



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCENCIAS

**VARIABILIDAD GENÉTICA Y ENDOGAMIA
DEL PEZ CACHORRITO DEL SONOYTA
Cyprinodon eremus Miller y Fuiman, 1987, EN
REFUGIOS Y POBLACIONES SILVESTRES DEL
ESTADO DE SONORA, MÉXICO.**

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

presenta:

ROMÁN RODRÍGUEZ RAMÍREZ

Hermosillo, Sonora, México

9 de enero de 2020

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Maestro en Biociencias** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca de Ciencias Biológicas y de la Salud para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

Román Rodríguez Ramírez

Autor

Dra. Nohemí Gámez Meza

Coordinadora del Programa de Maestría en Biociencias

VARIABILIDAD GENÉTICA Y ENDOGAMIA DEL PEZ CACHORRITO DEL
SONOYTA *Cyprinodon eremus* Miller y Fuiman, 1987, EN REFUGIOS Y POBLACIONES
SILVESTRES DEL ESTADO DE SONORA, MÉXICO.

T E S I S

que para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

presenta:

Román Rodríguez Ramírez

Hermosillo, Sonora, México.

9 de enero del 2020

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada “Variabilidad genética y endogamia del pez cachorrito del Sonoyta *Cyprinodon eremus* Miller y Fuiman, 1987, en refugios y poblaciones silvestres del estado de Sonora, México”, presentada por Román Rodríguez Ramírez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias.



Dr. Alejandro Varela Romero
Director



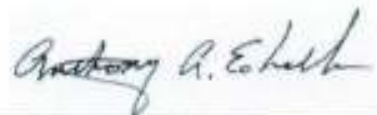
M.C. Nohelia G. Pacheco Hoyos
Secretario



Dr. José Manuel Grijalva Chon
Sinodal interno



Dr. Marco Antonio López Torres
Sinodal interno



Dr. Anthony A. Echelle
Sinodal externo

DEDICATORIA

A mis padres Raúl y Rosario por sus consejos de la vida, a mis hermanos Ramsés, Roberto, Raúl y sus familias por su apoyo incondicional.

A mis compañeros y amigos del posgrado, en especial Eduardo Sánchez (Caborqueño / Codornicero), Luis Vázquez (Banquero), Oscar López (Wero), Carlos Galaz (Gatero), Alapisco (sobrino), Julio Gastélum (la bocina es mía), Alexandre Gutiérrez (Templario), Felipe Reynaga (Conde de las carnitas), Paul Fernando (Suertudo) y futuras generaciones.....

A la manada: Héctor Arturo, Sahid Romero, Daniel Olivares, José Carlos, Antonio Coronado, David Maytorena, José Víctor, Diego Maytorena, Hannsel y Aldo Ramírez.

A mis mejores amigos biólogos José Said e Iván Absalón, por sus apoyos y consejos; a Edwin Juárez por ser un buen amigo y consejero; Ángel Luna y Raúl Gómez amigos de frikies.

Por último, quiero dedicar a mi novia Martha Verónica Maldonado Bracamonte por su gran apoyo incondicional, amor y afecto, por siempre estar conmigo en malos y buenos momentos de mi vida, por ser una persona especial y fuente de inspiración para seguir superándome a mí mismo cada día.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Programa de Biociencias del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora. Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por proporcionar la beca de Maestría. A mi director de tesis el Dr. Alejandro Varela Romero por dirigir y apoyar incondicionalmente mi desarrollo profesional y amigo cercano y, agradezco una vez más por su paciencia y comprensión.

A mi comité de tesis M.C. Nohelia G. Pacheco Hoyos, Dr. José Manuel Grijalva Chon, Dr. Marco Antonio López y Dr. Anthony Echelle, por brindarme lo necesario para el desarrollo de este trabajo.

A SAGARPA, CEDO, COBACH plantel Sonoyta y Centro Ecológico de Sonora, por las muestras y permisos otorgados.

Al UA-CONACYT Binational Consortium for the Regional Scientific Development and Innovation (también conocido como Consortium for Arizona-Mexico Arid Environments – CAZMEX), que financió el proyecto Conservation status and genetic management of imperiled species along the US-Mexico border.

Agradezco a la School of Natural Resources and the Environment de la Universidad de Arizona, en especial a la Dra. Melanie Culver el apoyo en el genotipo de muestras, a la Dra. Karla Vargas por el curso Bioinformatic for Microsatellite, además por el apoyo en la preparación de placas de genotipo y al Dr. Michael Bogan por el financiamiento del proyecto.

A la Biól. Martha Verónica Maldonado Bracamonte y M.C. Paul Fernando Balderrama Aguilar, por su gran apoyo y tiempo, además al laboratorio de Ecología Molecular del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora.

RESUMEN

El pez cachorrillo del Sonoyta (*Cyprinodon eremus*) es una especie endémica de la cuenca del río Sonoyta (Sonora) y del manantial Quitobaquito (Arizona). Su distribución actual está restringida por impactos antropogénicos. Como estrategia de conservación, se construyeron cuatro refugios, sin embargo, su establecimiento fue sin considerar la variación genética y estructura de las poblaciones de origen. La hipótesis plantea que los cambios en los indicadores de variabilidad genética y endogamia en los refugios son causados por el aislamiento continuo y su diferenciación genética debido a cuellos de botella y efecto fundador. El objetivo fue evaluar la variabilidad genética y nivel de endogamia en tres refugios y la población silvestre en Sonora, por medio de diez loci microsatelitales y determinar parámetros básicos de diversidad genética, equilibrio genético, índices de fijación (R_{st} y F_{is}) y presencia de cuellos de botella. Los resultados indican que hay una alta variabilidad genética en todas las poblaciones teniendo a la población Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos (CEDO) con la mayor variabilidad genética. Todas las poblaciones en cautiverio y población silvestre actualmente presentan un desequilibrio genético causado por el déficit de heterocigotos. Los índices de fijación indican poca diferenciación genética ($R_{st} = 0.007$) y un alto coeficiente de endogamia ($F_{is} = 0.26$), por lo que se infiere que hay divergencia entre todas las poblaciones por el aislamiento que provee. El análisis de cuello de botella solo se detectó en el refugio artificial de Centro Ecológico de Sonora (CES). Como conclusión la población del CEDO es potencialmente útil para incrementar la variabilidad genética del resto de los refugios y, además los indicadores de variabilidad genética concuerdan con los de la población silvestre, por lo que pudiera funcionar como fuente para la reintroducción en el Río Sonoyta.

ABSTRACT

The Sonoyta pupfish (*Cyprinodon eremus*) is an endemic species of the Sonoyta River basin (Sonora) and the Quitobaquito spring (Arizona). Its current distribution is restricted by anthropogenic impacts. As a conservation strategy, four refuges were constructed, however, this was done without considering the genetic variation and structure of the populations of origin. The hypothesis states that changes in genetic variability and inbreeding in the refuges are caused by continuous isolation and genetic differentiation due to bottlenecks and founder effect. The objective is to evaluate genetic variability and level of inbreeding in three refuges and the wild population in Sonora, through ten microsatellite loci and determine basic parameters of genetic diversity, genetic equilibrium, fixation index (R_{st} and F_{is}) and evidence of past bottlenecks. The results indicate high genetic variability in all populations, with the Intercultural Center for Desert and Ocean Studies (CEDO) having the highest. All populations in captivity and the wild population exhibit heterozygote deficits. Fixation indexes show little genetic differentiation among populations ($R_{st} = 0.007$) and a high inbreeding coefficient ($F_{is} = 0.26$) indicating that there is little divergence among populations. The only evidence of past bottlenecks is in the refuge at Centro Ecologico de Sonora (CES). In conclusion, the CEDO population is potentially useful for increasing the genetic variability of the rest of the refuges. The indicators of genetic variability at CES are consistent with those of the wild population, so it could function as a source for reintroduction into the Sonoyta River.

ÍNDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN	<i>i</i>
DEDICATORIA	<i>ii</i>
AGRADECIMIENTOS	<i>iii</i>
RESUMEN	<i>iv</i>
ABSTRACT	<i>v</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>viii</i>
ÍNDICE DE TABLAS	<i>x</i>
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	3
I.1. Perspectiva general de la conservación de peces dulceacuícolas	3
I.2. Principios básicos de la genética de poblaciones	4
I.3. Conservación de la biodiversidad de peces dulceacuícolas: Beneficios y riesgos en el uso de la propagación artificial (ecosistemas receptores de stock, translocación y reintroducción)	6
I.3.1. Beneficios y riesgos en la propagación artificial de peces dulceacuícolas: conservación genética	8
I.4. Microsatélites como marcadores moleculares: Una herramienta para evaluar la diversidad genética	9
I.5. La familia Cyprinodontidae y su origen evolutivo	12
I.6. Pez cachorrito del Sonoyta: Ecología, distribución y divergencia	14
I.7. Factores de riesgo y acciones de conservación del cachorrito del Sonoyta	17
I.8. Diversidad genética en <i>Cyprinodon eremus</i>	18
I.9. Estudios de microsatélites de otros peces cachorrito: <i>Cyprinodon spp</i>	18
II. HIPÓTESIS	20
III. OBJETIVOS	21
III.1. Objetivo general	21
III.2. Objetivos específicos	21
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	22
IV.1. Descripción de los sitios de muestreos	22
IV.1.1. Río Sonoyta	22
IV.1.2. Refugios	23
IV.2. Recolecta de ejemplares y muestras de tejidos	23
IV.3. Extracción de ADN	24
IV.4. Amplificación de microsatélites	24
IV.5. Lectura de alelos y pruebas de loci de microsatélites	26
IV.6. Parámetros de variabilidad genética	26
IV.7. Diferenciación genética e índice de endogamia	27
IV.8. Análisis de cuellos de botella	28

V.	RESULTADOS	29
V.1.	Amplificación de microsatélites y lectura de alelos de <i>Cyprinodon eremus</i>	29
V.2.	Evaluación de homocigotos y alelos nulos	30
V.3.	Parámetros de variabilidad genética de <i>Cyprinodon eremus</i>	31
	V.3.1. Índice de contenido polimórfico (PIC)	31
	V.3.2. Alelos por locus, heterocigosidad observada y esperada, frecuencias alélicas y frecuencias genotípicas	32
	V.3.3. Probabilidad de identidad	39
V.4.	Equilibrio genético	39
V.5.	Diferenciación genética (R_{st}) e índice de endogamia (F_{is})	40
VI.	DISCUSIÓN	45
VI.1.	Parámetros de variabilidad genética de <i>Cyprinodon eremus</i> : Índice de contenido polimórfico (PIC) y parámetros poblacionales	45
VI.2.	Equilibrio genético	50
VI.3.	Diferenciación genética (R_{st}) e índice de endogamia (F_{is})	51
VI.4.	Análisis de cuello de botella	55
VII.	CONCLUSIONES	56
VIII.	RECOMENDACIONES	57
IX.	LITERATURA CITADA	58
	ANEXOS	
I.	Tabla resumida del análisis de las frecuencias de alelos nulos de microsatélites entre todas las poblaciones, bajo diferentes algoritmos de Micro-Checker v.2.2.3	65
II.	Frecuencia de genotipos observados de individuos heterocigotos y homocigotos por población y por locus. Frecuencia de genotipos compartidos (al menos con una o tres poblaciones) y frecuencia de genotipos únicos	67
III.	Análisis de probabilidad de identidad (PI) por locus y por locus de cada población evaluada del presente estudio	67
IV.	Tabla resumida de media de alelos privados de los refugios y población silvestre	68

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
1	Distribución geográfica de la familia Cyprinodontidae. Diseño con base en Alfonsi y Pérez (2003).	13
2	Dimorfismo sexual de <i>Cyprinodon eremus</i> . A = Hembra, B = Macho. Tomado de Miller y Fuiman (1987).	15
3	Distribución y localidades de <i>Cyprinodon eremus</i> . A = Río Sonoyta. B = Manantial de Quitobaquito.	15
4	Hábitats de pez cachorrito del Sonoyta. Foto superior localidad el Papalote en el Río Sonoyta, Sonora. Foto inferior localidad manantial de Quitobaquito, Arizona.	16
5	Cuenca del Río Sonoyta y sus principales tributarios.	23
6	Expresión matemática de la probabilidad de identidad, donde p_i y p_j son las respectivas frecuencias de los i -ésimos y j ésimos alelos encontrados en la población.	27
7	Intervalos y frecuencia del tamaño de los alelos observados para los 10 loci microsatelitales de refugios artificiales y población silvestre de <i>C. eremus</i> .	30
8	Frecuencias alélicas para los microsatélites GATA 9 y GATA 10. CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, RS = Río Sonoyta.	34
9	Frecuencias alélicas para los microsatélites GATA 20, GATA 26 y GATA 39. CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, RS = Río Sonoyta.	35
10	Frecuencias alélicas para los microsatélites GATA 73, GATA 104 y GATA 130. CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, RS = Río Sonoyta.	36
11	Frecuencias alélicas para los microsatélites AC 4 y AC 24. CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, RS = Río Sonoyta.	37
12	Promedio de genotipos por poblaciones. CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, RS = Río Sonoyta.	38

AA = media de genotipos homocigotos, Aa = media de genotipos heterocigotos.

- 13 Porcentajes de genotipos observados/compartidos o únicos entre los loci microsatelitales entre poblaciones. % GC = porcentaje de genotipos comunes o compartidos al menos con una a tres poblaciones, % GU = porcentaje de genotipos únicos. 38
- 14 Análisis de cuello de botella - cambio de moda. PA = proporción de alelos, CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta. RS: Río Sonoyta. 44

ÍNDICE DE TABLAS

TABLAS		PÁGINA
1	Estudios de microsatélites en especies del género <i>Cyprinodon</i> . H_o = heterocigosidad promedio observada, H_e = heterocigosidad promedio esperada, F_{st}/R_{st} = índices de diferenciación genética. Na = no aplica/información no disponible.	19
2	Loci informativos de microsatélites utilizados por Burg et al. (2002) y Koike et al. (2008). A = número de alelos, pb = pares de bases.	25
3	Programa de amplificación de loci microsatelitales por PCR de <i>C. eremus</i> . T = temperatura. Grupo A = GATA 9, GATA 10, GATA 26, GATA 39, GATA 73, GATA 104, GATA 130 y AC24. Grupo B = GATA 20 y AC4.	26
4	Amplificaciones y lecturas microsatélites fallidas en individuos de <i>C. eremus</i> . CES = Centro Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, RS: Río Sonoyta.	29
5	Número de homocigotos observados con Microchecker de 10 loci microsatelitales de refugios y población silvestre de <i>C. eremus</i> . Homocigotos observados/Homocigotos esperados. *locus con presencia de alelos nulos. Los valores en negritas son deficiencia o exceso de homocigotos. CES = Centro Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, RS: Río Sonoyta	31
6	Parámetros de diversidad genética e índice de contenido polimórfico (PIC) por locus en refugios y población silvestre de <i>C. eremus</i> . At =: total de alelos observados, N = número de individuos analizados, H_o = heterocigosidad observada por locus, H_e = heterocigosidad esperada por locus, PIC = índice de contenido polimórfico.	32
7	Parámetros de diversidad genética poblacional en <i>Cyprinodon eremus</i> de cuatro poblaciones de Sonora. A = número de alelos observados, A/L = alelos por locus, An = alelos nulos: H_o = heterocigosidad observada; H_e : heterocigosidad esperada, P = probabilidad de significancia entre diferencia de medias de H_o y H_e . Pc = valor de significancia con correcciones Bonferroni ($0.05/4 = 0.0125$).	33
8	Valores de significancia de la prueba de chi-cuadrada de equilibrio genético de Hardy-Weinberg por locus y entre loci. Los valores en negritas son significativos e indican un locus o población fuera del equilibrio $P < 0.05$. P HW = valores de significancia de las desviaciones de HW entre los loci por población. CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, RS = Río Sonoyta.	40
9	Índices de fijación: coeficiente de endogamia (F_{is}) y diferenciación genética (R_{st}) de refugios y población silvestre de <i>C. eremus</i> . Los valores debajo de la diagonal son valores de diferenciación R_{st} . Los valores encima de la diagonal son valores de significancia (significativos en negritas $P < 0.05$). CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, RS = Río Sonoyta.	41
10	Análisis de varianza molecular (AMOVA). % = porcentaje de variación, S.M = suma de cuadrados, R_{st} = índice de diferenciación genética, F_{is} = coeficiente	42

- de endogamia, $A = \text{AMOVA para } R_{st}$, $B = \text{AMOVA para } F_{is}$. $P = \text{valores de significancia}$.
- 11 Valores de significancia de la prueba de signo del análisis de cuello de botella de refugios y población silvestre de *C. eremus*. IAM = Modelo de alelos infinitos, TPM = Modelo de dos fases, SMM = Modelo de mutación por pasos, CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta. RS = Río Sonoyta, Valores en negrita son señales de presencia de cuello de botella. 42
- 12 Valores de significancia de la prueba de Wilcoxon del análisis de cuello de botella de refugios y población silvestre de *C. eremus*. IAM = Modelo de alelos infinitos, TPM = Modelo de dos fases, SMM = Modelo de mutación por pasos, A = deficiencia de heterocigotos, B = exceso de heterocigotos, C = deficiencia o exceso de heterocigotos, CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, RS = Río Sonoyta. Valores en negrita significativos ($P < 0.05$). 43
- 13 Comparación de la heterocigosidad observada/alelos por locus en el presente estudio y otros trabajos en otras especies de *Cyprinodon*. IND = información no disponible. 46
- 14 Comparación de los parámetros de variabilidad genética de *Cyprinodon eremus* de refugios y la población silvestre. $A/L = \text{alelos por locus}$, $H_o = \text{heterocigosidad observada}$, $H_e = \text{heterocigosidad esperada}$, Años = transcurridos desde la translocación a los refugios, RS = Río Sonoyta. Quitobaquito, CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, SDM = Sonora Desert Museum, TCP = Tohono Chul Park, ASU2 = Arizona State University, SCC = Scottsdale Community College, FT = Finley Tank, NA = no aplica, a = muestras de 1998. b = muestras del 2005. 48
- 15 Comparación de índices de fijación (R_{st} y F_{is}) de refugios y poblaciones silvestres de *Cyprinodon eremus*. $R_{st} = \text{diferenciación genética}$, $F_{is} = \text{coeficiente de endogamia}$, *Valores calculados, T = años transcurridos desde la translocación a los refugios del Río Sonoyta (RS) y Quitobaquito. CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, SDM = Sonora Desert Museum, TCP = Tohono Chul Park, ASU2 = Arizona State University, SCC = Scottsdale Community College, FT = Finley Tank, IND =: información no disponible, NA = no aplica. 53

INTRODUCCIÓN

La pérdida, degradación y fragmentación del hábitat en ecosistemas dulceacuícolas son consecuencias de las alteraciones por el uso de suelo. Entre estas alteraciones se tienen la transformación del suelo a la agricultura, construcciones sobre márgenes de ríos, desviaciones y sustracción de agua para uso humano e intervención antropogénica en las cuencas hidrológicas (ejemplo: presas) y cambio climático (Mota *et al.*, 2014). Este tipo de situaciones pueden interrumpir la migración de peces a lo largo de las cuencas, que aunada a la introducción de especies exóticas a este tipo de ecosistemas acuáticos continentales, promueven fuerte competencia con las especies locales (Benirschke, 2006). Generalmente, dichas especies son desplazadas de su hábitat provocando que se reduzcan sus números poblacionales, condiciones que afectan a la composición genética (Whiteley *et al.*, 2015). Por lo tanto, los peces dulceacuícolas son más vulnerables en comparación a otras especies de vertebrados que tienen mayor capacidad de dispersión.

En una perspectiva general, los peces dulceacuícolas se distribuyen en hábitats muy reducidos y en ocasiones pierden conectividad con otras poblaciones (Epifanio y Waples, 2015). Como estrategia de conservación, a partir de la década de los setenta se iniciaron los primeros programas de recuperación y conservación de peces dulceacuícolas a través de las translocaciones a refugios, refugios seminaturales y reintroducciones a hábitats naturales como una contramedida a la extinción de múltiples especies de peces (Minckley, 1995). Sin embargo, el aislamiento continuo que provee estas medidas puede llegar a afectar a largo plazo la estructura genética de las poblaciones de resguardo.

Cuando las poblaciones se encuentran aisladas por un largo periodo de tiempo, puede llegar a manifestar una pérdida en la variabilidad genética a nivel intraespecífico (Hedrick y Garcia-Dorado, 2016). Esta pérdida de la variabilidad genética puede atribuirse a un cuello de botella, que es un evento que reduce el número de individuos (perfiles genéticos) dentro de la población, al quedar un número finito de individuos con características genéticas propias en el hábitat, que se le denomina efecto fundador, donde estos son los que se encargarán de repoblar nuevamente el ecosistema acuático dentro de su distribución o una nueva área a colonizar (Caballero *et al.*, 2017). Sin embargo, en la población que cuenta con individuos con perfiles

genéticos únicos (efecto fundador) en función del tiempo, se va reduciendo la probabilidad de apareamiento no azaroso produciendo endogamia en la población (Pekkala *et al.*, 2014).

El pez cachorrillo del Sonoyta (*Cyprinodon eremus*) pertenece a la familia Cyprinodontidae y es una especie endémica del noroeste de México. Actualmente, su distribución está fuertemente restringida por impacto antropogénico a pequeños segmentos del Río Sonoyta en Sonora y del manantial de Quitobaquito en Arizona (Minckley y Marsh, 2009). A pesar de originarse alopátricamente de *Cyprinodon macularius*, que es una especie en peligro de extinción en México, el cachorrillo del Sonoyta no cuenta con estatus de conservación oficial. Como estrategia de conservación, dependencias gubernamentales y no gubernamentales de México y Estados Unidos de América han construido refugios como reservorios para *C. eremus* (QRSWG, 2011). Para estimar la variabilidad genética son utilizados los marcadores moleculares que por definición son todos aquellos segmentos que se pueden rastrear en el ADN y un tipo particular de marcadores moleculares son los microsatélites, que son capaces de medir la variabilidad genética y mostrar una idea clara del estado genético de las poblaciones, en especial las que se encuentran bajo resguardo. Los microsatélites (repeticiones tándem de secuencias cortas) se distinguen principalmente por la alta tasa de polimorfismo en regiones codificantes y no codificantes en nuclear, mitocondrial y cloroplasto), y su carácter codominante nos permite la distinción de individuos heterocigotos y homocigoto (Vieira *et al.*, 2016). Por lo tanto, el presente estudio pretende evaluar la variabilidad genética, endogamia y la posibilidad de cuellos de botellas en el pasado entre los refugios de *C. eremus* existentes en el Estado de Sonora utilizando 10 loci de microsatélites y compararlos con los indicadores publicados en la literatura y en poblaciones silvestres actuales. Los resultados se pretenden utilizar para el conocimiento sobre las condiciones actuales de la diversidad genética del cachorrillo del Sonoyta en refugios y en poblaciones silvestres de esta especie endémica. Por lo tanto, este estudio permitirá diseñar el manejo futuro de las poblaciones de resguardo y a la vez permitirá proponer un plan de reintroducción en caso de un evento de extinción en ambientes naturales en el Río Sonoyta.

