



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

Tesis

**ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN *Anolis
nebulosus* CON MARCADORES DE ADN MITOCONDRIAL**

Que presenta:

Biol. José Alfredo Soria Bárcena

Para obtener el título de Maestro en Ciencias Biológicas

ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA PECUARIA

ASESORA: DRA. MARÍA GUADALUPE ZAVALA PÁRAMO

Morelia Mich., Febrero 2020

Indice

1. RESUMEN	4
2. ABSTRACT	5
3. INTRODUCCION	6
4. ANTECEDENTES	8
4.1 DIVERSIDAD DE <i>ANOLIS</i> EN MÉXICO.....	8
4.2 ANOLIS NEBULOSUS.....	8
4.3 DIVERSIDAD GENÉTICA Y MORFOLÓGICA DE <i>ANOLIS NEBULOSUS</i>	10
4.4 MARCADORES MOLECULARES	11
5. JUSTIFICACIÓN	13
6. HIPÓTESIS	14
7. OBJETIVOS	15
8. MATERIALES Y MÉTODOS	16
8.1 MATERIAL BIOLÓGICO	16
8.2 EXTRACCIÓN DE ADN.....	16
8.3 AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA ADN POLIMERASA	17
8.4 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	17
8.5 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA.....	17
8.6 ANÁLISIS GENEALÓGICO.....	18
9. RESULTADOS	19
9.1 EXTRACCIÓN DE ADN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN	19
9.2 DIVERSIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA.....	24
9.3 RED DE HAPLOTIPOS	28
9.3.1 <i>ARNr16S</i>	28
9.3.2 <i>COI</i>	29
9.4 ANÁLISIS DE RELACIONES GENEALÓGICAS.....	30
10. DISCUSIÓN	35
10.1 MÉTRICAS DE DIVERSIDAD	35
10.2 DISTANCIAS PAREADAS.....	35
10.3 RED DE HAPLOTIPOS.....	37
10.4 RELACIONES GENEALÓGICAS	37

11. CONCLUSIONES 39

12. BIBLIOGRAFÍA 40

1. RESUMEN

Anolis nebulosus es una especie endémica de México, que se distribuye desde el norte en Chihuahua hasta el sur en Oaxaca. Es una especie de hábitos diurnos evitando las horas de mayor calor, generalmente arborícola y de dieta insectívora. Se puede encontrar en el bosque tropical caducifolio, subperenifolio, matorral xerófilo y bosques de pino-encino. Se ha reportado que las especies de *Anolis* presentan una rápida adaptación a su habitat, lo que ocurre en pocas generaciones, y además se han observado episodios de selección natural que conducen a una evolución en una escala de tiempo contemporánea. El objetivo de este estudio fue evaluar la diversidad genética de poblaciones de *Anolis nebulosus* utilizando marcadores de ADN mitocondrial. El estudio se realizó en poblaciones de ejemplares colectados en Michoacán y Jalisco, a través de los marcadores de ARN ribosomal 16S (RANr16S) y Citocromo Oxidasa I (COI). Se obtuvieron los índices de diversidad y diferenciación genética, y se revisaron las relaciones genealógicas entre los haplotipos. El análisis de diversidad genética mostró alta diversidad haplotípica y nucleotídica, lo cual de acuerdo a Grant y Bowen (1998) sugiere una población grande y estable con una historia antigua. Destaca que los porcentajes de diferenciación genética están por encima de lo esperado para especies estrechamente relacionadas según lo propuesto por Gunter et al (2014). Adicionalmente, los resultados de todos los análisis sugirieron la presencia de diferentes linajes asociados a la distribución geográfica de la especie en subpoblaciones que podrían estar aisladas y han sufrido expansiones *in situ*.
PALABRAS CLAVE: BIODIVERSIDAD, REPTILES, COI, ARNr16S, ENDEMICA.

2. ABSTRACT

Anolis nebulosus is an endemic species of Mexico, which is distributed from the north in Chihuahua to the south in Oaxaca. It is a species of daytime habits avoiding the hottest hours, usually living in trees and of insectivorous diet. It can be found in the tropical deciduous forest, subperennifolio, xerophilous scrub and pine-oak forests. It has been reported that *Anolis* species have a rapid adaptation to their habitat, which occurs in a few generations, and there have also been episodes of natural selection that lead to an evolution on a contemporary time scale. The objective of this study was to evaluate the genetic diversity of *Anolis nebulosus* populations using mitochondrial DNA markers. The study was carried out in populations of specimens collected in Michoacan and Jalisco, through the 16S ribosomal RNA (rRNA 16S) and Cytochrome Oxidase I (COI) markers. The indexes of diversity and genetic differentiation were obtained and genealogical relationships between haplotypes were reviewed. The genetic diversity analysis showed high haplotype and nucleotide diversity, which according to Grant and Bowen (1998) suggests a large and stable population with an ancient history. It emphasizes that the percentages of genetic differentiation are above what is expected for closely related species as proposed by Gunter et al (2014). Additionally, the results of all analyzes suggested the presence of different lineages associated with the geographical distribution of the species in subpopulations that could be isolated and have undergone expansions *in situ*.

3. INTRODUCCION

Anolis es un género de saurópsidos que pertenecen al Infra-orden Iguania nativos del continente Americano y el Caribe (Conant y Collins, 1998), en general limitado a las zonas tropicales con altitudes que van de 0 a 500 metros sobre el nivel del mar (msnm) (Williams, 1977). Sin embargo, se ha documentado especies que se encuentran hasta los 800 msnm (*A. gundlachi*) (Hertz et al., 1979). Por otro lado, *A. cybotes* tiene un registro de distribución en bosque seco en la República Dominicana a altitudes de 2,200 msnm (Hert y Huey, 1981). La distribución del género en el continente va desde el Sureste de los Estados Unidos, en los estados de Carolina del Norte, Tennessee, Arkansas y el este de Texas (Rand, 1969; Williams, 1977), hasta el norte de Bolivia y el Centro de Brasil, y por todas las islas del Caribe. En México, se distribuyen en los límites neotropicales en la Sierra Madre Oriental y en la Sierra Madre Occidental y de ahí hacia el Sur, en los estados de Campeche, Colima, Chiapas, Durango, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Quintana roo, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y Zacatecas (Conant y Collins, 1998; Losos y Schneider, 2009; Gray et al. 2012).

Entre las lagartijas del género *Anolis*, la hembra es de menor tamaño que el macho y hay características únicas que distinguen al género, como la presencia de almohadillas adheribles similares a las de los geckos, aunque su característica principal es la presencia de un saco gular colorido, el cual no siempre es visible y en las hembras suele ser de tamaño reducido o vestigial (Fitch y Hillis, 1984). Se ha documentado la función principal del saco gular en la delimitación de territorio ante otros machos y para el cortejo, además de funciones en interacción interespecífica e intraespecífica; con reconocimiento entre especies según el patrón de escamas y gama de colores, los cuales son más vívidos y ricos en diversidad en una longitud de onda que solo los *Anolis* perciben (Nicholson et al. 2007). Los ojos tienen una doble capa fóvea, característica que solo se ha visto en aves rapaces y se cree les proporciona una visión binocular (Fleishman, 1992, 1993, 1997; Loew et al., 2002).

El género *Anolis*, es el más abundante de vertebrados terrestres (Nicholson *etal.* 2012.) y actualmente se reconocen alrededor de 400 especies y cada año se describen nuevas especies (Losos, 2009). Alrededor de 150 especies se distribuyen en las islas del Caribe pero

tienen un origen probable en Centroamérica, desde donde se distribuyeron a través del Caribe hacia Sudamérica y Norteamérica (Román-Palacios, 2018). Debido a que es un género con una gran diversidad ecológica y una amplia variación morfológica, estos tetrápodos terrestres se han vuelto un ejemplo clásico de la radiación adaptativa en vertebrados (Williams, 1972; Losos et al., 1998). La clasificación de *Anolis* ha sido complicada y en numerosas ocasiones se propuso dividir el género en al menos ocho géneros diferentes (Nicholson et al. 2012). Sin embargo, los análisis genéticos no indican tal división (Jackman et al., 1999; Poe, 2013). Además, el género se ha dividido en grupos artificiales o complejos de especies para su estudio y se ha intentado determinar la monofilia de estos grupos con base en sus similitudes morfológicas y datos de ADN mitocondrial (ADNmt) (Castañeda y de Queiroz, 2011).

Su clasificación taxonómica y la diferenciación entre especies es una tarea compleja debido a que el género tiene una gran diversidad morfológica. Se ha reportado que presentan una rápida adaptación a su hábitat, lo que ocurre en pocas generaciones (Losos, 2009), por ello, se les denomina "ecomorfos", es decir que dos especies diferentes con características morfológicas similares no necesariamente son filogenéticamente cercanos (Williams 1972). Así mismo, se han identificado alrededor de ocho morfotipos diferentes dependiendo del nicho que ocupe la población (Williams, 1983; Losos, 2009). Recientemente se encontró que ciertas especies solo pueden identificarse con certeza al revisar los caracteres sexuales, por lo que la forma más precisa para la identificación es utilizando marcadores moleculares de ADNmt (Gunter et al. 2014).

4. ANTECEDENTES

4.1 Diversidad de *Anolis* en México

México, es uno de los países considerados como megadiversos, albergando aproximadamente 12% de la diversidad de especies, además de su diversidad ecológica y genética, lo cual es consecuencia de su topología, la disparidad de climas y de su ubicación geográfica. En cuanto a la diversidad de la herpetofauna, nuestro país se ubica como el segundo más diverso albergando alrededor de 864 especies de reptiles, ligeramente por debajo de Australia (CONABIO, 2013; Flores-Villela y García-Vázquez, 2014). Es relevante resaltar que el 57% de especies son endémicas de nuestro país, esto quiere decir que alrededor de 493 especies son exclusivas del territorio nacional.

De las casi 400 especies de *Anolis*, se reconocen 53 especies hasta 2017 (Gray et al., 2012; Gunther et al., 2014; Gray et al., 2016), de las cuales 30 son endémicas, lo que equivale al 56.6%, es decir, que más de la mitad de especies son exclusivas de México (<http://www.uta.edu/biology/mexicoherps/Polychrotidae.htm>). Desafortunadamente, se conoce muy poco sobre la mayoría de las especies de este género así como de muchas especies de reptiles (Flores-Villela y García-Vázquez, 2014).

4.2 *Anolis nebulosus*

La especie *A. nebulosus* es endémica de México, presenta una amplia distribución por la vertiente del Pacífico desde Sinaloa hasta Oaxaca, más específicamente desde donde convergen los estados de Chihuahua, Sinaloa y Durango (Fig. 1). Estos *Anolis* se distribuyen desde el nivel del mar hasta los 2,100 metros sobre el nivel del mar (msnm). Es una especie de hábitos diurnos, evitado las horas de mayor calor, generalmente arborícola de dieta insectívora. Se puede encontrar en hábitats como el bosque tropical caducifolio, subperenifolio, matorral xerófilo y bosques de pino encino, manglares y áreas perturbadas (Ramírez-Bautista, 2002).



