

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Diversidad genética de la población del lagarto escorpión
(*Heloderma charlesbogerti*) en el municipio de Cabañas, Zacapa y
de ejemplares en cautiverio: Implicaciones para su conservación

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Sergio Andrés González Mollinedo
para optar al grado académico de Licenciado en Biología

Guatemala
2016

Diversidad genética de la población del lagarto escorpión
(*Heloderma charlesbogerti*) en el municipio de Cabañas, Zacapa y
de ejemplares en cautiverio: Implicaciones para su conservación

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



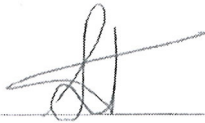
Diversidad genética de la población del lagarto escorpión
(*Heloderma charlesbogerti*) en el municipio de Cabañas, Zacapa y
de ejemplares en cautiverio: Implicaciones para su conservación

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Sergio Andrés González Mollinedo
para optar al grado académico de Licenciado en Biología

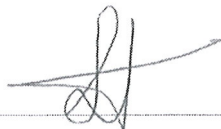
Guatemala
2016

Vo. Bo.:

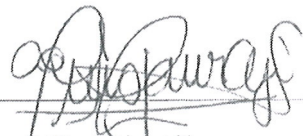
Tribunal Examinador:

(f)  _____

Lic. Thomas Schrei

(f)  _____

Lic. Thomas Schrei

(f)  _____
MSc. Javier Ajú

(f)  _____
MSc. Gabriela Alfaro

MSc. Gabriela Alfaro

Fecha de aprobación de examen final: Guatemala, 25 de noviembre de 2016.

Prefacio

Con la entrega de este estudio, entrego también mi condición de estudiante universitario, de estudiantes de la Universidad del Valle de Guatemala y culmino un capítulo más de mi vida. En este documento se condensan dos años de esfuerzo, cinco años de trayectoria universitaria y cada uno de los textos, documentales, reportajes y cualquier otra forma de información que me ha permitido consolidar el conocimiento que ostento hasta el día de hoy. Además, este capítulo conlleva todas las experiencias de vida que me han formado, todas las alegrías, tristezas, triunfos, derrotas, lágrimas, sonrisas, besos, abrazos, enojos, desilusiones y sueños. Esta tesis no representa lo que soy en su totalidad, pero es el marco en el que se presenta. Cada momento vivido al día de hoy ha resultado en la capacidad de generar este documento, y en él, espero transmitir algo muy importante: conocimiento. Como científico, el generar conocimiento es la motivación principal, el motor y la reacción natural ante la curiosidad. El saber que hay algo por aprender, por descubrir, por observar es la principal motivación de quienes decidimos enfocar nuestras vidas en la generación del conocimiento, de buscar la fascinación en lo que aún no comprendemos a fondo. Espero que con este estudio y los muchos que espero prosigan, podamos comprender lo maravilloso y complejo que puede llegar a ser la vida misma, nuestra evolución y nuestra existencia.

Agradezco a mis padres, Sergio y Johanna, responsables de mi existencia, proveedores de todo lo que he necesitado hasta el día de hoy y aún más. Han moldeado lo que soy y lo que no soy con su ejemplo y su amor y me han permitido llegar al fin de este capítulo. También agradezco especialmente a mi abuelo Sergio por su ejemplo y acompañamiento a lo largo de toda mi vida. Siempre hemos compartido lo mejor de esta vida.

Agradezco a todas las personas que asesoraron mi tesis y fueron parte de la construcción de este estudio: Thomas Schrei, Elena Dardón, Andrés Ávalos, Javier Ajú y Daniel Ariano. Agradezco las muestras obtenidas a través del trabajo de Zootropic y FUNDESGUA, de las cuales se logró obtener la información generada. Agradezco también a las instituciones involucradas en el estudio por permitir la obtención de muestras de los individuos en cautiverio que habitan allí.

Agradezco a mis compañeros y compañeras de clase: Titi, Mármol, Martín, Vary, Marissa, Anaisa, Reynhold, Mafer, Andrea, Gaby, Dani y a todas esas personas con las cuales compartí un salón de clases. Gracias por su apoyo, su amistad y su contribución especial a mi proceso. Y así como nos recuerdo, recuerdo también a Nahomi Lara, Ángel de León y Juan Carlos Velásquez, que fueron asesinados mientras luchaban por sus sueños. Los mismos que los nuestros.

Agradezco a mi familia y amigos, a todas aquellas personas con las que he compartido un lazo de amistad y amor. Entre algunos debo mencionar a Jona, Erick, Pau, Adriana, Marissa, Martín, Diego, Marcela, y muy especialmente a Gabi. Con ustedes y su amor encontré lo mejor que hay en mí y soy quien soy hoy.

Índice

Prefacio	vi
Índice	vii
Listado de cuadros y figuras	ix
Resumen	xi
Abstract	xii
I. Introducción	1
II. Marco teórico	3
A. Historia Natural de <i>H. charlesbogerti</i>	3
B. Importancia de <i>H. charlesbogerti</i>	6
C. Riesgos para las poblaciones de <i>H. charlesbogerti</i>	6
D. Importancia de la diversidad genética	7
E. Simulaciones coalescentes y detección de cuellos de botella	8
F. Comparación de métodos de simulación	10
G. Rescate genético	10
III. Justificación	13
IV. Objetivos	15
A. General	15
B. Específicos	15
V. Metodología	17
A. Hipótesis y variables	17
B. Métodos	17
C. Análisis poblacional	20
D. Detección de cuellos de botella	21
E. Diagrama de la metodología	22
VI. Resultados	23

A. Extracción de ADN	23
B. Amplificación y medición de alelos	24
C. Genética poblacional	29
D. Detección de cuellos de botella	35
VII. Discusión	37
A. Extracción de ADN	37
B. Amplificación y medición de alelos	38
C. Genética poblacional	41
D. Detección de cuellos de botella	43
VIII. Conclusiones	47
IX. Recomendaciones	49
X. Referencias	51
XI. Anexos	55
A. Licencias de investigación y colecta de CONAP	55
B. Protocolo de toma de muestras y extracción de ADN con tarjetas FTA	57

Listado de cuadros y figuras

Cuadros

CUADRO 1. Rendimiento y pureza de la extracción de ADN a partir de sangre preservada en tarjetas FTA, usando un disco.	23
CUADRO 2. Rendimiento y pureza de la extracción de ADN a partir de sangre preservada en tarjetas FTA, usando cinco discos.	23
CUADRO 3. Porcentaje de productos de amplificación obtenidos de la PCR por cada marcador utilizado.	25
CUADRO 4. Alelos identificados para los marcadores H3SU001-HESU008 para todas las muestras.	27
CUADRO 5. Alelos identificados para los marcadores HESU009-HESU016 para todas las muestras.	28
CUADRO 6. Alelos y frecuencia alélica para los marcadores polimórficos en el conjunto de datos completo.	30
CUADRO 7. Alelos y frecuencia alélica para los marcadores polimórficos para la población de Cabañas.	31
CUADRO 8. Heterocigosidad observada, esperada (según Nei, 1987) y coeficientes de endogamia para los marcadores polimórficos para el conjunto de individuos analizados.	32
CUADRO 9. Heterocigosidad observada, esperada (según Nei, 1987) y coeficientes de endogamia para los marcadores polimórficos para los individuos silvestres de Cabañas.	32
CUADRO 10. Resumen de valores de p para las pruebas realizadas para la detección de cuellos de botella utilizando Bottleneck para la población de Cabañas.	35

Figuras

FIGURA 1. <i>Heloderma charlesbogerti</i> . Fotografía por Thomas Schrei (2009)	3
FIGURA 2. Bosque estacionalmente seco del Valle del Motagua. Fotografía de Andrea Martínez (2016)	4
FIGURA 3. Distribución de la frecuencia de alelos normal en L para distintas poblaciones de codorniz nortea (<i>Colinus virginianus</i>) donde no existe un cuello de botella (Evans et al., 2013).	9
FIGURA 4. Diagrama de la metodología del proyecto.	22
FIGURA 5. Gel de poliacrilamida al 12% donde se visualizaron productos de amplificación.	25
FIGURA 6. Gel de poliacrilamida para la medición de alelos y su mapa de carga.	26
FIGURA 7. Análisis de Componentes Principales (PCA) utilizando los datos de alelos para todos los individuos analizados.	34

Resumen

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la diversidad genética en las muestras obtenidas de Cabañas, Gualán y de ejemplares en cautiverio de *Heloderma charlesbogerti* para determinar las implicaciones principales de esto en la conservación de la especie. El análisis genético se hizo con 12 marcadores microsatélites generados por Hess *et al.* (2013), que permitieron generar información nueva y complementaria a la que se produjo por Schrei (2014), cuya principal limitante fue la poca información que se obtuvo utilizando seis marcadores. La duplicación de marcadores en este estudio permitió realizar distintos análisis, como una detección de cuellos de botella poblacionales más robusta. Se espera que el procedimiento utilizado pueda ser replicado para evaluar y manejar la diversidad genética de las poblaciones existentes de la especie y explorar la diversidad de nuevas, cumpliendo con una de las estrategias planteadas en el plan de manejo de *H. h charlesbogerti* (2013-2018). Los resultados principales fueron la detección de un proceso endogámico, a pesar de no encontrar evidencia clara de un cuello de botella poblacional para los individuos de Cabañas. También, se reveló una baja diversidad genética en la población (2.25 alelos por marcador) y una deficiencia de heterocigotos. Esto implica riesgos para la población de cara a sus principales amenazas, como fragmentación, pérdida de hábitat y el cambio climático. Algunas de estas amenazas pueden ser el enfoque de varias medidas de conservación, pero una diversidad genética baja puede ser determinante para extinciones locales, aún con el hábitat en la mejor condición. Por esta razón, es necesario rescatar la diversidad genética de las poblaciones reestableciendo el flujo entre ellas, realizando migraciones asistidas o mediante un programa de reproducción *ex situ* entre organismos con haplotipos diferenciados para producir nuevas generaciones con diversidad genética mayor. Existe la posibilidad de lograr esto, ya que los individuos que se encuentran en cautiverio parecen evidenciar otras poblaciones con alelos distintos a los observados en Cabañas. En consecuencia, el riesgo que presenta una diversidad genética baja, incluso con las medidas de conservación actuales, se reduciría y aumentaría la resiliencia y adaptabilidad de la especie. Esto permitirá enfrentar de mejor manera situaciones estresantes como cambios físicos de su hábitat y cambio climático.

Abstract

The main objective of this study was to evaluate the genetic diversity of samples of *Heloderma charlesbogerti* from the populations of Cabañas, Gualán and individuals in captivity to determine its implications on the conservation of the species. The analysis was performed using 12 microsatellite markers generated by Hess *et al.* (2013), which allowed the study to generate new information which also complemented the study by Schrei (2014), whose principal limitation was the poor information generated by a set of six microsatellite markers. The use of twice the amount of markers allowed the implementation of different analysis, such as a population bottleneck detection test which was more robust. It is expected that the procedure used in the present study can be replicated to evaluate and monitor the genetic diversity of extant populations of the species and the exploration of new ones, in compliance to the strategies proposed in the management plan for *H. charlesbogerti* (2013-2018). The main results of the study show an ongoing endogamic process despite the absence of a historical population bottleneck for the individuals of Cabañas. It also revealed a low average genetic diversity (2.25 alleles per marker) and a heterozygote deficiency. This implies that the populations is at risk facing its most prominent threats, such as habitat loss and fragmentation, climate change and extermination. Some of these threats can be the focus of several conservation efforts, but a low genetic diversity can be determinant on local extinctions, even with a habitat in the best of conditions. Because of this, it is necessary to rescue the genetic diversity of the populations of the species by reestablishing the genetic flow between them, assisting on the migration of different individuals or implementing an *ex situ* reproduction program which can breed organisms with differentiated haplotypes to produce offspring with a higher average genetic diversity. It is possible to achieve this due to the existence of individuals in captivity that seem to provide evidence of other populations and alleles external to those observed in the population of Cabañas. In consequence, the risk that a low genetic diversity represents for the species, even with the ongoing conservation efforts, would be reduced and the resilience and adaptability of the species would increase. This would allow it to face stressful situations such as physical change to its habitat and climate change in a better way.

I. Introducción

Este estudio presenta la evaluación de la diversidad genética de las poblaciones del lagarto *Heloderma charlesbogerti* ubicadas en Cabañas y Gualán (de la cual se cuenta únicamente con un individuo), así como la de los ejemplares en cautiverio en instituciones guatemaltecas. El procedimiento utilizado puede replicarse para evaluar la diversidad genética de las poblaciones de la especie que no se lograron incluir en el estudio y monitorear la diversidad genética de las poblaciones a futuro. Se buscó conocer la estructura genética de las poblaciones de la especie, información esencial para el desarrollo de futuros planes de manejo y conservación. Esta información permite identificar a las poblaciones que se encuentran en un mayor riesgo de extinción para enfocar los esfuerzos de conservación y reducir su vulnerabilidad.

Muchos de los riesgos clásicos para la conservación de esta especie, como la pérdida de hábitat, el tráfico ilegal, la exterminación indiscriminada y las creencias populares que le dan una mala fama a la especie han sido el objetivo principal de los esfuerzos de conservación que se han realizado hasta la fecha. Sin embargo, existen otros factores externos que no pueden ser tratados por esfuerzos de conservación *in situ*, o incluso *ex situ*, y que afectan indirectamente a la especie, como el cambio climático y el calentamiento global. De lo que se sabe hasta la fecha acerca de la historia de esta especie, es posible pensar que el número de ejemplares ha venido disminuyendo desde la época en que se dieron los primeros asentamientos humanos en la zona del Valle de Motagua por miedo a su veneno, lo que pudo haber reducido de manera importante su diversidad genética y su densidad poblacional. Un aumento en la diversidad genética es una de las medidas que pueden implementarse para mitigar los efectos de estas amenazas externas en varias de las poblaciones de esta especie, que podrían llegar a extinguirse al enfrentar situaciones drásticas. Esto es evidenciado por la baja diversidad genética en la población de esta especie ubicada en el municipio de Cabañas, tal como se reportó recientemente en el trabajo de Schrei (2014), en el que se analizaron seis marcadores microsatélites en esta población de *H. charlesbogerti* y se obtuvo un promedio de 1.5 alelos por *locus*.

Una posibilidad prometedora de manejo que se ha discutido, pero nunca se ha implementado, es un programa de reproducción orientado a incrementar la diversidad genética de las poblaciones existentes mediante selección artificial de cruces que maximicen la diversidad genética de las crías. Otra medida que se podría implementar es la protección de corredores geográficos que puedan conectar las distintas poblaciones, cuya función sería mantener el flujo genético entre ellas e implementar procesos de migración asistida con el mismo fin. Pueden implementarse nuevas estrategias de conservación para *H. charlesbogerti*, e incluso para otras especies, al poder obtener información acerca de su estructura genética poblacional. Este estudio implementó una nueva forma de recolección de muestras de esta especie, y comprobó la utilidad de doce nuevos marcadores microsatélites para poder analizar la diversidad genética de la especie de este punto en adelante. Usando estos marcadores moleculares, se analizaron las muestras obtenidas por Thomas Schrei (2014), así como 10 nuevas muestras de *H. charlesbogerti* que se encuentran en cautiverio

en el país y una muestra que se obtuvo de la población de Gualán. Se espera que la información generada sea de utilidad para la creación de planes de manejo más integrales en las poblaciones analizadas, y que los marcadores utilizados permitan conocer la diversidad de otras poblaciones en un futuro.

II. Marco teórico

A. Historia Natural de *H. charlesbogerti*.

1. Revisión taxonómica. *Heloderma charlesbogerti* (Campbell y Vannini, 1988) es un lagarto venenoso de la familia Helodermatidae que habita los bosques secos del Valle del Motagua. *H. charlesbogerti* fue descrito como una subespecie de *Heloderma horridum* por Campbell y Vannini (1988), siendo la subespecie con menor área de distribución de las cuatro (junto con *H. h. alvarezii*, *H. h. horridum* y *H. h. exasperatum*). Reiserer *et al.* (2013) hicieron una revisión taxonómica de estas cuatro subespecies y se propuso elevar cada una a especie, basándose en diferencias genéticas, morfológicas y biogeográficas. Esto también beneficia la conservación de cada especie, al ser la clasificación taxonómica utilizada por proyectos de conservación y manejo (Reiserer *et al.*, 2013). Por esta razón, se adopta la nueva taxonomía en este estudio.

FIGURA 1. *Heloderma charlesbogerti*.



Fuente: Thomas Schrei, 2009

2. Hábitat. *Heloderma charlesbogerti* habita el bosque estacionalmente seco del Valle del Motagua. Prefiere un bosque con baja precipitación y altas temperaturas durante la época seca, con vegetación parecida a la de matorral espinoso (Ariano-Sánchez, 2006; Domínguez-Vega *et al.*, 2012). Su pico de actividad es en la época lluviosa y durante la época anual de ovoposición de varias especies, incluyendo la de la iguana negra, *Ctenosaura palearis* (Beck, 2005; com. pers. con Daniel Ariano-Sánchez). Es interesante que la época de mayor actividad corresponda con una temperatura media de actividad menor (27.2°C en época lluviosa vs. 30.2° C en época seca) (Beck, 2005). Estos lagartos pasan hasta el 95% del tiempo sin actividad, especialmente en época seca, resguardándose en madrigueras que cavan otros animales o ellos mismos, preferentemente a 0.5 m de profundidad (Beck, 2005; Ariano-Sánchez, 2006). Domínguez-Vega *et al.* (2012) reportan que *H. horridum (sensu lato)* tiene una alta especificidad de nicho debido a sus necesidades especiales de precipitación, temperatura y estacionalidad del bosque que habita. Menos del 10% de los bosques secos del Valle del Motagua, en donde podría habitar *H. charlesbogerti*, se encuentran protegidos (Nájera Acevedo, 2006), por lo que no solo esta especie se encuentra en riesgo de perder su hábitat, sino todas las demás especies endémicas a ellos.