I. ANTECEDENTES

I.1. Perspectiva general de la conservación de peces dulceacuícolas

Los peces dulceacuícolas forman parte de los grupos más diversos y amenazados a nivel mundial, representando alrededor del 25 % de la diversidad total de los vertebrados. De las aproximadamente 30,000 especies descritas, el 37 % están en peligro de extinción (Hermoso *et al.*, 2015). La conservación de la biodiversidad dulceacuícola está directamente relacionada con la presión que experimentan estos ecosistemas en todo el mundo debido a su importancia para el desarrollo humano. Estos ecosistemas, junto con su diversidad biológica, están sujetas a mayores presiones y amenazas que los ecosistemas terrestres adyacentes (Nel *et al.*, 2007; Vörösmarty *et al.*, 2010). La extracción de agua, introducción de especies no nativas, la contaminación y transformación del hábitat de las cuencas son las principales amenazas para la conservación de la biodiversidad dulceacuícola. Estas presiones crecen de manera alarmante por el aumento de la población humana en todo el mundo y el efecto del cambio climático (Strayer y Dudgeon, 2010).

La conservación de los ecosistemas dulceacuícolas ha permanecido periférica a los objetivos de conservación desarrollados para los ecosistemas terrestres, a menos que se considere importante para la biodiversidad terrestre (Olden *et al.*, 2010). La implementación de acciones de conservación está restringida por presupuestos limitados y posibles conflictos con otros usos antropogénicos. Por este motivo, no es factible proteger todas las áreas que contribuyen a la persistencia de la biodiversidad (Margules *et al.*, 2002) y se requiere una planificación adecuada.

Los ecosistemas dulceacuícolas plantean algunos desafíos únicos para la implementación de acciones de conservación efectiva, como la importancia de la conectividad de los ecosistemas para mantener los procesos naturales y facilitar la dispersión de las especies (Linke *et al.*, 2011). La conectividad espacio temporal desempeña un papel clave en el mantenimiento de importantes procesos ecológicos, como las migraciones periódicas o la dispersión desde las áreas de refugio, el flujo de genes y el transporte de energía y materia, esenciales para la persistencia de las poblaciones y las especies. La conectividad en los

ecosistemas dulceacuícolas se define en cuatro dimensiones (Ward y Stanford, 1989): longitudinal (corriente arriba-corriente abajo), lateral (interacciones entre canales y sistemas ribereños / fluviales), vertical (conexiones entre la superficie) y sistemas de aguas subterráneas, las cuales están sujetas a dinámicas temporales (Hermoso *et al.*, 2015). Las dimensiones de los ecosistemas han sido profundamente modificadas a través de la construcción de barreras como presas, cruces de caminos o cualquier forma que pueda afectar el movimiento longitudinal de individuos, reducen el flujo de nutrientes - sedimentos y afectan la conectividad lateral al disminuir los pulsos de inundación (Arthington, 2012; Pópino *et al.*, 2012).

Los ecosistemas dulceacuícolas son extremadamente dependientes del paisaje terrestre circundante (por ejemplo, como fuente de material o vulnerabilidad a amenazas originadas en sistemas terrestres, como sedimentos o contaminantes). Por este motivo, el manejo adecuado para la conservación de la biodiversidad dulceacuícola debe ir más allá del límite de este ecosistema y extenderse en grandes áreas terrestres (Hermoso *et al.*, 2015). Otro aspecto clave adicional para la conservación de este tipo de ecosistemas es la necesidad de disponibilidad de agua, a menudo en funcionamiento. Los flujos de agua definen ecosistemas dulceacuícolas saludables y mantienen características importantes como la temperatura, la geomorfología o la diversidad del hábitat y procesos como el transporte de nutrientes, elementos clave para el mantenimiento de la biodiversidad dulceacuícola (Hermoso *et al.*, 2015).

I.2. Principios básicos de la genética de poblaciones

Los componentes de la diversidad biológica (genética, ecosistémica y de especies) son afectados por diversos procesos que actúan en escalas espaciales y temporales (Piñero *et al.*, 2008). Aunque los tres niveles son relevantes, es importante resaltar que la diversidad genética es uno de los niveles más básicos de la diversidad biológica. La variabilidad genética de una especie es un componente de la biodiversidad y se define como las variaciones heredables entre los individuos dentro y entre poblaciones a través de los genes y su combinación de distintos genotipos (Molina-Freaner *et al.*, 2010; Hedrick, 2011). Los genes pueden ser cuantificados mediante parámetros de diversidad dentro de las poblaciones a nivel génico (*e.g* número

promedio de alelos por locus en la población) o genotípico (*e.g* proporción de loci heterocigotos en población), ambos como ámbito de la genética de poblaciones.

La genética de poblaciones pretende describir la variabilidad y los cambios que ocurren a nivel intra - interespecífico de las poblaciones, incluyendo la adaptación, la especiación y pretende abordar las causas de la evolución (Hedrick, 2011). Los estudios se basan en el principio del equilibrio de Hardy - Weinberg, que asumen que las poblaciones se encuentran en equilibrio siempre y cuando las poblaciones sean muy grandes, todos los apareamientos ocurran al azar, todos los alelos (alternativas de un locus) sean igualmente competentes para dejar descendencia y no exista migración de alelos; requisitos a cumplir para que la población no se encuentre en proceso evolutivo (Eguiarte *et al.*, 2007). Sin embargo, cuando se rompen estas suposiciones, las fuerzas evolutivas como la mutación, flujo génico, deriva génica y la selección natural pueden afectar el equilibrio Hardy - Weinberg y cambiar la composición genética de las poblaciones (Molina-Freaner *et al.*, 2010).

Las poblaciones que reducen su número de individuos constantemente por eventos naturales o antropogénicos, dan origen a poblaciones pequeñas, que en una perspectiva general, estas son sometidas a una fuerza evolutiva que se le denomina deriva genética (Piñero *et al.*, 2008). Esta fuerza evolutiva modifica las frecuencias alélicas y produce cambios evolutivos completamente al azar, lo que da como resultado cambios en el acervo genético entre generaciones sucesivas de una población. Este se debe a su efecto acumulativo por eventos aleatorios, la deriva genética no produce adaptación, pero puede hacer que cambien las frecuencias de los alelos, lo que es por sí mismo un mecanismo de evolución (Piñero *et al.*, 2008).

El movimiento de las frecuencias de los alelos tiene dos efectos importantes y relacionados, en el primero los alelos se pueden desplazar hacia la fijación o pérdida, con una probabilidad de fijación igual a la frecuencia del alelo, en el segundo la frecuencia de los heterocigotos disminuye, llevando a una pérdida de heterocigosidad y por lo tanto la homocigosidad expone alelos deletéreos a la selección (Hedrick y Garcia-Dorado, 2016). Un atributo que se origina de la deriva genética es el efecto fundador, que se da cuando los fundadores originales de una población son pequeñas muestras de la población donante y por lo tanto difieren entre sí en las frecuencias de los alelos debido a un efecto aleatorio, por lo que

llega a distinguirse una estructura genética inicial. El efecto fundador puede resultar del establecimiento de una nueva población de individuos derivados de una población mucho mayor o de una reducción extrema en el tamaño de la población (cuello de botella), en ambos casos los alelos presentes inmediatamente después del evento se pueden encontrar en una frecuencia mucha más alta de lo que eran originalmente y alcanzar frecuencias mayores por deriva genética que tienen lugar mientras la población siga pequeña (Wright *et al.*, 2008; Pekkala *et al.*, 2012; Whiteley *et al.*, 2015).

Las poblaciones aisladas derivadas de un pequeño número de individuos que se separaron a causa de un evento fundador y que preservan este estado por muchas generaciones, produce un flujo génico a nivel intraespecífico únicamente, por lo que se produce homogeneidad en los genomas de la población debido al fenómeno de la endogamia (Nietlisbach *et al.*, 2017). La endogamia, que consiste en el apareamiento no aleatorio en individuos que tienen algún parentesco, aumenta la frecuencia de los homocigotos en comparación con lo que se espera en los supuestos de Hardy-Weinberg (Love- Stowell *et al.*, 2017). Sin embargo, la endogamia induce cambios en las frecuencias genotípicas de generación en generación y no promueve que las frecuencias de los alelos cambien. Por lo tanto, la endogamia por sí misma no es un mecanismo de evolución, pero, puede tener importantes consecuencias evolutivas (Hedrick y Garcia-Dorado, 2016).

I.3. Conservación de la biodiversidad de peces dulceacuícolas: Beneficios y riesgos en el uso de la propagación artificial (ecosistemas receptores de stock, translocación y reintroducción)

La conservación de la diversidad de peces dulceacuícolas, la sostenibilidad del hábitat y los beneficios de la viabilidad en cualquier enfoque de la conservación (propagación, almacenamiento, translocación y reintroducción de individuos), no solo afectan a la especie o población objetivo, sino además a otras especies que coexisten en los ecosistemas receptores. En una perspectiva general, los peces son a menudo utilizados como un ejercicio para abordar la "oferta y demanda" de organismos vivos para garantizar su persistencia y viabilidad a largo plazo. A la inversa, la propagación artificial de peces, el almacenamiento en stocks, la

reintroducción y la translocación se pueden ver como enfoques de "oferta" para complementar las mejoras *in situ* del hábitat o la eliminación de otras presiones para aumentar la producción por encima de la capacidad de carga inherente en un hábitat prístino o en un ecosistema estresado (Epifanio y Waples, 2015). El almacenamiento y la propagación artificial se han llevado a cabo bajo el enfoque de la conservación y/o restauración, por lo tanto, los programas que iniciaron desde la década de los cuarenta han cambiado el enfoque y objetivos, paralelos a la gestión de recursos de pesca (Epifanio y Waples, 2015). Las translocaciones y las reintroducciones están relacionadas, pero son actividades sutilmente diferentes que, en última instancia, mueven los peces dulceacuícolas dentro y entre los ecosistemas en los que evolucionaron en un sentido general, es decir, representan el movimiento de una especie a un área nueva más allá de su distribución natural.

Una translocación implica el desplazamiento de individuos de una especie (o linaje distinto y divergente, definido como un stock, población, unidad evolutivamente significativa, unidad de manejo genético) a un lugar afuera del rango histórico. Por otra parte, cuando involucra una translocación a un stock con un remanente de stock nativo, puede conducir a efectos de cruzamiento y erosión de la diversidad entre poblaciones (Epifanio y Waples, 2015). Las translocaciones pueden ser “directas” (embriones, jóvenes o adultos se capturan de un lugar y se mueven a otro) o “indirectos” (por ejemplo, adultos capturados de un lugar y criados para producir jóvenes que posteriormente se liberan en un hábitat específico) (Epifanio y Waples, 2015; Heilveil y Stockwell, 2017).

Las reintroducciones, que son más utilizadas para la conservación de la biodiversidad, implican el retorno o restauración de una especie a un lugar dentro de su rango histórico nativo previamente ocupado desde el cual se ha extirpado. De manera similar, la translocación es una acción humana impulsada para la conservación que involucra el movimiento de una especie a un lugar o hábitat donde actualmente no existe esa especie, incluidos los refugios fuera del sitio (Epifanio y Waples, 2015).

I.3.1. Beneficios y riesgos en la propagación artificial de peces dulceacuícolas: conservación genética

La propagación artificial que involucra las translocaciones y reintroducciones tiene mejor función si se realiza después de una evaluación exhaustiva de los posibles beneficios y riesgos ecológicos y genéticos para la especie que se pretende rescatar o utilizar. La dispersión artificial desde stocks tiene el potencial de proporcionar dos tipos de servicios ecosistémicos: (1) aquellos que promueven beneficios para la sociedad humana y (2) aquellos que promueve beneficios para las poblaciones naturales y los ecosistemas asociados (Epifanio y Waples, 2015; Whiteley *et al.*, 2015).

Para especies en peligro de extinción, la translocación de especímenes a refugios a corto plazo es una respuesta rápida para evitar la pérdida de la diversidad biológica, sin embargo, la conservación de poblaciones de resguardo a largo plazo puede tener graves problemas para el mantenimiento de su estructura genética, debido al aislamiento geográfico y al nulo flujo genético, produciéndose endogamia en la población, ocasionando una reducción en la variabilidad genética (Hedrick y Garcia-Dorado, 2016). Las poblaciones con bajos niveles de variabilidad genética tienen menos capacidad para responder al cambio ambiental. Los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones están determinados en gran medida por el tamaño efectivo de la población (N_e), que puede ser influenciado por muchos factores, incluyendo la propagación artificial (Whiteley *et al.*, 2015). En general, cuando el tamaño efectivo de la población es más bajo y a menudo, los riesgos de reducir la variabilidad genética aumentan cuando N_e en la población cautiva es mucho más bajo que en la naturaleza y cuando la fracción de reproductores naturales que son de origen cautivo es relativamente alta llegando a inducir posiblemente una reducción adaptativa (Epifanio y Waples, 2015; Nietlisbach *et al.*, 2017).

La principal preocupación con respecto a la pérdida de la diversidad genética entre las poblaciones de resguardo es que los individuos, generalmente de uno o unos pocos reproductores, conducirán a la sustitución de los patrones existentes de poblaciones adaptadas localmente con un número menor de individuos relativamente homogéneos. Es decir, puede producirse un desplazamiento de perfiles genéticos y podría desplazar una adecuación importante para dicho hábitat a largo plazo. Por lo tanto, las especies que han estado en

resguardo por un largo periodo generalmente son menos aptos en la naturaleza y si se reproducen con éxito, su progenie puede deprimir la condición física y comprometer la viabilidad de la población silvestre (depresión exogámica) en caso que se realizara una reintroducción a dicho hábitat (Frankham, 2016). Un fenómeno indeseable relacionado también con la pérdida de adecuación que se produce cuando los individuos de dos poblaciones genéticamente divergentes se cruzan, es la depresión exogámica, que consiste en la reproducción o cruce de individuos genéticamente muy distintos y por mecanismos de recombinación que suceden en los genomas nucleares puede mejorar la variabilidad genética o incrementar alelos deletéreos a la población nativa del área que se desea rescatar (Hedrick y Fredrickson, 2010; Hedrick y Garcia-Dorado, 2016). Por lo anterior, es necesaria la utilización de reproductores locales para evitar la pérdida de adecuaciones y la reducción probabilística de los efectos que pueda traer la translocación, con el posterior cruce de poblaciones genéticamente divergentes (Epifanio y Waples, 2015).

En una visión general, las translocaciones y reintroducciones pueden ser herramientas de manejo para la reproducción entre individuos de diferentes poblaciones de refugio, que produce un flujo génico artificial que puede promover una reducción en la endogamia y aumento el potencial reproductivo del stock resultante (Whiteley *et al.*, 2015). Sin embargo, también este tipo de manejo del flujo genético puede llegar a producir una depresión exogámica en el apareamiento de las especies o restringir la adaptación local, por lo tanto el uso de esta estrategia para incrementar el flujo genético deberá ser cuestionado en cuanto a los posibles beneficios para restaurar la diversidad (Heilveil y Stockwell, 2017).

I.4. Microsatélites como marcadores moleculares: Una herramienta para evaluar la diversidad genética

Los microsatélites, también conocidos como repeticiones cortas en tándem (STRs, Short tandem repeats por sus siglas en inglés), son secuencias de ADN que contienen bloques de repeticiones de 6 nucleótidos o menos, dispuestas sin interrupción por un número limitado de veces llamadas tándem (Guichoux *et al.*, 2011). Se localizan a lo largo de todo el genoma, siendo abundantes en regiones centromeros o en porciones heterocromáticas de los cromosomas y su densidad promedio por genoma es de un locus STR cada 104 o 105 bases (Vieira *et al.*, 2016). Los

microsatélites surgen como uno de los marcadores moleculares más utilizados para el estudio de la variabilidad genética, porque representan un locus único, codominante, con una alta tasa de mutación y su análisis puede efectuarse combinando distintos microsatélites para proveer una réplica rápida del genoma con un costo accesible (Frankham *et al.*, 2010). El primer uso de los microsatélites en poblaciones naturales fue reportado hace más de 20 años (Vieira *et al.*, 2016), desde entonces los microsatélites representan un marcador importante para un número considerable de trabajos de genética de la conservación (Vieira *et al.*, 2016).

Los microsatélites se clasifican según el tipo de arreglo de sus secuencias repetidas, los de estructura simple se componen de una misma secuencia de repetición (AAA), independientemente del número de bases que la conformen. Los de estructura compuesta están conformados por más de un tipo de repetición en tándem, generalmente con repeticiones muy similares en tamaño y secuencia y varían solo en un nucleótido (GAGA). Los de estructura compleja (GAGCGAGC) presentan más de un tipo de repetición, pero pueden ser de diferente tamaño y secuencia. Otra categoría de clasificación son las que consideran secuencias perfectas, imperfectas, interrumpidas o compuestas. En un microsatélite perfecto (AAAA) la secuencia de repetición no está interrumpida por ninguna base que no pertenezca al motivo, en un microsatélite imperfecto (GGGCAGGG) hay un par de bases entre los motivos repetidos que no concuerdan con la secuencia motivo. En un microsatélite interrumpido (GATACGGATA) se detecta una pequeña secuencia dentro de la secuencia repetitiva que no coincide con la secuencia tándem, y en uno compuesto (GAGATCTC), la secuencia contiene dos secuencias de repeticiones distintas y adyacentes (Guichoux *et al.*, 2011; Vieira *et al.*, 2016).

Las regiones microsatélites tienen una tasa de mutación estimada de 10^{-3} a 10^{-4} de eventos por locus por generación (ganancia o pérdida de repeticiones), la cual es mucho mayor que la tasa de sustitución de nucleótidos simples (Vieira *et al.*, 2016). El origen de las repeticiones (STRs) en los genomas se debe a la gran frecuencia por deslizamiento - apareamiento desigual de las hebras de ADN y a errores de corrección de la polimerasa (“slippage and proofreading errors”) durante la replicación del ADN (Lai *et al.*, 2015). Consiste básicamente en un mal apareamiento por deslizamiento de las hebras de ADN, que afecta a la ADN polimerasa, provocando una detención del copiado. Al parecer es ocasionada por factores como la misma secuencia repetitiva, que produce la detención de la actividad y del complejo de

replicación, durante el copiado y la procesividad de la polimerasa sobre la hebra molde, se crea una disociación del complejo de replicación que desplaza la enzima y se aleja al extremo prima terminal de la hebra nueva a sintetizar del sitio activo de la polimerasa (Vieira *et al.*, 2016). Después de que la enzima puede volver a su sitio original, continúa con la copia desde la misma cadena de repetición que había dejado en el momento de la interrupción, o en una repetición previa o posterior a ella.

El modelo de mutación en microsatélites mejor aceptado es el modelo por pasos, *Step wise mutation model* (SMM por sus siglas en inglés), que consiste en que un microsatélite muta, gana o pierde una repetición, esto implica que dos alelos que difieren solo en una repetición, es decir, que comparten un ancestro común más reciente, están más relacionados que aquellos que difieren en varias unidades (Guichoux *et al.*, 2011; Vieira *et al.*, 2016).

La ventaja de los microsatélites es el acceso a una escala fina de estudio, permite el uso de una cantidad pequeña de la muestra, su especificidad, por lo que se previene la contaminación amplificando otro ADN extraño. Sin embargo, una de las limitantes más importantes en la utilización de microsatélites es que un solo locus no muestra suficiente información de la estructura genética en todos los individuos de una población, por lo que se necesita utilizar varios loci para proveer una perspectiva más robusta. En ocasiones la disponibilidad de microsatélites específicos para ciertas especies está limitada a la disponibilidad de las genotecas en la utilización de genomas completos para el diseño de microsatélites específicos (Guichoux *et al.*, 2011; Vieira *et al.*, 2016).

En particular, los STRs son útiles en estudios de diversidad genética, en especial en los vertebrados medidos con base a la distancia genética, para estimar el flujo de genes y las tasas de cruzamiento y en estudios evolutivos, sobre todo para inferir relaciones genéticas intraespecíficas (Benirschke, 2006; Lai *et al.*, 2015).

I.5. La familia Cyprinodontidae y su origen evolutivo

La familia Cyprinodontidae forma parte del orden Cyprinodontiformes (1,200 especies) que surgieron a finales del Cretácico hace aproximadamente entre 80 - 67 millones de años (ma), distribuidos principalmente en ambientes dulceacuícolas y salobres en el sur de Norte América y Norte de América del Sur, el Mediterráneo en Europa y norte de África y sudeste Asiático (Capobianco y Friedman, 2018). Los Cyprinodontiformes están actualmente divididos en los subclados Aplocheiloidei y Cyprinodontoidei, fuertemente apoyados por evidencia morfológica y molecular (Parenti, 1981; Setiamarga *et al.*, 2008). El registro fósil más antiguo del orden provienen del maastrichtiano del Cretácico tardío de la formación Molino de Bolivia, la cual podría representar un linaje basal (Capobianco y Friedman, 2018).

Las clasificaciones tradicionales del suborden Cyprinodontoides del viejo mundo refleja tres linajes no relacionados, sin embargo, las filogenias moleculares recientes las agrupan en un clado anidado dentro de una radiación estadounidense (Pohl *et al.*, 2015). Esta topología implica un solo evento (vicarianza o dispersión a larga distancia), la cual explica la presencia de Cyprinodontoides en ambos lados del Atlántico. Las filogenias recientes de Aplocheiloidei indican que África y los Cyprinodontoides indo-malayos son linajes hermanos (Furness *et al.*, 2015; Pohl *et al.*, 2015). Por lo tanto, la evidencia fósil y molecular ha mostrado que la mayoría de las especies se dispersaron desde dos regiones biogeográficas, argumentando la dispersión marina con origen sudamericano y dispersiones sucesivas desde África durante el Cretácico tardío al Paleógeno, lo cual se explica posiblemente por qué los peces cachorrillo de ecosistemas dulceacuícolas aún conservan la capacidad para tolerar la salinidad (Capobianco y Friedman, 2018).

