *P. chrysopeplus* se reporta como la primera especie de ave tóxica de Centroamérica.
7. Plumaje de *P. chrysopeplus* es aposemático, advirtiendo sobre su toxicidad.

VIII. RECOMENDACIONES

A. Genética de la conservación

1. Es recomendable realizar otro estudio de genética poblacional de *C. palearis* y *H. charlesbogerti*, pero con genes nucleares (como microsatélites) para llegar a obtener conclusiones complementarias sobre el estado genético de la población, ya que con los genes mitocondriales únicamente se obtiene información de la línea maternal, no de la línea parental. Con el fin de confirmar la presencia de baja diversidad genética desde otro enfoque molecular.
2. Al usar papel Whatman ® FTA para el almacenamiento de muestras y kit con columnas para la extracción de ADN, se recomienda hacer la centrifugación de la muestra para únicamente pasar el sobrenadante a la columna y así evitar que se tapen los poros de la columna.
3. También se recomienda incrementar, en la medida de lo posible, el tamaño de muestra para el estudio de genética poblacional para así poder tener una muestra más representativa de las localidades de las que se obtuvieron pocos ejemplares.
4. Es recomendable la realización de más estudios genéticos de *C. palearis* y *H. charlesbogerti*, para la obtención de secuencias publicadas y de libre acceso en los bancos de datos como GenBank; de esta forma se da a conocer la importancia del estudio de la iguana de órgano y Heloderma del Valle del Motagua.
5. Realizar translocaciones, en caso de considerarse necesario, únicamente entre ejemplares de *H. charlesbogerti* de las localidades en los extremos de la distribución de la especie, Sanarate y Gualán, con el fin de incrementar la diversidad genética de estas poblaciones.
6. Reforzar las acciones de conservación del hábitat y de *H. charlesbogerti* en la población de Cabañas pues la misma es la que posee presencia de los tres haplotipos encontrados en la especie.
7. Continuar y reforzar el programa de incremento de copulas de ejemplares de *H. charlesbogerti* silvestres en semi-cautiverio realizado en la Reserva Natural para la Conservación del Heloderma como una manera de aumentar el tamaño poblacional y mantener los tres haplotipos encontrados en la especie.
8. Realizar un estudio acerca de la perspectiva que tienen los pobladores acerca de situación actual de *H. charlesbogerti* y *C. palearis* en cada una de las zonas muestreadas para determinar la efectividad de estrategias de conservación en las que se vean involucrados.
9. Fomentar la realización de un corredor biológico en el bosque seco del Valle del Motagua que conecte los principales *hotspots* de biodiversidad con el fin de aumentar la conectividad entre las poblaciones de mayor importancia tanto para *H. charlesbogerti* como para *C. palearis*.

10. Crear programas de conservación en semicautiverio independientes para cada ESU con el fin de aumentar el tamaño poblacional de *C. palearis*.
11. Crear un programa de concientización tanto para el heloderma como para la iguana de órgano que abarque las principales poblaciones en el caso de *H. charlesbogerti*, y todas las ESU en el caso de *C. palearis* con el fin de disminuir la cacería hacia ambas especies.
12. Involucrar a los pobladores de cada región en la que se planea implementar estrategias de conservación, con el fin de crear una identificación entre las especies protegidas y el área de trabajo.

B. Toxinología

1. Realizar comparaciones con una fosfolipasa A₂ como un control positivo para futuros estudios, de esta manera se observan las modificaciones directas a esta enzima.
2. Purificar la enzima en caso que desee evaluarse ésta solamente, y no el veneno; de manera que se obtengan datos más precisos y exactos.
3. Trabajar en condiciones óptimas de ambas enzimas, para lograr observar si existen disminuciones significativas y reducir la variabilidad de las réplicas.
4. Evaluar la modificación de la actividad del veneno con otros inhibidores sintéticos o una mezcla de los mismos.
5. Realizar estudios *in vivo* del tratamiento de estos venenos con pBPB, de manera que se observe de forma adecuada la reducción de sus efectos.
6. Determinar la toxicidad de ambas especies de *Icterus sp.* y poder determinar el tipo de mimetismo que ocurre entre este grupo y *P. chrysopeplus*.
7. Analizar el carácter químico de la sustancia o sustancias que confieren la toxicidad a plumas de *P. chrysopeplus*. Esto podría ayudar a buscar aplicaciones de estas toxinas en beneficio del ser humano.

IX. LITERATURA CITADA

- Alberts, A. 1999. «Developing recovery strategies for West Indian Rock Iguanas». *Endangered Species UPDATE*, 16(5), 107-110.
- All About Birds. Blackbirds and allies.
https://www.allaboutbirds.org/guide/browse_tax.aspx?family=33 [Fecha de consulta: 12 de marzo, 2017]
- Allendorf, F. W., Hohenlohe, P. A., & Luikart, G. 2010. «Genomics and the future of conservation genetics». *Nature Reviews Genetics*. 11(10), 697–710.
- Allendorf, F.W. & Luikart, G. 2007. *Conservations and the genetics of populations*. Blackwell Publishing, Londres. 664págs.
- Amos, W. & Balmford, A. 2001. «When does conservation genetics matter?» *Heredity* 87(3):257-265.
- Anzueto, R. & Campbell, J. 2010. «Guatemalan Beaded Lizard (*Heloderma horridum charlesbogerti*) on the place versant of Guatemala» *The Southwest Naturalist*. 55(3):453-454.
- Ariano, D. & Salazar, G. 2007. «Notes on the Distribution of the Endangered Lizard, *Heloderma horridum charlesbogerti*, in the Dry Forests of Eastern Guatemala: An Application of Multi-criteria Evaluation to Conservation». *Iguana* 14(3): 152-158.
- Ariano, D. 2003. *Distribución e historia narural del Escorpión, Heloderma horridum charlesbogerti Campbell y Vannini, (Sauria: Helodermatidae) en Zacapa, Guatemala y caracterización de su veneno*. Tesis Universidad del Valle de Guatemala. 80págs.
- Ariano-Sánchez, D. 2006. «The Guatemalan beaded lizard: Endangered inhabitant of a unique ecosystem». *Iguana* 13(3): 178-183.
- Ariano-Sánchez, D. 2008. «Envenomation by a wild Guatemalan beaded lizard *Heloderma horridum charlesbogerti*». *Clinical Toxicology* 46 (9): 897-899.
- Ariano-Sánchez, D. 2017. Tiempo de vida de *Heloderma charlesbogerti* en vida silvestre. Universidad del Valle de Guatemala. Email: dariano@gmail.com
- Ariano-Sánchez, D. y G. Salazar. 2015. «Spatial ecology of the endangered Guatemalan Beaded Lizard *Heloderma charlesbogerti* (Sauria: Helodermatidae), in a tropical dry forest of the Motagua Valley, Guatemala». *Mesoamerican Herpetology*, 2(1): 64-74.
- Ariano-Sánchez, D., & Salazar, G. 2012. «*Heloderma horridum charlesbogerti* (Guatemalan Beaded Lizard)- Shelter use». *Herpetological Review* 43(4): 645-646.
- Ariano-Sánchez, D., Muñoz-Alons, A., Marquez, L.C. & Acevedo, M. 2014. «*Heloderma horridum*». *The IUCN Red List of Threatened Species* 2014: e.T9864A3152367.
- Audesirk, T., G. Audesirk y B. Byers. 2003. *Biología. La vida en la Tierra*. 6a. ed. Pearson Educación, México D. F. 889 pp.
- Auliya, M., S. Altherr, D. Ariano-Sánchez, E. Baard, C. Brown, J. Cantu, G. Gentile, P. Gildenhuys, E. Henningheim, J. Hintzmann, K. Kanari, M. Krvavac, M. Lettink, J. Lippert, L. Luiselli, S. Pasachnik y T. Zigler. 2017. «Trade in live reptiles, its impact on wild populations, and the role of the European market». *Biological Conservation*. 204: 103-119
- Bartram, S. y Boland, W. 2001. «Chemistry and Ecology of Toxic Birds». *ChemBioChem*, 2: 809–811.

- Bazin, E., Glémin S., & Galtier, N. 2006. «Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals». *Science* 312(5773):570-572.
- Beauty of Birds. *New World Orioles (Icterus)*. <https://www.beautyofbirds.com/orioles.html> [Fecha de consulta: 12 de marzo, 2017]
- Beck, D. 2005. *Biology of Gila Monsters and Beaded Lizards*. University of California Press, Los Angeles: USA. 247págs.
- Bender, D., Contreras, T., & Fahrig, L. 1998. «Habitat loss and population decline: a meta-analysis of the patch size effect». *Ecology* 79(2): 517-533.
- BirdLife International. *Species factsheet: Pheucticus chrysopleus*. <http://datazone.birdlife.org/species/factsheet/yellow-grosbeak-pheucticus-chrysopleus> [Fecha de consulta: 12 de marzo, 2017]
- Bogenhaden, D. 2011. «Mitochondrial DNA nucleoid structure». *Biochimica et Biophysica Acta*. 1819(9-10): 914-920.
- Bon, C.; J. Changeux, T. Jeng y H. Fraenkel-Conrat. 1979. «Postsynaptic effects of crotoxin and its isolated subunits». *European Journal of Biochemistry*. 99(3):471-481.
- Boyce, M. y L. McDonald. 1999. «Relating populations to habitats using resource selection functions». *Trends in Ecology & Evolution*, 14(7), 268-272.
- Brewer, D. *Yellow Grosbeak (Pheucticus chrysopleus)*. <http://www.hbw.com/species/yellow-grosbeak-pheucticus-chrysopleus> [Fecha de consulta: 12 de marzo, 2017]
- Buckley, L.J. & Axtell, R.W. 1997. «Evidence for specific status of the Honduran lizard formally referred to as *Ctenosaura palearis* (Reptilia: Squamata: Iguanidae) » *American Society of Ichthyologists and Herpetologists (ASIH)*. 1997(1):138-150.
- Buckley, L.J. K. Queiroz. Etheridge, R. B. Hollingsworth. Iverson, J. S. Pasachnik. Stephen, C. 2011. «Iguanas of the word (Iguanidae; Iguanimae) ». *Iguana Taxonomy Working Group*. 11(6):1-26.
- Burke, J.E. y E.A. Dennis. 2009. «Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling». *Journal of Lipid Research April Supplement*: S237-S242. DOI 10.1194/jlr.R800033-JLR200.
- Byrd, F.E. y B.D. Johnson. 1970. «Some effects of heat-labile venom components on indirect hemolysis by crotalid venoms». *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 19(4): 724-728.
- Calvete, J.J.; L. Sanz, P. Cid, P. De la Torre, M. Flores-Díaz, M.C. Dos Santos, A. Borges, A. Breimo, Y. Angulo, B. Lomonte, A. Alape-Girón y J.M. Gutierrez. 2010. «Snake venomomics of the central american rattlesnake *Crotalus simus* and the south american *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive pedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America». *Journal of Proteome Research* 9(1):528-544.
- Campbell, J. y J. Vannini. 1988. «A new subspecies of beaded lizard, *Heloderma horridum*, from the Motagua Valley of Guatemala». *Journal of Herpetology*. 22(4):457-468.
- Campbell, J., & Lamar, W. 2004. *The venomous reptiles of the Western Hemisphere, Volume 2*. Comstock Pub Associates. New York: USA. 870 págs.

- Campbell, J.A. y Vannini J.P. 1989. «Distribution of amphibians and reptiles in Guatemala and Belize». *Proceedings of the western foundation of vertebrate zoology*. 4(1):21p.
- Canziani, G; C. Seki y J.C. Vidal. 1982. «Accessibility of the active site of crotoxin B in the crotoxin complex». *Toxicon*. 20(5):809-822.
- Cardoso, D., & Cristiano, M., & Tavares., & Heinze, J. 2015. «Phylogeography of the sand dune ant *Mycetophylax simplex* along the Brazilian Atlantic Forest coast: Remarkably low mtDNA diversity and shallow population structure». *BMC Evolutionary Biology*, 15(106)1-13.
- Carvalho, B.M.A.; Santos, J.D.L.; Xavier, B.M.; Almeida, J.R.; Resende, L.M.; Martins, W.; Marcussi, S.; Marangoni, S.; Stábeli, R.G.; Calderon, L.G.; Soares, A.M.; Da Silva, S.L. y D.P. Marchi-Salvador. (2013). *Snake venom PLA₂s inhibitors isolated from Brazilian plants: Synthetic and natural molecules*. BioMed Research International 2013: 8p.
- Castro, E,N; Lomonte, B; Gutiérrez, M; Alagón, A. y Gutiérrez, J.M. 2013. «Intraspecies variation in the venom of the rattlesnake *Crotalus simus* from Mexico: different expression of crotoxin results in highly variable toxicity in the venoms of three subspecies». *Journal of Proteomics*. 87. 103-121.
- CENGICAÑA. 2014. *El Cultivo de la Caña de Azúcar en Guatemala*. (M. Melgar, A. Meneses, H. Orozco, O. Pérez, & R. Espinoza, Eds.). Guatemala: Guatemala. 526 págs.
- Chacur, M.; Longo, I.; Picolo, G.; Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B.; Guerra, J.L.; Teixeira, C.F.P.; y Y. Cury. 2003. *Hiperalgia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A2 from Bothrops asper snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants*. *Toxicon* 41: 667-678.
- Chazal, J y M. Rousevell. 2009. «Land-use and climate change within assessments of biodiversity change: A review». *Global Environmental Change*. 19(2): 306-315.
- Chippaux, J.P. 1998. «Snake-bites: appraisal of the global situation». *Bulletin of the World Health Organization* 76(5): 515-525.
- Clement, M., Snell, Q., Walker, P., Posada, D., & Crandall, K. 2002. «TCS: Estimating gene genealogies». *Parallel and Distributed Processing Symposium, International Proceedings*, 2, 184.
- Cleve, C., Perrine, J., Holzman, B., & Hines, E. 2011. «Addressing biased occurrence data in predicting potential Sierra Nevada red fox habitat for survey prioritization». *Endangered Species Research*, 14(3), 179-191.
- CONAP. 2009. *Lista de especies amenazadas (LEA) y Listado de flora y fauna silvestres CITES de Guatemala*. Departamento de vida silvestre – CONAP. 122 pp.
- CONAP-ZOOTROPIC. 2013. *Estrategia nacional para la conservación del Heloderma y su hábitat, 2013-2018*. D. Ariano (Ed.). Zootropic, Guatemala. Guatemala. 32 págs
- CONAP-ZOOTROPIC-CECON-TNC. 2011. *Plan de Conservación de las Regiones Secas de Guatemala*. Editores: D. Ariano, E. Secaira, B. García y M. Flores. TNC, Guatemala: Guatemala. 60 págs.
- Cornell Lab of Ornithology. *Spot-breasted oriole*. https://www.allaboutbirds.org/guide/Spot-breasted_Oriole/id [Fecha de consulta: 10 de octubre, 2016]
- Coti, P., & Ariano-Sánchez, D. 2008. «Ecology and traditional use of the Guatemalan black iguana (*Ctenosaura palearis*) in the dry forests of the Motagua Valley, Guatemala». *Iguana* 15(3): 142-149.

- Cox, C., & Moore, P. 2016. *Biogeography: An Ecological and Evolutionary Approach* Ladle, John Wiley & Son, Inc. Estados Unidos. 500 pp.
- Crandall, D. 1994. «Intraspecific cladogram estimation: accuracy at higher levels of divergence». *Systematic Biology*. 45(7). 56 – 63.
- Crandall, K; R, O. Bininda-Emonds; Mace, G; R. Wayne. 2000. «Considering evolutionary processes in conservation biology». *Trends in Ecology & Evolution Journal*. 15(7): 290-295.
- Crnokrak, P., & Barrett, S. C. H. 2002. «Purging the genetic load: a review of the experimental evidence». *International Journal of Organic Evolution*. 56(12), 2347–2358.
- Crnokrak, P., & Roff, D. A. 1999. «Inbreeding depression in the wild». *Heredity*, 83(3):260-270
- Crow, J. 2010. «Wright and Fisher on Inbreeding and Random Drift». *Genetics* 184(3):609-611.
- Desjardins, P., & Conklin, D. 2010. «NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids». *Journal of visualized experiments, NCBI*. 22(45):.e2565.
- Díaz, C.; Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B. y J. Nuñez. 1993. «p-Bromophenacyl bromide modification of Bothrops asper myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A₂, affects its pharmacological activities». *Toxicon*. 31(9): 1202-1206.
- Dickson, S; R. Shirazi; Hansson, C; F. Bergquist; Nissbrandt, H; K. Skibicka. 2011. «The Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1) Analogue, Exendin-4, Decrease the Rewarding Value of Food: A New Role of Mesolimbic GLP-1 Receptors». *The Journal of Neuroscience*. 32(14): 4812-4820.
- Dixo, M., Paul, J., Morgante, J. S., & Zamudio, K. R. 2009. «Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest». *Biological Conservation* 142(8), 1560–1569.
- Dodd CJ & Seigel R. 1991. «Relocation, repatriation and translocation of amphibians and reptiles: are they conservation strategies that work? ». *Herpetology* 47(3):336-356.
- Domínguez-Vega, H., Monroy-Vilchis, O., Balderas-Valdivia, C., Gienger, C. y Ariano-Sánchez, D. 2012. «Predicting the potential distribution of the beaded lizard and identification of priority areas for conservation». *Journal for Nature Conservation*. 20: 247-253
- Douglas, M. E., Douglas, M. R., Schuett, G. W., Beck, D. D., & Sullivan, B. K. 2010. «Conservation phylogenetics of helodermatid lizards using multiple molecular markers and a supertree approach». *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 55(1), 153–167.
- Dowling, D; U. Friberg; Lindell, J. 2008. «Evolutionary implications of non-neutral mitochondrial genetic variation». *Cell Press*. 23(10): 546-554.
- Dumbacher, J. P., G. K. Menon, y J. W. Daly. 2009. «Skin as a toxin storage organ in the endemic New Guinean Genus *Pitohui*». *The American Ornithologists' Union*. 126(3): 520-530.
- Dumbacher, J. y R. Fleischer. 2001. «Phylogenetic evidence for colour pattern convergence in toxic pitohuis: Mülerian mimicry in birds?». *Proceedings of the Royal Society of London*. 268(1480):1971-1976.
- Dumbacher, J., B. Beehler, T. Spande, H. Garraffo, y J. Daly. 1992. «Homobatrachotoxin in the genus *Pitohui*: Chemical defense in birds? ». *Science* 258(5083):799-801.
- Excoffier L., & Smouse, PE., & Quattro JM. 1992. «Analysis of molecular variance inferred from metric distances among dna haplotypes: Application to human mitochondrial dna restriction data». *Genetics* 131(2):479–491.

- Fahrig, L. 2003. «Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity». *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 34 (1): 487–515.
- FAO. Wild birds and avian influenza. <http://www.fao.org/docrep/010/a1521e/a1521e00.htm> [con acceso el 8 de noviembre, 2016]
- Faure, G.; H. Xu, y F.A. Saul. 2011. «Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric β -neurotoxin». *Journal of Molecular Biology* 412(2):176-191.
- Frankham, R. 2003. «Genetics and conservation biology». *Comptes Rendus Biologies*. 326(Suplemento 1): 22-29.
- Frankham, R. 2005. «Genetics and extinction. Biological Conservation». *Biological conservation*. 126(2):131–140.
- Frankham, R., & Ballou, J., & Briscoe, D. 2009. *Introduction to conservation genetics*. 2a ed. Cambridge: Cambridge University Press. 618págs.
- Frankham, R., J. D. Ballou, and D. A. Briscoe 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 673 págs.
- Fry, B., N. Vidal, J. Norman, F. Vonk, H. Scheib, S. Ryan, S. Kuruppu, K. Fung, S. Blair, M. Richardson, W. Hodgson, V. Ignjatovic, R. Summerhayes, and E. Kochva. 2006. «Early evolution of the venom system in lizards and snakes». *Nature*. 439: 584-588.
- Fry, B.G.; Vidal, N.; Norman, J.A.; Vonk, F.J.; Scheib, H.; Ramjan, S.F.R.; Kuruppu, S.; Fung, K.; Hedges, S.B.; Richardson, M.K.; Hodgson, W.C; Ignjatovic, V.; Summerhayes, R. y E. Kochva. 2006. «Early evolution of the venom system in lizards and snakes». *Nature* 439: 584-588.
- Galindo-González, J. (2007). *Efectos de la fragmentación del paisaje sobre poblaciones de mamíferos; el caso de los murciélagos de Los Tuxtlas, Veracruz. Tópicos en sistemática, biogeografía, ecología y conservación de mamíferos*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México 144págs.
- Galtier, N; B. Nabholz; Glémin, S; D. Hust. 2009. «Mitochondrial DNA as maker of molecular diversity: a reappraisal». *Molecular Ecology*. 18(22):4541-4550.
- Geethaa, S., P. Jayanthi, S. Poh y O. Ming. 2013. «Interferennnce from ordinarily used solvents in the outcomes of Artemia salina lethality test». *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 4(4): 179-182.
- Gehring, P., & Pabijan, M., & Randrianirina, J., & Glaw, F., & Vences, M. 2012. «The influence of riverine barriers on phylogeographic patterns of Malagasy reed frogs (*Heterixalus*)» *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 64(3). 618 – 632.
- Gomez, F.; Vandermeers, A.; Vandermeers-Piret, M-C.; Herzog, R.; Rathe, J.; Stievenart, M.; Winand, J. y J. Christophe. 1989. «Purification and characterization of five variants of phospholipase A2 and complete primary structure of the main phospholipase A2 variant in *Heloderma suspectum* (Gila Monster) venom». *European Journal of Biochemistry* 186(1-2):23-33.
- Gonzales, S. 2017. *Diversidad genética del largarto escorpión (Heloderma horridum charlesbogerti) en el municipio de Cabañas, Zacapa y de ejemplares en cautiverio: implicaciones en su conservación*. Tesis Universidad del Valle de Guatemala. 65págs.