FIGURA 2. Bosque estacionalmente seco del Valle del Motagua.



Fotografía de Andrea Martínez (2016).

3. Alimentación y naturaleza venenosa de *H. charlesbogerti*. El *H. charlesbogerti* se alimenta de huevos de aves con nidos terrestres, crías de algunos mamíferos que hacen madrigueras y de huevos de otros reptiles (Beck, 2005; Ariano-Sánchez, 2006), como de *Ctenosaura palearis* (Cotí & Ariano-Sánchez, 2008). Debido a que su veneno no es utilizado para cazar o inmovilizar presas, su naturaleza venenosa seguramente es defensiva (Beck, 2005; Ariano-Sánchez, 2007). Los casos de

mordeduras a humanos son esporádicas y no letales, por lo que no se ha desarrollado un antídoto para su veneno. Ariano-Sánchez (2008) reporta el cuadro clínico de un caso de envenenamiento agudo por mordedura de *H. charlesbogerti*. Los síntomas que se presentaron fueron dolor local agudo e inmediato, mareos y transpiración excesiva. Poco después, se adormeció la mano y el brazo izquierdo (sitio de la mordedura), seguido de un edema visible, adormecimiento en la otra mano, inflamación de la lengua y falta de aliento (Ariano-Sánchez, 2008). Al llegar al hospital, el paciente presentó hipotensión, vómitos severos y taquicardia, pero el tratamiento administrado resolvió el cuadro y el paciente fue dado de alta a las 24 horas (Ariano-Sánchez, 2008). Otro caso de envenenamiento no presentó un cuadro como este, sino únicamente edema, vómitos y malestar general. Incluso existen casos de mordeduras que no presentan síntomas de envenenamiento y podrían considerarse mordidas secas (com. pers. con Thomas Schrei). El veneno de *H. charlesbogerti* es administrado mediante una mordedura fuerte, que permite que los dientes atraviesen la piel, permitiendo el ingreso del veneno en la herida producida (Beck, 2005). Una salivación profusa que contiene el veneno es uno de los primeros comportamientos que se presentan previos a un intento de mordedura, y se da especialmente cuando el animal se encuentra estresado o bajo posible amenaza (Beck, 2005; Ariano-Sánchez, 2008). El veneno emite un aroma agrídulce o cítrico y se ha hipotetizado que puede tener una función aposemática para ahuyentar a posibles predadores (Ariano-Sánchez, 2007).

4. Comportamiento reproductivo de *H. charlesbogerti*. El ciclo reproductivo de *H. charlesbogerti* es complejo y requiere de mucha inversión de energía. El ciclo reproductivo de *H. horridum* fue documentado únicamente por organismos atropellados en México. Se ha documentado que la espermatogénesis se da en los meses de agosto y termina en noviembre. Esto coincide con la época de luchas entre machos (Beck, 2005). En el caso de las hembras, únicamente se sabe que la ovoposición se da entre octubre y diciembre (Beck, 2005). El ritual de combate entre machos es muy característico. Se ha observado que los machos se colocan uno al lado del otro, se toman con dos patas y juntan sus vientres para formar un arco, usando las otras dos patas y la cola como puntos de contacto con el suelo. Ambos machos empujan hasta que el arco colapsa y el macho dominante usualmente queda encima del otro (Beck & Ramírez-Bautista, 1991). Gienger y Beck (2005) observaron un dimorfismo sexual para *H. horridum* (*sensu lato*) en el largo de la cola (más larga en machos) y lo relacionan a la importancia de la cola como punto de contacto con el suelo al formar el arco al competir con otro macho.

5. Paleobiogeografía de *H. charlesbogerti*. La paleobiogeografía de esta especie es interesante. Existe la hipótesis que un ancestro de *H. charlesbogerti* y *H. alvarezii* viajó hacia el istmo centroamericano y una población quedó en Chiapas, dando origen al *H. alvarezii*. Otra población ingresó al país por el bosque seco de la costa sur y rodeó la Sierra Madre por el sur, para entrar al Valle del Motagua, donde la población quedó aislada y dio lugar a *H. charlesbogerti* (Campbell & Vaninni, 1988). Esta teoría se vio apoyada por la colecta de especímenes de *H. charlesbogerti* en la vertiente del Pacífico, en los departamentos de Santa Rosa y Guatemala (Anzueto & Campbell, 2010). Actualmente, se conocen cuatro poblaciones en el Valle

del Motagua: en Cabañas-El Jícaro, San Jorge-Zacapa, Sanarate y Gualán-La Cartuchera-Los Jutes (Ariano-Sánchez & Salazar, 2007). Además, se piensa que existe una población en la vertiente del Pacífico, ubicada en remanentes de bosque seco, y puede representar a la población más aislada de la especie (Anzueto & Campbell, 2010; Domínguez-Vega, 2012). Se ha observado que la población de Gualán es la única que ocurre en bosque pino-encino (Beck, 2005, Ariano-Sánchez & Salazar, 2007). Además, el área de potencial distribución para la especie en Guatemala es de 200,000 ha, de las cuales únicamente el 10% está protegido (Reiserer *et al.*, 2013).

B. Importancia de *H. charlesbogerti*.

H. charlesbogerti es uno de los miembros de la familia Helodermatidae, endémico a Guatemala (Ariano-Sánchez, 2003; Ariano-Sánchez, 2006; Reiserer *et al.*, 2013), cuyas cinco especies están agrupadas en un solo género. Estas cinco especies conforman un grupo muy interesante de reptiles (Reiserer *et al.*, 2013). La pérdida de tan solo una especie es una pérdida significativa para este grupo taxonómico y la extinción de una línea evolutiva única. Esta línea evolutiva es representada por los únicos lagartos con glándulas venenosas funcionales en el continente americano y la distribución restringida de *H. charlesbogerti* lo hace especialmente único, así como vulnerable (Beck, 2005). El veneno de las especies de este género también es de mucha importancia, ya que se han conducido varios estudios acerca de su potencial para la fabricación de fármacos (Beck, 2005; Fry *et al.*, 2009; Fry *et al.*, 2010; Douglas *et al.*, 2010). Especialmente porque se ha aislado una proteína llamada exendin-3, que es un factor de secreción de insulina que actúa sobre el páncreas y puede usarse para tratar la diabetes tipo I y II (Eng *et al.*, 1990). Además de esto, las especies de Helodermatidae pueden ser utilizadas como especie bandera y sombrilla para la conservación de los bosques secos de México y Guatemala (Ariano-Sánchez *et al.*, 2011; Domínguez-Vega *et al.*, 2012).

C. Riesgo para las poblaciones de *H. charlesbogerti*.

H. charlesbogerti es una especie que se encuentra bajo considerable amenaza por distintos factores. La principal amenaza para este organismo en la actualidad es la pérdida de hábitat (Ariano-Sánchez, 2003; Ariano-Sánchez, 2006; Beck, 2005), lo cual tiene graves repercusiones para el *H. charlesbogerti* por ser una especie con un nicho ecológico muy específico (Domínguez-Vega *et al.*, 2012). Además, los pobladores locales mataban a estos animales por temor a su veneno o por supersticiones negativas que los rodean (Beck, 2005; Ariano-Sánchez, 2006). Mediante programas de educación ambiental *in situ*, este riesgo se ha visto disminuido y mucha gente reporta los avistamientos de *H. charlesbogerti* a organizaciones no gubernamentales como Zootropic o la Fundación para las Especies Amenazadas de Guatemala (FUNDESGUA) que trabajan con la especie, en vez de matarlos. Esto ha contribuido a proteger la especie y mejorar el programa de monitoreo de la especie, especialmente en la población de Cabañas (Ariano-Sánchez *et al.*, 2011). Sin embargo, la zona de influencia de estos proyectos se ha visto limitada y las creencias que rodean a esta especie pueden causar su muerte hasta el día de hoy. A pesar de esto, Ariano-Sánchez (2006) estimó que existían entre 200-250 individuos en vida silvestre, pero se sospecha que

el número ha incrementado desde ese entonces o incluso se discute que esta estimación puede no ser acertada. Sin embargo, un número reducido en las poblaciones de *H. charlesbogerti* es también un riesgo. Cuellos de botella en las poblaciones y una consecuente endogamia llevan a la reducción de la diversidad genética de una especie, lo que reduce su aptitud reproductiva por depresión endogámica y reduce sus probabilidades de sobrevivir a fluctuaciones ambientales que puedan ser estresantes o exijan de plasticidad fenotípica (Frankham *et al.*, 2002; Randall *et al.*, 2008). A esto se le suman los procesos estocásticos que reducen la diversidad genética al azar con mayor severidad en poblaciones de menor tamaño y estos ciclos de eventos al azar y endogamia contribuyen a un vórtice de extinción (Höglund, 2009). Además, al vórtice de extinción de poblaciones pequeñas se suma el riesgo del cambio climático, que se presenta como un incremento de la temperatura global, lo que puede alterar la distribución de reptiles tropicales y puede desplazar su nicho térmico (Huey *et al.*, 2009; Sinervo *et al.*, 2010). Situaciones como estas exigen de una alta diversidad genética para poder sobrellevarlas y asegurar la supervivencia de la población. Especies con alta especificidad de nicho, como *H. charlesbogerti*, se encuentran entre las principales amenazadas (Sinervo *et al.*, 2010; Domínguez-Vega *et al.*, 2012).

D. Importancia de la diversidad genética

La diversidad genética es de gran importancia para la supervivencia de una especie. Al aumentar la diversidad genética de una población, aumentan su adaptabilidad y plasticidad fenotípica que le permite superar fluctuaciones ambientales u otras situaciones estresantes (Frankham *et al.*, 2002; Randall *et al.*, 2008). Por esta razón es importante realizar estudios acerca de la diversidad genética de especies que se encuentren en peligro. Se han hecho estudios de diversidad genética en el oso pardo (Paetkau *et al.*, 1998), nemátodos que parasitan escarabajos (McGaughan *et al.*, 2014), alfalfa (Falahati-Anbara *et al.*, 2007) y pasto marino (Ehlers *et al.*, 2008). En el caso del pasto marino (*Zostera marina*), la diversidad genética de esta especie se correlaciona con su resiliencia al calentamiento global (Ehlers *et al.*, 2008). Actualmente, no existen publicaciones acerca de la diversidad genética ni genética de poblaciones para *H. charlesbogerti*. Sin embargo, se cuenta actualmente con un trabajo de tesis en la Universidad del Valle de Guatemala cuyo principal objetivo fue determinar la diversidad genética de la población de *H. charlesbogerti* en Cabañas, Zacapa (Schrei, 2014), utilizando seis marcadores microsatélites aislados por Felton *et al.* (2007), que fueron utilizados con *H. horridum*. Schrei (2014) encontró una diversidad genética promedio muy baja (1.5 alelos por marcador), lo que permite pensar que la población se encuentra en considerable riesgo y es de vital importancia obtener mayor información acerca de la diversidad genética de las demás poblaciones de esta especie para poder contribuir a su conservación. Sin embargo, al ser el *H. charlesbogerti* un animal bastante longevo que llega a vivir hasta 50 años (Beck, 2005), es muy poco probable que la diversidad genética se haya visto reducida tan drásticamente a causa de factores antropogénicos recientes, por lo que se realizará una simulación coalescente que pueda encontrar el momento en que se dio el cuello de botella que redujo la diversidad genética hasta el punto como se encuentra hoy (com. pers. con Thomas Schrei). El uso de marcadores microsatélites es una buena herramienta para la genética de poblaciones ya que su costo es

bajo, cuenta con herencia Mendeliana, sus tasas de mutación son altas debido a susceptibilidad a errores en la meiosis que agregan o reducen la cantidad de repeticiones de pares de bases típicas de estas regiones, lo que permite una mejor resolución temporal en los análisis, y a diferencia de otros métodos, son co-dominantes, lo que permite observar homocigotos y heterocigotos, en vez de presencia o ausencia de distintos patrones como al utilizar técnicas como RFLPs o SNPs (Akemi *et al.*, 2012).

E. Simulaciones coalescentes y detección de cuellos de botella

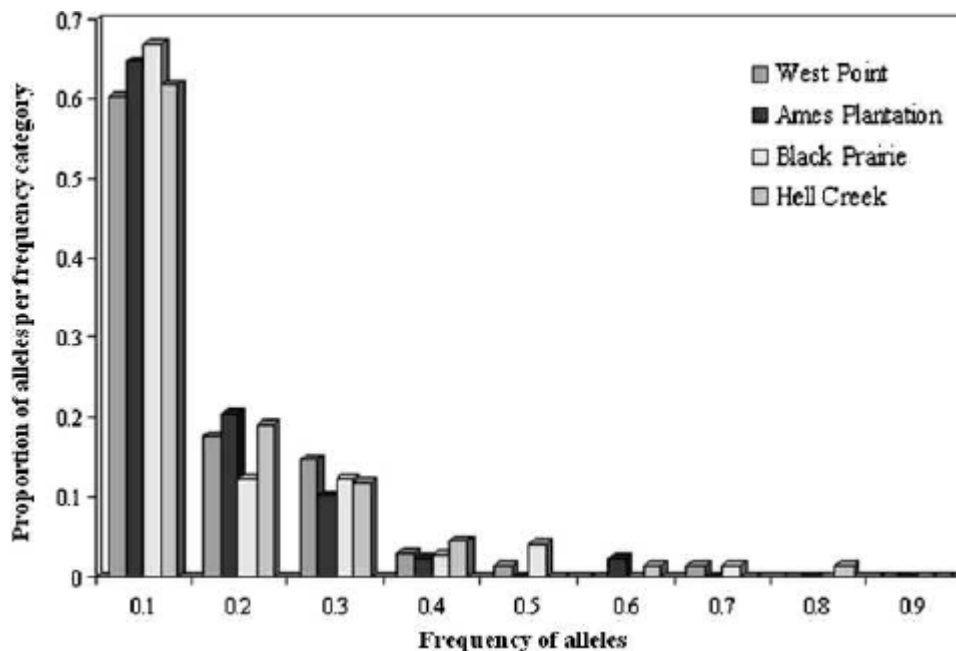
Una simulación coalescente es una manera de analizar datos genéticos de una población o especie. Este método puede utilizar diferentes alelos obtenidos de marcadores microsatélites, y utiliza una simulación de las tasas de mutación que remontan los marcadores al pasado y encuentra al ancestro en común más reciente para los distintos linajes de cada marcador (Kingman, 1984; Williamson, 2005; Funk *et al.*, 2010). Las simulaciones coalescentes combinan pruebas de genealogía con simulaciones de Monte Carlo para describir la genealogía de una población haploide, basándose en el modelo de Wright-Fisher de procesos poblacionales e implementa la fórmula de muestreo de Ewens (Kingman, 1982). A lo largo del tiempo y de los avances en la Genética y la Biología Molecular, estas simulaciones se han adaptado para encontrar cuellos de botella, entendidos como la reducción drástica del tamaño poblacional (Williamson, 2005; Funk *et al.*, 2010), y observar dinámicas poblacionales (Girod *et al.*, 2011) al aplicar nuevos modelos estadísticos.

En conservación, las simulaciones son de especial interés para encontrar cuellos de botella, recientes o antiguos, y poder reconocer la magnitud que tuvo para una especie, ya que esto afecta la diversidad genética de una población. Sin embargo, el modelo coalescente se adapta más a poblaciones en equilibrio y deja de ser eficiente al buscar un cuello de botella poblacional (Williamson, 2005). Existen dos modelos de mutación principales en las cuales se basan las simulaciones para encontrar cuellos de botella: mutación de dos fases (TPM, por sus siglas en inglés) y la mutación por pasos individuales (SMM, por sus siglas en inglés) (Williamson, 2005). La TPM se basa en tener una porción fija de alelos que mutan por pasos individuales, mientras otra porción muta según una distribución geométrica y en más de un paso. En la mutación por pasos individuales, se asume que el 100% de los alelos muta por pasos individuales a una tasa μ igual y constante (Ohta y Kimura, 1973; Williamson, 2005). Basados en estos modelos, surgen los modelos de la L de Luikart *et al.* (1998), la M de Garza y Williamson (2001), la Msvr de Beaumont (1999) y la H_k de Cornet y Luikart (1996) que permiten la detección de cuellos de botella poblacionales a partir de datos de marcadores microsatélites.

La prueba de la L de Luikart se basa en que los alelos raros tienen mayor probabilidad de desaparecer cuando se da un cuello de botella. La prueba toma todos los alelos encontrados y los reparte en diez intervalos de frecuencias, creando intervalos de alelos comunes y raros. Si se encuentra una menor frecuencia en los alelos raros que en todos los demás, la prueba detecta un cuello de botella. En teoría, al

realizar esa distribución de frecuencia de alelos, debería de tomar una forma en L, por lo que al haber un cuello, esta distribución se pierde (Williamson, 2005).

FIGURA 3. Distribución de la frecuencia de alelos normal en L para distintas poblaciones de codorniz norteña (*Colinus virginianus*) donde no existe un cuello de botella



(Evans *et al.*, 2013).