Figura 1. Mapa de distribución de la especie *Anolis nebulosus*. en amarillo se resalta el área de distribución.

Se puede decir que esta especie de tetrápodo es lo que típicamente se conoce como lagartija, con la presencia del saco gular colorido que no siempre es visible. Son de un tamaño considerado como pequeño, las hembras con una longitud hocico-cloaca de aproximadamente 35 a 45 mm y en machos de 32 a 50 mm. Generalmente, son de cuerpo alargado y esbelto con la cabeza triangular, con extremidades alargadas, con dedos de igual forma alargados. Las escamas dorsales son más pequeñas que las ventrales y son fuertemente quilladas. El saco gular es de tamaño considerablemente mayor en los machos y en el caso de las hembras parece casi vestigial (Gunther et al., 2014). La coloración del saco gular es de color naranja con líneas rojas que van de lado a lado bordeando las escamas y en los bordes es blanco, lo cual se considera particular de esta especie, aunque no siempre esta presente este rasgo (Fig. 2).



Figura 2. Fotografías de un ejemplar en vida silvestre de *Anolis nebulosus* y del saco gular de un macho.

La IUCN lo clasifica como una especie en estatus de estable y no se hace mención de ningún tipo de conservación de forma directa, ni se encuentra sujeta a ningún tipo de protección, sin embargo, parte de su distribución se encuentra dentro de áreas naturales protegidas como la reserva de la biósfera Chamela-Cuixmala (Gray et al., 2012; Flores-Villela y Hammerson, 2007).

4.3 Diversidad genética y morfológica de *Anolis nebulosus*

El mayor número de estudios que hay sobre *A. nebulosus* tienen como objetivo el análisis estadístico de poblaciones (Jenssen, 1971), distribución, etología, nicho ecológico y en listados de diversidad de especies sobre un área determinada, y sobre todo en discusiones sobre su clasificación y sinonimias (Jenssen, 1970; Bautista y Vitt, 1997; Bautista y Benabib, 2001). Aunque en general estos tópicos son los que más se han estudiado sobre el género, en los últimos años entró en auge el estudio con marcadores moleculares en diferentes niveles, como filogeografía, filogenia, datación y genealogía entre otros. A diferencia de la mayoría de las especies del Caribe y algunas de Centroamérica y norte de Sudamérica, los *Anolis* endémicos de México se han estudiado poco a nivel molecular (Soria-Bárcena, 2017).

Anolis nebulosus es una de las especies con más controversia taxonómica, con una amplia distribución, diferentes ecomorfos y con al menos cinco sinonimias y unas 29 revisiones (<http://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Anolis&species=nebulosus>).

Destaca una revisión de Montes de Oca et al. (2013) donde, con base en caracteres morfológicos, concluyeron que las especies *Anolis schmidtii* y *Anolis simmonsii* son sinónimos de *A. nebulosus*.

Por otro lado, Gunter et al. (2014) mediante el análisis genético con ADN mitocondrial (ADNmt) y morfológico han propuesto que *A. nebulosus* es un complejo de especies y que *A. boulengerianus* no es una sinonimia de *A. nebulosus*, re-estableciéndolo como especie.

En un estudio molecular realizado en dos poblaciones de *A. nebulosus*, Senczuk et al. (2014) reportaron diferencias morfológicas y de comportamiento entre dos poblaciones, una continental en la reserva de la biósfera Chamela-Cuixmala Jalisco y otra en la isla Don Panchito que se encuentra cerca de la costa de la reserva. Sin embargo, los resultados del análisis de las poblaciones usando el marcador de ARN ribosomal 16S (ARNr16S) de ADNmt, indicaron que ambas poblaciones corresponden a la misma especie con solo tres haplotipos aparentemente compartidos. Como explicación a las diferencias morfológicas se propuso gigantismo insular.

En un estudio más reciente, el análisis molecular de algunos ejemplares de *A. nebulosus* colectados en la comunidad del Tuito, Jalisco, utilizando el marcador de ARNr16S (Soria-Bárcena, 2017) mostró una alta diversidad en comparación con lo reportado por Senczuk et al. (2014), sugiriendo que la especie puede presentar una alta diversidad genética.

4.4 Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares son biomoléculas portadoras de información como las proteínas o el ADN (Simpson, 1997). En el área de la biología molecular se han desarrollado múltiples técnicas para la obtención de diferentes marcadores de ADN con el objetivo de detectar polimorfismos. Los marcadores moleculares se pueden clasificar en tres grupos por su aparición cronológica (Maheswaran, 2004). En el primer grupo están los marcadores de “primera generación”, que aparecieron en la década de los 70’s y 80’s del siglo pasado, en él se pueden encontrar los RFLP’s (Restriction Fragment Length Polymorphism), VNTR (Variable Number Tandem Repeats) o a los SSCP (Single Stranded Conformational Polymorphism). En el segundo grupo se encuentran los marcadores de la década de los 90’s del siglo pasado y se les denomina de “segunda generación”; algunos de ellos son los RAPD’s (Randomly Amplified Polymorphic DNA) o los SSR (Simple Sequence Repeats). En el tercer grupo están, por ejemplo los AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ASAP (Allele Specific Associated Primers) o SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) y son nombrados de “tercera generación”.

Actualmente, la secuenciación del ADN es la técnica más utilizada en análisis taxonómicos, ya que a través de ella se puede observar puntualmente la variación de caracteres presentes en el

ADN nuclear (ADNnu) y ADNmt. La base de estos análisis es considerar a cada nucleótido (en secuencias homólogas) como un carácter y la presencia de Adenina, Timina, Citosina o Guanina es considerada como un estado de carácter para cada sitio en particular, de esta manera es posible comparar cientos o miles de caracteres entre diferentes individuos de una población o entre diferentes niveles taxonómicos.

El ADNmt ofrece una prueba molecular sensible del proceso evolutivo y es uno de los marcadores más utilizados en diferentes análisis moleculares en vertebrados. Algunas de las ventajas del ADN mitocondrial como marcador, es que tiene una tasa de evolución mayor que la el ADN nuclear, se hereda como una simple copia (herencia materna), no tiene recombinación y es relativamente fácil de obtener (Ball y Avise, 1992). Se puede ver que en diferentes revisiones taxonómicas de vertebrados se utilizan secuencias de ADNmt como las de la NADH Deshidrogenasa 2 y 6 (ND2, ND6), ATP sintasa 8 y 6 (ATP8, ATP6), Citocromo oxidasa I (COI), Citocromo b (Cytb), y los genes de ARN ribosomal 12S y 16S, aunque también se usan algunas secuencias nucleares.

5. JUSTIFICACIÓN

Recientemente, el análisis de la riqueza de especies de vertebrados terrestres reveló propiedades importantes y únicas de la diversidad de los reptiles, particularmente de las lagartijas y tortugas. A escala regional, los reptiles son inusualmente diversos en hábitats semiáridos. A pesar de que los reptiles representan un tercio de los vertebrados terrestres de la biodiversidad global, hasta hace poco se sabía muy poco de ellos. Esto condujo a que este grupo de vertebrados no fueran incorporados en los planes de conservación, sesgando nuestra comprensión de los procesos subyacentes que rigen la biodiversidad global de vertebrados. La distribución de las lagartijas sugiere que han sufrido procesos ecológicos y evolutivos diferentes a los de otros taxa de vertebrados (Roll et al., 2017). Los análisis sobre la caracterización molecular de las especies de *Anolis* en nuestro país son escasos, y en un estudio previo encontramos que las especies de *Anolis* en México están pobremente representadas en banco de datos (NCBI). Los programas de conservación de especies requieren de la evaluación de niveles de diversidad intraespecíficos, por ello el análisis de diversidad y estructura genética de *A. nebulosus* es un aporte inicial para la futura comprensión de los procesos ecológicos y evolutivos de esta especie endémica de México.

6. HIPÓTESIS

Las poblaciones de *Anolis nebulosus* presentan altos niveles de diversidad genética.

7. OBJETIVOS

General

- ◉ Evaluar la diversidad y estructura genética de poblaciones de *Anolis nebulosus* utilizando ADN mitocondrial.

Específicos

- ◉ Determinar la diversidad genética de poblaciones de *Anolis nebulosus*.
- ◉ Evaluar estructura genética entre poblaciones.
- ◉ Establecer las relaciones genealógicas de *Anolis nebulosus*.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Material biológico

Se analizaron 13 ejemplares colectados en Michoacán y Jalisco, los cuales se encuentran depositados en la Colección de Muestras Biológicas de Fauna Silvestre del Centro multidisciplinario en Biotecnología (CMEB); tres muestras de individuos colectadas en la localidad conocida como El Tuito del municipio de Cabo Corrientes del Estado de Jalisco; 10 muestras colectadas de ejemplares en la comunidad de Huetamo, Michoacán. Adicionalmente, en el análisis se incluyeron 36 ejemplares colectados en diferentes localidades de Michoacán, pertenecientes a la colección científica de herpetofauna de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

8.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de tejido de la cola de cada ejemplar, mediante el método libre de fenol de FitzSimmons (1997). En un microtubo de 1.5 ml estéril, se colocó una fracción de tejido de aproximadamente 6X4 mm, se incubó con 400 µl de buffer de lisis (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 10 mM, SDS 1%) y 100 µl de proteinasa K (10mg/ml) (Sigma), por un periodo de 6 horas a 60°C en un termomixer (Eppendorf), se agitó por inversión ocasionalmente, y se refrigeró durante 12 h a -20°C. Finalizado el tiempo de incubación, se adicionaron 170 µl de acetato de amonio 7.5 M mezclando por inversión y se congeló a -70°C durante 20 minutos. Se centrifugó a 13,000 rpm por 25 minutos a 4°C en una microcentrífuga (Sorvall). El sobrenadante se transfirió a un microtubo de 1.5 ml nuevo, se mezcló con 800 µl de isopropanol frío (-20°C) y se almacenó a -70°C 12 h. Posteriormente, se centrifugó a 13,000 rpm por 25 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se enjuagó con etanol al 70% frío (-20°C). Se eliminó el exceso de etanol, se secó la pastilla a temperatura ambiente, se resuspendió en 25 µl de agua destilada desionizada estéril (H₂O_{dde}) y se almacenó a 4°C. La presencia e integridad del ADN se revisó por electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8), buffer de carga tipo III 6X (Bromofenol 0.25%, xilencianol FF 0.25% y glicerol 30%) (Sambrook y Rusell, 2001), teñido con Syber Safe 1X (Invitrogene), se aplicó una corriente de 50 voltios durante 50 minutos y se visualizó con luz ultravioleta a 320 nm en un fotodocumentador (Kodak Gel Logic 200).