La familia Cyprinodontidae está constituida por seis géneros y 100 especies y es comúnmente reconocida como peces cachorrillo que se distribuyen en Norte y Centro América, en el norte de América del Sur, las Indias Occidentales y África del norte (Figura 1) (Alfonsi *et al.*, 2003; Echelle *et al.*, 2005; Esmaeili *et al.*, 2018). El género *Cyprinodon* (peces cachorrillos) tiene distribución más extendida y habita desde desiertos a grandes planicies en el sudoeste de Norte América (Echelle *et al.*, 2005), además, habitan en aguas dulces, salobres y costeras marinas (Miller *et al.*, 2009). Existen 50 especies de *Cyprinodon*, de las cuales treinta únicamente se distribuyen en regiones áridas de manera alopátrica y habitan pequeños cuerpos

de agua, torrentes cortos u ojos de agua de valles aislados (Echelle *et al.*, 2005; Esmacili *et al.*, 2018).

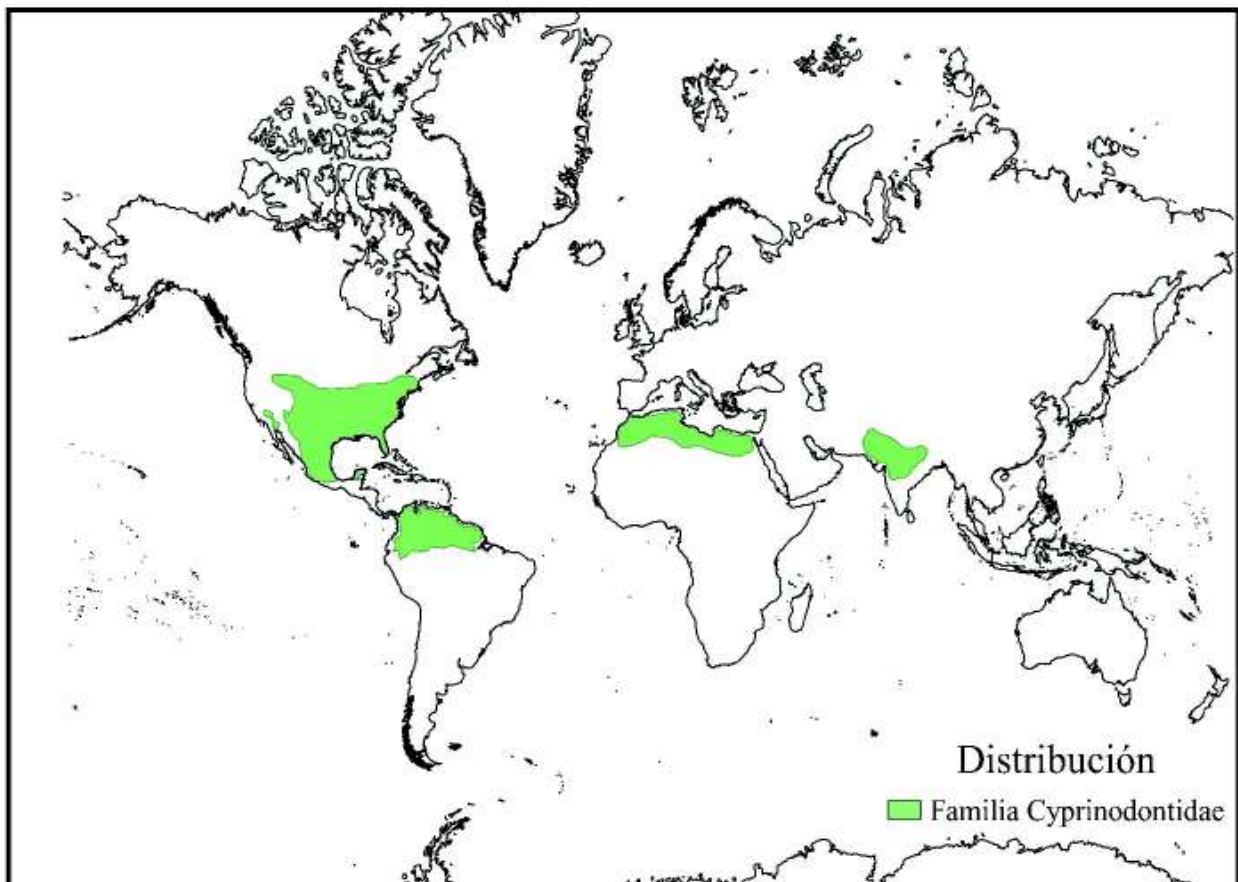


Figura 1. Distribución geográfica de la familia Cyprinodontidae. Diseño con base en Alfonsi y Perez (2003).

Los estudios sobre el género *Cyprinodon* han permitido entender la adaptación de estos organismos a ambientes extremos (Burg *et al.*, 2002). Varias especies del género *Cyprinodon* han proporcionado un conjunto de sistemas y modelos ideales para la investigación de la adaptación a lo largo de gradientes ecológicos y el mantenimiento del flujo de genes, así como para la cohesión de especies y fenotipos (Burg *et al.*, 2002). Echelle *et al.* (2005) mediante un análisis de la variabilidad en secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt) (regiones ND2, Cytb y 2,548 pb de la región control) demostraron que el género *Cyprinodon* empezó a divergir de un antepasado común con *Megupsilon*, un género monotípico de la Mesa del Norte de México, a partir del mioceno tardío.

I.6. Pez cachorrillo del Sonoyta: Ecología, distribución y divergencia

El pez cachorrillo del Sonoyta (*Cyprinodon eremus*) llegan a tener una talla máxima de 50 mm, una longevidad promedio de 3 años, toleran altas temperaturas (44.2 °C - 45 °C) y bajas concentraciones de oxígeno (0.13 mg/l), permitiéndole sobrevivir en ambientes acuáticos desérticos (Minckley y Marsh, 2009). Esta especie presenta dimorfismo sexual (Figura 2), donde las hembras (Figura 2a) y los juveniles son de color plateado y muestran un conjunto de barras estrechas y oscuras en los costados del cuerpo que se interrumpen lateralmente, presentan un ocelo en la aleta dorsal y en ocasiones una mancha oscura en la anal (Miller *et al.*, 2009). Por el contrario, los machos (Figura 2b) tienen un cuerpo iridiscente con tonalidades azul cielo en el área dorsal, las aletas son oscuras y en la época reproductiva se distinguen por tener aleta caudal y el pedúnculo color amarillo pálido (Miller *et al.*, 2009). Además, presentan al año hasta dos temporadas reproductivas, una en primavera y otra en verano, donde los machos son territoriales contra otros machos, excepto con las hembras que liberan los óvulos en los límites de los territorios de protección de los machos en cuerpos de agua con poca profundidad. Por otra parte, el cachorrillo del Sonoyta en comparación con otras especies tiene la mandíbula más larga y la cabeza más alta como rasgos distintivos (Minckley y Marsh, 2009).

El cachorrillo del Sonoyta se consideraba como una subespecie de *Cyprinodon macularius* (Miller y Fuiman, 1987). Posteriormente, mediante un estudio filogenético de ADN mitocondrial, Echelle *et al.* (2000) demostraron una relación monofilética recíproca entre poblaciones de los del clado del Río Sonoyta/Quitobaquito y el clado del Salton Sea/Delta del Río Colorado como distribución histórica de *C. macularius* (Figura 3). Además, con la diagnosis morfológica previa para la subespecie de Miller y Fuiman (1987) y la historia geológica, se apoya el reconocimiento de las poblaciones del Río Sonoyta/Quitobaquito como una especie distinta propuesto por Echelle *et al.* (2000). Por lo tanto, *C. macularius eremus* ascendió taxonómicamente a nivel especie con el nombre de *Cyprinodon eremus* (Echelle *et al.*, 2000). No obstante, a pesar de que el Río Sonoyta y el manantial de Quitobaquito (Figura 4) habita la misma especie, ambas áreas deben ser manejadas como diferentes demes poblacionales debido al grado de diferenciación genética y aislamiento (Echelle *et al.*, 2000). *Cyprinodon eremus* divergió de *Cyprinodon macularius* hace aproximadamente 1.7 ma (Echelle *et al.* 2005; Echelle 2008), lo cual concuerda con los datos reportados por Lynch (1981) de la última actividad

volcánica en la región, donde los flujos de lava del Pinacate desviaron el curso del Río Sonoyta hacia el Este donde conectaba con el bajo Delta del Río Colorado.

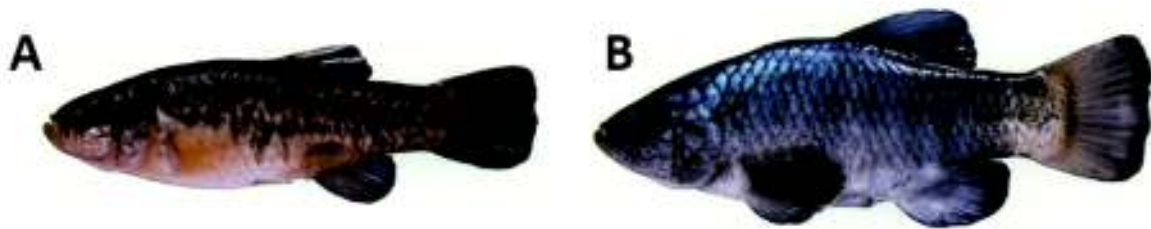


Figura 2. Dimorfismo sexual de *Cyprinodon eremus*. A = Hembra, B = Macho. Tomado de Miller y Fuiman (1987).

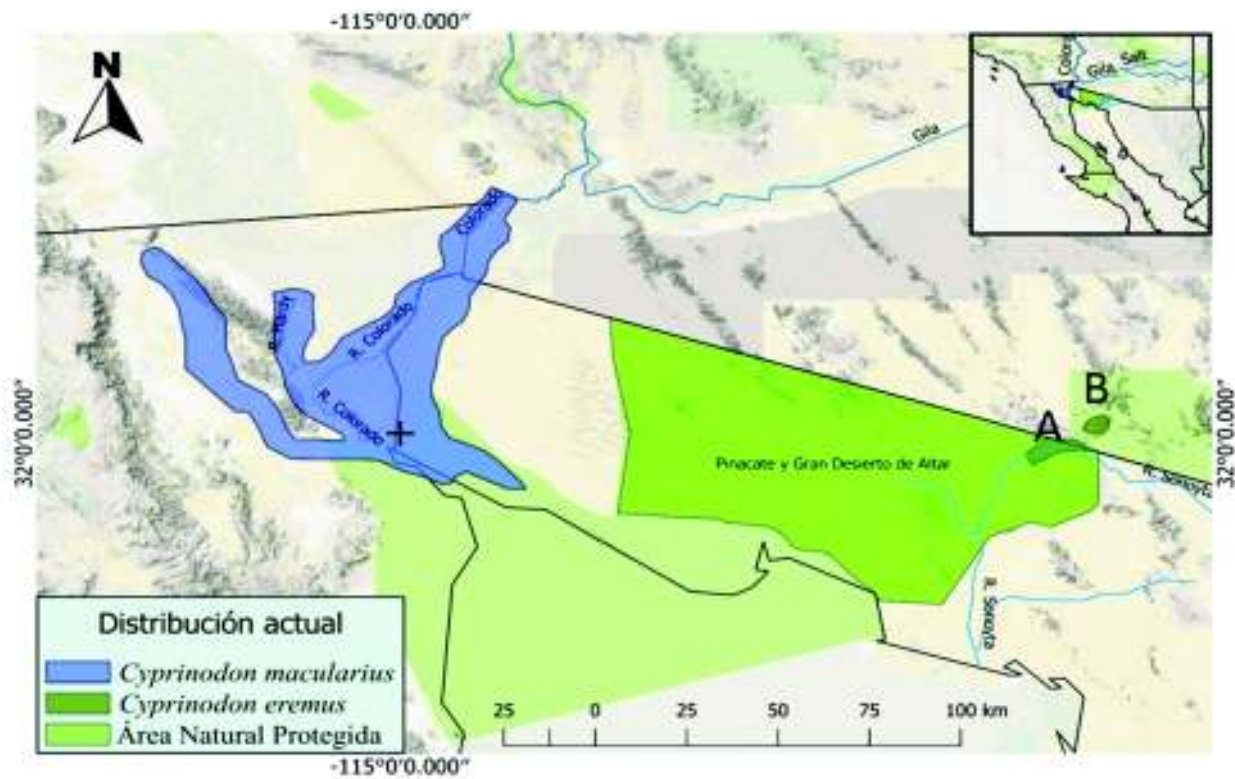


Figura 3. Distribución y localidades de *Cyprinodon eremus*. A = Río Sonoyta, B = Manantial de Quitobaquito.



Figura 4. Hábitats del pez cachorrillo del Sonoyta. Foto superior localidad el Papalote en el Río Sonoyta, Sonora. Foto inferior localidad manantial de Quitobaquito, Arizona.

I.7. Factores de riesgo y acciones de conservación del cachorrito del Sonoyta

La ictiofauna nativa del noroeste de México y el suroeste de Estados Unidos se ha reconocido actualmente como en riesgo de extinción debido a la disminución de sus poblaciones, fenómeno causado por la pérdida y modificación del hábitat, contaminación e introducción de especies exóticas (Minckley y Marsh, 2009; Varela-Romero y Hendrickson, 2009; Rosen *et al.*, 2010;). Particularmente, la población de *C. eremus* del Río Sonoyta se encuentra fuertemente amenazada debido a la degradación y la desecación de los hábitats acuáticos (Hendrickson y Minckley, 1985; Hendrickson y Varela-Romero, 1989, Varela-Romero y Hendrickson, 2009). Durante el verano, el cauce del río sufre una desecación que lo reduce a una pequeña corriente en el área del Papalote (aproximadamente 1.3 km de longitud), dentro de los límites de la Reserva de la Biosfera El Pinacate y Gran Desierto de Altar, donde habita el pez cachorrito del Sonoyta (Schoenherr, 1988; QRSWG, 2011; Budd *et al.*, 2017). La corriente superficial del sistema está mantenida por agua subterránea poco profunda o corriente de descarga de aguas negras residual de diferentes fuentes a lo largo de la cuenca (QRSWG, 2011).

Debido a las condiciones hidrológicas actuales en el desierto del suroeste de los Estado Unidos y noroeste de México, la existencia de agua superficial en el Río Sonoyta ha sido reducida drásticamente, por lo que *C. eremus* no puede mantener poblaciones abundantes a lo largo de todo el año (QRSWG, 2011). En la actualidad, la especie no tiene una designación de alguna categoría de riesgo de extinción por el gobierno federal en México, sin embargo, se encuentra como en peligro en la Lista Roja de especies amenazadas (The IUCN Red List of Threatened Species) de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (NatureServe, 2014). Como estrategias de conservación, se han creado varios refugios (reservorios genéticos) del pez cachorrito de Sonoyta en México.

En Sonora, existen cuatro refugios ubicados en instituciones del gobierno federal (Estación Biológica el Pinacate, Centro de visitantes Schuk Toak), estatal como el Colegio de Bachilleres en Sonoyta (COBACH Sonoyta) y el Centro Ecológico del Estado de Sonora) y privadas como el Centro de Estudios de Desierto y Océanos (CEDO). A partir de la década de 1970, las translocaciones de peces cachorrito en los refugios han desempeñado un papel importante en la gestión de la conservación de la especie, con el propósito de stock de reserva para un futuro, de acuerdo a las necesidades de recuperación y manejo de la especie (Minckley,

1995; Finger *et al.*, 2013). Debido a que el establecimiento de estas poblaciones de refugio se inició sin una evaluación de su variabilidad genética y posible estructura poblacional, existe incertidumbre acerca de su utilidad como stocks con representatividad genética de la especie. Por lo tanto, el establecimiento de poblaciones de refugio deberá estar sustentado en evaluaciones de la variabilidad genética y la estructura poblacional de los stocks (Koike *et al.*, 2008). Además, es necesario contar con una evaluación actualizada de la variabilidad genética de las poblaciones silvestres para identificar el nivel de conservación de la variabilidad genética actual y futura.

I.8. Diversidad genética en *Cyprinodon eremus*

La diversidad genética ha sido evaluada en *C. eremus* al menos utilizando dos tipos de marcadores moleculares. Echelle *et al.* (2000) analizó un segmento de 337 pb de la región control y dos segmentos del gen ND2, ambos del ADN mitocondrial en la población del Río Sonoyta y la población de Quitobaquito, en dicho estudio se detectaron cuatro y tres haplotipos respectivamente, donde un haplotipo del Río Sonoyta no es compartido con la población de Quitobaquito. La diversidad haplotípica (*Hd*) observada fue baja, sin embargo, las diferencias de las variaciones entre los haplotipos de las poblaciones fueron significativas, lo cual sugiere que su distribución fue continua hasta hace poco tiempo. Por otra parte, Koike *et al.* (2008) examinaron cuatro loci de microsatélites nucleares en seis refugios de *C. eremus* y en poblaciones silvestres (Río Sonoyta y manantial de Quitobaquito), donde encontraron que las poblaciones silvestres resultaron con mayor variabilidad genética. En otro estudio Loftis *et al.*, (2008) utilizaron siete loci de microsatélites y demostraron que hay una fuerte estructura genética en las poblaciones silvestres (Río Sonoyta y manantial de Quitobaquito) debido al aislamiento en las que se encuentran.

I.9. Estudios de microsatélites de otros peces cachorrito: *Cyprinodon* spp.

En general, en los estudios de microsatélites de peces dulceacuícolas en el Oeste del continente americano se espera que los niveles de diversidad genética sean bajos en comparación a las especies de latitudes más bajas (Adams y Hadley, 2013). Las diferencias en el número de

especies y loci evaluados pueden sesgar tales comparaciones, por lo cual la similitud de la variación genética puede explicarse en tres grupos. El primero, genes de las especies del norte están formadas por componentes que se originaron desde diferentes refugios glaciares, cada uno con su variación genética. El segundo, especies del norte tienen rangos de distribución relativamente grandes, lo que contribuye a la diferenciación regional, mientras que muchas especies neotropicales tienen rangos relativamente estrechos y, por lo tanto, tienen poco margen para la diferenciación regional y, por último el tercero a un nivel artificial (Hilsdorf y Hallerman, 2017). En la Tabla 1 se recopilan los estudios de microsatélites en diferentes especies del género *Cyprinodon* en los últimos 15 años.

Tabla 1. Estudios de microsatélites en especies del género *Cyprinodon*. H_o = heterocigosidad promedio observada, H_e = heterocigosidad promedio esperada, F_{st}/R_{st} = índices de diferenciación genética. Na = no aplica/información no disponible.

Autor(es)	Especie	Loci	H_o	H_e	F_{st}/R_{st}
Burg <i>et al.</i> (2002)	30 spp	21	Na	Na	Na
Strecker (2006)	<i>C. artifrons</i>	5	0.689	0.822	0.0091/0.0977
	<i>C. beltrani</i>	5	0.745	0.85	
	<i>C. esconditus</i>	5	0.731	0.788	
	<i>C. labiosus</i>	5	0.757	0.809	
	<i>C. maya</i>	5	0.725	0.789	
	<i>C. simus</i>	5	0.776	0.816	
	<i>C. verecundus</i>	5	0.789	0.848	
Turner <i>et al.</i> (2008)	<i>C. variegatus</i>	8	Na	0.28	0.177
Koike <i>et al.</i> (2008)	<i>C. eremus</i>	4	0.81	0.84	0.115
Loftis <i>et al.</i> (2008)	<i>C. eremus</i>	7	0.84	0.841	0.100
	<i>C. macularius</i>	7	0.886	0.9095	0.029
Martin (2010)	<i>C. nevadensis pectoralis</i>	10	0.26-0.81	0.41- 0.78	0.219
Martin <i>et al.</i> (2012)	<i>C. diabolis</i>	12	Na	0.60-0.88	Na
Carson <i>et al.</i> (2013)	<i>C. julimes</i>	25	0.105- 0.947	Na	Na
	<i>C. pachycephalus</i>	20	0.022-0.588	Na	Na
Finger <i>et al.</i> (2013)	<i>C. radiosus</i>	9	0.557	0.553	0.005 -0.100
Heivel y Stockwell (2017)	<i>C. tularosa</i>	13	0.3225	0.3237	0.394

II. HIPÓTESIS

La variabilidad genética y endogamia de las población silvestre y refugios de *Cyprinodon eremus* mostrarán cambios en comparaciones con los valores reportados, debido al aislamiento continuo que han tenido y su diferenciación genética podrá atribuirse al cuello de botella y efecto fundador.

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivo general

Evaluar la variabilidad genética y el grado de endogamia del pez cachorrito del Sonoyta, *Cyprinodon eremus*, en refugios y en la población silvestre en Sonora, México.

III.2. Objetivos específicos

1. Comparar la variabilidad genética microsatelital de las poblaciones de *C. eremus* en refugios y población silvestre en Sonora.
2. Evaluar el equilibrio genético actual de las poblaciones de *C. eremus* de los refugios y en la población silvestre en Sonora.
3. Estimar y comparar los niveles de endogamia entre cada población de los refugios y en la población silvestre en Sonora.
4. Determinar la existencia de cuellos de botella en cada uno de los refugios existentes y en la población silvestre en Sonora.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Descripción de los sitios de muestreos

IV.1.1. Río Sonoyta

La cuenca del Río Sonoyta (Figura 5) abarca aproximadamente 3,160 km² y representa un segmento interrumpido del sistema del Río Colorado. El drenaje se origina en la Sierra del Pozo Verde en México y cruza a los Estados Unidos donde gira al oeste a la nación Tohono O'odham al norte de la frontera internacional. En la parte alta de este drenaje, los arroyos Vamori y San Simón drenan en el Río Sonoyta antes de que cruce otra vez con México, 48 km al este de Sonoyta y continua aproximadamente 22 km al oeste paralelo a la frontera. El río gira al sur a lo largo del lado este del escudo volcánico del Pinacate, pasando a través del límite este del Gran Desierto y llegando al Mar de Cortez al este de Puerto Peñasco. Hoy el Río Sonoyta tiene una fuente perene en la localidad de El Papalote, entre los kilómetros 16 y 19 al oeste de Sonoyta (QSWG, 2011).