La M de Garza y Williamson (2001) equivale a la proporción entre número de alelos y el rango de tamaños de los alelos. El supuesto de esta prueba es que el número de alelos cambia más rápido que el rango de tamaño durante un cuello de botella. Esto se debe a que el número total de alelos cambia con cada pérdida por deriva genética excesiva, pero solo la pérdida del alelo más pequeño o el más grande generan un cambio en el rango de tamaños. Una simulación genera una M en equilibrio y un intervalo de confianza del 95%. El cuello de botella es detectado cuando M se encuentra por debajo del intervalo de confianza (Williamson, 2005).

La H_k de Cornuet y Luikart (1996) se acopla al modelo de mutación por pasos (SMM) y se basa en que los alelos raros se extinguen más rápido que los comunes durante un cuello de botella, produciendo un exceso de heterocigosidad. La heterocigosidad (H) se forma al restarle a 1 la sumatoria del cuadrado de la frecuencia de k alelos. Esta H se genera mediante simulaciones y se compara con la observada para detectar un cuello de botella (Williamson, 2005).

El método de M_{svar} está basado en probabilidades Bayesianas de similitud y simulaciones de Monte Carlo. Con datos demográficos microsatelitales, este método provee información acerca de la dinámica poblacional al generar probable información demográfica en el pasado utilizando una simulación coalescente (Williamson, 2005). Es decir, este método permite determinar si una población está en

incremento o decremento (Girod *et al.*, 2011). Sin embargo, el método Msvar requiere de un gran poder computacional y el modelo coalescente resulta ser poco adecuado para encontrar cuellos de botella debido a que se adapta de mejor manera a poblaciones en equilibrio, como se mencionó antes (Williamson, 2005).

F. Comparación de métodos de simulación

Muchos estudios se han basado en los modelos anteriores para simular la estructura genética de poblaciones hacia el pasado y encontrar cuellos de botella, como el estudio de Funk *et al.* (2010) con el búho manchado del norte (*Strix occidentalis caurina*). En este estudio, y en los de Williamson (2005), Cornuet y Luikart (1996), y Garza y Williamson (2001) están de acuerdo que la H_k de Cornuet y Luikart es más útil para detectar cuellos de botella recientes y de baja magnitud (Funk *et al.*, 2010). También se ha notado que la M de Garza y Williamson es útil para encontrar cuellos de botella más antiguos y de mayor magnitud (Williamson, 2005; Funk *et al.*, 2010). Además, si se limita el número de alelos en la simulación, Williamson (2005) determina que H_k y M_k son menos susceptibles a errores de tipo I y II (detectar un cuello de botella cuando no lo hubo y no detectar un cuello de botella cuando realmente sí lo hubo, respectivamente). Sin embargo, una sobreestimación de la proporción de alelos que muta por pasos individuales (p_g) y la proporción de alelos cuya mutación queda regida por una distribución geométrica (δ_g), la M_k , que es sensible a estos parámetros, se vuelve susceptible a errores tipo I (Williamson, 2005). En el caso de la H_k , la distribución generada en equilibrio es más eficiente para detectar cuellos de botella cuando se asume TPM. La desventaja de asumir una TPM es que incrementa la probabilidad de caer en errores tipo I si se subestiman p_g y δ_g (Williamson, 2005). Estos errores ocurren por dar parámetros erróneos al modelo de mutación, pero existen otros supuestos que puede producir errores en las simulaciones, como subdivisión de una población, selección diferencial de alelos o la mezcla con otras poblaciones (Williamson, 2005). Por lo tanto, es importante considerar lo anterior a la hora de escoger un método de simulación, pero se debe controlar otros supuestos que puedan alterar el modelo y arrojar resultados erróneos (Williamson, 2005).

G. Rescate genético

La importancia de la diversidad genética para la conservación ha sido de interés relativamente reciente. Esto posiblemente se debe a la novedad de las técnicas y modelos necesarios para aplicar este conocimiento. La obtención de información genética poblacional con marcadores microsatélites ha sido útil en varios casos notables. Algunos ejemplos de su uso son el diagnóstico de la diversidad genética de poblaciones de buitres amenazados (Arshad *et al.*, 2009) y pandas gigantes (Lu *et al.*, 2001), inferir la existencia de flujo genético entre poblaciones de serpientes de cascabel (Bushar *et al.*, 1998) y caracterizar el efecto de cuello de botella en poblaciones de tortugas (Kuo y Janzen, 2004).

La información que puede proporcionar el uso de marcadores microsatélites acerca de la diversidad genética de las poblaciones de una especie puede ayudar a diagnosticar su estado de conservación y describir su diversidad. Esta información también puede ayudar directamente a la toma de decisiones que

pueden convertirse en acciones concretas en el campo de conservación de poblaciones silvestres. Conocer detalladamente el estado genético de las poblaciones de una especie ha permitido tomar acciones que han resultado en esfuerzos exitosos de manejo. Especies altamente amenazadas que han sido diagnosticadas con una diversidad genética reducida son candidatos ideales para una modalidad de manejo que ha sido conocida como “rescate genético”. Este tipo de manejo aumenta el éxito reproductivo y la diversidad genética de una población al introducir organismos inmigrantes. Se ha demostrado que esta estrategia puede tener un impacto positivo en las poblaciones tratadas bajo las condiciones adecuadas (Tallmon *et al.*, 2004). Algunos ejemplos exitosos que cabe mencionar es el manejo genético del lobo de México (Fredrickson *et al.*, 2007) y el manejo de la pantera de Florida (Johnson *et al.*, 2010).

El manejo genético también puede ser implementado en cautiverio, a través de programas de reproducción que aseguren una progenie con diversidad genética elevada. Esto también permite evitar la endogamia que es probable que suceda en poblaciones silvestres reducidas, causando un vórtice de extinción. Este tipo de manejo fue clave en la reintroducción del cóndor californiano a la naturaleza, luego de que los últimos especímenes fueron transferidos a cautiverio en 1987 (Ralls y Ballou, 2004). Con la información obtenida de este estudio, se espera poder tener la evidencia suficiente para poner en marcha un plan de manejo genético para el escorpión, ya sea mediante la introducción de inmigrantes o mediante un programa de reproducción en cautiverio con el objetivo de maximizar la diversidad genética

III. Justificación

El *H. charlesbogerti* es una especie endémica al Valle del Motagua y el único representante de la familia Helodermatidae que se encuentra exclusivamente en Guatemala. La familia Helodermatidae es la única familia de lagartos con glándulas de veneno funcionales en el continente americano, y la distribución restringida de *H. charlesbogerti* lo hace especialmente único, así como vulnerable. Al ser una especie tan única y realmente endémica a Guatemala, la responsabilidad de su manejo y conservación recae a los científicos guatemaltecos y los recursos que tengan disponibles. Por lo tanto, su conservación es de interés para las personas comprometidas con la conservación de la biodiversidad de nuestro país.

Esta especie no solo es importante para la fauna endémica del país, sino también su veneno es de importancia en la investigación farmacológica al contener compuestos que pueden utilizarse para tratar la diabetes y otras enfermedades como el Alzheimer (Eng *et al.*, 1990). Aún hace falta comprender el verdadero potencial de los compuestos presentes en el veneno de las especies de este grupo y esto le suma importancia a su conservación como recurso genético.

La cantidad de individuos y la distribución de sus poblaciones están muy reducidos, al punto que un encuentro en vida silvestre es extremadamente raro. Recientemente, en su trabajo de tesis, Thomas Schrei (2014) determinó la diversidad genética de la población de *H. charlesbogerti* de Cabañas, Zacapa, usando 6 marcadores microsatélites y encontró una diversidad promedio baja (1.5 alelos por *locus*). Esto implica que la viabilidad de la especie se encuentra amenazada la enfrentarse a un posible vórtice de extinción, sin mencionar las implicaciones negativas que puede llegar a tener la endogamia y la homocigocidad en una población silvestre. Una baja diversidad genética puede amenazar la viabilidad de una población silvestre incluso cuando su hábitat se encuentra muy bien preservado debido a efectos depresores de la baja diversidad genética en la vigorosidad de sus individuos. Además, la población puede volverse especialmente vulnerable a situaciones estresantes en su ambiente y en general hacia el cambio climático (Frankham *et al.*, 2002; Randall *et al.*, 2008). Las lagartijas de los trópicos no solo enfrentan amenazas como la pérdida de hábitat, exterminación indiscriminada debido a supersticiones (muy frecuente en el caso de *H. charlesbogerti*, especialmente en aquellos sitios donde las personas no han sido sensibilizada al respecto), extracción ilegal para tráfico de mascotas o contaminación, sino también el desplazamiento de su nicho térmico ideal (Sinervo *et al.*, 2010). Por lo tanto, el cambio climático suma a la necesidad de una diversidad genética alta para asegurar la viabilidad de la especie y tener resiliencia y una buena capacidad de respuesta. Especies como *H. charlesbogerti*, que tienen una especificidad de nicho muy alta (Domínguez-Vega *et al.*, 2012) se ven especialmente amenazadas ante estos cambios.

Un estudio más amplio de las poblaciones, evaluando un mayor número de marcadores, puede proveer información más completa respecto a la diversidad genética de la especie. En la estrategia nacional para la

conservación de esta especie, se especifica que conocer el estado genético de sus poblaciones es de gran importancia. Esto no solo permitiría enriquecer el manejo actual de la especie, sino también generaría datos para poblaciones cuya estructura genética poblacional básica es prácticamente desconocida. Además, el uso de marcadores microsatélites recién publicados y en mayor número, puede generar información adicional y complementaria a la que se tiene acerca de la genética poblaciones de esta especie. Esto permitiría priorizar los esfuerzos de conservación y redirigir recursos para proteger las poblaciones más vulnerables, aumentando la viabilidad de la especie y complementaría a los esfuerzos existentes. Un plan de manejo que sea capaz de aumentar la diversidad genética de la especie es de interés para su futuro, y también podría aplicarse para la conservación de otras especies en riesgo con características poblacionales similares.

IV. Objetivos

A. General

1. Evaluar la diversidad genética de las poblaciones de *H. charlesbogerti* en los municipios de Cabañas y Gualán, así como de los ejemplares en cautiverio, utilizando 12 marcadores microsatélites.

B. Específicos

1. Obtener haplotipos de los ejemplares en cautiverio de *H. charlesbogerti* y sugerir acciones de reproducción *ex situ* para generar individuos de una mayor diversidad genética como medida de conservación.
2. Comparar la diversidad genética de los ejemplares analizados con los resultados obtenidos con los resultados obtenidos de otros estudios (Hess *et al.*, 2013; Schrei, 2014; Zoológico de Atlanta, sin publicar).
3. Evaluar la existencia de un cuello de botella histórico en las poblaciones silvestres analizadas de *H. charlesbogerti* utilizando simulaciones coalescentes y métodos basados en el modelo de Wright-Fisher.
4. Implementar el método de tarjetas FTA (Whatman) para la conservación de tejido sanguíneo y la posterior extracción de ADN para generar resultados replicables en el caso de esta especie.

V. Metodología

A. Hipótesis y variables

Las hipótesis del estudio son:

- La diversidad genética promedio de las poblaciones de *H. charlesbogerti* será menor a 5 alelos por marcador microsatélite
- Los ejemplares en cautiverio, tanto en Guatemala como en el zoológico de Atlanta presentan haplotipos que pueden generar individuos con una diversidad genética mayor al promedio.
- Las poblaciones de *H. charlesbogerti* del Valle del Motagua han sufrido al menos un cuello de botella a lo largo de su historia.

Las principales variables que se midieron en el experimento son la riqueza de alelos por marcador, la longitud de los fragmentos amplificados, la localidad de colecta de los individuos muestreados y datos geográficos del sitio de colecta. Estos datos permitieron realizar el análisis de genética poblacional, el análisis geográfico de las poblaciones de la especie y las simulaciones que pueden detectar cuellos de botella poblacionales.

B. Métodos

1. **Muestras.** Las muestras obtenidas son muestras de sangre de *H. charlesbogerti*. La sangre fue extraída por investigadores capacitados y se almacenó en tarjetas FTA (Whatman). Se obtuvieron muestras de las poblaciones de Cabañas, de Gualán y de la población en cautiverio en distintas colecciones del país. También se trabajó con las muestras de ADN proveniente de hisopados de saliva, tomadas por Schrei (2014). Estas muestras corresponden a 22 individuos de la población de Cabañas y se analizaron con 12 marcadores microsatélites nuevos, distintos a los seis que ya fueron utilizados. Las muestras de sangre fueron destinadas para la extracción de ADN y su posterior amplificación con marcadores microsatélites. Las muestras de tejido sanguíneo en las tarjetas FTA fueron almacenadas a temperatura ambiente y depositadas en las Colecciones de Referencia de la Universidad del Valle de Guatemala para su uso en futuros estudios y su adecuado almacenamiento.

2. **Toma de muestras.** Se tomaron muestras de sangre de los individuos que fueron reportados o colectados por los proyectos de conservación de la zona durante todo el año 2014 y 2015. Usualmente, las personas de las comunidades aledañas a las poblaciones de *H. charlesbogerti*, quienes han sido incluidas en los programas de educación ambiental efectuados por organizaciones que investigan a la especie en la zona, reportan los hallazgos de la especie al personal para que se llegue a colectar al animal. Estos se midieron, se pesaron y se les colocó un chip subcutáneo para su futuro monitoreo, si es que no se trataba de una recaptura. Este monitoreo se hace por personal de los proyectos de conservación de la especie que operan

con licencias de investigación del Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP). Se optó por evitar exponer a las personas de las comunidades a riesgos innecesarios al manejar a estos animales, por lo que se propusieron nuevas metodologías de búsqueda, como caminatas *in situ* por los investigadores. Se tomaron muestras de sangre de los organismos colectados con jeringas veterinarias desechables. Se obtuvo alrededor de 1 mL de sangre de la vena caudal y se conservó en tarjetas FTA (Whatman)¹ a temperatura ambiente. Las personas que tomaron las muestras de sangre fueron capacitadas por un veterinario del Zoológico de Atlanta especializado en el manejo de reptiles. Se cuenta con permisos de colecta e investigación extendidos por CONAP para este proyecto así como la autorización del Comité de Ética en Cuidado y Uso Animal (CEUCA) de la Universidad del Valle de Guatemala (ver Anexos). Se tomaron 11 muestras nuevas y se preservaron con este método. Diez de estas muestras provienen de individuos en cautiverio y una proviene de un individuo de la población de Gualán. A las muestras de cautiverio se les asignó la denominación C1-C10 y se debe contactar al autor si se desea conocer más acerca de estos ejemplares. Las muestras se guardaron en bolsas “zip-lock”, a temperatura ambiente hasta ser utilizadas para la extracción de ADN.

3. Extracción de ADN. Para la extracción de ADN, se utilizó un método de extracción orgánico. Se experimentó con uno, dos y cinco discos de 2 mm de diámetro, obtenidos con un “puncher” específico para uso en tarjetas FTA, que se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se le agregó 500 µL de buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM y SDS 2%) junto con 20 µL de solución de proteinasa K (20 mg/mL) y se maceraron. Cada tubo se mezcló por inversión y se dejó incubar a 56°C por seis horas. Luego, se añadió un volumen de fenol y se mezcló por inversión o “vórtex”. Cada tubo se centrifugó a 14,000 rpm por diez minutos a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante, el cual se trasladó a un microtubo de 1.5 mL nuevo. A esto se agregó 500 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión y se volvió a centrifugar a 14,000 rpm por diez minutos. Se recuperó el sobrenadante y se trasladó a un tubo nuevo de 1.5 mL. Se le agregaron 50 µL de acetato de amonio 3M y 800 µL de isopropanol. Cada tubo se colocó a precipitar por toda la noche a -20°C. Luego de precipitar el ADN, se centrifugó por 30 minutos para recuperar el pellet y decantar el líquido. Al pellet se le agregaron 800 µL de etanol al 70% y se centrifugó por 20 minutos a 14,000 rpm. El tubo se dejó abierto a temperatura ambiente y se esperó a que los remanentes de etanol se evaporaran y el pellet quedara seco. Como alternativa, se colocaron los tubos en un horno a 50°C para que el pellet se secase rápidamente. Por último, el pellet se resuspendió en 30 µL de agua bidestilada estéril o buffer TE. El volumen puede variar dependiendo del tamaño del pellet observado. Se cuantificó la concentración y su pureza (contaminación por proteínas) mediante espectrofotometría utilizando las ecuaciones 1 y 2, con una dilución de 1:20.

$$[ADN] = (A_{260} - A_{230}) * 20 * 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

¹ Tarjetas de papel filtro que preserva la sangre evitando la acción de nucleasas o cualquier degradación del material genético y existe un protocolo de extracción de ADN para la sangre preservada de este modo para un posterior análisis.

Ecuación 1. Cuantificación de la concentración de ADN (ng/ μ L)

$$Pureza = \frac{(A_{260} - A_{230})}{(A_{280} - A_{230})}$$

Ecuación 2. Determinación de la pureza de la solución de ADN

El tubo se guardó en refrigeración (4°C). La solución que resultó de la extracción se visualizó en un gel de agarosa para asegurar una buena integridad del ADN extraído, cargando 4 μ L de la muestra en un pozo. El gel se corrió por 45 minutos a 90 V. Si se observaban bandas fuertes en la parte superior del gel, se confirmaba una buena integridad del ADN extraído.