8.3 Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa

Se utilizaron los juegos de oligonucleótidos para amplificación de un fragmento de 600 pb del ARNr16S, reportados por Suminda et al. (2002) y un juego de oligonucleótidos para la amplificación de un fragmento de 682 pb de COI, diseñados por Padilla-Jacobo (2017).

Las reacciones de amplificación se prepararon en microtubos estériles de 0.2 ml como sigue: 200 ng de ADN, 10 pmol de cada oligonucleótido, buffer para PCR 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), MgCl₂ 1.5 mM, 200 μM de cada dNTP, Platinum *Taq* DNA polimerasa 1.5 U (Invitrogen) y H₂O_{de} hasta un volumen final de 25 μl. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización de 95°C durante 1 minuto, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 45 segundos, alineamiento a 54-55°C durante 40 segundos y extensión a 72°C durante 40 segundos, y una extensión final a 72°C durante 7 minutos (GeneAmp PCR System 2700/Applied Biosystems). Los productos de amplificación se revisaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8), buffer de carga tipo III 6X (Bromofenol 0.25%, xilencianol FF 0.25% y glicerol 30%) (Sambrook y Russell, 2001), teñido con Sybr Safe 1X (Invitrogen), y el marcador de tamaño molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Se aplicó una corriente de 50 voltios durante 60 minutos y se visualizó con luz ultravioleta a 320 nm en un fotodocumentador (Kodak Gel Logic 2000).

8.4 Secuenciación y análisis de secuencias

La secuenciación se realizó por el método dideoxy en ambas cadenas por el método de dideoxy (Sanger et al., 1977), mediante el servicio comercial de Macrogen USA. Los electroferogramas y sus secuencias se alinearon y editaron con el programa Bioedit 7.09 (Hall, 1999). Para corroborar la identidad de las secuencias, se realizó una comparación de estas en base de datos del NCBI (Gen bank) con el programa BLAST (Zhang et al., 2000).

8.5 Análisis de diversidad y diferenciación genética

Una vez comprobada la identidad de las secuencias y tras una exhaustiva búsqueda en NCBI de más secuencias para robustecer el análisis, se procedió a elaborar una matriz por marcador para su análisis por separado. Para la obtención del número de haplotipos (H), diversidad haplotípica (Hd) y nucleotídica (Pi), sitios polimórficos (S), sitios invariantes y sitios parsimoniosamente

informativos, se utilizó el programa DnaSP 5.10 (Librado and Rozas, 2009). Para el análisis de distancia genética se utilizó el programa MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011).

8.6 Análisis genealógico

Se establecieron las relaciones entre los haplotipos y sus frecuencias mediante una red de haplotipos. Para ello, la red se elaboró mediante el método Median-joining con el software NETWORK v4.6.0.0. La construcción de las redes se llevó a cabo con el método que combina el algoritmo de Kruskal para encontrar árboles de expansión mínima favoreciendo conexiones cortas y el algoritmo heurístico de máxima parsimonia de Farris (MP), el cual agrega secuencialmente vectores (Bandelt et al., 1999). Para la elaboración de los árboles genealógicos basados en los criterios de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood -ML), y de inferencia bayesiana (Bayesian Inference -BI-), se utilizaron los programas RaxML (Stamatakis 2004) y Mr Bayes v3.1 (Ronquis y Huelsenbeck, 2003) respectivamente. Para el análisis ML se calculó el modelo de evolución molecular, el cual se eligió bajo el criterio de información de Akaike (AIC) (Alfaro y Hulsenbeck, 2006) con el programa ModelTest v.3.7 (Posada, 2008). Los análisis bayesianos se corrieron con 10×10^6 generaciones usando dos Cadenas de Markov de Montecarlo (MCMC), los árboles se muestrearon cada 1000 generaciones descartando el 25% para obtener un árbol de consenso de mayoría. Los soportes de los nodos se estimaron con análisis bootstrap (PB) y probabilidad posterior (PP). Los árboles se visualizaron y editaron utilizando el programa FigTree v1.4.0 (Rambaut, 2012).

9. RESULTADOS

9.1 Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

Se realizó la extracción de ADN de 31 muestras biológicas de individuos de Jalisco y Michoacán. En la figura 3 se muestra la integridad del ADN de algunas de las muestras.

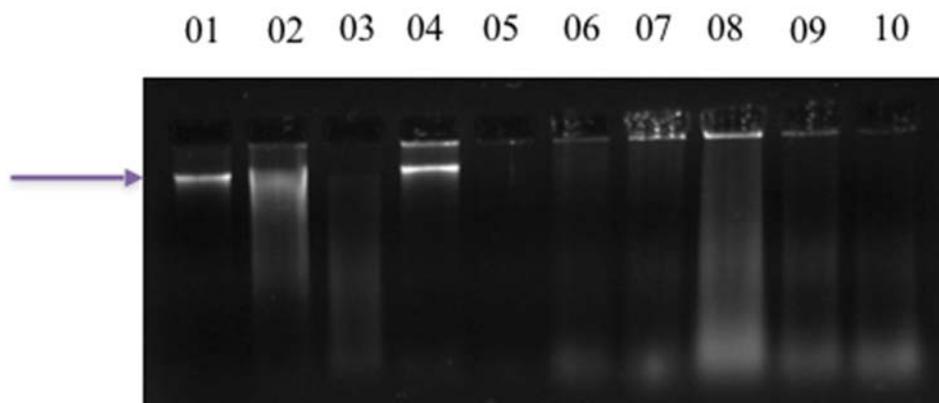


Figura 3. ADN purificado de muestras biológicas de *Anolis nebulosus*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, con TAE 1X y teñido con Sybr Safe 1X. Cada carril corresponde a un individuo.

A continuación, en la figura 4 se muestran algunos de los productos de amplificación con el tamaño esperado para los dos marcadores.

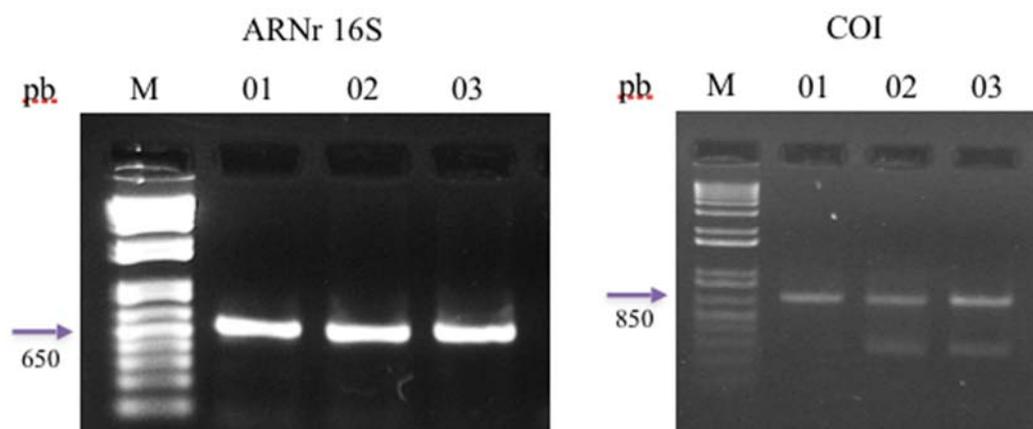


Figura 4. Productos de amplificación de los marcadores de ARNr16S y COI de *Anolis nebulosus*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, con TAE 1X y teñido con Sybr Safe 1X. Carril M, marcador de tamaño molecular 1Kb Plus DNA Ladder; Carriles 1-3 en cada gel corresponden a tres individuos.

En la Tabla 1 se enlistan las muestras analizadas, su localidad de colecta y el tamaño de las secuencias obtenidas y editadas para cada marcador.

Tabla 1. Muestras con sitio de procedencia indicando fragmentos de ADNmt amplificado y longitud de los mismos. *ND; no disponible.

Clave	Sitio de Colecta	ARNr16S	COI
<i>Anolis nebulosus</i> J01	El Tuito – Jalisco	543	*ND
<i>Anolis nebulosus</i> J02	El Tuito – Jalisco	539	649
<i>Anolis nebulosus</i> J03	El Tuito – Jalisco	548	651
<i>Anolis</i> sp C02	Huetamo – Michoacán	558	603
<i>Anolis</i> sp C03	Huetamo – Michoacán	542	603
<i>Anolis nebulosus</i> C04	Huetamo – Michoacán	*ND	652
<i>Anolis nebulosus</i> C05	Huetamo – Michoacán	539	*ND
<i>Anolis</i> sp C06	Huetamo – Michoacán	552	603
<i>Anolis</i> sp C07	Huetamo – Michoacán	529	652
<i>Anolis</i> sp C08	Huetamo – Michoacán	542	604
<i>Anolis</i> sp C09	Huetamo – Michoacán	*ND	652
<i>Anolis</i> sp D01	Huetamo – Michoacán	558	603
<i>Anolis</i> sp X	Huetamo – Michoacán	514	641
<i>Anolis nebulosus</i> H03	*ND	*ND	459
<i>Anolis</i> sp H05	*ND	417	*ND
<i>Anolis nebulosus</i> H06	Tzararacua – Michoacán	389	628
<i>Anolis nebulosus</i> H07	Tzararacua – Michoacán	543	*ND
<i>Anolis nebulosus</i> H08	Tzararacua – Michoacán	522	*ND
<i>Anolis nebulosus</i> H09	Tzararacua – Michoacán	551	627
<i>Anolis nebulosus</i> H10	Tzararacua – Michoacán	*ND	551

<i>Anolis nebulosus</i> H12	Tzararacua – Michoacán	462	*ND
<i>Anolis nebulosus</i> H13	Tzararacua – Michoacán	538	613
<i>Anolis nebulosus</i> H14	Tzararacua – Michoacán	551	*ND
<i>Anolis nebulosus</i> H15	Tzararacua – Michoacán	553	648
<i>Anolis nebulosus</i> H16	Tzararacua – Michoacán	538	613
<i>Anolis nebulosus</i> H17	Tzararacua – Michoacán	541	614
<i>Anolis</i> sp H21	*ND	414	*ND
<i>Anolis nebulosus</i> H25	*ND	*ND	407
<i>Anolis</i> sp H29	*ND	*ND	631
<i>Anolis nebulosus</i> H34	*ND	*ND	451
<i>Anolis nebulosus</i> H35	*ND	*ND	443

Para corroborar la identidad de las secuencias se realizó una comparación con las bases de datos (NCBI, GenBank). Se obtuvieron 23 secuencias de ARNr16S (Tabla 2), de las cuales solo 14 fueron identificadas como *Anolis nebulosus*, por lo que las otras nueve secuencias fueron descartadas de este estudio y se trabajó únicamente con 19 secuencias identificadas positivamente para la especie de interés.

Tabla 2. Resultado de cobertura e identidad, de las secuencias obtenidas de ARNr16S en este estudio con la base de datos del Genbak NCBI, por el método de Blast.

