

**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

Facultad de Ciencias y Humanidades



*Excellencia que trasciende*

**DEL VALLE**  
GRUPO EDUCATIVO

Diversidad genética e historia demográfica de una población del lagarto escorpión (*Heloderma charlesbogerti*) basada en marcadores microsatélites e implicaciones para su conservación

Trabajo de graduación presentado por  
Klaus Thomas Schrei Godoy  
para optar al grado académico de Licenciado en Biología.

Guatemala  
2014







Diversidad genética e historia demográfica de una población del  
lagarto escorpión (*Heloderma charlesbogerti*) basada en  
marcadores microsatélites e implicaciones para su conservación



**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

Facultad de Ciencias y Humanidades

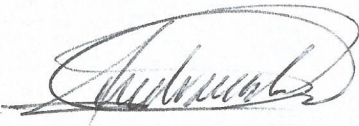
Diversidad genética e historia demográfica de una población del  
lagarto escorpión (*Heloderma charlesbogerti*) basada en  
marcadores microsatélites e implicaciones para su conservación

Trabajo de graduación presentado por  
Klaus Thomas Schrei Godoy  
para optar al grado académico de Licenciado en Biología.

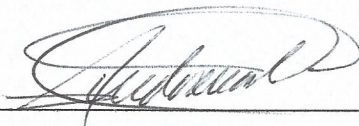
Guatemala  
2014

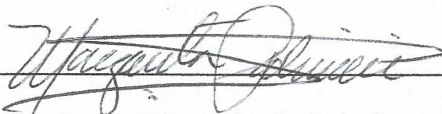


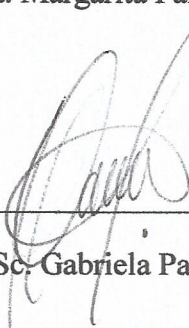
Vo. Bo. :

(f)   
\_\_\_\_\_  
Lic. Andrés Ávalos

Tribunal Examinador:

(f)   
\_\_\_\_\_  
Lic. Andrés Ávalos

(f)   
\_\_\_\_\_  
Lcda. Margarita Palmieri

(f)   
\_\_\_\_\_  
M. Sc. Gabriela Palomo

Fecha de aprobación: Guatemala, 21 de marzo de 2014



# ÍNDICE

ÍNDICE .....	xi
LISTADO DE CUADROS Y FIGURAS .....	xiii
RESUMEN .....	xv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
A. Antecedentes .....	1
1. <i>Heloderma charlesbogerti</i> .....	1
2. Estado de conservación del escorpión .....	4
3. Poblaciones pequeñas, diversidad genética y conservación.....	8
4. Cuantificación de la variabilidad genética mediante marcadores microsatélites e inferencia de parámetros demográficos .....	9
5. Información genética implicada en el manejo de especies para conservación.....	13
B. Justificación.....	14
C. Objetivos .....	15
1. Objetivo general .....	15
2. Objetivos específicos .....	15
II. MÉTODOS.....	17
A. Procedencia de las muestras .....	17
B. Extracción de muestras de células de epitelio bucal .....	17
C. Purificación de ADN a partir de células de epitelio bucal .....	18
D. Determinación de la pureza y cuantificación del ADN en solución.....	19
E. Amplificación de ADN.....	19
F. Identificación de fragmentos de ADN.....	20
G. Análisis de datos .....	21
III. RESULTADOS.....	21
A. Extracción de ADN .....	23
B. Amplificación de ADN.....	23
C. Comparación de diversas condiciones para la visualización de microsatélites en geles de acrilamida.....	24

D. Diversidad genética de la población .....	24
E. Visualización de fragmentos de ADN amplificados en geles de acrilamida de 50 cm en condiciones desnaturalizantes.....	24
IV. DISCUSIÓN .....	31
A. Extracción y amplificación de ADN a partir de células de epitelio bucal en <i>Heloderma</i> mediante el método de sal .....	31
B. Uso de electroforesis en geles de acrilamida y tinción con nitrato de plata como medio de visualización de los fragmentos amplificados.....	34
1. Migración de los fragmentos según distintas condiciones de electroforesis .....	35
2. Patrones de bandas exhibidos por los productos de amplificación en geles de 50 cm en condiciones desnaturalizantes y caracterización de los alelos .....	38
C. Diversidad genética de la población .....	41
D. Pérdida de diversidad genética en la población estudiada .....	42
E. Recomendaciones para la conservación del escorpión.....	45
V. CONCLUSIONES .....	49
VI. RECOMENDACIONES.....	51
VII. LITERATURA CITADA.....	53
VIII. APÉNDICES.....	63
A. Protocolo para la visualización de marcadores microsatélites mediante geles de 50 cm en condiciones desnaturalizantes y tinción con nitrato de plata.....	63
B. Caracterización de genotipos individuales en la población de <i>Heloderma charlesbogerti</i> en Cabañas, Zacapa, en base a seis marcadores microsatélites.....	71
C. Resumen de la variación de seis <i>loci</i> microsatélites en la población de <i>Heloderma charlesbogerti</i> en Cabañas, Zacapa.....	72
D. Estimación del costo de reactivos de laboratorio para la estimación del tamaño de los fragmentos de marcadores microsatélites. ....	73

## LISTADO DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1: Secuencias de los seis pares de cebadores utilizados en esta investigación y motivos repetidos en los <i>loci</i> microsátélites flanqueados por éstos. ....	20
Figura 1: Fotografía de un ejemplar adulto de <i>Heloderma charlesbogerti</i> .....	3
Figura 2: Representación señalizada de la porción de interés del gel de visualización de productos de amplificación del marcador HELO1 y fotografía del mismo.....	25
Figura 3: Representación señalizada de la porción de interés del gel de visualización de productos de amplificación del marcador HELO2 y fotografía del mismo.....	26
Figura 4: Representación señalizada de la porción de interés del gel de visualización de productos de amplificación del marcador HELO3 y fotografía del mismo.....	27
Figura 5: Representación señalizada de la porción de interés del gel de visualización de productos de amplificación del marcador HELO4 y fotografía del mismo.....	28
Figura 6: Representación señalizada de la porción de interés del gel de visualización de productos de amplificación del marcador HELO5 y fotografía del mismo.....	29
Figura 7: Representación señalizada de la porción de interés del gel de visualización de productos de amplificación del marcador HELO6 y fotografía del mismo.....	30

Figura 8: Comparación de la migración de la misma escalera molecular y productos de amplificación del marcador HELO1 en un gel de 50 cm en condiciones desnaturalizantes y geles de acrilamida de siete centímetros. ....	36
Figura 9: Comparación de las señales mostradas por productos de amplificación del marcador HELO1 en geles a acrilamida de siete centímetros y geles de 50 cm en condiciones desnaturalizantes. ....	36
Figura 10: Perfil de intensidad de la señal de un mismo producto de amplificación de un individuo heterocigoto visualizado en geles de 50 cm en condiciones desnaturalizantes y geles de acrilamida de siete centímetros. ....	37
Figura 11: Perfil de intensidad de las señales de productos de amplificación del marcador HELO3 y HELO2 de individuos heterocigotos, homocigotos para el alelo de mayor longitud y homocigotos para el alelo de menor longitud. ....	40
Figura 12: Fotografía de la visualización de productos de amplificación del marcador HELO3 en un gel de 50 cm en condiciones desnaturalizantes. ....	41

## RESUMEN

El escorpión, *Heloderma charlesbogerti*, es una lagartija endémica de Guatemala que habita en las zonas secas del oriente del país. Diversas presiones humanas que van desde la pérdida de hábitat hasta la eliminación selectiva y comercio ilegal han contribuido a que la especie se encuentre en peligro crítico de extinción. Este trabajo explora si la reducción del tamaño de una de sus poblaciones ha sido causa de una fuerte reducción de su diversidad genética. Tal reducción podría conllevar otros problemas como depresión endogámica y mayor susceptibilidad a factores ambientales, que en conjunto podrían precipitar la especie a la extinción.

Se evaluó la diversidad genética de la población silvestre de escorpión en Cabañas, Zacapa. Para ello, se obtuvo ADN mediante un protocolo semi-invasivo de hisopado bucal y se utilizaron seis marcadores microsatélites. El tamaño de los productos de amplificación de PCR fue determinado mediante electroforesis en geles de acrilamida de 50 cm en condiciones desnaturalizantes y tinción con nitrato de plata.

Se determinó que la diversidad genética de la población exhibe valores muy bajos. Esto se debe probablemente a un prolongado cuello de botella y no a factores humanos recientes. Este cuello de botella puede ser resultado de presiones humanas anteriores al último siglo y a la dinámica natural del hábitat específico del escorpión.

Con base a los resultados encontrados, se recomienda urgentemente evaluar la genética poblacional del escorpión a nivel de especie, abarcando a todas las poblaciones hoy aisladas, y considerar acciones de manejo genético enfocadas en reducir su riesgo de extinción. Cualquier futura acción de manejo debe, de forma indispensable, considerar la variabilidad genética de la población



# I. INTRODUCCIÓN

Aunque la situación real de *Heloderma charlesbogerti* es en buena medida desconocida, no es aventurado asumir que la especie sufre de una distribución muy reducida y tamaños poblacionales son quizá menos de 200 individuos adultos en promedio. Los factores que la han llevado a tal situación son muy probablemente de origen humano y, como tal, es posible que la especie presente una diversidad genética artificialmente baja.

La reducida diversidad genética puede manifestarse en la reducción del éxito reproductivo y el aumento de la susceptibilidad de la especie a cambios aleatorios de tipo ambiental o a patógenos. Cuando una población pequeña se enfrenta a estos problemas, ésta se precipita hacia la extinción debido a que tanto la causa como el efecto se retroalimentan positivamente. Un reducido número poblacional ocasiona problemas que a la vez contribuyen a reducir más a la población.

Evaluar la diversidad genética de esta especie presenta dificultades especiales. Al tratarse no sólo de una especie rara sino con hábitos especialmente sigilosos, la colecta de un número suficiente de especímenes ha sido, a lo largo de los años, un desafío insolventable. Recientemente, sin embargo, las iniciativas de conservación alrededor de la especie han facilitado el acceso a un mayor número de muestras.

El presente trabajo evalúa la diversidad genética de una de las poblaciones silvestres del escorpión empleando seis marcadores microsátélites y utilizando un método semi-invasivo para la extracción del material genético, examina la utilidad del método empleado y discute las posibles causas de la diversidad genética encontrada. Las conclusiones de este trabajo serán de gran relevancia para la toma de decisiones respecto a la conservación del escorpión.

## A. Antecedentes

1. *Heloderma charlesbogerti*. *Heloderma charlesbogerti* pertenece a la familia de lagartijas Helodermatidae, cuya distribución abarca desde el sur de los Estados Unidos hasta Guatemala. Hasta hace muy poco, la familia estaba conformada por un solo

género (*Heloderma*) dividido en dos especies: el “monstruo de Gila” *H. suspectum* y *H. horridum* conocido como “escorpión”. Esta última especie estaba conformada por cuatro subespecies, pero diversas líneas de evidencia llevaron a que cada una de ellas se reconozca hoy a nivel de especie (Reiserer, Schuett & Beck, 2013). *H. charlesbogerti* es endémica de Guatemala y actualmente se considera restringida a la región semiárida del Valle del Motagua. Ya que en su rango de distribución es conocida popularmente como “escorpión”, se utilizará este nombre común a lo largo de este documento para referirse exclusivamente a la especie guatemalteca *H. charlesbogerti*, excluyendo a las que en México son referidas bajo el mismo nombre.

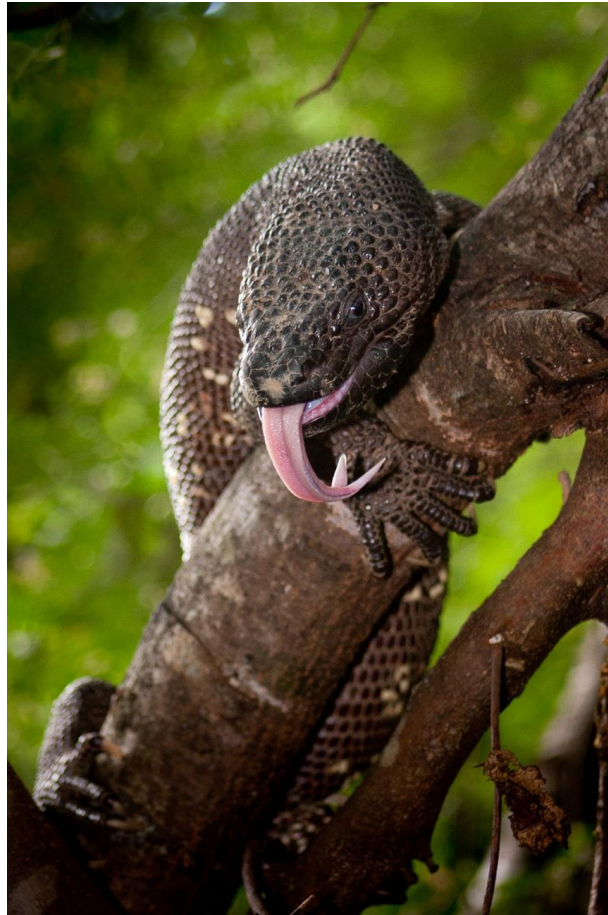
La extraña apariencia del escorpión y los demás miembros de su familia, así como sus características fisiológicas únicas, se encuentran entre las más distintivas de las lagartijas existentes actuales. Entre ellas destacan sus adaptaciones a los ecosistemas secos y su peculiar aparato venenoso.

La longitud promedio de un escorpión silvestre adulto es de  $57.42 \pm 4.08$  cm (IC95%), pero en cautiverio se han reportado especímenes que sobrepasan los 80 cm (Ariano, Alvarado, Masaya, & Sercaria, 2006). Su coloración es negra, con pequeñas manchas amarillas envolviendo el cuerpo y anillos del mismo color en la cola. La coloración es una de las principales diferencias entre las especies hasta hace poco clasificadas dentro de *Heloderma horridum*, exhibiendo la abundancia y patrón de las manchas amarillas claras diferencias. La textura de la piel, con pequeños bultos en forma redonda, responde a la presencia de estructuras de hueso incrustadas en el tejido conocidas como osteodermos. La cola es relativamente corta y muy robusta en comparación a otros grupos de lagartijas (Figura 1).

La familia Helodermatidae fue hasta hace poco considerada el único grupo de lagartijas venenosas existentes, aunque recientemente se han descubierto aparatos venenosos en otras especies (Fry *et al.*, 2006, 2009). El veneno con fines primariamente defensivos es producido dentro de glándulas salivales situadas en la mandíbula inferior y secretado a través de ductos que terminan en la base de los dientes; éstos presentan surcos por los cuales el veneno fluye por capilaridad (Beck, 2009). Debido a que los *Heloderma* son tímidos y sigilosos, puede decirse que no representa una amenaza real para los

humanos (Kohler, 2008). Las mordidas accidentales en casos reportados en la literatura siempre responden a manipulaciones intencionales del animal. Estos accidentes deben tratarse como una emergencia médica, pero no se han reportado muertes como consecuencia (Beck, 2009).

**Figura 1: Fotografía de un ejemplar adulto de *Heloderma charlesbogerti*.**



**Fotografía por el autor.**

El escorpión habita el ecosistema de bosque tropical estacionalmente seco, caracterizado por precipitación reducida y vegetación adaptada a la sequía, con notable presencia de cactáceas. Su período de actividad se restringe a la temporada de lluvia, estiviendo en refugios subterráneos durante la época seca (Ariano Sánchez, 2007). Sus movimientos son particularmente lentos, imposibilitándole la persecución o emboscada de presas. En consecuencia este carnívoro es principalmente un depredador de nidos, siendo los huevos de vertebrados (aves y otras lagartijas) y roedores recién nacidos sus principales alimentos (Beck, 2009). La estacionalidad del ecosistema que habita sumado

al nicho altamente especializado que ocupa, hace que el escorpión se encuentre naturalmente en densidades bajas si se compara con otras lagartijas. Beck (2009) estima para *Heloderma horridum* el equivalente a un individuo cada 10 hectáreas en hábitat no perturbado, lo cual es coherente con observaciones personales alrededor de la Reserva Natural *Heloderma* en Cabañas, Zacapa. Esto, sumado a las presiones humanas y las limitaciones geográficas de su ecosistema, ha significado que el escorpión se considere una especie en peligro crítico en Guatemala (CONAP, 2009).

2. Estado de conservación del escorpión. Aunque la presencia de *Heloderma* en el oriente guatemalteco no fue reconocida por la comunidad científica hasta su descripción a fines de los años ochenta (Campbell & Vannini, 1988), tratándose por tanto de un descubrimiento relativamente reciente, el escorpión ha recibido ya particular atención con fines conservacionistas en respuesta a las serias amenazas que lo afectan (Reiserer *et al.*, 2013).

La necesidad de implementar acciones de conservación para el escorpión se advirtió rápidamente tras su descubrimiento. Ya en esos años se consideraba sumamente raro y la desaparición del hábitat presentaba una seria amenaza, motivando que algunos especímenes vivos fueran trasladados hacia Estados Unidos como una estrategia de conservación (Owens, 2006). Seguidamente, se enfatizó en mayor investigación científica y acciones de preservación en el ámbito silvestre. En consecuencia, el escorpión ha sido uno de los principales elementos de conservación en el Valle del Motagua, y diferentes aspectos de su estado de conservación han sido tratados (CONAP-ZOOTROPIC, 2013).

En los últimos años observaciones personales han confirmado registros de la presencia del escorpión en los municipios de Cabañas, Gualán (Zacapa), Sanarate, El Júcaro (El Progreso) y San José del Golfo (Guatemala). Registros dentro de las últimas tres décadas incluyen además el municipio de Zacapa y más recientemente se publicaron registros para la vertiente pacífica del país, por primera vez fuera del Valle del Motagua (Anzueto & Campbell, 2010). Estos registros corresponden a especímenes anteriores a 1970 (previos, por tanto, a la descripción de la subespecie), que habían sido depositados en museos. Estos especímenes provienen de los municipios de Villa Canales y Oratorio en los departamentos de Guatemala y Santa Rosa. Aunque no han colectado especímenes

desde ese tiempo, una evaluación de campo reciente consideró muy posible que la especie se encuentre aún en Villa Canales (obs. per.; datos no publicados). Al mismo tiempo, se cuenta con datos anecdóticos que sitúan a la especie en San Jacinto, Chiquimula.

