



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

**“Estructura genética y conectividad migratoria de las
agregaciones invernantes de *Calidris mauri* (Charadriiformes:
Scolopacidae) en México”**

Tesis

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Ecología Molecular y Biotecnología

Presenta

Leonardo Mario De la Rosa Conroy

Ensenada, Baja California

Enero de 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

**“Estructura genética y conectividad migratoria de las
agregaciones invernantes de *Calidris mauri* (Charadriiformes:
Scolopacidae) en México”**

Tesis

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Ecología Molecular y Biotecnología

Presenta

Leonardo Mario De la Rosa Conroy

Aprobada por:



Dr. Luis M. Enríquez Paredes
Director de tesis



Dr. Faustino Camarena Rosales
Sinodal



Dr. Guillermo Fernández Aceves
Sinodal



Dr. Gorgonio Ruiz Campos
Sinodal

A mi padre

Agradecimientos

Agradezco la disposición de mi director de tesis, Dr. Luis Enríquez Paredes quien tuvo el cuidado y la paciencia para abordar cada detalle en este trabajo. Mi agradecimiento al Dr. Guillermo Fernández Aceves, quien con confianza y optimismo me permitió participar en el proyecto “Caracterización morfológica, isotópica y genética de *Calidris mauri* en el Noroeste de México (PAPIIT IN212809-3)”, mismo que él dirige y del cual se desprende esta tesis.

Quiero agradecer la excelente disposición del Dr. Faustino Camarena Rosales y del Dr. Gorgonio Ruiz Campos quienes en todo momento apoyaron en la realización de este trabajo, enriqueciéndolo con sus valiosos comentarios y sugerencias.

Quiero también agradecer a los maestros del posgrado en Ecología Molecular y Biotecnología pues cumplen un compromiso notable hacia el programa y hacia los alumnos que lo cursan. A través de su constante entrega permiten que trascienda la formación de futuros investigadores en el país. De igual manera a la Universidad Autónoma de Baja California por el apoyo durante mi estancia como estudiante en sus instalaciones.

Asimismo, extendiendo las gracias a Laura Cervantes por apoyarme en el trabajo de laboratorio. Mario Leal, Daniel Espinosa, Roberto Carmona, Andrea Cuellar, Gill Andersen, Eduardo Soto, Minerva Valdespino, Miriam Lerma, Alfredo Castillo, Birgit Schwarz, Sam Franks, and Juan Carlos Leyva por su valioso esfuerzo en el campo

que permitió la obtención de muestras del playerito occidental para el análisis genético.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca No. 266741, misma que me permitió realizar mis estudios de posgrado. Igualmente, agradezco el apoyo económico y logístico de los proyectos CONACYT (82671), PAPIIT (IN212809), ICML-UNAM, NSERC-CANADA, UABC 1997-0351 y NMBCA.

Finalmente, agradezco a mis amigos y a mi familia por el apoyo extendido durante el tiempo que me tomó elaborar este trabajo.

Resumen

Se estudió la variabilidad genética de siete agregaciones invernantes del playerito occidental *Calidris mauri* en México a partir de los polimorfismos presentes en la región control del ADN mitocondrial (ADNmt). La identidad genética de las agregaciones fue analizada mediante una AMOVA para conocer la posible estructura presente en las agregaciones de playeritos invernantes, considerando las implicaciones asociadas a su distribución espacial. Finalmente, se discutió sobre la historia demográfica basándose en la información ofrecida por el marcador utilizado. El estudio genético se realizó a partir de 410 individuos provenientes de ocho localidades diferentes y se utilizó una secuencia de 635 *pb* perteneciente a la región control del ADNmt. A partir de 56 sitios variables se identificaron 87 haplotipos para el playerito occidental. La diversidad haplotípica fue alta ($H=0.76$), mientras que la diversidad nucleotídica resultó baja ($\pi_n=0.0024$), valores congruentes con los de otras especies del género *Calidris*. Las relaciones filogenéticas a nivel intraespecífico, con base en el modelo de Tajima-Nei con una corrección $\gamma=0.03$, así como los estadísticos de la prueba de neutralidad, permitieron determinar que la población atravesó un evento de expansión demográfica súbita en un punto de su historia. Dicha expansión pudo haber ocurrido después de sufrir un cuello de botella poblacional consecuencia de los eventos de glaciación más recientes. Finalmente no se evidenció estructura genética asociada a su ADNmt lo cual es reflejo de una distribución espacial homogénea durante esta parte de su ciclo migratorio.