Marcador	Ejemplar	NCBI	Cobertura	Identidad
ARNr16S	<i>Anolis nebulosus</i> J01 y J03.	<i>A. macrinii</i>	98%	91.68%
		<i>A. nebulosus</i>	80%	97.03%
		<i>A. yoroensis</i>	99%	91.22%
		<i>A. stevepoi</i>	98%	91.25%
		<i>A. macrinii</i>	98%	91.25%
ARNr16S	<i>Anolis nebulosus</i> J02.	<i>A. nebulosus</i>	81%	97.26%

	<i>A. macrinii</i>	99%	91.70%
	<i>A. nebulosus</i>	81%	97.03%
	<i>A. nebulosus</i>	81%	97.03%
	<i>A. macrinii</i>	99%	91.33%
ARNr16S <i>Anolis nebulosus</i> C02, C03 y C06.	<i>A. microlepidotus</i>	95%	93.16%
	<i>A. microlepidotus</i>	91%	94.16%
	<i>A. subocularis</i>	95%	92.19%
	<i>A. subocularis</i>	95%	91.16%
	<i>A. macrinii</i>	95%	91.79%
ARNr16S <i>Anolis nebulosus</i> C05, C07 y C08.	<i>A. nebulosus</i>	99%	94.61%
	<i>A. nebulosus</i>	99%	94.58%
	<i>A. nebulosus</i>	99%	92.62%
	<i>A. yoroensis</i>	99%	91.18%
	<i>A. stevepoei</i>	99%	91.26%
ARNr16S <i>Anolis</i> sp C07, C08, H05 y H21.	<i>A. microlepidotus</i>	98%	93.16%
	<i>A. microlepidotus</i>	94%	94.16%
	<i>A. subocularis</i>	99%	92.22%
	<i>A. subocularis</i>	98%	92.19%
	<i>A. subocularis</i>	98%	92.16%
ARNr16S <i>Anolis</i> sp D01.	<i>A. microlepidotus</i>	95%	93.35%
	<i>A. microlepidotus</i>	91%	94.36%
	<i>A. subocularis</i>	95%	92.36%
	<i>A. subocularis</i>	95%	92.35%
	<i>A. macrinii</i>	95%	92.35%
ARNr16S <i>Anolis</i> sp X.	<i>A. microlepidotus</i>	96%	92.61%
	<i>A. microlepidotus</i>	91%	93.67%
	<i>A. subocularis</i>	96%	91.40%
	<i>A. subocularis</i>	96%	91.57%

		<i>A. subocularis</i>	95%	91.23%
ARNr16S	<i>Anolis nebulosus</i> H06, H07, H08,	<i>A. nebulosus</i>	90%	96.88%
	H09, H12, H13, H14, H,15, H16	<i>A. nebulosus</i>	90%	96.59%
	y H17.	<i>A. nebulosus</i>	90%	96.59%
		<i>A. immaculogularis</i>	100%	90.84%
		<i>A. Gadovii</i>	100%	90.84%

De igual forma se obtuvieron 23 secuencias para COI aunque en algunos casos no eran del mismo ejemplar, como se describe en la tabla 3. Mediante el análisis de comparación de las secuencias de COI con banco de datos, se observó que aunque existen algunos reportes de secuencias del marcador, estas no corresponden con la región del gen obtenida en este estudio (Tabla 3). Por lo anterior, la identidad de las secuencias de este estudio se corroboró mediante un análisis de alineamiento con la secuencia del gen completo de *A. carolinensis*. Tras corroborar la identidad de las secuencias de COI, como en el caso del análisis con ARNr16S, se descartaron las secuencias de los ejemplares que no fueron identificados como *A. nebulosus*, por cual se continuó el análisis con 14 secuencias positivamente identificadas para la especie de interés.

Tabla 3. Resultado de cobertura e identidad, de las secuencias de COI obtenidas en este estudio con la base de datos del Genbak NCBI, por el método de Blast.

Marcador	Ejemplar	NCBI	Cobertura	Identidad
COI	<i>Anolis nebulosus</i> J2, J3, C04	<i>A. cybotes</i>	99%	84.27%
	H25, H34 y H35.	<i>A. carolinensis</i>	98%	83.91%
		<i>Holbrooki lacerara</i>	100%	82.90%
		<i>Holbrooki lacerara</i>	100%	82.90%
		<i>Holbrooki lacerara</i>	100%	82.90%
COI	<i>Anolis</i> sp C02, C03,	<i>Chelodina burundi</i>	98%	81.85%
	C06, D01, X, C07, C08	<i>Batrachoseps campi</i>	98%	81.62%
	y C09.	<i>Petrosaurus thalassinus</i>	98%	81.47%

		<i>Chelodina mccordi</i>	98%	81.51%
		<i>Chelodina mccordi</i>	98%	81.51%
COI	Anolis nebulosus H03, H06, H09, H10, H13, H15, H16 y H17.	<i>Hellenolacerta graeca</i>	99%	84.32%
		<i>Holbrookia lacerata</i>	99%	83.62%
		<i>Holbrookia lacerata</i>	99%	83.62%
		<i>Holbrookia lacerata</i>	99%	83.62%
		<i>Holbrookia lacerata</i>	99%	83.62%

9.2 Diversidad y diferenciación genética

En la Tabla 4 se describen los resultados del análisis de diversidad genética de las secuencias de ARNr16S y COI.

Tabla 4. Resultados de las métricas de diversidad genética en individuos de *A. nebulosus* de acuerdo con los marcadores moleculares ARNr16S y COI. N = número de muestras consideradas. H = Número de haplotipos; Hd = diversidad haplotípica; Pi = diversidad nucleotídica; S = Sitios polimórficos.

	Marcador	N	H	Hd	Pi	S
<i>A. nebulosus</i>	ARNr16S	31	9	0.813	0.02781	35
<i>A. nebulosus</i>	COI	14	6	0.813	0.03898	37

En el caso de el ARNr16S se analizaron 351 caracteres de 31 secuencias, incluyendo las obtenidas en este estudio y 17 reportadas previamente para *A. nebulosus* en bases de datos (NCBI), de las cuales 15 pertenecen a tres haplotipos reportados por Senzuk *et al* (2014) para Chamela-Cuixmala. Los resultados del análisis del total de muestras revelaron alta diversidad haplotípica (Hd) y nucleotídica (Pi) y 35 sitios polimórficos (S). En el caso de COI, se analizaron 285 caracteres de las 14 secuencias obtenidas. Nuevamente, se detectaron altos índices de Hd y Pi y con 37 sitios polimórficos (S). Con el software arlequín 3.5, se busco determinar el número de sitios con transiciones, transversiones, sustituciones y deleciones (Tabla 5). Esto se aplicó a las secuencias obtenidas con los dos marcadores analizados en este estudio.

Tabla 5. Datos de los sitios con el numero de sitios que tiene transiciones, transversiones, sustituciones y deleciones para los marcadores COI y ARNr16S de individuos de *A. nebulosus*.

	COI	ARNr16S
Tranciones	53	36
Transversiones	40	33
Sustituciones	88	62
Deleciones	1	8

A continuación, los resultados del análisis de diferenciación mediante distancias genéticas pareadas entre los individuos para el marcador ARNr16S (Tabla 6), mostraron un rango de distancia de 0.0 a 6.1 % entre las secuencias de individuos colectados como *A. nebulosus*; la mayor distancia encontrada (6.1%) fue entre un haplotipo de Chamela, Jalisco y uno publicado en NCBI (No. acceso: MK621404) sin información de localidad publicada a la fecha de elaboración del presente documento. Para el caso de COI (Tabla 7) los ejemplares mostraron un rango de distancia genética que va desde 0.0 a 10.2%; la mayor distancia se encontró entre dos ejemplares de Michoacán y los colectados en la localidad del Tuito, Jalisco.

Tabla 6. Distancias pareadas con el marcador ARNr16S. En color morado se resalta el valor más alto y en rojo el valor más bajo para *A. nebulosus*.

#1	<i>A. carolinensis</i>	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	
#2	<i>A. nebulosus</i> O1	0.115																			
#3	<i>A. nebulosus</i> O2	0.113	0.002																		
#4	<i>A. nebulosus</i> O3	0.118	0.002	0.005																	
#5	<i>A. nebulosus</i> O4	0.101	0.054	0.056	0.056																
#6	<i>A. nebulosus</i> O5	0.097	0.058	0.061	0.061	0.004															
#7	<i>A. nebulosus</i> J01	0.110	0.028	0.030	0.030	0.053	0.057														
#8	<i>A. nebulosus</i> J02	0.110	0.028	0.030	0.030	0.055	0.059	0.000													
#9	<i>A. nebulosus</i> J03	0.110	0.028	0.030	0.030	0.053	0.057	0.000	0.000												
#10	<i>A. nebulosus</i> C05	0.106	0.037	0.040	0.040	0.055	0.055	0.028	0.028	0.028											
#11	<i>A. nebulosus</i> H06	0.111	0.031	0.034	0.034	0.049	0.051	0.028	0.028	0.028	0.028										
#12	<i>A. nebulosus</i> H07	0.099	0.026	0.028	0.028	0.047	0.051	0.023	0.023	0.023	0.023	0.000									
#13	<i>A. nebulosus</i> H08	0.101	0.027	0.029	0.029	0.049	0.051	0.024	0.024	0.024	0.020	0.003	0.002								
#14	<i>A. nebulosus</i> H09	0.099	0.026	0.028	0.028	0.047	0.051	0.023	0.023	0.023	0.023	0.000	0.000	0.002							
#15	<i>A. nebulosus</i> H12	0.107	0.031	0.033	0.033	0.050	0.052	0.024	0.024	0.024	0.024	0.000	0.000	0.002	0.000						
#16	<i>A. nebulosus</i> H13	0.099	0.026	0.028	0.028	0.047	0.051	0.023	0.023	0.023	0.023	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000					
#17	<i>A. nebulosus</i> H14	0.099	0.026	0.028	0.028	0.047	0.051	0.023	0.023	0.023	0.023	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000				
#18	<i>A. nebulosus</i> H15	0.099	0.026	0.028	0.028	0.047	0.051	0.023	0.023	0.023	0.021	0.003	0.002	0.000	0.002	0.002	0.002	0.002			
#19	<i>A. nebulosus</i> H16	0.099	0.026	0.028	0.028	0.047	0.051	0.023	0.023	0.023	0.023	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	
#20	<i>A. nebulosus</i> H17	0.099	0.026	0.028	0.028	0.047	0.051	0.023	0.023	0.023	0.023	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000

Tabla 7. Distancias pareadas con el marcador COI. En color morado se resalta el valor más alto y en rojo el valor más bajo para *A. nebulosus*.