- Gonzalez, G., & Hailer, F., & Flores, O., & García, R., & Maldonal, J. 2010. «Patterns of genetic diversity in the critically endangered Central American river turtle: human influence since the Mayan age? ». *Conservation Genetics*. 12(5):1229 – 1242.
- Goode, A., S. Pasachnik y T. Maple. 2016. «Habitat utilization of Roatán spiny-tailed iguanas (*Ctenosaura oedirhina*) and its implications for conservation». *Herpetological Conservation Biology*. 11(6):79-89.
- Gopalakrishnakone, P. 2015. *Toxinology*. Springer, Estados Unidos. 1532 págs.
- Groombridge, J. J., Jones, C. G., Bruford, M. W., & Nichols, R. A. 2000. «Conservation biology: “Ghost” alleles of the Mauritius kestrel». *Nature*. 403: 616.
- Gupta, A., Lal, K. K., Mohindra, V., Singh, R. K., Punia, P., Dwivedi, A. K., ... Jena, J. K. 2013. «Genetic divergence in natural populations of bronze featherback, *Notopterus notopterus* (Osteoglossiformes: Notopteridae) from five Indian rivers, analyzed through mtDNA ATPase6/8 regions. » *Meta Gene*. 1, 50–57.
- Gutiérrez, J.M. 1995. *Clinical toxicology of snakebite in Central America*. In: Meir, J. & White, J. (Eds.), Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons. CRC Press, Boca Raton, Florida. 25 págs.
- Gutiérrez, J.M. 2010. *Snakebite envenomation in Central America*. In: Mackessy, S.P. (Ed.), Handbook of venoms and toxins of reptiles. CRC Press, Boca Raton, Florida. 16 págs.
- Habib, M; W. Lakra; Mohindra, V; K. Lal; Punia, P; R. Singh; Khan, A. 2012. «Assessment of ATPase 8 and ATPase 6 mtDNA Sequences in Genetic Diversity Studies of *Channa marulius* (Channidae: Perciformes)». *The Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Section 8B: Biological Science*. 82(4):497-501.
- Hamidi, M., B. Jovanova y T. Kadifkova. 2014. «Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model». *Macedonian pharmaceutical bulletin*. 60(1):9-18.
- Hartl, D; Clark, A. 2007. *Principles of Populations genetics (4ª ed.)*. Sinauer Asociados, Estados Unidos. 545 págs.
- Hay, J. M., Daugherty, C. H., Cree, A., & Maxson, L. R. 2003. «Low genetic divergence obscures phylogeny among populations of *Sphenodon*, remnant of an ancient reptile lineage». *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(1), 1–19.
- Hines, K. 2011. «Effects of ecotourism on endangered northern Bahamian Rock Iguanas (*Cyclura cyclura*) ». *Herpetological Conservation and Biology*. 6(2), 250-259.
- Holdridge, L. 1978. *Ecología Basada en Zonas de Vida IICA*. Editorial Agroamérica, Costa Rica. 156 págs.
- Irwin, D. M. 2012. «General and Comparative Endocrinology Origin and convergent evolution of exendin genes». *General and Comparative Endocrinology*. 175(1), 27–33.
- Jeng, T.W. y H. Fraenkel-Conrat. 1978. «Chemical modification of histidine and lysine residues of crotoxin». *FEBS Letters* 87(2):291-296.
- Karr, J. 1981. «Surveying birds with mist nets». *Studies in Avian Biolgy* 6: 62-67.
- Kluge, A., & Farris, J. 1969. «Quantitative phyletic and the evolution of Anurans». *Systematic Zoology*. 18(1):1-32.

- Köhler, G. 1995. «Estudios al aire libre sobre la morfología y ecología de *Ctenosaura bakeri* y *C. oedirhina* en las Islas de la Bahía, Honduras avisos de protección». *Salamandra Rheinbach* 31(2):93-106.
- Köhler, G. 2003. *Reptiles of Central America*. Herpeton. Offenbach, Alemania. 367págs.
- Koludarov, I.; Jackson, T.N.W.; op den Brouw, B.; Dobson, J.; Dashevsky, D.; Arbuckle, K.; Clemente, C.J.; Stockdale, E.J.; Cochran, C.; Debono, J.; Stephens, C.; Panagides, N.; Li, B.; Manchadi, M.R.; Violette, A.; Fourmy, R.; Hendriks, I.; Nouwens, A.; Clements, J.; Martelli, P.; Kwok, H.F. y B.G. Fry. 2017. «Enter the dragon: The dynamic and multifunctional evolution of anguimorpha lizard venoms». *Toxins*. 9(242), 37p.
- Koludarov, I.; Jackson, T.N.W.; Sunagar, K.; Nouwens, A.; Hendriks, I. y B.G. Fry. 2014. «Fossilized venom: The unusually conserved venom profiles of *Heloderma* species (beaded lizards and gila monsters) ». *Toxins*. 6(12):3582-3595.
- Krauss, J; R. Bommarco; Guardiola, M; R. Heikkinen; Helm, R; M. Kuussaari; Lindborg, R; E. Ockinger; Partel, M; J. Pino; Poyry, J; K. Raarikainen; Sang, A; C. Stefanescu; Teder, T; M.Zobel; Steffan-Dewenter, I. 2010. «Habitat fragmentation causes immediate and time-delayed biodiversity loss at different trophic levels». *Ecology Letters*. 13(5): 597-605.
- Kuo, C. H., & Janzen, F. J. 2004. «Genetic effects of a persistent bottleneck on a natural population of ornate box turtles (*Terrapene ornata*)». *Conservation Genetics*. 5(4), 425–437.
- Lebuhn, M., Derenkó, J., Rademacher, A., Helbig, S., Munk, B., Pechtl, A., ... Klocke, M. 2016. «DNA and RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR-Based Assays for Biogas Biocenoses in an Interlaboratory Comparison». *Bioengineering*. 3(1), 7.
- Lee, S; K. Diener; Kaufman, S; J-P. Krieger; Pettersen, K; N. Jejelava; Arnold, M; A. Watts; Langhans, W. 2016. «Limiting glucocorticoid secretion increases the anorexigenic property of Exendin-4». *Molecular Metabolism*. 5(7):552-565.
- Lesica, P., & Allendorf, W. 1995. «When are peripheral populations valuable for conservation?» *Conservation Biology*. 9(4): 753-760.
- Loo, J. 2011. *Manual de genética de la conservación: principios aplicados de genética para la conservación de la diversidad biológica*. Comisión Nacional Forestal, México D.F. 192págs.
- Lowe, W; F. Allendorf. 2010. «What can genetic tell us about population connectivity? ». *Molecular Ecology*. 19(15): 3038-3051.
- Manly, B. F. L., McDonald, L., Thomas, D., McDonald, T. L., & Erickson, W. P. (2004). *Resource selection by animals: statistical design and analysis for field studies*. 2^{da} Edición. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 222 Pp.
- Marchi-Salvador, D.P.; L.C. Corrêa, A.J. Magro, C.Z. Oliveira, A.M. Soares y M.R.M. Fontes. 2008. «Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A₂ formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom». *Proteins*. 72:883-891.
- Marcussi, S.; Sant'Ana, C.; Oliveira, C.Z.; Quintero, A.; Menaldo, D.L.; Belebani, R.O.; Stábéli, R.G.; Giglio, J.R.; Fontes, M.R.M. y A.M. Soares. (2007). *Snake venom phospholipase A₂ inhibitors: Medicinal chemistry and therapeutic potential*. Current Topics in Medicinal Chemistry 7: 743-756.

- McCandlish, D., & Stoltzfus, A. (2014). *Modeling Evolution Using the Probability of Fixation: History and Implications*. The Quarterly Review of Biology.
- Mebs, D. 2001. «Toxicity in animals. Trends in evolution?» *Toxicon*. 39: 87-96.
- mediLexicon. 2017. Toxinology. www.medilexicon.com [Fecha de consulta: 12 de marzo, 2017]
- Mendoza, N. 2008. *Farmacología médica*. Editorial Médica Panamericana, México D.F. 10008 pp.
- Milot, E., Weimerskirch, H., Duchesne, P., & Bernatchez, L. 2007. «Surviving with low genetic diversity: the case of albatrosses». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 274(1611), 779–787.
- Moghim, A.; S. Rahmani, R. Zare, M. Sadeghzadeh y S. Faraji. 2011. «An efficient solvent-free selective bromination of ketones by H₂O₂-HBr». *Iranian Journal of Organic Chemistry*. 3(3):707-711.
- Moritz, C. 1994. «Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation». *Trends in Ecology & Evolution*. 9(11). 373- 375.
- Moritz, C. 1999. «Conservation units and translocations: strategies for conserving evolutionary processes». *Hereditas*, 130(3), 217-228.
- Morrison, D, *et al.* How do we interpret a rooted haplotype network?. The genealogical world of phylogenetic networks. <http://phylonetworks.blogspot.com/2013/09/how-do-we-interpret-rooted-haplotype.html> [Fecha de consulta :20 de marzo del 2017].
- NeotropicalBirds. 2010. Icterus.: http://neotropical.birds.cornell.edu/portal/species/overview?p_p_spp=676716 [Fecha de consulta: 10 de octubre, 2016]
- NeotropicalBirds. 2010. Yellow grosbeak. http://neotropical.birds.cornell.edu/portal/species/overview?p_p_spp=663116 [Fecha de consulta: 12 de marzo, 2017]
- Orr, H. 2010. «The population genetics of beneficial mutations». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 365 (1544): 1195–1201.
- Pasachnik, S. & D. Ariano-Sánchez. 2010. «CITES appendix II listing for the *Ctenosaura plearis* clade: developing conservation policies in Central America». *IRCF Reptiles & Amphibians*. 17(3): 137-139.
- Pasachnik, S., & Echternacht, A. 2010. «Gene trees, species and species trees in the *Ctenosaura plearis* clade». *Conservation genetics*. 11(5):1767–1781.
- Pasachnik, S., & Hudman, S. 2016. «Conservation genetics of roatán spiny-tailed iguanas, *Ctenosaura oedirhina*». *Herpetological Conservation and Biology* 11(6): 187 – 196.
- Pasachnik, S., Fitzpatrick, B., Near, T., & A. Echternacht. 2009. «Gene flow between an endangered endemic iguana, and its wide spread relative, on the island of Utila, Honduras: when is hybridization a threat?». *Conservation Genetics* 10:1247–1254.
- Pasachnik, S.; A. Echternacht; Fitzpatrick, B. 2011. «Population genetics of Honduras spiny-tailed iguana *Ctenosaura melanosterna*: implications for conservation and management». *Endangered Species Research*. 14:113-126.

- Pauls, S; C. Nowak; Balint, M; M. Pfenninger. 2013. «The impact of global climate change on genetic diversity within population and species». *Molecular Ecology*. 22(4): 925-946.
- Perdices, A, & Doadrio, I. 2001. «The molecular systematics and biogeography of the European cobitids based on mitochondrial DNA sequences». *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 19(3), 468–478.
- Pierce, B. 2010. *Genética: un enfoque conceptual*. 3^{ra} Edición. Editorial Médica Panamericana, España 832 págs.
- Polsky, F., & Edgell, M., & Seidman, J., & Leder, P. 1978. «High capacity gel preparative electrophoresis for purification of fragments of genomic DNA». *Analytical biochemistry Journal*. 87(2). 397-410.
- Pool, J; I. Hellmann; Jensen, J; R. Nielsen. «Population genetic inference from genomic sequence variation». *Genomic Research*. 20(3): 291-300.
- Preciado, L.M. y J.A. Pereañez. 2017. *Low molecular mass natural and synthetic inhibitors of snake venom metalloproteinases*. Toxin Reviews Early Online: 1-8.
- Preece, J., N. Friedman, K. Omland. 2007. «Song and plumage evolution in the new world orioles (*Icterus*) show similar lability and convergence in patterns». *Evolution*. 61(4): 850-863.
- R Core Team. 2016. «R: A language and environment for statistical computing». R. *Foundation for Statistical Computing*. Vienna, Austria. URL: <https://www.r-project.org/>.
- Rahikainen, A. L., Palo, J. U., de Leeuw, W., Budowle, B., & Sajantila, A. 2016. «DNA quality and quantity from up to 16 years old post-mortem blood stored on FTA cards». *Forensic Science International*, 261, 148–153.
- Rand, G. 1995. *Fundamentals of aquatic toxicology*. CRC Press, Florida. 1125 págs.
- Reiserer, R., Schuett, G., & Beck, D. 2013. «Taxonomic reassessment and conservation status of the beaded lizard, *Heloderma horridum* (Squamata: Helodermatidae)». *Amphibian & Reptile Conservation*. 7(1), 75–96.
- Rius, M; J. Darling. 2014. «How important is intraspecific genetic admixture to the success of colonizing population? » *Trends in Ecology & Evolution*. 29(4);233-242.
- Rossen, L., & Norskov, P., & Homstrom, K. 1992. «Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions». *International Journal of food microbiology*. 17(1). 37 – 45.
- Rübsamen, H.; H. Breithaupt y E. Habermann. 1971. «Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex». *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Pharmakologie*. 270(3):274-288.
- Sabeti, P. C. 2006. «Positive Natural Selection in the Human Lineage». *Science*, 312(5780), 1614–1620.
- Sahney, S., Benton, M., & Falcon-Lang, H. 2010. «Rainforest collapse triggered Pennsylvanian tetrapod diversification in Euramerica». *Geology*. 38 (12): 1079–1082.
- Sanderson, M. 1989. «Confidence limits on phylogenies: the bootstrap revisited». *Cladistics*. 114(3). 123 – 132.
- Saravia, P.; E. Rojas, V. Arce, C. Guevara, J.C. López, E. Chaves, R. Velásquez, G. Rojas y J.M. Gutierrez. 2002. «Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical

- rattlesnake *Crotalus durissus*: pathophysiological and therapeutic implications». *Revista de Biología Tropical* 50(1):337-346.
- Savitzky, A., Mori, A., Hutchinson, D., Saporito, R., Burghardt, G., Lillywhite, H. y Meinwald, J. 2012. «Sequestered defensive toxins in tetrapod vertebrates: principles, patterns, and prospects for future studies». *Chemoecology* 22(1): 141-158.
- Schneider, S; D. Roessli; Excoffier, L. 2000. *Arlequin: A Software for Population Genetic Data Analysis*. Genetics and Biometry Lab, Dep. Of Anthropology, University of Geneva. 7págs.
- Schrader, C., & Schielke, A., & Ellerbroek, L. 2012. «PCR inhibitors – occurrence, properties and removal». *Journal of applied microbiology*. 113(5). 1014-1026.
- Schrei, Thomas. 2014. *Diversidad genética e historia demográfica de una población del lagarto escorpión (*Heloderma h. charlesbogerti*) basada en marcadores microsatélites e implicaciones para su conservación* Tesis para el grado de licenciatura. Departamento de Biología. Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala. 75 págs.
- Sherwin, W., & Moritz, C. 2000. *Genetic, Demographic and Viability of Fragmented Population*. Managing and monitoring genetic erosion. In C. Young, Andrew (Division of Plant Industry CSIRO & C. Clarke, Geoffrey M (Division of Entomology, CSIRO (Eds.). Londres: Cambridge University Press. 25 págs.
- Short J, Bradshaw SD, Giles J, Prince RIT and Wilson GR. 1992. «Reintroduction of macropods (Marsupialia: Macropodoidea) in Australia-a review». *Biological Conservation*. 62(2):189-204.
- Skelhorn, J. y C. Rowe. 2007. «Predators' toxin burdens influence their strategic decisions to eat toxin prey». *Current Biology*. 17(17):1479-1483
- Slatkin, M. 1987. «Gene flow and the geographic structure of natural populations». *Science* 236(4803): 787-792.
- Teacher, A; J. Griffiths. 2011. «HapStar: automated haplotype network layout and visualization». *Molecular Ecology Resources*. 11(1): 151-153.
- Tsangaras, K., Avila-Arcos, M. C., Ishida, Y., Helgen, K. M., Roca, A. L., & Greenwood, A. D. 2012. «Historically low mitochondrial DNA diversity in koalas (*Phascolarctos cinereus*)». *BMC Genetics*. 13(1): 92.
- UCLA. Center for Tropical Research and The Conservation Genetics Resource Center. 2015. «Feather Sampling Protocol».
- Van den Berg L, J. Bullock. Clarke, R. R. Langston. Rose, R. 2001. «Territory selection by the Dartford warbler (*Sylvia undata*) in Dorset, England: the role of vegetation type, habitat fragmentation and population size». *Biological Conservation*. 101(2):217-228.
- Vucetich, J. A., & Waite, T. A. 2001. «Spatial patterns of demography and genetic processes across the species' range: null hypotheses for landscape conservation genetics». *Conservation genetics*. 4(5), 639-645.
- Walter, F.G.; U. Stolz, F. Shirazi, J. McNally. 2009. «Epidemiology of severe and fatal rattlesnake bites published in the American Association of Poison Control Centers». *Clinical Toxicology* 47:663-669.
- Waples, R; O. Gaggiotti. 2006. «What is population? An empirical evaluation on some genetic methods for indentifying the number of gene pools and their degree of connectivity». *Molecular Ecology*. 15(6): 1419-1439.

- Wieldon, P. J. 2000. «Avian chemical defense: Toxic Birds not of a feather». *PNAS*. 97(24): 12948-12949.
- Wiegand, T., Revilla, E., & Moloney, K. 2005. «Effects of habitat loss and fragmentation on population dynamics». *Conservation Biology* 19(1):108-121.
- Wildlife Conservation Society. 2014. «*Field Blood Collection and Processing for Health Screening Protocol*». <http://www.iucn-iscg.org/publications/general-publications/1757-2/>. [Fecha de consulta: 09/01/2017].
- Wildlife Conservation Society. 2014. «*Filter paper use*». <http://www.iucn-iscg.org/publications/general-publications/1757-2/>. [Fecha de consulta: 09/01/2017].
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. 1997. «Effect of pH and Ionic Strength on The Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity». *Biotechniques*. 22(3), 474–481.
- Wilsdon, C. 2009. *Animal behavior*. Chelsea House Publishers, Nueva York. 137 págs.
- Wright, S. 1951. «The genetical structure of populations». *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- Wu, C. 2014. «An important player in brine shrimp lethality bioassay: The solvent». *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 5(1): 57–58.
- Wynen, L., Goldsworthy, S. D., Guinet, C., Bester, M. N., Boyd, I. L., Gjertz, I., ... Slade, R. 2000. «Postsealing genetic variation and population structure of two species of fur seal (*Arctocephalus gazella* and *A. tropicalis*)». *Molecular Ecology*. 9(3): 299–314
- Yeates, C., & Gillings, MR., Davison, A. 1998. «Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplifications». *Biological Procedures online*. 1:40-47.
- Yoshimoto, J., & Ariano, D. 2017. «*El bosque estacionalmente seco de Guatemala: flora, fauna y cultura*». ServiPrensa, Guatemala.
- Young, A., T. Boyle y T. Brown. 1996. «The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants». *Trends in Ecology & Evolution*. 11(10):413-418.
- Zarza, E., & Reynoso, V., & Emerson, B. 2011. «Discordant patterns of geographic variation between mitochondrial and microsatellite markers in the Mexican black iguana (*Ctenosaura pectinata*) in a contact zone». *Journal of Biogeography*. 38(7):1394 – 1405.
- Zarza, E., & Reynoso, V.H., & Emerson, B.C. 2008. «Diversification in the northern neotropics: mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of the iguana *Ctenosaura pectinate* and related species». *Molecular Ecology*. 17(14): 3259–3275.
- Zink, R; G. Barrowclough. 2008. «Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography». *Molecular Ecology*. 17(9): 2107-2121.

X. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de sangre periférica de reptiles.

Suplementos

- Jeringas de 1-10cm.
- Alcohol etílico.
- Algodón
- Papel filtro Watman ® FTA.
- Bolsas plásticas: Ziplock.
- Marcador permanente.

Procedimiento

1. Delimitar el área del papel filtro para asegurar obtener una muestra útil.
2. Usar el tamaño adecuado de aguja en jeringa, pequeñas para animales pequeños, a continuación, se presenta una guía de cómo elegir el tamaño adecuado:

Tamaño de reptil	combinación jeringa/aguja
<150g	1ml con 27Gx1/2"
150-200g	1ml con 25Gx5/8"
1-3kg	3ml con 23Gx1"
>3kg	5-10ml con 20Gx1-1/2"
3. Limpiar la cola con alcohol etílico, limpiar el exceso con hisopo o gasa.
4. Insertar la aguja entre las escamas. Para una aproximación lateral hacia la vena de la cola, colocar al animal sobre una superficie plana e insertar la aguja 1/3 hacia un lado de la cola; en caso de tocar hueso, redireccionar la aguja de forma lenta.
5. Recolectar sangre mediante succión; no más del 1% en peso del animal.
6. Colocar la sangre recolectada en papel filtro de forma lenta para evitar formación de burbujas o salpicaduras.
7. Dejar secar el papel filtro con la sangre.
8. Colocar en sobre contenedor y etiquetar debidamente con datos de colecta.
9. Colocar sobre contenedor en bolsa plástica y cerrar sacando la mayor cantidad de aire posible.
10. Almacenar a temperatura ambiente hasta su utilización.

Anexo 2. Licencia de colecta emitida por CONAP a asesor de trabajo de graduación y colaboradores.

Forma LCA

**CONSEJO NACIONAL DE AREAS PROTEGIDAS (CONAP)
GUATEMALA, C.A.**

Serie A Nº 003272

LICENCIA DE COLECTA O APROVECHAMIENTO DE VIDA SILVESTRE

1. Nombre o razón social: Daniel Ariano Sanchez
 Dirección: 15 avenida 1-83 Zona 1
 Teléfono: _____ Identificación: DPI: 2331 73366 0101

2. Tipo de colecta: comercial _____ científica XXX aficionada _____

3. No. de registro: I-010-2004

4. Especies a colectar:

ESPECIES	CANTIDAD	FORMA
Heloderma spp.	30	Vivos y liberados
.....U.L.....		

5. Ubicación de la colecta o aprovechamiento: Zacapa, El Progreso, Nentón, Huehuetenango

6. Número de registro de la propiedad: _____

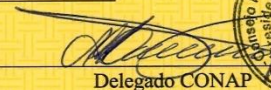

7. Técnicas de colecta autorizadas: Manual por búsqueda en cuevas, los ejemplares serán marcados con chip y liberados

8. Nombre de colector(es) autorizado(s) e identificación: _____
Erick López (1864 60368 1908), Gilberto Salazar (1794 63460 1907)
Johana Gil (2496 41615 0408)

9. Localidad de traspaso de material colectado: _____
Reserva natural Heloderma, El Arenal, Cabañas, Zacapa

Lugar y fecha de emisión: Guatemala, 25 de Abril del 2,016

Válido hasta: Guatemala, 25 de Abril del 2,017

(f) 
 Delegado CONAP 

Forma LCA

CONSEJO NACIONAL DE AREAS PROTEGIDAS (CONAP)
GUATEMALA, C.A.

Serie A Nº 003269

LICENCIA DE COLECTA O APROVECHAMIENTO DE VIDA SILVESTRE

1. Nombre o razón social: Daniel Ariano Sanchez
 Dirección: 15 avenida 1-B3 Zona 1
 Teléfono: _____ Identificación: DPI: 2331 73366 0101
2. Tipo de colecta: comercial _____ científica XXX aficionada _____
3. No. de registro: I-010-2009

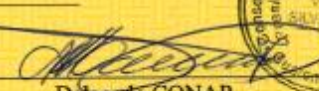
4. Especies a coleccionar:

ESPECIES	CANTIDAD	FORMA
<i>Ctenosaura palearis</i>	10	Vivos y liberados con chip
<i>Ctenosaura palearis</i>	90	Muestras de sangre
<i>Ctenosaura similis</i>	90	Muestras de sangre
<i>Ctenosaura flavidorsalis</i>	30	Muestras de sangre
	111	

5. Ubicación de la colecta o aprovechamiento: _____
Zacapa, El Progreso, Jutapa, Santa Rosa, Huehuetenango
6. Número de registro de la propiedad: _____
7. Técnicas de colecta autorizadas: _____
Manual con caza de captura y red los ejemplares serán liberados luego de muestra de sangre
8. Nombre de colector(es) autorizado(s) e identificación: _____
Gilberto Salazar (1794 63160 1907), Erick López (1864 60366 1908), Johana Gil (2496 41616 0106)
Victor Reynoso (14834512), Gabriela Díez (7868410)
9. Localidad de traspaso de material colectado: _____
Los ejemplares vivos serán liberados en el mismo sitio de colecta

Lugar y fecha de emisión: Guatemala, 22 de Abril del 2,016Válido hasta: Guatemala, 22 de Abril del 2,017

(f)


 Delegado CONAP


Anexo 3. Carta de aprobación para el manejo de animales por parte del Comité de ética para el uso y cuidado de animales de la Universidad del Valle de Guatemala (CEUCA-UVG).