Los últimos datos de distribución aquí mencionados se acercan a las primeras especulaciones sobre su distribución realizadas junto a la descripción de la subespecie (Campbell & Vannini, 1988). Estos autores sugerían que la distribución podía extenderse hacia la parte este de la vertiente pacífica, abarcando Chiquimula, Jutiapa y Santa Rosa. Los registros en Villa Canales (Anzueto V & Campbell, 2010) extienden más aún su rango de distribución, llevándolo hasta la zona central de la bocacosta guatemalteca. Los mismos registros se encuentran fuera de la distribución potencial más recientemente predicha para *H. horridum* (sensu lato) (Domínguez-Vega, Monroy-Vilchis, Balderas-Valdivia, Gienger, & Ariano-Sánchez, 2012), que no tomó en cuenta estas localidades de reciente reporte. Esto demuestra que la distribución potencial del escorpión debe ser aún un tema de estudio. La incorporación de todos los registros históricos y el uso de capas de información geográfica más precisas podrían predecir un escenario diferente y llevar al descubrimiento de nuevas poblaciones, ya que sus hábitos sigilosos y su densidad poblacional naturalmente baja contribuyen a que su existencia en una localidad dada pueda pasar desapercibida, tal como ocurrió en el Valle del Motagua hasta finales los años ochenta. Esto hace muy difícil contar con datos precisos sobre su estado de conservación, y obliga a trabajar bajo ciertos supuestos.

Actualmente, las únicas poblaciones con registros confirmados recientes son cuatro. Ariano y Salazar (2007) reportan tres poblaciones presentes en los únicos tres parches de bosque continuo de gran tamaño encontrados en su estudio de distribución en Zacapa (nombradas en esa publicación como Cabañas-El Júcaro, San Jorge-Zacapa y Gualán-La Cartuchera-Los Jutes). Ya que el estudio no tomó en cuenta El Progreso, no se mencionó una población confirmada en Sanarate (que podría nombrarse Sanarate-San José del Golfo), conocida por el “Programa de Protección al Escorpión” de la empresa Cementos Progreso, y un registro fotográfico reciente en San José del Golfo. Otras

localidades responden únicamente a anécdotas no confirmadas, o a sitios donde el último registro dista en más de 40 años, por lo que podría tratarse de poblaciones ya extintas.

Aunque la existencia de otras poblaciones debe considerarse como una posibilidad abierta, también resulta factible que las cuatro poblaciones confirmadas puedan ser las únicas remanentes al día de hoy o que éstas mismas se encuentren subfragmentadas. Dada esta situación el principio de precaución obliga a diseñar estrategias de conservación en base a este escenario, y no acomodarse en la posibilidad de que existan otras poblaciones aún por descubrirse.

Junto a las limitaciones para establecer las poblaciones existentes, se encuentran también dificultades para establecer el número poblacional del escorpión. Un estimado sugirió que la población total se encontraba entre 200 y 250 individuos en vida silvestre (D. Ariano-Sánchez, 2006; CITES, 2007), sin embargo, los detalles de tal estimación no fueron reportados. La ONG Asociación Zootropic ha conducido un estudio de captura y recaptura durante varios años en el municipio de Cabañas y Gualán. A partir de este estudio, hoy se cifra alrededor de 300 individuos totales solamente a la población de Cabañas-El Jícaro, pero se cree que esta población es la de mayor tamaño.

Independientemente del número real, es razonable asumir que el escorpión existe en cantidades muy por debajo de las deseables. Si se toma en cuenta su rareza natural, sumado a las presiones humanas enfrentadas a nivel de especie y ecosistema, el escorpión cumple ampliamente los criterios para considerarse una especie en peligro de extinción. La especie es ampliamente considerada como una de las más amenazadas de Guatemala; esto responde no sólo a la pérdida de hábitat, sino a que se suman presiones tales como la eliminación selectiva debido al miedo que causa en algunas personas y la extracción ilegal para el mercado de reptiles en cautiverio (Ariano-Sánchez, 2003). Los bosques secos en la región semiárida del Valle del Motagua, de los cuales es propio este animal, forman parte del ecosistema más amenazado y menos protegido de Centroamérica (CONAP-ZOOTROPIC-CECON-TNC, 2011) y del ecosistema tropical en mayor peligro a nivel mundial (Janzen, 1988). En respuesta a lo anterior, el escorpión ha sido incluido en el listado nacional de especies amenazadas (CONAP, 2009) y ha sido transferido a la categoría más restrictiva de comercio internacional de especies (CITES, 2007).

Hasta hace pocos años no existían zonas protegidas dentro del rango de distribución del escorpión. Actualmente se encuentran varias pequeñas reservas privadas en el Valle del Motagua, de las cuales sólo dos son conocidas por albergar a la especie. El Parque Regional Municipal Niño Dormido y la Reserva Natural *Heloderma* (esta última aún en proceso de declaratoria formal) localizados en Cabañas y establecidos en 2003 y 2007 suman entre ellos menos de 250 ha. Sólo una pequeña porción del Parque Regional ofrece hábitat adecuado para el escorpión, por lo que la extensión del hábitat protegido para la especie es aún menor. Con ello el Sistema Guatemalteco de Áreas Protegidas es aún insuficiente para la protección de la especie. Mientras la pérdida de hábitat continúa, otras presiones han disminuido. La eliminación selectiva se ha logrado reducir casi totalmente en la población de Cabañas, mientras que no se tiene evidencia de extracción ilegal en los años más recientes. Con ello, se considera que actualmente la principal amenaza del escorpión es la destrucción de su ecosistema.

El escorpión ha sido también el foco de atención de esfuerzos de reproducción en cautiverio con éxito aún muy limitado. El zoológico estadounidense San Diego Zoo, que actualmente no alberga la especie, consiguió reproducirlo en dos ocasiones totalizando seis crías en 2003 y 2006 (Owens, 2006). Zoo Atlanta en el mismo país produjo una única cría en el 2012 mientras que en Guatemala la Asociación Zootropic comenzó a reproducir al escorpión dentro de la Reserva Natural *Heloderma*, consiguiendo también una cría en el mismo año. Al año siguiente, ambas instituciones consiguieron cinco y dos crías respectivamente. El objetivo del programa de reproducción tiene como fines la reintroducción de la especie en el medio natural y el establecimiento de una población en cautiverio. En todos estos esfuerzos, la infertilidad de los huevos ha sido un problema notable (Owens 2006, B. Lock, com. pers., obs. pers.).

A pesar de algunos avances, lo anteriormente expuesto no presagia un buen futuro para el escorpión. Aún si la pérdida de hábitat se remediara en el corto plazo, es posible que las consecuencias de tener un número poblacional bajo hayan afectado a la especie de modo permanente y dificulten que ésta se recupere satisfactoriamente. Por tal razón la evaluación de su diversidad genética y consecuentes estrategias de manejo podrían ser cruciales para su conservación.

3. Poblaciones pequeñas, diversidad genética y conservación. Las consecuencias de un pequeño tamaño poblacional tienen que ver con la genética de poblaciones y los modelos demográficos de extinción. En palabras simples, mientras más pequeña es una población, más susceptible es de extinguirse por varias causas (Shaffer, 1981). Este fenómeno se debe tanto a problemas demográficos que ocurren a consecuencia del azar, los cuales son mucho más probables en poblaciones pequeñas, como a diversos problemas causados por la pérdida de diversidad genética.

Los procesos que ocurren de forma no determinista, esporádica y no intermitente son también llamados procesos estocásticos. Este tipo de procesos que son insignificantes en poblaciones grandes pueden afectar seriamente a poblaciones pequeñas (Gotelli, 2001; Meffe & Carroll, 1997). En poblaciones de estas características el azar puede llevar, por ejemplo, a una relación de sexos o una secuencia de eventos de mortalidad y fecundidad desfavorables para la supervivencia de la especie (p. e. una gran proporción de machos, o una secuencia de individuos poco fértiles). Cambios en el ambiente como catástrofes naturales también pueden extinguir con mucha mayor probabilidad a una población pequeña que a una grande.

Los procesos estocásticos también pueden manifestarse a nivel genético. En una población pequeña es mucho más probable que la frecuencia de alelos en la siguiente generación difiera respecto de la de los padres que si la población fuera grande. En las poblaciones pequeñas es posible que algunos alelos no queden representados en la siguiente generación debido al azar (Meffe & Carroll, 1997), en forma de error de muestreo aleatorio. Este cambio aleatorio en la frecuencia de alelos de las siguientes generaciones se conoce como deriva genética. Mientras que en una población grande la selección natural elimina mutaciones perjudiciales y el papel del azar es mínimo, en una población pequeña el azar puede predominar (Frankham, Ballou, & Briscoe, 2010) incrementando la deriva genética.

Una población pequeña también es más susceptible de presentar endogamia. La endogamia es la producción de crías por emparejamiento de individuos relacionados por descendencia. Ésta puede tener un gran impacto en la estructura genética de una población, tanto por la reducción de variabilidad genética como por aumentar la

posibilidad de que alelos perjudiciales se expresen debido a homocigosidad (Meffe & Carroll, 1997). Este impacto se conoce como depresión endogámica, que puede llevar rápidamente a la extinción debido a la relación positiva entre ella y la reducción del tamaño poblacional, y junto a ella con procesos estocásticos demográficos. Esta relación se conoce como el vórtice de extinción (Tanaka, 2000). La depresión endogámica tiene consecuencias perjudiciales en todos los aspectos reproductivos y de supervivencia, incluyendo producción de esperma, capacidad de apareamiento, fecundidad femenina, supervivencia de juveniles, habilidad parental, edad hacia la madurez sexual y supervivencia adulta (Frankham *et al.*, 2010).

Aunque el papel de los factores genéticos en el proceso de extinción fue por muchos años debatido, hoy se tiene suficiente evidencia de que la depresión endogámica y pérdida de diversidad genética aumentan el riesgo de extinción en poblaciones naturales y en experimentos de laboratorio (Frankham, 2005). Ignorar los factores genéticos puede llevar a subestimar el riesgo de extinción de una población y reflejarse en acciones de conservación inadecuadas (Blomqvist, Pauliny, Larsson, & Flodin, 2010). Ha sido demostrado que, contrario a lo pensado anteriormente, la mayoría de especies no se extinguen antes de que los factores genéticos las afecten negativamente. Frecuentemente en los procesos de extinción la depresión endogámica se suma a otras presiones para aumentar el riesgo de extinción de las especies amenazadas (Spielman, Brook, & Frankham, 2004). Si bien este factor puede no ser necesariamente la principal causa de extinción, sí puede resultar crítico (Mills & Smouse, 1994).

4. Cuantificación de la variabilidad genética mediante marcadores microsatélites e inferencia de parámetros demográficos. Cuantificar la variabilidad genética requiere identificar el nivel de variación existente entre el genoma de individuos de la misma especie. Diversos métodos moleculares tienen un importante papel en esta estimación al comparar los genotipos de los diferentes individuos en fragmentos seleccionados del genoma ya conocidos por exhibir variación. Existen diversos marcadores moleculares utilizados para este propósito; entre los más utilizados se encuentran el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), el polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP) y los marcadores microsatélites. Los

microsatélites son altamente poderosos para determinar la variabilidad genética y el parentesco, pudiendo además identificar heterocigosidad al distinguir las variaciones alélicas en un *locus* dado (lo cual se conoce como codominancia). Estos marcadores presentan además ventajas prácticas, pues pueden ser fácilmente amplificados por PCR. Entre sus desventajas se encuentra que su desarrollo requiere previa información molecular de la especie a tratar, lo cual resulta altamente laborioso (Arif & Khan, 2009). En el caso de *H. horridum (sensu lato)*, ya se han caracterizado seis marcadores microsatélites polimórficos que hacen posible estudiar su genética poblacional mediante esta técnica (Feltoon *et al.*, 2007) y fueron utilizados en este estudio. Más recientemente se caracterizaron marcadores microsatélites para *H. suspectum* de los cuales se desarrollaron 13 cebadores que presentaron amplificación en *H. horridum* (Edwards *et al.* 2013).

Los microsatélites son copias múltiples de pequeñas secuencias de entre uno y seis (comúnmente dos) pares de bases que se distribuyen de modo uniforme a lo largo del genoma nuclear de los eucariotas. La cantidad de repeticiones para un *locus* dado es altamente variable entre individuos, resultando en variaciones en la longitud del *locus* microsatélite. El ADN que rodea a los *loci* microsatélites es generalmente idéntico entre individuos de una misma especie, permitiendo el desarrollo de oligonucleótidos o cebadores que permiten la amplificación de los microsatélites mediante PCR. Los productos amplificados resultantes pueden luego discriminarse según su longitud mediante electroforesis en geles de acrilamida o técnicas de electroforesis capilar. Con ello, es posible caracterizar los alelos presentes en determinados *loci* para una muestra poblacional y describir con ello genotipos individuales. La información obtenida permite describir el nivel de variación presente en la muestra e inferir a partir de ella los procesos genéticos que afectan a la población (Arif & Khan, 2009; Garza & Williamson, 2001).

La relación para predecir la frecuencia de alelos dada la frecuencia de genotipos, o viceversa, responde al modelo desarrollado independientemente por Godfrey H. Hardy y Wilhelm Weinberg en 1908. Este modelo conocido ampliamente como el principio de Hardy-Weinberg establece que cuando los supuestos de Hardy-Weinberg se cumplen, las frecuencias genotípicas se mantienen constantes a lo largo de las generaciones (Hamilton,

2009). El principio aplica para organismos diploides que se reproducen sexualmente y asume los siguientes supuestos: el emparejamiento es al azar, la población es efectivamente infinita, no hay migración, no ocurren mutaciones, y no existe selección natural. Está demostrado matemáticamente que cuando los principios se cumplen los alelos se encuentran en “equilibrio”, y un alelo dado se conserva en la población independientemente de su frecuencia inicial (Frankham *et al.*, 2010).

Aunque los supuestos no reflejan ningún caso real, la aplicación común del principio de Hardy-Weinberg es evaluar desviaciones de su modelo nulo; es decir, probar la hipótesis nula de que los supuestos se cumplen indicando si la población está o no en equilibrio. La significancia de las diferencias entre las frecuencias alélicas observadas y esperadas según el modelo puede establecerse por una prueba de ji-cuadrado. Al encontrarse grandes desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg en una población, éstas deben analizarse junto a información adicional para explicar una posible causa. Por ejemplo, un exceso de homocigotos podría indicar la ocurrencia de endogamia, lo cual constituye información importante para la conservación de una especie. Los marcadores microsatélites son especialmente adecuados para evaluar el modelo de equilibrio de Hardy-Weinberg en una población (Frankham *et al.*, 2010).

La información genética ha sido desde sus inicios foco de grandes avances en el campo de la estadística. Mientras algunos modelos como el equilibrio de Hardy-Weinberg han sido aplicados por décadas, los métodos más recientes aprovechan el mayor poder computacional y la información de nuevas técnicas moleculares para inferir un rango más amplio de parámetros. Diversos métodos tienen la capacidad de proveer información sobre fenómenos demográficos históricos incluyendo migraciones y crecimiento. Esto a la vez permite inferir una de las principales interrogantes en genética de la conservación: distinguir entre una población pequeña que naturalmente tiene poca variación genética de una cuya poca variabilidad es debida a una reducción poblacional reciente (Pearse & Crandall, 2004), siendo éstas últimas de especial interés. Tal información repercute directamente en la toma de decisiones para la conservación de una especie.

Como se verá a continuación, algunos de estos métodos infieren reducciones recientes en el tamaño poblacional (cuellos de botella) a partir de datos de microsatélites utilizando un bajo número de muestras y *loci* evaluados. Estas pruebas hacen uso de modelos matemáticos de mutación de estos *locus* y comparan los resultados experimentales con valores esperados según los modelos para concluir su significancia. La existencia de estas herramientas sirve para ejemplificar la utilidad de la información que puede obtenerse a través de marcadores moleculares. Dos de estas herramientas, la “razón M” (Garza & Williamson, 2001) y el método BOTTLENECK (Piry, Luikart, & Cornuet, 1999) se describen a continuación.

La “razón M” se fundamenta en que los alelos raros se pierden rápidamente, pero a menos que éstos estuvieran en los extremos del rango de longitud del *locus* la pérdida de alelos raros no afecta el rango de tamaños para un *locus* dado. Con ello la cantidad de alelos y sus respectivos tamaños en un *locus* es un indicador de cuántos alelos se han perdido. Mediante este método es posible determinar si el estadístico M (la razón entre el número de alelos y el rango de tamaños) difiere significativamente del esperado si la población se encontrara en equilibrio de acuerdo al modelo de mutación de dos fases de Rienzo *et al.* (1994).

El programa BOTTLENECK detecta reducciones identificando excesos de heterocigosidad basado en los modelos de mutación de alelos infinitos (Kimura & Crow, 1964) y paso a paso (Ohta & Kimura, 1973). El método se basa en que al ocurrir una reducción en el tamaño poblacional, el número de alelos se reduce más rápido que lo esperado si la población estuviera en equilibrio de mutación y deriva. Como la reducción en el número de alelos se debe a la pérdida de alelos raros, esto contribuye poco a reducir el valor de la heterocigosidad. Por ello es posible detectar si existe un exceso significativo de heterocigosidad respecto al esperado en una población en equilibrio. Cornuet y Luikart (1996) desarrollaron cuatro pruebas para determinar esta significancia. Éstas han probado ser eficaces en detectar cuellos de botella en poblaciones naturales cuando se evalúan al menos cinco *loci* polimórficos y 20 – 30 individuos (Luikart & Cornuet, 1998). La concordancia entre varios métodos provee una mayor confianza de los resultados de las pruebas (Pearse & Crandall, 2004).

5. Información genética implicada en el manejo de especies para conservación. La información molecular llevada a la práctica de la conservación de poblaciones silvestres es aún un fenómeno relativamente limitado, lo cual puede deberse a que su importancia aún no ha sido del todo reconocida y a que aún se trata de un campo relativamente novedoso. La genética de la conservación ha sido utilizada principalmente para probar teorías que relacionan la diversidad genética con problemas demográficos, definir la distancia genética entre poblaciones y diagnosticar la variabilidad genética en una especie dada, como es el caso de este estudio. Los ejemplos de este tipo son amplios: los marcadores microsatélites han sido empleados para describir la diversidad genética de poblaciones de buitres amenazados (Arshad *et al.*, 2009) y pandas gigantes (Lu *et al.*, 2001), inferir el flujo genético entre serpientes de cascabel (Bushar, Reinert, & Gelbert, 1998) y caracterizar el efecto de un cuello de botella poblacional en tortugas (Kuo & Janzen, 2004), por mencionar algunos.