El clima que predomina en el área es de tipo muy seco BW, con lluvias en verano, invierno y escasas todo el año, subtipo muy seco semicálido, con lluvias en verano BWhw (x') (CONAGUA, 2015). De acuerdo con datos de las estaciones climatológicas localizadas en Puerto Peñasco, que corresponden a la región costera y al poblado Sonoyta, localizado en la porción media alta de la cuenca, las temperaturas máximas varían de 30° C a 43° C, las cuales se registran por lo general en verano y las mínimas de 9° C a 12° C, en invierno. La precipitación media anual es del orden de 135 mm con valores promedio del orden de 93.7 mm en Puerto Peñasco y 184.4 mm en Sonoyta, aunque en los últimos cinco años ha variado considerablemente, ya que para el periodo 1992-1996 la primera estación registró un volumen de precipitación medio anual de 74 mm, en tanto que la segunda registró un valor de 253 mm (CONAGUA, 2015).

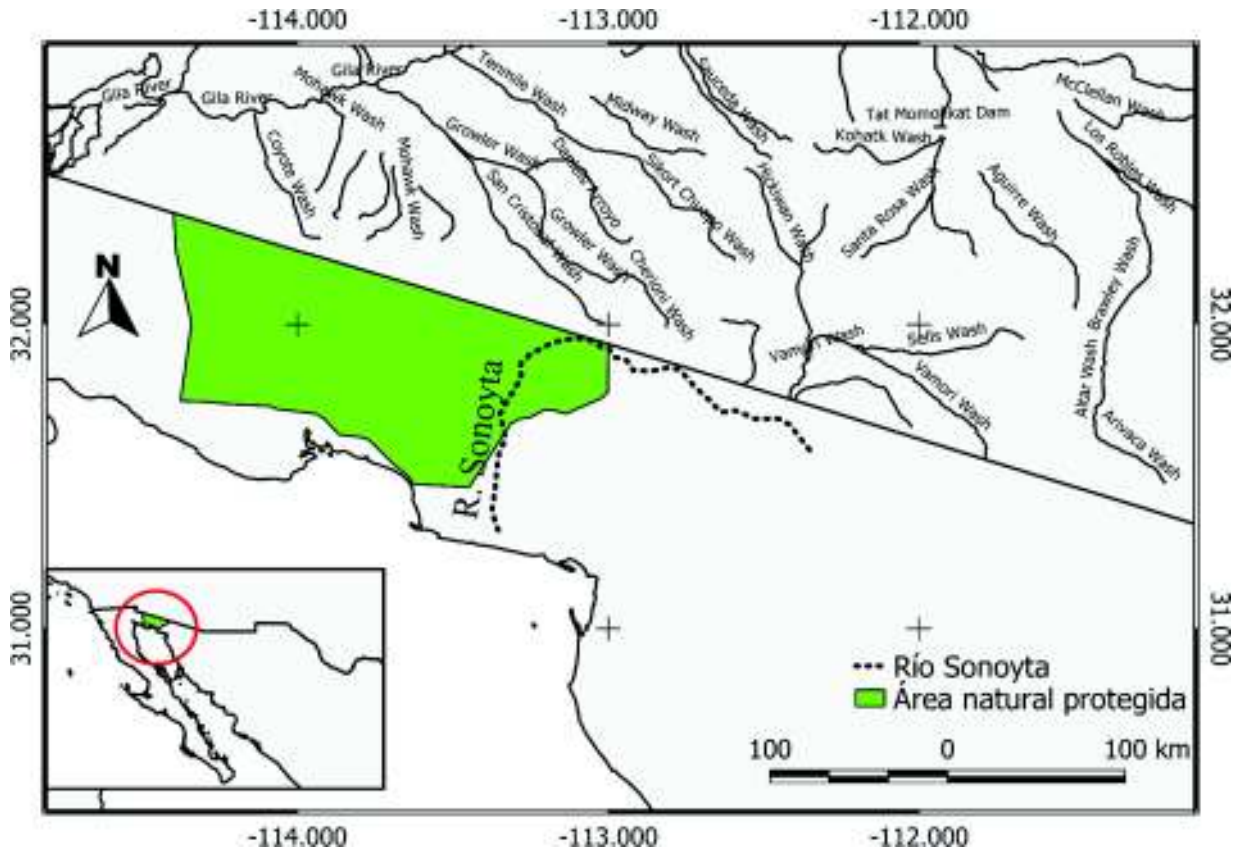


Figura 5. Cuenca del Río Sonoyta y sus principales tributarios.

IV.1.2. Refugios

La localización de los refugios de *C. eremus* en Sonora son un refugio en el Colegio de Bachilleres (COBACH/ 10 años) en Sonoyta, un refugio en la Estación Biológica de la Reserva de la Biósfera El Pinacate y Gran Desierto de Altar (11 años), uno en el Centro de Estudios de Desiertos y Océano A.C. (CEDO/ 11 años) en Puerto Peñasco (Minckley *et al.*, 2012) y uno en el Centro Ecológico de Sonora, en Hermosillo (~ 32 años).

IV.2. Recolecta de ejemplares y muestras de tejidos

Se realizó un muestreo de 30 individuos adultos del cachorrillo del Sonoyta, *C. eremus*, en cada uno de los refugios en Sonora. Además, se realizó un muestreo de 30 individuos para la población silvestre ubicada en la localidad del Papalote en el Río Sonoyta. La recolecta de

ejemplares se realizó bajo la autorización del Permiso de Pesca de Fomento PPF/DGOPA-023/18. En cada individuo se realizó un corte de la porción interna de la aleta pélvica y músculo del costado derecho del pez y fueron etiquetados individualmente y depositados en etanol absoluto. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Ecología Molecular del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS) y depositadas en la Colección de Tejidos mantenidas a 4° C. El resto de los ejemplares fue depositado en la Colección de Peces Nativos del DICTUS.

IV.3. Extracción de ADN

Se realizaron extracciones de ADN genómico a partir de 25 mg del tejido de las aletas o de músculo del costado lateral del cuerpo del cachorrito del Sonoyta por medio del kit QIAamp DNA Mini Kit de QIAGEN según las especificaciones del fabricante. Cada tejido fue homogenizado e incubado con proteinasa K a 56° C por 24 horas. La concentración y pureza del ADN fue evaluada con un espectrofotómetro Nano Drop 1000. Se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (1 µL/mL) para visualizar la integridad del ADN.

IV.4. Amplificación de microsatélites

Se amplificaron 10 loci de microsatélites marcados con fluróforos (Tabla 2) y reportados por Burg *et al.* (2002) y Koike *et al.* (2008) y las condiciones de los programas de amplificación se pueden observar en la tabla 3. Para la amplificación, se utilizaron temperaturas de alineamiento de 48°C y 51°C para el grupo A y de 52°C y 55°C para el grupo B y se prepararon reacciones de PCR de 25 µL con GoTaq® Colorless Master Mix cuyas concentraciones finales fueron 50 ng/µl de ADN genómico, 1 U de Taq polimerasa, 2X de buffer para PCR, 400 µM de dNTP, 0.2 µM de cada primer y 3 mM de MgCl₂. Las amplificaciones de los microsatélites se realizaron en 30 individuos de *C. eremus* para cada uno de los refugios en Sonora, y 30 individuos del río Sonoyta. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1 y hasta 3 % con el propósito de discriminar bandeos múltiples y su concentración se evaluó con el Nano Drop 1000. Los productos de PCR fueron diluidos a una concentración de 100 ng /µl, los cuales fueron

colocados en placas de 96 pozos con 10 μ l/individuo, previamente deshidratados y enviados al University of Arizona Genetic Core (UAGC) para la lectura de los fragmentos de PCR amplificados, bajo los estándares de GS500-ROX.

Tabla 2. Loci informativos de microsatélites utilizados por Burg *et al.* (2002) y Koike *et al.* (2008). *A* = número de alelos, pb = pares de bases.

Locus	pb	<i>A</i>	Fluóforos	5'3'	Secuencia
GATA 9	258-306	4	HEX	a	TCTTGGTGAAAAGGGACTATACG
				b	GCGTTCTCGAGCTTGTTTAG
GATA 10	214-242	4	HEX	a	TTTAAGGCTGTGGTCCAACCTG
				b	AGGTGAGAGACAGCGACTGG
GATA 20	311-343	4	NED	a	AATCATGGCGATGGAAAGAC
				b	AATGACACTTCACATCCAGCC
GATA 26	271-367	4	HEX	a	ACCTCTCAAGGCAAACAACG
				b	TCCCACGATAGCTCAGACG
GATA 39	252-308	4	HEX	a	CCTTAGGTGCCTGTGTGAGC
				b	TGGGAGGTGAACTAAAGATGC
GATA 73	349-389	3	NED	a	GGAGACGGTAATCTAGCCAGG
				b	TCCCCTACCACATAGAGAGGG
GATA 104	388-476	4	NED	a	CCATATTGCTCCCATAGCTG
				b	TTCGTCAATACCTTACATGCTG
GATA 130	233-333	3	HEX	a	CAGCTCACACACACACAAGC
				b	ATGGGTGGCTCACATAATGG
AC4	136-178	4	FAM	a	CTGCTGCAGTCTGCAC
				b	TCACCTCCAAGGTTAGTCAT
AC24	156-174	3	FAM	a	CCACCACTTAGTGTTCGAGT
				b	GGAGACGGTCACCTGAAACC

Tabla 3. Programa de amplificación de loci microsatelitales por PCR de *C. eremus*. T = temperatura. Grupo A = GATA 9, GATA 10, GATA 26, GATA 39, GATA 73, GATA 104, GATA 130 y AC24. Grupo B = GATA 20 y AC4.

Ciclos	Fase	T(°C)/Grupo A	T(°C)/Grupo B	Tiempo
1	Desnaturalización	95	95	120 segundos
5	Desnaturalización	94	94	30 segundos
	Alineación	48	52	30 segundos
	Extensión	72	72	30 segundos
35	Desnaturalización	94	94	45 segundos
	Alineación	51	55	45 segundos
	Extensión	72	72	60 segundos
1	Extensión final	72	72	120 segundos

IV.5. Lectura de alelos y pruebas de loci de microsatélites

Para el análisis de variabilidad de los microsatélites se realizó la lectura de alelos en el programa GeneMarker v.2.6.4 (SoftGenetics, State College, USA) bajo los parámetros de GS500-ROX. Para la matriz de alelos obtenida se evaluó la pérdida de alelos (alelos nulos) y el exceso de homocigotos y se realizaron correcciones a la matriz bajo el algoritmo de Oosterhout y Brookfield utilizando correcciones Bonferroni para ajustes de genotipos por locus (Apéndice 1) con el programa Micro-Checker v.2.2.3. (Oosterhout *et al.*, 2004).

Para determinar las condiciones de equilibrio genético de las poblaciones, se realizaron pruebas de la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg por locus y entre todos los loci, utilizando 100,000 pasos de cadenas de Markov en el programa Arlequín v.3.115.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010) y GenePop v.4.5.1 (Raymond y Rousset, 1995) con 1,000 iteraciones, respectivamente.

IV.6. Parámetros de variabilidad genética

Se determinó el polimorfismo o PIC (Índice de Contenido Polimórfico) con Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007). La heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e), número de alelos (A), alelos por locus (A/L) fueron evaluados con GenAlEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012), y el número de alelos nulos (A_n) se obtuvo con Micro-Checker v.2.2.3.

(Oosterhout *et al.*, 2004). Además, las frecuencias alélicas-genotípicas se obtuvieron para todos los loci en cada una de la población silvestres y refugios del pez cachorrillo del Sonoyta, usando el programa computacional GenePop v.4.5.1 (Raymond y Rousset, 1995). Para la probabilidad de identidad (PI) se determinó el estimador por locus utilizando el software Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) y GenAlEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012) por población. Este estimador evalúa la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar en una población presenten lo mismo genotipos en un locus, usando la expresión matemática de la figura 6. Además, para la heterocigosis observada (H_o) y la heterocigosis esperada (H_e) se utilizó una prueba t de student para determinar P entre ambos estimadores y se utilizó la corrección de Bonferroni para reducir el error tipo I (rechazar una hipótesis nula verdadera) utilizando Minitab v.18.1.

$$PI = \sum_i p_i^4 + \sum_i \sum_{j>i} (2p_i p_j)^2$$

Figura 6. Expresión matemática de la Probabilidad de identidad. Donde p_i y p_j son las respectivas frecuencias de los i -ésimos y j ésimos alelos encontrados en la población.

IV.7. Diferenciación genética e índice de endogamia

Se obtuvo el índice de diferenciación genética (R_{st}) utilizando la frecuencia de los tamaños de los fragmentos de cada alelo para cada locus en todas las poblaciones silvestre y refugios con GenAlEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012). El índice de endogamia (F_{is}) se calculó utilizando la H_o y H_e para todos los loci de cada una de las población silvestre y refugios con GenePop v.4.5.1 (Raymond y Rousset, 1995). Para ambos índices (R_{st} y F_{is}) se evaluó la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg (Cockerham, 1973; Weir y Cockerham, 1984) y se realizaron pruebas de significancia a través de un análisis de AMOVA con el programa informático Arlequín v.3.5.2.2 (Excoffier y Lischer, 2010).

IV.8. Análisis de cuellos de botella

Para determinar la presencia de posibles cuellos de botella en la población silvestre y en los refugios se utilizó el paquete informático Bottleneck 1.2.0.2 (Piry *et al.*, 1999), usando la heterocigosidad esperada de cada locus para la prueba de signos y la de Wilcoxon que usa tres modelos de mutación: modelo de alelos infinitos (IAM: Infinite Allele Model), modelo de dos fases (TPM: Two Phase Model) y el modelo de mutación por pasos (SMM: Stepwise Mutation Model). Para el modelo TPM se fijó en el programa una probabilidad de 95 % y una varianza de 12. Estos parámetros permiten una distribución geométrica más uniforme y sensible para los microsatélites (Piry *et al.*, 1999; Cristescu *et al.*, 2009). Adicionalmente, se utilizó otro indicador de cuello de botella que señala que si las distribuciones de las frecuencias alélicas se asemejan a un modelo de tipo L (cambio de moda), la población se encuentra en un escenario de equilibrio de mutación-deriva. Por el contrario, si la distribución se desvía de un tipo L, indica un evento reciente de un cuello de botella. Por lo tanto, para la población silvestre y cada uno de los refugios se utilizó 1,000 iteraciones en el análisis (Piry *et al.*, 1999).

V. RESULTADOS

V.1. Amplificación de microsatélites y lectura de alelos de *Cyprinodon eremus*

Se amplificaron 30 individuos de la población silvestre y 30 de cada uno de los cuatro refugios, de las cuales se obtuvieron 1,179 lecturas de alelos entre los diez loci microsatelitales. Solamente 21 individuos no amplificaron en un locus y se muestran en la tabla 4 con los loci fallidos. Por otra parte, se obtuvieron tamaños de alelos desde 89 pb hasta 382 pb (alelo de mayor tamaño) entre los loci analizados (Figura 7). Los alelos de mayor tamaño y más frecuentes fueron de 249-289 pb, a diferencia de los alelos de 169-209 que presentaron menor frecuencia. Sin embargo, se obtuvo un grupo de alelos con menor tamaño mencionado, pero con una mayor frecuencia (Figura 7).

Tabla 4. Amplificaciones y lecturas microsatélites fallidas en individuos de *C. eremus*. CES = Centro Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, RS: Río Sonoyta.

Locus	Poblaciones			
	CES	CEDO	CB	RS
GATA 9	0	0	1	0
GATA 10	1	5	0	1
GATA 20	0	1	0	1
GATA 26	0	0	1	0
GATA 39	0	0	2	1
GATA 73	0	1	0	1
GATA 104	0	0	0	0
GATA 130	0	0	0	0
AC4	0	1	2	2
AC24	0	0	0	0
Total, de individuos fallidos	1	8	6	6

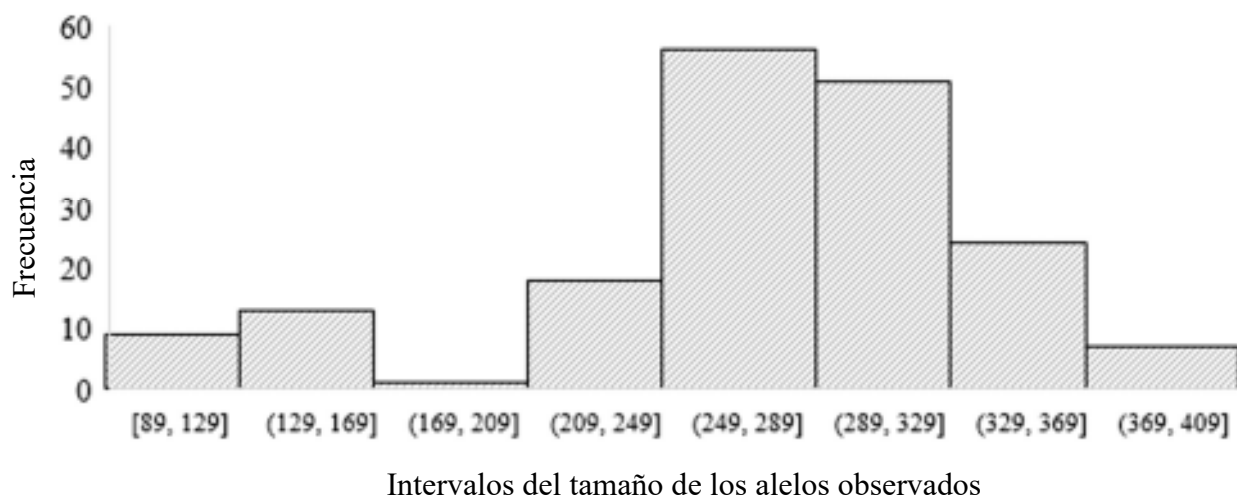


Figura 7. Intervalos y frecuencias del tamaño de los alelos observados para los 10 loci microsatelitales de refugios y población silvestre de *C. eremus*.

V.2. Evaluación de homocigotos y alelos nulos

Se detectaron seis loci de microsatélites con exceso de homocigotos y cuatro loci (GATA 26 y GATA 130 con deficiencia de homocigotos entre todas las poblaciones (Tabla 5). La población CES presenta mayor homocigosis entre todas las poblaciones con un promedio de 11.9 al contrario de la población CEDO donde presentó una media de 8.7 homocigotos (Tabla 5). Cabe mencionar que en CB y RS se observó una deficiencia de homocigotos significativa entre todos los loci. Por otra parte, el locus con el mayor número de homocigotos detectado entre todos los loci fue GATA 130, a pesar de que se encuentra bajo una deficiencia de homocigotos con una media de 19.5, contrario al GATA 9 que fue el locus con el menor número de homocigotos encontrados (Tabla 5). Por último, el programa Microchecker determinó que los loci GATA 20 (RS) y GATA 104 (CB) tienen presencia de alelos nulos y fueron analizados bajo el algoritmo Brookfield. Ambos loci mostraron una frecuencia de 0.081 y 0.083 respectivamente (Apéndice I).

Tabla 5. Número de homocigotos observados con Microchecker de 10 loci microsatelitales de refugios y población silvestre de *C. eremus*. Homocigotos observados/Homocigotos esperados. *locus con presencia de alelos nulos. Los valores en negritas son deficiencia o exceso de homocigotos. CES = Centro Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, RS: Río Sonoyta.

Locus	Refugios y Población silvestre				Media
	CES	CEDO	CB	RS	
GATA 9	9/8.0	6/2.6	5/1.9	7/3.6	6.7/4.0
GATA 10	14/9.2	6/2.9	10/5.8	9/5.32	9.7/5.8
GATA 20	10/6.58	7/3.24	10/5.58	7/3.08*	8.5/4.62
GATA 26	8/7.41	9/9.73	8/9.31	7/9.61	8/9.01
GATA 39	9/8.01	6/4.61	7/3.66	8/5.56	7.5/5.46
GATA 73	9/7.03	8/5.29	8/4.73	9/4.63	8.5/5.42
GATA 104	13/13.61	8/7.29	10/6.43*	10/5.46	10.25/8.19
GATA130	24/24.44	19/20.44	22/22.86	13/16.53	19.5/21.03
AC4	14/13.66	7/5.13	8/3.37	6/5.39	8.75/6.87
AC24	9/12.81	11/13.44	14/11.58	15/14.06	12.25/12.97
Media	11.9/11.07	8.7/7.47	10.2/7.52	9.1/7.33	

V.3. Parámetros de variabilidad genética de *Cyprinodon eremus*

V.3.1. Índice de contenido polimórfico (PIC)

Se encontró que todos los loci fueron polimórficos. El intervalo obtenido fue desde 4 a 29 alelos entre todas las poblaciones y los loci. Nueve loci presentaron deficiencia de heterocigotos, excepto GATA 130 (exceso de heterocigotos). De acuerdo con la clasificación de Botstein *et al.* (1980), tan solo ocho microsatélites presentan valores altamente polimórficos (> 0.7), mientras que los loci GATA 130 y AC24 son polimórficos (> 0.2) en el PIC (Tabla 6). Por otra parte, GATA 9 fue el microsatélite más polimórfico en el contexto del número de alelos observados para dicho locus. No obstante, su PIC es menor en comparación al GATA 20 que fue de 0.932, siendo este el locus con mayor valor de PIC (Tabla 6). Cabe mencionar que AC24 fue el locus con menor número de alelos observados, no obstante, su PIC fue superior al de GATA 130, a pesar de que este locus tiene más alelos observados (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros de diversidad genética e índice de contenido polimórfico (PIC) por locus en refugios y población silvestre de *C. eremus*. At = total de alelos observados, N = número de individuos analizados, H_o = heterocigosidad observada por locus, H_e = heterocigosidad esperada por locus, PIC = índice de contenido polimórfico.