**Comité de Ética, Uso y Cuidado animal de la
Universidad del Valle de Guatemala**

CEUCA - UVG

Departamento de Biología
Investigador Principal: M.Sc. Daniel Ariano Sánchez
E-Mail: dariano@uvg.edu.gt
Teléfono: 5996-0659
Propuesta D-2016(3)

Guatemala, 10 de noviembre de 2016.

Estimado M.Sc. Daniel Ariano,

Por este medio se hace constar que la propuesta del proyecto titulado: *“Genética de la conservación y toxínología de las especies de fauna amenazadas de extinción en el bosque seco del Valle de Motagua”* ha sido revisado por miembros del comité de Ética, para el Uso y Cuidado Animal de la Universidad Del Valle de Guatemala (CEUCA – UVG).

Los evaluadores han hecho sus sugerencias con el fin de asegurar el trato ético y adecuado a los animales que serán utilizados para cumplir con los propósitos de la investigación. Dichas modificaciones han sido realizadas y posteriormente revisadas. Se ha determinado que las mismas cumplen con los requisitos mínimos necesarios, así como también se ha cumplido con los procedimientos y lineamientos descritos por el comité.

Por este medio se le informa que está autorizado para llevar a la práctica tal y como se describe en el protocolo. Esta autorización tiene vigencia de un año a partir de la fecha de la presente carta, por lo que deberá solicitarse renovación al comité si el mismo se extendiera. Se solicita que si hubiese necesidad de hacer modificaciones al protocolo, se comunique de nuevo con el comité para que dichas enmiendas sean evaluadas de manera que se pueda garantizar que se cumple a cabalidad con los lineamientos del CEUCA-UVG.

Sin otro particular quedo a sus órdenes,



MV Vanessa Granados B
Médico Veterinario
Colegiado 997
CEUCA - UVG
Comité de Ética, Uso y Cuidado Animal
Universidad del Valle de Guatemala.

Anexo 4. Protocolo de extracción de ADN con kit comercial GenElute™Mammalian Genomic DNA Miniprep (G1N70).

Protocolo de extracción de ADN a partir de sangre periférica.

1. Colectar la sangre en tubo anticoagulante (tubo con EDTA es preferible).
2. Colocar 20 μ L de solución Proteinasa K en tubos de microcentrífuga de 1.5ml. Agregar 200 μ L de sangre. En caso de tener menos de 200 μ L, resuspender en solución de resuspensión hasta llevar a 200 μ L.
3. Agregar 20 μ L de solución ARNasa A e incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente.
4. Agregar 200 μ L de solución de lisis C (B8803) al tubo y agitar vigorosamente en “vortex” durante 15 segundos. Incubar a 55°C durante 10 minutos.
5. Agregar 500 μ L de solución de preparación de columna a cada columna “GenElute Miniprep Binding Column” (con aro de color rojo). Y centrifugar a 12,000 x g por 1 minuto. Descargar el líquido filtrado.
6. Agregar 200 μ L de etanol (95-100%) al lisado, mezclar vigorosamente en “vortex” durante 5-10 segundos. Una solución homogénea es esencial.
7. Transferir el contenido total del tubo con lisado, a columna pre-ensamblada anteriormente. Usar pipeta con punta de alto calibre para reducir el recorrido del ADN en su transferencia.
8. Centrifugar a $\geq 6,500$ x g por 1 minuto. Descartar el tubo de recolección con líquido filtrado en su interior; y colocar la columna en un nuevo tubo de recolección de 2ml.
9. Diluir solución de lavado concentrado con 80ml de etanol (este procedimiento únicamente se hace la primera vez que se utiliza la solución). Agregar 500 μ L de solución de lavado a la columna y centrifugar por 1 minuto a $\geq 6,500$ x g. Descartar el tubo de recolección con líquido filtrado en su interior; y colocar la columna en un nuevo tubo de recolección de 2ml.
10. Agregar 500 μ L de solución de lavado a la columna y centrifugar por 3 minutos a máxima velocidad (12,000-16,000 x g) para lavar la columna. La columna debe de estar libre de etanol antes de eluir el ADN. Centrifugar 1 minuto más para asegurar que esté libre de etanol. Descartar el tubo de recolección con líquido filtrado en su interior; y colocar la columna en un nuevo tubo de recolección de 2ml.
11. Agregar 200 μ L de solución de elución directamente al centro de la columna; centrifugar 1 minuto a $\geq 6,500$ x g para eluir el ADN. Para aumentar la elución incubar 5 minutos a temperatura ambiente después de agregar la solución de elución y después centrifugar.

Anexo 5. Protocolo de reacción en cadena de polimerasa (PCR) con kit comercial ReadMix™ Taq PCR Reaction Mix (P4600).

1. Agregar los siguientes reactivos en tubos de PCR de 0.2 o 0.5ml, en el orden correspondiente.

Volumen	Reactivo	Concentración final
25 µL	2x ReadyMix Taq PCR Mix reactivo	1.5 unidades Taq ADN polimerasa, 10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1.5mM MgCl ₂ , 0.001% gelatina, 0.2mM dNTP, estabilizador.
1 µL	Oligo sentido	0.1-1.0µM (15-30 bases de longitud)
1 µL	Oligo antisentido	0.1-1.0µM (15-30 bases de longitud)
x µL	Plantilla de ADN	
q.s	Agua	
50 µL		Volumen total

2. Mezclar ligeramente y breve centrifugación para colectar todos los componentes al fondo del tubo.
3. Los parámetros de amplificación deberían de ser optimizados por oligo individual, plantilla y ciclos.

Parámetros comunes de amplificación:

Proceso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	94°C	1 minuto
Anillamiento de cebadores	55°C	2 minutos
Extensión	72°C	3 minutos

25-30 ciclos son recomendados.

4. Los productos de amplificación pueden ser evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa y subsecuente tinción con bromuro de etidio.

Anexo 6. Protocolo de purificación de productos de PCR con kit comercial SpinPrep PCR Clean-up marca Millipore (70976-3).

Antes de utilizar el kit por primera vez reconstituir buffer de lavado “SpinPrep” con 63ml de etanol, luego marcar que ya fue adicionado.

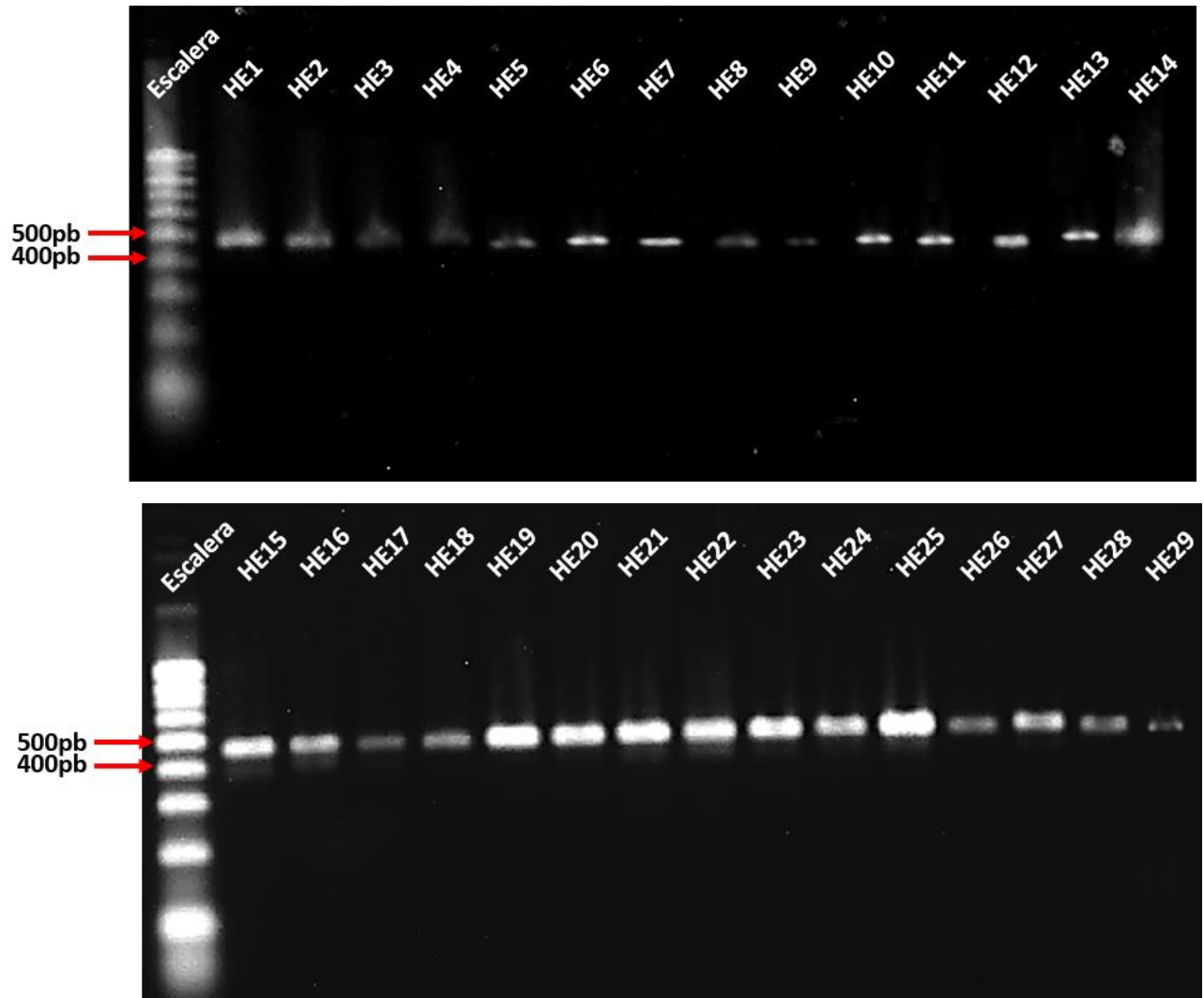
1. Antes de iniciar, colocar el volumen requerido (50-100 μ L por preparación) de “SpinPrep Elution Buffer” (C) a 70°C.
2. Transferir toda la reacción de PCR a tubo de 1.5ml de microcentrífuga. Agregar 4 volúmenes (400 μ L por 100 μ L de reacción de PCR) de “SpinPrep Bind Buffer” (A) y mezclar en “vortex”.
3. Colocar los filtros “SpinPrep PCR” en tubos de recolección de 2ml; transferir la mezcla anterior (paso 2) a filtro y centrifugar a $\geq 10,000$ x g por 1 minuto.
4. Remover la unidad de filtro del tubo de recolección y descartar el lavado.
5. Volver a colocar el filtro en tubo recolector de 2ml y agregar 400 μ L de “SpinPrep Bind Buffer” (A). Centrifugar a $\geq 10,000$ x g por 1 minuto.
6. Remover la unidad de filtro del tubo de recolección y descartar el lavado.
7. Volver a colocar el filtro en tubo recolector de 2ml y agregar 400 μ L de “SpinPrep Wash Buffer” (B). Centrifugar a $\geq 10,000$ x g por 1 minuto.
8. Remover la unidad de filtro del tubo de recolección y descartar el lavado.
9. Volver a colocar el filtro en tubo recolector de 2ml y centrifugar a $\geq 10,000$ x g por 2 minutos, para remover el buffer de lavado completamente.
10. Transferir el filtro al tubo de elución de 1.5ml “SpinPrep Elute”.
11. Agregar 50 μ L de buffer “SpinPrep Elution” (C) precalentado a 70°C, al filtro. Cerrar el tubo e incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente.
12. Inmediatamente centrifugar 1 minuto y recolectar en tubo de elución de productos de PCR.
13. Para maximizar el rendimiento de ADN, realizar una segunda elución (pasos 9-10).

Anexo 7. Datos de colecta de todas las muestras de *H. charlesbogerti* y *C. palearis* en las distintas localidades del Valle de Motagua.

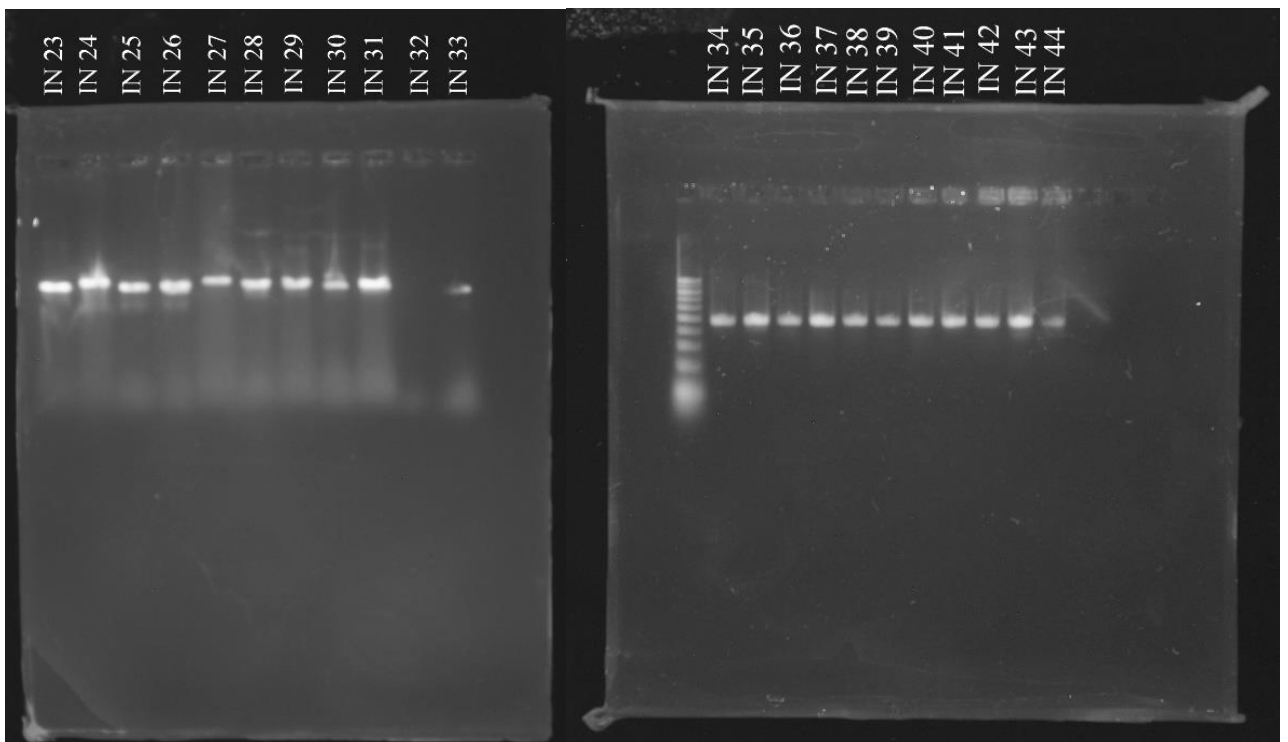
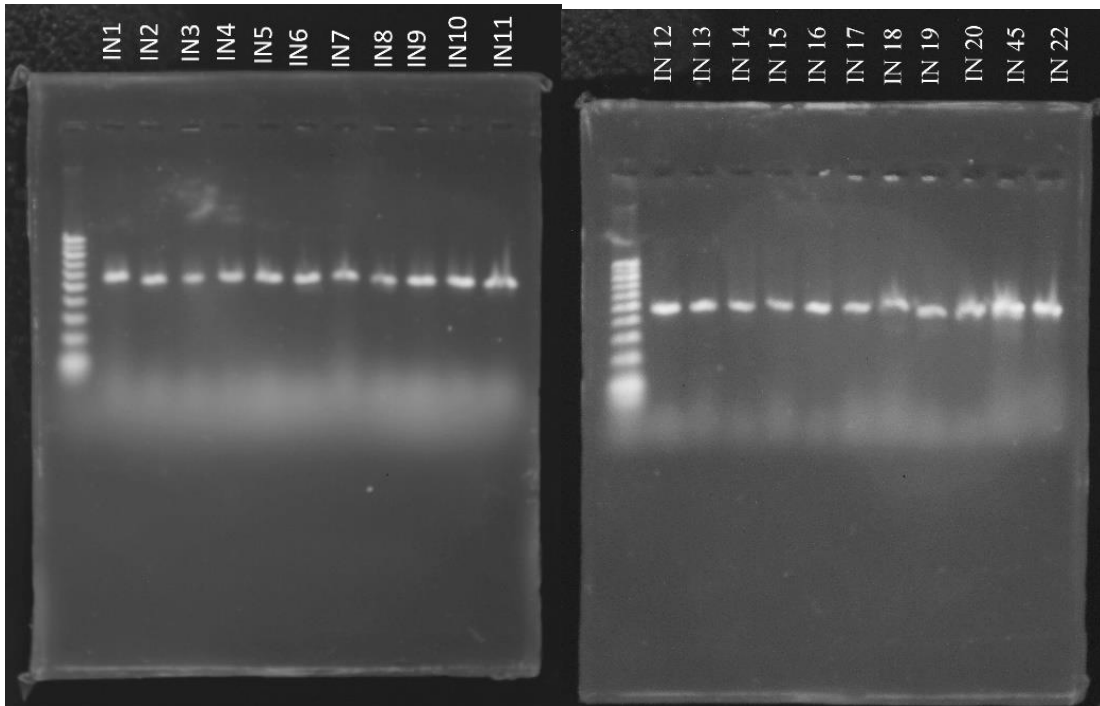
ID	Nombre	No. De chip	Medidas de cabeza (mm)		Medidas de cuerpo (cm)		Lugar	Población	Haplotipo perteneciente
			Ancho	Largo	SVL	TL			
HE2	Jacinto	94579273	55.53	58.97	41.00	29.50	Aldea El Arenal	Cabañas	Central
HE3	Wilfreda	44795824	56.23	62.78	42.50	30.50	Aldea El Arenal	Cabañas	Central
HE4	Xibalbá	----- --	48.19	57.80	36.00	26.50	Aldea El Arenal	Cabañas	Central
HE5	Beto	69786592	48.56	60.18	40.00	29.00	Aldea El Arenal	Cabañas	Occidental
HE6	Rodrigo	-----	46.6	61.37	37.00	28.00	Aldea El Arenal	Cabañas	Central
HE7	Pompilio	69616294	45.85	34.56	38.00	28.30	Aldea Los Encuentros	Los Encuentros-Cabañas	Central
HE8	Yaje	69628043	65.11	47.98	38.00	30.00	Aldea El Arenal	Cabañas	Central
HE9	Rambo	44835048	48.21	57.26	41.00	32.00	Aldea El Arenal	Cabañas	Occidental
HE11	Americo	54873574	62.47	49.05	42.00	31.00	Aldea El Arenal	Cabañas	Central
HE12	Machete	-----	32.90	48.19	25.00	17.00	Aldea El Arenal	Cabañas	Central
HE16	Toffy	54870551	52.78	66.63	38.50	28.00	Aldea El Arenal	Cabañas	Central
HE17	Ericka	44793815	49.86	63.76	39.50	31.50	Aldea El Arenal	Cabañas	Occidental
HE18	Javier	44777575	46.44	53.20	38.00	26.20	Aldea El Arenal	Cabañas	Occidental
HE19	Sandy	-----	48.76	60.05	37.00	26.50	Aldea El Arenal	Cabañas	Oriental
HE20	Cola de shero	-----	31.00	62.00	26.10	19.30	Cabañas, Zacapa	Cabañas	Central
HE10	Mateo	-----	56.69	45.21	36.00	26.30	Aldea El Rosario	El Rosario	Central
HE13	Leoncido	67035616	42.44	53.01	34.00	24.00	Aldea El Rosario	El Rosario	Occidental
HE15	Zarco	69638847	53.64	58.84	40.50	28.00	Aldea El Rosario	El Rosario	Central
HE1	Chata	69623053	51.44	65.16	44.00	30.50	Gualán	Gualán	Central
HE14	Tarzán	44777024	47.96	57.70	39.00	30.00	Gualán	Gualán	Central
HE21	Cabrón	-----	34.77	53.00	32.5	22.00	Gualán	Gualán	Central
HE22	La marash	-----	48.00	67.00	39.3	31.30	Gualán	Gualán	Oriental
HE24	Arquetipo	-----	33.00	49.00	26.9	18.40	Gualán	Gualán	Central
HE24	SM1	-----	66.00	66.00	36.80	26.70	Sanarate, El Progreso	Sanarate	Central
HE25	SM2	-----	49.00	53.00	29.60	20.00	Sanarate, El Progreso	Sanarate	Central
HE26	SM3	-----	53.00	55.00	34.30	24.20	Sanarate, El Progreso	Sanarate	Occidental
HE27	SM4	-----	58.00	68.00	37.20	28.3	Sanarate, El Progreso	Sanarate	Central
HE28	SM6	-----	57.00	63.00	34.60	23.30	Sanarate, El Progreso	Sanarate	Occidental
HE29	SM7	-----					Sanarate, El Progreso	Sanarate	Occidental