#1	A. carolinensis	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14
#2	A. nebulosus J02	0.163													
#3	A. nebulosus J03	0.163	0.006												
#4	A. nebulosus C04	0.169	0.086	0.093											
#5	A. nebulosus H03	0.168	0.092	0.094	0.070										
#6	A. nebulosus H06	0.163	0.097	0.097	0.071	0.000									
#7	A. nebulosus H09	0.171	0.094	0.097	0.067	0.009	0.011								
#8	A. nebulosus H10	0.171	0.094	0.098	0.069	0.009	0.011	0.000							
#9	A. nebulosus H13	0.168	0.093	0.093	0.070	0.009	0.010	0.005	0.005						
#10	A. nebulosus H15	0.169	0.091	0.094	0.067	0.011	0.015	0.006	0.007	0.008					
#11	A. nebulosus H16	0.168	0.093	0.096	0.069	0.009	0.010	0.002	0.002	0.003	0.005				
#12	A. nebulosus H17	0.166	0.089	0.090	0.061	0.009	0.013	0.002	0.002	0.007	0.008	0.003			
#13	A. nebulosus H25	0.150	0.098	0.096	0.070	0.000	0.000	0.010	0.010	0.008	0.016	0.008	0.013		
#14	A. nebulosus H34	0.171	0.102	0.102	0.069	0.010	0.011	0.004	0.004	0.002	0.009	0.004	0.004	0.013	
#15	A. nebulosus H35	0.157	0.101	0.101	0.073	0.000	0.002	0.012	0.012	0.009	0.016	0.009	0.014	0.000	0.014

9.3 Red de Haplotipos

9.3.1 ARNr16S

En la red elaborada con nueve haplotipos identificados en 31 individuos, se observaron un máximo de 39 mutaciones entre los haplotipos que se separaron en grupos de haplotipos asociados a las localidades de colecta de los ejemplares de *A. nebulosus* (Fig. 5). En la red, se observa la formación de polígonos entre los nueve haplotipos, lo que nos indica la falta de datos y muestra de una alta diversidad para esta especie, en un marcador que se considera especie específico en estudios taxonómico moleculares. Los haplotipos H1, H2 y H3 pertenecen a la reserva de la biosfera, Chamela-Cuixmala, Jalisco; se observa una distancia de 10/11 pasos mutacionales con los ejemplares del Tuito, Jalisco (H6).

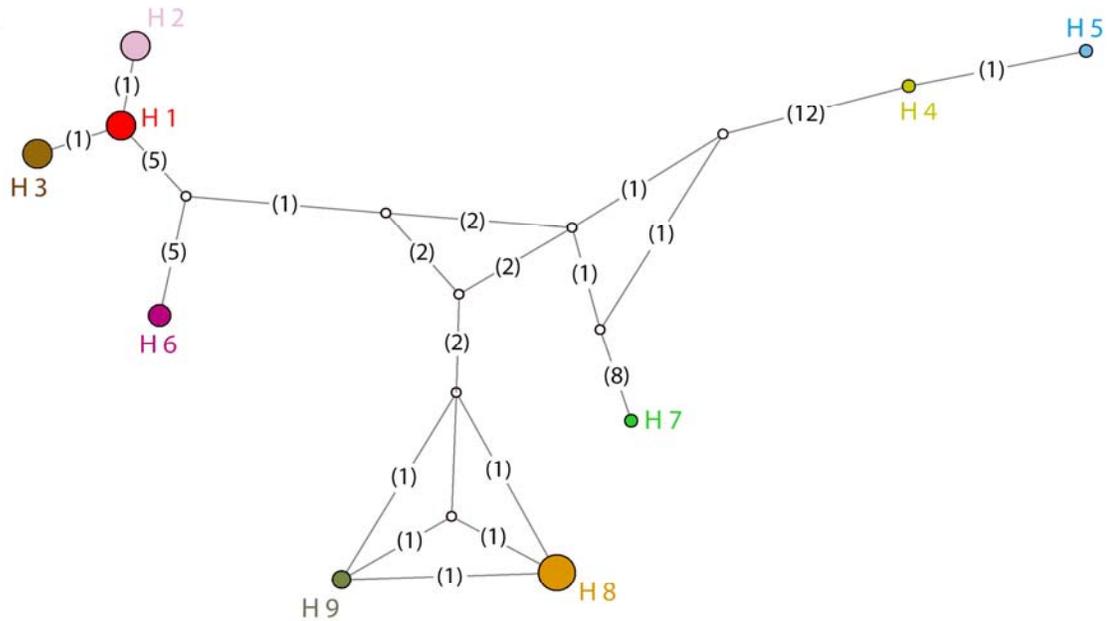


Figura 5. Red de haplotipos Median-joining, donde se muestra la relación entre los nueve haplotipos de 31 individuos de *A. nebulosus* basado en ARNr16S. El tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia del haplotipo; la longitud de las líneas no es proporcional al número de mutaciones; los números entre las líneas representan a las mutaciones; y los círculos blancos representan ancestros hipotéticos o no muestreados.

En la figura también se observa a los ejemplares provenientes de la Tzaráracua, Michoacán, que están representados por los haplotipos H8 y H9; entre ellos se encontró un solo paso mutacional que los separa. El haplotipo H8 se detectó en ocho ejemplares, y H9 en dos. Entre estos haplotipos H8 y H9 y el haplotipo H7 del ejemplar colectado en Huetamo hay 14 pasos mutacionales. Finalmente, los haplotipos H4 y H5, corresponden a las dos secuencias de NCBI de las que se desconoce el origen (*A. nebulosus* 04 y 05).

9.3.2 COI

En la red de haplotipos elaborada con seis haplotipos y 14 secuencias de *A. nebulosus* se observaron 39 mutaciones entre los haplotipos (Fig. 6).

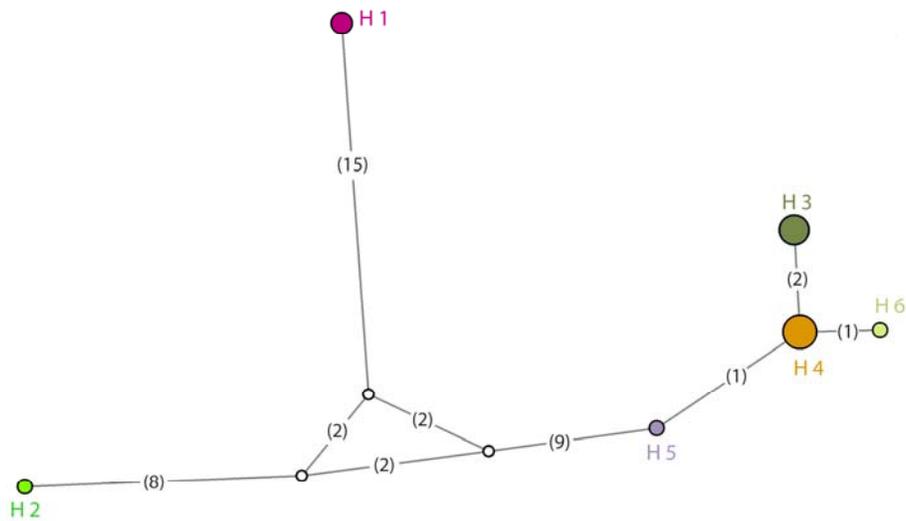


Figura 6. Red de haplotipos Median-joining, donde se muestra la relación entre los seis haplotipos de 14 individuos del género *A. nebulosus* basado en COI. El tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia del haplotipo; la longitud de las líneas o es proporcional al número de mutaciones; los números entre las líneas representan a las mutaciones; y los círculos blancos representan ancestros hipotéticos o no muestreados.

A pesar de no contar con todas las secuencias de COI exactamente de los mismos individuos analizados ARNr16S, se encontró un resultado similar con ambos marcadores. Además de la formación de un polígono, el haplotipo H2 identificado en un solo ejemplar proveniente de la localidad de Huetamo Michoacán, presentó 25 pasos mutacionales con el haplotipo H1 identificado en dos ejemplares del Tuito, Jalisco. Los haplotipos H5, H4, H3 corresponden a ejemplares colectados en la Tzaráracua, Michoacán, y el H6 proviene de secuencias del banco de datos de origen desconocido. Entre H2 y H5 se observan 19 pasos mutacionales, y entre H2 y H3 se observan 24 pasos mutacionales. Entre la mayoría de los haplotipos de ejemplares de Michoacán (H3, H4, H5 y H6), excepto H2, la distancia no es tan grande pero hay hasta 26 pasos mutacionales respecto a los haplotipos de los ejemplares de Jalisco, lo que indica alta diversidad genética para la especie.

9. 4 Análisis de relaciones genealógicas

Para la elaboración de los árboles genealógicos de ML e IB se determinó que el modelo de evolución molecular adecuado para ambos marcadores es “general time reversible” con sitios invariables (GTR+I). En los análisis de ML con las secuencias de ARNr16S se utilizaron 14 secuencias obtenidas en este estudio y se incluyeron cinco reportadas para *A. nebulosus* (de las provenientes de Chamela-Cuixmala). Como grupo externo se utilizó una secuencia de *Anolis carolinensis* reportada en NCBI (No. acceso: EU747728). En la topología del árbol genealógico construido mediante el método ML (Fig.7), *A. nebulosus* es monofilético, donde se observa como grupo ancestral a las dos secuencias obtenidas en NCBI (*A. nebulosus* 04 y 05) de origen desconocido. Luego se observa la formación de dos clados (C1) y tres subclados (Sc1). En un clado (C11), se agruparon los ejemplares pertenecientes al estado de Jalisco, que adicionalmente se agruparon dentro de los subclados Sc11 y Sc12 (PB = 81) en una politomia suave que indica una relación cercana entre los haplotipos. En el Sc11, se observan las tres secuencias de individuos del Tuito con una PB = 100, y en el Sc12 se incluyeron las secuencias de individuos de la reserva de la biósfera Chamela-Cuixmala, con una PB = 99.

En el C12 se incluyeron todas las secuencias obtenidas en este estudio para el estado de Michoacán con una baja PB, donde se observa al ejemplar proveniente de Huetamo, Michoacán (*A. nebulosus* C05) en una divergencia temprana al resto de individuos provenientes de la

Tzararacua. La topología de Cl2 presentó una politomía suave con dos ejemplares basales y un subclado (Scl3) donde se agruparon ocho ejemplares con una PB = 61.

En el análisis genealógico bajo IB (Fig. 8) con ARNr16S, se observa una topología prácticamente similar, cuya diferencia más notoria fue la conformación de un clado bien soportado (PP de 0.98 y 1) que incluyó a las secuencias *A. nebulosus* 04 y 05 obtenidas en NCBI, de origen desconocido. Como se observa en la figura 8, los soportes de los nodos de los clados y subclados fue mayor que el del análisis de ML (Fig. 7), sin embargo, se mantiene la politomía del Cl2.