Pero son más limitados los casos donde la información genética, fuera de servir con fines descriptivos o teóricos, ya ha sido empleada directamente en tomas de decisiones llevadas a acciones concretas en el campo de la conservación de poblaciones silvestres. Aunque de modo conceptual la genética influye constantemente la toma de decisiones de conservación, conocer el caso concreto de una especie en particular también puede ser de utilidad y ha producido, aunque aún escasos, algunos ejemplos de manejo. Cuando una reducida diversidad genética ha sido diagnosticada en algunas especies en peligro de extinción, una nueva modalidad de manejo conocida como “rescate genético” ha jugado un papel protagónico en su conservación. El rescate genético busca aumentar el éxito reproductivo de una población con la introducción de inmigrantes. Se ha demostrado que en algunas condiciones unos pocos inmigrantes pueden tener impactos positivos inmediatos en la trayectoria de una población (Tallmon, Luikart, & Waples, 2004). Especialmente notables son los casos exitosos de manejo genético del lobo de México (Fredrickson, Siminski, Woolf, & Hedrick, 2007) y la pantera de Florida (Johnson *et al.*, 2010). En estos casos, la introducción de migrantes genéticamente distintos ocasionó una marcada mejora en la tasa de reproducción de ambas especies, revirtiendo la tendencia poblacional. Entre los reptiles, un caso muy

estudiado con claros efectos positivos en la recuperación de poblaciones que sufrían depresión endogámica, es el de la víbora europea en Suecia (Madsen *et al.*, 1999).

El manejo de poblaciones viables en condiciones de cautiverio y la cría de soporte también deben apoyarse en el conocimiento de la diversidad genética. Un adecuado manejo genético en cautiverio ha sido uno de los factores clave para la exitosa reintroducción del cóndor californiano en la naturaleza, luego de que los últimos ejemplares fueran transferidos al cautiverio en 1987 (Ralls & Ballou, 2004).

## **B. Justificación**

Aunque está lejos de ser la única, el escorpión se considera una de las especies más amenazadas de Guatemala. Se le considera como tal debido a que se conoce en muy pocas poblaciones naturales, posiblemente aisladas, y el tamaño de éstas se presume como muy pequeño. Ante tal situación, es posible que el escorpión haya sido conducido hacia la depresión endogámica y que esto junto a otros factores demográficos esté acelerando su extinción.

La extinción de esta especie tiene especial relevancia si se toma en cuenta que se trata de una lagartija de características únicas, propia de Guatemala, y considerada desde hace años una bandera de la conservación biológica en el país. Por ello, diagnosticar tan pronto como sea posible los problemas genéticos es de gran importancia para determinar las acciones a seguir en su conservación. Las dificultades encontradas en la reproducción de esta especie en cautiverio son coherentes con algunos síntomas de depresión endogámica, por lo que una reducida diversidad genética se sospecha como una causa y como tal requiere evaluación.

Conocer la diversidad genética de esta población de escorpión provee información relevante para determinar, en conjunto con otros datos, lo siguiente: si el tamaño poblacional es adecuado; si el tamaño poblacional se redujo recientemente o ha sido reducido por un largo tiempo; si el estudio debe ampliarse a otras poblaciones; y si hay evidencias que indiquen qué acciones de manejo genético son necesarias para la supervivencia a largo plazo del escorpión.

La evaluación del método utilizado es también de gran relevancia. Esto permite utilizar esta base metodológica en estudios futuros. El presente trabajo representa una de las primeras veces en el país que la diversidad genética a nivel poblacional es empleada como insumo en la conservación de una especie en peligro de extinción. También es la primera vez que los marcadores microsatélites desarrollados para *Heloderma horridum* (sensu lato) son empleados en un escenario práctico. Se espera que este proyecto sumado a otros que atacan diferentes factores que amenazan al escorpión, contribuya en última instancia a revertir la tendencia poblacional de la especie y a asegurar su conservación.

## **C. Objetivos**

### **1. Objetivo general**

Contribuir a la conservación de *Heloderma charlesbogerti* con información sobre su genética poblacional

### **2. Objetivos específicos**

- Evaluar un procedimiento para el estudio de la diversidad genética de *Heloderma charlesbogerti* basado en marcadores microsatélites.
- Evaluar la variabilidad genética de la población de *Heloderma charlesbogerti* de Cabañas, Zacapa.
- Inferir parámetros demográficos históricos a partir de la diversidad genética de la población y el conocimiento actual sobre la especie.
- Elaborar recomendaciones para el manejo de la especie con fines de conservación.



## **II. MÉTODOS**

### **A. Procedencia de las muestras**

La rareza y comportamiento del escorpión dificultan la captura de individuos dentro de técnicas de muestreo ordinarias, por lo cual éstas resultan imprácticas. Por tanto las muestras silvestres se obtuvieron de individuos capturados dentro del programa de conservación del escorpión que lidera la Asociación Zootropic. Este programa hace uso de una extensiva campaña de concienciación que ha tenido como resultado la colaboración de las personas locales a la conservación de la especie. Dentro de este programa los agricultores locales capturan los escorpiones que resultan de encuentros casuales y los entregan para su marcaje, previo a ser liberados en el sitio de captura. En 2011 y 2012, se obtuvieron muestras de 32 distintos escorpiones provenientes de la población de Cabañas-El Jícaro, en el municipio de Cabañas en Zacapa. Las colectas fueron realizadas bajo los permisos del Consejo Nacional de Áreas Protegidas según las resoluciones 012/2011 y 016/2012 vigentes entre marzo de 2011 y marzo de 2013, que autorizan expresamente al autor.

### **B. Extracción de muestras de células de epitelio bucal**

La obtención se muestras de células epiteliales de los escorpiones siguió el siguiente protocolo:

- Trasladar a los animales a una jaula y dejarlos reposar por varias horas a modo de reducir el estrés de la captura.
- Un asistente experto en el manejo de la especie debe sujetar a los animales durante todo el procedimiento y mantenerlos inmóviles.
- Proceder a la toma de muestras cuando los animales se encuentran en completa calma.
- Introducir, utilizando guantes de látex, un hisopo esterilizado dentro de la boca del animal. Si éste tuviera la boca cerrada, el hisopo puede introducirse fácilmente haciendo presión a través de la comisura labial.

- Con movimientos suaves raspar las superficies bucales durante un minuto, rotando el hisopo varias veces durante el procedimiento y evitando el contacto excesivo con saliva.
- Depositar el extremo del hisopo con la muestra dentro de un microtubo de 1.5 ml cargado con 600  $\mu$ l de buffer de lisis TNES (10 mM Tris pH 7.5, 400 mM NaCl, 100 mM EDTA, 0.6% SDS).
- Almacenar las muestras a temperatura ambiente hasta el procedimiento de extracción de ADN, por un máximo de cinco días previos al procedimiento de purificación.

Con el fin de contar con material de respaldo y almacenar muestras para usos futuros se obtuvieron hasta tres réplicas de raspado bucal por individuo.

Por tratarse de una especie peligrosa, únicamente profesionales de la Asociación Zootropic experimentados en el manejo de la especie manipularon a los animales. La persona encargada de sujetar los animales empleó guantes de cuero grueso como medida de protección.

### **C. Purificación de ADN a partir de células de epitelio bucal**

Para dos muestras de células epiteliales de cada individuo la extracción de ADN se realizó de acuerdo al siguiente protocolo, modificado de Alijanabi & Martínez (1997):

- Agregar al tubo 35  $\mu$ l de proteinasa K (20 mg/ml) y mezclar invirtiendo varias veces el tubo.
- Incubar la muestra por 24 horas a 37°C con agitación.
- Agregar 167  $\mu$ l de NaCl 6M y agitar vigorosamente (a mano) durante 20 segundos.
- Centrifugar a 14 000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Colectar el sobrenadante en un nuevo microtubo de 1.5 ml.
- Agregar un volumen de etanol al 100% a -20°C y mezclar suavemente invirtiendo el microtubo.
- Almacenar a -20°C por varias horas.

- Centrifugar a 14 000 rpm por 20 minutos a 4°C.
- Eliminar el etanol invirtiendo despacio el microtubo sobre un beaker.
- Lavar el pellet con 700 µl de etanol al 100% invirtiendo suavemente el microtubo.
- Centrifugar a 14 000 rpm por 20 minutos a 4°C.
- Eliminar el etanol invirtiendo despacio el microtubo sobre un beaker.
- Lavar el pellet con 700 µl de etanol al 70% invirtiendo suavemente el tubo.
- Centrifugar a 14 000 rpm por 20 minutos a 4°C.
- Eliminar el etanol invirtiendo despacio el microtubo sobre un beaker.
- Dejar el tubo abierto a temperatura ambiente hasta que el etanol se seque.
- Suspende el ADN en 100 µl de agua bidestilada estéril y almacenar en refrigeración.

Para el procedimiento de purificación de una porción de las muestras no se contó con una centrifugadora refrigerada, por lo que debieron centrifugarse a temperatura ambiente (Ver discusión sobre posibles efectos negativos de esta modificación).

#### **D. Determinación de la pureza y cuantificación del ADN en solución**

Utilizando un espectrofotómetro UV se obtuvo la concentración del ADN en solución para cada muestra a partir de la medición de la absorbancia de la luz de 260 nm de longitud de onda. El mismo espectrofotómetro se utilizó para indicar la pureza de la solución a partir de la razón calculada entre la absorbancia de la luz de 260 nm y la de 280 nm.

#### **E. Amplificación de ADN**

Para la amplificación, se seleccionó como plantilla la muestra de cada individuo con valor de pureza más cercano a 1.8. Las reacciones de amplificación se prepararon en volúmenes de 12.5 µl adicionales a la solución de ADN, según la siguiente mezcla de reacción:

9.65 µl de H<sub>2</sub>O, 0.1 µl de Taq polimerasa (Novagen NovaTaq 5U/µl), 0.5 µl de cada cebador (12.5 µM), 1.25 µl de buffer de la Taq (10X), 0.5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.5 µl de mezcla de DNTP (2.5 mM cada nucleotido) y 50 ng de ADN nuclear (volumen variable según la concentración de la solución).

El ciclo térmico consistió en 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.

Los cebadores utilizados fueron los que flanquean los seis *loci* microsatélites caracterizados por Feltoon *et al.* (2007), cuyas secuencias se encuentran a continuación:

**Cuadro 1: Secuencias de los seis pares de cebadores utilizados en esta investigación y motivos repetidos en los *loci* microsatélites flanqueados por éstos.**

<b>Locus</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Motivo repetido</b>
HELO1F	GATCAGGAGAATCAGGAGGTG	GT
HELO1R	GGCAGAGAAAACCACTGTGTGC	
HELO2F	TGAGAAGAGGTTGTCTGTATCTC	CA
HELO2R	TAGATACATAAATGCAGGCGCT	
HELO3F	TGGTGCTTTCCGACTTC	TG
HELO3R	CATGATAATTGGGTGTTACTG	
HELO4F	CCTTGCCATTACTTGCTTT	TG
HELO4R	TCCCCCTCCCTTTCTT	
HELO5F	GGGTGCAGAGCAATGG	AC
HELO5R	GTATGCATGATGTTTTTGAGC	
HELO6F	TCCTTTCCAGTTAATTTGCTTG	CAT
HELO6R	AGATTTTTTGCTATGGGGGAG	

## **F. Identificación de fragmentos de ADN**

Los fragmentos de ADN amplificado se esperaban en un rango de 112 a 219 pares de bases. Para estimar el tamaño de los productos amplificados se utilizó electroforesis en geles de acrilamida de 50 cm al 10% (acrilamida-bis 37.5:1) y urea 7M en el aparato de geles de secuenciación Sequi Gen-GT de Bio-Rad y tinción con nitrato de plata. El protocolo utilizado se proporciona en el apéndice A.

El tamaño de los fragmentos se estimó a partir de fotografías utilizando el software GelAnalyzer 2010a (Lazar, 2010). Se realizaron comparaciones en distintas condiciones de electroforesis para establecer la utilidad de otros métodos en el análisis de *loci* microsatélites. Las otras condiciones comparadas fueron: geles de siete centímetros no desnaturalizantes (aparato Mini-PROTEAN de Bio-Rad) y geles de 50 cm en condiciones no desnaturalizantes utilizando el mismo aparato de secuenciación.

### **G. Análisis de datos**

No fue posible realizar pruebas de inferencia estadística para inferir la historia demográfica de la población a partir de la caracterización genética. Esto se debió a que el número de *loci* polimórficos encontrados fue inferior al recomendado para estas pruebas (Garza & Williamson, 2001; Luikart & Cornuet, 1998), imposibilitando obtener conclusiones a partir de ellas.

Los valores de frecuencias alélicas, heterocigosidad observada y esperada, y las pruebas de significancia para identificar desviación del equilibrio de Hary-Weinberg se computaron mediante el programa GENEPOP 4.2 (Raymond & Rousset, 1995).



### III. RESULTADOS

#### A. Extracción de ADN

El mismo método de extracción se llevó a cabo en dos procedimientos independientes totalizando 73 muestras provenientes de 32 escorpiones distintos. La pureza del ADN, determinada por la razón de absorbancia 260:280 nm promedió 1.74 para todas las muestras. El rendimiento promedio para todas las muestras fue de 142 ng/μl. Se encontraron diferencias entre la concentración media del primer procedimiento de extracción ( $184.64 \pm 43.01$  ng/μl,  $n = 14$ ) y el segundo ( $99.78 \pm 17.74$  ng/μl,  $n = 18$ ) ( $t_{(30)} = 3.85$ ,  $p < 0.001$ ). La pureza también mostró diferencias significativas entre el primer ( $1.83 \pm 0.02$ ,  $n = 14$ ) y el segundo ( $1.79 \pm 0.03$ ,  $n = 18$ ) procedimiento de extracción ( $t_{(30)} = 2.29$ ,  $p = 0.03$ ).

#### B. Amplificación de ADN

Inicialmente, se realizó el procedimiento de amplificación de los seis marcadores para una muestra seleccionada de cada individuo, favoreciendo a las muestras con mayor cercanía al valor de absorbancia 260:280 nm de 1.8. De 32 muestras seleccionadas, se obtuvo amplificación satisfactoria de los seis marcadores para 22 (69%). En los casos que no se obtuvo amplificación tras la primera muestra, se repitió el procedimiento utilizando una segunda réplica de los mismos individuos, sin éxito alguno. Se encontró diferencia significativa de la concentración de las muestras que sí amplificaron ( $156.72 \pm 32.08$  ng/μl,  $n = 22$ ) y las que no ( $93.30 \pm 27.70$  ng/μl,  $n = 10$ ) ( $t_{(30)} = 2.42$ ,  $p = 0.02$ ). La pureza también exhibió diferencia significativa entre el grupo que sí amplificó ( $1.82 \pm 0.02$ ,  $n = 22$ ) y el que no ( $1.76 \pm 0.04$ ,  $n = 10$ ) ( $t_{(30)} = 3.01$ ,  $p = 0.005$ ).

El éxito de amplificación fue del 86% y 56% según el procedimiento de extracción, pero la diferencia no se considera significativa ( $\chi^2_{(1, n=32)} = 2.08$ ,  $p = 0.15$ ). El grupo de mayor éxito estuvo almacenado a 4°C por un año y seis meses previo al procedimiento de amplificación, frente a seis meses del segundo grupo.

### **C. Comparación de diversas condiciones para la visualización de microsatélites en geles de acrilamida**

De las tres condiciones de visualización evaluadas, sólo la electroforesis en geles de 50 cm en condiciones desnaturalizantes permitió una correcta visualización de los fragmentos tanto para la identificación de individuos heterocigotos como la estimación precisa de la longitud del fragmento. Los geles de siete centímetros y el gel de 50 cm en condiciones no desnaturalizantes no resultaron adecuados para el estudio.

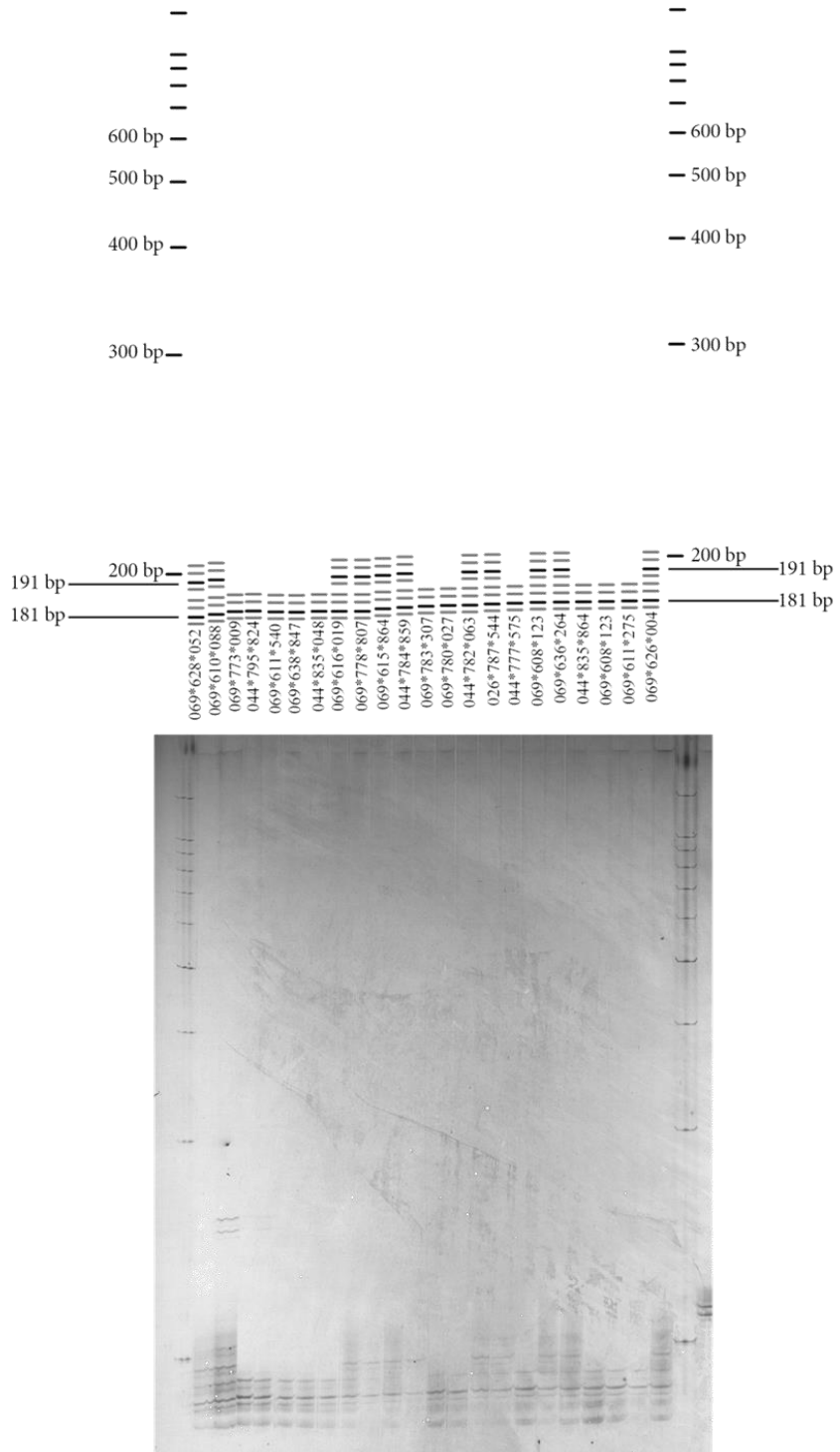
### **D. Diversidad genética de la población**

En base a seis *loci* microsatélites, el número de alelos por *locus* evaluado promedió 1.5, con un máximo de dos. Tres de los *locus* evaluados presentaron un solo alelo. La heterocigosidad observada ( $H_o$ ) tuvo un rango de 0.00 a 0.50 y la esperada ( $H_e$ ) de 0.00 a 0.45. Los valores de  $H_o$  y  $H_e$  iguales a cero responden a *locus* monomórficos. La hipótesis del equilibrio de Hardy-Weinberg se aceptó al nivel del 5% para todos los *locus* según el método de enumeración completa de Louis y Dempster (1987). La heterocigosidad promedio de la población fue de 0.23. Los apéndices B y C muestran los genotipos obtenidos por individuo y otros valores de interés únicos de cada *locus*.