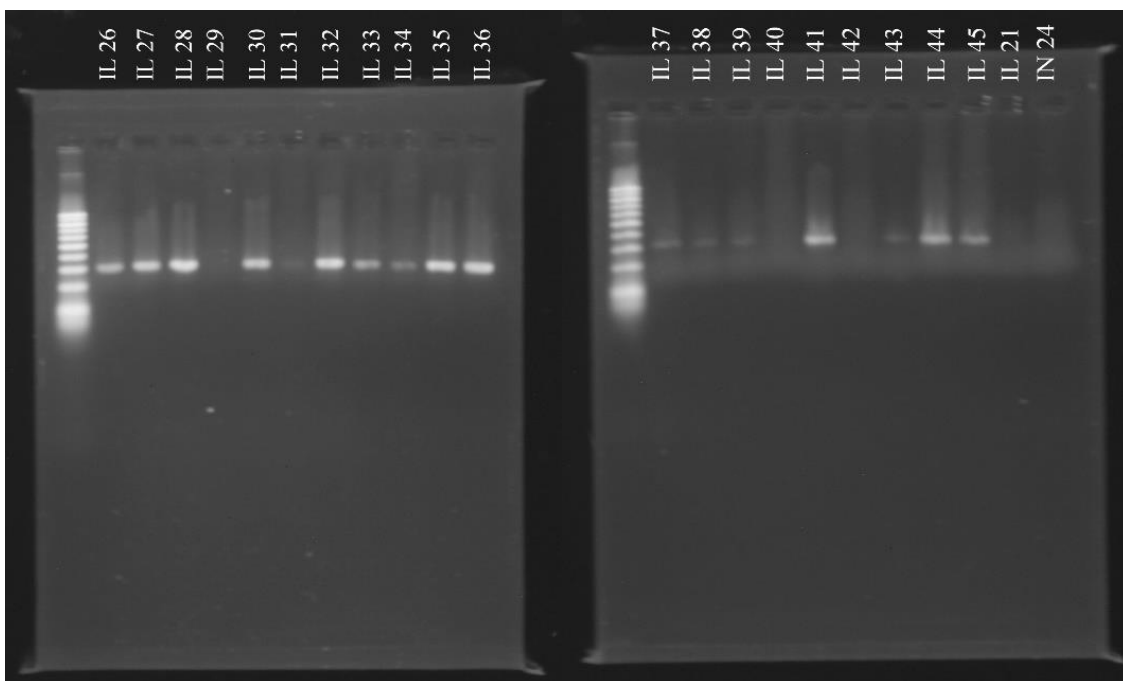
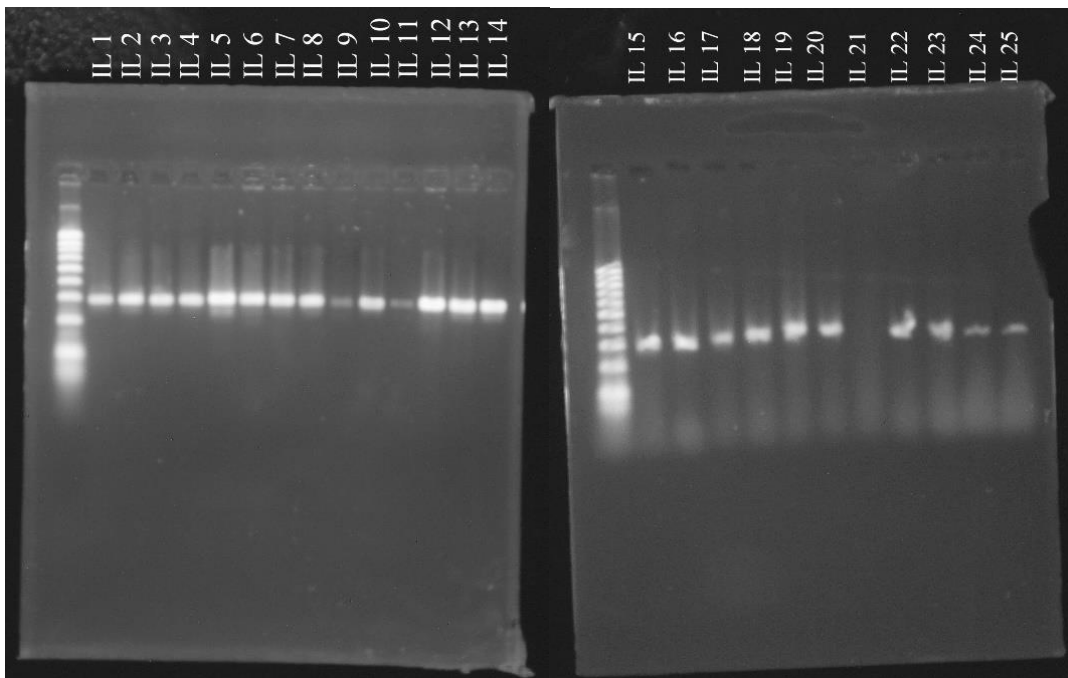
ID	Nombre	Fecha	Lugar	Peso (lb)	Sexo	Medidas de cuerpo (cm)		Medidas de cabeza (mm)		Bolsa gular (machos, cm)	Haplotipo según <i>Nadh4</i>	Haplotipo según <i>LdhA</i>
						SVL	TL	Ancho	Largo			
1	Tuerto	11-ene-17	El Cojonal	0.75	M	20.8	27	32.86	40.5	5.5	Cabañas	Cabañas A
2	Sandra	11-ene-17	El Cojonal	0.5	F	21	26.5	26.55	37.96	----	Cabañas	Cabañas A
3	Teresa	11-ene-17	El Cojonal	0.5	F	17.7	24	20.76	30.71	----	Cabañas	Cabañas A
4	Banano	11-ene-17	El Cojonal	0.5	M	24	30	30.84	41.19	6	Cabañas	Cabañas A
5	Guido	11-ene-17	El Cojonal	1.13	M	18	27	23.77	34.09	5	Cabañas	Cabañas A
6	Chichi	14-ene-17	Cerro Viejo	0.5	F	12.5	19	15.4	25.04	----	Cabañas Sur	Cabañas A
7	Chochi	14-ene-17	Cerro Viejo	0.5	F	12.5	21.5	16.5	25.57	----	Cabañas	Cabañas A
8	Chachi	14-ene-17	Cerro Viejo	0.5	F	15	15.5	19	30.02	----	Cabañas	Cabañas A
9	Luisa	15-ene-17	Cerro Viejo	1.15	F	21	21	25.85	35.08	----	Cabañas	Cabañas B
10	Cheja	15-ene-17	Cerro Viejo	1.12	F	19	28	23.16	33.22	----	Cabañas Sur	Cabañas A
11	-----	16-ene-17	Cerro Viejo	0.75	F	19.5	19.5	24.85	35.92	----	Cabañas Sur	Cabañas A
12	-----	16-ene-17	Cerro Viejo	0.75	M	19	29	26.55	39.23	4	Cabañas	Cabañas A
13	-----	17-ene-17	Cerro Viejo	0.5	M	17.5	27.5	21.53	33.73	3	Cabañas Sur	Cabañas A
14	-----	17-ene-17	Cerro Viejo	0.75	F	19.4	23.5	24	36.42	----	Cabañas	Cabañas A
15	-----	18-ene-17	San Vicente	0.5	M	13.5	17	18.02	28.89	1.7	Cabañas Sur	Cabañas A
16	-----	18-ene-17	San Vicente	0.5	F	13.5	19.5	18.13	27.6	----	Cabañas	Cabañas A
17	Sansón	19-ene-17	El Escondido	1	M	22.5	29	28.1	40.86	5	Cabañas Sur	Cabañas A
18	Aura	20-ene-17	El Escondido	1	F	22.5	22	27.61	41.29	----	Cabañas Sur	Cabañas A
19	-----	20-ene-17	El Escondido	0.5	M	15	24.5	18.31	30.82	2.5	Cabañas Sur	Cabañas A
20	Eustaquio	26-nov-16	Reserva	---	M	17.8	21	22.01	31.87	----	Cabañas Sur	Cabañas A
21	Primarina	26-nov-16	Reserva	---	F	15.7	24.4	19.97	28.82	----	Cabañas Sur	Cabañas A
22	Cavino	26-nov-16	Reserva	---	M	19.5	26.2	35.43	22.59	----	Cabañas	Cabañas A
23	Astilla	18-mar-17	El Jícaro	---	F	17.3	22.6	23	33	----	Cabañas	Cabañas A
24	J. Balvin	18-mar-17	El Jícaro	---	M	24.4	30.4	25	53	6.6	Cabañas	Jícaro
25	----	18-mar-17	El Jícaro	---	F	16.1	24.6	20	33	----	Cabañas	Cabañas A
26	Arenita	1-abr-17	Palo Amontonado	---	F	14.9	19.8	23	34	----	Occidental	Cabañas A
27	Almuerzo	1-abr-17	Gualán	---	F	13.6	22.1	19	31	----	Cabañas Sur	Cabañas A
28	Marcelo	2-abr-17	Gualán	---	M	18.7	26.9	28	39	3.7	Cabañas Sur	Cabañas A
29	Rana	2-abr-17	Gualán	---	F	20.1	43.3	26	45	----	N/A	N/A
30	Carrapiñada	2-abr-17	Gualán	---	M	17.5	17.9	26	39	3.8	Oriental	Cabañas A
31	Precoz	2-abr-17	Gualán	---	M	17.2	23.8	32	37	3.4	Cabañas Sur	Cabañas A
32	Simi	2-abr-17	Gualán	---	F	21.3	16.4	29	48	----	N/A	N/A
33	Elhecho	2-abr-17	Gualán	---	M	20.5	18.1	26	40	2.9	Cabañas Sur	Cabañas A
34	La escéptica	20-may-17	Usumatlán	--	-	15.9	24.2	19.6	31.6	----	Motagua Norte	Motagua A
35	Iguana	20-may-17	Usumatlán	--	-	27.2	36	32.4	50.7	----	Cabañas	Cabañas A
36	Manza	20-may-17	Usumatlán	--	M	22	28.2	27.2	41.7	----	Cabañas	Cabañas A
37	Mambo	20-may-17	Usumatlán	--	-	15.4	22.8	29.7	18.6	----	Cabañas	Cabañas A
38	La chinga	20-may-17	Usumatlán	--	F	21.2	28.4	40.9	26	----	Cabañas	Motagua B
39	Milagro	21-may-17	Usumatlán	--	F	23.1	23.6	40.1	26.2	----	Cabañas	Cabañas A
40	Jak	21-may-17	Usumatlán	--	M	14.9	22.2	27.3	19.1	----	Cabañas	Cabañas A
41	Heloderma	21-may-17	Usumatlán	--	-	18.6	22.9	53.5	38.2	----	Cabañas	Cabañas A
42	La inesperada	21-may-17	Usumatlán	--	-	24.6	32.7	42.9	31.8	----	Cabañas	Cabañas A
43	Cola1	-----	-----	--	-	-----	-----	-----	-----	----	N/A	N/A
44	Cola2	-----	-----	--	-	-----	-----	-----	-----	----	Cabañas	Cabañas A
45	Cola3	-----	-----	--	-	-----	-----	-----	-----	----	Cabañas	Cabañas A

Anexo 8. Geles de agarosa 1.5% con productos purificados de gen *atpasa-6* para *Heloderma charlesbogerti*. Los geles fueron corridos a 90 volts/cm durante 60 minutos.



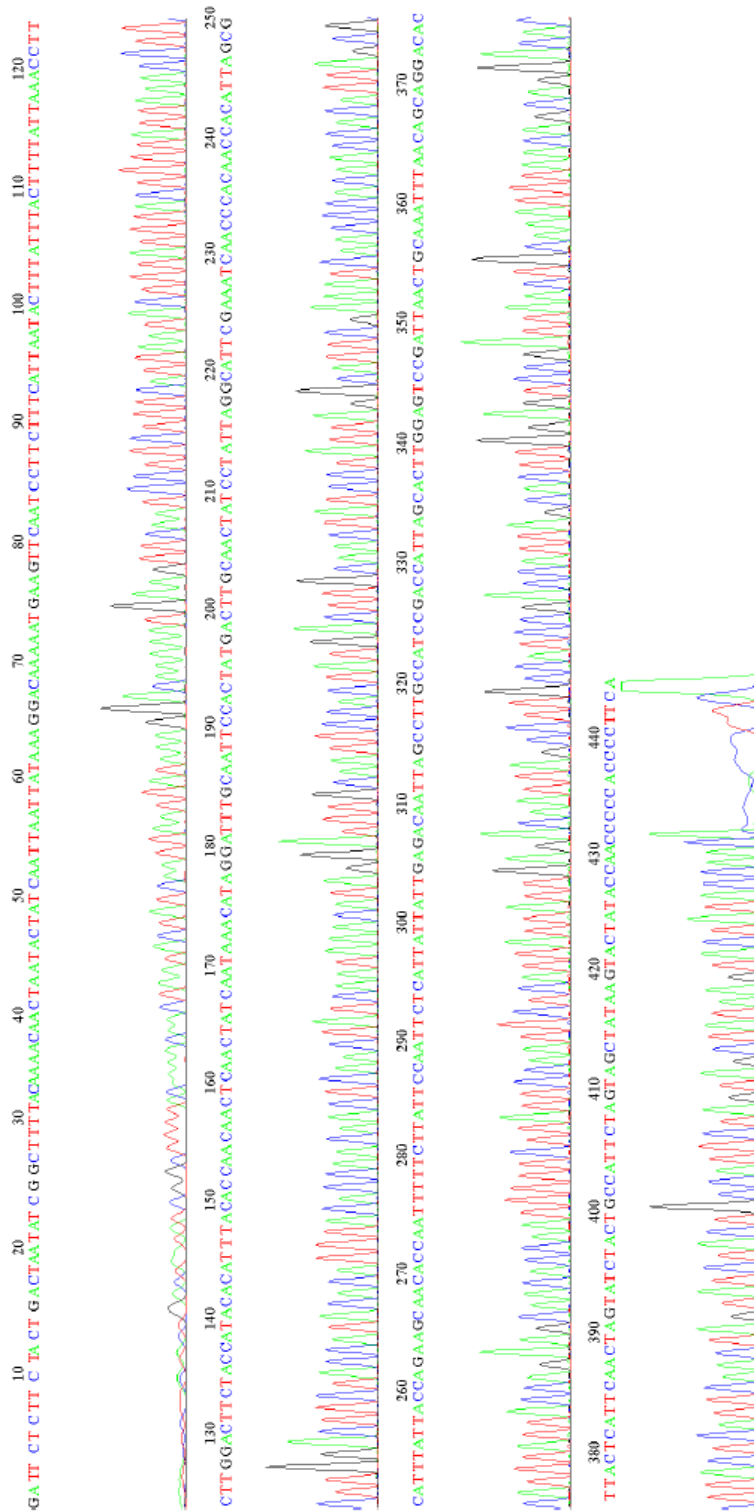
Anexo 9. Geles de agarosa 1.5% con productos purificados de genes *nadh4* y *ladhA* para *Ctenosaura palearis*. Los geles fueron corridos a 90 volts/cm durante 60 minutos.





Anexo 10. Muestra de electroferogramas obtenidas de la secuenciación del producto de PCR correspondiente al gen *atpasa-6* de *H. charlesbogerti*. El producto fue secuenciado por Macrogen, Inc, Corea; mediante secuenciación por método de Sanger.

HE1

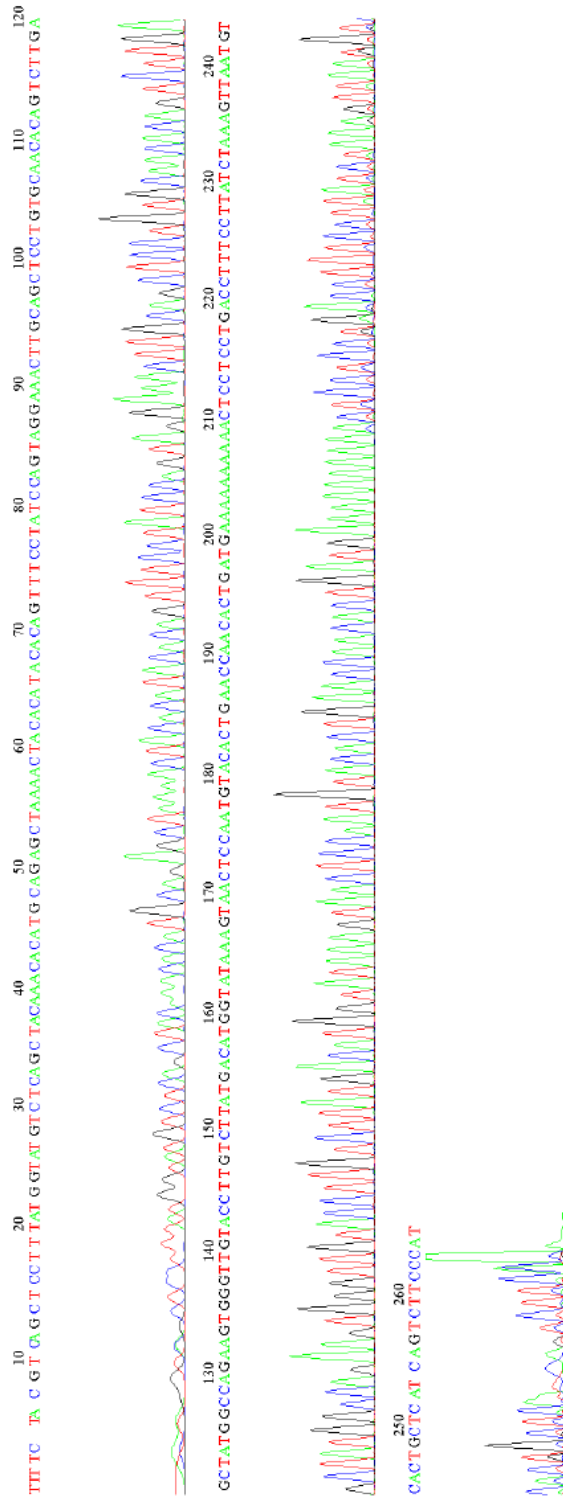


Anexo 12. Muestra de electroferogramas obtenidas de la secuenciación del producto de PCR correspondiente al gen *ladhA* de *C. paleris*. El producto fue secuenciado por Macrogen, Inc, Corea; mediante secuenciación por método de Sanger.

IL1



File: IL1_LaDH-1.ab1 Run Ended: 2017/8/16 22:31:42 Signal G:2192.A:2626 C:3463 T:2769
 Sample: IL1_LaDH-1 Lane: 57 Base spacing: 13.933427 266 bases in 3311 scans Page 1 of 1



Anexo 13. Archivo “.nexus” del gen *atpasa-6* analizado en el programa PopArt para la generación de la red de haplotipos mediante el método de inferencia TCS.

#NEXUS

Begin Data;

Dimensions ntax=26 nchar=448;

Format datatype=DNA missing=N gap=-;

Matrix

HE29 -----

GCTTTTACAAAACAACATACTATCAATTAATTATAAAGGACAAAAATGAAGTTCAATCCT
TCTTTCATTAATACTTTATTTACTTTTATTAACCTTCTTGGACTTCTACCATACACATTTACA
CCAACAACACTCAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCACTATGACTTGCAACTATCCT
ATTAGGCATTTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTTATTACCAGAAGCAACACCAA
TTTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTTGCCATCCGACCATTAGCACT
TGGAGTCCGATTAAGTACTGCAAATTTAACAGCAGGACACTTACTCATTCAACTAGTATCTACTG
CCATTCTAGTAGCTATAAGTACTATACCAACA-ACC-ACCCTTCA-

HE8 -----

GGCTTTTACAAAACAACATACTATCAATTAATTATAAAGGACAAAAATGAAGTTCAATCC
TTCTTTCATTAATACTTTATTTACTTTTATTAACCTTCTTGGACTTCTACCATACACATTTAC
ACCAACAACACTCAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCACTATGACTTGCAACTATCC
TATTAGGCATTTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTTATTACCAGAAGCAACACCA
ATTTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTTGCCATCCGACCATTAGCA
CTTGGAGTCCGATTAAGTACTGCAAATTTAACAGCAGGACACTTACTCATTCAACTAGTATCTAC
TGCCATTCTAGTAGCTATAAGTACTATACCAACA-CCC-ACCCT----

HE28 -----

CGGCTTTTACAAAACAACATACTATCAATTAATTATAAAGGACAAAAATGAAGTTCAATC
CTTCTTTCATTAATACTTTATTTACTTTTATTAACCTTCTTGGACTTCTACCATACACATTTA
CACCAACAACACTCAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCACTATGACTTGCAACTATC
CTATTAGGCATTTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTTATTACCAGAAGCAACACC
AATTTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTTGCCATCCGACCATTAGC
ACTTGGAGTCCGATTAAGTACTGCAAATTTAACAGCAGGACACTTACTCATTCAACTAGTATCTA
CTGCCATTCTAGTAGCTATAAGTACTATACCAACA-ACC-ACCCT----

HE26 -----

CGGCTTTTACAAAACAACATACTATCAATTAATTATAAAGGACAAAAATGAAGTTCAATC
CTTCTTTCATTAATACTTTATTTACTTTTATTAACCTTCTTGGACTTCTACCATACACATTTA
CACCAACAACACTCAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCACTATGACTTGCAACTATC
CTATTAGGCATTTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTTATTACCAGAAGCAACACC
AATTTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTTGCCATCCGACCATTAGC
ACTTGGAGTCCGATTAAGTACTGCAAATTTAACAGCAGGACACTTACTCATTCAACTAGTATCTA
CTGCCATTCTAGTAGCTATAAGTACTATACCAACA-ACC-ACCCT----

HE25 -----

CTTATACTGACTAATATCGGCTTTTACAAAACAACATACTATCAATTAATTATAAAGGAC
AAAAATGAAGTTCAATCCTTCTTTCATTAATACTTTATTTACTTTTATTAACCTTCTTGGACT
TCTACCATACACATTTACACCAACAACACTCAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCAC
TATGACTTGCAACTATCCTATTAGGCATTTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTTA
TTACCAGAAGCAACACCAATTTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTT
GCCATCCGACCATTAGCACTTGGAGTCCGATTAAGTACTGCAAATTTAACAGCAGGACACTTACT
CATTCAACTAGTATCTACTGCCATTCTAGTAGCTATAAGTACTATACCAAC--
CCCCACCCCT--

HE7 -----

CTGACTAATATCGGCTTTTACAAAACAACACTAATACTATCAATTAATTATAAAGGACAAAAAT
 GAAGTTCAATCCTTCTTTTCATTAATACTTTATTTACTTTTATTAAACCTTCTTGACTTCTACC
 ATACACATTTACACCAACAACACTCAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCTACTATGAC
 TTGCAACTATCCTATTAGGCATTTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTATTACCA
 GAAGCAACACCAATTTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTTGCCATC
 CGACCATTAGCACTTGGAGTCCGATTAACTGCAAATTTAACAGCAGGACACTTACTCATTCA
 ACTAGTATCTACTGCCATTCTAGTAGCTATAAGTACTATACCAACACCCCCACCCCTTCA

HE24 -----

GACTAATATCGGCTTTTACAAAACAACACTAATACTATCAATTAATTATAAAGGACAAAAATGA
 AGTTCAATCCTTCTTTTCATTAATACTTTATTTACTTTTATTAAACCTTCTTGACTTCTACCAT
 ACACATTTACACCAACAACACTCAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCTACTATGACTT
 GCAACTATCCTATTAGGCATTTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTATTACCAGA
 AGCAACACCAATTTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTTGCCATCCG
 ACCATTAGCACTTGGAGTCCGATTAACTGCAAATTTAACAGCAGGACACTTACTCATTCAAC
 TAGTATCTACTGCCATTCTAGTAGCTATAAGTACTATACCAAC-CCCCAACCCCTT--

HE23 -----

CTGACTAATATCGGCTTTTACAAAACAACACTAATACTATCAATTAATTATAAAGGACAAAAAT
 GAAGTTCAATCCTTCTTTTCATTAATACTTTATTTACTTTTATTAAACCTTCTTGACTTCTACC
 ATACACATTTACACCAACAACACTCAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCTACTATGAC
 TTGCAACTATCCTATTAGGCATTTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTATTACCA
 GAAGCAACACCAATTTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTTGCCATC
 CGACCATTAGCACTTGGAGTCCGATTAACTGCAAATTTAACAGCAGGACACTTACTCATTCA
 ACTAGTATCTACTGCCATTCTAGTAGCTATAAGTACTATACCAAC--CCCAACCCCT---