Locus	At	N	H_o	H_e	PIC
GATA 9	29	119	0.773	0.937	0.929
GATA 10	19	113	0.655	0.852	0.836
GATA 20	28	118	0.72	0.94	0.932
GATA 26	23	119	0.731	0.739	0.721
GATA 39	22	117	0.744	0.918	0.908
GATA 73	25	118	0.712	0.909	0.898
GATA 104	10	120	0.658	0.823	0.797
GATA 130	6	120	0.35	0.309	0.291
AC4	13	115	0.687	0.86	0.841
AC24	4	120	0.592	0.64	0.58

V.3.2. Alelos por locus, heterocigosidad observada y esperada, frecuencias alélicas y frecuencias genotípicas

Se encontró que el refugio CB es el más diverso en el número de alelos observados con un valor de 10.2 alelos por locus (A / L) y mientras que el CES es la menos diversa con 5.8 A/L entre todas las poblaciones analizadas (Tabla 7). Se observó una heterocigosidad observada (H_o) desde 0.602 a 0.703, únicamente las poblaciones CB y RS presentaron deficiencia en la H_o significativo, después de las correcciones Bonferroni estas poblaciones ya no presentaron significancia. (Tabla 7). Por otra parte, el refugio CEDO obtuvo la mayor H_o y mientras que el CES fue con la menor (Tabla 7). Cabe mencionar que la población del RS (población silvestre) cuenta con 9.9 alelos por locus con una H_o de 0.691 superando a CB. Por último, fueron dos alelos nulos para el refugio CB y uno para RS (Tabla 7).

El análisis de frecuencias alélicas mostró que solo siete loci microsatelitales presentaron 17 alelos comunes entre todas las poblaciones. Los alelos comunes y más frecuentes son: Para el locus GATA 9 fue el alelo 266 pb y 304 pb, los cuales fueron más frecuentes en CEDO y CES, respectivamente (Figura 8). En GATA 10 (Figura 8) los alelos 274 pb (CEDO), 286 pb y 290 pb (CES); GATA 26 (Figura 9) el alelo 260 pb (CEDO); para GATA 104 fueron los alelos 358 pb (RS) y 370 pb (CES). En GATA 130 (Figura 10) se observó que fueron los alelos 122

pb (CEDO) y 130 pb (CES); en AC4 (Figura 11) fueron los alelos 128 pb y 158 pb (CES), 160 pb (CEDO), y 162 pb (CB). Por último, en el locus AC24 (Figura 11) fueron los alelos 125 pb (CES y CEDO), 130 pb (CES) y 150 pb (RS). Por otra parte, los loci GATA 20, GATA 39 (Figura 9) y GATA 73 (Figura 10), a pesar de que no mostraron alelos comunes entre todas las poblaciones, si mostraron al menos uno o más alelos comunes entre los refugios (CES, CEDO y CB) y refugios (al menos uno o dos) con la población silvestre del Río Sonoyta.

En el estudio de las frecuencias genotípicas se detectó un promedio de 40.9 genotipos por locus de los diez loci microsatélites analizados (Apéndice II). Se observó desde seis hasta 70 genotipos entre los diez loci analizados y entre las poblaciones. El locus GATA 20 resultó con el mayor número de genotipos observados (Apéndice II) y GATA 130 fue el menos diverso. El refugio en CEDO tiene una media de 20.5 genotipos heterocigotos por locus, ocupando el segundo lugar la población silvestre (RS: 20.3) por lo que fueron las poblaciones con mayor variabilidad genotípica (Figura 12). A pesar de que se encontró una gran diversidad genotípica entre todas las poblaciones, solamente tres loci (GATA 104, GATA 130 y AC4) presentan genotipos comunes o compartidos al menos con una a tres poblaciones, sobrepasando más del 50% de los genotipos observados para dicho locus (Figura 13), mientras que el resto de los loci, presentaron bajos porcentajes desde 10 hasta 37.1 % (Figura 13). Por otra parte, el porcentaje de genotipos únicos fue 11.1 - 90 % de los genotipos observados, destacando a GATA 20, GATA 26, GATA 39 y GATA 73, como los loci con el mayor contenido de genotipos únicos dentro de las poblaciones (Figura 13).

Tabla 7. Parámetros de variabilidad genética poblacional en *Cyprinodon eremus* de cuatro poblaciones de Sonora. A = número de alelos observados, A/L = alelos por locus, An = alelos nulos, H_o = heterocigosidad observada, H_e = heterocigosidad esperada, P = probabilidad de significancia entre diferencia de medias de H_o y H_e . P_c = valor de significancia con correcciones Bonferroni ($0.05/4 = 0.0125$).

Poblaciones	A	A/L	An	H_o	H_e	P	P_c
CES	58	5.8	0	0.602	0.630	0.721	0.1802
CEDO	100	10	0	0.703	0.747	0.551	0.1377
CB	102	10.2	2	0.655	0.745	0.281	0.0702
RS	99	9.9	1	0.691	0.752	0.296	0.074

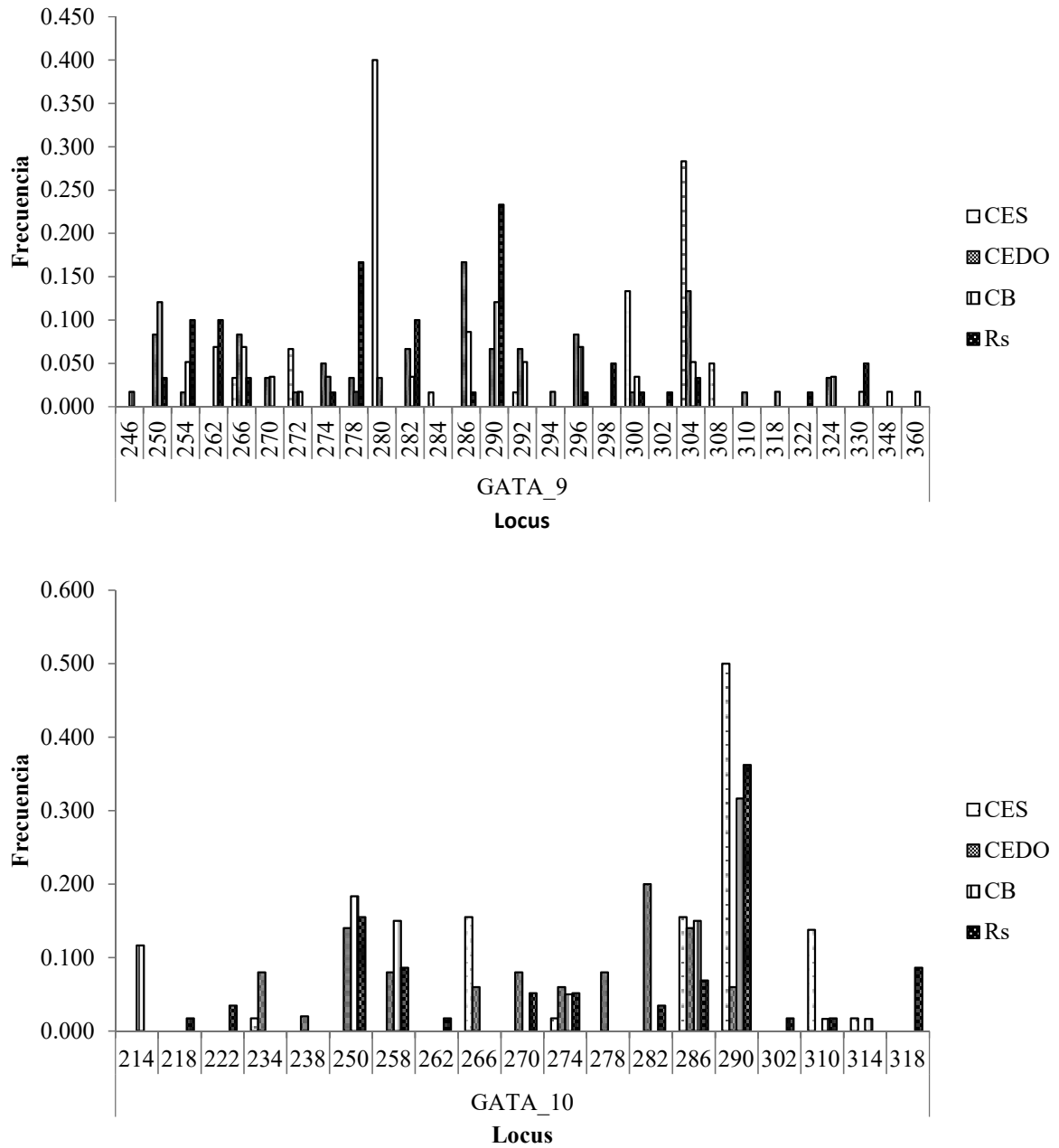


Figura 8. Frecuencias alélicas para los microsatélites GATA 9 y GATA 10. CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, RS = Río Sonoyta.

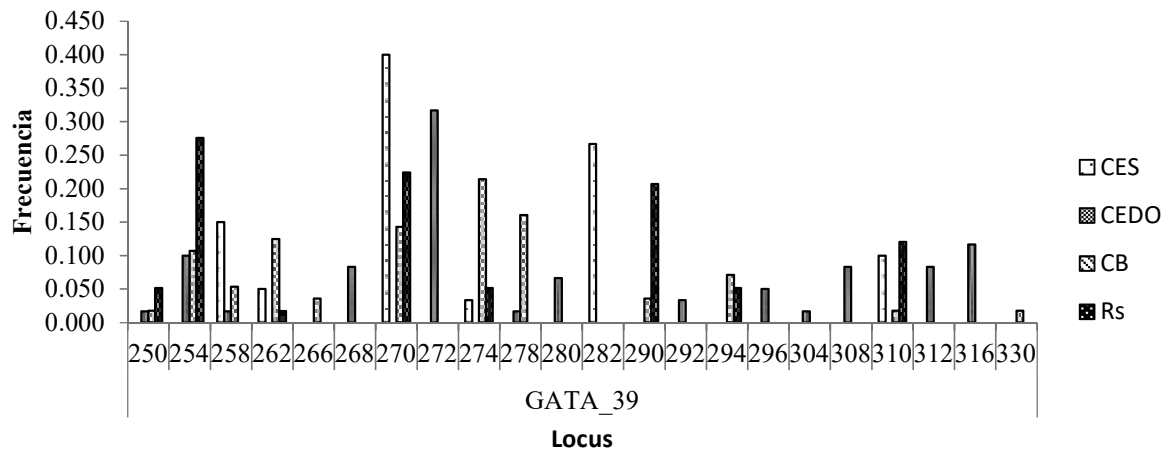
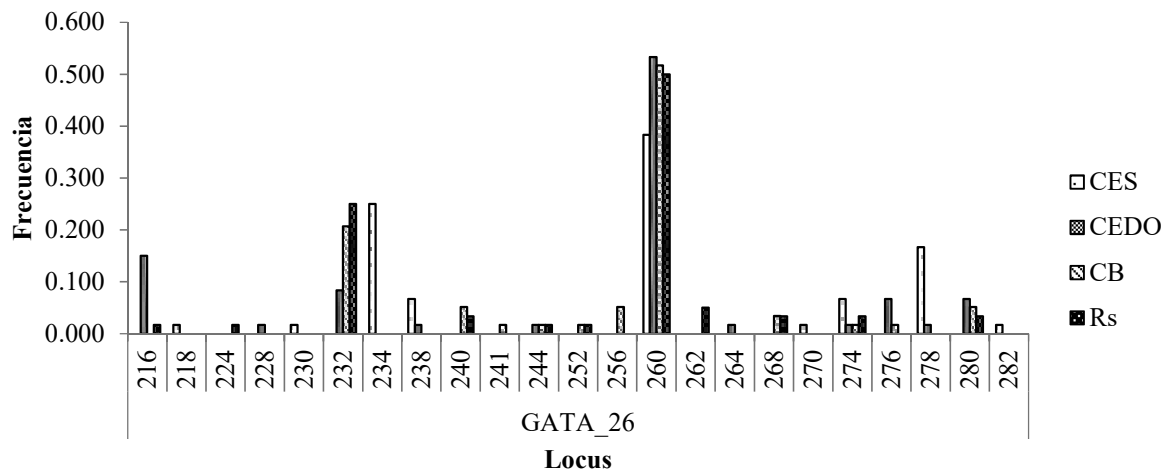
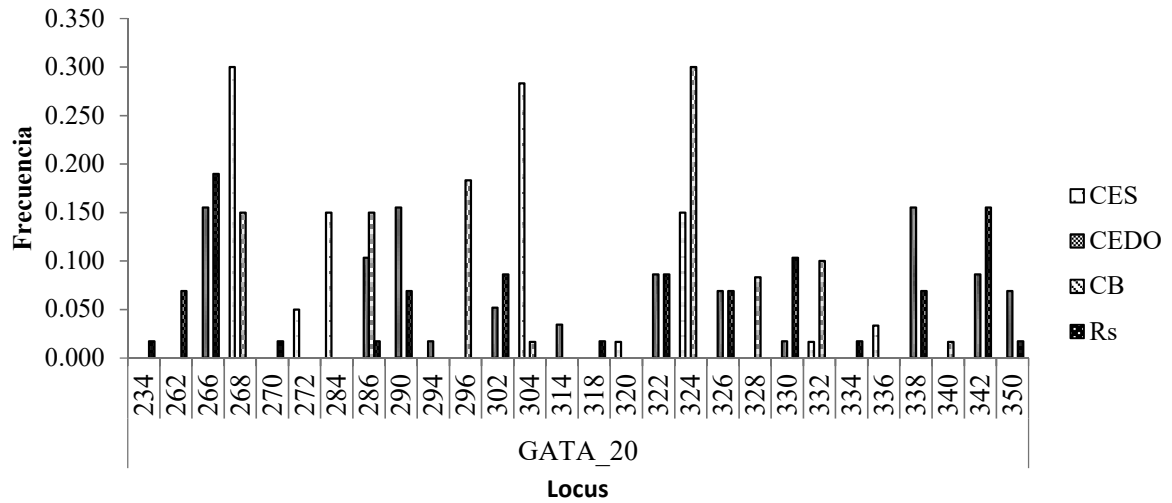


Figura 9. Frecuencias alélicas para los microsatélites GATA 20, GATA 26 y GATA 39. CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, RS = Río Sonoyta.

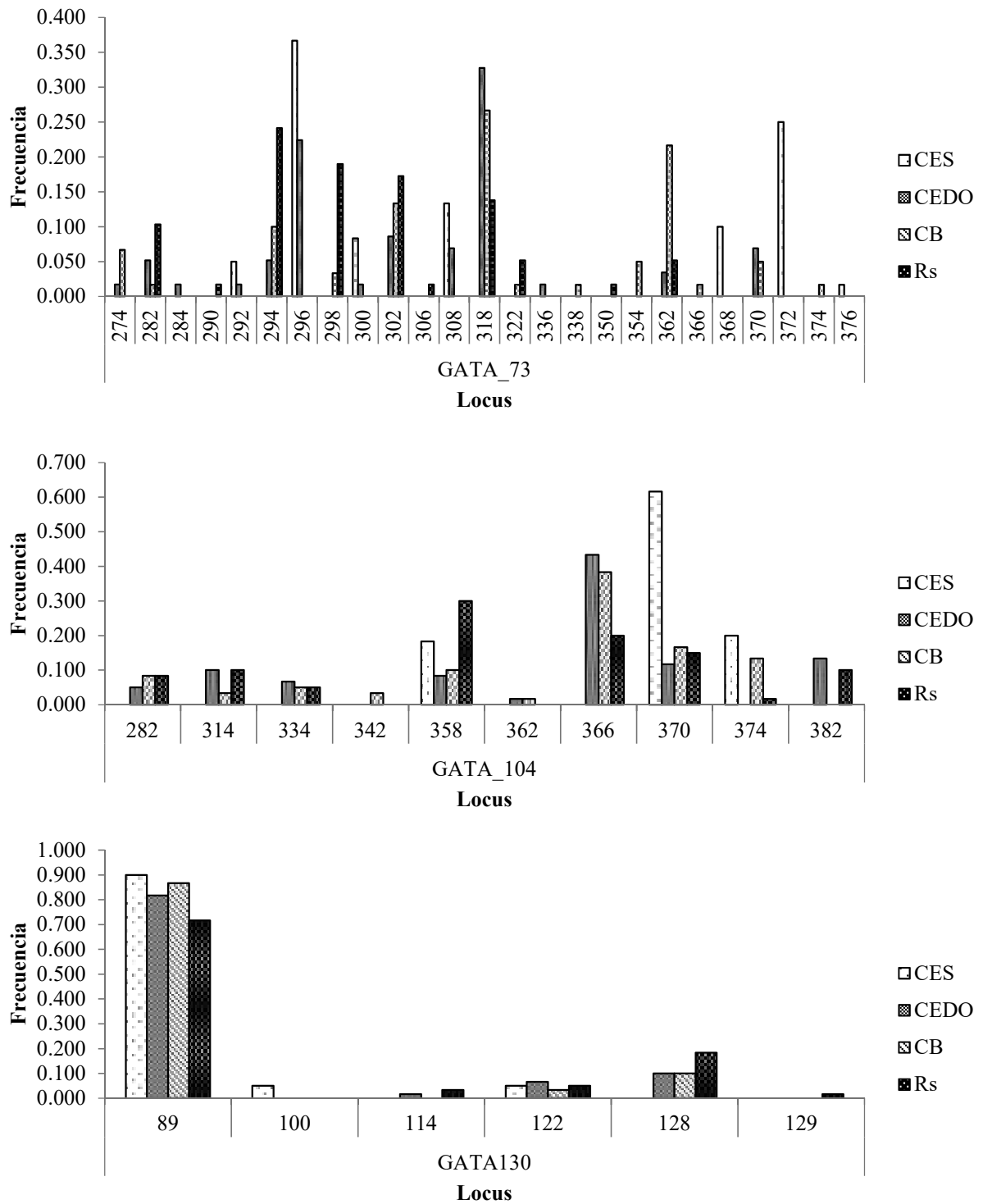


Figura 10. Frecuencias alélicas para los microsatélites GATA 73, GATA 104 y GATA 130. CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, RS = Río Sonoyta.

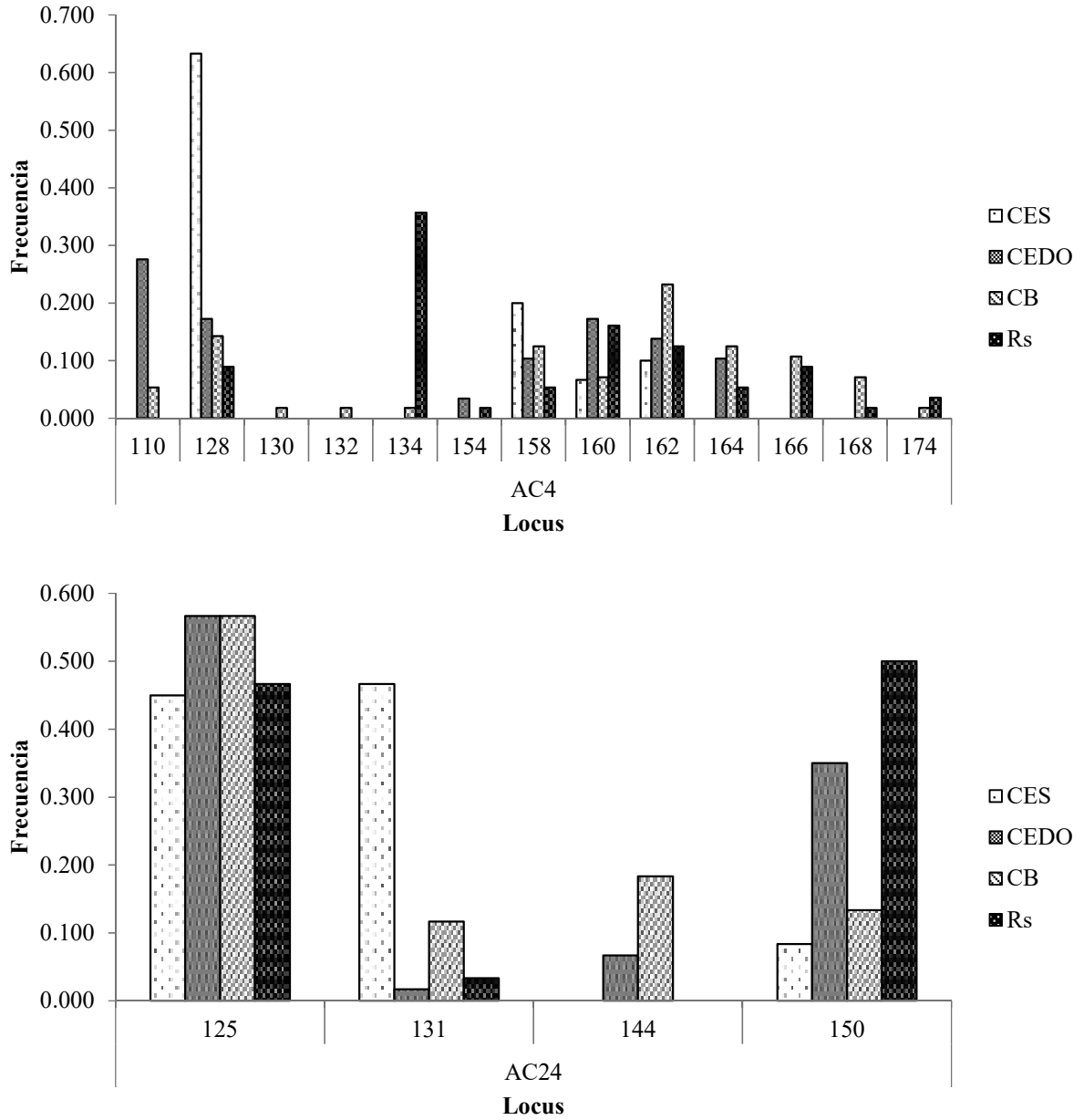


Figura 11. Frecuencias alélicas para los microsatélites AC 4 y AC 24. CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, RS = Río Sonoyta.