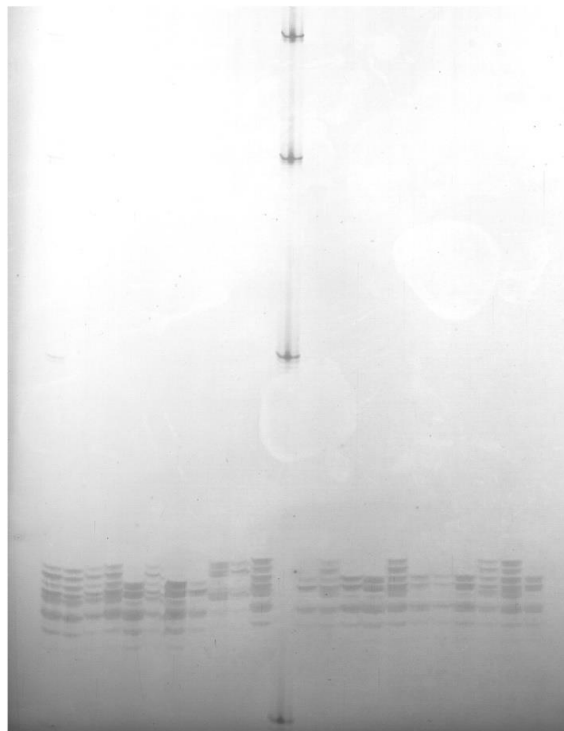
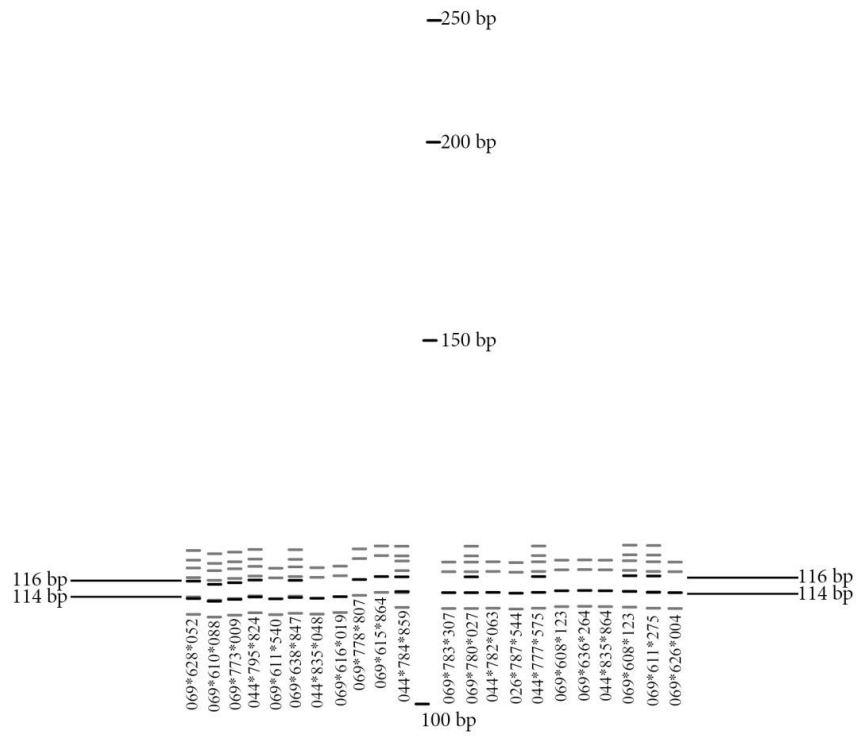
### **E. Visualización de fragmentos de ADN amplificados en geles de acrilamida de 50 cm en condiciones desnaturalizantes.**

Las figuras 2 – 7 muestran la visualización obtenida para los seis marcadores amplificados.

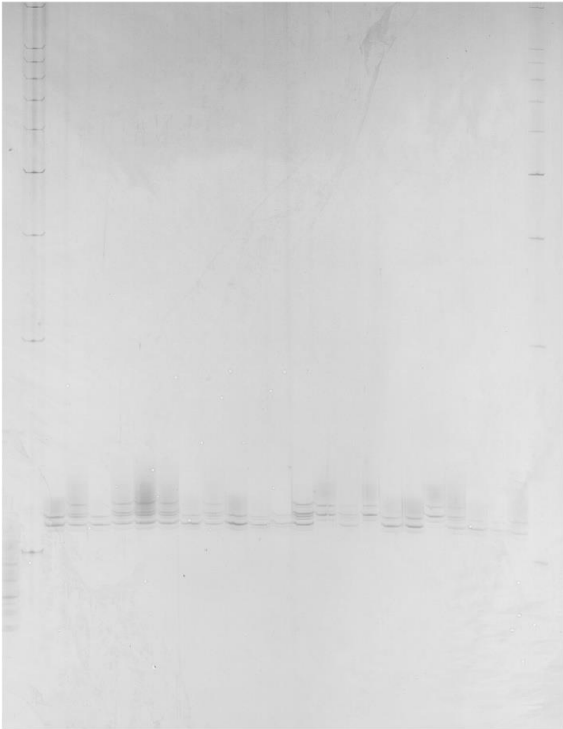
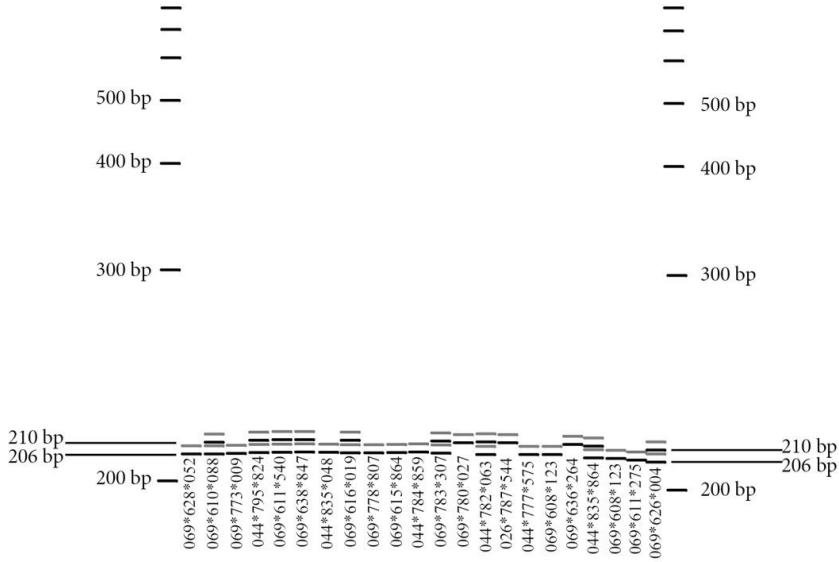
**Figura 2: Representación señalizada de la porción de interés del gel de visualización de productos de amplificación del marcador HELO1 (arriba) y fotografía del mismo (abajo).**



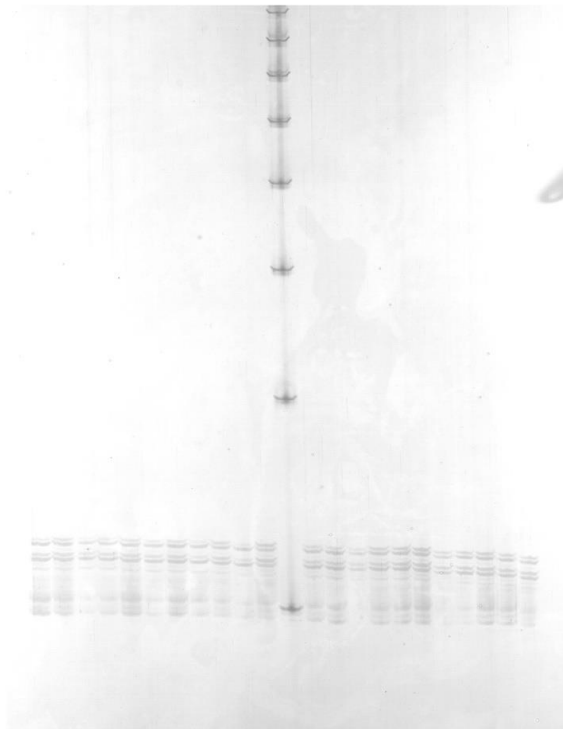
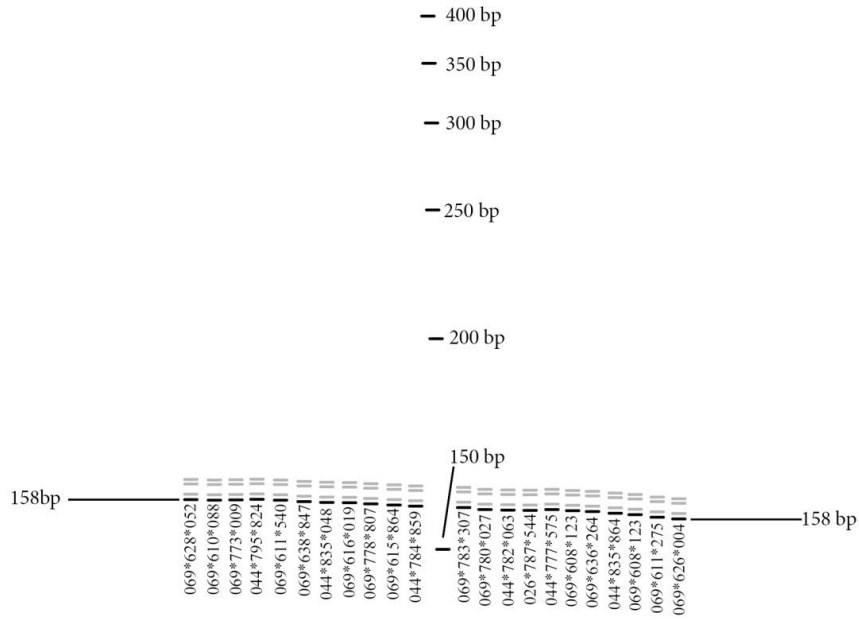
**Figura 3: Representación señalizada de la porción de interés del gel de visualización de productos de amplificación del marcador HELO2 (arriba) y fotografía del mismo (abajo).**



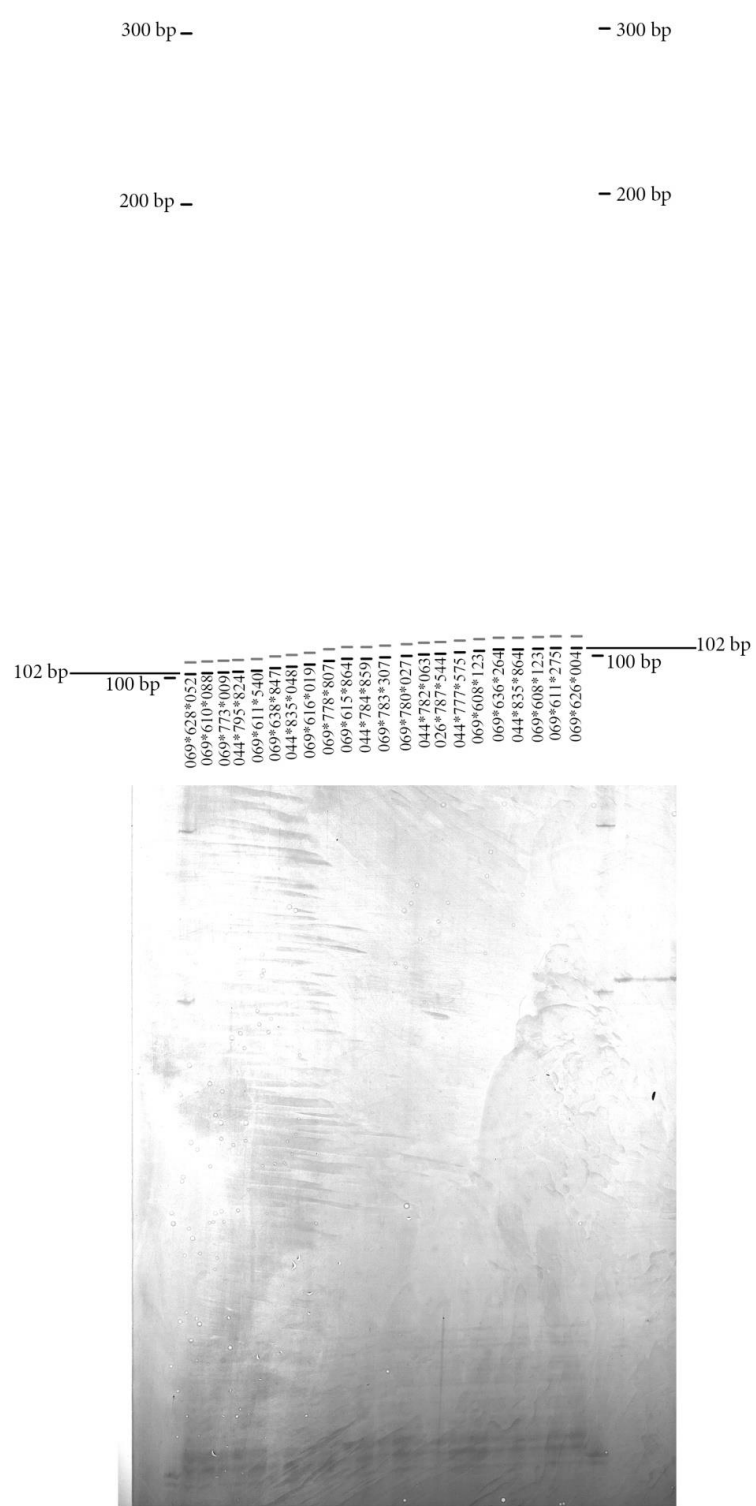
**Figura 4: Representación señalizada de la porción de interés del gel de visualización de productos de amplificación del marcador HELO3 (arriba) y fotografía del mismo (abajo).**



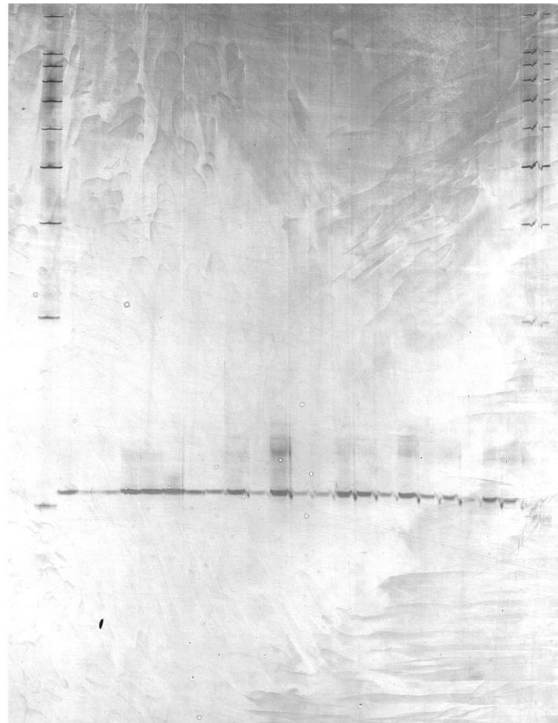
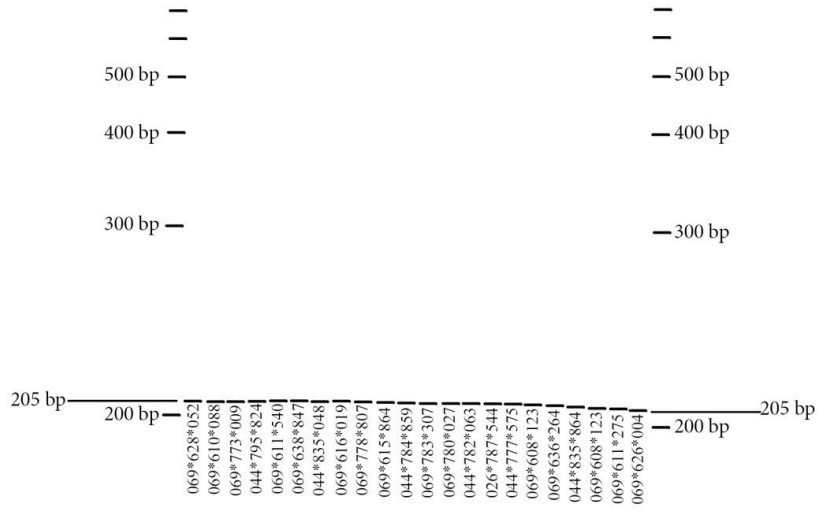
**Figura 5: Representación señalizada de la porción de interés del gel de visualización de productos de amplificación del marcador HEL04 (arriba) y fotografía del mismo (abajo).**



**Figura 6: Representación señalizada de la porción de interés del gel de visualización de productos de amplificación del marcador HELO5 (arriba) y fotografía del mismo (abajo).**



**Figura 7: Representación señalizada de la porción de interés del gel de visualización de productos de amplificación del marcador HELO6 (arriba) y fotografía del mismo (abajo).**



## IV. DISCUSIÓN

### A. Extracción y amplificación de ADN a partir de células de epitelio bucal en *Heloderma* mediante el método de sal

El método empleado para la obtención de muestras de tejido de epitelio bucal presenta como ventaja el ser poco invasivo y requerir poca capacitación para realizarse en forma segura tanto para los investigadores como los animales. Numerosos autores han recomendado el hisopado bucal como una fuente confiable de ADN en estudios con reptiles (Beebee, 2008; Miller, 2006; Schulte *et al.* 2011).