Abstract

The present study analyzed the genetic polymorphisms present in the mitochondrial control region (mtDNA) of 410 individuals of the Western Sandpiper (*Calidris mauri*) belonging to eight different wintering aggregations in both the Pacific and the Atlantic coasts of Mexico. The genetic identity for each aggregation was analyzed and the possibility of a defined genetic structure among and within wintering aggregations was tested through a molecular AMOVA. The spatial distribution of the groups was taken into account for the discussion of such analysis. Finally, the demographic history of the Western Sandpiper was discussed according to the genetic information obtained from the genetic marker. The analysis of a 635 bp mtDNA sequence resulted in 56 variable sites which yielded 87 different haplotypes for the species. Haplotype diversity was high in the global sample ($H=0.76$), while nucleotide diversity resulted low ($\pi_n= 0.0024$), resembling those from other calidrid species. The intraspecific phylogeny, based on an adjusted Tajima-Nei model with a gamma correction=0.03, as well as the results of the Tajima's D test for neutrality support a demographic expansion scenario for the species. Such expansion could have taken place during the species' recovery from a demographic bottleneck during the last glaciation event. The lack of significant population structure in the AMOVA tests, suggests a homogeneous spatial distribution of *C. mauri* mitochondrial haplotypes during the wintering season.

Contenido

Agradecimientos	iii
Resumen	v
Abstract.....	vi
Introducción	1
Antecedentes.....	5
I. Taxonomía y distribución de la especie.....	5
II. Identificación de la especie.....	6
III. Comportamiento reproductivo.....	8
IV. Comportamiento migratorio.....	9
VI. Los polimorfismos del ADN mitocondrial como marcadores genéticos.....	11
Justificación	14
Hipótesis.....	17
Objetivos.....	18
I. Objetivo general.....	18
II. Objetivos particulares.....	19
Área de estudio.....	20
Materiales y Métodos	24
I. Trabajo de Campo.....	24
II. Trabajo de laboratorio.....	26
III. Trabajo de Gabinete.....	29

Resultados	34
I. Extracción, amplificación y secuenciación del DNAm.	34
II. Diversidad Genética.	38
III. Estructura Genética.	40
IV. Demografía histórica y filogenia intraespecífica.	45
Discusión	49
I. Variabilidad genética.....	49
II. Estructura genética.	54
III. Historia demográfica.....	57
Conclusiones	58
Referencias	59

Lista de Figuras

Figura 1. Distribución de <i>Calidris mauri</i> a lo largo de su ciclo anual migratorio.....	6
Figura 2. Morfología del playerito occidental <i>Calidris mauri</i>	7
Figura 3. Distribución geográfica invernal de <i>Calidris mauri</i> en México.....	11
Figura 4. Esquema de una molécula de ADN mitocondrial en las aves.....	13
Figura 5. Esquema de la región control del ADNmt de las aves.. ..	13
Figura 6. Localización de las agregaciones invernales de <i>Calidris mauri</i> estudiadas en el presente trabajo.....	20
Figura 7. Distribución de las diferencias pareadas observadas entre los haplotipos mitocondriales de <i>C. mauri</i>	46
Figura 8. Red de mínima separación (MSN) para los haplotipos mitocondriales correspondientes a la región control de <i>C. mauri</i>	47
Figura 9. Topología del árbol filogenético de haplotipos mitocondriales para <i>C. mauri</i>	48