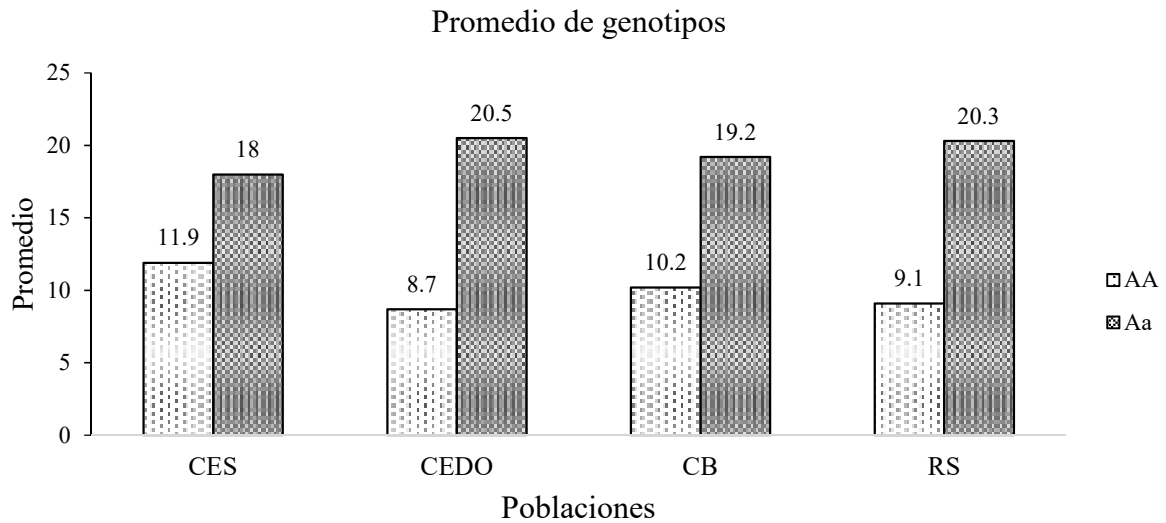


Figura 12. Promedio de genotipos por poblaciones. CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, RS = Río Sonoyta. AA = media de genotipos homocigotos, Aa = media de genotipos heterocigotos.

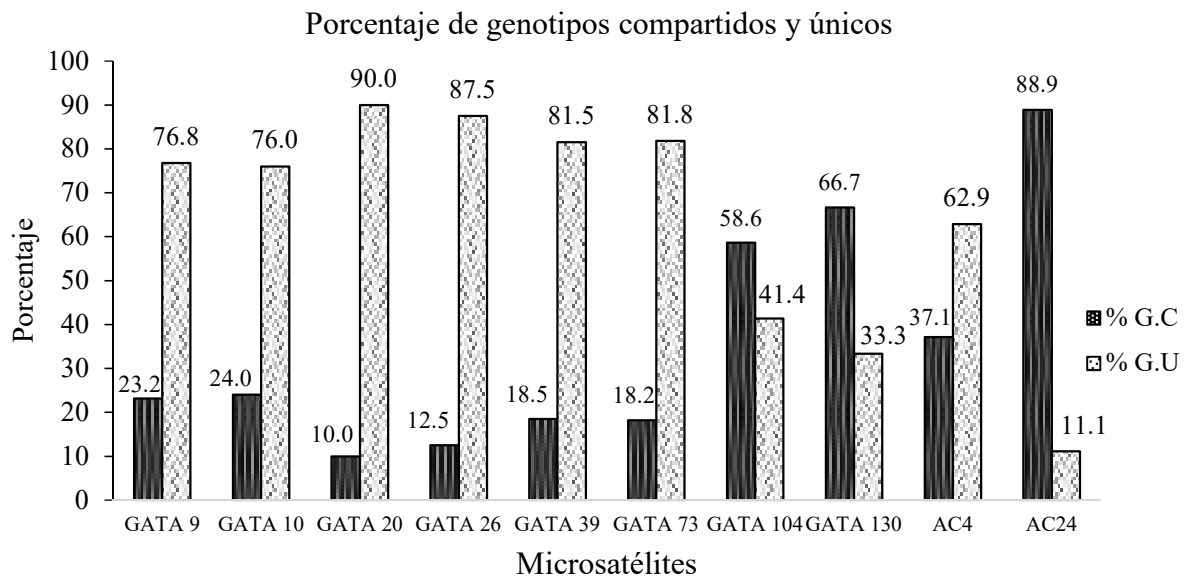


Figura 13. Porcentajes de genotipos observados/compartidos o únicos entre los loci microsatelitales entre poblaciones. % GC = porcentaje de genotipos comunes o compartidos al menos con una a tres poblaciones, % GU = porcentaje de genotipos únicos.

V.3.3. Probabilidad de identidad

Se detectó una probabilidad de identidad (PI) de 0.008 a 0.496 entre los loci, donde se observó que el GATA 130 tiene la mayor de probabilidad de encontrar dos individuos al azar con el mismo genotipo en todas las poblaciones analizadas. Además, dicho locus destaca valores de PI de 0.342- 0.672 entre las poblaciones y entre el resto de los loci del presente estudio (Apéndice III). Los loci GATA 9 y GATA 20, obtuvieron los mismos valores probabilísticos que resultaron iguales entre los refugios y la población silvestre. Cabe mencionar que la población del CES obtuvo ocho loci con el PI más alto entre todas las poblaciones, excepto en los loci GATA 26 y AC24. Por otra parte, los refugios CEDO, CB y la población silvestre (RS) obtuvieron valores de PI muy similares en todos los loci (Apéndice III).

V.4. Equilibrio genético

Para las desviaciones del equilibrio de Hardy - Weinberg (HW), se detectó que múltiples loci presentaron valores significativos (Tabla 8). Diez de las 40 pruebas indican significancia al nivel de $P < 0.05$. Esto es bastante más que la expectación ($0.05 * 40 = 2$) basado en una tasa de error Tipo I de 0.05. De la manera similar, se esperará menos que una deficiencia entre las 10 pruebas por cada una de las poblaciones /individuos ($0.05 * 10 = 0.5$). Al contrario, las deficiencias ocurrieron en todas las poblaciones, tales como: CES, 1; CB, 2, CEDO, 3; y RS, 4. Se concluye que los datos incluyen deficiencias significativas, como indicado por el cálculo usando todas las loci por cada población (Tabla 8).

Tabla 8. Valores de significancia de la prueba de chi-cuadrada de equilibrio genético de Hardy-Weinberg por locus y entre loci. Los valores en negritas son significativos e indican un locus o población fuera del equilibrio $P < 0.05$. P_{HW} = valores de significancia de las desviaciones de HW entre los loci por población. CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, RS = Río Sonoyta.

Locus	CES	CEDO	CB	RS
GATA 9	0.334	0.005	0.040	0.059
GATA 10	0.102	0.121	0.075	0.052
GATA 20	0.374	0.396	0.085	0.015
GATA 26	0.001	0.003	0.458	0.094
GATA 39	0.291	0.095	0.091	0.007
GATA 73	0.455	0.001	0.096	0.219
GATA 104	0.201	0.159	0.112	0.042
GATA 130	1.000	1.000	1.000	0.705
AC4	0.010	0.147	0.008	0.014
AC24	0.305	0.827	0.596	0.858
P_{HW}	0.023	0.001	0.003	0.0000

V.5. Diferenciación genética (R_{st}) e índice de endogamia (F_{is})

El análisis de la diferenciación genética a través del índice R_{st} entre todas las poblaciones revela valores de poca a moderada diferenciación (0.016 a 0.130). El R_{st} entre el CES con el resto de las poblaciones resultaron valores moderados, mientras que el resto de las comparaciones son valores de poca diferenciación (Tabla 9). Por otra parte, se detectaron valores significativos en el R_{st} (Tabla 9, $P < 0.05$) entre todas las poblaciones, excepto entre el refugio artificial CEDO y la población silvestre (RS) con una diferenciación genética moderada ($P = 0.061$).

El coeficiente de endogamia (F_{is}) indica que todas las poblaciones presentan un exceso de homocigotos ($F_{is} > 0$). Se observaron valores de 0.19 a 0.31, teniendo la población silvestre (RS) el mayor grado de endogamia, mientras que el refugio del CEDO registró el menor grado registrado (Tabla 9). Por otra parte, las poblaciones de los refugios de CES y CB presentaron valores de endogamia muy similares.

Tabla 9. Índices de fijación: coeficiente de endogamia (F_{is}) y diferenciación genética (R_{st}) de refugios y población silvestre de *C. eremus*. Los valores debajo de la diagonal son valores de diferenciación R_{st} . Los valores encima de la diagonal son valores de significancia (significativos en negritas $P < 0.05$). CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, RS = Río Sonoyta.

Población	Matriz de diferenciación genética				Coefficiente de endogamia
	CES	CEDO	CB	RS	F_{is}
CES		0.001	0.001	0.001	0.2643
CEDO	0.115		0.004	0.061	0.1933
CB	0.097	0.036		0.002	0.282
Rs	0.130	0.016	0.046		0.3084

Valores de significancia para R_{st} : 0-0.05 poca, 0.05-0.15 moderada, 0.15 -0.25 grande, >0.25 muy grande.

Para los índices de fijación R_{st} y F_{is} descritos en el presente estudio, se observaron valores globales de 0.07 y 0.263, respectivamente. Ambos índices mostraron valores muy significativos en el análisis de AMOVA (Tabla 10, $P < 0.001$). Para el R_{st} se demostró que el origen de la variación esta explicada dentro de las poblaciones con un 92%, y para el coeficiente de endogamia F_{is} , su origen se explica dentro de los individuos con un 68 % (Tabla 10).

V.6. Análisis de cuellos de botella

El programa BOTTLENECK detectó señales de cuellos de botella solamente en la población de CES, y para este en dos pruebas (Tablas 11 y 12): la prueba de signo ($P = 0.03$) y la prueba Wilcoxon con el modelo de alelos infinitos (IAM; $P = 0.01$). Estos significan un exceso de heterocigotos basado en expectativas teóricamente desde el número de alelos lo que pasa con cuellos de botella. El análisis gráfico de las frecuencias alélicas (Figura 14), demostró que, para cada población, sus alelos conforman con una estructura de forma de L, lo cual sugiera que ningún refugio artificial ni la población silvestre han tenido un evento de cuello de botella.

Tabla 10. Análisis de varianza molecular (AMOVA). % = porcentaje de variación. SM = suma de cuadrados. R_{st} = índice de diferenciación genética. F_{is} = coeficiente de endogamia. A = AMOVA para R_{st} , B = AMOVA para F_{is} . P = valores de significancia.

A			B		
Origen de la variación	S.M.	%	Origen de la variación	S.M.	%
Entre el grupo de los refugios y la población natural	20182.1	0	Entre refugios y población natural	20182.119	0
Entre poblaciones sin grupos	50056.61	8	Entre poblaciones (refugios y población natural)	50056.613	8
Dentro de las poblaciones	931984.7	92	Entre los individuos dentro de las poblaciones	580766.2	24
			Dentro de los individuos	351218.5	68
Índices de fijación	Valores globales	P			
R_{st}	0.07	0.001			
F_{is}	0.263	0.001			

Tabla 11. Valores de significancia de la prueba de signo del análisis de cuello de botella de refugios y población silvestre de *C. eremus*. IAM = Modelo de alelos infinitos, TPM = Modelo de dos fases, SMM = Modelo de mutación por pasos, CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, RS = Río Sonoyta, Valores en negrita son señales de presencia de cuello de botella.

Población	Prueba de signo		
	IAM	TPM	SMM
CES	0.031	0.167	0.060
CEDO	0.371	0.172	0.182
CB	0.145	0.623	0.180
RS	0.379	0.187	0.068

Tabla 12. Valores de significancia de la prueba de Wilcoxon del análisis de cuello de botella de refugios y población silvestre de *C. eremus*. IAM = Modelo de alelos infinitos, TPM = Modelo de dos fases, SMM = Modelo de mutación por pasos, A = deficiencia de heterocigotos, B = exceso de heterocigotos, C = deficiencia o exceso de heterocigotos, CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, RS = Río Sonoyta. Valores en negrita significativos ($P < 0.05$).

Población	Prueba de Wilcoxon								
	IAM			TPM			SMM		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
CES	0.99	0.012	0.024	0.137	0.883	0.275	0.08	0.934	0.16
CEDO	0.88	0.137	0.275	0.161	0.862	0.322	0.116	0.903	0.232
CB	0.934	0.08	0.16	0.278	0.753	0.556	0.187	0.838	0.375
RS	0.903	0.116	0.232	0.096	0.919	0.193	0.052	0.958	0.105

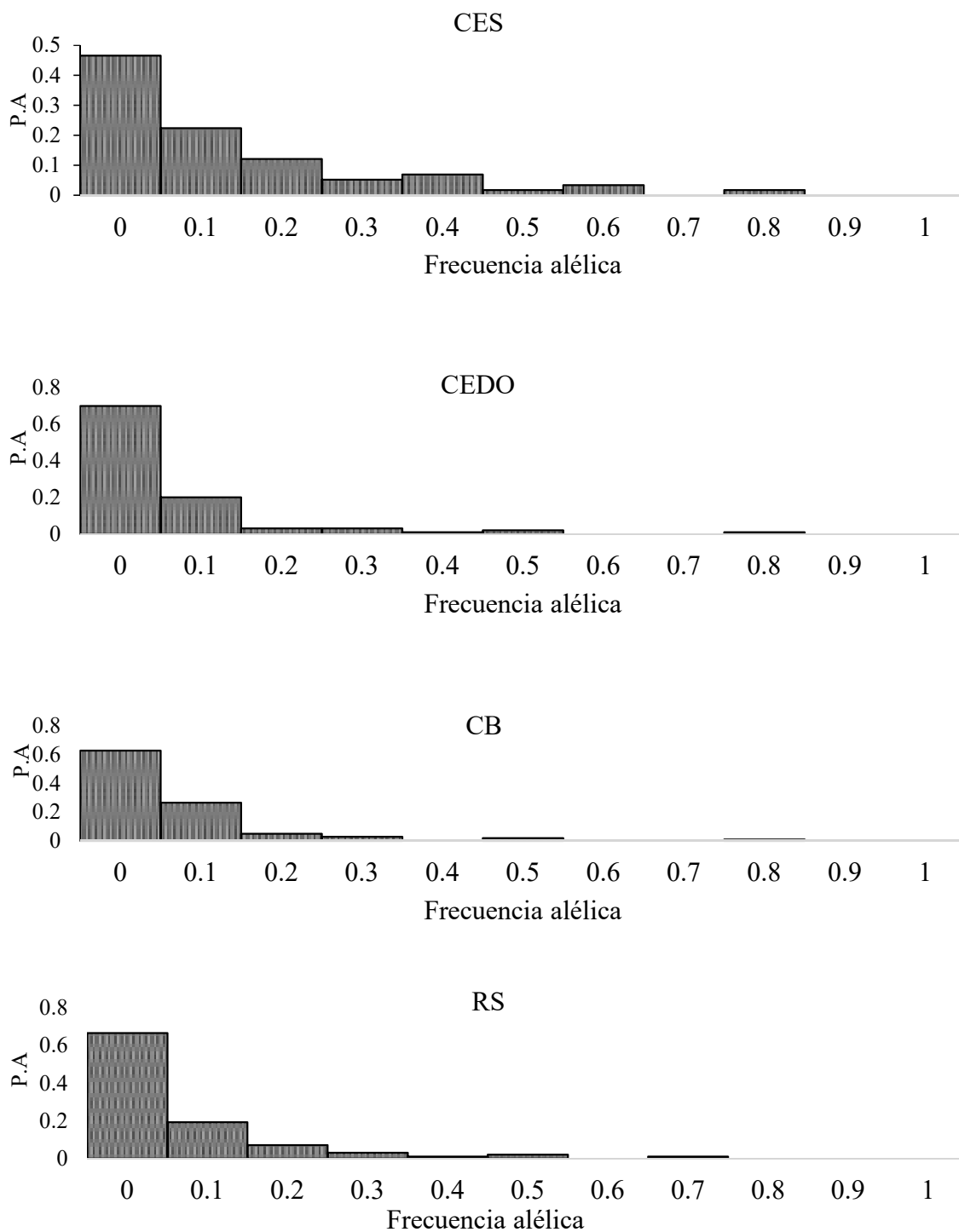


Figura 14. Análisis de cuello de botella - cambio de moda. PA = proporción de alelos, CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, RS = Río Sonoyta.

VI. DISCUSIÓN

VI.1. Parámetros de variabilidad genética de *Cyprinodon eremus*: Índice de contenido polimórfico (PIC) y parámetros poblacionales

Los loci analizados en el presente estudio y el índice de contenido polimórfico (PIC) para cada locus mostraron un número de alelos superior a los reportados por Burg *et al.* (2002). La diferencia aparentemente se debe primero a que los microsatélites fueron diseñados a partir del genoma de *Cyprinodon diabolis*, cuya especie tiene una población pequeña y una deriva genética fuertemente, por lo cual no es genéticamente cercana a la especie del presente estudio. A pesar de esto, la comparación del PIC se basó principalmente en el número de alelos reportados por locus del presente trabajo contra la especie genéticamente más cercana que es *C. macularius* de acuerdo a Echelle *et al.* (2000). A pesar de que difieren en el número de alelos en cada locus y en sus tamaños, estos se encuentran dentro o fuera del tamaño de alelos observados. Por ejemplo, para GATA 9 se encontró un total de veintinueve alelos entre todas las poblaciones. Sin embargo, todos los tamaños de los alelos observados para dicho locus están dentro del intervalo de 246 a 360, y son muy similares a los reportados para *C. macularius* mencionados por Burg *et al.* (2000), esto posiblemente se deba a la inespecificidad del microsatélite. Además, las regiones que flanquean a los microsatélites son fuertemente conservadas, incluso en especies filogenéticamente distantes, de modo que se puede considerar que el polimorfismo es informativo (Vieira *et al.*, 2016).

El índice de contenido polimórfico de todos los loci los clasifica como muy informativos de acuerdo con Botstein *et al.* (1980). No obstante, no existen trabajos previos que evalúen el PIC de otras especies de *Cyprinodon*. A pesar de la inexistencia de este análisis, el índice es directamente proporcional a la heterocigosidad observada (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005). En otros estudios (Strecker, 2006; Martin, 2010; Finger *et al.*, 2013) se han reportado valores de heterocigosidad observada similares a los del presente estudio, al igual en el número de alelos reportados (Tabla 13). Dicha comparación de los valores de heterocigosidad observada y alelos se basó en loci que han sido evaluados para otras especies.

Para el locus GATA 9, la heterocigosidad baja observada en el presente estudio contrasta con lo reportados para *C. nevadensis pectoralis* (Martin, 2010), donde se describió que las poblaciones con tamaños menores a 100 individuos pueden presentar altos niveles de variabilidad genética a pesar de que se encuentran en aislamiento. Para GATA 20, los valores si son comparables con los reportados para *C. beltrani* (Strecker, 2006), pero el número de alelos reportados es superior al del presente estudio. Esto se puede deber a que *C. beltrani* se encuentra habitando en la Laguna Chichankanab que cuenta con un área de 30 km² de superficie, área superior a la de los refugios de *C. eremus* y la población silvestre del pez cachorrito del Sonoyta en Sonora. Strecker (2006) describe que en la Laguna Chichankanab existen posibles barreras reproductivas, lo que ocasiona la presencia de estructura genética promovida por el aislamiento, además postula como hipótesis a un pequeño número de fundadores para el sistema ambiental y la posible hibridación con otras especies de *Cyprinodon*. Los loci GATA 26, GATA 39 y GATA 73 presentan un mayor número de alelos que *C. radiosus* reportado por Finger *et al.* (2013), sin embargo, la heterocigosidad para cada locus se observó con poca diferencia (GATA 39 y GATA 73), excepto para el locus GATA 26 donde se observó una moderada diferencia entre ambas especies. Dicha comparación representa datos muy similares, ya que ambos estudios son evaluaciones en poblaciones en cautiverio por más de 10 años de aislamiento. Por último, para los loci AC4 y AC24, los valores de H_o presentan una diferencia considerable comparados con los descritos por Martin (2010) y Strecker (2006), respectivamente (Tabla 13).

Tabla 13. Comparación de la heterocigosidad observada/alelos por locus en el presente estudio y otros trabajos en otras especies de *Cyprinodon*. IND = información no disponible.

	Este estudio	Finger <i>et al.</i> (2013) <i>C. radiosus</i>	Martin (2010) <i>C. nevadensis pectoralis</i>	Strecker (2006) <i>C. beltrani</i> ¹ , <i>C. esconditus</i> ²
GATA 9	0.773/29	IND	0.79/IND	IND
GATA 20	0.72/28	IND	IND	0.778/43 ¹
GATA 26	0.731/23	0.354/11	0.69/IND	IND
GATA 39	0.744/22	0.705/13	IND	IND
GATA 73	0.712/25	0.749/12	IND	IND
AC4	0.687/13	IND	IND	0.889/18 ²
AC24	0.592/4	IND	0.73/IND	IND

Para los parámetros de variabilidad genética poblacional de los refugios y de la población silvestre de *Cyprinodon eremus*, solo los refugios del CEDO y CB, presentan un déficit en la heterocigosidad observada (H_o) y la media de alelos por locus (A/L) más similares a la población del Río Sonoyta en la actualidad. Ambos refugios fueron creados por translocación de especímenes del Río Sonoyta en los años 2007 y 2008 respectivamente (Minckley *et al.*, 2012), a diferencia del refugio del CES que tiene aproximadamente 32 años de fundado, el cual difiere considerablemente solo en la media de alelos por locus contra el resto de las poblaciones (Tabla 14), patrón que ya ha sido observado en refugios de Estados Unidos (Arizona) y en una evaluación previa a las poblaciones silvestres de Quitobaquito y el Río Sonoyta con muestras de 1998 (Koike *et al.*, 2008).