Sin embargo, la técnica de hisopado bucal presenta desventajas con potenciales efectos negativos en esta investigación. Ningún estudio previo ha empleado el método de hisopado en animales que segregan veneno al interior de la boca, como *Heloderma*, y es posible que éste contribuya a la degradación rápida de la muestra. También es posible que la muestra se degrade rápidamente en condiciones de campo donde las muestras no pueden colocarse en refrigeración de modo inmediato. Los dos factores anteriores pudieron haber influido negativamente en el rendimiento de la extracción de ADN obtenido en la presente investigación, y hacen de este método una opción no ideal para estudios futuros.

Extraer sangre es una posible alternativa al hisopado bucal para la extracción de ADN en reptiles. A partir de la experiencia del autor posterior a la toma de muestras para este estudio, la extracción de sangre por parte de personal capacitado se recomienda como una buena alternativa en especial si se considera su almacenamiento en el largo plazo. La extracción de sangre a partir de la vena caudal de un escorpión es particularmente fácil debido a su gran tamaño, y gracias al mismo factor el procedimiento resulta sólo ligeramente invasivo frente a la extracción de sangre en reptiles de menor tamaño.

El procedimiento de purificación del ADN se realizó en un plazo de cinco días tras la extracción de las muestras. No está claro por tanto si las muestras podrían almacenarse por más tiempo sin afectar de manera importante el rendimiento e integridad de la

extracción, pero es razonable asumir una mayor tasa de descomposición de las muestras según el paso del tiempo. Dado que el procedimiento es laborioso, el protocolo utilizado sólo resulta práctico cuando un número importante de muestras pueden purificarse a la vez. Esto hace necesario el almacenamiento de muestras de tejido por varios meses (con el consiguiente riesgo de que se degraden), o bien el acceso a un número considerable de animales vivos en un espacio de tiempo pequeño. En el caso particular de este estudio, la obtención de un número importante de muestras de manera simultánea fue posible debido a que la Asociación Zootropic mantuvo en cautiverio animales silvestres por algunos meses como parte de una estrategia de reproducción en cautiverio en los años 2011 y 2012. De este modo, el procedimiento de purificación sólo debió realizarse en dos grupos.

A partir del año 2013 el programa de conservación del escorpión de la Asociación Zootropic continuó con el monitoreo de la población a través de un programa de captura, pero con la liberación de estos animales en un plazo de pocos días imposibilitando obtener un número grande de muestras simultáneas como se hizo en el presente estudio. Esto se debe a que el limitado éxito del programa de reproducción (sólo tres crías en dos años) no justifica la extracción de más de una decena de animales anuales hacia condiciones de cautiverio. Por lo tanto, si se utilizara en el futuro las células de epitelio bucal como fuente de ADN las muestras deberán procesarse individualmente (lo cual es impráctico) o almacenarse congeladas por varios meses (con la consecuente degradación del material). En vista de esta situación, la Fundación para la Especies Amenazadas de Guatemala ha establecido un programa de colecta de muestras de sangre utilizando tarjetas *Whatman FTA*®, que resultan adecuadas para la estabilización de las muestras sanguíneas en condiciones de campo y almacenamiento a largo plazo.

El método de purificación empleado presentó como desventaja el ser laborioso, pero utiliza reactivos de fácil disponibilidad y bajo costo. Este método es conocido por ser de utilidad para un amplio rango de tipos de muestras (Aljanabi & Martínez, 1997). A partir de la experiencia generada en este proyecto, se recomienda su utilización.

Los valores de pureza promedio de la solución de ADN se consideran buenos. A pesar de ello, aunque se contó con 32 muestras iniciales sólo fue posible obtener el perfil

genético de 22. Distintos ensayos se hicieron con el fin de amplificar las 10 muestras restantes, incluyendo la modificación de la concentración de magnesio, concentración de la plantilla de ADN y temperaturas del ciclo térmico. En dichos ensayos la utilización de un control que había amplificado satisfactoriamente demostró ser poco sensible a las variaciones de las condiciones, amplificando satisfactoriamente en todos los ensayos. En ningún caso una muestra que no había amplificado previamente mostró un cambio de comportamiento. Es importante señalar que los valores de pureza obtenidos por espectrofotometría pueden reflejar inadecuadamente la calidad de la plantilla de ADN para la amplificación, pudiendo haber presentes ciertos contaminantes que resulten en valores de absorbancia similares a los esperados para el ADN puro.

En el proceso de visualización en geles de siete centímetros para comprobar si existió amplificación, 22 muestras que amplificaron satisfactoriamente presentaron señales intensas y claras para todos los marcadores mientras que 10 no presentaron señal de ningún tipo. Numerosos intentos y condiciones de amplificación sugieren que el fallo en la amplificación es atribuible a las plantillas de ADN. La concentración de ADN en la solución fue significativamente menor en el grupo que no amplificó, aunque algunas muestras mostraron un comportamiento anómalo, presentando altas concentraciones. De igual forma, el grupo que no amplificó presentó una media de pureza significativamente diferente, aunque de igual modo algunas muestras se comportaron de modo contrario.

El procedimiento de extracción y purificación se realizó en dos grupos. El éxito de amplificación de ambos fue de 86% y 56%. Esta diferencia parece ser una diferencia importante, aunque no es estadísticamente significativa y por tanto podría deberse al azar. En este procedimiento no sólo el éxito de amplificación fue menor, sino que la pureza y rendimiento fueron significativamente diferentes y menores. La única diferencia apreciable en el procedimiento fue el uso de una centrifugadora refrigerada en el primer caso, frente a una ordinaria en el segundo. Es muy posible que este factor o algún error desapercibido en el segundo procedimiento sea el responsable de los malos resultados obtenidos.

Ya que el grupo de mayor éxito de amplificación fue aquel que luego de ser purificado estuvo almacenado por más tiempo, no parece que haya habido degradación

importante del ADN en solución por el almacenamiento. Esto significa que una vez purificado, es posible almacenar las muestras de ADN por largo tiempo.

Sumando ambos grupos de extracción, el porcentaje de muestras que proveyeron amplificación satisfactoria fue del 69%. Este valor es poco aceptable en especial si se toma en cuenta la dificultad especial de acceder a un número alto de muestras de la especie. Pero en función de que ocho de las 10 muestras que no pudieron amplificarse provinieron de un mismo procedimiento de extracción, es más razonable pensar que se cometió un error durante este procedimiento en particular y que el primer grupo refleja mucho mejor la utilidad real del protocolo empleado. Tomando en cuenta esto, el protocolo parece ser altamente confiable.

Es posible decir entonces que, realizado adecuadamente, el procedimiento de extracción a partir de células de epitelio bucal es utilizable en *Heloderma*, pero no se recomienda para poblaciones silvestres por la necesidad procesar las muestras casi inmediatamente sin posibilidad de almacenar el tejido previo a la purificación.

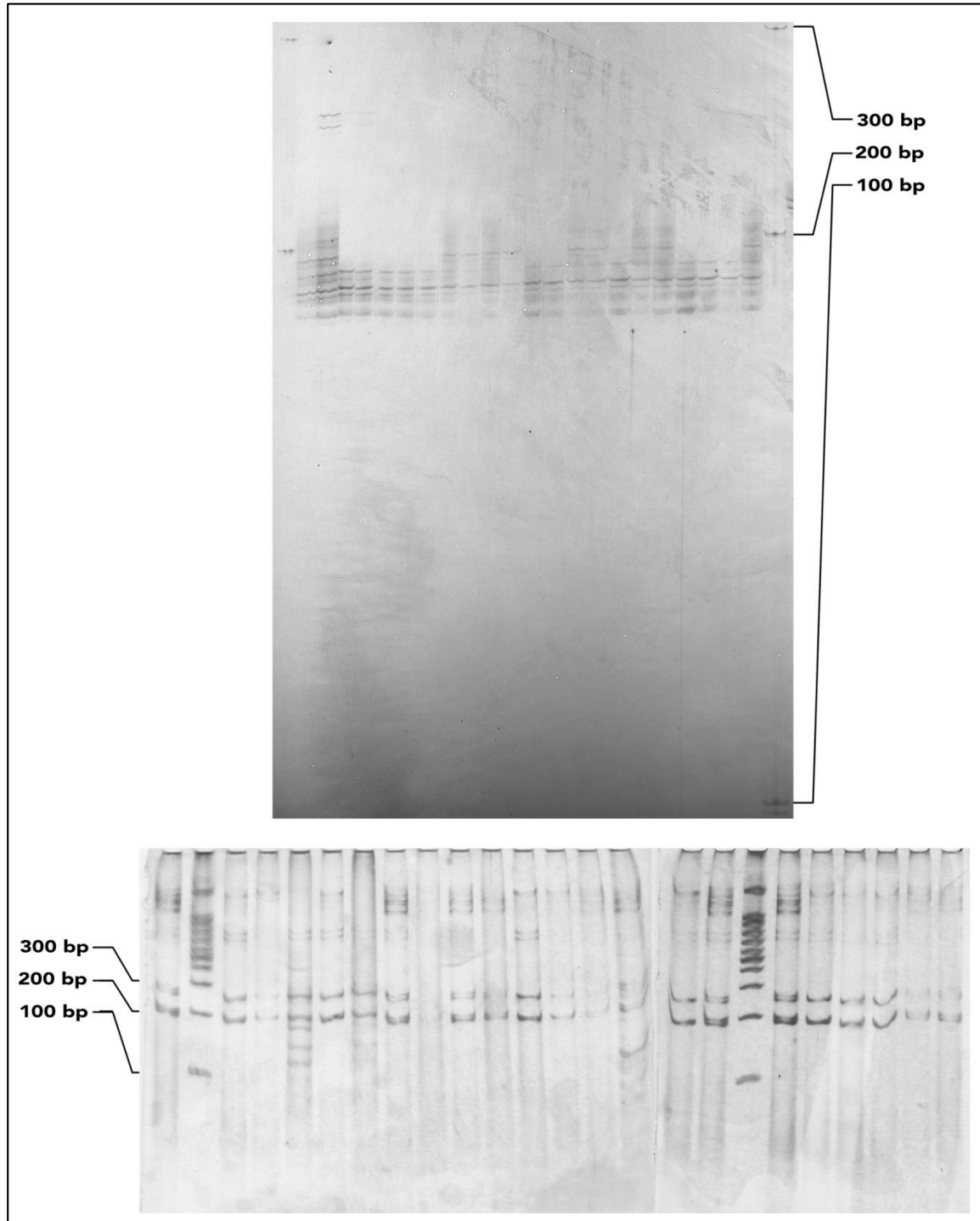
## **B. Uso de electroforesis en geles de acrilamida y tinción con nitrato de plata como medio de visualización de los fragmentos amplificados**

Además de amplificar con éxito los fragmentos de ADN deseados, para este estudio es necesario determinar con precisión la longitud de cada fragmento y distinguir claramente entre fragmentos distintos de longitud muy similar (que difieren únicamente en dos pares de bases). Como parte del procedimiento, y con el fin de probar en primer lugar el éxito de la amplificación de una manera sencilla, se utilizaron geles de acrilamida de siete centímetros en condiciones no desnaturalizantes. Esto permitió al mismo tiempo evaluar la utilidad de éstos en la discriminación de fragmentos de tamaños similares, la identificación de individuos heterocigotos y la estimación del tamaño de los fragmentos mediante esta técnica frente al uso de geles de mayor tamaño, que conllevan un procedimiento más laborioso y mayor costo.

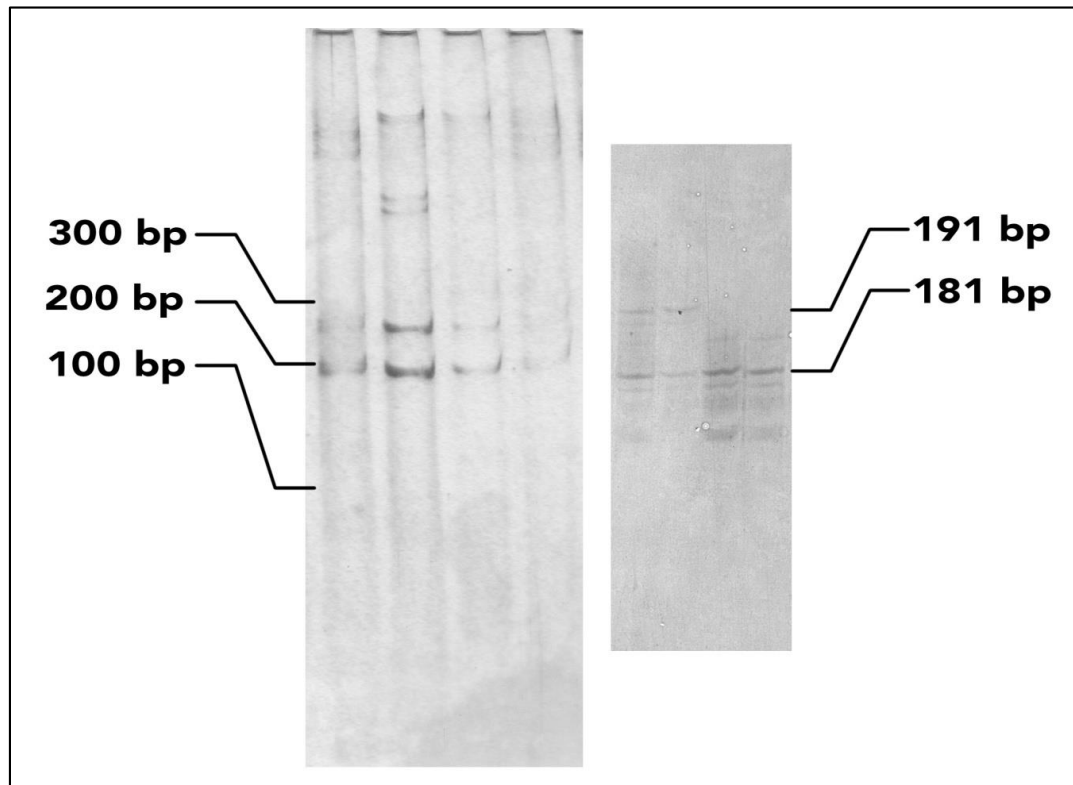
1. Migración de los fragmentos según distintas condiciones de electroforesis. Las imágenes de los geles de acrilamida pequeños se obtuvieron a través de un escáner a resolución de 300 píxeles por pulgada mientras que las imágenes de los geles de acrilamida de 50 cm se obtuvieron mediante una cámara digital con un sensor de 5184 x 3456 píxeles. La cámara se utilizó para fotografiar una imagen de 20.5 x 37.5 centímetros sobre la superficie de un transiluminador de luz blanca. De estas fotografías se obtuvo una resolución equivalente a 310 píxeles por pulgada, muy similar a la obtenida por el escáner.

Los fragmentos de interés se encontraban entre los 112 y 220 pares de bases de acuerdo a la caracterización de los microsátélites. Se optimizaron las condiciones de electroforesis para la separación de estos fragmentos, las cuales fueron del 20% para los geles de siete centímetros en condiciones no desnaturizantes, y del 10% para los geles de 50 cm en condiciones desnaturizantes. La separación bajo estas condiciones en la región entre 100 y 300 pares de bases fue ocho veces mayor en el gel de 50 cm en condiciones desnaturizantes (Figura 8), determinado en píxeles en las imágenes finales. Una mejor separación es una obvia ventaja en un proceso de electroforesis, pues facilita la discriminación de los productos de la amplificación.

**Figura 8: Comparación de la migración de la misma escalera molecular y productos de amplificación del marcador HELO1 en un gel de 50 cm en condiciones desnaturizantes (arriba) y geles de acrilamida de siete centímetros (abajo). Ambas imágenes se muestran a la misma escala.**

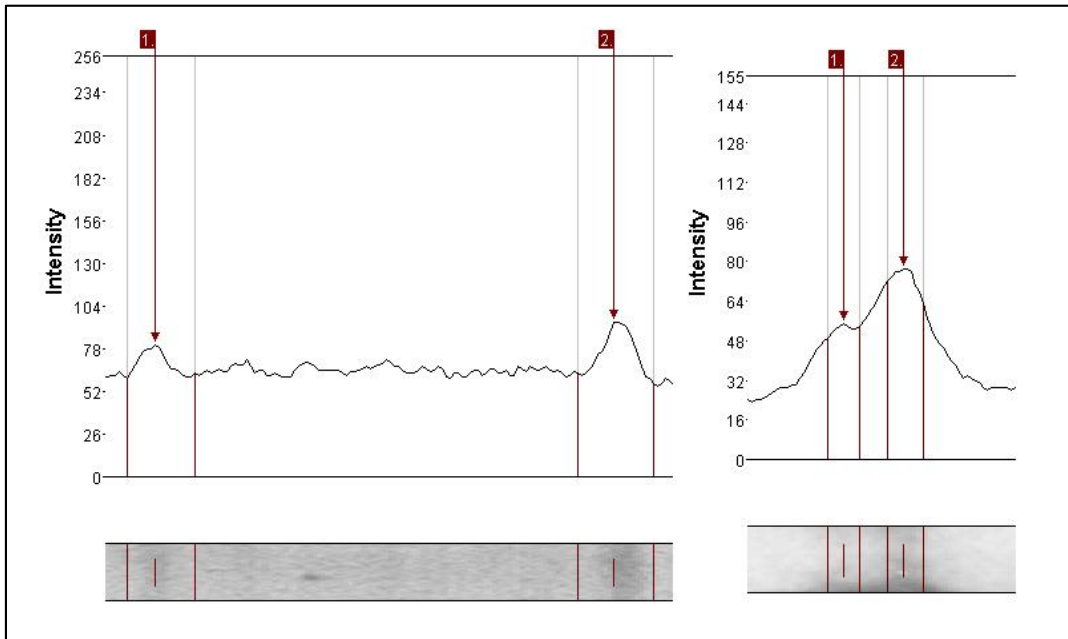


**Figura 9: Comparación de las señales mostradas por productos de amplificación del marcador HEL01 en geles a acrilamida de siete centímetros (izquierda) y geles de 50 cm en condiciones desnaturalizantes (derecha). Ambas imágenes se muestran a la misma escala.**



Las condiciones de electroforesis no desnaturalizantes, tanto en geles de siete como 50 cm, no permitieron una estimación coherente con el tamaño de los fragmentos esperados. En todos los casos el tamaño se sobreestimó, y en ninguno se pudo distinguir con confianza entre distintos alelos. Estos geles mostraron también mayor multiplicidad de bandas a lo largo de regiones muy distintas del gel, cosa que no ocurrió en los geles en condiciones desnaturalizantes. El fin de la desnaturalización del ADN es eliminar al máximo las posibles estructuras secundarias que alteran la migración de los fragmentos, haciendo que la tasa de migración se vea menos afectada por la composición de bases del fragmento y responda mejor a su longitud. Los geles de siete centímetros son un buen instrumento para comprobar de modo sencillo el éxito de una reacción de amplificación, pero no parecen ser adecuados para estudios de genética poblacional.