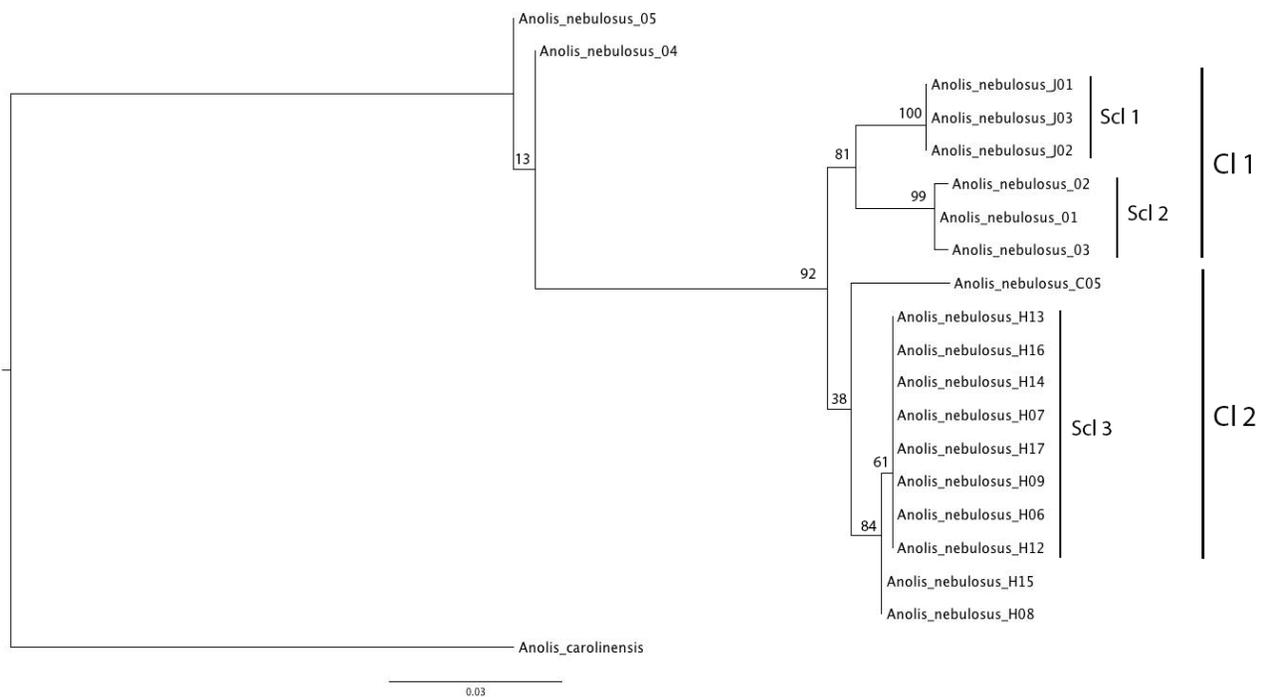


Figura 7. Árbol genealógico de secuencias de ARNr16S (533 pb) de *Anolis nebulosus*, construido bajo ML. Los números sobre los nodos corresponden a PB. Se utilizó *Anolis carolinensis* como grupo externo.

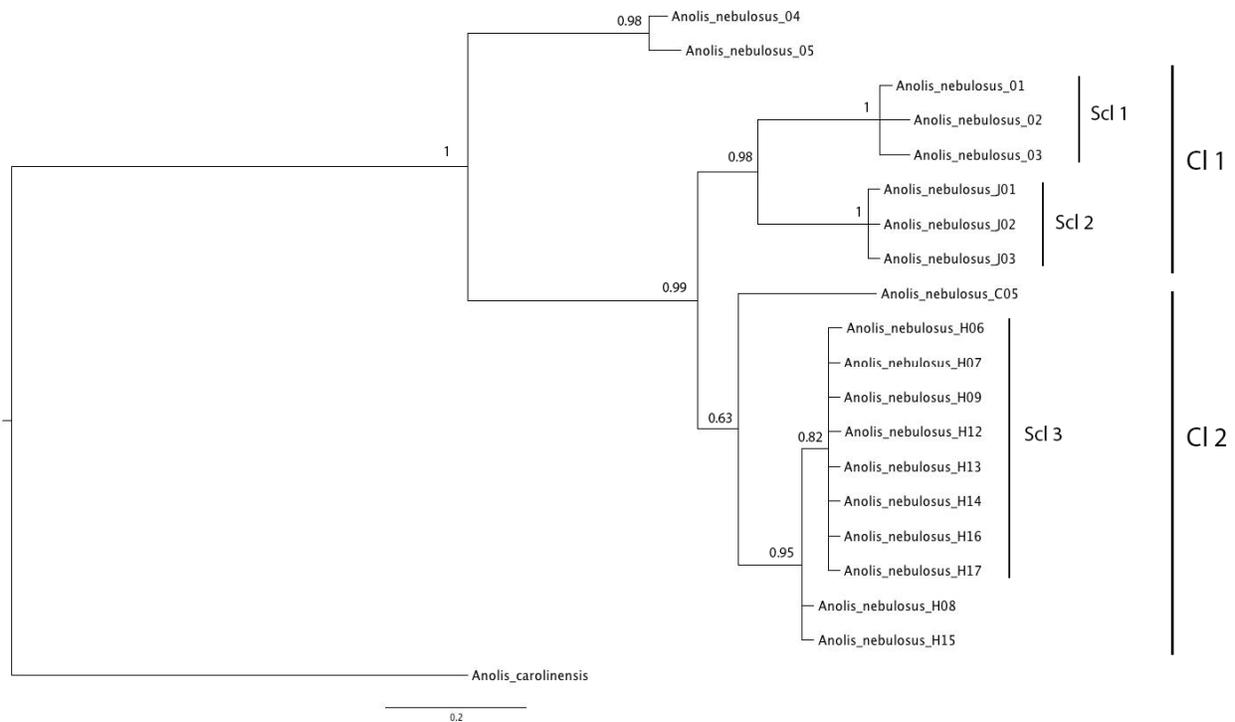


Figura 8. Árbol genealógico de secuencias de ARNr16S (533 pb) de *Anolis nebulosus* construido bajo IB. Los números sobre los nodos corresponden a PP. Se utilizó *Anolis carolinensis* como grupo externo.

Para el análisis genealógico con el marcador COI, se utilizaron 14 secuencias de *A. nebulosus*. En la topología del árbol ML (Fig. 9), se corroboró la monofilia de la especie y similar a lo observado con el marcador ARNr16S, los ejemplares se agruparon en dos clados. Sin embargo, aunque con bajo soporte en el nodo (PB=33), en el CI1 se agruparon la secuencia del ejemplar C04 de Huetamo, Michoacán y en un subclado (Scl1) dos secuencias de los ejemplares J02 y J03 del Tuito, Jalisco. En el CI2 con buen soporte en el nodo (PB = 80), se integraron las secuencias de los ejemplares de Michoacán destacando la secuencia H5 de la Tzararacua que se separó del resto, las cuales fueron incluidas en tres subclados. Casi todas las secuencias obtenidas se identificaron como provenientes de Tzararácua, excepto *A. nebulosus* H25, H34 y H35, de las cuales se desconoce la localidad de Michoacán donde fueron colectados los ejemplares.

En la topología del árbol bajo IB (Fig. 10), también se corroboró la monofilia de la especie, así como el agrupamiento de las secuencias en dos clados y tres subclados. Sin embargo, en este análisis, con alto soporte en el nodo (PP=0.99) el CI1 solo incluyó a las secuencias de los ejemplares J02 y J03 del Tuito, Jalisco. Por otro lado, con buen soporte en el nodo (PP=0.70), en

el CL2 la secuencia del ejemplar C04 de Huetamo, Michoacán, se separó del resto de las secuencias provenientes de la Tzaráracua y otras localidades (desconocidas) de Michoacán, que a su vez fueron separadas en tres subclados en una politomía suave.

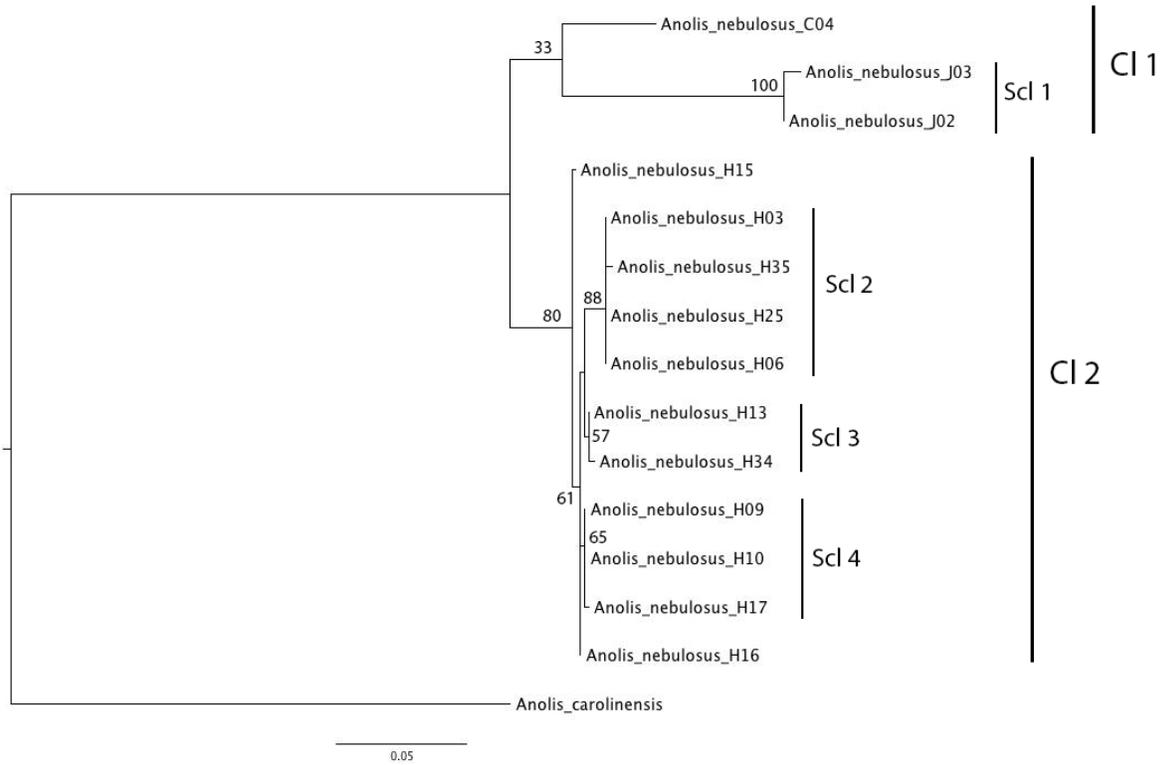


Figura 9. Árbol genealógico de secuencias COI (629 pb) de *Anolis nebulosus* construido bajo ML. Los números sobre los nodos corresponden a PB. Se utilizó *Anolis carolinensis* como grupo externo.