Para llegar a obtener el protocolo optimizado, se experimentó con la cantidad de discos, como se explica anteriormente. También se experimentó con el tiempo de digestión de las muestras en solución de lisis y con el tiempo de precipitación del ADN. Para comparar las distintas pruebas entre uno, dos o cinco discos, habiendo optimizado el resto del procedimiento, se utilizó una prueba t de Student pareada. Con los resultados de esta prueba, se logró determinar qué cantidad de discos era óptima. Estas pruebas se realizaron para las muestras disponibles al momento de realizar la comparación.

4. Amplificación de marcadores microsatélites. En total, se trató de amplificar 13 marcadores que surgieron de una caracterización de marcadores en *H. suspectum* por Hess *et al.* (2013). Este estudio generó 18 sitios amplificables, pero *H. horridum* amplificó únicamente 13 de ellos. Un marcador fue descartado por la dificultad que presentó su amplificación. Para lograr la amplificación en todas las muestras, se utilizó una mezcla de PCR convencional a un volumen final de 12.5 μ L a los que se adiciona la solución de ADN. La mezcla del PCR utilizada es la siguiente:

Taq polimerasa (Novagen NovaTaq 0.04U/ μ L), cebadores (0.5 μ M de cada uno), buffer para amplificación (1X), MgCl₂ (2.5 mM), dNTPs (0.2 mM cada nucleótido) y solución de ADN nuclear (50 ng).

El ciclo térmico para la amplificación consistió de desnaturalización inicial a 95°C por cinco minutos; 10 ciclos con desnaturalización a 95°C por 45 segundos, temperatura de anillamiento entre 60 y 51°C por 45 segundos, disminuyendo en un grado por ciclo y extensión a 72°C por 45 segundos; 30 ciclos con anillamiento a 50°C; y extensión final a 72°C por diez minutos.

5. Visualización y análisis de productos amplificados. A cada producto se le agregó 10 μ L de solución de carga o “stop mix” (0.2% p/v de xilen-cianol FF, 0.2% p/v de azul de bromofenol, 2% v/v de EDTA 0.5 M, 3% v/v de agua destilada y 95% v/v formamida desionizada). Se corrieron geles de poliacrilamida al 12% de tamaño pequeño para determinar si existió amplificación o no. Se llenó la cámara con solución TBE 1X hasta la marca indicada. Se cargó 4 μ L del producto con “stop mix” por pozo. Estos geles se corrieron utilizando amperaje constante, aplicando 15 mA por gel. Al terminar la corrida, los geles

se fijaron con 150 mL de ácido acético al 10% durante 20 minutos. Luego de la fijación, se lavaron tres veces con agua destilada, dos minutos por lavado. Luego de los lavados, se pasó a la solución de tinción (8.83 mM AgNO₃, 0.15% v/v de formaldehído al 37%) por 30 minutos. Se descartó la solución de tinción, se dio un lavado de alrededor de 10 segundos con agua destilada y se agregó la solución de revelado (0.283 M de carbonato de sodio, 0.15% v/v de formaldehído y 0.0052% v/v de tiosulfato de sodio al 10%). La presencia o ausencia de bandas aproximadamente del peso esperado indicó el éxito de la amplificación.

Para el análisis de alelos, se corrieron geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes, usualmente utilizados para secuenciación, con los productos obtenidos, ya que proveen una mejor resolución para determinar el tamaño de los segmentos amplificados. Estos geles se corrieron en una cámara de secuenciación a un poder máximo de 100 W durante 4 horas. Previo a cargar el gel, este debe calentarse a 55°C aumentando la cantidad de watts de la fuente de poder, usando entre 120-130 W. Las muestras a cargar fueron desnaturizadas al colocarse cinco minutos a 95°C e inmediatamente transferidas a hielo. El procedimiento de revelado comienza por la fijación en 1.5 L de solución de ácido acético al 10%. Luego se lava por 10 minutos en agua destilada. Se traslada el gel a 1.5 L de solución de tinción (8.83 mM AgNO₃, 0.15% v/v de formaldehído al 37%) por 30 minutos. Luego, se pasa 10 segundos por agua destilada sin uso previo, y por último se traslada a 1.5 L de solución de revelado (0.283 M de carbonato de sodio, 0.15% v/v de formaldehído y 0.0052% v/v de tiosulfato de sodio al 10%). Cada paso se realiza en una bandeja de plástico rotulada específicamente. El gel debe ser fotografiado para su posterior análisis, tratando de que el lente esté completamente paralelo al gel. La longitud de las bandas se calculó mediante el uso de GelAnalyzer, que utilizó la escalera de masa molecular como referencia de la distancia de migración de fragmentos de ADN de diferentes longitudes de pares de bases. El programa generó una curva de calibración mediante los pesos moleculares ingresados para la escalera y la distancia de migración de cada banda. La ecuación generada para esta curva de calibración es aplicada a la distancia que migró cada una de las bandas de los productos que se midieron y así se obtuvo el peso molecular de cada producto. Una explicación y discusión más detallada de esta metodología puede encontrarse en Schrei (2014).

C. Análisis poblacional general

El análisis de genética poblacional general se refiere al cálculo de índices de heterocigosidad y riqueza de alelos en las poblaciones. Se obtuvo la riqueza de alelos promedio para cada población con la siguiente fórmula. En la fórmula, n representa la cantidad de alelos de k marcador, mientras N representa la cantidad de marcadores utilizados en el análisis de la población.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i}{N}$$

Ecuación 3. Promedio de alelos por marcador para una población analizada de tamaño N

Luego de eso, se calculó la frecuencia de cada alelo por cada marcador al obtener la proporción de la población total de alelos analizada N que contaba con el alelo i .

$$f_i = \frac{n_i}{N}$$

Ecuación 4. Frecuencia del i ésimo alelo.

Para cada marcador, se calculó la heterocigosidad observada y la heterocigosidad esperada, según Nei (1987), utilizando las siguientes fórmulas. La heterocigosidad observada (H_o) se obtiene dividiendo la cantidad de genotipos heterocigotos (h) del marcador a analizar por la cantidad de genotipos analizados (N) en la ecuación 5.

$$H_o = \frac{h}{N}$$

Ecuación 5. Heterocigosidad observada en una población analizada de tamaño N

La heterocigosidad esperada (H_e) se obtiene con la ecuación 4, donde N es la cantidad de genomas haploides evaluada y f es la frecuencia el i ésimo alelo por cada marcador (Nei, 1984).

$$H_e = \left(\frac{N}{1 - N} \right) \left(1 - \sum_{i=1}^k (f_i)^2 \right)$$

Ecuación 6. Heterocigosidad esperada para una población de tamaño N

Una vez obtenida la heterocigosidad esperada y observada, se calculó el coeficiente de endogamia para cada marcador (F), utilizando la siguiente ecuación.

$$F = \frac{H_e - H_o}{H_e}$$

Ecuación 7. Coeficiente de endogamia para una población analizada

Estos análisis otorgaron información general acerca de la estructura genética de las poblaciones de la especie y permiten evaluar el riesgo al que están sometidas. Para realizar este análisis se utilizó R y SPSS (IBM).

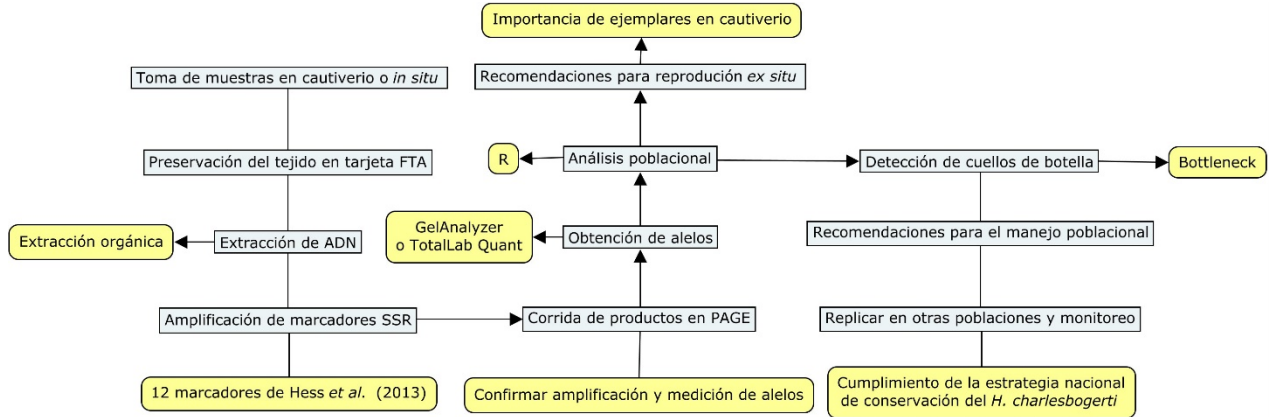
D. Detección de cuellos de botella

La detección de cuellos de botella se realizó mediante simulaciones computacionales basadas en el modelo poblacional de Wright-Fisher y diferentes modelos de mutación (IAM, SMM y TPM) derivados del modelo coalescente. La prueba se realizó con el programa Bottleneck (Cornuet y Luikart, 1997). La simulación se realizó para los tres modelos. Para el TPM, se utilizaron los parámetros de proporción de

SMM en el $TPM = 0.000$ y la varianza de la distribución geométrica para $TPM = 0.36$. La simulación corrió 1000 iteraciones y generó una prueba de signos, una prueba de diferencias estandarizadas, una prueba de rangos con signo de Wilcoxon y una prueba de distribución en L (L de Luikart). Esta simulación se hizo exclusivamente con los datos de la población de Cabañas utilizando los doce marcadores analizados, de los cuales ocho son polimórficos. La hipótesis nula en cada una de las pruebas es que la muestra cumple con el equilibrio en deriva mutacional de cada uno de los modelos.

E. Diagrama de la metodología

FIGURA 4. Diagrama de la metodología del proyecto.



VI. Resultados

A. Extracción de ADN

Como parte de los objetivos específicos de la investigación, se planteó evaluar el uso de tarjetas FTA como método de almacenamiento de tejido sanguíneo y su efectividad a la hora de extraer ADN del tejido preservado en ellas. Para esto, se utilizaron las muestras tomadas para individuos de cautiverio y el individuo de Gualán. A continuación, en el cuadro 1, se presenta el rendimiento de la extracción con un solo disco.

CUADRO 1. Rendimiento y pureza de la extracción de ADN en duplicado a partir de sangre preservada en tarjetas FTA, usando un disco.

Muestra	ng/μL	Pureza	ng/μL	Pureza
C1	10	2	40	2
C2	25	1.67	55	2.22
C3	60	2	145	2.23
C4	20	2	45	2.25

Se observa que el rendimiento es usualmente bajo, y no siempre se obtuvo suficiente ADN como para poder trabajar, ni siquiera cuantificar. Muchas veces el rendimiento fue tan bajo que el espectrofotómetro utilizado no pudo detectar ADN. En una ocasión, se decidió probar una extracción con dos discos macerados. En este caso, se extrajo ADN del tejido de los individuos provenientes del Zoológico La Aurora, hembra y macho. El rendimiento fue de 130 ng/ μ L (1.85 de pureza) y 97 ng/ μ L (1.84 de pureza), respectivamente. Estos resultados no pudieron replicarse en futuros intentos. Consecuentemente, se decidió aumentar el número de discos a cinco, y macerarlos. Esto generó los siguientes resultados (ver cuadro 2).

CUADRO 2. Rendimiento y pureza de la extracción de ADN a partir de sangre preservada en tarjetas FTA, usando cinco discos.

Muestra	ng/μL	Pureza
C1	135	2.1
C2	95	2.1
C3	145	1.9
C4	120	2.2
L	160	2.1
C5	30	3.0
C6	110	2.2
C7	125	2.1
C8	225	2.0
C9	105	1.9
C10	95	1.9

Al utilizar cinco discos y macerarlos en la solución de extracción, los rendimientos resultaron más altos. La pureza del ADN obtenido también se encontró en valores óptimos para poder amplificar exitosamente durante reacciones de PCR. En el caso de la muestra M326, es posible que el rendimiento haya sido bajo al perder el pellet. Sin embargo, se contaba con otras soluciones para esta muestra que se utilizó para una prueba inicial de extracción y presentó un rendimiento de 85 ng/ μ L y pureza de 4.5. Con este método, se obtuvieron los rendimientos más altos del proyecto y de manera relativamente consistente.

Para poder comparar los métodos de extracción utilizados (un disco versus cinco discos macerados) se realizó una prueba t de Student pareada. Sin embargo, el protocolo con un solo disco se implementó cuando aún no se contaba con el total de las muestras de cautiverio ni la muestra que se tomó a un individuo de Gualán, por lo que no pudieron utilizarse para esta prueba. La primera comparación fue entre el primer intento con un solo disco (segunda columna del Cuadro 1) y los resultados para las mismas muestras presentadas en el Cuadro 2. La prueba t dio un valor de $p=0.004$, menor al $\alpha=0.05$, por lo que la diferencia fue significativa. Para la segunda prueba, el segundo intento de extracción con un disco (cuarta columna del Cuadro 1) se comparó con los mismos datos del Cuadro 2. La prueba t dio un valor de $p=0.086$, mayor al $\alpha=0.05$, por lo que la diferencia no fue significativa, a pesar de tener rendimientos más altos. A partir de esto, se determinó que el protocolo utilizado para la extracción con cinco discos macerados produce mejores resultados en la extracción de ADN al tratarse de muestras de tejido sanguíneo conservadas en tarjetas FTA (Whatman).

B. Amplificación y medición de alelos

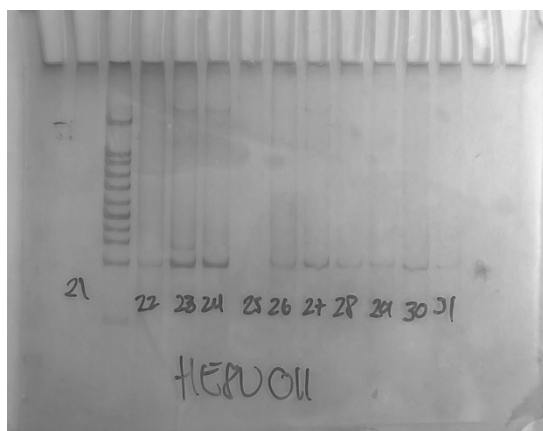
Para este estudio se utilizaron 33 muestras, 22 de ellas fueron tomadas por Thomas Schrei en la población silvestre de Cabañas, quien realizó la extracción de ADN y permitió su uso en este estudio. Las 11 restantes fueron tomadas de 10 individuos de cautiverio y un individuo silvestre, proveniente de Gualán. Estas últimas 11 muestras provienen de flebotomías y la sangre obtenida se preservó en tarjetas FTA. El ADN de estas muestras se extrajo con el protocolo de extracción con solventes orgánicos establecido como el más efectivo en la sección anterior. Se procedió a amplificar estas 33 muestras con 12 marcadores moleculares SSR publicados por Hess *et al.* (2013). A continuación se presenta el éxito que se tuvo en la amplificación con cada uno de los marcadores utilizados (ver Cuadro 3).

CUADRO 3. Porcentaje de productos de amplificación obtenidos de la PCR por cada marcador utilizado.

Marcador	% amplificado
HESU001	100
HESU002	100
HESU004	93.94
HESU006	93.94
HESU007	90.91
HESU008	100
HESU009	93.94
HESU010	100
HESU011	72.73
HESU012	100
HESU013	90.91
HESU016	100
TOTAL	94.70

Se contaba con 33 muestras a amplificarse con 12 marcadores, resultando en un total de 396 productos de amplificación posibles. De estos, se obtuvieron 375 (94.7%). Los 21 productos restantes nunca pudieron amplificarse de manera adecuada, a pesar de intentar con reactivos completamente nuevos. Estos productos recalcitrantes pertenecen principalmente al marcador HESU011, que fue especialmente problemático. Este marcador también tuvo la peculiaridad de tener bandas de un tamaño muy distinto a las observadas cuando se generaron los marcadores. Esto se discutirá en la sección correspondiente.

Se comprobó la amplificación mediante PAGE, usando geles pequeños al 12%. Estos no fueron utilizados para la medición del tamaño de alelos. A continuación se presenta un ejemplo de estos geles.

**FIGURA 5.** Gel de poliacrilamida al 12% donde se visualizaron productos de amplificación.

En este gel se pueden observar productos pertenecientes al marcador HESU011. La presencia de una banda de aproximadamente el peso esperado se consideraba como una amplificación exitosa. Estas muestras eran almacenadas con “Stop Mix” a 4°C para poder realizar la medición mediante PAGE en vidrios de 50 cm, originalmente usado para la secuenciación Sanger, donde era posible medir los alelos producidos con una resolución mucho mayor. Estos geles permiten diferenciar entre alelos que tengan diferencia de dos, tres o cuatro pares de bases en su tamaño (escalera 100 bp, Promega) (Summer *et al.*, 2009).