Lista de Tablas

Tabla I. Detalle de las muestras de <i>C. mauri</i> empleadas en el presente estudio.....	25
Tabla II. Secuencia correspondiente al haplotipo WESA001.....	35
Tabla III. Frecuencia relativa de los haplotipos mitocondriales de <i>C. mauri</i> agrupados por agregación invernante.....	36
Tabla IV. Diversidad genética en las agregaciones invernales de <i>C. mauri</i> en México.....	40
Tabla V. Partición de la varianza para el análisis de diferenciación genética para las agregaciones invernantes de <i>C. mauri</i> en México.....	41
Tabla VI. Diferenciación genética entre agregaciones invernantes de <i>C. mauri</i> estimada con base en los índices de fijación genética.....	42
Tabla VII. Diversidad haplotípica y nucleotídica en <i>C. mauri</i> en grupos con respecto al sexo y a la edad.....	43
Tabla VIII. Diferenciación genética entre diferentes grupos demográficos de <i>C. mauri</i> para las agregaciones invernantes en México.....	44
Tabla IX. Diferenciación genética entre los grupos de edad y sexo en las agregaciones invernantes de <i>C. mauri</i>	44
Tabla X. Prueba de Tajima para determinar el escenario demográfico histórico de las agregaciones invernantes de <i>C. mauri</i> en México.....	45
Tabla XI. Comparación de la diversidad genética en el ADNmt entre distintas especies de especies del género <i>Calidris</i>	51

Lista de Apéndices

Apéndice 1	65
Apéndice 2	66
Apéndice 3	67
Apéndice 4	69

Introducción

Los humedales han sido particularmente afectados por el acarreo de desechos biológicos y químicos producto de la actividad agrícola de las últimas décadas. Una considerable gama de contaminantes se acumula progresivamente en sus aguas, en sus sedimentos y en su biota. Esta situación representa un problema a escala global que exige ser remediado con urgencia. El establecer las medidas de conservación adecuadas requiere de un estudio detallado de las características presentes en el ecosistema así como de las especies que lo habitan (Colwell, 2010).

Las aves costeras son organismos de utilidad en la determinación de los niveles de contaminación en ecosistemas marinos. Las aves costeras han sido empleadas como eficientes bioindicadores desde la década de 1980, cuando se utilizaron para determinar el tamaño de los *stocks* de peces disponibles para la explotación pesquera. Así, durante las siguientes décadas se llevaron a cabo esfuerzos para reunir información de sentido demográfico, conductual y fisiológico de estas especies. A partir del estudio de las aves costeras se logró una mejor comprensión de la ecología en ecosistemas marinos y costeros (Piatt *et al.*, 2007).

Paralelamente, la urgencia por un esfuerzo de conservación a escalas globales, es particularmente cierta en el caso de las aves costeras migratorias ya que la viabilidad de sus poblaciones está sujeta a la calidad ambiental de los humedales que son hábitat críticos en su ciclo anual (Haig *et al.*, 1997). Las aves migrantes frecuentemente explotan recursos cíclicos en lugares que no soportan un uso continuo, por lo que se

vuelven dependientes de una secuencia específica de sitios eslabonados a lo largo de una ruta migratoria (Carmona, 2007). Diferentes estudios de largo plazo en Europa, América del Norte y Asia han demostrado una disminución reciente en la mayoría de las poblaciones de las aves migratorias, particularmente en el orden Charadriiformes (Thomtas, 2006).

Las aves costeras dedican gran parte de su ciclo de vida en ambientes costeros, esto las expone a diferentes contaminantes, mostrándose susceptibles a la bioacumulación ya que éstas se encuentran al final de las redes tróficas (Burger, 2004). Aunado a esto, el hecho que sean organismos abundantes, relativamente longevos y de fácil observación ya que se agrupan en parvadas numerosas, convierte a las aves costeras en excelentes indicadores ecológicos de los ambientes marinos.