**Figura 10:** Perfil de intensidad de la señal de un mismo producto de amplificación de un individuo heterocigoto visualizado en geles de 50 cm en condiciones desnaturalizantes (izquierda) y geles de acrilamida de siete centímetros (derecha). Ambas imágenes tienen la misma escala horizontal. La diferencia de longitud entre ambos alelos es de 10 pares de bases.



2. Patrones de bandas exhibidos por los productos de amplificación en geles de 50 cm en condiciones desnaturalizantes y caracterización de los alelos. Aunque teóricamente tras el proceso de electroforesis se espera una única banda por cada alelo presente, es común en la electroforesis en acrilamida encontrar patrones de bandas correspondientes a un solo producto de amplificación. Estos patrones se deben a limitaciones propias de la técnica y son comunes en estudios con marcadores microsatélites. Las múltiples bandas podrían dificultar la interpretación, pues obliga a discriminar cuáles bandas corresponden a distintos alelos, y en cada alelo, definir cuál banda refleja fielmente la longitud del fragmento. Los patrones exhibidos fueron bastante consistentes en la mayoría de marcadores, tratándose en general de cuatro bandas de intensidad variable para cada alelo (Figuras 11 y 12), distribuidas en una distancia menor a diez pares de bases. En los geles de 50 cm, la correcta identificación de un patrón de bandas como producto de la amplificación del fragmento deseado, así como la distinción entre alelos distintos resultó fácil y confiable al observar todas las muestras dentro del mismo gel. Esto fue posible dado que los patrones de bandas exhibieron las siguientes características:

- a. La estimación del tamaño del fragmento amplificado a partir del patrón de bandas fue consistente con los tamaños esperados según las características del marcador. En todos los casos los alelos identificados se encuentran dentro del rango esperado según Feltoon *et al.* (2007) o corresponden exactamente con alelos reportados.
- b. El patrón de bandas fue consistente a lo largo de todas las muestras. No existieron muestras que exhibieran patrones de bandas múltiples diferentes a las demás.
- c. Todos los alelos para determinado marcador mostraron el mismo patrón de bandas múltiples. Los individuos heterocigotos muestran un patrón exactamente igual dos veces (Figura 11), indicando la migración de dos productos de distintos tamaños.
- d. Los alelos mostrados por individuos heterocigotos son iguales a los que se pueden encontrar en individuos homocigotos.

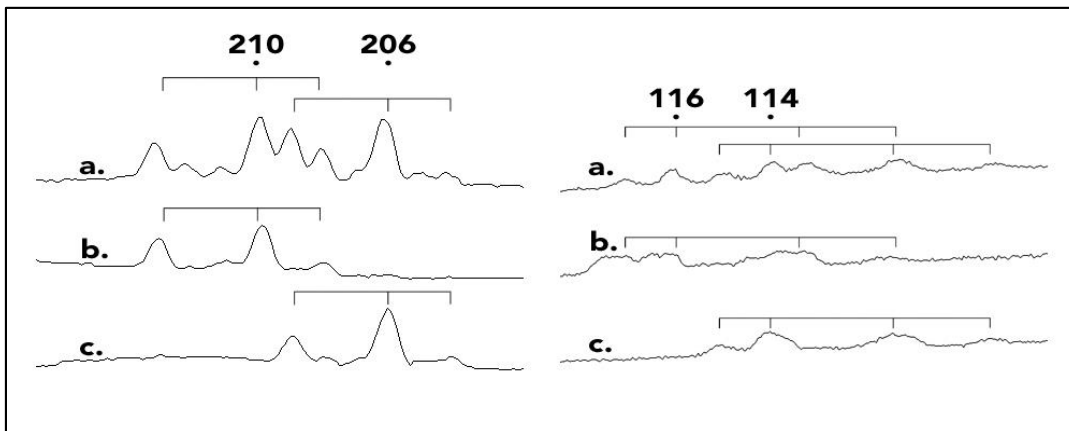
Dentro del patrón de bandas múltiples, para identificar la banda que corresponde precisamente con la longitud del fragmento buscado se utilizó como único criterio la intensidad de ésta. Se seleccionó por tanto la banda con la señal más intensa, la cual es consistente a lo largo de todas las muestras. Aunque no fue posible comprobar si este criterio brinda una identificación precisa, esto no tiene efecto en el estudio por las siguientes razones:

- a. No hace falta identificar la banda que reproduce fielmente el tamaño del alelo para discriminar entre ellos.
- b. La distancia en longitud del fragmento entre un alelo y otro se mantiene igual, independientemente de la banda que se utilice como referencia dentro del patrón de bandas múltiples propio de cada alelo. Esto significa que puede estimarse, sin lugar a error, el tamaño relativo entre un alelo y otro. El tamaño relativo entre los alelos es importante para varias pruebas estadísticas realizadas a partir de información genética.

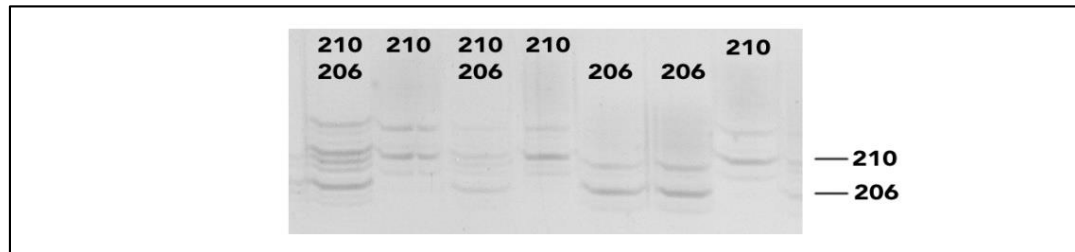
Por las razones anteriores es posible concluir que la técnica empleada en este estudio es suficientemente precisa para el estudio de la genética poblacional de

*Heloderma* mediante el uso de marcadores microsatélites. Aunque gradualmente el uso de geles de acrilamida ha caído en desuso a favor de técnicas automáticas de estimación basadas en electroforesis capilar, el acceso a esta tecnología es muy limitado en Guatemala. Si bien pueden considerarse la contratación de servicios de este tipo fuera del país, esto representa un costo considerablemente mayor respecto a la técnica aquí empleada. En una cotización para la presente investigación, el precio dado por la empresa coreana Macrogen fue de cuatro dólares estadounidenses por muestra. En cambio, el costo estimado de los reactivos de laboratorio para la técnica aquí utilizada fue menor a Q5.50 por muestra (ver Apéndice D). Adicionalmente debe considerarse el costo del marcaje fluorescente de los productos de PCR para la estimación mediante electroforesis capilar.

**Figura 11: Perfil de intensidad de las señales de productos de amplificación del marcador HELO3 (izquierda) y HELO2 (derecha) de individuos heterocigotos (a), homocigotos para el alelo de mayor longitud (b) y homocigotos para el alelo de menor longitud (c). Los números señalan la longitud en pares de bases equivalente a la distancia de migración.**



**Figura 12: Fotografía de la visualización de productos de amplificación del marcador HELO3 en un gel de 50 cm en condiciones desnaturalizantes. Los números indican la señal de alelos presentes en la imagen correspondientes a los patrones de bandas, así como sus posiciones relativas.**



### C. Diversidad genética de la población

Las distintas variables obtenidas para cuantificar la diversidad genética de la población señalan que ésta es menor a otras especies en peligro de extinción (Frankham *et al.*, 2010). Por ejemplo, la población con menor diversidad genética y considerada más vulnerable del dragón de Komodo *Varanus komodoensis* presenta un número medio de alelos por *locus* ( $A$ ) de 1.8, de una muestra de sólo 12 individuos (Ciofi *et al.*, 1999), frente a  $A = 1.5$  de la población evaluada en este estudio. Sin embargo, la distancia genética entre estas especies dificulta la interpretación de esta comparación. Es más adecuado poner en perspectiva la diversidad genética encontrada con otros datos existentes para *Heloderma*, aunque éstos resulten escasos. Se encontró que la diversidad genética es menor a una población silvestre de *H. suspectum*,  $A = 7.67$  (Hess *et al.*, 2013), e individuos en cautiverio de *H. horridum (sensu lato)*,  $A = 5.67$  (Feeltoon *et al.*, 2007). Estos datos proveen la única fuente de comparación dentro del género, e indican que esta población *H. charlesbogerti* muestra la menor diversidad genética ( $A = 1.5$ ) conocida para el género hasta el momento.

Para interpretar correctamente los resultados encontrados, es importante analizar la evidencia disponible sobre la variabilidad y patrones de mutación de los marcadores utilizados por Feeltoon *et al.* (2007). Los autores que caracterizaron los *loci* microsatélites no discuten en profundidad su polimorfismo, pero proveen datos que indican que, en efecto, los *loci* tratados son altamente variables. Al probar el polimorfismo de los marcadores, el número de alelos por *locus* promedió 5.67, variando de tres a 12. Al comparar el número de alelos encontrados y el rango de longitud de éstos,

se observa también que el 68% (variando del 57% al 100% según el marcador) de todos los alelos posibles dentro de estos rangos de longitud fue encontrado en la población de 156 individuos. Esto provee una idea del potencial de mutación de estos *locus* y conduce a concluir que, en caso de encontrarse poca variabilidad en una población silvestre, esto es un buen indicador de poca diversidad genética a lo largo del genoma y no el resultado del uso de marcadores poco polimórficos.

Los resultados indican, por tanto, que la diversidad genética de la población del escorpión en Cabañas es muy baja. Examinar las causas de este fenómeno puede conducir a importantes conclusiones relevantes para la conservación a largo plazo de la especie.

#### **D. Pérdida de diversidad genética en la población estudiada**

Como se dijo anteriormente, una población natural tiene el potencial de exhibir una diversidad genética mucho mayor en los *loci* evaluados que la encontrada. Esto conduce a deducir que si la diversidad encontrada es baja, esto se debe a la pérdida de la diversidad genética y fijación de alelos respecto al pasado de la población. Esta reducción puede explicarse analizando otros factores poblacionales de la especie.

La diversidad genética en *loci* neutrales, como se considera el caso de los microsatélites, se da como consecuencia de la deriva al azar. Si bien la mayoría de mutaciones en estos *locus* se pierde en pocas generaciones debido a que éstas empiezan en frecuencias relativas muy bajas, nuevas mutaciones continúan produciéndose y una pequeña porción, como consecuencia del azar, aumenta su frecuencia hasta tomar relevancia en la población. La variabilidad genética es determinada por el balance entre las mutaciones causando nuevos alelos, y la deriva que puede eliminarlos. Aunque las posibilidades de que un nuevo alelo se extinga son siempre mucho mayores, en una población grande el número de mutaciones producidas es suficiente para que, en contra de las probabilidades individuales, algunos alelos aumenten su frecuencia. Por esta razón, en una población grande la diversidad genética crece a lo largo del tiempo, en particular en *loci* que muestran una alta tasa de mutación como son los microsatélites.

La reducción de la diversidad genética en estos *loci* responde también al azar, pero el efecto de éste contribuye más a la pérdida de alelos en cuanto más pequeña sea una

población. Simulaciones computacionales y experimentos de laboratorio (Frankham *et al.*, 2010) han mostrado cómo las posibilidades de perder un alelo con una frecuencia relativa dada son inversamente proporcionales al tamaño de la población. Sin duda, la principal razón para la reducción de diversidad genética se relaciona con una reducción severa en el tamaño poblacional. En el caso de *loci* neutrales en poblaciones pequeñas, el error de muestreo aleatorio tiene un fuerte impacto en la frecuencia de alelos de la siguiente generación, mientras que en poblaciones grandes éstos se ven poco afectados por el error de muestreo aleatorio y tienden a comportarse según la teoría de equilibrio de Hardy-Weinberg y mantener su frecuencia.

En este estudio, el número de *loci* polimórficos fue insuficiente para determinar el comportamiento demográfico de la población a partir de la información genética utilizando inferencia estadística, pero otras claves pueden ayudar a explicar los fenómenos demográficos que pueden haber afectado a la población, y éstos pueden ser útiles para explicar la reducida diversidad genética encontrada.

Aunque existe poco trabajo científico al respecto, a partir de observaciones puede deducirse que la distribución de la especie está fragmentada en unas pocas poblaciones pequeñas. En un escenario realista, soportado por datos de marcaje y recaptura obtenidos por el autor, la población en la cual se centró el estudio se estimó en 300 individuos. Típicamente el tamaño efectivo de una población es cercano al 10% del número real (Frankham *et al.*, 2010), es decir, de 30 para este caso. Tal tamaño poblacional podría reducir severamente la diversidad genética en muy poco tiempo. Por simulaciones computacionales en el programa Red Lynx (Carwright, 2009) se estimó que para tal número poblacional uno de cada tres alelos con una frecuencia inicial de 0.1, debajo de la cual se colocan la mayoría de alelos en una población grande (Luikart *et al.*, 1998), se extinguirían en tan sólo 10 generaciones debido a la deriva. Suponiendo entre siete y 15 años por generación, esto es entre 70 y 150 años en el caso de *Heloderma*.

La diversidad genética encontrada parece señalar un caso aún más extremo al escenario planteado anteriormente. La población no presenta ningún alelo raro (frecuencia menor a 0.1), y la mitad de los *loci* evaluados presentaron fijación. Esto sugiere que, o bien la población ha sido mucho más pequeña que la anterior, o el espacio

de tiempo por la que ha sido reducida es mayor a unas pocas generaciones. No hay razones para pensar que la población sea mayor hoy en día que lo que pudo ser décadas o siglos atrás. Sí es razonable pensar, en cambio, que la antigüedad de la reducción poblacional sea mayor a 10 generaciones.

Si en consecuencia no parece posible que la reducción de la diversidad genética pueda deberse a eventos de las últimas décadas (deforestación, extracción o persecución reciente), al pensar en posibles causas de la reducción poblacional fuera de las últimas décadas dos razones han de considerarse: la dinámica natural del bosque seco en el Valle del Motagua y la presencia humana en el área de Cabañas en períodos de tiempo anteriores.

No existen estudios profundos sobre la distribución del ecosistema de bosque seco en el Valle del Motagua. Sin embargo, observaciones señalan que éste es un ecosistema naturalmente raro y no puede descartarse que la dinámica de la distribución del hábitat específico del escorpión dentro del mismo Valle del Motagua, donde predomina el matorral espinoso, haya conducido de forma natural a formar varias poblaciones aisladas y relativamente pequeñas. Debe evaluarse si el flujo genético entre las poblaciones ha sido interrumpido de forma natural a causa de este factor, o si ha sido la deforestación por factores humanos la responsable de aislar a cada población en particular. Para resolver esta incógnita, la interrupción del flujo genético entre poblaciones podría datarse a partir de marcadores moleculares. Se recomienda también avanzar en el entendimiento de la distribución del ecosistema de bosque seco en el Valle del Motagua y determinar si las condiciones ambientales naturales harían posible el flujo genético entre poblaciones hoy en día.

A los posibles factores naturales se suma que la densidad de escorpiones dentro de un área geográfica dada se haya visto reducida artificialmente por causas humanas. Aunque se sabe poco de la historia de la región, no deben dejar de tomarse en cuenta los numerosos sitios arqueológicos del período Clásico Tardío (600 D.C. – 900 D. C.) que se conocen dentro del sitio de estudio y la fundación de lo que hoy es cabecera municipal (en ese tiempo San Sebastián Chimalapa) que tuvo lugar en alrededor de 1550 a sólo ocho kilómetros del centro del área de estudio. También es importante el hallazgo de

numerosas piedras de moler (observación personal) que sugieren que los cerros en los que hoy habita el escorpión han sido utilizados para la producción de maíz más allá de unas pocas generaciones atrás. Se sabe también que numerosos sitios poblados cercanos, por ejemplo la comunidad de El Arenal, se remontan más allá de 130 años. De esto se concluye que el área ha estado continuamente afectada por humanos, y dado que tradicionalmente el escorpión ha sido un animal temido y por tal razón eliminado, y que su demografía lo hace especialmente susceptible a este fenómeno, es muy posible que esto haya influido en mantener un número poblacional pequeño por un largo tiempo, pudiendo esto explicar la reducción en su diversidad genética.

Independientemente de las causas, este estudio permite concluir que el valor de la diversidad genética de esta población de escorpión es dramáticamente bajo. Esta realidad ha de tomarse en cuenta para el desarrollo de estrategias de conservación.

### **E. Recomendaciones para la conservación del escorpión**

A la luz del presente estudio, se advierte claramente que la población estudiada se está enfrentando a una reducida diversidad genética, con los potenciales efectos de la depresión endogámica y la menor capacidad de la población de adaptarse a cambios ambientales. Esta nueva evidencia vuelve a sugerir que el escorpión se encuentra críticamente amenazado, y es importante incluir el factor genético en las estrategias de conservación a seguir en el futuro.