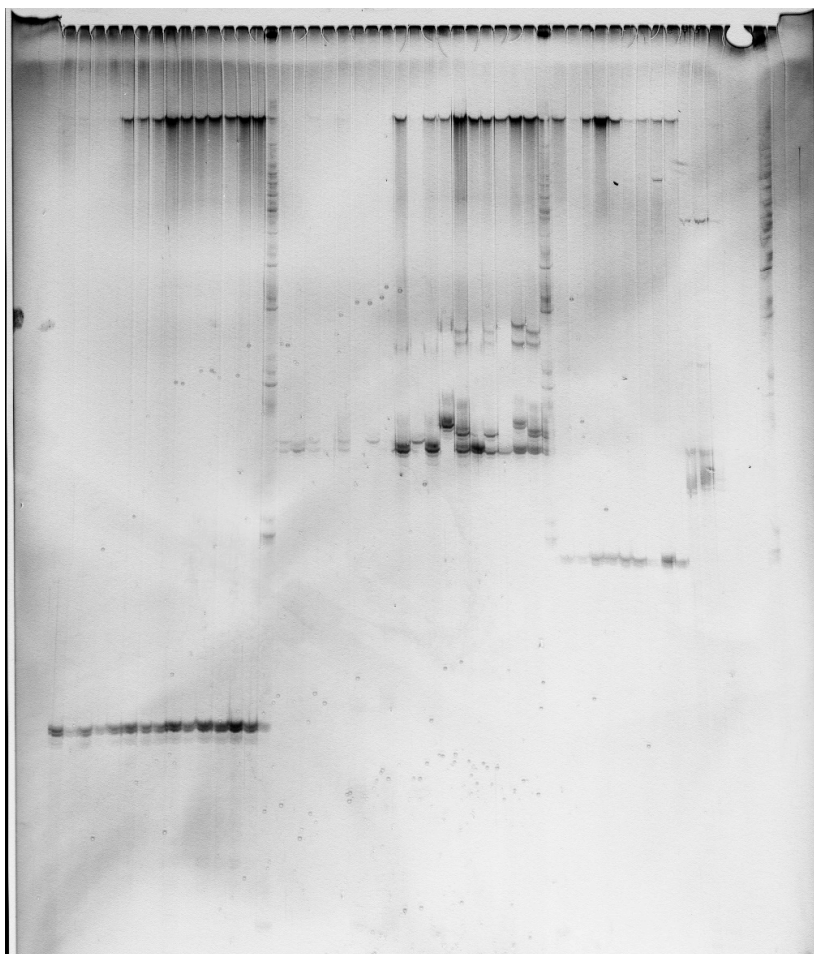


FIGURA 6. Gel de poliacrilamida para la medición de alelos y su mapa de carga.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
4.2	18.2	19.2	C1.2	C2.2	C3.2	C4.2	L.2	C5.2	C6.2	C7.2	C8.2
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C9.2	C10.2	E	4.7	3.7	21.7	26.7	29.7	30.7	31.7	C1.7	C2.7
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
C3.7	C4.7	L.7	C5.7	C6.7	C7.7	C8.7	C9.7	C10.7	E	C1.11	C2.11
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
C3.11	C4.11	L.11	C5.11	C6.11	C7.11	C8.11	29.4	30.4	31.4	-	-

Este gel se utilizó para resolver los alelos de muestras de los marcadores HESU002, HESU007, HESU011 y HESU004, como puede verse en el mapa de carga. La identidad que se muestra es el código de muestra y el número de marcador luego del punto. Estos gels se usaron para medir los alelos del estudio, presentados en el siguiente cuadro (ver Cuadro 4).

CUADRO 4. Alelos identificados para los marcadores HESU001-HESU008 para todas las muestras.

Muestra	HESU001	HESU002	HESU004	HESU006	HESU007	HESU008
3	153	131	216	141	250	216
4	153	131	216	141	244	216
5	153	131	216	-	244	216
7	153	131	219/225	141	244	219
8	153	131	216	141	244	216/219
11	153	131	216/222	141	244	216
15	153	131	216/222	141	238	216
16	153	131	216	141	238	216
18	153	131	216/222	141	238	216
19	153	131	216	-	244/250	216
20	153	131	216	141	244	216
21	153	131	-	141	-	216
22	153	131	216	141	244	216
23	153	131	219	141	244	216
24	153	131	219	141	244	216
25	153	131	222	141	244	216
26	153	131	216	141	244	216
27	153	131	219	141	238	216
28	153	131	222	141	-	216
29	153	131	216/222	141	244	216
30	153	131	216/219	141	244	216
31	153	131	219	141	244	216
C1	153	131	-	141	238	216
C2	153	131	216	141	244	216
C3	153	131	213/219	141	238	216
C4	153	131	219	141	259	216
L	153	131	219	141	238/253	216
C5	153	131	216	141	238	216
C6	153	131	216	141	-	216
C7	153	131	216/228	141	238/253	216
C8	153	131	216/231	141	238	216
C9	153	131	228	141	238/259	216
C10	153	131	216/228	141	238/253	216

CUADRO 5. Alelos identificados para los marcadores HESU009-HESU016 para todas las muestras.

Muestra	HESU009	HESU010	HESU011	HESU012	HESU013	HESU016
3	240	252	164	252	169/173	207
4	-	252	164	252	173	207
5	240	252	-	252	173	207
7	240	252	-	252	173	207
8	240	252	-	252	169/173	207/213
11	240	252	164	252	169/173	207
15	240	252	-	252	173	204/207
16	-	248	-	252	173	207
18	240	252/260	164/222	252	173	207
19	240	252	-	252	-	207
20	240	252	164	252	173	207
21	240	248	-	252	173	207
22	240	252	164	252	173	207
23	240	252	164/219	252	173	204/207
24	240/249	260	164	252	173	207
25	240	252	164/219	252	173	207
26	240	252	164	252	173	207
27	240	248/260	164	252	173	207
28	240/249	252	164	252	169	207
29	240/249	252/260	164	252	169/173	207
30	240/249	252/260	164	252	173	207
31	240	248/260	164	252	169/173	207
C1	240	260	164	252	173	207
C2	240	248/252	164	252	173	207
C3	240	252	164	252	173	207
C4	243	252	164	252	173	207
L	240	248/260	164	252	169	207
C5	240	252/260	-	252	-	207
C6	240	248	164	252	-	207
C7	240	252/260	-	252	165/173	207
C8	240	252	164	252	169/173	207
C9	240	260	164	252	173	207
C10	240	252	164	252	173	207

Las muestras representadas por números del 3-31 provienen de la población de Cabañas. La muestra nombrada “L” es el individuo que se obtuvo de la población de Gualán. El resto de muestras son de individuos de cautiverio. Las casillas donde se encuentra un solo tamaño corresponden a homocigotos, mientras que los que tienen dos tamaños divididos por una diagonal corresponden a heterocigotos. Las casillas que contienen un guión corresponden a productos recalcitrantes.

Es importante destacar que muchas de las medidas del tamaño de los alelos son consistentes con los tamaños presentados en Hess *et al.* (2013). Si no coinciden directamente, la variación es consistente con la de los tamaños reportados. La excepción es el marcador HESU011, donde existe una gran diferencia entre el tamaño reportado (225) y el medido (164), con excepción de algunos heterocigotos en donde se encuentran bandas del peso reportado. Sin embargo, son tan pocos que se consideran alelos raros, como se evidencia a continuación. Estos alelos raros brindan información importante. Por ejemplo, el individuo analizado de Gualán (L) tiene un alelo que no se encuentra en Cabañas para el marcador HESU007, que se repite en C7 y C10, que también son individuos de cautiverio. Para este mismo marcador, C4 y C9 presentan el alelo 259, que difiere de Cabañas también. En el caso de HESU004, los individuos C7, C9 y C10 presentan el alelo 228, que no se encuentra en Cabañas. De igual manera, el individuo C8 presente el alelo 231, ajeno a Cabañas.

C. Genética poblacional

Para el análisis poblacional, se manejaron los datos obtenidos de dos formas. La primera forma fue tomar todo el cúmulo de datos e interpretarlo como una sola población. Esto se debe a que se sabe poco de la procedencia de los individuos de cautiverio y no se tenía una muestra representativa de ninguna otra población. Además, varios individuos de cautiverio provienen, o se cree que provienen, de la población de Cabañas. La segunda forma de trabajar el análisis fue directamente con la población de Cabañas. Esto excluyó las muestras de cautiverio y al individuo de Gualán. Inicialmente, se identificó los alelos de cada marcador y su frecuencia. A continuación se presentan los marcadores polimórficos para ambos grupos.

CUADRO 6. Alelos y frecuencia alélica para los marcadores polimórficos en el conjunto de datos completo.

Marcador	Alelos	Frecuencia	Alelos raros
HESU004	213	0.016	3
	216	0.516	
	219	0.242	
	222	0.129	
	225	0.016	
	228	0.065	
	231	0.016	
HESU007	238	0.333	3
	244	0.517	
	250	0.050	
	253	0.050	
	259	0.050	
HESU008	216	0.955	1
	219	0.045	
HESU009	240	0.903	1
	243	0.032	
	249	0.065	
HESU010	248	0.152	0
	252	0.636	
	260	0.212	
HESU011	164	0.938	2
	219	0.042	
	222	0.021	
HESU013	165	0.017	1
	169	0.167	
	173	0.817	
HESU016	203	0.030	2
	207	0.955	
	213	0.015	

El marcador más polimórfico en todo el conjunto de muestras es HESU004 con un total de 7 alelos tanto para los organismos de Cabañas como para los de cautiverio y el individuo de Gualán. Las frecuencias son muy variables y en marcadores como HESU008, HESU009 y HESU016, se observan alelos muy dominantes con frecuencias mayores al 0.9. En contraste, se encontraron uno o más alelos raros en todos los marcadores, a excepción de HESU010. Los alelos raros tienen una frecuencia menor al 0.05. El promedio global de alelos por marcador para todos los individuos del estudio es de 2.75.

CUADRO 7. Alelos y frecuencia alélica para los marcadores polimórficos para la población de Cabañas.

Marcador	Alelos	Frecuencia	Alelos raros
HESU004	216	0.548	1
	219	0.238	
	222	0.190	
	225	0.024	
HESU007	238	0.200	0
	244	0.725	
	250	0.075	
HESU008	216	0.932	0
	219	0.068	
HESU009	240	0.900	0
	249	0.100	
HESU010	248	0.136	0
	252	0.705	
	260	0.159	
HESU011	164	0.900	1
	219	0.067	
	222	0.033	
HESU013	169	0.167	0
	173	0.833	
HESU016	204	0.045	2
	207	0.932	
	213	0.023	

Al analizar específicamente la población de Cabañas, la cantidad de alelos raros se reduce. Existe un alelo raro en HESU004 y dos en HESU016. Esto no sólo se debe a que existen alelos raros en los individuos de cautiverio, sino que también la reducción del tamaño de la muestra cambia las frecuencias alélicas y algunos alelos raros en el conjunto completo de datos alcanzan una frecuencia mayor al 0.05. Sin embargo, es evidente que existen marcadores donde existen alelos altamente dominantes como HESU008 y HESU009. De igual manera, existe una gran dominancia por el alelo “207” para el marcador HESU016. El promedio de alelos por marcador para la población de Cabañas resulta ser de 2.25, mientras que para los individuos de cautiverio, este dato es de 2 alelos por marcador.

A partir de los datos de alelos y su frecuencia, se calculó la heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e , según Nei, 1987). En base a estos datos, se calcularon coeficientes de endogamia (F). Este cálculo se realizó tanto como para todo el conjunto de individuos analizados, así como para los individuos silvestres de Cabañas. Ambos cálculos se muestran en los siguientes dos cuadros.

CUADRO 8. Heterocigosidad observada, esperada (según Nei, 1987) y coeficientes de endogamia para los marcadores polimórficos para el conjunto de individuos analizados.

Marcador	N	He	Ho	F
HESU004	62	0.664	0.323	0.514
HESU007	60	0.625	0.167	0.733
HESU008	66	0.088	0.030	0.656
HESU009	62	0.182	0.129	0.291
HESU010	66	0.535	0.273	0.490
HESU011	48	0.121	0.125	-0.029
HESU013	60	0.310	0.233	0.248
HESU016	66	0.089	0.091	-0.021

CUADRO 9. Heterocigosidad observada, esperada (según Nei, 1987) y coeficientes de endogamia para los marcadores polimórficos para los individuos silvestres de Cabañas.

Marcador	N	He	Ho	F
HESU004	42	0.621	0.286	0.540
HESU007	40	0.440	0.050	0.886
HESU008	44	0.130	0.045	0.650
HESU009	40	0.185	0.200	-0.083
HESU010	44	0.470	0.227	0.517
HESU011	30	0.191	0.200	-0.048
HESU013	42	0.285	0.238	0.163
HESU016	44	0.132	0.136	-0.032

En estos últimos dos cuadros, se muestran los datos de heterocigosidad esperada y observada, con lo que se calculó el coeficiente de endogamia. La columna “n” corresponde a la cantidad genomas haploides analizados. Se puede observar que tanto para el conjunto de individuos del estudio, así como para la población de Cabañas, la mayoría de marcadores polimórficos, especialmente los que tienen una heterocigosidad esperada alta (entiéndase los más informativos) muestran coeficientes de endogamia positivos y de alta magnitud. Esto indica deficiencias de heterocigosidad y un proceso de endogamia evidente. Los coeficientes de endogamia negativos corresponden a marcadores en donde la heterocigosidad esperada es baja, pero se observa un exceso de heterocigosidad mínimo, lo que resulta en un F negativo y pequeño. Estos marcadores también son aquellos que tienen alelos muy dominantes, con frecuencias iguales o mayores a 0.9. La excepción a esto es el marcador HESU008, que tiene únicamente un heterocigoto, por lo que existe una fuerte deficiencia ante la heterocigosidad esperada. Posteriormente, se calculó el estadístico FIS, pero resultó ser muy similar al coeficiente calculado con los datos anteriores, por lo que se decidió utilizar F y obtener conclusiones de este dato.

Como parte del análisis de los alelos obtenidos, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés). Este análisis representa en un espacio bidimensional un resumen del

comportamiento de los individuos analizados al usar los 12 marcadores analizados como variables que generan un hiper-volumen. Los dos ejes con los que se representa el PCA son generados a partir de un análisis de qué factores, o marcadores en este caso, determinan en mayor proporción la distribución de los individuos analizados en la gráfica. Por lo tanto, el PCA es una representación en dos dimensiones de las similitudes y diferencias entre los individuos analizados a partir de la información de sus alelos. Para estos análisis, se excluyó el marcador HESU011, puesto a que la amplificación se dio únicamente en el 72.7% de las muestras y las variaciones en sus alelos parecen no cumplir la mutación típica de las regiones de microsatélites a través del deslizamiento y reacomodo de la hebra (Akemi et al., 2012), sino que parece haber sufrido un evento de recombinación (esto se discutirá en la sección pertinente). Debido a estas peculiaridades, el incluir este marcador generó ruido en los resultados y cambió su interpretación. Para poder generar la siguiente figura, se priorizó aquellos marcadores polimórficos que presentan un comportamiento más convencional. El resultado de este análisis se presenta a continuación.

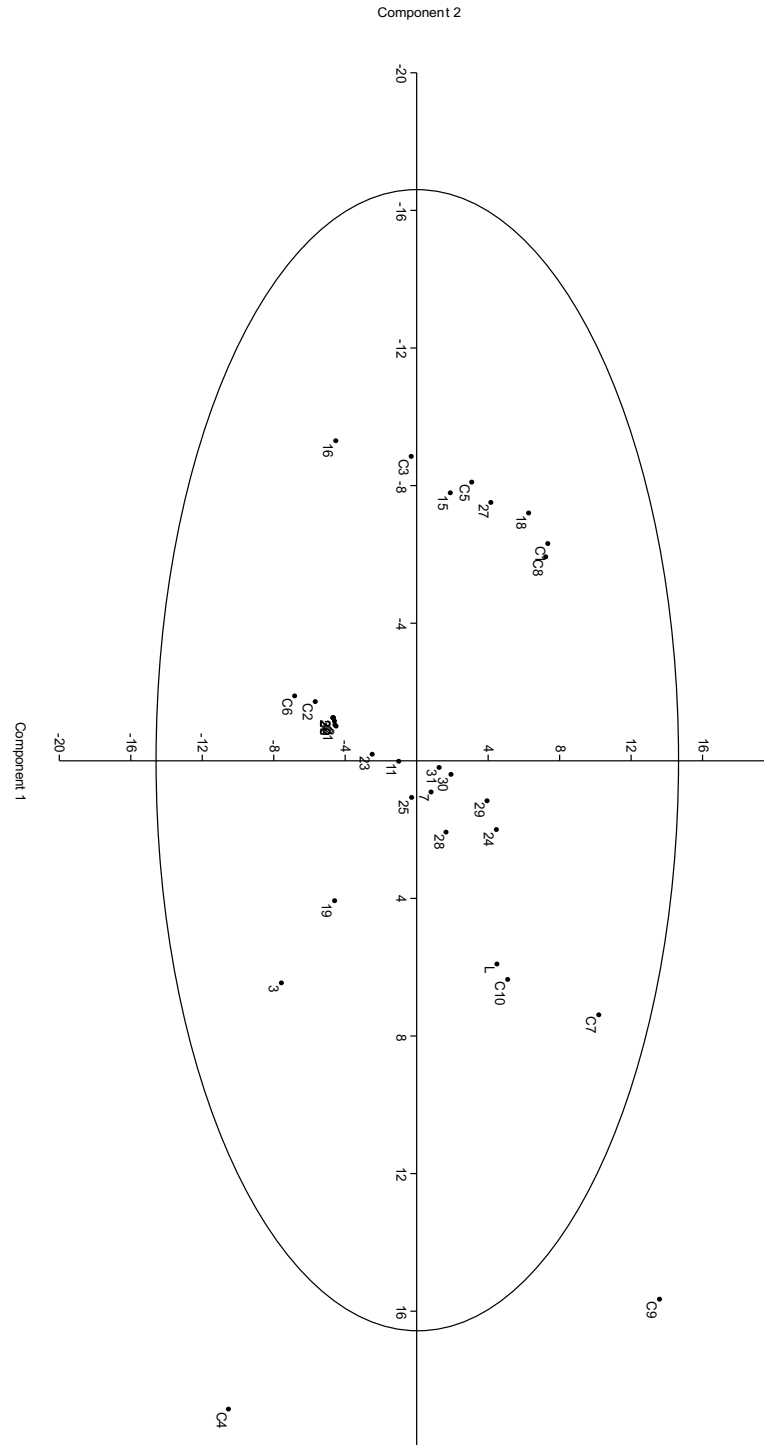


FIGURA 7. Análisis de Componentes Principales (PCA) utilizando los datos de alelos para todos los individuos analizados.