El playerito occidental *Calidris mauri* es reconocido como un bioindicador notable de los humedales costeros (Fernández, 1996). El playerito occidental es el migrante más numeroso del Corredor Migratorio del Pacífico, con aproximadamente 3.5 millones de individuos, a pesar de que hay señalamiento de que durante la última década sus números se han reducido en zonas importantes para su migración, la especie no se encuentra en estatus protegido. Durante el verano se reproduce en planicies árticas del estrecho de Bering y migra en otoño a través del Corredor Migratorio del Pacífico utilizando humedales (Bishop *et al.*, 2006). Los ambientes costeros le ofrecen sitios de reposo y alimentación durante su ciclo anual de migración (Kraaijeveld, 2008). Desgraciadamente la actividad antropogénica ha degradado estos ambientes a través de la agricultura intensiva, la construcción de

complejos portuarios, la sobreexplotación de especies para uso alimenticio y tantas otras actividades que irrumpen los patrones naturales de estos ecosistemas (Colwell, 2010).

Existe incertidumbre acerca de la genética poblacional de *C. mauri*: si bien existen estudios para otras especies del género *Calidris* (Wenink, 1993; Buehler, 2003, 2005, 2006; Rönkä, 2008), del playerito solo existe un estudio para una de sus agregaciones invernantes (Vilanova, 2006). La predilección del playerito occidental por ciertas rutas de migración y determinados sitios de invernación pudiera estar relacionada con la información genética de la especie. La filopatría existe hacia los sitios de invernación (Fernández *et al.*, 2006), sin embargo, aun se requieren investigaciones utilizando técnicas moleculares.

El monitoreo de poblaciones naturales a través de técnicas moleculares es una manera práctica y no invasiva de obtener información acerca de las características biológicas y demográficas de una especie. La diversidad genética presente en una población define el éxito que pueda tener una población frente a un evento súbito que amenace la supervivencia de la especie. Actualmente la presencia antropogénica afecta notablemente a los ambientes naturales, por lo cual es importante dedicar esfuerzos al monitoreo de la diversidad genética. A medida en que se innova en el desarrollo de técnicas moleculares, la cantidad de aproximaciones disponibles para estudiar las poblaciones naturales ha incrementado (Parker *et al.*, 1998).

El presente estudio busca indagar en los aspectos genéticos de la población invernante de *C. mauri*. La región control del ADN mitocondrial se utilizó como

marcador ya que es un sitio informativo, de evolución neutral y de alta variabilidad. A partir de la necesidad de conocer una posible asociación entre la distribución espacial de la especie y su identidad genética durante la temporada invernante, se indagó en la estructura genética presente en las agregaciones invernantes para buscar diferencias entre las agregaciones asociadas al Atlántico con respecto a aquellas asociadas al Pacífico. Así mismo, se pretende aseverar que los indicadores genéticos presentes en este estudio resulten consistentes con la historia demográfica que se le atribuye a la especie.

Antecedentes

I. Taxonomía y distribución de la especie.

El playerito occidental, *Calidris mauri* (Cabanis, 1857) forma parte de la familia Scolopacidae en el Orden de los Charadriiformes. Los registros fósiles del playerito occidental más antiguos con los que se cuentan datan del Pleistoceno tardío en localidades de California, Ecuador y Perú y están fechados en 0.6 millones de años (Colwell, 2010). Fósiles de *Eurenetes rayi*, que es similar a *C. mauri* pero de mayor tamaño, han sido fechados en 9 millones de años de antigüedad. A la fecha no se reconocen subespecies para *Calidris mauri* (Wilson, 1994).

El playerito occidental es un migrante de mediana a gran escala. Se trata de la especie más numerosa dentro de las aves costeras que utilizan el corredor migratorio del Pacífico. La mayoría de los expertos coinciden en que su población oscila alrededor de 3.5 millones, sin embargo se ha propuesto que la población global supera los 6 millones de individuos (Bishop *et al.*, 2006).