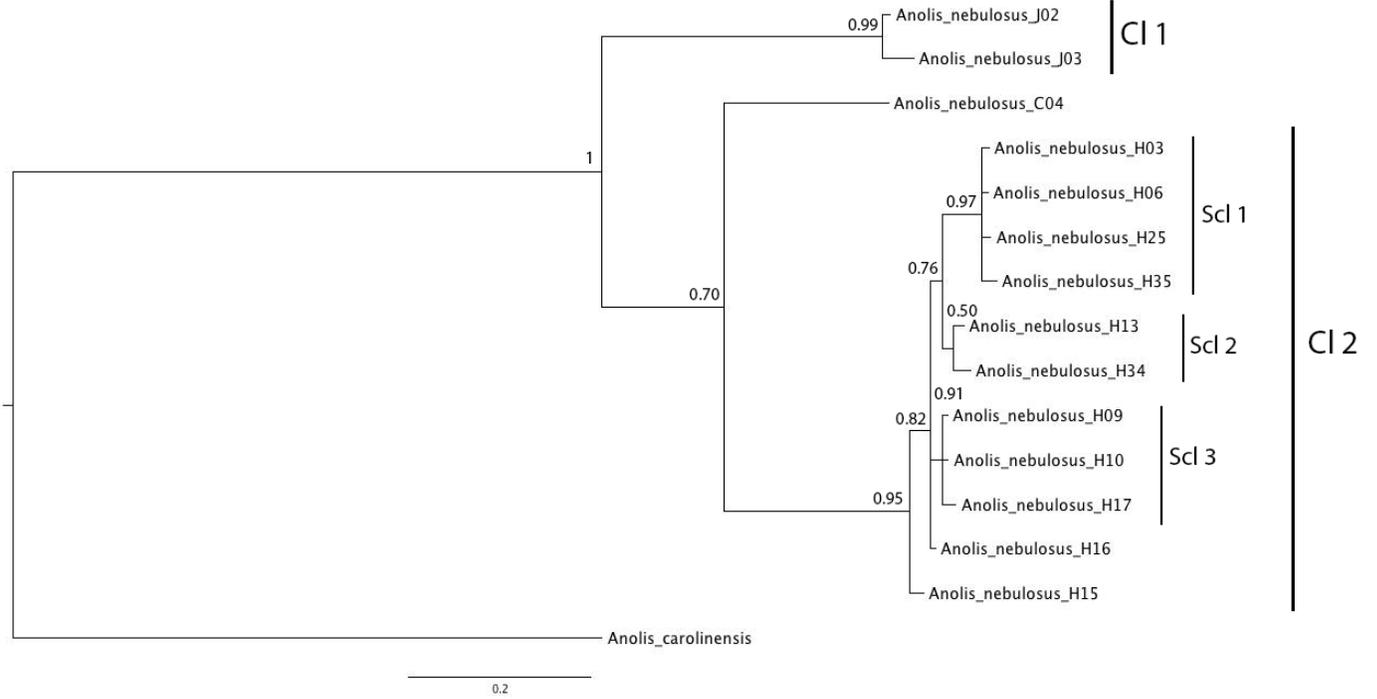


Figura 10. Árbol genealógico de secuencias COI (629 pb) de *Anolis nebulosus* construido bajo IB. Los números sobre los nodos corresponden a la PP. Se utilizó *Anolis carolinensis* como grupo externo.

10. DISCUSIÓN

10.1 Métricas de diversidad

Se identificaron nueve haplotipos o líneas maternas dentro de la población de 31 individuos analizados con RNAr16S y seis haplotipos en una población de 16 individuos con COI. Previamente, mediante el análisis de 28 individuos de Chamela-Cuxamala a través del marcador ND2, se detectaron 13 haplotipos, alta diversidad haplotípica (0.878) y baja diversidad nucleotídica (0.0034) (Senczuk et al., 2017). El análisis de diversidad genética de *A. nebulosus* con los marcadores ARNr165S y COI mostró alta diversidad haplotípica y nucleotídica, lo cual de acuerdo a Grant y Bowen (1998) sugiere una población grande y estable con una historia antigua, o bien que representa un contacto secundario entre linajes alopátricos. Sin embargo, dado que se trata de reptiles con poblaciones separadas por distancia geográfica y barreras naturales, la explicación más parsimoniosa es que aunque fragmentada, la especie presenta una población grande y estable con una historia antigua. Se sabe que *A. nebulosus* se adapta bien a su medio, incluso si este está perturbado (IUCN 2007) y tiene un relativo éxito reproductivo a comparación de otras especies de fauna. Adicionalmente, destaca el nivel de polimorfismo encontrado en la secuencia del ARNr16S, ya que se trata de un marcador que comúnmente presenta bajo polimorfismo y por ello es utilizado principalmente en análisis de enfoque taxonómico para la identificación de especies (Arif y Khan. 2009). Sin embargo, los electroferogramas de la secuencia de ambas cadenas en cada muestra analizada, mostraron picos de detección bien definidos que respaldan la presencia de los sitios polimórficos identificados. Respecto al marcador COI, como se esperaba, los niveles de polimorfismo fueron mayores que los del ARNr16S. Los genes codificares como COI, presentan una variabilidad aproximadamente tres veces superior que la de los genes ribosomales (Carranza, 2000).

10.2 Distancias pareadas

En primera instancia, la distancia genética entre una secuencia de *A. carolinensis* y las de *A. nebulosus* presentó un rango de 9.9-11.8% con el marcador de ARNr16S y de 17.1-15% con COI, indicando una referencia importante sobre los niveles de diferenciación entre especies que pertenecen a diferentes linajes dentro del género. Un estudio previo sobre la revisión filogenética de *Anolis*, mostró que ambas especies se agrupan dentro del mismo clado con las especies

mexicanas y aquellas de distribución en Centroamérica, Sudamérica y el Caribe, pero *A. carolinensis* pertenece a un linaje con divergencia temprana respecto al linaje de *A. nebulosus* (Soria-Bárcena, 2017). De acuerdo a Carranza (2000), la divergencia genética entre especies del género *Gallotia* de los reptiles lacértidos es de 4% con el marcador de ARNr16S y 15% con el de COI. En este estudio, el porcentaje de divergencia del ARNr16S entre especies del mismo género es tres veces mayor, por lo que sería lógico que este nivel de divergencia incrementara a nivel intraespecífico.

Los resultados de diferenciación genética entre las secuencias de ARNr16S y COI de *A. nebulosus*, sugirieron la presencia de diferentes linajes asociados a la distribución geográfica de la especie. Los individuos provenientes de la misma localidad presentaron bajos niveles de distancia genética entre ellos, por ejemplo la distancia entre los individuos de la Tzaráracua, Michoacán con el marcador de ARNr16S fue de 0.0-0.3% y con COI fue de 0.09-1.1%, mientras que entre los individuos de Jalisco y los de Michoacán, con el marcador de ARNr16S fue de 2.3-2.8% y con COI de 8.9-10.2%. Por otro lado, destacó la alta distancia (6.1%) con el marcador de ARNr16S, observada entre la secuencia de *A. nebulosus* 05 publicada en base de datos (NCBI) sin referencia a su origen, y un individuo de la reserva Chamela-Cuixmala. Este resultado sugiere que la secuencia es de un individuo que proviene de una población más alejada geográficamente que las de Michoacán y Jalisco, por ejemplo hacia el sur (Oaxaca), ya que presenta una menor distancia con el ejemplar de Huetamo, Michoacán. El análisis de otras poblaciones en el rango de distribución de la especie podría corroborar esta hipótesis.

Por otro lado, es importante destacar que la distancia genética (2.8%) entre las secuencias de ARNr16S de los tres ejemplares provenientes del Tuito, Jalisco, fue similar a la detectada entre estos individuos y la secuencia de *A. nebulosus* C05 de Huetamo Michoacán (2.6%), a pesar de la distancia geográfica entre estas poblaciones. Por otro lado, también destacó la alta distancia (4%) entre *A. nebulosus* C05 de Huetamo Michoacán y las muestras de la Tzaráracua, Michoacán, ya que las localidades de estas poblaciones son relativamente cercanas. Para confirmar estos niveles de distancia genética se requiere el análisis de un mayor número de individuos de ambas localidades y de localidades intermedias.

Finalmente, el análisis del marcador COI de tres individuos de Michoacán cuya localidad de colecta es desconocida, mostró una distancia genética nula o cercana (0-1.6%) con los individuos de la Tzaráracua, por lo que se puede asumir que provienen de esta localidad.

10.3 Red de Haplotipos

La red de haplotipos permitió la identificación de las relaciones de los haplotipos (nueve para ARNr16S y seis para COI) y sus frecuencias. En la red construida con ARNr16S la formación de dos haplogrupos bien definidos asociados a las localidades de colecta, uno en la Tzaráracua y otro en Chamela-Cuixmala, corroboró lo observado en el análisis diversidad y diferenciación genética. Adicionalmente, se identificaron tres linajes, uno asociado a Tuito, Jalisco, otro en Huetamo Michoacán, y el tercero con muestras de origen desconocido que sugirió su procedencia de individuos de poblaciones del alguno de los extremos de la distribución geográfica de la especie. El número de pasos mutacionales entre estos haplogrupos y linajes detectados, sugiere la ausencia de haplotipos de las mismas poblaciones y de poblaciones intermedias aun no muestreadas. La red construida con secuencias de COI corroboró lo observado con la de ARNr16S, sin embargo, debido a que se cuenta con menor número de secuencias solo se pudo identificar un haplogrupo en la Tzaráracua, Michoacán, donde se incluyeron haplotipos de esta localidad y un haplotipo de Michoacán sin datos de georeferenciación, por lo cual se infiere que proviene de esta localidad. Adicionalmente, un linaje se asoció a Tuito, Jalisco y otro a Huetamo, Michoacán.

Los resultados de este análisis se respaldan con lo reportado por Senczuc et al. (2017) en la red de 13 haplotipos del marcador ND2, de los individuos de Chamela-Cuxamala, donde se detectó un haplogrupo con un haplotipo dominante y haplotipos periféricos separados por 1-3 pasos mutacionales, con la forma de estrella que indica expansión de un número pequeño de fundadores (Grant y Bowen, 1998). Es decir, que las poblaciones de *A. nebulosus* podrían presentar alta diversidad genética debido a procesos de diversificación o expansiones dentro de cada localidad de su rango de distribución geográfica.

10.4 Relaciones genealógicas

Las relaciones genealógicas a través de ambos marcadores ARNr16S y COI y mediante IB y ML, permitieron establecer que *A. nebulosus* es monofilética y en la base de los árboles ubicó como ancestrales a los haplotipos de secuencias reportadas en NCBI, sin datos sobre su origen. Por lo tanto, considerando el origen neotropical de la especie y que las poblaciones en el sur de México son las más ancestrales para la especie, este resultado sugiere que los haplotipos de NCBI pueden provenir de individuos de su rango de distribución en el extremo sur, es decir entre Guerrero y

Oaxaca. Para corroborar esta hipótesis, se requiere de análisis de poblaciones de Guerrero y Oaxaca. Por otro lado, la topología de los árboles mostró a los ejemplares de Michoacán como ancestrales a los de Jalisco, y dentro de los de Michoacán a los de Huetamo como ancestrales a los de la Tzaráracua corroborando que la especie expandió su rango de distribución desde el sur hacia el norte de México. La formación de los Subclados tiene un patrón de distribución y de integración consistente con los haplogrupos y linajes identificados en las redes de haplotipos, lo que robustece ambos análisis al mantener una coherencia en la comparación de los datos.