En la figura podemos observar que cada uno de los puntos representa a un individuo analizado. El análisis se basó en los haplotipos obtenidos y se generó la distribución observada utilizando el programa PAST. La elipse representa un intervalo de confianza de un 95%, por lo que los puntos que están afuera representan individuos significativamente distintos a aquellos que están dentro de la elipse. Por lo tanto, los individuos C9 y C4 presentan un conjunto de alelos que se diferencia significativamente del conjunto dentro de la elipse. Estos individuos provenientes de instituciones donde viven en cautiverio parecieran estar bien diferenciados de aquellos de la población de Cabañas. El individuo de Gualán aparece dentro de la elipse, a pesar de ser un individuo silvestre de una población distinta. Además de estas observaciones, se puede notar que existen dos subgrupos donde se aglomeran la mayoría de individuos silvestres de Cabañas, junto con ejemplares de cautiverio. Lo que el PCA sugiere es que los individuos de la elipse probablemente provengan de otras poblaciones (al estar distanciados entre sí esto es lo más probable). También sugiere que existe subdivisión entre la población de Cabañas según los subgrupos identificados.

D. Detección de cuellos de botella

La prueba de detección de cuellos de botella se realizó con el software Bottleneck (Cornuet y Luikart, 1997). Este programa toma los datos de microsatélites y los utiliza para generar una simulación coalescente que obedece a tres modelos de mutación: el modelo de alelos infinitos (IAM, por sus siglas en inglés), SMM y TPM. Los resultados se resumen en el siguiente cuadro.

CUADRO 10. Resumen de valores de p para las pruebas realizadas para la detección de cuellos de botella utilizando Bottleneck para la población de Cabañas.

Prueba	IAM	TMP	SMM
Signos	0.633	0.624	0.077
Diferencias Estandarizadas†	0.265	0.222	0.007*
Wilcoxon	0.320	0.320	0.010*
L	Distribución en L normal		

*= Valor de p menor a α ; †= requiere al menos 20 *loci* polimórficos

La hipótesis nula en cada una de las pruebas es que la muestra cumple con el equilibrio en deriva mutacional de cada uno de los modelos. Al ser el valor p menor a un α de 0.05, esta hipótesis se rechaza y se concluye que la población no se encuentra en un equilibrio en deriva mutacional, por lo que se detecta un cuello de botella. Este es el caso para las pruebas de diferencias estandarizadas y Wilcoxon en SMM. En el caso de la prueba de Wilcoxon, la p reportada es para una cola y deficiencia de H. Sin embargo, la prueba de diferencias estandarizadas requiere de al menos 20 *loci* polimórficos y únicamente existen ocho en la base de datos obtenida para Cabañas. La distribución generada con los datos alimentados a la simulación corresponde con una forma de L, por lo que el cuello de botella detectado no es reciente.

CUADRO 11. Resumen de valores de p para las pruebas realizadas para la detección de cuellos de botella utilizando Bottleneck para la población de Cabañas incluyendo alelos de Schrei (2014).

Prueba	IAM	TMP	SMM
Signos	0.139	0.149	0.548
Diferencias Estandarizadas†	0.142	0.177	0.308
Wilcoxon	0.884	0.839	0.461
L	Distribución en L normal		

*= Valor de p menor a α ; †= requiere al menos 20 *loci* polimórficos

Al agregar los alelos obtenidos por Schrei (2014), la prueba arroja resultados muy distintos. No detecta ningún cuello de botella, a pesar de haber una baja diversidad genética y varios marcadores polimórficos (10 en total, para el caso de los datos combinados). Al utilizar 18 marcadores, la robustez de esta prueba es mayor a la prueba que utiliza únicamente los 12 presentados en este estudio, e indica un resultado distinto. Al combinar únicamente los marcadores polimórficos (10) y correr la prueba de nuevo, el resultado no cambia. No existe un cuello de botella según Bottleneck al utilizar la información obtenida de ambos estudios. La detección de cuellos de botella se basa en modelos estadísticos complejos y alimentarlo de la mayor cantidad de información aumenta la solidez de las conclusiones que pueden ser alcanzadas. Este es un ejemplo de eso y se discutirá adecuadamente en la siguiente sección, junto con el resto de hallazgos del estudio.

VII. Discusión

A. Extracción de ADN

La extracción de ADN implementada tuvo que optimizarse para el método de toma de muestra utilizado. Las muestras de sangre se preservaron en tarjetas FTA (Whatman). En un inicio, se utilizó un protocolo del fabricante en donde un disco de 2 mm de diámetro podía lavarse tres veces con un buffer de lisis y luego, la reacción de PCR podía montarse sobre el disco. Se intentó utilizar este proceso y se determinó que existía un exceso de ADN que inhibió la amplificación. Se concluyó esto debido a que luego del PCR, el gel mostró una banda fuerte de ADN pesado, como cuando se corre un gel de integridad, pero no se observó una banda del peso esperado del amplicón.

Por consiguiente, se trabajó con un protocolo de extracción orgánica especificado por el fabricante de las tarjetas FTA y se adaptó según los resultados observados durante distintas pruebas (resumidas en la sección de resultados). Este protocolo permitía obtener una solución de ADN que pudo cuantificarse y modificar su concentración para poder correr la PCR con éxito. Sin embargo, el protocolo propuesto por Whatman fue modificado.

Se logró identificar que el bajo rendimiento en la extracción se veía gravemente restringido por la disponibilidad de tejido, ya que el protocolo sugería utilizar un solo disco de 2 mm de la tarjeta FTA durante el proceso. Esto se solucionó al aumentar el número de discos a cinco. Al aumentar la disponibilidad de tejido, el rendimiento fue mejor. Como medida complementaria a esta alternativa, se decidió macerar los discos para aumentar la superficie de contacto del tejido con la solución de lisis. Esta solución contiene Proteinasa K (20 mg/mL) que permite la digestión de las proteínas de la célula durante la incubación. Esto evita que la solución de ADN contenga proteínas y otros compuestos derivados que puedan interferir durante la PCR. Además, esta solución tiene una alta carga de sales, lo que permite aglomerar los residuos celulares y separarlos del ADN, pues estos residuos son afines a solventes orgánicos como el fenol y el cloroformo utilizados en la extracción. Es posible que el macerar los discos de las tarjetas FTA genere contaminación que pueda llegar a inhibir la amplificación, como micropartículas de las fibras del papel, pero no se exploró exhaustivamente esta posibilidad. Si se tratara de replicar el estudio, es aconsejable comparar el rendimiento entre muestras maceradas y no maceradas.

Se decidió ampliar el tiempo de precipitación del ADN extraído en isopropanol a -20°C de dos horas a una precipitación durante toda la noche. Esto se hizo procurando poder precipitar una mayor cantidad de ADN a que si se dejara un período más corto. Además, luego de la precipitación, se sugiere centrifugar por 30 minutos a 4°C permitiendo que, por propiedades coligativas, la mayor cantidad de ADN se encontrara fuera de la solución al momento de formar el precipitado. Por último, el precipitado se lavó con etanol al 70% para remover cualquier tipo de contaminación residual y se suspendió en 30 μL de solución TE

precalentado. Se consideró que este volumen permitía que el precipitado generara una concentración inicial que siempre pudiera diluirse a una solución de trabajo, considerando que el rendimiento podría ser bajo. Si se resuspendiera con un volumen de TE mayor, la concentración podía diluirse más allá de la concentración utilizada en soluciones de trabajo. De esos 30 μL de solución final, se destinaron cinco para la cuantificación de la concentración y pureza del ADN extraído. El 95.45% de las amplificaciones que se hicieron con ADN extraído de esta manera fueron exitosas (muestras de cautiverio y Gualán). El protocolo propuesto puede encontrarse en la sección de anexos de este documento.

B. Amplificación y medición de alelos

La amplificación de las regiones de interés posiblemente fue la parte más problemática del estudio. Se logró obtener un 94.7% de los productos esperados (ver cuadro 4 y 5), pues el resto no se lograron amplificar a pesar de varios intentos. Los posibles impedimentos a la amplificación fueron la integridad de las muestras de ADN, la calidad de la extracción de ADN, la idoneidad del programa del termociclador y el estado de los reactivos a utilizar. En cuanto a la calidad del ADN, se refiere específicamente a aquellas muestras que fueron extraídas por Thomas Schrei (2014) para su estudio. Estas muestras pasaron al menos un año almacenadas a 4°C y posiblemente esto contribuyó a su degradación. A esto, es posible añadirle el factor de la calidad de la extracción. Algunas muestras extraídas por Schrei resultaron problemáticas para la extracción y fueron eliminadas o requirieron de varios intentos para amplificar. Esto posiblemente explica casos en los que individuos presentaron dificultad para amplificar en varios marcadores. Este es el caso para las muestras 16, 19 y 21, que presentaron dificultad para amplificar con al menos dos marcadores (tres, en el caso de la muestra 21). El principal problema con estas muestras era que el tejido había sido agotado (este era el caso para todos los individuos silvestres de Cabañas), por lo que no podía repetirse la extracción para obtener ADN fresco o de mejor calidad.

En el caso de las amplificaciones que no se lograron obtener con muestras de cautiverio, otras causas parecen haber influenciado. A pesar de haber podido extraer repetidas veces, es posible que la calidad del ADN haya sido una limitante para la extracción. El protocolo de extracción que se optimizó generaba consistentemente muestras de ADN que parecían adecuadas para su amplificación. Sin embargo, algunos productos resultaron problemáticos. Además de la calidad de la extracción, y posiblemente en mayor medida, el estado de los reactivos para la PCR, pudo haber determinado el éxito de dichas amplificaciones. Se sospecha fuertemente que la degradación de las soluciones de trabajo de los cebadores pudo haber afectado los últimos intentos de amplificación debido a que estas sufrieron de varias descongelaciones. Este problema trató de solucionarse con la obtención de nuevas alícuotas de trabajo de los cebadores utilizados, con el reemplazo de los demás reactivos de la PCR, pero luego de varios intentos, se decidió desistir, especialmente por la posible degradación de las soluciones madre de los cebadores. Estas fueron descongeladas varias veces con el objetivo de obtener los productos restantes, pudiendo causar su degradación.

Por último, se encuentra el caso del marcador HESU011, el cual resultó ser el más problemático de todos, pudiendo amplificarse únicamente el 72.73% de las muestras. En la publicación donde se generaron los marcadores utilizados (Hess *et al.*, 2013), este marcador fue presentado como el que más cloruro de magnesio requería para su amplificación, lo que sugiere que su amplificación también fue difícil para los autores. Sin embargo, al poder amplificarla y medirla, se encontró que el alelo dominante medido era de un tamaño mucho menor al reportado en la publicación original. Un cambio tan amplio en la longitud de los alelos reportados al observado en el estudio puede explicarse a través de un posible evento de recombinación que causó que la región cambiara de tamaño de manera abrupta y se reportara un alelo 61 pares de bases más pequeño (Li *et al.*, 2002; Akemi *et al.*, 2012). A pesar de esto, se encontraron otros dos alelos, de 219 y 222 pares de bases. Esos alelos coinciden con las longitudes expresadas en la publicación original lo que sugiere que el evento de recombinación fue reciente y aún persisten copias de la región previas a esto, a pesar de ser muy pocas, y prácticamente residuales.

Es común que los microsatélites sufran eventos de recombinación que causan la modificación o la pérdida de la identidad del alelo, puesto a que estas regiones incluso pueden ser precursoras de dichos eventos (Li *et al.*, 2002). La recombinación está ligada a procesos de meiosis y mitosis en distintas proporciones y puede resultar en la modificación de las regiones analizadas. Es posible que este sea el caso para la región amplificada con el marcador HESU011, lo que podría explicar su dificultad para amplificar debido a la pérdida de la región o la modificación de las secuencias que la flanquean, pudiendo ser el caso también para otras muestras y otros marcadores. Además, es factible que, al ser una posible región precursora de eventos de recombinación, no cumpla con las características de una región de selección neutra, sino que exista cierta selección hacia un alelo funcional que permite que desempeñe su rol de manera adecuada. Esto podría atribuirse a que se fije un alelo único, que parece ser el caso en las muestras observadas. Esta observación parece ser sustentada por el hecho de tener alelos raros apegados a los tamaños reportados en la publicación original (Hess *et al.*, 2013). Sin embargo, esto es difícil de determinar sin conocer a mayor profundidad el genoma de la especie y la funcionalidad de la región amplificada. Para poder dilucidar eventos de recombinación, es necesario poder secuenciar la región y esto sale de los alcances de este proyecto. No se puede descartar la posibilidad de que un alelo de tamaño tan diferente pueda haber surgido a través de procesos estocásticos y la dificultad de amplificación se deba a otras causas ya discutidas en esta sección. Además, es probable que si este fuera el caso, podría tratarse de un fenómeno aislado a la población de Cabañas y no necesariamente se cumpla en otras.

Debido a la forma en que esta región parece haber mutado y a la sospecha de que su selección no es neutra, este marcador fue excluido de los análisis multivariados, pues exhibe un comportamiento que viola los supuestos de su evolución para algunas de las pruebas y presentaba información para un porcentaje insuficiente de las muestras.

La medición de los alelos se hizo luego de correr los productos obtenidos en electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) con altas concentraciones de urea. Estos geles desnaturalizantes de 50 cm fueron utilizados originalmente para secuenciación Sanger, pero debido a su resolución capaz de diferenciar entre variaciones de tamaño hasta de un nucleótido (Shendure y Ji, 2008; Summer *et al.*, 2009), se adaptó a su uso con microsatélites (ver figura 3 y 4). La ventaja de utilizar estos geles para medir microsatélites es que las diferencias entre alelos que a veces pueden ser de tres pares de bases (en el caso de los marcadores utilizados), es que esta diferencia es más conspicua en geles de 50 cm, a diferencia de si se utilizaran geles de 20 cm o menos para el procedimiento de medición. Además, el desnaturalizar el ADN a emplearse permite eliminar factores como conformaciones secundarias o afinidades diferenciadas, lo que hace que el ADN migre en el gel exclusivamente en correlación a su peso molecular (Summer *et al.*, 2009). Sin embargo, también cuenta con sus limitaciones.

Se utilizó el software gratuito GelAnalyzer2010b para este análisis. Existen otros programas para este tipo de análisis con plataformas más amigables y sofisticadas, pero requieren el pago de licencia para utilizarse. Esto complica levemente el análisis, pero a pesar de esto, presenta una gran capacidad de personalización de los carriles. La principal limitante del programa es el tiempo que conlleva el análisis de cada gel. El análisis utiliza fotografías de los geles, pues es en 1D. Esto implica que si existe alguna inclinación, ya sea en la superficie donde se fotografía el gel o en el ángulo de la cámara, puede llegar a distorsionarse el análisis y el cálculo del tamaño de los alelos amplificados puede variar. Para evitar esta interferencia, se tomaron todas las precauciones necesarias. El gel se colocó en una superficie horizontal sobre el suelo y la cámara se niveló para estar totalmente paralela al suelo utilizando un indicador de inclinación. Esto evitó que la medición se distorsionara por alguna inclinación. El programa utiliza como referencia los tamaños de la escalera de peso molecular para generar una curva que modele la migración de los alelos a través de una regresión exponencial. Por lo tanto, la exactitud de la regresión dependerá de cuántos puntos de referencia puedan identificarse en la escalera. En este caso, se utilizó una escalera con tamaños que diferían 100 pb de entre sí (100, 200, 300,... 1100), pero no siempre se logró identificar la misma cantidad de bandas, ya sea por la forma en que habría corrido el gel o el resultado de la tinción. Sin embargo, siempre se logró generar una regresión con un R^2 de al menos 0.99 para realizar las mediciones. El hecho de que los tamaños reportados fueran consistentes con los presentados por Hess *et al.* (2013) ratifican que la medición fue exitosa. A pesar de esto, una escalera con intervalos menores puede ayudar a mejorar la exactitud con la que se miden los alelos.

Por último, el desnaturalizar las muestras de ADN y determinar su peso en este tipo de PAGE genera bandas “fantasma”, las cuales parecen ser una banda de tamaño aparte, pero son parte del alelo a medir. Por esta razón, fue dificultoso lograr identificar alelos individualmente a la hora de realizar el análisis. Para solucionar esto, se procedió a poner mayor atención en los patrones de bandas generados, más que en las bandas individuales. Además de esta precaución, se midió siempre la banda más pesada (la que se encuentra más arriba en el gel) para evitar que variaciones como esa introdujeran ruido al análisis. Esto es algo muy

importante a tomar en cuenta a la hora de buscar replicar el estudio o utilizar las mismas técnicas con otros fines.

C. Genética poblacional

Como primer análisis, se obtuvo la frecuencia alélica y se identificaron alelos raros (cuadro 6 y 7). Además de esto, se calculó la heterocigosidad observada y la heterocigosidad esperada (Nei, 1987) y a partir de estos datos, se calculó el coeficiente de endogamia para cada marcador (cuadro 8 y 9). De esta manera, se identificaron los marcadores más informativos. El criterio que se utilizó fue la cantidad de alelos por marcador, una heterocigosidad esperada mayor a 0.2 y la dominancia de cada alelo por cada marcador. De esta manera, se prioriza a los marcadores HESU004, HESU007, HESU010 y HESU013. Estos cuatro marcadores presentaron la información más valiosa al estudio, aun cuando se contaba con otros tres marcadores polimórficos.