HE22 -----

GACTAATATCGGCTTTTACAAAACAACACTAATACTATCAATTAATTATAAAGGACAAAAATGA
 AGTTCAATCCTTCTTTTCATTAATACTTTATTTACTTTTATTAAACCTTCTTGACTTCTACCAT
 ACACATTTACACCAACAACACTCAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCTACTATGACTT
 GCAACTATCCTATTAGGCATTTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTATTACCAGA
 AGCAACACCAATTTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTTGCCATCCG
 ACCATTAGCACTTGGAGTCCGATTAACTGCAAATTTAACAGCAGGACACTTACTCATTCAAC
 TAGTATCTACTGCCATTCTAGTAGCTATAAGTACTATACCAACCCCCACCCCTTT-

HE21

ACCTCCTTTAATACTGACTAATATCGGCTTTTACAAAACAACACTAATACTATCAATTA
 ATTATAAAGGACAAAAATGAAGTTCAATCCTTCTTTTCATTAATACTTTATTTACTTTTATTAA
 ACCTTCTTGACTTCTACCATACACATTTACACCAACAACACTCAACTATCAATAAACATAGGA
 TTTGCAATTCCTACTATGACTTGCACACTATCCTATTAGGCATTTCGAAATCAACCCACAACCAC
 ATTAGCGCATTATTACCAGAAGCAACACCAATTTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGA
 GACAATTAGCCTTGCCATCCGACCATTAGCACTTGGAGTCCGATTAACTGCAAATTTAACAG
 CAGGACACTTACTCATTCAACTAGTATCTACTGCCATTCTAGTAGCTATAAGTACTATACCAA
 CA-CCC-ACCCTTCCA

HE20 -----

GACTAATATCGGCTTTTACAAAACAACACTAATACTATCAATTAATTATAAAGGACAAAAATGA
 AGTTCAATCCTTCTTTTCATTAATACTTTATTTACTTTTATTAAACCTTCTTGACTTCTACCAT
 ACACATTTACACCAACAACACTCAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCTACTATGACTT
 GCAACTATCCTATTAGGCATTTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTATTACCAGA
 AGCAACACCAATTTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTTGCCATCCG
 ACCATTAGCACTTGGAGTCCGATTAACTGCAAATTTAACAGCAGGACACTTACTCATTCAAC
 TAGTATCTACTGCCATTCTAGTAGCTATAAGTACTATACCAACA-CCC-ACCC-----

HE19 -----

CTGACTAATATCGGCTTTTACAAAACAACACTAATACTATCAATTAATTATAAAGGACAAAAAT
 GAAGTTCAATCCTTCTTTTCATTAATACTTTATTTACTTTTATTAAACCTTCTTGACTTCTACC

ATACACATTTACACCAACAACACTCAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCACTATGAC
 TTGCAACTATCCTATTAGGCATTTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTATTACCA
 GAAGCAACACCAATTTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTTGCCATC
 CGACCATTAGCACTTGGAGTCCGATTAAGTACTATAACAGCAGGACACTTACTCATTCA
 ACTAGTATCTACTGCCATTCTAGTAGCTATAAGTACTATAACCAACCCCCCCCCCTT---

HE18 -----

CGGCTTTTACAAAACAACACTAATACTATCAATTAATTATAAAGGACAAAAATGAAGTTCAATC
 CTCTTTTCATTAATACTTTATTTACTTTTATTAACCTTCTTGGACTTCTACCATACACATTTA
 CACCAACAACACTCAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCACTATGACTTGCAACTATC
 CTATTAGGCATTTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTATTACCAGAAGCAACACC
 AATTTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTTGCCATCCGACCATTAGC
 ACTTGGAGTCCGATTAAGTACTATAACAGCAGGACACTTACTCATTCAACTAGTATCTA
 CTGCCATTCTAGTAGCTATAAGTACTATAACCAACA-ACC-ACCCT----

HE17 -----

CAAAACAACACTAATACTATCAATTAATTATAAAGGACAAAAATGAAGTTCAATCCTTCTTTCA
 TTAATACTTTATTTACTTTTATTAACCTTCTTGGACTTCTACCATACACATTTACACCAACAA
 CTCAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCACTATGACTTGCAACTATCCTATTAGGC
 ATTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTATTACCAGAAGCAACACCAATTTTTCT
 TATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTTGCCATCCGACCATTAGCACTTGGAGT
 CCGATTAAGTACTATAACAGCAGGACACTTACTCATTCAACTAGTATCTACTGCCATTCT
 AGTAGCTATAAGTACTATAACCAACA-ACC-ACCCT----

HE16 -----

GACTAATATCGGCTTTTACAAAACAACACTAATACTATCAATTAATTATAAAGGACAAAAATGA
 AGTTCAATCCTTCTTTTCATTAATACTTTATTTACTTTTATTAACCTTCTTGGACTTCTACCAT
 ACACATTTACACCAACAACACTCAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCACTATGACTT
 GCAACTATCCTATTAGGCATTTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTATTACCAGA
 AGCAACACCAATTTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTTGCCATCCG
 ACCATTAGCACTTGGAGTCCGATTAAGTACTATAACAGCAGGACACTTACTCATTCAAC
 TAGTATCTACTGCCATTCTAGTAGCTATAAGTACTATAACCAACA-CCC-ACCCT----

HE15 -----

CTTTCTACTGACTAATATCGGCTTTTACAAAACAACACTAATACTATCAATTAATTATAAAGGAC
 AAAAATGAAGTTCAATCCTTCTTTTCATTAATACTTTATTTACTTTTATTAACCTTCTTGGACT
 TCTACCATACACATTTACACCAACAACACTCAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCAC
 TATGACTTGCAACTATCCTATTAGGCATTTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTTA
 TTACCAGAAGCAACACCAATTTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTT
 GCCATCCGACCATTAGCACTTGGAGTCCGATTAAGTACTATAACAGCAGGACACTTACT
 CATTCAACTAGTATCTACTGCCATTCTAGTAGCTATAAGTACTATAACCAACA-CCC-ACCCT----

HE14 -----

GACTAATATCGGCTTTTACAAAACAACACTAATACTATCAATTAATTATAAAGGACAAAAATGA
 AGTTCAATCCTTCTTTTCATTAATACTTTATTTACTTTTATTAACCTTCTTGGACTTCTACCAT
 ACACATTTACACCAACAACACTCAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCACTATGACTT
 GCAACTATCCTATTAGGCATTTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTATTACCAGA
 AGCAACACCAATTTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTTGCCATCCG
 ACCATTAGCACTTGGAGTCCGATTAAGTACTATAACAGCAGGACACTTACTCATTCAAC
 TAGTATCTACTGCCATTCTAGTAGCTATAAGTACTATAACCAACA-CCC-ACCC-----

HE13 -----

ATCGGCTTTTACAAAACAACACTAATACTATCAATTAATTATAAAGGACAAAAATGAAGTTCAA
 TCCTTCTTTTCATTAATACTTTATTTACTTTTATTAACCTTCTTGGACTTCTACCATACACATT
 TACACCAACAACACTCAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCACTATGACTTGCAACTA
 TCCTATTAGGCATTTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTATTACCAGAAGCAACA
 CCAATTTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTTGCCATCCGACCATTA

GCACTTGGAGTCCGATTAAGTACTATAAGTACTATAACCAACA-ACCCACCCT----

HE11 -----

GACTAATATCGGCTTTTACAAAACAACCTAATACTATCAATTAATTATAAAGGACAAAAATGA
AGTTCAATCCTTCTTTTACATTAATACTTTATTTACTTTTATTAAACCTTCTTGGACTTCTACCAT
ACACATTTACACCAACAACCTCAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCACTATGACTT
GCAACTATCCTATTAGGCATTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTTATTACCAGA
AGCAACACCAATTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTTGCCATCCG
ACCATTAGCACTTGGAGTCCGATTAAGTACTATAAGTACTATAACCAACA-CCC-ACCCT----

HE9 -----

TATTCGGCTTTTACAAAACAACCTAATACTATCAATTAATTATAAAGGACAAAAATGAAGTTC
AATCCTTCTTTTACATTAATACTTTATTTACTTTTATTAAACCTTCTTGGACTTCTACCATACACA
TTTACACCAACAACCTCAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCACTATGACTTGCAAC
TATCCTATTAGGCATTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTTATTACCAGAAGCAA
CACCAATTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTTGCCATCCGACCATT
AGCACTTGGAGTCCGATTAAGTACTATAAGTACTATAACCAACA-ACC-ACCCT----

HE6 -----

GACTAATATCGGCTTTTACAAAACAACCTAATACTATCAATTAATTATAAAGGACAAAAATGA
AGTTCAATCCTTCTTTTACATTAATACTTTATTTACTTTTATTAAACCTTCTTGGACTTCTACCAT
ACACATTTACACCAACAACCTCAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCACTATGACTT
GCAACTATCCTATTAGGCATTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTTATTACCAGA
AGCAACACCAATTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTTGCCATCCG
ACCATTAGCACTTGGAGTCCGATTAAGTACTATAAGTACTATAACCAACA--CCCCACCCT----

HE5 -----

GGCTTTTACAAAACAACCTAATACTATCAATTAATTATAAAGGACAAAAATGAAGTTCAATCC
TTCTTTTACATTAATACTTTATTTACTTTTATTAAACCTTCTTGGACTTCTACCATACACATTTAC
ACCAACAACCTCAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCACTATGACTTGCAACTATCC
TATTAGGCATTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTTATTACCAGAAGCAACACCA
ATTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTTGCCATCCGACCATTAGCA
CTTGGAGTCCGATTAAGTACTATAAGTACTATAACCAACA-ACCCACCCT----

HE4 -----

ATCGGCTTTTACAAAACAACCTAATACTATCAATTAATTATAAAGGACAAAAATGAAGTTCAA
TCCTTCTTTTACATTAATACTTTATTTACTTTTATTAAACCTTCTTGGACTTCTACCATACACATT
TACACCAACAACCTCAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCACTATGACTTGCAACTA
TCCTATTAGGCATTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTTATTACCAGAAGCAACA
CCAATTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTTGCCATCCGACCATTA
GCACTTGGAGTCCGATTAAGTACTATAAGTACTATAACCAACA-CCC-ACCCT----

HE3 -----

TGACTAATATCGGCTTTTACAAAACAACCTAATACTATCAATTAATTATAAAGGACAAAAATGA
AAGTTCAATCCTTCTTTTACATTAATACTTTATTTACTTTTATTAAACCTTCTTGGACTTCTACCA
TACACATTTACACCAACAACCTCAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCACTATGACT
TGCAACTATCCTATTAGGCATTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTTATTACCAG
AAGCAACACCAATTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTTGCCATCC
GACCATTAGCACTTGGAGTCCGATTAAGTACTATAAGTACTATAACCAACA-CCCCACCCT---

HE2 -----
 GACTAATATCGGCTTTTACAAAACAACATAACTATCAATTAATTATAAAGGACAAAAATGA
 AGTTCAATCCTTCTTTTATTAACTTTTACTTTTATTAAACCTTCTTGGACTTCTACCAT
 ACACATTTACACCAACAACATAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCTACTATGACTT
 GCAACTATCCTATTAGGCATTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTATTACCAGA
 AGCAACACCAATTTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTTGCCATCCG
 ACCATTAGCACTTGGAGTCCGATTAACACTGCAAATTTAACAGCAGGACACTTACTCATTCAAC
 TAGTATCTACTGCCATTCTAGTAGCTATAAGTACTATACCAACA-CCC-ACCCT----

HE1 -----
 CTGACTAATATCGGCTTTTACAAAACAACATAACTATCAATTAATTATAAAGGACAAAAAT
 GAAGTTCAATCCTTCTTTTATTAACTTTTACTTTTATTAAACCTTCTTGGACTTCTACC
 ATACACATTTACACCAACAACATAACTATCAATAAACATAGGATTTGCAATTCCTACTATGAC
 TTGCAACTATCCTATTAGGCATTCGAAATCAACCCACAACCACATTAGCGCATTATTACCA
 GAAGCAACACCAATTTTTCTTATTCCAATTCTCATTATTATTGAGACAATTAGCCTTGCCATC
 CGACCATTAGCACTTGGAGTCCGATTAACACTGCAAATTTAACAGCAGGACACTTACTCATTCA
 ACTAGTATCTACTGCCATTCTAGTAGCTATAAGTACTATACCAAC--CCCCACCCCTTC-

;

End;

Begin Traits;

Dimensions NTraits=4;

Format labels=yes missing=? separator=Comma;

TraitLatitude 14.87 14.8232 14.8618 15.0899;

TraitLongitude -89.8257 -90.2897 -89.7851 -89.3048;

TraitLabels ElRosario Sanarate Cabanas Gualan;

Matrix

HE29 0,1,0,0

HE8 0,0,1,0

HE28 0,1,0,0

HE26 0,1,0,0

HE25 0,1,0,0

HE7 0,0,1,0

HE24 0,1,0,0

HE23 0,0,0,1

HE22 0,0,0,1

HE21 0,0,0,1

HE20 0,0,1,0

HE19 0,0,1,0

HE18 0,0,1,0

HE17 0,0,1,0

HE16 0,0,1,0

```

HE15 1,0,0,0
HE14 0,0,0,1
HE13 1,0,0,0
HE11 0,0,1,0
HE9 0,0,1,0
HE6 0,0,1,0
HE5 0,0,1,0
HE4 0,0,1,0
HE3 0,0,1,0
HE2 0,0,1,0
HE1 0,0,0,1
;
End;
Begin Network;
Dimensions ntax=3 nvertices=3 nedges=2 plotDim=-100.833,0,701.328,439.265;
Format      Font=Baskerville,10,-1,5,50,0,0,0,0      LegendFont=Baskerville,10,-1,5,50,0,0,0,0
VColour=#000000ff  EColour=#000000ff  BGColour=#00000000  VSize=15  EView=Dashes
LPos=485.995,255.331
LColours=#ff0000ff,#37c837ff,#660080ff,#ffcc00ff,#ff00ccff,#aa0000ff,#5500d4ff,#ff0066ff,#d7ff2aff,#
00ccffff;
Translate
1 HE29,
2 HE8,
3 HE22,
;
Vertices
1 -2.00519 168.098,
2 199.983 193.279,
3 455.865 171.15,
;
VLabels
1 -31.0052 168.098,
2 177.983 193.279,
3 426.865 171.15,
;
Edges

```

1 0 1 1,

2 1 2 1,

;

End;

Anexo 14. Archivo “.nexus” del gen *nadh4* analizado en el programa PopArt para la generación de la red de haplotipos mediante el método de inferencia TCS

NEXUS

Begin Data;

Dimensions ntax=45 nchar=453;

Format datatype=DNA missing=N gap=-;

Matrix

IN1_ND4 -----ACCTAAA-
 TCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTAATCCA
 AACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATCCTCCA
 TATTGTTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCTAATCCTAGCA
 CGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTAACCAA
 CATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACTTTTCA
 ACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTTACTCA
 CTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCACCTTCACAT-----

IN2_ND4 -----
 ACCTAAAATCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGC
 CTAATCCAAACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAAC
 ATCCTCCATATTGTTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCTAA
 TCCTAGCACGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACC
 TAACCAACATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCA
 CTTTTCAACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATT
 TACTACTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCACCTTCACATCATCCCC---

IN3_ND4 -----
 ACCTAAAATCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGC
 CTAATCCAAACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAAC
 ATCCTCCATATTGTTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCTAA
 TCCTAGCACGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACC
 TAACCAACATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCA
 CTTTTCAACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATT
 TACTACTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCACCTTCACATCATACCCAC
 AAGACCA---

IN4_ND4 -----
 ACCTAAAATCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGC
 CTAATCCAAACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAAC
 ATCCTCCATATTGTTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCTAA
 TCCTAGCACGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACC
 TAACCAACATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCA
 CTTTTCAACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATT
 TACTACTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCACCTTCAC-----

IN5_ND4 -----
 CACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTAATCCAA
 ACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATCCTCCAT
 ATTGTTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCTAATCCTAGCAC
 GGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTAACCAAC
 ATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACTTTTCAA

CTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTTACTCAC
TACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCACCTTCACATCATCCCCACAGA-----

IN6_ND4 -----

CTAAATCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTA
ATCCAAACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATC
CTCCATATTATTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCCTAATCC
TAGCACGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTA
ACCAACATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACT
TTTCAACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTT
ACTCACTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCACCTTCACA-----

IN7_ND4 -----

CTAAAATCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCT
AATCCAAACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACAT
CCTCCATATTGTTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCCTAATC
CTAGCACGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCT
AACCAACATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCAC
TTTTCAACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTT
ACTCACTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCACCTTCACATCATCCCCACC
AGA-----

IN8_ND4 ---

ACAGACCTAAAATCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGC
ATGCCTAATCCAAACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCC
TAACATCCTCCATATTGTTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCC
CTAATCCTAGCACGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCC
AACCTAACCAACATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTC
CGCACTTTTCAACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAG
CCATTTACTCACTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCACCTTCACATCATC
CCCAAC-----

IN9_ND4 -----GACCTAAA-

TCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTAATCCA
AACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATCCTCCA
TATTGTTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCCTAATCCTAGCA
CGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTAACCAA
CATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACTTTTCA
ACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTTACTCA
CTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCACCTTCAC-----

IN10_ND4 -----

ACCTAAAATCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGC
CTAATCCAAACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAAC
ATCCTCCATATTATTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCCTAA
TCCTAGCACGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACC
TAACCAACATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCA
CTTTTCAACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATT
TACTCACTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCACCTTCAC-----

IN11_ND4 -----

AATCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTAATC
CAAACCTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATCCTC
CATATTATTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCCTAATCCTAG
CACGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTAAC
AACATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACTTTT
CAACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTTACT
CACTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCACCTTCACATCAC-----

IN12_ND4 -----CTAAA-
 TCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTAATCCA
 AACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATCCTCCA
 TATTGTTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCTAATCCTAGCA
 CGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTAACCAA
 CATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACTTTTCA
 ACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTTACTCA
 CTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCCTTCACA-----

IN13_ND4 -----
 CACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTAATCCAA
 ACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATCCTCCAT
 ATTATTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCTAATCCTAGCAC
 GGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTAACCAAC
 ATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACTTTTCAA
 CTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTTACTCAC
 TACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCCTTCACATCATACCCACAGACCC
 AAA

IN14_ND4 -----
 TCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTAATCCA
 AACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATCCTCCA
 TATTGTTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCTAATCCTAGCA
 CGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTAACCAA
 CATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACTTTTCA
 ACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTTACTCA
 CTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCCTTCACAT-----

IN15_ND4 -----
 CTAAATCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTA
 ATCCAAACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATC
 CTCCATATTATTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCTAATCC
 TAGCACGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTA
 ACCAACATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACT
 TTTCAACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTT
 ACTCACTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCCTTCACATCATC-----
 --

IN16_ND4 -----
 TAAAATCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTA
 ATCCAAACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATC
 CTCCATATTGTTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCTAATCC
 TAGCACGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTA
 ACCAACATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACT
 TTTCAACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTT
 ACTCACTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCCTTCACATC-----

IN17_ND4 -----
 ACCTAAATCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCC
 TAATCCAAACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACA
 TCCTCCATATTATTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCTAAT
 CCTAGCACGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCT
 AACCAACATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCAC
 TTTTCAACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTT
 ACTCACTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCCTTCACATCATCCCCAAC
 AGACCA---

IN18_ND4 -----
 ACCTAAAATCTACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGC
 CTAATCCAAACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAAC
 ATCCTCCATATTATTTGCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCCTAA
 TCCTAGCACGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACC
 TAACCAACATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCA
 CTTTTCAACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATT
 TACTACTACACATATTCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCACCTTCACAT-----

IN19_ND4 -----
 CACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTAATCCAA
 ACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATCCTCCAT
 ATTATTTGCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCCTAATCCTAGCAC
 GGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTAACCAAC
 ATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACTTTTCAA
 CTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTTACTCAC
 TACACATATTCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCACCTTCACATCAC-----

IN20_ND4 -----
 TCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTAATCCA
 AACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATCCTCCA
 TATTATTTGCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCCTAATCCTAGCA
 CGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTAACCAA
 CATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACTTTTCA
 ACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTTACTCA
 CTACACATATTCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCACCTTCACATCA-----

IN21_ND4 -----
 ATCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTAATCC
 AAATCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATCCTCC
 ATATTATTTGCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCCTAATCCTAGC
 ACGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTAACCA
 ACATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACTTTTC
 AACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTTACTC
 ACTACACATATTCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCACCTTCACAT-----

IN22_ND4 -----
 CTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTAATCCAAAC
 TCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATCCTCCATAT
 TGTTTTGCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCCTAATCCTAGCACGG
 GGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTAACCAACAT
 AGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACTTTTCAACT
 GATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTTACTACTA
 CACATATTCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCACCTTCACATCATCCCC-ACAG-----

IN23_ND4 -----
 CTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTAATCCAAAC
 TCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATCCTCCATAT
 TGTTTTGCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCCTAATCCTAGCACGG
 GGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTAACCAACAT
 AGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACTTTTCAACT
 GATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTTACTACTA
 CACATATTCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCACCTTCACATCATCCCCACAG-----

IN24_ND4 -----ACCTAAA-
 TCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTAATCCA
 AACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATCCTCCA
 TATTGTTTTGCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCCTAATCCTAGCA

CGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTAACCAA
 CATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACTTTTCA
 ACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTTACTCA
 CTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCCTTCACATCATC-----

IN25_ND4 -----ACCTAAA-
 TCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTAATCCA
 AACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATCCTCCA
 TATTGTTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCTAATCCTAGCA
 CGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTAACCAA
 CATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACTTTTCA
 ACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTTACTCA
 CTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCCTTCACATC-----

IN26_ND4 -----
 CTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTAATCCAAAC
 TCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATCCTCCATAT
 TATTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCTAATCCTAGCACGG
 GGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAGCCTAACCAACAT
 AGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACTTTTCAACT
 GATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTTACTCACTA
 CACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCCTTCACATCATCCCCAACAGACCA--

IN27_ND4 -----
 TCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTAATCCA
 AACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATCCTCCA
 TATTATTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCTAATCCTAGCA
 CGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTAACCAA
 CATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACTTTTCA
 ACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTTACTCA
 CTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCCTTCACATCATCCCCT-
 CCAGACCA--

IN28_ND4 -----
 CTAAAATCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCT
 AATCCAAACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACAT
 CCTCCATATTATTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCTAATC
 CTAGCACGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCT
 AACCAACATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCAC
 TTTTCAACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTT
 ACTCACTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCCTTCACATCACCCCACAG
 ACCA-----

IN29_ND4 -----
 CACTAATCGCTTACTCATCAGTAAGCCACATAGGACTAGTCATTGCTGCATGTCTCATCCAA
 ACACCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATTGCCCATGGCCTAACCTCCTCTAT
 ATTATTCTGTTTGGCCAATACTAACTACGAACGAACCCACACCCGAACCCTAATCTTAGCCC
 GCGGCTTCCAAACTATCCTACCCCTAATAACTACCTGATGGCTCCTTGCCAACCTAACCAAC
 ATAGCACTACCCCAACCATTAACCTAATAGGTGAACTTACAATTATCTCCGCACTTTTCAA
 CTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACTGGATTAGGCACCCTCATTACAGCCATCTACTCAC
 TACACATATTTCTAATAACACAACGAAACAAACTCCCCTTCACATCATCCCCACAGA-----