Muchas preguntas quedan aún por resolver en cuanto a la genética poblacional del escorpión. Se recomienda continuar este tema de estudio a fin de soportar con mejor evidencia las conclusiones que aquí se presentan y explorar los aspectos de la genética poblacional que aún no han podido ser evaluados. En especial, dado la poca variabilidad genética encontrada, es muy importante el uso de un mayor número de marcadores para dar robustez a las conclusiones y poder comprobar mediante herramientas estadísticas la ocurrencia de un cuello de botella poblacional. Adicionalmente es necesario estudiar a las demás poblaciones y establecer la diversidad genética que éstas conservan. Es muy posible que en las demás poblaciones se encuentre también una reducida diversidad genética, pero el azar podría haber llevado a la fijación de distintos alelos en cada una de

las poblaciones y en consecuencia, a haber conservado cierta diversidad a nivel de especie. En base a las conclusiones, se podría incorporar a las demás poblaciones en una estrategia de manejo que a través del flujo genético conduzca a aumentar el tamaño efectivo de la población de la especie en todo su conjunto.

La constante infertilidad en los huevos de escorpión encontrada en esfuerzos de reproducción en cautiverio, la cual contrasta con otras especies similares, podría ser una consecuencia de la depresión endogámica. Estos efectos podrían manejarse si se determina que cada población ha presentado endogamia de modo independiente, y en función de esto trasladar individuos poco emparentados entre poblaciones. Esto también señala la necesidad de conservar cada una de las poblaciones existentes del escorpión para la efectiva conservación de la especie. En la actualidad los esfuerzos de conservación sólo se han podido centrar en una población, pero resulta imprescindible abarcar a las demás.

A diferencia de otras especies, el lento desarrollo del escorpión y la dificultad de estudiarlo no permiten comprobar en un tiempo razonable los efectos en la fertilidad o supervivencia de crías exógamas frente a endógamas, por lo que hará falta el uso de casos de otras especies como modelo para la toma de decisiones de manejo que contemplen la transferencia entre poblaciones. Esta decisión se soporta por la similitud entre el hábitat de las distintas poblaciones y podría soportarse aún más si determina que existía un flujo genético reciente entre ellas. Si esto se comprueba, junto con un estudio más amplio que evalúe la diversidad genética de cada población, quedarán pocos argumentos para contraindicar el rescate genético de la especie. El presente estudio podría haber descartado el factor genético como uno de los problemas actuales del escorpión, pero por el contrario, señala con urgencia que el rescate genético podría constituir una necesidad apremiante para su conservación. Un número creciente de casos exitosos dentro de los reptiles señalan el rescate genético como una alternativa viable en este grupo taxonómico. De particular interés para este trabajo resulta el caso de poblaciones de la víbora europea *Vipera berus* en Suecia, ver Madsen *et al*, 1999.

Se recomienda por tanto, como paso inmediato, evaluar la genética poblacional a nivel de especie abarcando distintas poblaciones y utilizando un mayor número de

marcadores para aportar robustez a las conclusiones. De este modo se podrá establecer si la población está fragmentada a nivel genético y en tal caso, considerar el manejo genético que ésta requiere para reducir su probabilidad de extinción. Es posible que si se logra restaurar el flujo genético entre poblaciones a través de manejo, el tamaño poblacional efectivo sea suficiente para la supervivencia en el largo plazo de la especie, y que los efectos negativos de la endogamia se vean disminuidos gradualmente. De no tomar acción, es posible que cada población individual se extinga en corto plazo como resultado de factores genéticos, tanto por depresión endogámica como reducida adaptabilidad.



## V. CONCLUSIONES

- A. Se desarrolló satisfactoriamente un procedimiento para el estudio de la diversidad genética de *Heloderma charlesbogerti* de acuerdo a marcadores microsatélites.
- Las células de epitelio bucal constituyen una fuente útil de ADN para estudios en *Heloderma*, pero su uso en poblaciones silvestres resulta impráctico por la imposibilidad de almacenar las muestras por largos períodos de tiempo.
  - El uso de geles de 50 cm en condiciones desnaturalizantes es una alternativa efectiva para estudios de genética poblacional mediante marcadores microsatélites. Esta técnica permite la caracterización exacta del tamaño del fragmento amplificado y la distinción entre alelos de longitud muy similar.
- B. Se evaluó la diversidad genética de la población de *Heloderma charlesbogerti* en Cabañas, Zacapa.
- La diversidad genética de la población de escorpión en Cabañas muestra valores mínimos. Ésta es comparativamente baja respecto a otras poblaciones de *Heloderma* y otras especies en peligro de extinción.
- C. Los valores de diversidad genética encontrados, sumados a otros conocimientos sobre la especie, proveyeron indicios sobre el comportamiento demográfico histórico de la población de *Heloderma charlesbogerti* en Cabañas:
- La baja diversidad genética de la población sólo puede deberse a una reducción del número poblacional (cuello de botella). Tal reducción poblacional ha sido prolongada. Las perturbaciones recientes (en el último siglo) no pueden explicar por sí solas una reducción tan severa en la diversidad genética.
  - Contacto con grupos humanos por más de 1,500 años y la dinámica natural del hábitat del escorpión pueden explicar la fragmentación de la población y una reducción artificial de su número poblacional. Éstas se proponen como la causa principal de la pérdida de diversidad genética en

la población, en contraste con eventos más recientes de pérdida de hábitat, comercio ilegal o persecución.

- D. La información obtenida a través de este estudio señala la importancia de continuar evaluando la diversidad genética de *Heloderma charlesbogerti* previo a la formulación de estrategias de manejo puntuales, para las cuales la pequeña escala de este estudio no permitió proveer aún suficiente respaldo.

## VI. RECOMENDACIONES

- A. Se recomienda continuar con la colecta y almacenamiento de muestras de tejido sanguíneo de escorpiones silvestres que puedan servir para posteriores estudios poblacionales.
- B. Debido a que diferentes poblaciones de escorpión a la tratada en este estudio pudieron haber perdido su diversidad genética de modo independiente, es de gran importancia la evaluación de éstas para contar con datos más representativos a nivel de especie.
- C. En vista de los resultados del presente estudio, debe ser prioritario evaluar la suma de acciones de manejo genético a las estrategias de conservación para el escorpión que existen actualmente.
- D. Debe ampliarse el trabajo para identificar nuevas poblaciones remanentes de escorpión con el potencial de aumentar el tamaño efectivo de la población total bajo un eventual esquema de manejo genético.
- E. La poca variabilidad genética que mostró la población hace necesario el uso de un mayor número de marcadores moleculares para obtener mejores conclusiones respecto a su demografía. Se recomienda sumar a los seis marcadores utilizados en este estudio los recientemente desarrollados por Edwards *et al.* (2013) en estudios futuros.



## VII. LITERATURA CITADA

- Aljanabi, S. M., & I. Martinez. 1997. **Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques.** *Nucleic acids research* 25(22):4692-4693.
- Anzueto V, R., & J. A. Campbell. 2010. **Guatemalan Beaded Lizard (*Heloderma horridum charlesbogerti*) on the Pacific Versant of Guatemala.** *The Southwestern Naturalist* 55(3):453–454.
- Ariano, D., L. Alvarado, L. Masaya & E. Sercaria. 2006. **Estrategia Nacional para la conservación del Lagarto Escorpión *Heloderma horridum charlesbogerti*.** Guatemala, Zootropic/CONAP/TNC. 45 pp.
- Ariano, D. & G. Salazar. 2007. **Notes on the distribution of the endangered lizard, *Heloderma horridum charlesbogerti*, in the dry forests of eastern Guatemala: An application of multi-criteria evaluation to conservation.** *Iguana* 14(3):152–158.
- Ariano Sánchez, D. 2007. **Distribución potencial, ámbitos de hogar y patrones de comportamiento del lagarto escorpión *Heloderma horridum charlesbogerti* (Sauria: Helodermatidae) con notas sobre el primer envenenamiento por esta especie en Guatemala.** Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 81 pp.
- Ariano-Sánchez, D. 2006. **The Guatemalan beaded lizard: Endangered inhabitant of a unique ecosystem.** *Iguana* 13:179–183.

- Ariano-Sánchez, D. 2003. **Distribución e historia natural del Escorpión, *Heloderma horridum charlesbogerti* Campbell y Vannini, (Sauria: Helodermatidae) en Zacapa, Guatemala y caracterización de su veneno.** Guatemala, Univesidad del Valle de Guatemala. 80 pp.
- Arif, I. A. & H. A. Khan. 2009. **Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review.** *Animal biodiversity and conservation* 32(1):9–17.
- Arshad, M., I. Pedall, J. Gonzalez, M. Wink, O. Hatzofe, A. A. Khan & T. Osborne. 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.
- Beebee, T. J. 2008. **Buccal swabbing as a source of DNA from squamate reptiles.** *Conservation Genetics* 9(4):1087-1088.
- Beck, D. D. 2009. **Biology of Gila Monsters and Beaded Lizards.** Berkeley, University of California Press. 224 pp.
- Blomqvist, D., A. Pauliny, M. Larsson & L. Flodin. 2010. **Trapped in the extinction vortex? Strong genetic effects in a declining vertebrate population.** *BMC evolutionary biology* 10(1):33.
- Bogert, C. M. & R. M. del Campo. 1956. **The Gila monster and its allies;: The relationships, habits, and behavior of the lizards of the family Helodermatidae.** *Bulletin of the AMNH* 109(1).

- Bushar, L. M., H. K. Reinert, & L. Gelbert. 1998. **Genetic Variation and Gene Flow within and between Local Populations of the Timber Rattlesnake, *Crotalus horridus*.** *Copeia* 1998(2):411.
- Campbell, J. A., & 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.
- Cartwright, R. A. 2009. **Red Lynx.** Disponible en <http://scit.us/redlynx/>
- Ciofi, C., M. A. Beaumont, I. R. Swingland, & M. W. Bruford. 1999. **Genetic divergence and units for conservation in the Komodo dragon *Varanus komodoensis*.** *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 266(1435): 2269-2274.
- CITES. 2007. 14va. Conferencia de las Partes. Propuesta 14.
- CONAP. 2009. **Lista de Especies Amenazadas - LEA - y Listado de Especies de Flora y Fauna CITES de Guatemala.** 2<sup>a</sup> ed. Guatemala, Consejo Nacional de Áreas Protegidas. 122 pp.
- CONAP-ZOOTROPIC-CECON-TNC. 2011. **Plan de Conservación de las Regiones Secas de Guatemala Documento Técnico No. 99 (01-2011).** Guatemala, Consejo Nacional de Áreas Protegidas. 76 pp.
- CONAP-ZOOTROPIC. 2013. **Estrategia Nacional para la Conservación del *Heloderma* y su hábitat 2013 - 2018.** Guatemala. Consejo Nacional de Áreas Protegidas 32 pp.

- Cornuet, J. M., & G. Luikart. 1996. **Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data.** *Genetics* 144(4):2001–2014.
- Domínguez-Vega, H., O. Monroy-Vilchis, C. J. Balderas-Valdivia, C. M. Gienger & D. Ariano-Sánchez, D. 2012. **Predicting the potential distribution of the beaded lizard and identification of priority areas for conservation.** *Journal for Nature Conservation* 20(4):247–253.
- Hess, M. R., T. Edwards, D. A. Edmunds, & K. E. Bonine. 2013. **Characterization of STR/microsatellite primers for the Gila monster, *Heloderma suspectum* screened from paired-end Illumina shotgun sequencing.** *Conservation Genetics Resources*, 5:1121-1123.
- Excoffier, L., G. Laval & S. Schneider. 2005. **Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis.** *Evolutionary bioinformatics online* 1:47.
- Feltoon, A. R., T. Guerra, C. Lehn & M. R. J. Forstner. 2007. **Isolation and characterization of six microsatellites in the Mexican beaded lizard *Heloderma horridum*.** *Molecular Ecology Notes* 7(3):433–435.
- Frankham, R. 2005. **Genetics and extinction.** *Biological Conservation* 126(2):131–140.
- Frankham, R., J. D. Ballou & D. A. Briscoe. 2010. **Introduction to Conservation Genetics**, 2<sup>a</sup> ed. Cambridge, Cambridge University Press. 644 pp.

- Fredrickson, R. J., P. Siminski, M. Woolf & P. W. Hedrick. 2007. **Genetic rescue and inbreeding depression in Mexican wolves.** *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274(1623):2365–2371.
- Fry, B. G., N. Vidal, J. A. Norman, F. J. Vonk, H. Scheib, S. F. R. Ramjan, S. F. R. & E. Kochva. 2006. **Early evolution of the venom system in lizards and snakes.** *Nature* 439(7076):584–588.
- Fry, B. G., S. Wroe, W. Teeuwisse, M. J. P. van Osch, K. Moreno, J. Ingle & J. A. Norman, J. 2009. **A central role for venom in predation by *Varanus komodoensis* (Komodo Dragon) and the extinct giant *Varanus (Megalania) priscus*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(22):8969–8974.
- Garza, J. C. 2011. John Carlos Garza - **Population Genetic Software.** *Southwest Fisheries and Science Center.* Obtenido de <http://swfsc.noaa.gov/textblock.aspx?Division=FED&id=3298>
- Garza, J. C., & E. G. Williamson. 2001. **Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci.** *Molecular ecology* 10(2):305–318.
- Gotelli, N. J. 2001. **A primer of ecology.** Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates Inc. 290 pp.
- Hamilton, M. 2009. **Population Genetics.** Nueva Jersey, Wiley-Blackwell. 424 pp.
- Janzen, D. H. 1988. **Tropical dry forests. The most endangered major tropical ecosystem.** *Biodiversity.* Washington DC: National Academy of Sciences/Smithsonian Institution. Pp. 130-137

- Johnson, W. E., D. P. Onorato, M. E. Roelke, E. D. Land, M. Cunningham, R. C. Belden, & D. Shindle. 2010. **Genetic restoration of the Florida panther.** *Science* 329(5999):1641–1645.
- Kimura, M., & J. F. Crow. 1964. **The number of alleles that can be maintained in a finite population.** *Genetics* 49(4):725.
- Kohler, G. 2008. **Reptiles of Central America.** 2<sup>a</sup> ed. Offenbach, Herpeton Verlag Elke Kohler. 400 pp.
- 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.
- Lazar, Itzvan. 2010. **Gelanalyzer 2010a.** Disponible en <http://www.gelanalyzer.com/>
- Louis, E. J., & E. R. Dempster, 1987. **An exact test for Hardy-Weinberg and multiple alleles.** *Biometrics* 43:805–811.
- Lu, Z., W. E. Johnson, M. Menotti-Raymond, N. Yuhki, J. S. Martenson, S. Mainka & S. J. O'Brien. 2001. **Patrones de Diversidad Genética en Poblaciones Remanentes de Panda Gigante.** *Conservation Biology* 15(6):1596–1607
- Luikart, G., F. W. Allendorf, J. M. Cornuet, & W. B. Sherwin. 1998. **Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks.** *Journal of Heredity* 89(3):238-247.

- Luikart, G., & J. M. Cornuet. 1998. **Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data.** *Conservation Biology* 12(1):228–237.
- Madsen, T., R. Shine, M. Olsson, & H. Wittzell. 1999. **Conservation biology: restoration of an inbred adder population.** *Nature* 402(6757):34–35.
- Meffe, G. K., & C. R. Carroll. 1997. **Principles of Conservation Biology.** 2<sup>a</sup> ed. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates Inc. 729 pp.
- Mills, L. S., & P. E. Smouse. 1994. **Demographic consequences of inbreeding in remnant populations.** *American Naturalist* 412–431.
- Ohta, T., & M. Kimura. 1973. **A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population.** *Genetical research* 22(02):201–204.
- Owens, T. 2006. **Ex situ: Notes on reproduction and captive husbandry of the Guatemalan beaded lizard (*Heloderma horridum charlesbogerti*).** *Iguana* 13(3):212–215.
- Pearse, D. E., & K. A. Crandall. 2004. **Beyond F<sub>ST</sub>: analysis of population genetic data for conservation.** *Conservation Genetics* 5(5):585–602.
- Piry, S., G. Luikart & J. M. Cornuet. 1999. **BOTTLENECK: a program for detecting recent effective population size reductions from allele data frequencies.** Obtenido de <http://www.ensam.inra.fr/URLB/bottleneck/pub.html>

- Ralls, K., & J. D. Ballou. 2004. **Genetic status and management of California condors.** *The Condor* 106(2):215–228.
- Raymond M. & F. Rousset. 1995. **GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism.** *Journal of Heredity* 86:248-249
- Rienzo, A. D., A. C. Peterson, J. C. Garza, A. M. Valdes, M. Slatkin & N. B. Freimer. 1994. **Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(8):3166–3170.
- Reiserer, R.S., G. W. Schuett, & D. D. Beck. 2013. **Taxonomic Reassessment and Conservation Status of the Beaded Lizard, *Heloderma horridum* (Squamata: Helodermatidae).** *Amphibian & Reptile Conservation* 7(1): 74–96.
- Schulte, U., F. Gebhard, L. Heinz, M. Veith & A. Hochkirch. 2011. **Buccal swabs as a reliable non-invasive tissue sampling method for DNA analysis in the lacertid lizard *Podarcis muralis*.** *North-Western Journal of Zoology* 7(2): 325-328.
- Shaffer, M. L. 1981. **Minimum population sizes for species conservation.** *BioScience* 131–134.
- Spielman, D., B. W. Brook, & R. Frankham. 2004. **Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(42):15261–15264.
- 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.

Tanaka, Y. 2000. **Extinction of populations by inbreeding depression under stochastic environments.** *Population Ecology* 42(1):55–62.



## VIII. APÉNDICES

### A. Protocolo para la visualización de marcadores microsatélites mediante geles de 50 cm en condiciones desnaturalizantes y tinción con nitrato de plata

El presente protocolo presenta un procedimiento práctico para la visualización de productos de amplificación entre 100 y 300 pares de bases. Previo al uso de este protocolo, ha de consultarse el manual de instrucciones específico de cada equipo.