En estos *loci*, se pudo identificar que existen individuos que parecen no corresponder con los haplotipos generados para la población de Cabañas. Parece que los individuos C7 y C10 son similares al individuo de Gualán según la información generada por el marcador HESU007, ya que cuentan con el mismo genotipo que parecería ser típico de esta población. Sin embargo, difieren también los individuos C4 y C9 con el alelo 259, ajeno a Cabañas y distinto a Gualán. Para el marcador HESU004, también se observó divergencia con los alelos generados para Cabañas. En este caso, Lagarto (Gualán), cuenta con un genotipo observado en Cabañas, pero tanto C7, C9 y C10 presentan el alelo 228, que no se encontró en Cabañas. Para este marcador, el individuo C8 también presentó un alelo único, el 231. Los alelos encontrados en estos individuos parecen sugerir su procedencia de otras poblaciones. Al tener un solo individuo de Gualán, es difícil discutir si existe una diferencia sustancial con la población de Cabañas o no. Sin embargo, existe por lo menos un alelo que no se encontró en Cabañas. En cuanto al marcador HESU004, la información generada parece sugerir que existe cierta similitud entre los individuos de Cabañas y Gualán, pero los otros organismos de cautiverio que se diferenciaron, aparentan venir de una o dos poblaciones más. Sin embargo, hacer esta afirmación es difícil al no conocer la estructura genética de otras poblaciones a una profundidad comparable con la información que se tiene de Cabañas.

En el caso de los marcadores HESU008, HESU009 y HESU016, existen dos o tres alelos, pero existe gran dominancia por parte de un único alelo (frecuencia mayor o igual a 0.9). La frecuencia de los alelos para estos marcadores parecen ser un indicador inequívoco de un proceso de pérdida de diversidad genética donde un alelo dominante tiende a fijarse en la población, mientras que los alelos raros tienden a desaparecer, especialmente con los coeficientes de endogamia que se observaron. Es muy poco probable que estos alelos raros hayan resurgido por mutación, aunque en un escenario de recuperación, es posible que algunos alelos reaparezcan, aunque este parece no ser el caso. Esto no descarta la existencia de un cuello de botella poblacional, pero parece que existe tanto un proceso endogámico como resultado a una

reducción poblacional reciente que ha disminuido drásticamente la diversidad genética de la población y se debe buscar revertirlo.

La posible existencia de un cuello de botella poblacional actual en la población es apoyada por los coeficientes de endogamia observados para los marcadores más informativos del estudio. Los coeficientes de endogamia son positivos y cercanos a uno, lo que indica que existe un alto grado de endogamia en la población de Cabañas. La interpretación de estos coeficientes para el conjunto de organismos no es tan relevante como lo es para los individuos silvestres, pues refleja que el proceso se está dando en la naturaleza y en la población más protegida de la especie. Esto es particularmente preocupante, pues indica que las medidas de conservación que se han estado implementando en Cabañas han sido insuficientes para recuperar la diversidad genética en la población ya que nunca han sido su objetivo y es hasta en recientes estudios que se ha analizado. Estos estudios demuestran la necesidad medidas alternativas deben considerarse, como la movilización de organismos de otras poblaciones y la reproducción selectiva *ex situ*, para lograr que la recuperación de la diversidad perdida sea más rápida. La principal amenaza para la especie si se mantiene una baja diversidad genética es el cambio climático y cambios en el nicho térmico de los animales (Sinervo *et al.*, 2010). Una modificación del nicho térmico a causa del cambio climático podría ser un evento que amenace la supervivencia de la especie si no logra recuperarse o adaptarse a tiempo. La baja diversidad genética que existe también puede agravar problemas inherentes a la población y evidencia el proceso de endogamia que viven estos organismos.

En comparación con los resultados obtenidos, el estudio que se realizó con los individuos del Zoológico de Atlanta arrojó información similar. Los marcadores HESU001, HESU002 y HESU012 resultaron ser monomórficos, al igual que en el presente estudio. Ellos no pudieron amplificar el marcador HESU006, mientras que en el presente estudio resultó ser de los marcadores monomórficos. El marcador HESU011 resultó dificultoso en ambos casos. Por último, ellos lograron la amplificación del marcador HESU018, el cual fue eliminado por su dificultad para amplificar con las muestras analizadas aquí

Al tener en mente las similitudes, diferencias y diversidad de los alelos obtenidos en el estudio, se puede proponer un escenario que posiblemente haya estado afectando a la especie en tiempos recientes. Se puede determinar que existen individuos que no parecen provenir de la población de Cabañas, pero sus haplotipos no son del todo distintos a los encontrados en esta población. Es posible que existan alelos distintos en otras poblaciones, como en el caso de Gualán, que aún permanezcan desconocidos. Las similitudes observadas en los haplotipos de los individuos analizados parece sugerir que existió un flujo genético fuerte entre las poblaciones, pero su aislamiento y reducción de la diversidad afectaron a estas poblaciones a como se encontraron en la actualidad. Esto parece esperanzador, pues es posible que se encuentre diversidad genética distinta en otras poblaciones que aún no se ha descrito y puede ser clave para un rescate genético de la especie. En esto radica la importancia de explorar y evaluar la diversidad genética de estas poblaciones. Como primera contribución a esto, este estudio puede identificar que individuos como

L, C4, C7, C8, C9 y C10 pueden ayudar a inyectar diversidad genética a la población de Cabañas mediante un programa de reproducción *ex situ*, pues sus haplotipos parecen ser suficientemente distintos para aportar diversidad a una población tan afectada. Esto se ve reflejado en el PCA generado.

El PCA presentado en este estudio se realizó utilizando el software PAST. Los datos para el análisis fueron ingresados a manera de que existía una columna para cada alelo, entiéndase dos columnas por marcador. Esto resulta en que la concepción de la información no necesariamente se dio como la de dos alelos codominantes pertenecientes a una misma región del genoma, sino como la comparación de genomas haploides. Esta es una gran debilidad del análisis realizado, pero es útil para ilustrar las similitudes y diferencias entre los alelos presentados por cada individuo. Es por eso que se realiza un desglose más rústico de los datos previo a obtener más conclusiones de este análisis. A pesar de reflejar algunas de las diferencias ya discutidas, señala únicamente a C4 y C9 como individuos significativamente distintos a los demás analizados en el estudio.

D. Detección de cuellos de botella

Para la detección de un cuello de botella en la población de Cabañas, se recurrió a una simulación coalescente con los modelos de mutación IAM, SMM y TPM usando los parámetros especificados en la sección de resultados. Esta simulación se realizó en el software Bottleneck (Cornuet y Luikart, 1997). De las tres pruebas generadas por el programa utilizando los marcadores analizados en este estudio, dos detectaron un cuello de botella para el modelo SMM. Este modelo ha sido relacionado a regiones microsatélites en humanos (Ohta y Kimura, 1973) y puede aplicarse a la evolución de microsatélites con selección neutra en otras especies. Este modelo sostiene que estas regiones mutan a una tasa igual y constante entre todos los alelos (Ohta y Kimura, 1973; Williamson, 2005). Este modelo de mutación corresponde con la mutación por deslizamiento de la hebra que se propone para la adición o eliminación de repeticiones en microsatélites (Schlötterer, 2000; Akemi *et al.*, 2012). Por lo tanto, este modelo se considera el más apto para la detección de cuellos de botella utilizando microsatélites y precisamente fue utilizando ese modelo que la simulación lo identificó en los datos generados durante este estudio.

Luego de esta simulación, se agregaron los datos obtenidos con los marcadores utilizados por Schrei (2014) y el resultado obtenido fue contradictorio. Esta simulación no encontró un cuello de botella en la población. Este análisis es más robusto, ya que contiene una mayor cantidad de información y un mayor número de marcadores polimórficos. La razón de la discrepancia entre ambos resultados es algo difícil de determinar, pero sin lugar a dudas, la robustez del modelo es mayor al tener mayor información.

Las simulaciones, incluyendo la distribución en L normal para ambos casos, sugieren que de haber existido un cuello de botella en la población, este no es detectable con la información disponible. A pesar de esto, se apoya fuertemente la posibilidad de su existencia en un pasado reciente o incluso en la actualidad

debido a la baja diversidad genética observada en la población de Cabañas y los altos coeficientes de endogamia observados para los marcadores más informativos señalados en el estudio. Lo que sugiere el cúmulo de análisis es que puede estarse dando en este momento. Las presiones que han causado el declive de la diversidad genética, como la fragmentación y pérdida de hábitat, la reducción del tamaño poblacional y la dilución de la selección sexual debido a la homogenización genética de la población (Schrei, 2014) siguen vigentes. El proceso observado parece corresponder con un vórtice de extinción y medidas adecuadas son urgentes para evitar la degradación de la población que la dirija hacia la extinción local. Existen alelos raros que parecen ser remanentes de una diversidad mayor que alguna vez existió en la población. Estos alelos raros, acompañados de un alelo dominante, a veces con frecuencia mayor a 0.9, indican un proceso de pérdida de la diversidad genética, agravado por un tamaño poblacional pequeño y la posible depresión endogámica que puede estar afectando actualmente a la población. La reaparición de alelos, actualmente observados como raros, y la recuperación de diversidad son mucho menos probables debido a las condiciones en las que viven estos individuos, pero todo parece indicar que la disminución de la diversidad genética no ha sido un proceso natural y estocástico. Es evidente que la fragmentación de hábitat y el exterminio de estos animales los ha llevado a tener una situación poblacional crítica en cuanto a su diversidad genética. Estos son efectos que son atribuidos directamente a la presencia humana en esta zona desde hace varios siglos. La población se ha venido reduciendo tanto en tamaño como en diversidad y esto presenta un grave problema.

Las características genéticas de la población de Cabañas parecen indicar un gran riesgo ante posibles eventos de estrés como cambio climático y el cambio de uso del suelo. Esta vulnerabilidad puede estar amenazando a otras poblaciones de las cuales se conoce muy poco y no están realmente protegidas. Por esta razón, es urgente explorar y proteger las otras poblaciones de esta especie para asegurar su supervivencia, tanto a escala local, como general.

La simulación generada permite alcanzar ciertas conclusiones interesantes, pero es necesario reconocer que el análisis tiene sus limitaciones. Como primera limitación, se cuenta únicamente con 10 *loci* polimórficos para 22 individuos. Esto reduce la robustez del análisis, por lo que se recomienda interpretarlo únicamente como un indicador y no como una certeza. En el caso de la prueba de diferencias estandarizadas, se requieren al menos 20 *loci* polimórficos, por lo que inmediatamente la validez de esta prueba queda eliminada y debe descartarse para alcanzar conclusiones en este estudio. Para lograr un análisis más robusto, es necesario incorporar más marcadores al análisis, esperando que sean polimórficos y puedan brindar mayor información. Además de esto, se desconoce el genoma de la especie, por lo que desconoce realmente si las regiones analizadas cumplen con una selección neutra o si cumplen con funciones estructurales o regulatorias dentro del genoma que puedan causar la vulneración de los supuestos de las pruebas generadas (Li *et al.*, 2002). También es difícil determinar si los marcadores utilizados son representativos de la diversidad del genoma, pero, al haber sido secuenciados usando la técnica de “Shotgun”, se puede asumir que su localización en el genoma es aleatoria y posiblemente dispersa en

distintos cromosomas (Hess *et al.*, 2013). A futuro, se pueden realizar estudios utilizando Secuenciación de Última Generación (NextGenSeq) para poder analizar regiones mitocondriales y nucleares para analizar a mayor profundidad la diversidad que pueda existir en cada población.

Dentro de este estudio, se identificó que el marcador HESU011 puede haber sufrido un evento de recombinación (Li *et al.*, 2002), cambiando radicalmente su longitud y esto hace que no presente una mutación de acuerdo a los modelos presentados. Sin embargo, al excluirse de la prueba, se alcanzaron las mismas conclusiones, por lo que la simulación inicial se sostuvo. Todas estas consideraciones deben tomarse en cuenta a la hora de seleccionar marcadores para estudios de esta índole y alcanzar las conclusiones que se tratan de generar, pero al no contar con esta información y mayor conocimiento acerca del genoma de la especie, se debe asumir que las regiones cumplen con los supuestos.

En conclusión, este estudio revela una baja diversidad genética en la población de Cabañas, donde también está dándose un proceso de endogamia, reflejado en los altos coeficientes de endogamia obtenidos y loci con un alelo altamente dominante en vías de fijarse. Se puede afirmar con bastante certeza que este es el resultado de la intervención humana en el hábitat de la especie y su exterminio indiscriminado. Esto representa un riesgo para la población de Cabañas y probablemente lo sea para otras poblaciones con procesos similares, pero sin estudiar, ya que la baja diversidad compromete la adaptabilidad de las poblaciones a eventos catastróficos, a la pérdida y la fragmentación de su hábitat y al cambio climático. Además de esto, sin medidas adecuadas para el manejo genético, es posible que las poblaciones entren en un vórtice de extinción del cual no puedan recuperarse, resultando en la desaparición completa. Las medidas que se han tomado a la fecha son insuficientes para conservar adecuadamente la población de Cabañas y las demás poblaciones de la especie, ya que el componente genético no ha sido explorado a profundidad y la reproducción asistida puede resultar en una fuerte endogamia, como sugieren los datos obtenidos. Sin embargo, se evidencia la importancia que debe tener el componente genético en la conservación de esta especie y permite trazar una ruta para futuras medidas de conservación que pueden implementarse. Por ejemplo, es de gran importancia explorar las poblaciones que se encuentran sin protección actualmente, ya que estas pueden contar con un acervo genético distinto al observado en Cabañas. Esto se respalda al observar los haplotipos de los individuos C4 y C9, actualmente en cautiverio. Estas poblaciones pueden ser clave para la recuperación de la diversidad genética de la especie, al poder abonar a la diversidad de otras poblaciones mediante la reproducción *ex situ*, migraciones asistidas y corredores biológicos que permitan reestablecer el flujo genético, aumentando la diversidad de los individuos y fortaleciendo su resiliencia a cambios en el ecosistema. Por lo tanto, este estudio debe considerarse como un primer paso y como un llamado de atención. Hace falta indagar en otras poblaciones, tomar medidas a una escala mayor y tener un norte compartido para poder evitar la extinción de un reptil excepcional, endémico e importante. Los esfuerzos actuales lastimosamente no podrían evitar una extinción en el peor escenario, pero las medidas a tomarse son claras.

VIII. Conclusiones

1. El protocolo de extracción orgánica de ADN a partir de sangre conservada en tarjetas FTA propuesto en este estudio resultó ser eficaz para la obtención de soluciones de ADN apto para amplificar.
 - a. El 94.7% de los productos posibles logró ser amplificado. El marcador más problemático para la amplificación fue el HESU011.
2. Se encontraron cuatro alelos raros para la población de Cabañas y cuatro alelos raros entre los individuos de cautiverio. Los alelos raros de cautiverio resultan de la consideración del conjunto total de individuos analizados como una sola población.
 - a. Estos alelos raros sugieren que algunos de los individuos de cautiverio puedan proceder de otras poblaciones con una diversidad genética distinta a la de la población de Cabañas.
3. El promedio de alelos para todo el conjunto de datos analizado fue de 2.75. El promedio de alelos por marcador para la población de Cabañas fue de 2.25. El promedio de alelos por marcador para los individuos de cautiverio fue de 2.
4. Ocho de los 12 marcadores utilizados resultaron polimórficos; en los cuatro restantes (HESU001, HESU002, HESU006 y HESU012) se encuentra fijado un único alelo.
 - a. Al añadir los resultados de Schrei (2014), el total de marcadores polimórficos para la población de Cabañas asciende a 10.
5. Los marcadores que resultaron brindar mejor información fueron HESU004, HESU007, HESU010 y HESU013, siendo polimórficos y con una heterocigosidad esperada de más de 0.2.
6. Se identificaron coeficientes de endogamia positivos en los marcadores HESU004, HESU007, HESU008, HESU010 y HESU013. Esto indica que existe un proceso de endogamia en la población de Cabañas debido a una deficiencia de heterocigosidad.
 - a. Este proceso de endogamia, junto con una diversidad genética baja parecen ser indicios de que existió alguna vez un cuello de botella para la población de Cabañas que no fue detectable con certeza en el estudio.
7. El estado de la población de Cabañas es preocupante, ya que presenta altos coeficientes de endogamia y una diversidad genética baja cuando se compara con la de otras poblaciones en riesgo. Por lo tanto, deben tomarse medidas de conservación inmediatas para poder aumentar la diversidad genética y la adaptabilidad de la población.
8. El proceso de reducción de la diversidad genética, endogamia y declive poblacional observado en los individuos de Cabañas no parece ser un proceso natural o estocástico. Las causas identificadas de esto como la fragmentación y destrucción de hábitat, el exterminio de individuos de la especie y las supersticiones que la rodean son evidentemente generadas por el ser humano y su presencia desde la época precolombina en la región.