IN30_ND4 -----
 ACGACCTAAATCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCAT
 GCCTAATCCAAACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTA
 ACATCCTCCATATTATTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCT
 AATCCTAGCCCGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCA
 ACCTAACCAACATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCC

GCACTTTTCAACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGC
 CATTACTACTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAGCTCCCACTTCACAT-----

IN31_ND4 -----

CTAAATCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTA
 ATCCAAACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATC
 CTCCATATTATTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCATAATCC
 TAGCACGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTA
 ACCAACATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACT
 TTCAACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTT
 ACTCACTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAACAACTCCCACTTCACATCATCCCCAC
 AG-----

IN32_ND4 -----

CACTAATCGCTTACTCATCAGTAAGCCACATAGGACTAGTCATTGCTGCATGTCTCATCCAA
 ACACCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATTGCCCATGGCCTAACCTCCTCTAT
 ATTATTCTGTTTGGCCAATACTAACTACGAACGAACCCACACCCGAACCCTAATCTTAGCCC
 GCGGCTTCCAAACTATCCTACCCCTAATAACTACCTGATGGCTCCTTGCCAACCTAACCAAC
 ATAGCACTACCCCAACCATTAACCTAATAGGTGAACCTACAATTATCTCCGCACTTTCAA
 CTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACTGGATTAGGCACCCTCATTACAGCCATCTACTCAC
 TACACATATTTCTAATAACACAACGAAACAACAACTCCCACTTCACAT-----

IN33_ND4 -----

CTAAATCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTA
 ATCCAAACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATC
 CTCCATATTATTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCATAATCC
 TAGCACGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTA
 ACCAACATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACT
 TTCAACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTT
 ACTCACTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAACAACTCCCACTTCACATCACCCCACCA
 GAC-----

IN34_ND4 -----

ACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTAACCCAAACTCCATGAAGCATCCCCGGACCCATA
 ATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATCCTCCATATTGTTTTGCCTAGCCAACACCAACTAC
 AAACGAACCCATACTCGAACCCATAATCCTAGCGGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAAT
 AACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTAACCAACATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAA
 TAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACTTTTCAACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAAC
 GGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTTACTCACTACACATATTCCTAACGACACAACGAAA
 CATC-----

IN35_ND4 -----

ACCTAAAATCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGC
 CTAATCCAAACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAAC
 ATCCTCCATATTGTTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCATA
 TCCTAGCACGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACC
 TAACCAACATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCA
 CTTTTCAACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATT
 TACTCACTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAACAACTCCCACTTCAC-----

IN36_ND4 -----

TCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTAATCCA
 AACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATCCTCCA
 TATTGTTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCATAATCCTAGCA
 CGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTAACCAA
 CATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACTTTTCA

ACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCCTCATTACAGCCATTTACTCA
CTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCACCTTCACAT-----

IN37_ND4 -----

ATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTAATCCAAACTCC
ATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATCCTCCATATTGT
TTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCCTAATCCTAGCACGGGGC
TTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTAACCAACATAGC
ACTTCCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACTTTTCAACTGATC
CCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCCTCATTACAGCCATTTACTACTACACA
TATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCACCTTCACATCAC-----

IN38_ND4 -----

TACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTAATCCA
AACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATCCTCCA
TATTGTTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCCTAATCCTAGCA
CGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTAACCAA
CATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACTTTTCA
ACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCCTCATTACAGCCATTTACTCA
CTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCACCTTCACATC-----

IN39_ND4

AACGACGACCTAAAATCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTC
ATCGCCGCATGCCTAATCCAAACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGC
CCACGGCCTAACATCCTCCATATTGTTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATA
CTCGAACCCCTAATCCTAGCACGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGG
CTCCTTGCCAACCTAACCAACATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTAC
AATCATCTCCGCACTTTTCAACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCC
TCATTACAGCCATTTACTACTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCACCT
CACATCATCCCCCACAGA-----

IN40_ND4 ----ACGACCTAAA-

TACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTAATCCA
AACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATCCTCCA
TATTGTTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCCTAATCCTAGCA
CGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTAACCAA
CATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACTTTTCA
ACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCCTCATTACAGCCATTTACTCA
CTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCACCTTCACATCAC-----

IN41_ND4 ---ACGGACCTAAA-

TACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTAATCCA
AACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATCCTCCA
TATTGTTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCCTAATCCTAGCA
CGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTAACCAA
CATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACTTTTCA
ACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCCTCATTACAGCCATTTACTCA
CTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCACCTTCACATCAC-----

IN42_ND4 -----

TAAATCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCTAA
TCCAAACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACATCC
TCCATATTGTTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCCCTAATCCT
AGCACGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCTAA
CCAACATAGCACTTCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCACTTT
TTCAACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCCTCATTACAGCCATTTA
CTACTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCACCTTCACATCAC-----

IN43_ND4 -----
 CCTAAATCACTAATCGCTTACTCATCAGTAAGCCACATAGGACTAGTCATTGCTGCATGTCTC
 ATCCAAACACCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATTGCCCATGGCCTAACCTC
 CTCTATATTATTCTGTTTTGGCCAATACTAACTACGAACGAACCCACACCCGAACCCTAATCTT
 AGCCCCGCGGCTTCCAAACTATCCTACCCCTAATAACTACCTGATGGCTCCTTGCCAACCTAA
 CCAACATAGCACTACCCCAACCATTAACCTAATAGGTGAACTTACAATTATCTCCGCACTC
 TTCAACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACTGGATTAGGCACCCTCATTACAGCCATCTA
 CTCACTACACATATTTCTAATAACACAACGAAACAAACTCCCCTTCACATCATCCCCAACA
 G-----

IN44_ND4 -----
 CTAAAATCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCT
 AATCCAAACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACAT
 CCTCCATATTGTTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCTAATC
 CTAGCACGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCT
 AACCAACATAGCACTTCCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCAC
 TTTTCAACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTT
 ACTCACTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCCTTCACATCATCCCCAC
 AGA-----

IN45_ND4 -----
 CCTAAATCACTAATCGCCTATTCATCAGTAAGCCACATAGGACTGGTCATCGCCGCATGCCT
 AATCCAAACTCCATGAAGCATCACCGGAGCCATAATCCTAATAATCGCCCACGGCCTAACAT
 CCTCCATATTGTTTTGCCTAGCCAACACCAACTACGAACGAACCCATACTCGAACCTAATC
 CTAGCACGGGGCTTCCAAACTATTCTACCCCTAATAACATCATGATGGCTCCTTGCCAACCT
 AACCAACATAGCACTTCCCCCAACCATCAATCTAATAGGAGAACTTACAATCATCTCCGCAC
 TTTTCAACTGATCCCAACCAACAATCATCCTAACCGGCCTAGGCACCCTCATTACAGCCATTT
 ACTCACTACACATATTCCTAACGACACAACGAAACAAACTCCCCTTCACATCATCCCC--
 TCAGACCA--

;

End;

Begin Traits;

Dimensions NTraits=5;

Format labels=yes missing=? separator=Comma;

TraitLatitude 14.9025 14.9 14.8618 14.9495 15.1106;

TraitLongitude -89.8427 -90.0833 -89.7851 -89.779 -89.3394;

TraitLabels Jicaro Paloamontonado Cabanas Usumatlan Gualan;

Matrix

IN1_ND4 0,0,1,0,0

IN2_ND4 0,0,1,0,0

IN3_ND4 0,0,1,0,0

IN4_ND4 0,0,1,0,0

IN5_ND4 0,0,1,0,0

IN6_ND4 0,0,1,0,0

IN7_ND4 0,0,1,0,0

IN8_ND4 0,0,1,0,0
IN9_ND4 0,0,1,0,0
IN10_ND4 0,0,1,0,0
IN11_ND4 0,0,1,0,0
IN12_ND4 0,0,1,0,0
IN13_ND4 0,0,1,0,0
IN14_ND4 0,0,1,0,0
IN15_ND4 0,0,1,0,0
IN16_ND4 0,0,1,0,0
IN17_ND4 0,0,1,0,0
IN18_ND4 0,0,1,0,0
IN19_ND4 0,0,1,0,0
IN20_ND4 0,0,1,0,0
IN21_ND4 0,0,1,0,0
IN22_ND4 0,0,1,0,0
IN23_ND4 1,0,0,0,0
IN24_ND4 1,0,0,0,0
IN25_ND4 1,0,0,0,0
IN26_ND4 0,1,0,0,0
IN27_ND4 0,0,0,0,1
IN28_ND4 0,0,0,0,1
IN29_ND4 0,0,0,0,1
IN30_ND4 0,0,0,0,1
IN31_ND4 0,0,0,0,1
IN32_ND4 0,0,0,0,1
IN33_ND4 0,0,0,0,1
IN34_ND4 0,0,0,1,0
IN35_ND4 0,0,0,1,0
IN36_ND4 0,0,0,1,0
IN37_ND4 0,0,0,1,0
IN38_ND4 0,0,0,1,0
IN39_ND4 0,0,0,1,0
IN40_ND4 0,0,0,1,0
IN41_ND4 0,0,0,1,0

IN42_ND4 0,0,0,1,0

IN43_ND4 0,0,1,0,0

IN44_ND4 0,0,1,0,0

IN45_ND4 0,0,1,0,0

;

End;

Begin GeoTags;

Dimensions NClusts=5;

Format labels=yes separator=Comma;

ClustLatitude 14.9025 14.9 14.8618 14.9495 15.1106;

ClustLongitude -89.8427 -90.0833 -89.7851 -89.779 -89.3394;

ClustLabels Jicaro Paloamontonado Cabanas Usumatlan Gualan;

Matrix

IN1_ND4 14.8618,-89.7851,1,3

IN2_ND4 14.8618,-89.7851,1,3

IN3_ND4 14.8618,-89.7851,1,3

IN4_ND4 14.8618,-89.7851,1,3

IN5_ND4 14.8618,-89.7851,1,3

IN6_ND4 14.8618,-89.7851,1,3

IN7_ND4 14.8618,-89.7851,1,3

IN8_ND4 14.8618,-89.7851,1,3

IN9_ND4 14.8618,-89.7851,1,3

IN10_ND4 14.8618,-89.7851,1,3

IN11_ND4 14.8618,-89.7851,1,3

IN12_ND4 14.8618,-89.7851,1,3

IN13_ND4 14.8618,-89.7851,1,3

IN14_ND4 14.8618,-89.7851,1,3

IN15_ND4 14.8618,-89.7851,1,3

IN16_ND4 14.8618,-89.7851,1,3

IN17_ND4 14.8618,-89.7851,1,3

IN18_ND4 14.8618,-89.7851,1,3

IN19_ND4 14.8618,-89.7851,1,3

IN20_ND4 14.8618,-89.7851,1,3

IN21_ND4 14.8618,-89.7851,1,3
 IN22_ND4 14.8618,-89.7851,1,3
 IN23_ND4 14.9025,-89.8427,1,1
 IN24_ND4 14.9025,-89.8427,1,1
 IN25_ND4 14.9025,-89.8427,1,1
 IN26_ND4 14.9,-90.0833,1,2
 IN27_ND4 15.1106,-89.3394,1,5
 IN28_ND4 15.1106,-89.3394,1,5
 IN29_ND4 15.1106,-89.3394,1,5
 IN30_ND4 15.1106,-89.3394,1,5
 IN31_ND4 15.1106,-89.3394,1,5
 IN32_ND4 15.1106,-89.3394,1,5
 IN33_ND4 15.1106,-89.3394,1,5
 IN34_ND4 14.9495,-89.779,1,4
 IN35_ND4 14.9495,-89.779,1,4
 IN36_ND4 14.9495,-89.779,1,4
 IN37_ND4 14.9495,-89.779,1,4
 IN38_ND4 14.9495,-89.779,1,4
 IN39_ND4 14.9495,-89.779,1,4
 IN40_ND4 14.9495,-89.779,1,4
 IN41_ND4 14.9495,-89.779,1,4
 IN42_ND4 14.9495,-89.779,1,4
 IN43_ND4 14.8618,-89.7851,1,3
 IN44_ND4 14.8618,-89.7851,1,3
 IN45_ND4 14.8618,-89.7851,1,3

;

End;

Begin Network;

Dimensions ntax=6 nvertices=7 nedges=6 plotDim=0,-156,713.776,993.937;

Format Font=baskerville,10,-1,5,50,0,0,0,0,0 LegendFont=baskerville,10,-1,5,50,0,0,0,0,0

VColour=#000000ff EColour=#000000ff BGCColour=#00000000 VSize=15 EView=Dashes

LPos=509.841,0.5

LColours=#ff0000ff,#37c837ff,#660080ff,#ffcc00ff,#ff00ccff,#aa0000ff,#5500d4ff,#ff0066ff,#d7ff2aff,#00ccffff;

Translate

```
1 IN1_ND4,  
2 IN6_ND4,  
3 IN26_ND4,  
4 IN29_ND4,  
5 IN30_ND4,  
6 IN34_ND4,  
;  
Vertices  
1 325.099 357.599,  
2 436.903 447.712,  
3 454.175 732.163,  
4 246.667 84.4231,  
5 522.53 56.7231,  
6 236.776 424.937,  
7 473.194 157.425,  
;  
VLabels  
1 276.099 357.599,  
2 387.903 447.712,  
3 398.175 732.163,  
4 190.667 84.4231,  
5 466.53 56.7231,  
6 180.776 424.937,  
7 473.194 157.425,  
;  
Edges  
1 0 1 1,  
2 1 2 1,  
3 1 6 1,  
4 6 4 1,  
5 5 0 7,  
6 3 6 37,  
;  
End;
```

Anexo 15. Archivo “.nexus” del gen *ladhA* analizado en el programa PopArt para la generación de la red de haplotipos mediante el método de inferencia TCS

#NEXUS

Begin Data;

Dimensions ntax=43 nchar=368;

Format datatype=DNA missing=N gap=-;

Matrix

IL1_LaDH-1 -----
 TCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACTGAACCAACACTGAT---GAAAAAAA----
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCTCATCA-----

IL2_LaDH-1 -----
 TCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACTGAACCAACACTGAT---GAAAAAAA----
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCTCATCAGTC-----

IL3_LaDH-1 -----
 TCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACTGAACCAACACTGAT---GAAAAAAA----
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCTCAATCAGTC-----

IL4_LaDH-1 -----
 TCGCTCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACTGAACCAACACTGAT---GAAAAAAA----
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCTCATCCAGTC-----

IL5_LaDH-1 -----
 TCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACTGAACCAACACTGAT---GAAAAAAA----
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCT-----

IL6_LaDH-1 -----
 TCGCTCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACTGAACCAACACTGAT---GAAAAAAA----
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTG-----

IL7_LaDH-1 -----
 TCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACACTGAACCAACACTGAT----GAAAAAAA----
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCTCATCAGTC-----

IL8_LaDH-1 -----
 TCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACACTGAACCAACACTGAT----GAAAAAAA----
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCTCAATCAGTC-----

IL9_LaDH-1 -----
 CTATGAGAAATTGGGATCTCGTCCGTACATCTCTAGGGCCATGCCAGAGGGTGTGGTCTTCG
 TGTTCATGAAATAAAATAACACGACTGCAGTCTGACCAACGATGAAAAAAAAAAAAACCC
 CCGCCTGCCGTTCCCTCCTCACTGGATGGTCTTGGCCGCGATCCCACCAACAACAATACCCCC
 CCTATTCTTTTAGAGGGAATTAATCATCTTCCTGTT-
 TTTTCTGTGGCTCCACCAACCATCATAACCGGGGAGGCGCCCTCATTACAGCCGTTTACTCA
 CTACACATATTCTTAACGACACAACGAAGCAAACCTCCTCTTCTTTCCCTTCCCTGACCAA
 CAA

IL10_LaDH-1 -----
 TCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACACTGAACCAACACTGAT----GAAAAAAA----
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCTCAATCAGTC-----

IL11_LaDH-1 -----
 TCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACACTGAACCAACACTGAT----GAAAAAAA----
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCTCAATCAGTC-----

IL12_LaDH-1 -----
 TCGTCCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACACTGAACCAACACTGAT----GAAAAAAA----
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCT-----

IL13_LaDH-1 -----
 GGTCGCTCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACACTGAACCAACACTGAT----GAAAAAAA----
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCT-----

IL14_LaDH-1 -----
 TCGTCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACTGAACCAACTGAT---GAAAAAAA----
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTG-----

IL15_LaDH-1 -----
 CTCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACTGAACCAACTGAT---GAAAAAAA----
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCTCAATCAGTC-----

IL16_LaDH-1 -----
 TCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACTGAACCAACTGAT---GAAAAAAA----
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCTC-----

IL17_LaDH-1 -----
 TCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACTGAACCAACTGAT---GAAAAAAA----
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCTCAATCAGTC-----

IL18_LaDH-1 -----
 TCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACTGAACCAACTGAT---GAAAAAAA----
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCTCATCAGTC-----

IL19_LaDH-1 -----
 TCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACTGAACCAACTGAT---GAAAAAAA----
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCT-----

IL20_LaDH-1 -----
 CTCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACTGAACCAACTGAT---GAAAAAAA----
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCTCAATCAGTC-----

IL21_LaDH-1 -----
 TCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--

TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACACTGAACCAACACTGAT---GAAAAAAA---
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCTCAATCAGTC-----

IL22_LaDH-1 -----

TCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACACTGAACCAACACTGAT---GAAAAAAA---
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCTCAATCAGTC-----

IL23_LaDH-1 -----

GTCAGCTCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACACTGAACCAACACTGAT---GAAAAAAA---
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCTCAATCAGTC-----

IL24_LaDH-1

TTTAAAAAGGTTAAGTTTCTTTTTTGGTAAGTCTTAACTTAAAAAACTTGCGAAGGAA
 AACT--TAC-CTTA-ACCATTTCCTTTTCCGTAATAAACTTCCGCT-
 TCCGTGCCAAACGTTCTTGACTTATGCCAAAATTGGTTGTACCTTGCCTT--ATGA--TGGT--
 TAAAATTACTTCCATGGTAC-TGAAACCCACACCGAT---GAAAAAAA---
 AAAACTCCCCTGACACCTTCCCTTTCATAAATTAAGGGCCTGGGTCAATCAGTCTTCCCAA-

IL25_LaDH-1 ---

TATTATTTTGTTCGTTCTTTTTTTTTTTTTCTTCTACCAACCAAAGCAGGGTTAAAACC-
 TACCATAACCCTTTTCTTAATCCGGTAGAAAACT-
 GCAGCTTCCGGCGCAACCCATCCTTAAGTTATGGC-AGAAGGGGGTTGGTTCTTGCCT--
 AAGGACTTGG--ATAAAGTACTTCCAAGGTACACGGACCCAACACGGT---TAAAAAAA---
 AAACCCCTGGAC-CTTTCCTTACCT-
 TAATTAAGGGCACGGCCCTCCTACCATACCAAACA-----

IL26_LaDH-1 -----

CTCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACACTGAACCAACACTGAT---GAAAAAAA---
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCTCAATCAGTC-----

IL27_LaDH-1 -----

TCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACACTGAACCAACACTGAT---GAAAAAAA---
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCTCAATCAGTC-----

IL28_LaDH-1 -----

TCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-

CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACACTGAACCAACACTGAT---GAAAAAAA---
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACCTGCTCATCAGTC-----

IL29_LaDH-1 -----
 TCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACGCATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACACCGAACCAACACTGAT---
 GAAAAAAACCCCAAACCCCTCCTGAC-
 CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACCTGCTCAATCAGTCT-----

IL30_LaDH-1 -----
 TCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACACTGAACCAACACTGAT---GAAAAAAA---
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACCTGCTCAATCAGTC-----

IL32_LaDH-1 -----
 CTCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACGCATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACACCGAACCAACACTGAT---
 GAAAAAAACCCCAAACCCCTCCTGAC-
 CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACCTGCTCAATCAGTCT-----

IL33_LaDH-1 -----ATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACACTGAACCAACACTGAT---GAAAAAAA---
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACCTGCTCAATCAGTC-----

IL34_LaDH-1 -----GTCCCACGCACCTACGCACGGCTGGAGGTGTAAACC---
 ACACGTATTTTTTGTCTATTCTGAAGTAAATT-GTTGCG-CCTGCTATGCA-
 ATTCGTAATGTCCGAAGGGCAGTGGTGTG-ACCCTGTCTTCGGTGAGGTGAA--
 ATAAAATGTTTCCTATGTCCACTGAACCCACACAGAA---AAAAAAT----CGCTCCCC---
 CTTTCCTTATTTAT-GTTAATTGCTGTGCCCG-----

IL35_LaDH-1 -----
 GGTCGCTCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACACTGAACCAACACTGAT---GAAAAAAA---
 AAACCTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACCTGCTCAATCAGTC-----

IL36_LaDH-1 -----
 TCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
 TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAACTTGCAGCT-
 CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
 ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACACTGAACCAACACTGAT---GAAAAAAA---

AAACTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCTCAATCAGTC-----

IL37_LaDH-1 -----

TCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAAACTTGCAGCT-
CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACACTGAACCAACTGAT---GAAAAAAA---
AAACTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCTCAATCAGTC-----

IL38_LaDH-1 -----

CTAGGGAAAGATATGGCAAGAAACCTATAACTTTGCATGTTCCCCTATCCTGTAGGAGACTT
GCGTCT-CCTGTGCAACAGAGTCTTGACCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
AGGACAAGGA--ATAGAGTAACTCCAGTGTACACGGAACCTACACTGAT---GAAAAAAA---
AAACTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAAAGTGTCTGGTCCAAATCCTTCATAAA---

IL40_LaDH-1 -----

TCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAAACTTGCAGCT-
CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACACTGAACCAACTGAT---GAAAAAAA---
AAACTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCTCAATCAGTC-----

IL41_LaDH-1 -----

TCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAAACTTGCAGCT-
CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACACTGAACCAACTGAT---GAAAAAAA---
AAACTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTG-----

IL42_LaDH-1 -----

TCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAAACTTGCAGCT-
CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACACTGAACCAACTGAT---GAAAAAAA---
AAACTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCTCAATCAGTC-----

IL43_LaDH-1 -----

TTTATTGTTTTGCGCTATAAAAACAAAGGTAAAGCTACAACA-CGCA-GTATCCTTTTTATT-
TGTAGTTGAAAGC--GTTGCT-CGGGCACAA--AGCCTTGGACCTAAGGC-
GGAAGGGGGTTGTACCTTTAC-T--AAGAAAAAGG--
AAAAAATAACTTCCATGAACCCCGACCAAAACTGAA----
GAAAAAAAACCCAACCCCTCCTGAT-
CTTTTATTATCAATGGTTGATGTCGCTGAAAAATCCATCA-ACAA-----