#### 1. Soluciones a preparar

- a. **Buffer TBE 5X (500 ml):** 27 g de Trizma-base, 2.33 g de EDTA, 13.75 g de ácido bórico. Disolver componentes con agitación en un beaker de 500 ml empleando unos 400 ml de agua destilada. Una vez disuelto, aforar en balón de aforo hasta 500 ml.
- b. **Buffer TBE 1X (2 l):** 400 ml de buffer TBE 5X. Añadir a la solución con 1.6 l de agua destilada.
- c. **Solución de acrilamida al 10% (80 ml):** 33.63 g de urea, 20 ml de solución de acrilamida-bis 37.5:1 al 40%, 16 ml de buffer TBE 5X. Mezclar el buffer y la solución de acrilamida en un beaker de 100 ml. Con agitación y calentamiento (evitando que la solución sobrepase los 35°C) agregar lentamente la urea y esperar que se disuelva totalmente, aproximadamente 20 minutos. Una vez disuelta, aforar a 80 ml en una probeta apartada para dicho fin. Filtrar en un nuevo beaker con papel filtro Whatman grado 1 y refrigerar.
- d. **Solución de fijación (1.5 l):** 150 ml de ácido acético glacial. Añadir 1.35 l de agua destilada en un beaker de 2 l.
- e. **Solución de tinción (1.5 l):** 2.25 g de  $\text{AgNO}_3$ , 2.25 ml de formaldehído al 37%. En un beaker de 2 l disolver los cristales de  $\text{AgNO}_3$  en 1.5 l de agua

destilada con una varilla de agitación, agregar el formaldehído y agitar suavemente.

- f. **Solución de revelado (1.5 l):** 45 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 2.25 ml de formaldehído al 37%, 78  $\mu\text{l}$  de tiosulfato de sodio al 10%. En un beaker de 2 l disolver los componentes con un agitador magnético. Colocar en refrigeración.
- g. **APS 10% (1 ml):** 0.1 g de persulfato de amonio. En una balanza, tarar un beaker de 10 ml y pesar el persulfato de amonio. Agregar 900  $\mu\text{l}$  de agua destilada y agitar suavemente con movimientos circulares hasta que se disuelva.
- h. **Bind silano (15.15 ml):** 15 ml de etanol al 95%, 75  $\mu\text{l}$  ácido acético glacial, 75  $\mu\text{l}$   $\gamma$ -metacriloxi-propiltrimetoxisilano. Mezclar los componentes y guardar en refrigeración.
- i. **Stopmix de formamida (10 ml):** 9.5 ml de formamida desionizada, 300  $\mu\text{l}$  de agua destilada, 200  $\mu\text{l}$  de EDTA 5M, 20 mg de Xilen-cianol, 20 mg de Azul de bromofenol. Mezclar los componentes y almacenar en refrigeración.

## 2. Otros reactivos y materiales

- a. Tetrametiletlenodiamina (TEMED)
- b. Diclorodimetilsilano (DMS)
- c. Agua destilada
- d. Etanol 95%
- e. Productos de amplificación
- f. Escalera molecular
- g. Silicón
- h. Kimwipes
- i. Detergente de platos
- j. Hielo

### 3. Equipo de laboratorio

- a. Aparato de electroforesis de secuenciación Bio-rad Sequi-Gen GT con placas de 38 x 50 cm.
- b. Fuente de poder Thermo Electron Corporation PS4000A Plus
- c. Placa térmica o termociclador.
- d. Mesa agitadora.

### 4. Procedimiento

- a. Preparación de las placas de vidrio
  - Lavar bien las placas de vidrio con detergente de platos y una esponja suave. Enjuagarlas con abundante agua destilada y luego con etanol al 95%. Dejar escurriendo hasta que se encuentren totalmente secas. La placa que está unida al reservorio de buffer de lavarse con cuidado para evitar que se introduzcan en él restos de jabón o agua del chorro, en ese caso deberá enjuagarse con agua destilada.
  - La placa grande debe tratarse con solución de Bind silano en la superficie en la cual se adherirá el gel. Con una micropipeta verter 50  $\mu$ l de la solución en el vidrio y distribuir cuidadosamente con un kimwipe utilizando guantes. Repetir otras dos veces con la misma cantidad de solución. Enjuagar dos veces con etanol al 95% y dejar que éste se seque totalmente. Desechar los guantes contaminados con Bind Silano.
  - La placa unida al reservorio de buffer debe tratarse con DMS para evitar que el gel se pegue a la superficie. Con una micropipeta verter dos veces 1000  $\mu$ l de DMS sobre el vidrio y distribuir con un kimwipe utilizando guantes nuevos. Repetir el procedimiento otras dos veces y

luego enjuagar con etanol al 95%. Dejar que el vidrio se seque totalmente.

b. Polimerización

- Seguir el manual del aparato para armar la cámara de polimerización del gel. Es importante verificar que los espaciadores estén limpios de restos de acrilamida y que el espesor de los espaciadores y el peine sean los mismos. Verificar visualmente que las dos placas y los espaciadores estén alineados en el extremo inferior de la armazón luego de apretar los sujetadores laterales.
- Colocar la armazón sobre la mesa en posición horizontal y colocar la base, para ello en extremo inferior de la armazón deberá sobresalir por la orilla de la mesa.
- Colocar en el extremo superior el peine en posición invertida, introduciendo sólo una de las esquinas del peine entre las dos placas de vidrio.
- Preparar la jeringa quitándole el émbolo y colocándole la manguera con la boquilla. Bloquear la manguera utilizando un broche aprietapapel.
- Agregar a la solución de acrilamida 450  $\mu\text{l}$  de APS al 10% y 45  $\mu\text{l}$  de TEMED. Agitar ligeramente y luego agregar la solución a la jeringa lentamente por el extremo anterior evitando la formación de burbujas, sujetándola en posición vertical.
- Colocar el émbolo empujándolo unos pocos centímetros dentro de la jeringa. Invertir la jeringa lentamente hasta que la boquilla se esté hacia arriba y sacudir para eliminar cualquier burbuja. Lentamente empujar el émbolo nuevamente hasta que la salga todo el aire y la solución alcance el extremo la boquilla en la manguera.

- En un movimiento rápido, introducir la boquilla de la manguera en el puerto de inyección del aparato. Empujando el émbolo, agregar la acrilamida lentamente para evitar la formación de burbujas hasta llenar totalmente el espacio entre las cámaras. Una vez lleno, colocar el broche a la manguera y, sin desconectarla del puerto de inyección, dejarla sobre el aparato.
- Inmediatamente, colocar el peine en posición partiendo de la esquina que ya estaba entre las placas, introduciéndolo poco a poco en dirección al otro extremo, evitando atrapar burbujas de aire. El peine debe introducirse dentro de las placas una distancia inferior a la longitud de los dientes.
- Dejar polimerizar al menos 45 minutos.

c. Precorrida

- Una vez polimerizado el gel, quitar la base del sistema de polimerización y armar el aparato de secuenciación. Colocar un máximo de 500 ml de buffer TBE 1X en el reservorio inferior, y llenar al máximo el reservorio superior. El buffer puede calentarse en horno de microondas hasta unos 50°C para ahorrar tiempo de precorrida.
- Cuando la cámara esté llena de buffer, extraer el peine y colocarlo nuevamente, esta vez pinchando el gel con los dientes aproximadamente unos dos milímetros.
- Colocar la tapa de seguridad, conectar la cámara a la fuente de poder y correr a no más de 100 Watts hasta estabilizar la temperatura del gel en unos 55°C. Cuando se haya alcanzado esta temperatura, ajustar a unos 75 - 85 Watts para mantener una temperatura constante, monitorear la temperatura y ajustar la potencia según sea necesario.

d. Preparación de las muestras

- Los productos de PCR y la escalera molecular deben mezclarse en un volumen de stopmix de formamida.
- Calentar la escalera molecular y los productos de PCR a 95°C en una placa térmica o un termociclador por 5 minutos.
- Trasladar las muestras inmediatamente a hielo previo a cargarlas en el aparato de electroforesis.

e. Carga de las muestras

- Dentro del hielo, colocar las muestras en el orden en el cual serán cargadas para hacer más eficiente la carga, tener a la mano agua destilada para lavar las puntas de micropipeta. El procedimiento debe hacerse rápido para evitar la pérdida de temperatura en el sistema mientras este apagado.
- Apagar la fuente de poder y remover la tapa de seguridad del aparato de electroforesis.
- Cargar en los pozos 3  $\mu$ l de las muestras preparadas, enjuagando la punta de la micropipeta entre la carga de cada muestra.
- Cargar 0.5  $\mu$ l de la escalera molecular preparada.

f. Electroforesis

- Rearmar el aparato y reiniciar la corrida a 100 Watts por unos minutos con el fin de hacer llegar rápidamente los productos en los pozos al borde del gel, cuando se observe que comenzó la migración dentro del gel ajustar a unos 75-85 Watts hasta retomar la temperatura de corrida de 50°C.

- Una vez alcanzados los 50°C, ajustar a aproximadamente 55 Watts para mantener una temperatura constante. Monitorear y ajustar la potencia para mantener la temperatura a lo largo del proceso de electroforesis.
- Monitorear el nivel de buffer en el reservorio superior, éste debe sobrepasar sobradamente el borde de la placa. Detener momentáneamente la electroforesis y ajustar el nivel si es necesario.
- Utilizando la migración de los pigmentos como referencia, detener la electroforesis cuando se estime que los fragmentos de interés ha migrado aproximadamente hasta la mitad del gel.
- Permitir que el sistema se enfríe y drenar el buffer a través de la válvula del reservorio superior. Levantar las placas y terminar de vaciar el resto del buffer volteando la armazón sobre un recipiente o sobre el reservorio inferior.

g. Tinción y revelado

- Lavar y secar cuidadosamente todas las bandejas a utilizar en el procedimiento.
- Quitar los sujetadores laterales y separar las placas cuidadosamente trabajando sobre una superficie horizontal.
- En una bandeja de tamaño ligeramente mayor a la placa, verter la solución de fijación e introducir la placa con el gel adherido. Poner en agitación por 20 minutos.
- Extraer el gel y dejar que escurra la solución de ácido acético. Colocarlo en una bandeja con dos litros de agua destilada y poner en agitación por 10 minutos. Recuperar la solución de fijación de la bandeja en un recipiente.

- Extraer el gel y dejar escurrir el agua. Trasladarlo a una bandeja con la solución de tinción y poner en agitación durante 30 minutos.
- Preparar una nueva bandeja con dos litros de agua destilada, colocar la bandeja con solución a un lado, y otra bandeja con la solución de revelado fría al otro lado. Extraer el gel de la solución de tinción, dejar escurrir un poco, y sumergir rápidamente (unos cinco segundos) en agua destilada. Inmediatamente colocar en la solución de revelado fría. Poner en agitación.
- Tener a mano el recipiente con la solución de fijación. Verterlo en la solución de revelado para detener la reacción de tinción cuando se observen las bandas en la intensidad deseada. Agitar hasta que la solución se neutralice completamente.
- Enjuagar el gel en agua destilada y ponerlo a secar en un escurridor.

**B. Caracterización de genotipos individuales en la población de *Heloderma charlesbogerti* en Cabañas, Zacapa, en base a seis marcadores microsatélites**

En la siguiente figura se expresan los genotipos encontrados en la población. Para cada *locus* los alelos están representados por el tamaño de los fragmentos amplificados. Los individuos están identificados según su número de chip inyectable AVID.

Individuo	Alelos en cada locus					
	HELO1	HELO2	HELO3	HELO4	HELO5	HELO6
069*628*052	191	116	206	158	102	205
	181	114	206	158	102	205
069*610*088	191	116	210	158	102	205
	181	114	206	158	102	205
069*773*009	181	116	206	158	102	205
	181	114	206	158	102	205
044*795*824	181	116	210	158	102	205
	181	114	206	158	102	205
069*611*540	181	114	210	158	102	205
	181	114	206	158	102	205
069*638*847	181	116	210	158	102	205
	181	114	206	158	102	205
044*835*048	181	114	206	158	102	205
	181	114	206	158	102	205
069*616*019	191	114	210	158	102	205
	181	114	206	158	102	205
069*778*807	191	116	206	158	102	205
	181	116	206	158	102	205
069*615*864	191	116	206	158	102	205
	181	116	206	158	102	205
044*784*859	191	116	206	158	102	205
	181	114	206	158	102	205

Individuo	Alelos en cada locus					
	HELO1	HELO2	HELO3	HELO4	HELO5	HELO6
069*783*307	181	114	210	158	102	205
	181	114	206	158	102	205
069*780*027	181	116	210	158	102	205
	181	114	210	158	102	205
044*782*063	191	114	210	158	102	205
	181	114	206	158	102	205
026*787*544	191	114	210	158	102	205
	181	114	210	158	102	205
044*777*575	181	116	206	158	102	205
	181	114	206	158	102	205
069*608*123	191	114	206	158	102	205
	181	114	206	158	102	205
069*636*264	191	114	210	158	102	205
	181	114	210	158	102	205
044*835*864	181	114	210	158	102	205
	181	114	206	158	102	205
069*608*123	181	116	206	158	102	205
	181	114	206	158	102	205
069*611*275	181	116	206	158	102	205
	181	114	206	158	102	205
069*626*004	191	114	210	158	102	205
	181	114	206	158	102	205

### C. Resumen de la variación de seis *loci* microsatélites en la población de *Heloderma charlesbogerti* en Cabañas, Zacapa.

A continuación se presenta la proporción de heterocigotos en la población  $H_o$ , heterocigosidad esperada  $H_e$ , número esperado de homocigotos y heterocigotos utilizando la corrección de Lavene y valor de significancia asociado a la hipótesis nula de equilibrio de Hardy-Weinberg en cada *locus* evaluado. Los valores fueron computados con el programa Genepop 4.2.

HELO1		
Genotipos	Obs.	Esp.
181,181	11	12.28
191,181	11	8.44
191,191	0	1.28
<b>Ho</b>	0.500	
<b>He</b>	0.375	
<b>Valor P</b>	0.268	
Alelos	Frecuencia	
181	0.750	
191	0.250	

HELO2		
Genotipos	Obs.	Esp.
114,114	10	10.12
116,114	10	9.77
116,116	2	2.12
<b>Ho</b>	0.455	
<b>He</b>	0.434	
<b>Valor P</b>	1.000	
Alelos	Frecuencia	
114	0.682	
116	0.318	

HELO3		
Genotipos	Obs.	Esp.
206,206	10	9.44
210,206	9	10.12
210,210	3	2.44
<b>Ho</b>	0.409	
<b>He</b>	0.449	
<b>Valor P</b>	0.653	
Alelos	Frecuencia	
206	0.659	
116	0.341	

HELO4		
Genotipos	Obs.	Esp.
158,158	22	22.00
<b>Ho</b>	Monomórfico	
<b>He</b>	Monomórfico	
<b>Valor P</b>	-	
Alelos	Frecuencia	
158	1.000	

HELO5		
Genotipos	Obs.	Esp.
102,102	22	22.00
<b>Ho</b>	Monomórfico	
<b>He</b>	Monomórfico	
<b>Valor P</b>	-	
Alelos	Frecuencia	
102	1.000	

HELO6		
Genotipos	Obs.	Esp.
205,205	22	22.00
<b>Ho</b>	Monomórfico	
<b>He</b>	Monomórfico	
<b>Valor P</b>	-	
Alelos	Frecuencia	
205	1.000	

## D. Estimación del costo de reactivos de laboratorio para la estimación del tamaño de los fragmentos de marcadores microsatélites.

A continuación se detalla la estimación del costo de los reactivos de laboratorio necesarios para la estimación del tamaño de los fragmentos de marcadores microsatélites, según los métodos utilizados en el presente trabajo.

Sistema de cuatro geles de siete centímetros para verificar el éxito de la amplificación (verifica 44 muestras)			
Buffer TBE 5X	202.40 ml		
	10.93 g	Trisma Base	Q 12.39
	0.94 g	EDTA	Q 4.06
	5.57 g	Ácido bórico	Q 2.73
Acrilamida 20%	22.80 ml		
	11.40 ml	Acrilamida 37%	Q 10.66
	2.40 ml	TBE 5X	-
Fijación	0.30 L		
	30.00 ml	Ácido acético glacial	Q 3.97
Tinción	0.30 L		
	0.30 g	Nitrato de plata	Q 8.35
	0.45 ml	Formaldehído	Q 0.11
Revelado	0.30 L		
	9.00 g	Carbonato de sodio	Q 5.69
	0.45 ml	Formaldehído	Q 0.11
	15.60 µl	Tiosulfato de sodio 10%	Q -
Persulfato 25%	1.00 ml		
	0.25 g	Persulfato de amonio	Q 0.92
Stop mix de formamida	0.15 ml		
	0.30 mg	Xilen cyanol	Q -
	0.30 mg	Azul de bromofenol	Q -
	3.00 µl	EDTA 5M	Q -
	0.14 ml	Formamida desionizada	Q 1.96
TEMED	32.00 µl		
	32.00 µl	Tetrametiletlenodiamina (TEMED)	Q 0.11

Gel desnaturalizante de 50 cm para estimar el tamaño de los productos amplificados (estima 44 muestras)			
Buffer TBE 5X	416.00 ml		
	22.46 g	Trisma Base	Q 25.47
	1.94 g	EDTA	Q 8.35
	11.44 g	Ácido bórico	Q 5.62
Acrilamida 10%	80.00 ml		
	33.63 g	Urea	Q 13.74
	20.00 ml	Acrilamida 37%	Q 18.70
	16.00 ml	TBE 5X	-
Fijación	1.50 L		
	150.00 ml	Ácido acético glacial	Q 19.87
Tinción	1.50 L		
	2.25 g	Nitrato de plata	Q 62.60
	2.25 ml	Formaldehído	Q 0.54
Revelado	1.50 L		
	45.00 g	Carbonato de sodio	Q 28.43
	2.25 ml	Formaldehído	Q 0.54
	78.00 µl	Tiosulfato de sodio 10%	Q -
Persulfato 10%	1.00 ml		
	0.10 g	Persulfato de amonio	Q 0.37
Bind silano	0.20 ml		
	0.20 ml	Etanol 95%	Q -
	<0.01 ml	Ácido acético glacial	Q -
	<0.01 ml	γ-metacriloxi-propiltrimetoxisilano	Q -
Stop mix de formamida	0.15 ml		
	0.30 mg	Xilen cyanol	Q -
	0.30 mg	Azul de bromofenol	Q -
	3.00 µl	EDTA 5M	Q -
	0.14 ml	Formamida desionizada	Q 1.96
TEMED	45.00 µl		
	45.00 µl	Tetrametiletlenodiamina (TEMED)	Q 0.16
DMS	2.00 ml		
	2.00 ml	Diclorodimetilsilano (DMS)	Q 1.96

<b>Total por 44 muestras</b>			<b>Q 239.39</b>
<b>Total por muestra</b>			<b>Q 5.44</b>