Sin embargo, los árboles genealógicos de ML e IB con el gen COI, mostraron una pequeña diferencia entre sus topologías. En el árbol ML, la secuencia denominada *A. nebulosus* C04 de un individuo de Huetamo, aparece como ancestral a las secuencias de Jalisco en tanto que en el árbol de IB, *A. nebulosus* C04 es ancestral a las secuencias de Michoacán. Estos resultados, se deben a la falta de información (haplotipos dentro y entre poblaciones), lo que es nuevamente un indicador de la alta diversidad genética. Sin embargo, cabe destacar que la diferencia genética de 8.6-9.3% de *A. nebulosus* C04 con los haplotipos de Jalisco y de 6.1-7.3% con los de Michoacán, es más consistente con la topología del árbol de IB. Adicionalmente, en la red de haplotipos donde *A. nebulosus* C04 se indica como H2, se percibe que este ejemplar se encuentra a 25 pasos mutacionales de Jalisco y a 20-22 pasos mutacionales de los haplotipos de la Tzaráracua, lo que nuevamente sería consistente con lo observado en el árbol de IB.

Finalmente, los resultados de diversidad y diferenciación genética, las redes de haplotipos y las relaciones genealógicas indican que la especie presenta un rango de distribución en forma de subpoblaciones que podrían estar aisladas y han sufrido expansiones *in situ*. Sin embargo, se requiere el análisis de un mayor número de poblaciones con mayor número de marcadores moleculares de ADNmt, en el rango total de distribución de la especie para corroborar los niveles de diversidad y estructura genética.

11. Conclusiones

- ❖ Se comprobó la hipótesis sobre la alta diversidad genética en la especie *A. nebulosus*. El análisis de diversidad genética con los marcadores ARNr165S y COI mostró alta diversidad haplotípica y nucleotídica, lo cual de acuerdo a Grant y Bowen (1998) sugiere una población grande y estable con una historia antigua.
- ❖ Los porcentajes de diferenciación genética están por encima de lo esperado para especies estrechamente relacionadas según lo propuesto por Gunter et al (2014).
- ❖ Los resultados de diversidad, diferenciación genética, redes de haplotipos y árboles genealógicos entre las secuencias de ARNr16S y COI de *A. nebulosus*, sugirieron la presencia de diferentes linajes asociados a la distribución geográfica de la especie en subpoblaciones que podrían estar aisladas y han sufrido expansiones *in situ*.
- ❖ En las redes de haplotipos y árboles genealógicos destaca la falta de información o de haplotipos ancestrales, que plantea nuevas preguntas de investigación respecto a la estructura genética de la especie, historia demográfica y tiempos de diversificación.

12. Bibliografía

- Arif, I. A., & Khan, H. A. (2009). Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal biodiversity and conservation*, 32(1), 9-17.
- Bandelt, H. J., Forster, P. y Roehl, A. 1999. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16 (1): 37-48.
- Brandley, M.C., de Queiroz, K., 2004. Phylogeny, ecomorphological evolution, and historical biogeography of the *Anolis cristatellus* group. *Herpetol. Monogr.* 18, 90–126.
- Campbell-Staton, S. C., Cheviron, Z. A., Rochette, N., Catchen, J., Losos, J. B., & Edwards, S. V. (2017). Winter storms drive rapid phenotypic, regulatory, and genomic shifts in the green anole lizard. *Science*, 357(6350), 495-498.
- Castañeda, M. R. y de Queiroz, K. (2011). Phylogenetic relationships of the Dactyloa clade of *Anolis* lizards based on nuclear and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular phylogenetics and evolution*, 61(3), 784-800.
- Conant R. y Collins J. 1998. 3ra Edición. Reptiles and Amphibians Eastern/Central North America. Peterson field guides. 615 pp.
- Carranza, S. 2001. Cap. XI Los métodos moleculares en el estudio de la sistemática y filogenia de los reptiles y anfibios ibéricos. En; Atlas y Libro rojo de los Anfibios y Reptiles de España, pp. 561-564.
- de Queiroz, K., Reeder, T., 2008. Squamata Lizards. In: Crother, B.I. (Ed.), Scientific and Standard English Names of Amphibians and Reptiles of North America North of Mexico, with Comments Regarding Confidence in Our Understanding. Society for the Study of Amphibians and Reptiles. *Herp. Circular*, vol. 37, pp. 24– 45.
- Etheridge, R. (1959). *The relationships of the anoles (Reptilia: Sauria: Iguanidae): an interpretation based on skeletal morphology*. University of Michigan (Doctoral dissertation, Ph. D. Thesis).
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1, 47–50.
- Fitz-Simmons, N. 1997. Male marine turtles: Gene flow, philopatry and Mating systems of the green turtle *Chelonia mydas*. Tesis doctoral, Universidad de Queensland, Australia.

- Fitch, H. S., & Hillis, D. M. (1984). The *Anolis* dewlap: interspecific variability and morphological associations with habitat. *Copeia*, 315-323.
- Flores-Villela, O. & Hammerson, G.A. 2007. *Anolis nebulosus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2007: e.T64207A12752241. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2007.RLTS.T64207A12752241.en>. Revisado. Agosto 2017.
- Grant, W. S., and B. W. Brown. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *The American Genetic Association* 89:415-426.
- Gunther K., Gómez Trejo R, BO P. Petersen C, Mendez de la Cruz F. 2014. A revision of the Mexican *Anolis* (Reptilia, Squamata, Dactyloidae) from the Pacific versant west of the Isthmus de Tehuantepec in the states of Oaxaca, Guerrero, and Puebla, with the description of six new species. ISSN 1175-5334 (Online Edition) Published by Magnolia Press, Auckland, New Zealand.
- Guyer, C., y Savage, J.M. 1986. Cladistic relationships among anoles (Sauria: Iguanidae). *Systematic Zoology*, 35, 509–531
- Gray L., S. Poe., Montes de Oca Nieto. A. 2012. Photo Guide To Mexican Anoles. <http://www.anoleannals.org/2012/11/07/photo-guide-to-mexican-anoles>
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hertz, P. E., Arce-Hernandez, A., Ramirez-Vazquez, J., Tirado-Rivera, W., & Vazquez-Vives, L. (1979). Geographical variation of heat sensitivity and water loss rates in the tropical lizard, *Anolis gundlachi*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 62(4), 947-953.
- Hertz, P. E., y Huey, R. B. 1981. Compensation for altitudinal changes in the thermal environment by some *Anolis* lizards on Hispaniola. *Ecology*, 62(3), 515-521.
- Jackman, T. R., Larson, A., De Queiroz, K., & Losos, J. B. (1999). Phylogenetic relationships and tempo of early diversification in *Anolis* lizards. *Systematic Biology*, 48(2), 254-285.
- Jenssen, T. A. (1970). The ethoecology of *Anolis nebulosus* (Sauria, Iguanidae). *Journal of Herpetology*, 1-38.

- Jenssen, T. A. (1971). Display analysis of *Anolis nebulosus* (Sauria, Iguanidae). *Copeia*, 197-209.
- Librado, P., and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 1451-1452.
- Losos, J.B. 2009. Lizards in an Evolutionary Tree: Ecology and Adaptive Radiation of Anoles. Berkeley: University of California Press. PP 507.
- Losos J. B. y C. J. Schneider. 2009. *Anolis* lizards. *Current Biology* Vol 19 No 8.R316.
- Losos J. B., Jackman T. R., Larson A., de Queiroz K. y Rodríguez-Schettino L. 1998. Contingency and determinism in replicated adaptive radiations of island lizards. *Science* 279:2115–2118. doi: 10.1126/science.279.5359.2115.
- Losos J. B. y C. J. Schneider. 2009. *Anolis* lizards. *Current Biology* Vol 19 No 8.R316.
- Nicholson, K. E. (2002). Phylogenetic analysis and a test of the current infrageneric classification of *Norops* (beta *Anolis*). *Herpetological Monographs*, 16(1), 93-120.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, y Kumar S. 2013 MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.
- The Reptile Database. <http://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Anolis&species=nebulosus> revisado: Agosto 2017.
- Poe S. 2013. 1986 Redux: New genera of anoles (Squamata: Dactyloidae) are unwarranted. *Zootaxa* 3626:295–299. Doi: 10.11646/zootaxa.3626.2.7.
- Rand, A.S. 1969. Competitive exclusion among anoles (Sauria: Iguanidae) on small island in the west Indies. *Breviora* 319:I-16.
- Ramírez-Bautista, A., & Vitt, L. J. (1997). Reproduction in the lizard *Anolis nebulosus* (Polychrotidae) from the Pacific coast of Mexico. *Herpetologica*, 423-431.
- Ramírez-Bautista, A., & Benabib, M. (2001). Perch height of the arboreal lizard *Anolis nebulosus* (Sauria: Polychrotidae) from a tropical dry forest of Mexico: effect of the reproductive season. *Copeia*, 2001(1), 187-193.
- Roll, U., Feldman, A., Novosolov, M., Allison, A., Bauer, A. M., Bernard, R., ... & Colli, G. R. (2017). The global distribution of tetrapods reveals a need for targeted reptile conservation. *Nature Ecology & Evolution*, 1(11), 1677.

- Ronquist, F. R., and J. P. H. Huelsenbeck. 2003. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 74: 5463-5467.
- Schoener T.W. y A. Scoener. 1983a. Distribution of vertebrates on some very small islands. I. occurrence sequences of individual species. *Journal of Animal Ecology* 52:209-235.
- Schoener T.W. y A. Scoener. 1983b. Distribution of vertebrates on some very small islands. II. Patterns in species number. *Journal of Animal Ecology* 52:237-262
- Soria-Bárcena J. A. 2017. Tesis de Licenciatura Análisis filogenético molecular de especies del género *Anolis* en México. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo
- Stamatakis, A., Ludwig, T., & Meier, H. (2004). RAxML-III: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 21(4), 456-463.
- Williams E.E. 1972. The origin of faunas. Evolution of lizard congeners in a complex island fauna: A trial analysis. *Evolutionary Biology* 6:47–89.
- Williams, E. E. 1977. Anoles out of place: Introduced anoles. *The Third Anolis Newsletter*. Museum of Comparative Zoology, Harvard Univ, Cambridge, 110-118.
- Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner y W. Miller. 2000. A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. *Journal of Computational Biology*. 7:203-14.