IL44_LaDH-1 -----

GGTCGCTCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAAACTTGCAGCT-
CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACACTGAACCAACTGAT---GAAAAAAA---
AAACTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCTCAATCAGTC-----

```

IL45_LaDH-1 -----
CTCCTTTATGGTATGTCTCAGCTACAAACACATGCAGAGCTAAAAC--
TACACATACACAGTTTCCTATCCAGTAGGAAACTTGCAGCT-
CCTGTGCAACACAGTCTTGAGCTATGGCCAGAAGTGGGTTGTACCTTGTCTT--
ATGACATGGT--ATAAAGTAACTCCAATGTACACTGAACCAACACTGAT----GAAAAAAA----
AAACTCCTCCTGAC-CTTTCCTTATCTAAAGTTAATGTCACTGCTCAATCAGTC-----
-----

```

;

End;

Begin Traits;

Dimensions NTraits=5;

Format labels=yes missing=? separator=Comma;

TraitLatitude 14.9025 14.9 14.8618 14.9495 15.1106;

TraitLongitude -89.8427 -90.0833 -89.7851 -89.779 -89.3394;

TraitLabels Jicaro Paloamontonado Cabanas Usumatlan Gualan;

Matrix

```

IL1_LaDH-1 0,0,1,0,0
IL2_LaDH-1 0,0,1,0,0
IL3_LaDH-1 0,0,1,0,0
IL4_LaDH-1 0,0,1,0,0
IL5_LaDH-1 0,0,1,0,0
IL6_LaDH-1 0,0,1,0,0
IL7_LaDH-1 0,0,1,0,0
IL8_LaDH-1 0,0,1,0,0
IL9_LaDH-1 0,0,1,0,0
IL10_LaDH-1 0,0,1,0,0
IL11_LaDH-1 0,0,1,0,0
IL12_LaDH-1 0,0,1,0,0
IL13_LaDH-1 0,0,1,0,0
IL14_LaDH-1 0,0,1,0,0
IL15_LaDH-1 0,0,1,0,0
IL16_LaDH-1 0,0,1,0,0
IL17_LaDH-1 0,0,1,0,0
IL18_LaDH-1 0,0,1,0,0
IL19_LaDH-1 0,0,1,0,0
IL20_LaDH-1 0,0,1,0,0

```

IL21_LaDH-1 0,0,1,0,0
IL22_LaDH-1 0,0,1,0,0
IL23_LaDH-1 1,0,0,0,0
IL24_LaDH-1 1,0,0,0,0
IL25_LaDH-1 1,0,0,0,0
IL26_LaDH-1 0,1,0,0,0
IL27_LaDH-1 0,0,0,0,1
IL28_LaDH-1 0,0,0,0,1
IL29_LaDH-1 0,0,0,0,1
IL30_LaDH-1 0,0,0,0,1
IL32_LaDH-1 0,0,0,0,1
IL33_LaDH-1 0,0,0,0,1
IL34_LaDH-1 0,0,0,1,0
IL35_LaDH-1 0,0,0,1,0
IL36_LaDH-1 0,0,0,1,0
IL37_LaDH-1 0,0,0,1,0
IL38_LaDH-1 0,0,0,1,0
IL40_LaDH-1 0,0,0,1,0
IL41_LaDH-1 0,0,0,1,0
IL42_LaDH-1 0,0,0,1,0
IL43_LaDH-1 0,0,1,0,0
IL44_LaDH-1 0,0,1,0,0
IL45_LaDH-1 0,0,1,0,0

;

End;

Begin GeoTags;

Dimensions NClusts=5;

Format labels=yes separator=Comma;

ClustLatitude 14.9025 14.9 14.8618 14.9495 15.1106;

ClustLongitude -89.8427 -90.0833 -89.7851 -89.779 -89.3394;

ClustLabels Jicaro Paloamontonado Cabanas Usumatlan Gualan;

Matrix

IL1_LaDH-1 14.8618,-89.7851,1,3

IL2_LaDH-1	14.8618,-89.7851,1,3
IL3_LaDH-1	14.8618,-89.7851,1,3
IL4_LaDH-1	14.8618,-89.7851,1,3
IL5_LaDH-1	14.8618,-89.7851,1,3
IL6_LaDH-1	14.8618,-89.7851,1,3
IL7_LaDH-1	14.8618,-89.7851,1,3
IL8_LaDH-1	14.8618,-89.7851,1,3
IL9_LaDH-1	14.8618,-89.7851,1,3
IL10_LaDH-1	14.8618,-89.7851,1,3
IL11_LaDH-1	14.8618,-89.7851,1,3
IL12_LaDH-1	14.8618,-89.7851,1,3
IL13_LaDH-1	14.8618,-89.7851,1,3
IL14_LaDH-1	14.8618,-89.7851,1,3
IL15_LaDH-1	14.8618,-89.7851,1,3
IL16_LaDH-1	14.8618,-89.7851,1,3
IL17_LaDH-1	14.8618,-89.7851,1,3
IL18_LaDH-1	14.8618,-89.7851,1,3
IL19_LaDH-1	14.8618,-89.7851,1,3
IL20_LaDH-1	14.8618,-89.7851,1,3
IL21_LaDH-1	14.8618,-89.7851,1,3
IL22_LaDH-1	14.8618,-89.7851,1,3
IL23_LaDH-1	14.9025,-89.8427,1,1
IL24_LaDH-1	14.9025,-89.8427,1,1
IL25_LaDH-1	14.9025,-89.8427,1,1
IL26_LaDH-1	14.9,-90.0833,1,2
IL27_LaDH-1	15.1106,-89.3394,1,5
IL28_LaDH-1	15.1106,-89.3394,1,5
IL29_LaDH-1	15.1106,-89.3394,1,5
IL30_LaDH-1	15.1106,-89.3394,1,5
IL32_LaDH-1	15.1106,-89.3394,1,5
IL33_LaDH-1	15.1106,-89.3394,1,5
IL34_LaDH-1	14.9495,-89.779,1,4
IL35_LaDH-1	14.9495,-89.779,1,4
IL36_LaDH-1	14.9495,-89.779,1,4

```

IL37_LaDH-1  14.9495,-89.779,1,4
IL38_LaDH-1  14.9495,-89.779,1,4
IL40_LaDH-1  14.9495,-89.779,1,4
IL41_LaDH-1  14.9495,-89.779,1,4
IL42_LaDH-1  14.9495,-89.779,1,4
IL43_LaDH-1  14.8618,-89.7851,1,3
IL44_LaDH-1  14.8618,-89.7851,1,3
IL45_LaDH-1  14.8618,-89.7851,1,3

```

```
;
```

```
End;
```

```
Begin Network;
```

```
Dimensions ntax=7 nvertices=7 nedges=6 plotDim=0,-156,713.776,993.937;
```

```

Format      Font=baskerville,10,-1,5,50,0,0,0,0      LegendFont=baskerville,10,-1,5,50,0,0,0,0
VColour=#000000ff EColour=#000000ff BGCColour=#00000000 VSize=15 EView=Numbers LPos=1,-
510.341
LColours=#ff0000ff,#37c837ff,#660080ff,#ffcc00ff,#ff00ccff,#aa0000ff,#5500d4ff,#ff0066ff,#d7ff2aff,#
00ccffff;

```

```
Translate
```

```

1 IL1_LaDH-1,
2 IL9_LaDH-1,
3 IL24_LaDH-1,
4 IL25_LaDH-1,
5 IL29_LaDH-1,
6 IL34_LaDH-1,
7 IL38_LaDH-1,

```

```
;
```

```
Vertices
```

```

1 310.099 452.599,
2 436.903 447.712,
3 454.175 732.163,
4 246.667 84.4231,
5 522.53 56.7231,
6 236.776 424.937,
7 473.194 157.425,

```

```
;
```

VLabels

1 318.099 541.599,

2 481.903 412.712,

3 448.175 714.163,

4 240.667 60.4231,

5 466.53 56.7231,

6 224.776 409.937,

7 526.194 161.425,

;

Edges

1 0 1 1,

2 1 2 1,

3 1 6 1,

4 6 4 1,

5 5 0 7,

6 3 6 37,

;

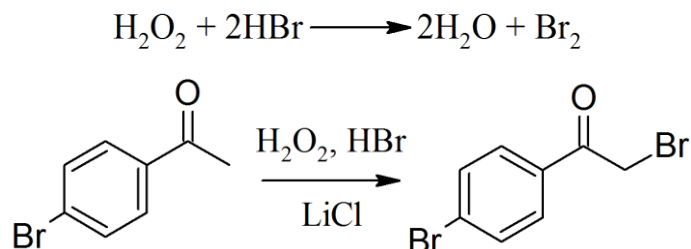
End;

Anexo 16. Protocolo de síntesis para el bromuro de p-bromofenacilo a partir de 4-bromoacetofenona

Objetivo:

- Sintetizar el bromuro de p-bromofenacilo para evaluar la inhibición de la actividad enzimática de la crotoxina B.

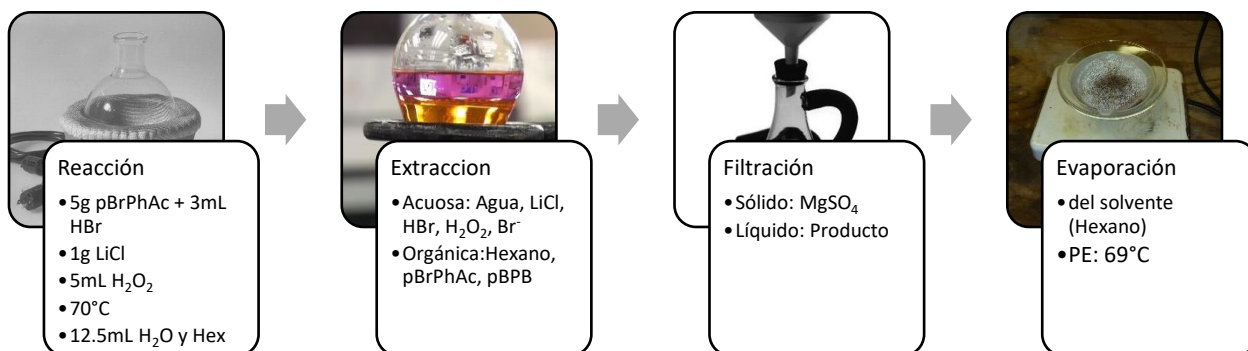
Reacción:



Procedimiento:

Colocar 5g de p-bromoacetofenona en un balón cubierto con aluminio. Agregar 3mL de una solución acuosa (47%) de HBr al balón y agitar por 5min a temperatura ambiente. Agregar 1g de LiCl y agitar por 1min. Agregar 5mL de una solución acuosa (30%) de H₂O₂ lentamente. Calentar la mezcla a 70°C por 1h. Luego, agregar cuidadosamente 12.5mL de agua, seguido de 12.5mL de hexano y se agitó la mezcla por 5min. Separar la fase orgánica y secar con sulfato de magnesio anhidro. Filtrar el material soluble y evaporar el solvente.

Diseño experimental:



Reactivos y materiales:

Nombre	Código	Marca	Pureza	Cantidad	Apariencia
p-Bromo acetofenona	O4-28.01	Merck	97.9%	5g	Sólido beige
Ácido Bromhídrico	I9-194	Merck	47%	3mL	Líquido incoloro
Cloruro de Litio	I2-438	Fisher	99.8%	1g	Sólido blanco higroscópico
Peróxido de Hidrógeno	O6-403.02	Merck	30%	5mL	Líquido incoloro
Hexano	O3-392	J.T. Baker	99%	12.5mL	Líquido incoloro
Sulfato de Magnesio	I2-447	Merck	99.8%	-	Sólido blanco higroscópico

Nombre	PM (g/mol)	PF (°C)	PE (°C)	ρ (g/mL)	Solubilidad
p-Bromo acetofenona	199.04	49-51	255	1.647	EtOH, Éter, Benceno, CCl ₄ , Ácido Acético
Ácido Bromhídrico (47%)	80.91	-11	122	1.49 (25°C)	Agua (204%) (15°C)
Cloruro de Litio	42.39	605	1360	2.070	Agua (84.5%) (25°C)
Peróxido de Hidrógeno (30%)	34.01	-0.43	150.2	1.110	Agua
Hexano	86.18	-95	69	0.659 (25°C)	Agua (0.0095%)
Sulfato de Magnesio	120.37	1127	Descomp.	2.66	Agua (35.7%) (25°C)
Bromuro de p-Bromo fenacilo	277.94	108-110	Descomp.	-	Etanol, Éter, Cloroformo

Nombre	Ingestión	Inhalación	Absorción	Seguridad	Desecho
p-Bromo acetofenona	Tóxico.	Puede causar síntomas de alergia o asma. Irrita el tracto respiratorio.	Irritación severa de la piel y ojos.	Si se inhala, trasladar a la persona a aire fresco. Lavar con agua abundante en caso de contacto o ingestión.	Frasco de desechos orgánicos.
Ácido Bromhídrico	Corrosivo.	Irritación del tracto respiratorio.	Quemaduras de piel y ojos.	Lavar con agua abundante y neutralizar el exceso. Si se ingiere, no inducir el vómito.	Neutralizar y Lavabo
Cloruro de Litio	Tóxico.	-	Irritación de piel y ojos.	Lavar con agua abundante.	Lavabo con bastante agua
Peróxido de Hidrógeno	Tóxico.	-	Irritación severa de ojos.	Lavar con agua abundante. Si se ingiere, no inducir el vómito.	Lavabo
Hexano	Dañino si hay exposición prolongada	Náusea	Irrita levemente piel y ojos	Lavar con agua y jabón. Si se ingiere, no inducir el vómito.	Frasco de desechos orgánicos
Sulfato de Magnesio	Produce vómitos	-	-	Lavar con agua abundante.	Lavabo con bastante agua
Bromuro de p-Bromo fenacilo	Corrosivo.	Irritación del tracto respiratorio.	Corrosivo.	Si se inhala, trasladar a la persona a aire	Frasco de desechos orgánicos.

fresco.
 Lavar con
 agua
 abundante.
 Remover
 vestimentas
 en caso de
 derrame. No
 inducir el
 vómito en
 caso de
 ingestión.

Cálculos

Cálculo No.1: Cantidades de sustrato a utilizar en base a la cantidad del producto esperado

- *p-Bromoacetofenona:*

$$5g \text{ pBPB} \times \frac{1\text{mol}}{277.94g} \times \frac{1\text{mol pBrPhAc}}{1\text{mol pBPB}} \times \frac{199.04g}{1\text{mol}} \times \left(\frac{100}{88}\right) = 4.0689g \text{ pBrPhAc}$$

Cálculo No.2: Estimación de la cantidad a utilizar del resto de reactivos

- *Ácido Bromhídrico:*

$$5g \text{ pBrPhAc} \times \frac{1000\text{mmol}}{199.04g} \times \frac{1.2\text{mL HBr}}{10\text{mmol pBrPhAc}} = 3.0145\text{mL HBr}$$

- *Cloruro de Litio:*

$$5g \text{ pBrPhAc} \times \frac{1000\text{mmol}}{199.04g} \times \frac{10\text{mmol LiCl}}{10\text{mmol pBrPhAc}} \times \frac{42.39g}{1000\text{mmol}} = 1.0649g \text{ LiCl}$$

- *Peróxido de Hidrógeno:*

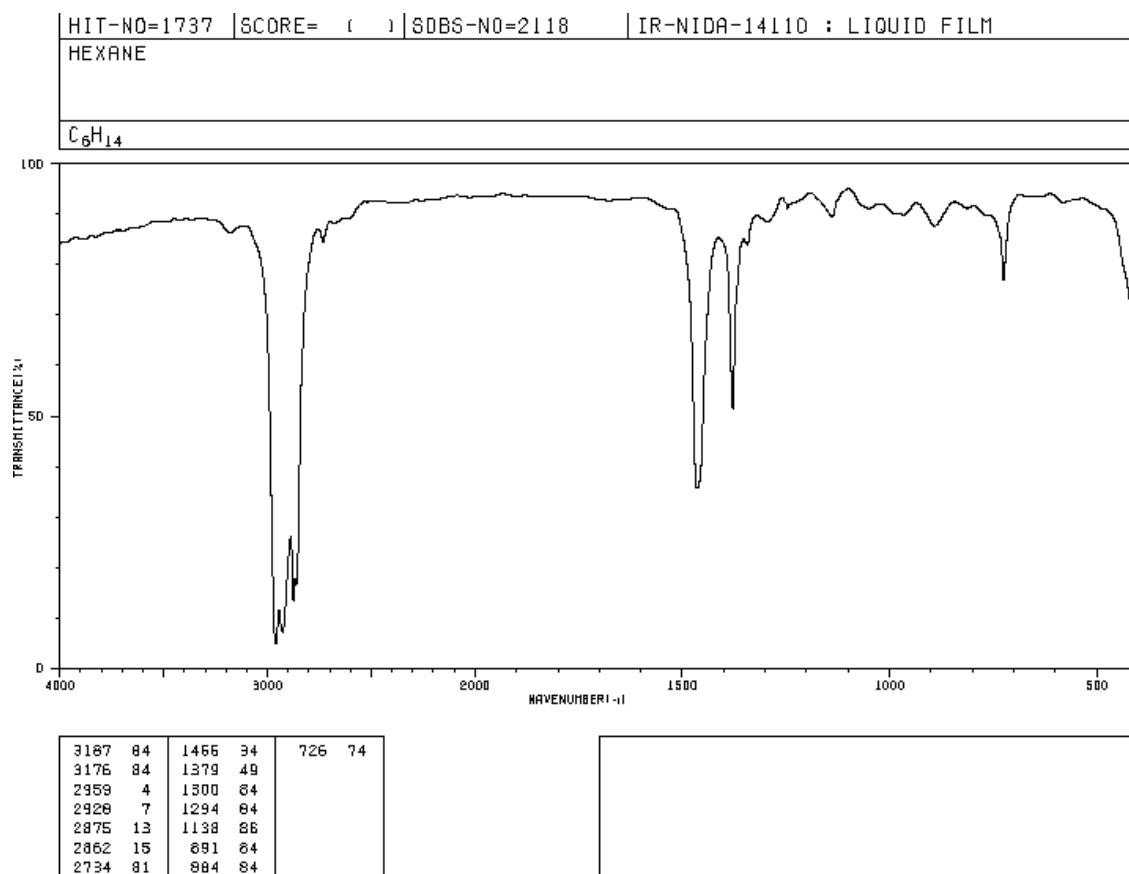
$$5g \text{ pBrPhAc} \times \frac{1000\text{mmol}}{199.04g} \times \frac{2\text{mL H}_2\text{O}_2}{10\text{mmol pBrPhAc}} = 5.0241\text{mL H}_2\text{O}_2$$

- *Hexano:*

$$5g \text{ pBrPhAc} \times \frac{1000\text{mmol}}{199.04g} \times \frac{5\text{mL Hexano}}{10\text{mmol pBrPhAc}} = 12.5603\text{mL Hexano}$$

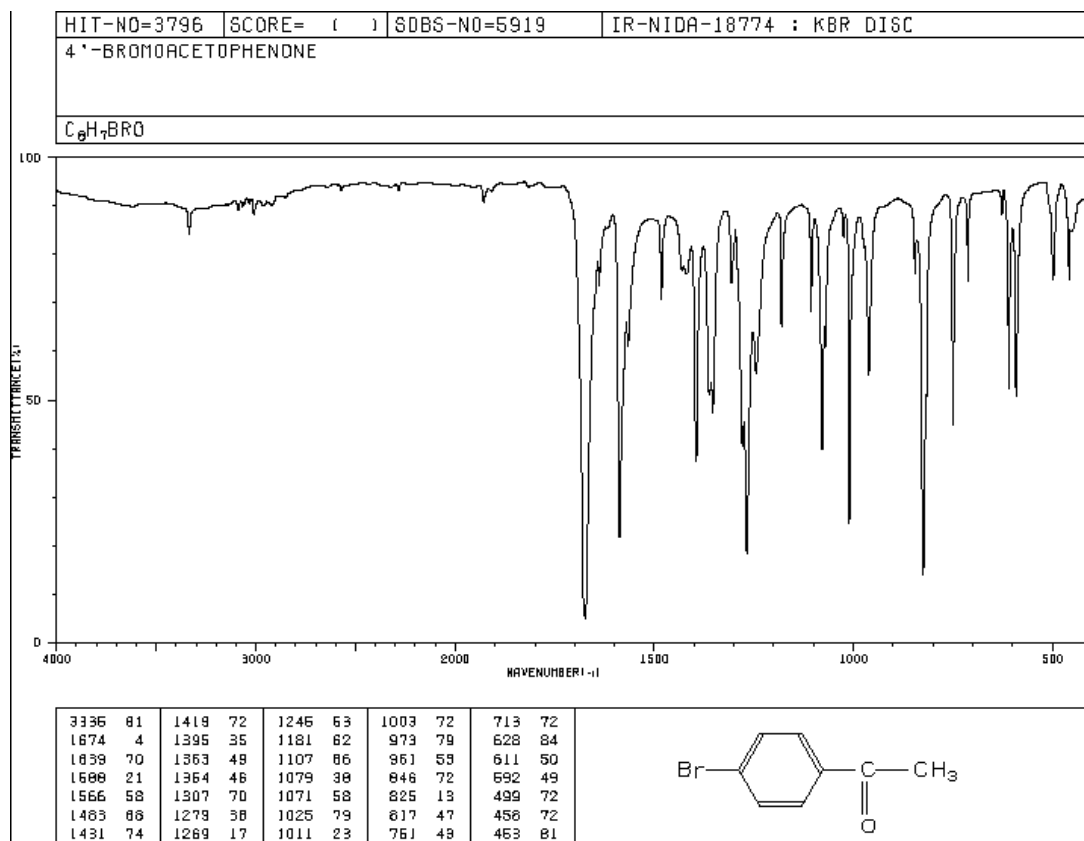
Espectros Infrarrojos (IR):

- Hexano



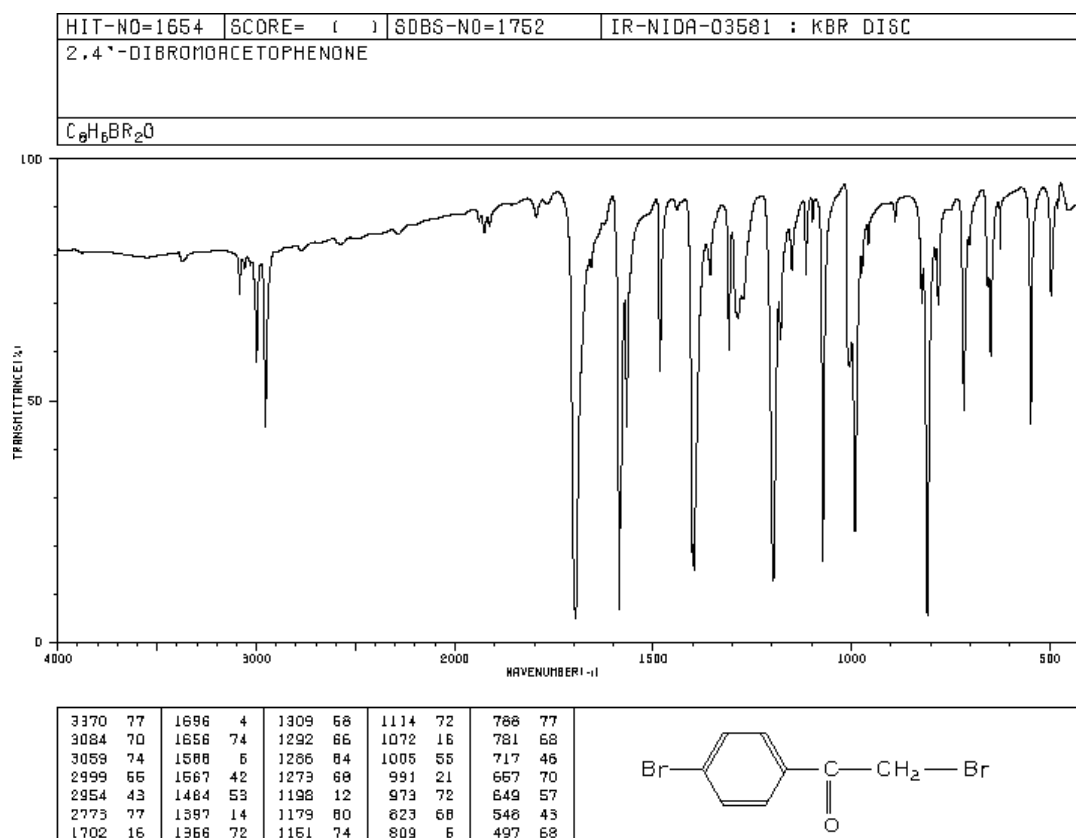
Espectro IR del Hexano. Obtenido de: <http://sdb.db.aist.go.jp> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 6/Sep/2016)

- p-Bromoacetofenona



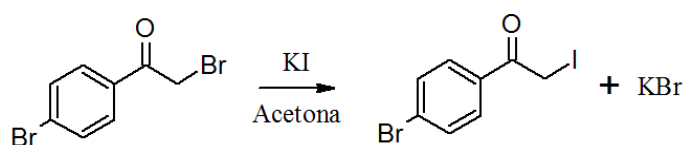
Espectro IR de la p-Bromoacetofenona. Obtenido de: <http://sdb.db.aist.go.jp> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 6/Sep/2016)

- Bromuro de p-Bromofenacilo



Espectro IR del pBPB. Obtenido de: <http://sdb.sdb.aist.go.jp> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 6/Sep/2016)

Anexo 17. Caracterización del producto de la síntesis.