IX. Recomendaciones

1. Replicar la metodología de este estudio como método de monitoreo e investigación de la diversidad genética en las distintas poblaciones de *H. charlesbogerti* a nivel nacional, en cumplimiento con lo sugerido en la estrategia de conservación de la especie (2013-2018), afianzando proyectos de conservación y monitoreo en otras poblaciones. Esta información es vital para tomar nuevas acciones de conservación a favor de la especie.
2. Al utilizar el método de conservación de tejido sanguíneo en tarjetas FTA, trabajar con el protocolo sugerido y buscar nuevas mejoras. El protocolo propuesto es bastante eficaz, pero puede mejorar en diversos aspectos que pudieron ser obviados en su elaboración.
3. Identificar adecuadamente el sitio de proveniencia de los individuos de cautiverio, pues esto puede ser de gran utilidad para estudios como este. Cuidar esta información es necesario.
4. Identificar todas las muestras obtenidas con los datos completos del animal, incluyendo el número de chip subcutáneo que se les coloca en los programas de monitoreo. Esto es indispensable para lograr una trazabilidad adecuada de cada muestra.
5. Implementar medidas de conservación para la especie enfocadas en la recuperación de la diversidad genética. Estas pueden incluir un programa de reproducción *ex situ* enfocado en producir crías con mayor diversidad genética y liberarlas en las distintas poblaciones, asistir en la migración de organismos genéticamente diferenciados a las poblaciones a donde se destinen, crear corredores biológicos donde los individuos puedan desplazarse entre poblaciones reproductivamente aisladas y continuar investigando y caracterizando la diversidad genética de las distintas poblaciones de la especie.

X. Referencias

- Anzueto, Roderico; J. A. Campbell. 2010. «Guatemala Beaded Lizard (*Heloderma charlesbogerti*) on the Pacific Versant of Guatemala» *The Southwestern Naturalist*. 55(3): 453-454.
- Akemi, Andrea, *et al.* 2012. «Microsatellites as Tools for Genetic Diversity Analysis» En *Genetic Diversity in Microorganisms*, de Prof. Mahmut Kaliskan. Rijeka: InTech. Págs. 149-170.
- Ariano-Sánchez, Daniel. 2003. «Distribución e historia natural del Escorpión, *Heloderma charlesbogerti* Campbell y Vannini, (Sauria: Helodermatidae) en Zacapa, Guatemala y caracterización de su veneno». Tesis Universidad del Valle de Guatemala.
- Ariano-Sánchez, Daniel. 2006. «The Guatemalan Beaded Lizard: Endangered Inhabitant of an Unique Ecosystem» *Iguana*. 13(3): 178-183.
- Ariano-Sánchez, Daniel. 2008. «Envenomation by a wild Guatemalan Beaded Lizard *Heloderma charlesbogerti*» *Clinical Toxicology*. 46(2008): 897-899.
- Ariano-Sánchez, Daniel; C. Beza y T. Schrei. 2011. «Using the Guatemala Beaded Lizard (*Heloderma charlesbogerti*) as an umbrella species for other critically endangered wildlife from the dry forests of the Motagua Valley» *Reptiles Australasia*. 1(2): 50-59.
- Ariano-Sánchez, Daniel; G. Salazar. 2007. «Notes on the Distribution of the Endangered Lizard, *Heloderma charlesbogerti*, in the Dry Forests of Eastern Guatemala: An Application of Multi-criteria Evaluation to Conservation» *Iguana*. 14(3): 152-158.
- Arshad, M. *et al.* 2009. «Genetic Variation of Four Gyps Species (*Gyps bengalensis*, *G. africanus*, *G. indicus* and *G. fulvus*) based on Microsatellite Analysis». *Journal of Raptor Research* 43(3): 227–236
- Beaumont, Mark A. 1999. «Detecting population expansion and decline using microsatellites» *Genetics* 153(1): 2013–2029.
- Beck, D.D. 2005. *Biology of Gila Monsters and Beaded Lizards*. Los Angeles: University of California Press, Berkley and Los Angeles. 213 pp.
- Bushar, L. M., H. K. Reinert, y L. Gelbert. 1998. «Genetic Variation and Gene Flow within and between Local Populations of the Timber Rattlesnake, *Crotalus horridus*». *Copeia* 1998(2): 411.
- Campbell, Jonathan; J. P. Vannini. 1988. «A New Subspecies of Beaded Lizard, *Heloderma horridum*, from the Motagua Valley of Guatemala» *Journal of Herpetology*. 22(4): 457-468.

- Cornuet, Jean-Marie; Gordon, Luikart. 1997. «Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data». *Genetics*. 144(4): 2001–2014.
- Cotí, Paola; D. Ariano-Sánchez. 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.
- Domínguez-Vega, Hublester *et al.* 2012. «Predicting the potential distribution of the beaded lizard and identification of priority areas for conservation» *Journal for Nature Conservation* 20(2012): 247-253.
- Douglas, Michael E. *et al.* 2010. «Conservation phylogenetics of helodermatid lizards using multiple molecular markers and a supertree approach» *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55(2010):153-167.
- Ehlers, Anneli; B. Worm y T. B. Reusch. 2008. «Importance of genetic diversity in eelgrass *Zostera marina* for its resilience to global warming» *Marine Ecology Progress Series*. 355: 1-7.
- Eng, J. *et al.* 1990. «Purification and structure of exendin-3, a new pancreatic secretory factor isolated from *Heloderma horridum* venom». *Journal of Biological Chemistry* 265(33): 20259-20262.
- Falahati-Anbaran, Mohsen *et al.* 2007. «Population genetic structure based on SSR markers in alfalfa (*Medicago sativa* L.) from various regions contiguous to the centres of origin of the species» *Journal of Genetics*. 86(1): 59-63.
- Feltoon, Angela *et al.* 2007. «Isolation and characterization of six microsatellites in the Mexican beaded lizard *Heloderma horridum*» *Molecular Ecology Notes*. 7(2007): 433-435.
- Frankham, Richard; J. D. Ballou y D. A. Briscoe. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University Press. 619 pp.
- Fredrickson, Richard *et al.* 2007. «Genetic rescue and inbreeding depression in Mexican wolves». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274(1623): 2365–2371.
- Fry; Bryan G. *et al.* 2009. «Novel venom proteins produced by differential domain -expression strategies in beaded lizards and Gila monsters (genus *Heloderma*)». *Molecular Biology and Evolution* 27(2): 395–407.
- Fry; Bryan G. *et al.* 2010. «Functional and Structural Diversification of the Anguimorpha lizard venom system» *Molecular and Cellular Proteomics*. 9(11): 2369-2390.
- Funk, W. Chris *et al.* 2010. «Evidence of recent population bottlenecks in Northern Spotted Owls (*Strix occidentalis caurina*)» *Conservation Genetics*. 11(2010): 1013-1021.

- Garza, John C.; Ellen G. Williamson 2001. «Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci». *Molecular Ecology*. 10(2001): 305–318.
- Gienger, C. M.; D. D. Beck. 2007. «Heads or tails? Sexual dimorphism in helodermatid lizards» *Canadian Journal of Zoology*. 85: 92-98.
- Hess, M. R. *et al.* 2013. «Characterization of STR/microsatellite primers for the Gila monster, *Heloderma suspectum* screened from paired-end Illumina shotgun sequencing» *Conservation Genetics Resources*. 5(4): 1121-1123
- Höglund, Jacob. 2009. *Evolutionary Conservation Genetics*. Oxford: Oxford Scholarship Online. DOI: 10.1093/acprof:oso/9780199214211.001.0001.
- Huey, R. B. *et al.* 2009. «Why tropical forest lizards are vulnerable to climate warming» *Proceedings of the Royal Society B*. 276(1664): 1939-1948.
- Johnson, W. E. *et al.* 2010. «Genetic restoration of the Florida panther». *Science* 329(5999): 1641–1645.
- Kingman, John F. C. 1982. «On the Genealogy of Large Populations» *Journal of Applied Probability*. 19(1982): 27-43.
- Kingman, John F. C. 2000. «Origins of the Coalescent: 1974-1982» *Genetics*. 156(4): 1461-1463.
- Kuo, C. H., & F. J. Janzen. 2004. «Genetic effects of a persistent bottleneck on a natural population of ornate box turtles (*Terrapene ornata*)». *Conservation Genetics* 5(4): 425–437.
- Li, Y. *et al.* 2002. «Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review» *Molecular Ecology*. 11(2002): 2453-2465.
- Lu, Z. *et al.* 2001. «Patterns of Genetic Diversity in Remnant Populations of the Giant Panda». *Conservation Biology* 15(6):1596–1607
- Luikart Gordon, *et al.* 1998. «Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks» *Journal of Heredity* 89(1998): 238–247.
- McGaughran, Angela; K. Morgan y R. J. Sommer. 2014. «Environmental Variables Explain Genetic Structure in a Beetle-Associated Nematode» *PLOS ONE*. 9(1): e87317.
- Nei, Masatoshi. 1972. «Genetic Distance between Populations» *The American Naturalist*. 106(949): 283-292.
- Nei, Masatoshi. 1987. «Molecular Evolutionary Genetis» Columbia University Press. Nueva York. 512 pp.

- Paetkau, David *et al.* 1998. «Variation in Genetic Diversity across the Range of North American Brown Bears» *Conservation Biology*. 12(2): 418-429.
- Ralls, K., y J. D. Ballou. 2004. «Genetic status and management of California condors». *The Condor* 106(2):215– 228
- Randall, Anne *et al.* 2008. «Ecological consequences of genetic diversity» *Ecology Letters*. 11(2008): 609-623.
- Reiserer, Randall; G. W. Schuett y D. D. Beck. 2013. «Taxonomic reassessment and conservation status of the beaded lizard, *Heloderma horridum* (Squamata: Helodermatidae) ». *Amphibian and Reptile Conservation*. 7(1): 74-96.
- Schrei, Thomas. 2014. « Diversidad genética e historia demográfica de una población del lagarto escorpión (*Heloderma charlesbogerti*) basada en marcadores microsatélites e implicaciones para su conservación» Tesis Universidad del Valle de Guatemala.
- Schrötterer, Christian. 2000. «Evolutionary dynamics of microsatellite DNA» *Chromosoma*. 109(6): 365-371.
- Shendure, Jay y H. Ji. 2008. «Next-generation DNA sequencing» *Nature Biotechnology*. 26(10): 1135-1145.
- Sinervo, Barry *et al.* 2010. «Erosion of Lizard Diversity by Climate Change and Altered Thermal Niches» *Science*. 328(5980): 894-899.
- Summer, Heike; R. Grämer y P. Dröge. 2009. «Denaturing Urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Urea PAGE)» *Journal of Visualized Experiments*. 2009(32): 1485.
- Tallmon, D. A., G. Luikart & R. S. Waples. 2004. «The alluring simplicity and complex reality of genetic rescue». *Trends in Ecology & Evolution* 19(9): 489–496.
- Williamson-Natesan, Ellen G. 2005. «Comparison of methods for detecting bottlenecks using microsatellite loci» *Conservation Genetics*. 6(2005): 551-56.

XI. Anexos

A. Licencias de Investigación y Colecta de CONAP

Forma LI

CONSEJO NACIONAL DE AREAS PROTEGIDAS
CONAP
PRESIDENCIA DE LA REPUBLICA
GUATEMALA, C. A.

Nº 00212 -B

LICENCIA DE INVESTIGACION

No. 009/2015

Nombre: Sergio Andrés González Molinedo No. Reg. 1-013-2014
Nacionalidad: Guatemalteco Identificación: DPI 2313 01804 0121
Institución: Universidad del Valle de Guatemala, FUNDESQUA
Si existe contrato administrativo que ampara esta Licencia, especificar referencia: _____
Titulo de la Investigación: "Cumplimiento de la Estrategia Nacional de Conservación del Heliconia y su Hábitat 2013-2015. Evaluación de la Diversidad Genética de las Poblaciones Silvestres y en Cautiverio"
Institución nacional que avala la investigación: Universidad del Valle de Guatemala
Nombre e identificación de otros investigadores participantes:
1. No hay acompañantes
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
Fecha de Emisión: Guatemala, 25 de febrero del 2015
Fecha de Vencimiento: Guatemala, 25 de febrero del 2016

[Firma]
Firma Secretario Ejecutivo/ Delegado de CONAP

Firma de Recibido

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

Serie A Nº 002012

LICENCIA DE COLECTA O APROVECHAMIENTO DE VIDA SILVESTRE

1. Nombre o razón social: Sergio Andrés González Molinedo
 Dirección: 3a. Avenida 1-60 Las Cumbres, Zona 16
 Teléfono: 3048-4164 Identificación: DPI: 2313 01804 0101

2. Tipo de colecta: comercial científica aficionada

3. No. de registro: 1013-2014

4. Especies a coleccionar:

ESPECIES	CANTIDAD	FORMA
<u>Helodermis charlesbogerti</u>	<u>75 (1 en/individuo)</u>	<u>Muestras de sangre en tarjetas FTA</u>
<u>.....</u>	<u>.....</u>	<u>.....</u>
<u>.....</u>	<u>.....</u>	<u>.....</u>
<u>.....</u>	<u>.....</u>	<u>.....</u>

5. Ubicación de la colecta o aprovechamiento: Municipio de Cabañas Usumatán, Guatán en Zecupe,
El Jicaro y Samarita, El Progreso y Oratorio, Santa Rosa.

6. Número de registro de la propiedad: _____

7. Técnicas de colecta autorizadas: _____

La muestra de sangre se colecta de la vena caudal (cola) del animal con una jeringa hipodérmica y
regatea en el FTA.

8. Nombre de colector(es) autorizado(s) e identificación: _____

No hay acompañantes

9. Localidad de traspaso de material coleccionado: _____

Universidad del Valle de Guatemala

Lugar y fecha de emisión: Guatemala, 25 de febrero del 2015

Válido hasta: Guatemala, 25 de febrero del 2016

(f) 
 Delegado CONAP



B. Protocolo de toma de muestras y extracción de ADN con tarjetas FTA

Toma de muestra:

- Tomar al animal del cual se extraerá sangre de manera adecuada, sujetando su cuello y pelvis.
- Desinfectar con alcohol 70% y solución de yodo la zona de la cola donde se realizará la extracción de sangre. De preferencia, se selecciona un segmento de la cola entre la cloaca y la parte media, donde la cola es gruesa.
- Limpiar el área.
- Introducir una jeringa hipodérmica de uso veterinario, nueva, hasta tocar las vértebras de la cola y retroceder unos milímetros, haciendo succión con la jeringa.
- Mantener la succión y buscar la vena caudal hasta que la jeringa comience a extraer sangre. Extraer 1 mL de sangre.
- Pasar la sangre extraída a un tubo de plástico de 1.5 mL para evitar una coagulación rápida.
- Con una aguja más fina (puede usarse una jeringa de insulina), tomar la sangre y colocarla gota a gota sobre una tarjeta FTA debidamente identificada con los datos del animal: No. de chip, nombre o apodo, sitio y fecha de colecta.
- Cerrar la tarjeta y guardarla en un lugar seco y fresco.

Extracción de ADN:

- Preparar la solución de lisis (ver sección específica en metodología) y una solución de Proteinasa K (20 mg/mL).
- Desinfectar una campana de flujo laminar con alcohol al 70%, hipoclorito de sodio al 10% y dejar 15 minutos con luz UV.
- Desinfectar el aparato para la obtención de discos de FTA (parte del kit que se vende con las tarjetas FTA por Whatman) o “puncher” usando alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 10%, dejar en la luz UV de la campana mientras se desinfecta.
- Colocar una toalla de papel estéril dentro de la campa, sobre la cual se cortarán los discos de las tarjetas.
- Tener a la mano tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles debidamente rotulados con el individuo al que pertenece la muestra y la fecha de la extracción.
- Con el “puncher”, obtener cinco discos de dos mm de diámetro por cada tarjeta FTA procesada y añadir las al tubo que corresponda con la muestra a extraer.
- Agregar 500 μ L de solución de lisis y 20 μ L de solución de Proteinasa K (20 mg/mL) y agitar hasta cubrir los discos en el líquido.
- Macerar los discos utilizando un pistilo de plástico estéril, ya sea de manera manual, o con un macerador electrónico.
- Incubar el tubo de 4-6 horas a 56°C en agitación constante.
- Añadir un volumen de fenol estabilizado y agitar bien hasta crear una emulsión.
- Centrifugar a 14,000 rpm por 10 minutos.
- Recuperar la capa acuosa del tubo, evitando llevar la basura del papel dentro de la pipeta.
- Pasar la capa acuosa a un nuevo tubo de 1.5 mL.
- Agregar 500 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), agitar hasta crear una emulsión.
- Centrifugar a 14,000 rpm por 10 minutos.
- En un tubo nuevo de 1.5 mL, añadir 50 μ L de acetato de amonio 3 M y 800 μ L de isopropanol frío.

- Recuperar la fase acuosa de la centrifugación anterior y añadirla a los tubos nuevos con acetato de amonio e isopropanol. Agitar bien. Si la extracción ha sido eficiente, posiblemente se observará un precipitado transparente o blanco. Es el ADN.
- Colocar los tubos a -20°C toda la noche para que el ADN pueda precipitar.
- Centrifugar a 14,000 rpm o velocidad máxima por 30 minutos en una centrífuga refrigerada a 4°C . Esto también puede lograrse al colocar la centrífuga en un cuarto frío.
- Decantar el líquido del tubo con mucho cuidado. En el fondo del tubo, debería de encontrarse el precipitado de ADN.
- Agregar 800 μL de etanol al 70% al tubo con el precipitado.
- Centrifugar a 14,000 rpm por 20 minutos.
- Abrir el tubo, decantar el líquido y dejar secando a temperatura ambiente o en un horno a 50°C . El precipitado debe verse seco para proceder.
- Agregar 30 μL de solución TE caliente al precipitado y resuspender en el tubo. La solución de ADN está lista para cuantificar su concentración y pureza.