Los indicadores de variabilidad genética para el refugio del CES son muy similares a los del refugio del Sonora Desert Museum (SDM) en Arizona, pero, ambos refugios pertenecen a linajes de poblaciones silvestres diferentes (Tabla 14). Koike *et al.* (2008), reportan que el refugio de Finley Tank (FT) el cual proviene del Río Sonoyta, presenta un número de alelos por locus 11.3 y déficit en la H_o , superando así los parámetros reportados para los refugios y la población silvestre actual del presente trabajo. Sin embargo, esto se debe principalmente a que el tiempo transcurrido desde que se translocaron los refugios del CEDO, CB y CES ha sido desde 10 a 32 años aproximadamente, a diferencia del refugio FT, que fue evaluado con solo tres años desde su establecimiento y con un número menor de loci empleados en el análisis (Tabla 14). Por otra parte, los indicadores de variabilidad genética en el CEDO y CB se observaron muy similares en su H_o comparado con el refugio del Tohono Chul Park (TCP), pero dicho refugio presenta la mitad de los alelos por locus registrados (CEDO y CB), esto aparentemente es debido por que provienen de otro refugio artificial (SDM), a diferencia de los refugios del CEDO y CB, que provienen de un linaje silvestre en un solo evento de translocación (Tabla 14). En contraste, el refugio de Scottsdale Community College (SCC) en Arizona, a pesar de que se originó de otro refugio y tener 5 años transcurridos desde su establecimiento, presenta indicadores de variabilidad genética superiores a los refugios del presente estudio (Tabla 14). Otro caso es el refugio Arizona State University (ASU2) que fue analizado después de 16 años de fundado y mostró indicadores de variabilidad genética superiores al presente estudio. (Tabla

14). Los indicadores de variabilidad genética de los refugios SCC y ASU2 fueron superiores a los refugios del presente estudio, esto es debido a que las poblaciones silvestres que fueron utilizadas como fundadoras de Quitobaquito y Río Sonoyta, tienen estructura genética diferente y las condiciones de hábitat son más complejas, debido que el Río Sonoyta está sometido a cambios constantes en los niveles de agua, a diferencia de Quitobaquito que se reconoce por mantener mayor estabilidad en la disposición del agua y un mejor grado de conservación del hábitat (Loftis *et al.*, 2008).

Tabla 14. Comparación de los parámetros de variabilidad genética de *Cyprinodon eremus* de refugios y la población silvestre. A/L = alelos por locus, H_o = heterocigosidad observada, H_e = heterocigosidad esperada, Años = transcurridos desde la translocación a los refugios, RS = Río Sonoyta. Quitobaquito, CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, SDM = Sonora Desert Museum, TCP = Tohono Chul Park, ASU2 = Arizona State University, SCC = Scottsdale Community College, FT = Finley Tank, NA = no aplica, a = muestras de 1998. b = muestras del 2005.

Estudios	Origen	No. Loci	Poblaciones	A/L	H_o	H_e	Años
Presente estudio	Río Sonoyta	10	CES	5.8	0.60	0.63	~32
			CEDO	10	0.70	0.75	11
			CB	10.2	0.66	0.75	10
Koike <i>et al.</i> (2008)	NA	4	RS	9.9	0.69	0.75	NA
	Quitobaquito		SDM ^b	6.5	0.67	0.72	28
	SDM		TCP ^b	5.5	0.75	0.75	18
	Quitobaquito		ASU2 ^b	13.2	0.86	0.86	16
	ASU2		SCC ^b	12.3	0.87	0.87	5
	Río Sonoyta		FT ^b	11.3	0.79	0.87	3
	NA		RS ^a	16.8	0.93	0.94	NA
Loftis <i>et al.</i> (2008)	NA	7	Quitobaquito ^a	15.3	0.90	0.93	NA
	NA		RS ^a	11.9	0.85	0.842	NA
	NA		Quitobaquito ^a	14.3	0.83	0.84	NA

La variabilidad genética actual de los refugios de Sonora del pez cachorrito del Sonoyta, a pesar de provenir de la población silvestre actual del Río Sonoyta, tienen mayor similitud con los parámetros descritos con los refugios que fueron fundados de la población silvestre Quitobaquito (Tabla 14). Esta similitud se ve reflejada principalmente en el grado de aislamiento y estado de conservación de los refugios de México, los cuales simulan condiciones más estables

en cuerpos de agua que en sistemas tributarios más dinámicos, como el Río Sonoyta, que es un sistema que presenta cambios fluctuantes en la disponibilidad de agua de forma de torrentes o cuerpos de agua cada año (Loftis *et al.*, 2008, Minckley *et al.*, 2012; Finger *et al.*, 2013).

La creación de poblaciones en cautiverio y el aislamiento que se produce como consecuencia de su establecimiento, puede inducir la fijación de alelos, la presencia de alelos locales en una escala de tiempo corto y a largo plazo (Hedrick y Garcia-Dorado, 2016). Los refugios evaluados en el presente estudio tienen evidencia de aislamiento, reflejo de la presencia de alelos únicos y genotipos únicos. Por ejemplo, en el análisis de las frecuencias alélicas del locus GATA 10 se detectaron diecinueve alelos, de los cuales solo tres alelos tienen presencia en todas las poblaciones evaluadas, pero estos tres alelos son más frecuentes en los refugios del CES y CEDO. Otro caso similar fue el locus GATA 104, mostrando únicamente dos alelos con mayor frecuencia en la población del RS y el refugio del CES, a pesar de haberse registrado diez alelos en el presente estudio. Cabe mencionar, que los loci descritos anteriormente observaron múltiples alelos compartidos entre los refugios o al menos dos refugios contra la población silvestre (RS), lo que indica que persiste la huella genética, es decir alelos originales de la población silvestre (Whiteley *et al.*, 2015).

Otro aspecto importante a mencionar en el análisis de las frecuencias de los alelos es su presencia múltiple en los loci de este estudio, ya que parecen estar más asociados los refugios del CB y CEDO con respecto a la población silvestre del Río Sonoyta, lo cual está fuertemente sustentado por el 70% de los loci analizados. Además, existió mayor frecuencia de genotipos únicos y distribuidos en cada una de las poblaciones mencionadas, rasgo indicativo de que las poblaciones se encuentran bajo procesos de divergencia como lo mencionan Russello y Jensen (2018).

Para la población del RS, los indicadores de variabilidad genética presentan una drástica reducción con respecto a los datos reportados por Loftis *et al.* (2008) para *C. macularius* y *C. eremus*. Esta reducción aparente puede deberse a que en ambos análisis difieren en el número de loci, ya que al utilizar un mayor número de loci de microsatélites, se puede llegar a representar la mayor proporción de la diversidad genética actual para cualquier población a analizar (Guichoux *et al.*, 2011). Otra causa posible es la escala de tiempo en la que han sido

evaluado las poblaciones, los parámetros de variabilidad genética descritos en el presente trabajo son de muestras provenientes del año 2018, 20 años de diferencia con respecto a los datos reportados por Loftis *et al.* (2008) donde sus muestras fueron tomadas en 1998 (Echelle *et al.*, 2000). Esta disminución de la variabilidad genética es inducida posiblemente por el aislamiento, la reducción de la población promovida por eventos de desecación extrema e inundación y la rápida repoblación en el Río Sonoyta (Black *et al.*, 2017).

Por último, el análisis de probabilidad de identidad (PI), identificó que dos loci (GATA 9 y GATA 20), no cuenta con valores probabilísticos para la identificación o discriminación del pez cachorrito del Sonoyta (Global), debido a que ambos loci presentan un gran número de genotipos de baja frecuencia. Esto concuerda con lo reportado por Waits *et al.* (2001) que indican que un gran número de genotipos impide la detección por medio de este índice. Además, para los loci mencionados, sus valores de probabilidad son bajos (< 0.01), lo que impide identificar individuos con el mismo genotipo, por lo tanto, la combinación de al menos ocho loci microsatelitales son necesarios, de acuerdo a Waits *et al.* (2001) para la identificación de individuos con genotipos iguales. Sin embargo, a nivel intrapoblacional todos los valores de PI para cada una de las poblaciones tienen valores suficientes para diferenciarlos, esto debido a la alta frecuencia de genotipos únicos.

VI. 2. Equilibrio genético

Para las poblaciones evaluadas en el presente estudio, todos los refugios y la población silvestre se encontraron fuera del equilibrio genético de Hardy – Weinberg, en el análisis entre loci, evidenciado por la evaluación de los 10 loci microsatélites. Esto se debe al déficit de heterocigotos, tal y como Guo y Thompson (1992) postulan como posibles causas de desequilibrio. De la misma forma, el análisis de H - W por locus, encontró que a nivel intrapoblacional múltiples loci estuvieron fuera del equilibrio. La población de refugio del CES fue la única que mostró un locus fuera del equilibrio de H – W (GATA 26), mientras que el resto de las poblaciones mostraron de 2 a 4 loci fuera del equilibrio. Koike *et al.* (2008) evaluaron un refugio (SDM = 28 años) con un grado de aislamiento similar a CES con 4 loci utilizados en nuestro estudio (GATA 9, GATA 26, GATA 39 y GATA 73) y solo el GATA 26

del presente estudio esta fuera H - W, mientras que para el refugio SDM este mismo locus está en equilibrio, esto puede atribuirse a la diferencia de alelos encontrados entre ambos estudios. Además, para las poblaciones del CEDO (3 loci), CB (1 locus) y RS (1 locus) en comparación con los loci analizados por Koike *et al.* (2008) (GATA 9, GATA 26, GATA 39 y GATA 73), se encontraron fuera del equilibrio y también difieren en el número de alelos encontrados. Por otra parte, la presencia de alelos nulos también podría indicar una desviación al equilibrio genético de H - W debido a que podría existir falsos homocigotos provocando una señal de desequilibrio (Chapuis y Estoup, 2007), sin embargo, para el presente estudio solo los loci GATA 20 (CB) y GATA 104 (RS) se encontraron presencia de alelos nulos con baja significancia ($P < 0.05$), por lo que en el resto de los loci no hay presencia de alelos nulos de acuerdo a lo indicado por Guo y Thompson (1992).

VI. 3. Diferenciación genética (R_{st}) e índice de endogamia (Fis)

Los indicadores de variabilidad genética en todas las poblaciones evaluadas del presente estudio resultaron altos y además existe diferenciación genética en el análisis global para todos los refugios y la población silvestre, excepto entre CEDO y RS. Esta diferenciación genética se debió principalmente a la elevada cantidad y a la alta frecuencia de alelos únicos o privados (Apéndice IV) y además, a la ausencia de flujo genético (aislamiento) entre los refugios y la población silvestre, lo que indica señales de divergencia (Cochran-Biederman *et al.*, 2015; Black *et al.*, 2017). Las translocaciones que se realizaron del Río Sonoyta para el establecimiento de los refugios, es otro factor que causa la diferenciación genética entre población silvestre vs población(es) en cautiverio o población(es) en cautiverio vs población en cautiverio, es el efecto fundador, debido a que presumiblemente fueron establecidos con una gran variabilidad genética, como lo indican al respecto Loftis *et al.* (2008) quienes observaron que la población del Río Sonoyta poseía 11.9 alelos por locus y ha habido pérdida de alelos hasta el presente (visto en RS), por lo que hay poca diferencia entre CB vs RS o CB vs CEDO. Esto se ha visto para *C. macularius* en el refugio Dexter National Fish Hatchery and Technology Center (DNFH) que ha mantenido un gran número de individuos de la especie (~ 500) y ha habido una pérdida de variabilidad genética y una moderada diferenciación genética con respecto a los del Delta del Río Colorado (Koike *et al.*, 2008).

La población del CES fuera la más divergente entre las poblaciones en cautiverio y la población silvestre, debido probablemente al tiempo desde su establecimiento (32 años) y esto se refleja principalmente por los escasos 58 alelos encontrados, número muy inferior comparado con los encontrados en el resto de los refugios. Estos resultados son similares a los reportados por Koike *et al.* (2008), donde debido al tiempo transcurrido en los refugios desde su establecimiento en Estados Unidos, observaron una reducción en la media de alelos por locus. Por otra parte, no se encontraron señales de divergencia entre CEDO y RS ($R_{st} = 0.016$ $P = 0.061$), debido que ambas poblaciones tienen más alelos en común y el tiempo transcurrido desde su fundación no ha impactado el acervo genético, por lo tanto, se infiere que la variabilidad genética de las dos poblaciones es similar. Esto lo ha observado Koike *et al.* (2008) para *C. macularius* en el refugio Dexter National Fish Hatchery and Technology Center (DNFH), donde analizaron muestras de 1998 y 2005 del mismo refugio y cuya diferenciación genética era pequeño, aunque fue al borde de significancia estadística ($F_{st} = 0.009$, $P = 0.054$).

El índice de R_{st} global (0.07) para del pez cachorrito del Río Sonoyta del presente estudio (Tabla 15) es ligeramente menor que el reportado (0.10) por Loftis *et al.* (2008) y Koike *et al.* (2008). Es decir, que el análisis AMOVA explican, en el presente estudio que el 92% de la variación es dentro de las poblaciones, 2% superior al descrito por Loftis *et al.* (2008). Sin embargo, el análisis de AMOVA de ambos estudios, difieren en los grupos, es decir para el presente estudio la diferencia fue entre unas poblaciones en cautiverio vs una población silvestre y para Loftis *et al.* (2008) la diferencia fue entre dos poblaciones silvestres aislados (Quitobaquito y Río Sonoyta). Las poblaciones en cautiverio de México, se comportan como las poblaciones aislados de *Cyprinodon tularosa* (Heilveil y Stockwell, (2017) en Malpais Spring (laguna), donde se observó una moderada diferenciación genética contra Salt Creek (Río), con un mayor grado de aislamiento que para el presente trabajo. En estudios recientes, Black *et al.* (2017) reportaron también diferenciación genética ($F_{st} = 0.062$) para *Cyprinodon bovinus* por medio de un índice análogo a R_{st} reportado por Balloux y Lugon-Moulin (2002) entre la población silvestre y la población en cautiverio. Además, hay indicios de diferencia morfológica en 15 años de aislamiento, aproximadamente entre los individuos de ambas poblaciones, este cambio morfológico también ha sido detectado hasta el momento únicamente para la población del CES de *C. eremus* (Barragán-Gutiérrez, 2017).

Tabla 15. Comparación de índices de fijación (R_{st} y F_{is}) de refugios y poblaciones silvestre de *Cyprinodon eremus*. R_{st} = diferenciación genética, F_{is} = coeficiente de endogamia, *Valores calculados, T = años transcurridos desde la translocación a los refugios del Río Sonoyta (RS) y Quitobaquito. CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, SDM = Sonora Desert Museum, TCP = Tohono Chul Park, ASU2 = Arizona State University, SCC = Scottsdale Community College, FT = Finley Tank, IND =: información no disponible, NA = no aplica.

Estudios	Poblaciones	Loci	F_{is}	T	R_{st}
Presente estudio	CES	10	0.264	~36	0.07
	CEDO	10	0.193	11	
	CB	10	0.282	10	
	RS	10	0.308	N.A	
Koike <i>et al.</i> , 2008	SDM	4	0.166*	28	0.115
	TCP	4	0.107*	18	
	ASU2	4	-0.023*	16	
	SCC	4	-0.035*	5	
	FT	4	0.059*	3	
	RS	4	0.010*	NA	
	Quitobaquito	7	IND	NA	
Loftis <i>et al.</i> , 2008	RS	7	IND	NA	0.100

Los índices de endogamia (F_{is}) de las poblaciones de cautiverio fueron menores que los detectados para la población del Río Sonoyta (Tabla 15), resultado ocasionado por el déficit de la heterocigosidad, con un F_{is} global significativo. A pesar de que en el presente estudio se encontró una gran diversidad de alelos y genotipos, el análisis de la evaluación de homocigotos mostró múltiples locus con exceso de homocigotos sin la presencia de alelos nulos en todas las poblaciones. Es decir, a pesar de que en todas las poblaciones se encontraron más genotipos heterocigotos, estos fueron de muy baja frecuencia, a diferencia de los genotipos homocigotos. Así, la población del CES para el locus GATA 9, se encontraron 21 genotipos heterocigotos y 9 homocigotos (Apéndice II), además el análisis con base en la frecuencia y cantidad de genotipos homocigotos en una muestra de 30 individuos determinó solo ocho genotipos homocigotos esperados por lo que se interpreta como exceso de homocigotos, a pesar de que hay más genotipos heterocigotos, pero en baja frecuencia en comparación de los homocigotos que son pocos, pero con mayor frecuencia. Por lo tanto, los coeficientes de endogamia para las poblaciones en cautiverio y silvestre, son consistentes a los reportados por Koike *et al.* (2008)

Además del aislamiento continuo, otro factor que puede estar induciendo la endogamia en las poblaciones en cautiverio del pez cachorrillo del Sonoyta son las dimensiones de los refugios y el número de fundadores, donde se encontró una asociación fuerte descritas en los refugios evaluados por Koike *et al.* (2008). Los refugios del CB y CEDO, fueron diseñados con una superficie de 12m² aproximadamente (Minckley *et al.*, 2012) y el tiempo de aislamiento de ambas poblaciones difieren solo por un año. Sin embargo, el *F_{is}* entre ambos refugios difieren considerablemente, esto probablemente es debido que el refugio CB fue fundada posiblemente con una mayor abundancia de la otra especie de pez nativo (*Agosia chrysogaster*). Por lo general, las poblaciones que se encuentran restringidas en el tamaño del hábitat y este se comparte con otras especies, la depredación puede llegar a eliminar una proporción considerable de la población y, además, la cruce entre individuos con algún parentesco consanguíneo puede darse (Epifanio y Waples, 2015).

El refugio del CES tiene una mayor superficie al igual que el CB o CEDO y comparten hábitat con otras especies de peces. La población del Río Sonoyta presentó el mayor índice de endogamia y puede deberse a dos factores. Esto puede ser causado por cíclica separación y fusión de pequeñas poblaciones al largo del Río Sonoyta. Se ha descrito la formación de pequeñas pozas o cuerpos de agua aislado de aproximadamente 4.5 m² de superficie promedio, aunque algunos se observaron estar conectados por un ligero torrente pluvial (Rodríguez-Ramírez, 2015). Es posible que las poblaciones reproduzcan separadamente durante la temporada estiaje cuándo las poblaciones tamañas están suficiente pequeños que deriva genética resulta en divergencia en frecuencias de alelos. La fusión de las poblaciones durante la temporada lluvia podría producir un exceso de homocigotos, la señal de endogamia. Este panorama no describe las condiciones de las poblaciones en cautiverio en cual endogamia parece más bajo que en el Río Sonoyta. En estos, las indicaciones de endogamia potencial es tal vez un efecto sencillo del tamaño pequeño poblacional, en que las probabilidades de reproducción entre relativos cercanos son más altas.

VI. 4. Análisis de cuello de botella

La población del Pez cachorrillo del Sonoyta en cautiverio del CES tiene menos variabilidad que lo demás poblaciones examinadas. También, es la única con evidencia de un cuello de botella. Es posible que ha sufrido una reducción en el tamaño poblacional reciente, posiblemente en los últimos cuatro años, similarmente a lo reportado por Finger *et al.* (2013) para *Cyprinodon radiosus* donde evaluaron un refugio (Marvin's Marsh) en el 2007 y 2010, registrando un cuello de botella para el año 2010. Los autores describen, y mencionan que esta especie diverge rápido, aproximadamente en tres a cuatro años (3 a 9 generaciones).

Las poblaciones cautivas del CEDO y CB parecen que no han perdido mucha variabilidad genética relativa a la de la población parental del Río Sonoyta (RS), por lo tanto, podemos inferir que los tamaños poblacionales inicial para el CEDO y CB, fueron adecuados para evitar un efecto fundador y que posterior a estos tamaños poblacionales han sido lo suficientemente grandes y no han tenido una fuerte deriva genética. De modo similar, parece que la población silvestre (RS), a pesar de la cíclica fragmentación del hábitat y la reducción en el tamaño de los cuerpos de agua (Rodríguez-Ramírez, 2015), no muestra señales de un cuello de botella. Este resulta a pesar que los tamaños poblacionales fluctúan año con año y se han reportado censos de 1,051 individuos promedio/año (Rodríguez-Ramírez, 2015).

VII. CONCLUSIONES

Los índices de contenido polimórficos muestran que todos los loci son altamente informativos. Los parámetros poblacionales demostraron que, comparadas con la población silvestre, hay una alta variabilidad genética en los refugios del CEDO y CB. El refugio del CEDO fue el que presentó mayor heterocigosidad observada, además registró el menor grado de endogamia y el mayor lo presentó la población silvestre. El refugio del CES mostró evidencia de cuello de botella reciente.

Los parámetros de variabilidad genética evaluados en el presente trabajo indican que la población de refugio del CEDO es por el momento la más viable para iniciar un programa de mejoramiento de la variabilidad genética entre los refugios. El resto de los refugios y la población silvestre requieren de un programa de mejoramiento de la variabilidad genética. En caso de una contingencia ambiental que promueva la extirpación de la población silvestre del pez cachorrito del Sonoyta, la población de refugio del CEDO es actualmente la mejor candidata para su reintroducción en hábitats naturales de su distribución histórica.

VIII. RECOMENDACIONES

Incrementar el número de loci para los estudios futuros destinados a la evaluación de la variabilidad genética y manejo de la especie.

Se recomienda un análisis de estructura genética poblacional por medio de un método Bayesiano, con la finalidad de confirmar la existencia de estructura entre las poblaciones y promover un manejo adecuado en caso de la realización de translocaciones.

Diseñar un plan de manejo demográfico y genético para el manejo de los refugios y la población silvestre en Sonora, México.

Una reevaluación de la diversidad genética de todos los refugios y poblaciones silvestres en periodos menores de 10 años.

Proponer el incrementar en el número de refugios a analizar tanto en México como en los Estados Unidos de América e involucrar a todos los refugios en análisis posteriores para conocer el estatus y establecer un manejo genético binacional adecuado.