Reacción del pBPB con yoduro de potasio en acetona. El mecanismo de reacción es una sustitución nucleofílica bimolecular (SN₂). Debido a esto, es selectivo para el bromo en posición alfa. El producto es un yoduro de alquilo insoluble en acetona (ACD/ChemSketch, versión 14.01.76694, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com, 2015.).

Teórico (cm ⁻¹) ^a	Experimental (cm ⁻¹)	Transmitancia (%)	Error (%)	Identidad ^b	Rango Esperado (cm ⁻¹) ^b
1693.67	1692.66	82.76	0.06	Estiramiento del carbonilo de una cetona de arilo.	1700-1680
1589.00	1581.77	82.72	0.46	Estiramiento de múltiples enlaces C-C de un aromático.	1580
1395.50	1394.83	83.00	0.05	Impureza de sustrato.	-
1379.50	1380.18	83.50	0.05	Doble C-H de un alcano sp ³ .	1380-1370
1195.00	1193.62	82.15	0.12	Producto.	-
1072.33	1069.65	81.33	0.25	Producto.	-
809.00	805.93	74.63	0.38	Doble C-H de un aromático con dos hidrógenos adyacentes.	830

^a Calculado con base en un promedio de tres espectros obtenidos de: <http://sdbs.db.aist.go.jp> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 11/Ago/2017).

^b Basado en el apéndice 2B de Wade, (2012).

Anexo 18. Resultados de los ensayos *in vitro*

Diámetros de hemólisis de las diluciones de veneno

Placa	DCs (mm)	Cs (mm)	CsI (mm)	DHe (mm)	He (mm)	HeI (mm)
1	13.00	10.60	12.36	7.30	10.08	12.32
2	12.40	10.00	13.08	8.60	10.82	12.26
3	13.68	11.32	13.40	8.20	12.00	12.82

Anexo 19. Resultados de los ensayos de hemólisis indirecta.

Datos de absorbancia obtenidos para el veneno de *C. simus* y el veneno con inhibidor.

Tiempo (min) Muestra	Veneno			Veneno + inhibidor		
	1	2	3	1	2	3
5	0.170	0.202	0.232	0.184	0.165	0.180
10	0.192	0.160	0.161	0.105	0.098	0.023
15	0.152	0.144	0.141	0.085	0.104	0.274
20	0.140	0.095	0.146	0.135	0.063	0.122
25	0.151	0.161	0.158	0.141	0.122	0.157
30	0.154	0.133	0.230	0.130	0.104	0.175

Datos de absorbancia obtenidos para el veneno de *H. charlesbogerti* y el veneno con inhibidor.

Tiempo (min) Muestra	Veneno			Veneno + inhibidor		
	1	2	3	1	2	3
5	3.691	0.313	0.182	0.320	0.140	0.264
10	0.251	0.182	0.192	0.243	0.098	0.201
15	0.304	0.151	0.218	0.274	0.183	0.202
20	0.143	0.080	0.127	0.249	0.165	0.276
25	0.231	0.173	0.210	0.235	0.177	0.182
30	0.244	1.619	0.151	0.156	0.078	0.193

Medianas de las absorbancias obtenidas para los ensayos con veneno de *C. simus*.

Tiempo (min)	Veneno	Veneno + Inhibidor
5	0.202	0.180
10	0.161	0.098
15	0.144	0.104
20	0.140	0.122
25	0.158	0.141
30	0.154	0.130

Medianas de las absorbancias obtenidas para el ensayo con veneno de *H. charlesbogerti*.

Tiempo (min)	Veneno	Veneno + Inhibidor
5	0.313	0.264
10	0.192	0.201
15	0.218	0.202
20	0.127	0.249
25	0.210	0.182
30	0.244	0.156

Porcentajes de hemólisis obtenidos para el ensayo con veneno de *C. simus*.

Tiempo (min)	Veneno	Veneno + Inhibidor
5	100	89.1
10	100	60.9
15	100	72.2
20	100	87.1
25	100	89.2
30	100	84.4

Porcentajes de hemólisis obtenidos para el ensayo con veneno de *H. charlesbogerti*.

Tiempo (min)	Veneno	Veneno + Inhibidor
5	100	84.3
10	100	104.7
15	100	92.7
20	100	196.1
25	100	86.7
30	100	63.9

Anexo 20. Protocolo operacional estándar (SOP; por sus siglas en inglés) para el manejo y descarte de veneno.

UVG Guatemala	Procedimiento Operacional Estándar	POE #: <u> 1 </u> Versión #: 1 Fecha: 21/02/2017
	PROCEDIMIENTO PARA EL MANEJO Y DESCARTE DE VENENO	Página #: 1/9 Preparado por: Andrade, E; K. Cardona; Castañón, E; S. Rodas; Rossi, G. Revisado por: MSc. Daniel Ariano Aprobado por: MSc. Daniel Ariano

1. Propósito:

General

- Conocer cuáles son los procedimientos generales para llevar a cabo el manejo y descarte correcto de veneno. De igual forma saber cuáles son los pasos a tomar a la hora de una emergencia (primeros auxilios).

Específicos

- Realizar una revisión de información para el manejo de venenos, así como su descarte.
- Generar procedimientos de manejo de venenos y descarte, así como las recomendaciones a tomar en cuenta, al momento de la exposición.

2. Aplicación:

- Veneno *Crotalus simus*: Se planea sintetizar un inhibidor para la crotoxina subunidad B presente en el veneno de *C. simus*. Con el fin de entender la cinética de esta subunidad y poder, en un futuro sintetizar un antídoto que cumpla con los requerimientos de esta toxina.

3. Referencias:

Bon, C.; J. Changeux, T. Jeng y H. Fraenkel-Conrat. 1979. *Postsynaptic effects of crotoxin and its isolated subunits*. European Journal of Biochemistry 99:471-481.

Cameron, P; G. Jelinek; Kelly, A; A. Brown; Little, M. 2014. *Textbook of Adult Emergency Medicine*. Elsevier Health Science. USA. 1036pp.

Chen, C; H. Wang. 2016. *Biomedical Applications and Toxicology of Carbon Nanomaterials*. John Wiley & Sons. USA. 543pp.

Clinical Toxinology Resources. 2014. *First Aid*. [Revisado: 22/02/2017]
http://www.toxinology.com/fusebox.cfm?fuseaction=main.first_aid.firstaid&id=FAD-01

Fox, M. 2013. *Glossary for the Worldwide Transportation of Dangerous Goods and Hazardous Materials*. Springer Science & Business Media. USA. 336pp.

Fry, B. 2015. *Venomous Reptiles and Their Toxins: Evolution, Pathophysiology and Biodiscovery*. Oxford University Press. Inglaterra. 504pp.

Marchi-Salvador, D.P.; L.C. Corrêa, A.J. Magro, C.Z. Oliveira, A.M. Soares y M.R.M. Fontes. 2008. *Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A₂ formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom*. *Proteins* 72:883-891.

Rübsamen, H.; H. Breithaupt y E. Habermann. 1971. *Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex*. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für Pharmakologie* 270(3):274-288.

Tardiff, R; J. Rodricks. 2013. *Toxic substances and human risk: Principles of Data Interpretation*. Springer Science & Business Media. USA. 460pp.

Tintinalli, J; G. Keler; Stapczynski, J. 2003. *Emergency Medicine: A comprehensive study guide*. 6ta edición. McGraw Hill Professional. USA. 2016pp.

U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, & National Institutes of Health. 2009. *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories* (5th ed.). L. C. Chosewood and D. E. Wilson (Eds.). Washington, DC: U.S. Government Printing Office. www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmb15/bmb15toc.htm

4. Terminología y abreviaciones:

1. Toxinas: es una sustancia producida por células vivas; en general, son moléculas pequeñas, o proteínas que causan enfermedad en el tejido, ya que se da interacción con enzimas o receptores de membrana (Tardiff & Rodricks, 2013 & Fox, 2013).
2. Veneno: es un conjunto de toxinas producido por glándulas especializadas y son liberadas por un animal a otro. Este veneno causa interrupción en el proceso endofisiológico o bioquímico en el animal receptor, facilitando la alimentación o defensa del animal producto (Fry, 2015).
3. Hemotoxicidad: se refiere a la interacción de producto químicos y bioquímicos, con componentes sanguíneos, incluyendo células y proteínas (Chen & Wang, 2016).
4. Antiofídico: es un conjunto de anticuerpos que degradan las toxinas presentes en el veneno, haciendo que no causante toxicidad en la persona atacada por un animal productor de veneno (Tintinalli, *et al.*, 2003). Al igual que las vacunas, pueden ser

monovalentes (para un solo tipo de veneno) o polivalentes (para varios tipos de veneno) (Cameron, *et al.*, 2014).

5. PBI: vendaje y la inmovilización (bandage and immobilization) (Cameron, 2014)

5. Principio:

El veneno de *Crotalus simus* consta de varias toxinas, entre estas, la crotoxina. Esta a su vez, está compuesta de dos subunidades, de las cuales la subunidad B es una fosfolipasa con actividad neurotóxica y hemotóxica (Bon *et al.* 1979, Rübtsamen *et al.* 1971). La toxicidad de ésta enzima se debe a que se enlaza a receptores específicos en áreas pre y post-sinápticas de la unión neuromuscular, evitando la liberación de acetilcolina (Marchi-Salvador *et al.* 2008).

6. Documentos Asociados:

NO APLICA

7. Seguridad:

Los riesgos primarios son exposiciones accidentales a mucosas (boca, ojos, etc.) o a heridas en la piel. Debido a esto, los venenos deben ser manipulados como si fueran reactivos químicos tóxicos, con la adición de algunos procedimientos dependiendo de la operación a realizar. Deben considerarse ciertas variables dependiendo del trabajo a realizar, como la toxina que se estudia, el estado físico, la cantidad relativa a la dosis letal media, el volumen manipulado, la metodología; y algún otro limitante con respecto al equipo de laboratorio (U.S. Dept. of Health and Human Services, CDC, & NIH, 2007).

Cualquier procedimiento que utilice toxinas o diluciones de toxinas, debe ser realizado bajo un Nivel 2 de Bioseguridad (BSL-2 por sus siglas en inglés). Esto debe realizarse con equipo de protección básico, como bata, guantes, y lentes; además de realizar las operaciones pertinentes en una campana. Las superficies deben ser desinfectadas antes y después de la operación. Las toxinas, especialmente los stocks, deben ser trasladadas de un lugar a otro en un recipiente a prueba de derrames. (U.S. Dept. of Health and Human Services, CDC, & NIH, 2007).

8. Equipo, materiales y equipo:**Reactivos**

Cantidad	Reactivo	Marca	Pureza	X
-----	Antiveneno polivalente	-----	-----	-----
-----	Antiveneno Polivalente	-----	-----	-----

Suministros

Cantidad	Suministro	Marca	X
-----	Vendas	-----	-----

Equipo

Cantidad	Equipo	Marca	Precisión	Rango	X
-----	Congelador a -70°C	-----	-----	-----	-----

9. Prueba estándar:

NO APLICA

10. Procedimiento:

Se debe proporcionar capacitación especial a todo el personal relacionado con las características únicas de riesgo de las toxinas que se estará trabajando y se deben proveer procedimientos específicos de derrame y / o exposición de emergencia. Se debe proporcionar información acerca de los riesgos que se corren al trabajar con la toxina o veneno en particular, conocer la forma de acción de la misma (citotoxicidad, hemotoxicidad, neurotoxicidad, etc...). Además, debe conocer el LD50 y conocer cuáles son los antídotos específicos que se deben de utilizar para el veneno o toxina.

En cuanto al manejo del veneno debe de estar restringido el contacto del mismo, únicamente personas con permiso y conocimiento lo pueden manipular. Deben estar en congelación a -70°C y deben de estar bajo llave o en lugares con acceso restringido.

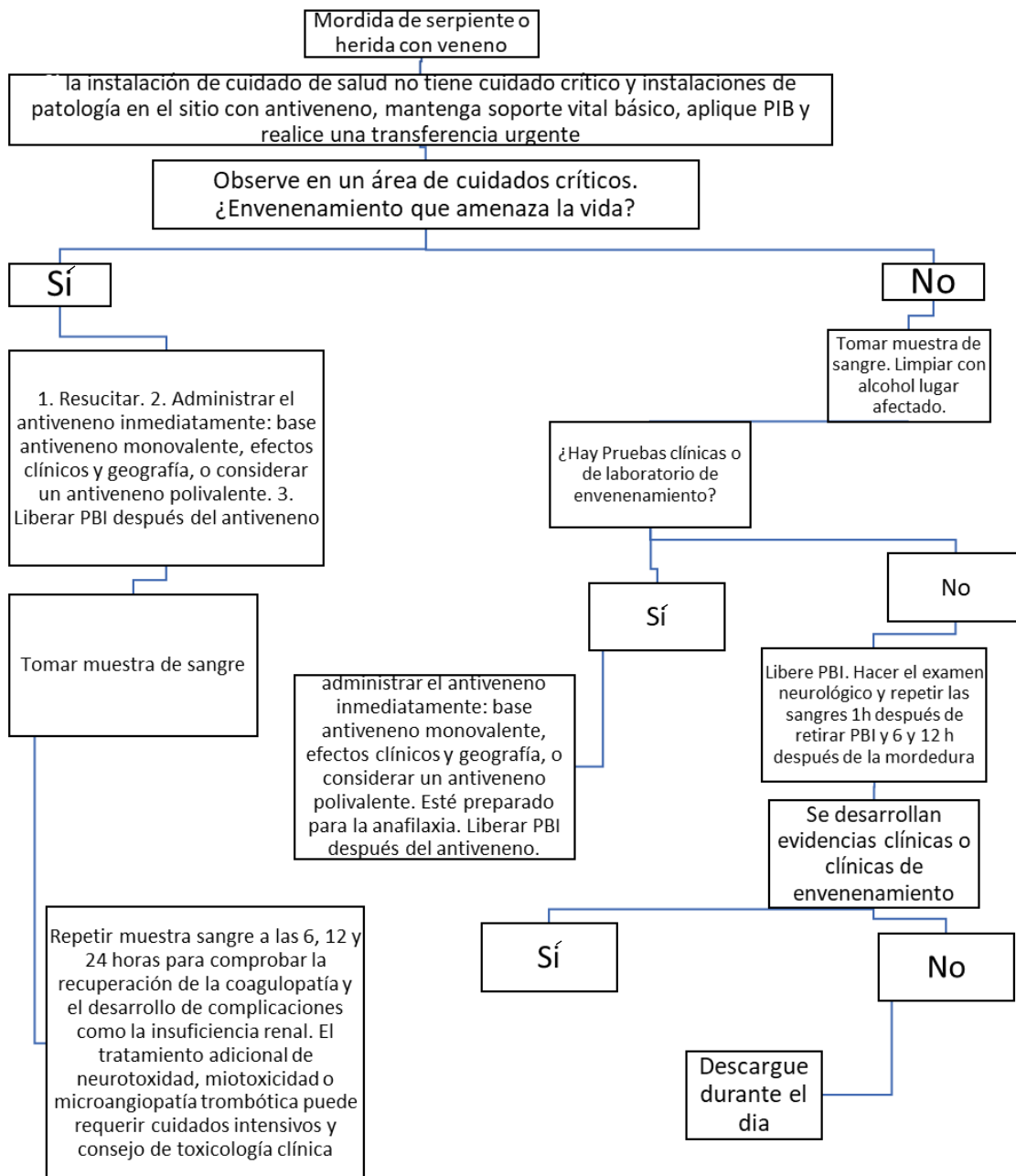
a. Primeros auxilios

El objetivo de los primeros auxilios es minimizar el movimiento del veneno a la circulación sistémica, la absorción es probable que se incrementa por el movimiento y el ejercicio. Esto se consigue mediante un vendaje a presión (vendas elásticas, como ACE) que se aplica sobre el sitio afectado y luego cubrir el miembro completo con una presión similar a la utilizada para un

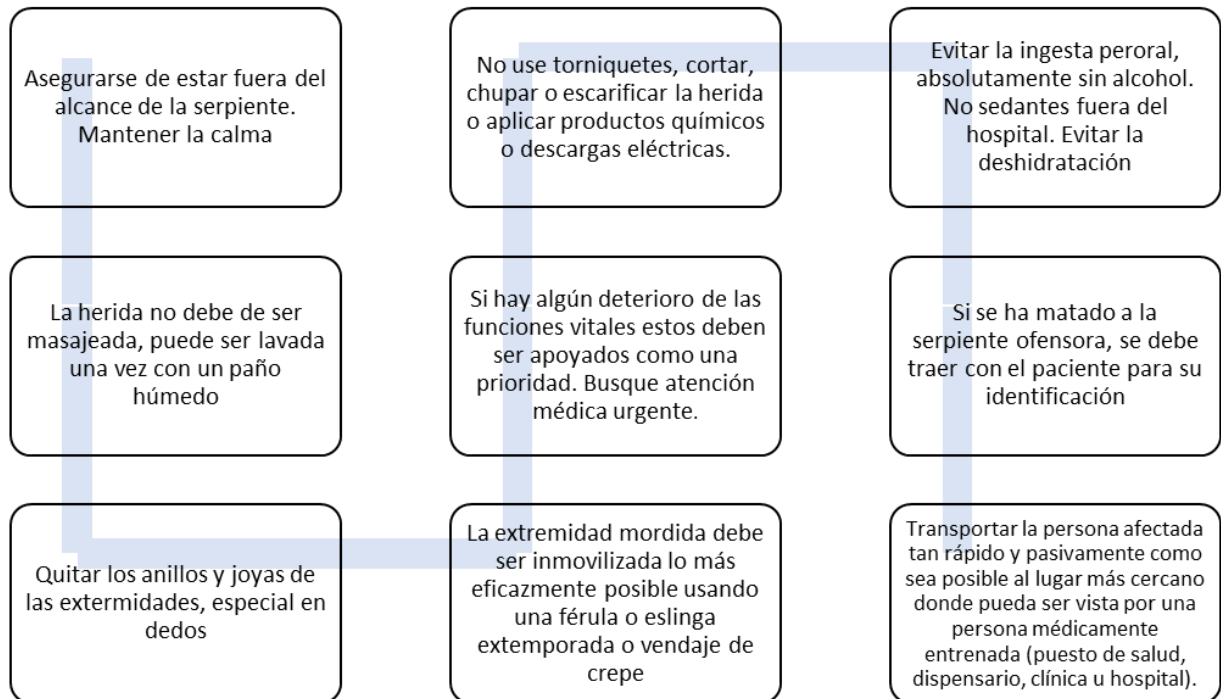
esguince de los miembros. El miembro afectado debe ser inmovilizado, así como todo el paciente o los primeros auxilios es ineficaz. La inmovilización consiste en férulas y prevención completa del movimiento o ejercicio de la parte afectada. En el caso de que no sea una extremidad la presión directa con una almohadilla y la inmovilización pueden ser útiles. El transporte debe llevarse al paciente y debe evitarse el caminar.

Los primeros auxilios deben eventualmente ser removidos, pero esto debe tener lugar en un área de reanimación de una instalación con los medios para tratar envenenamiento definitivamente. Los primeros auxilios se eliminan cuando: una evaluación clínica y de laboratorio completa no demuestra ninguna evidencia de envenenamiento. En estos pacientes, después de la retirada del vendaje, se necesitan más evaluaciones clínicas y de laboratorio para la sospecha de envenenamiento, existen pruebas clínicas o de laboratorio de envenenamiento. El vendaje se elimina después de completar el tratamiento con anti veneno intravenoso.

Muchas serpientes venenosas pueden causar efectos locales moderados y graves, alrededor del sitio de la mordedura, incluyendo ampollas, hinchazón, sangrado y necrosis de la piel (muchas víboras, algunas cobras, especies especialmente escupidas) y, para estos, el vendaje y la inmovilización (PBI) no se recomienda ya que puede empeorar lesión en el tejido local. Se recomienda una simple inmovilización del miembro mordido y administración del anti veneno específico para el veneno o toxina.



Algoritmo de decisión para llevar a cabo el tratamiento de una herida con un objeto con el que se haya trabajado veneno o toxina, bien mordedura de serpiente.



Listado de pasos a tomar en caso de una emergencia o mordedura de serpiente.

11. Cálculos

NO APLICA

12. Fórmulas a utilizar

NO APLICA

14. Control de calidad:

NO APLICA

Anexo 21. Trabajo de campo realizado y equipo de trabajo involucrado en el muestreo y recolección de datos.

Viaje de campo (Cabañas, Zacapa – Reserva Natural del Heloderma)



Viaje de campo (Cabañas, Zacapa – Reserva Natural del Heloderma)



Equipo de trabajo involucrado en la recolección de datos.