IX. LITERATURA CITADA

- Adams, R. I. y E. A Hadly. 2013. Genetic diversity within vertebrate species is greater at lower latitudes. *Evolution Ecology* 27:133.
- Alfonsi, C., H. López y J. E. Pérez. 2003. Caracterización genética y morfológica de las poblaciones de *Cyprinodon dearborni* (Atherinomorpha: Cyprinodontidae) en Chacopata y Laguna de los Patos, Venezuela. *Revista de Biología Tropical* 51:7–15.
- Aranguren-Méndez, J. A., R. Roman, W. Isea, Y. Villasmil y J. Jordana. 2005. Los microsátélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: Una revisión. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 13.
- Arthington, A. H. 2012. *Environmental Flows: Saving Rivers in the Third Millennium*. University of California Press. Berkeley, Estados Unidos de América.
- Balloux, F. y N. Lugin-Moulin, 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11:155–165.
- Barragán-Gutiérrez, A. 2017. Análisis morfométrico comparativo de poblaciones de refugio y silvestres del pez cachorrito del Sonoyta *Cyprinodon eremus* Miller y Fuiman, 1987 (Teleostei: Cyprinodontidae). Tesis de licenciatura. Licenciatura en Biología Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Hermosillo, Sonora México.
- Benirschke, K. 2006. Conservation and Genetics of Populations. *Journal of Heredity* 97:612–613.
- Black, A. N., H. A. Seears, C. M. Hollenbeck y P. B. Samollow. 2017. Rapid genetic and morphologic divergence between captive and wild populations of the endangered Leon Springs pupfish, *Cyprinodon bovinus*. *Molecular Ecology* 26:2237–2256
- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick y R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human Genetics* 32:314–331.
- Budd, B., D. Budeau, J. Connelly, S. Espinosa, S. Gardner, K. Griffin y J. Lindstrom. 2017. Biological opinion conference opinion for Coronado National Forest Land and Resource Management Plan. United States Department of the Interior (602):115.
- Burg, T. M., J. L. Wilcox y A. Martin. 2002. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in pupfish (genus *Cyprinodon*). *Conservation Genetics* 3:197–204.
- Caballero, A., I. Bravo y J. Wang. 2017. Inbreeding load and purging: Implications for the short-term survival and the conservation management of small populations. *Heredity* 118:177–185.
- Capobianco, A. y M. Friedman. 2018. Vicariance and dispersal in southern hemisphere freshwater fish clades: a paleontological perspective. *Biological Reviews*. Cambridge Philosophical Society, John Wiley & Sons, Inc. Inglaterra.
- Carson, E. W., R. R. Beasley, K. L. Jones, S. L. Lance, de M. L. Lozano-Vilano, L. Vela-Valladares y M. De la Maza-Benignos. 2013. Development of polymorphic microsatellite

- markers for the microendemic pupfishes *Cyprinodon julimes* and *C. pachycephalus*. *Conservation Genetics Resources* 5:853–856.
- Cochran-Biederman, J. L., K. E. Wyman, W. E. French y G. L. Loppnow. 2015. Identifying correlates of success and failure of native freshwater fish reintroductions. *Conservation Biology* 29:175–186.
- Chapuis, M.P. y A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24:621–631.
- Cockerham, C. C. 1973. Analyses of gene frequencies. *Genetics* 74:679–700.
- CONAGUA. 2015. Actualización de la disponibilidad media anual de agua en el acuífero Sonoyta- Puerto Peñasco (2603). Estado de Sonora. Diario Oficial de la Federación.
- Cristescu, R., W. B. Sherwin, K. Handasyde, V. Cahill y D. W. Cooper. 2010. Detecting bottlenecks using BOTTLENECK 1.2.02 in wild populations: The importance of the microsatellite structure. *Conservation Genetics* 11:1043–1049.
- Echelle, A. 2008. The western North American pupfish clade (Cyprinodontidae: *Cyprinodon*): Mitochondrial DNA divergence and drainage history. *The Geological Society of America Special Paper* 439:27–38.
- Echelle, A. A., E. W. Carson, A. F. Echelle, R. A. Van Den Bussche, T. E. Dowling y A. Meyer, 2005. Historical biogeography of the New-World pupfish genus *Cyprinodon* (Teleostei: Cyprinodontidae). *Copeia* 2005(2): 320–339.
- Echelle, A.A., R.A. Van Den Bussche, T.P. Malloy, Jr. M.L. Haynie y C.O. Minckley. 2000. Mitochondrial DNA variation in pupfishes assigned to the species *Cyprinodon macularius* (Atherinomorpha: Cyprinodontidae): Taxonomic implications and conservation genetics. *Copeia* 2000:353–364.
- Eguiarte, L.E., V. Souza y X. Aguirre. 2007. *Ecología Molecular*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México D.F.
- Epifanio, J. M. y R. S. Waples. 2015. Artificial propagation of freshwater fishes: Benefits and risks to recipient ecosystems from stocking, translocation and re-introduction. 399-436 p. En G. Closs, M. Krkosek, & J. Olden (Eds.), *Conservation of Freshwater Fishes*. Cambridge. Cambridge, Reino Unido.
- Esmaili, H. R., T. Asrar y A. Gholamifard. 2018. Review Article Cyprinodontid fishes of the world: an updated list of taxonomy, distribution and conservation status (Teleostei: Cyprinodontiformes). *Iranian Journal of Ichthyology* 5:1–29.
- Excoffier, L. y H. E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite v 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10:564–567.
- Finger, A. J., S. Parmenter y B. P. May. 2013. Conservation of the owens pupfish: Genetic effects of multiple translocations and extirpations. *Transactions of the American Fisheries Society* 142:1430–1443.

- Frankham, R. 2016. Genetic rescue benefits persist to at least the F3 generation, based on a meta-analysis. *Biological Conservation* 195:33–36.
- Frankham, R., J. D. Ballou y D.A. Briscoe. 2010. *Introduction to Conservation Genetics*, second ed. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido
- Furness, A. I., D. N. Reznick, M. S. Springer y R. W. Meredith. 2015. Convergent evolution of alternative developmental trajectories associated with diapause in African and South American killifish. *Biological Sciences* 282:1–9.
- Guichoux, E., L. Lagache, S. Wagner, P. Chaumeil, P. Léger, O. Lepais y R. J. Petit. 2011. Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11:591–611.
- Guo, S., y E. Thompson. 1992. Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles. *Biometrics* 48:361–372.
- Hedrick, P. W. y R. Fredrickson. 2010. Genetic rescue guidelines with examples from Mexican wolves and Florida panthers. *Conservation Genetics* 11:615–626.
- Hedrick, P. W. y A. García-Dorado. 2016. Understanding Inbreeding Depression, Purging, and Genetic Rescue. *Trends in Ecology and Evolution* 31:940–952.
- Hedrick, P. W. 2011. *Genetics of populations*, 4th eds. Jones and Bartlett, Boston. Estados Unidos de América.
- Heilveil, J. S. y C. A. Stockwell. 2017. Genetic signatures of translocations and habitat fragmentation for two evolutionarily significant units of a protected fish species. *Environmental Biology of Fishes* 100:631–638.
- Hendrickson, D. A. y A. Varela-Romero. 1989. Conservation status of desert pupfish, *Cyprionodon macularius*, in Mexico and Arizona. *Copeia* 1989:478–483.
- Hendrickson, D. A. y W. L. Minckley. 1985. Cienegas: Vanishing climax communities of the American Southwest. *Desert Plants (Boyce Thompson Arboretum, Superior, AZ)* 6:131–175.
- Hermoso, V., S. Linke, S. R. Januchowski-Hartley y M. J. Kennard. 2015. Freshwater Conservation Planning. 437-466 p. En Closs G., Krkosek, M., y Olden, J. (Eds.), *Conservation of Freshwater Fishes*. Cambridge University, Cambridge, Inglaterra.
- Hiltsdorf, A. W. S. y E. M. Hallerman. 2017. *Genetic resources of neotropical fishes*. Springer International Publishing. Cham, Switzerland.
- Kalinowski, S. T., M. L. Taper y T. C Marshall. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*. 16:1099–1106.
- Kardos, M., H. R. Taylor, H. Ellegren, G. Luikart, y F. W. Allendorf. 2016. Genomics advances the study of inbreeding depression in the wild. *Evolutionary applications* 9:1205–1218.
- Koike, H., A. A. Echelle, D. G. Loftis y R. A. Den Bussche. 2008. Microsatellite DNA analysis of success in conserving genetic diversity after 33 years of refuge management for the desert pupfish complex. *Animal Conservation* 11:321–329.

- Lai, K., M. T. Lorenc y D. Edwards. 2015. Molecular marker databases. 49-62. En: Batley, J. (eds) Plant Genotyping. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 1245. Humana Press, New York, NY.
- Linke, S., E. Turak y J. Nel. 2011. Freshwater conservation planning: the case for systematic approaches. *Freshwater Biology* 56:6–20.
- Loftis, D. G., A. A. Echelle, H. Koike, R. A. Van Den Bussche y C. O. Minckley. 2008. Genetic structure of wild populations of the endangered Desert Pupfish complex (Cyprinodontidae: *Cyprinodon*). *Conservation Genetics* 10:453–463.
- Love-Stowell, S. M., C. A. Pinzone y A. P. Martin. 2017. Overcoming barriers to active interventions for genetic diversity. *Biodiversity and Conservation* 26:1753–1765.
- Lynch, D. J. 1981. Trachytes and Alkali Basalts of Pinacate Volcanic Fields of Northwest Sonora, Mexico, their Ages, Composition, and Morphologies. *Geological Society of America* 19: 1–113.
- Margules, C. R., R. L. Pressey y P. H. Williams. 2002. Representing biodiversity: data and procedures for identifying priority areas for conservation. *Journal of Biosciences* 27:309–326.
- Martin, A. P. 2010. The conservation genetics of Ash Meadows pupfish populations. I. The Warm Springs pupfish *Cyprinodon nevadensis pectoralis*. *Conservation Genetics* 11:1847–1857.
- Martin, A. P., A. A. Echelle, G. Zegers, S. Baker y C. L. Keeler-Foster. 2012. Dramatic shifts in the gene pool of a managed population of an endangered species may be exacerbated by high genetic load. *Conservation Genetics* 13:349–358.
- Miller, R. R., W. L. Minckley y S. M. Norris. 2009. Peces dulceacuícolas de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Sociedad Ictiológica Mexicana A. C., El Colegio de la Frontera Sur y Consejo de los Peces del Desierto México-Estados Unidos. México, D.F.
- Miller, R.R. y L.A. Fuiman. 1987. Description and conservation status of *Cyprinodon macularis eremus*, a new subspecies of pupfish from Organ Pipe Cactus National Monument, Arizona. *Copeia* 3:593–609.
- Minckley, W. L. y P. C. Marsh. 2009. Inland fishes of the greater southwest: chronicle of a vanishing biota. University of Arizona Press. Arizona, Estados Unidos de América.
- Minckley, W. L. 1995. Translocation as a tool for conserving imperiled fishes: experiences in western United States. *Biology Conservation* 72:297–309.
- Minckley, C., I. Izaguirre-Pompa, D. Duncan, R. Timmons, D. Caldwell, J. López-Méndez y P. Rosen. 2012. Native Aquatic Vertebrates: Conservation and Management in the Río Sonoyta Basin, Sonora, Mexico Description of the Río Sonoyta. USDA Forest Service Proceedings RMRS.
- Molina-Freaner, F. E., T. A. Markow, E. J. Pfeiler, O.R. Rojas-Soto, A. Varela-Romero, A. Quijada-Mascareñas, M. Esqueda-Valle y G. Yépiz-Plascencia. 2010. Diversidad genética

- de la biota. 97-128 p. En: F. E. Molina-Freaner y T. R. Van Devender, (eds.). Diversidad biológica de Sonora. UNAM, México.
- Mota, M., R. Sousa, J. Araújo, C. Braga y C. Antunes. 2014. Ecology and conservation of freshwater fish: Time to act for a more effective management. *Ecology of Freshwater Fish* 23:111–113.
- NatureServe. 2014. *Cyprinodon eremus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2014: e. T191303A15361760.<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-.RLTS.T191303A15361760.en>. Downloaded on 11 December 2018.
- Nel, J. L., D. J. Roux, G. Maree, C. J. Kleynhans, J. Moolman, B. Reyers, M. Rouget y R. M. Cowling. 2007. Rivers in peril inside and outside protected areas: a systematic approach to conservation assessment of river ecosystems. *Diversity and Distributions* 13:341–352.
- Nietlisbach, P., L. F. Keller, G. Camenisch, F. Guillaume, P. Arcese, J. M. Reid, y E. Postma. 2017. Pedigree-based inbreeding coefficient explains more variation in fitness than heterozygosity at 160 microsatellites in a wild bird population. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 284: 1–9.
- Olden, J. D., M. J. Kennard, F. Leprieur, P. A. Tedesco, K. O. Winemiller y E. García-Berthou. 2010. Conservation biogeography of freshwater fishes: recent progress and future challenges. *Diversity and Distributions* 16:496–513.
- Oosterhout, C. V., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills y P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535–538.
- Parenti, L. R. 1981. A phylogenetic and biogeographic analysis of cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 168:341–557.
- Peakall, R. y P. E. Smouse. 2012. GenAlEx 6.5: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research an Update. *Bioinformatics* 28:2537–2539.
- Pekkala, N., K. E. Knott, J. S. Kotiaho y M. Puurtinen. 2012. Inbreeding rate modifies the dynamics of genetic load in small populations. *Ecology and Evolution* 2:1791-1804.
- Pekkala, N., K. E. Knott, J. S. Kotiaho, K. Nissinen y M. Puurtinen. 2014. The effect of inbreeding rate on fitness, inbreeding depression and heterosis over a range of inbreeding coefficients. *Evolutionary Applications* 7:1107–1119.
- Pépino, M., A. Rodríguez y P. Magnan. 2012. Impacts of highway crossings on density of brook char in streams. *Journal of Applied Ecology* 49:395 – 403.
- Piñero, D., A. Barahona, L. Eguiarte, A. Rocha y R. Salas. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. *Capital natural de México I*: 415–435.
- Piry, S., G. Luikart y J. M. Cornuet. 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity* 90:502–503.

- Pohl, M., F. C. Milvertz, A. Meyer y M. Vences. 2015. Multigene phylogeny of cyprinodontiform fishes suggests continental radiations and a rogue taxon position of *Pantanodon*. *Vertebrate Zoology* 65:37–44.
- Quitobaquito-Rio Sonoyta Working Group (QRSWG). 2011. Conservation agreement and rangewide conservation assessment and strategy for the Sonoyta mud turtle, Sonoyta pupfish, Quitobaquito spring snail, and longfin dace in Quitobaquito and Rio Sonoyta. 2 de febrero, 2012 draft: 64.
- Raymond, M. y F. Rousset. 1995. GENEPOP version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248–249.
- Rodríguez- Ramírez, R. 2015. Resumen de los censos de la ictiofauna del Río Sonoyta. Reporte CONANP. Reserva de la Biosfera el Pinacate y Gran Desierto de Altar, Puerto Peñasco, Sonora, México.
- Rosen, P. C., C. Melendez, J. D. Riedle, A. C. Pate y E. Fernandez. 2010. Ecology and Conservation in the Sonoyta Valley, Arizona and Sonora. *Southwestern Desert Resources*. 143-160 p. En: Halvorson, W., Shwalbe C., y Van Riper C. (Eds.), University of Arizona Press. Arizona, Estados Unidos de América.
- Russello M. A., y E. L. Jensen 2018. Ex Situ Wildlife Conservation in the Age of Population Genomics. 1-20 p. En: *Population Genomics*. Springer, Cham University of New Brunswick Fredericton, NB, Canada.
- Schoenherr, A. A. 1988. A review of the life history and status of the desert pupfish, *Cyprinodon macularius*. *Bull. So. Calif. Acad. Sci.* 87:104–134.
- Setiamarga, D. H. E., M. Miya, Y. Yamanoue, K. Mabuchi, T. Satho, J. G. Inoue y M. Nishida. 2008. Interrelationships of Atherinomorpha (medakas, flyingfishes, killifishes, silversides, and their relatives): The first evidence based on whole mitogenome sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49:598–605.
- Strayer, D. y D. Dudgeon. 2010. Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. *Journal of the North American Benthological Society* 29: 344 – 358.
- Strecker, U. 2006. Genetic differentiation and reproductive isolation in a *Cyprinodon* fish species flock from Laguna Chichancanab, Mexico. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39:865–872.
- Turner, B. J., D. D. Duvernell, T. M. Bunt y M. G. Barton. 2008. Reproductive isolation among endemic pupfishes (*Cyprinodon*) on San Salvador Island, Bahamas: Microsatellite evidence. *Biological Journal of the Linnean Society* 95:566–582.
- Varela-Romero, A. y D. A. Hendrickson. 2009. Peces dulceacuícolas. 339-356 p. En: F. E. Molina-Freaner y T. R. Van Devender (eds.) *Diversidad biológica de Sonora*, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.
- Vieira, M. L. C., L. Santini, A. L. Diniz y C. de F. Munhoz. 2016. Microsatellite markers: What they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology* 39:312–328.

- Vörösmarty, C. J., P. B. McIntyre, M. O. Gessner, D. Dudgeon, A. Prusevich, P. Green, S. Glidden, S. E. Bunn, C. A. Sullivan, C. Reidy Liermann y P. M. Davies. 2010. Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* 467:555–561.
- Waits, L.P., G. Luikart y P. Taberlet. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology* 10:249–256.
- Ward, J. V. y J. A. Stanford. 1989. The four-dimensional nature of lotic systems. *Journal of the North American Benthological Society* 8:2–8.
- Weir, B. S. y C. C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358–1370.
- Whiteley, A. R., S. W. Fitzpatrick, W. C. Funk y D. A. Tallmon. 2015. Genetic Rescue to the Rescue. *Trends in Ecology and Evolution* 30:42–49.
- Wright, L. I., T. Tregenza y D. J. Hosken, 2008. Inbreeding, inbreeding depression and extinction. *Conservation Genetics* 9:833–843.

ANEXO I. Tabla resumida del análisis de las frecuencias de alelos nulos de microsatélites entre todas las poblaciones, bajo diferentes algoritmos de Micro-Checker v.2. 2. 3.

Tabla de análisis de frecuencia de alelos nulos (An) bajo diferentes algoritmos. S. An = señal o presencia de alelos nulos.

Población/locus	S.An	Algoritmos de Microchecker			
		Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
CES					
GATA_9	no	0.0178	0.0233	0.0192	0.0192
GATA_104	no	-0.0508	-0.0185	-0.0133	0
AC24	no	-0.1235	-0.1	-0.0809	0
GATA_10	no	0.1179	0.1373	0.0979	0.1764
GATA_20	no	0.073	0.0787	0.064	0.064
AC4	no	0.0013	0.0103	0.0072	0.0072
GATA_39	no	0.0311	0.0229	0.0189	0.0189
GATA_73	no	0.0431	0.0447	0.0371	0.0371
GATA_26	no	0.0182	0.0131	0.0111	0.0111
GATA130	no	-0.1026	-0.039	-0.0127	0
CEDO					
GATA_9	no	0.061	0.0655	0.0587	0.0587
GATA_104	no	0.0257	0.0157	0.0133	0.0133
AC24	no	-0.0883	-0.0689	-0.0526	0
GATA_10	no	0.0674	0.0754	0.0658	0.3102
GATA_20	no	0.0724	0.0787	0.0686	0.1339
AC4	no	0.0399	0.0406	0.0352	0.1127
GATA_39	no	0.0245	0.028	0.025	0.025
GATA_73	no	0.0464	0.0605	0.0514	0.1264
GATA_26	no	-0.0064	-0.0178	-0.0146	0
GATA130	no	-0.1914	-0.0706	-0.0367	0
CB					
GATA_9	no	0.0552	0.0598	0.0544	0.1161
GATA_104	no	0.0852	0.0819	0.0666	0.0666
AC24	no	0.0696	0.0702	0.0499	0.0499
GATA_10	no	0.0778	0.0937	0.0764	0.0764
GATA_20	si	0.091	0.0994	0.0812	0.0812
AC4	no	0.0965	0.1086	0.0914	0.2094
GATA_39	no	0.0685	0.0737	0.0638	0.1828
GATA_73	no	0.0584	0.0691	0.0591	0.0591
GATA_26	no	-0.0568	-0.0322	-0.0269	0.0888
GATA130	no	-0.1395	-0.0573	-0.0233	0

RS					
GATA_9	no	0.0655	0.0676	0.0592	0.0592
GATA_104	si	0.0866	0.1018	0.0831	0.0831
AC24	no	0.0302	0.0302	0.0203	0.0203
GATA_10	no	0.0848	0.0841	0.0697	0.1418
GATA_20	no	0.0765	0.0817	0.0713	0.1357
AC4	no	0.0207	0.0136	0.012	0.1494
GATA_39	no	0.0553	0.0547	0.0464	0.1234
GATA_73	no	0.0885	0.0983	0.0817	0.15
GATA_26	no	-0.064	-0.0603	-0.0519	0
GATA130	no	-0.3062	-0.116	-0.0813	0

ANEXO II. Frecuencia de genotipos observados de individuos heterocigotos y homocigotos por población y por locus. Frecuencia de genotipos compartidos (al menos con una o tres poblaciones) y frecuencia de genotipos únicos.

Tabla de frecuencia de genotipos observados. CES = Centro de Ecológico de Sonora, CEDO = Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos, CB = COBACH Sonoyta, RS = Río Sonoyta, G = número de genotipos, AA = genotipos homocigotos, Aa = Genotipos heterocigotos, GC = genotipos comunes o compartidos, GU = genotipos únicos, σ = desviación estándar.

Locus	G	CES		CEDO		CB		RS		GC	GU
		AA	Aa	AA	Aa	AA	Aa	AA	Aa		
GATA 9	69	9	21	6	24	5	24	7	23	16	53
GATA 10	50	14	15	6	19	10	20	9	20	12	38
GATA 20	70	10	20	7	22	10	20	7	22	7	63
GATA 26	32	8	22	9	21	8	21	7	23	4	28
GATA 39	54	9	21	6	24	7	21	8	21	10	44
GATA 73	55	9	21	8	21	8	22	9	20	10	45
GATA 104	29	13	17	8	22	10	20	10	20	17	12
GATA 130	6	24	6	19	11	22	8	13	17	4	2
AC4	35	14	16	7	22	8	20	6	22	13	22
AC24	9	9	21	11	19	14	16	15	15	8	1
Media	40.9	11.9	18	8.7	20.5	10.2	19.2	9.1	20.3	10.1	30.8
σ	22.56	4.82	4.88	3.95	3.75	4.78	4.42	2.88	2.58	4.51	21.38

ANEXO III. Análisis de probabilidad de identidad (PI) por locus y por locus de cada población evaluada del presente estudio.

Locus	PI	CES	CEDO	CB	RS
GATA_9	0.008	0.10983	0.01411	0.00845	0.02582
GATA_104	0.055	0.26469	0.08249	0.06914	0.05595
AC24	0.188	0.27656	0.28387	0.19342	0.32979
GATA_10	0.035	0.13832	0.02434	0.06409	0.04958
GATA_20	0.008	0.08075	0.02297	0.05888	0.02046
AC4	0.035	0.25245	0.05463	0.03052	0.05687
GATA_39	0.013	0.11154	0.03685	0.03058	0.06337
GATA_73	0.016	0.08748	0.05247	0.04208	0.04509
GATA_26	0.085	0.09593	0.12903	0.13271	0.13909
GATA130	0.496	0.67234	0.48440	0.59770	0.34251

ANEXO IV. Tabla resumida de media de alelos privados de los refugios y población silvestre.

Poblaciones	Media alelos privados
CES	1.6
CEDO	1.8
CB	2.0
RS	1.9