Esta especie se distribuye principalmente en las costas de Alaska durante el verano boreal, en los meses de mayo a julio. Durante esta época del año, los playeritos occidentales se agregan en dos zonas de reproducción: una que se ubica desde el norte del río Kuskokwim hasta Punta Barrow, en Alaska, y otra en la península de Chutotski en Siberia. Durante el invierno se distribuye principalmente en las costas del Pacífico, desde California hasta Perú. En la costa del Atlántico es común desde Nueva Jersey hasta el Caribe en Venezuela y Colombia (Wilson, 1994).

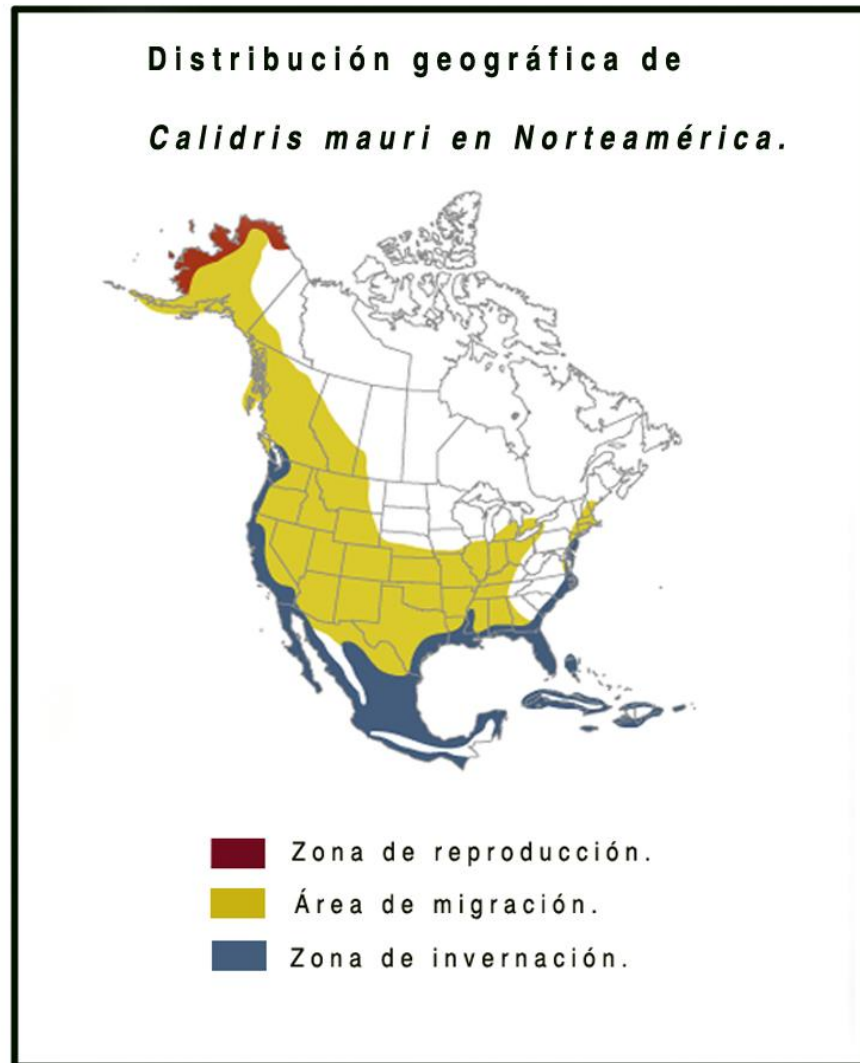


Figura 1. Distribución de *Calidris mauri* a lo largo de su ciclo anual migratorio.

II. Identificación de la especie.

El playerito occidental adulto mide entre 14 y 17 cm de longitud, su envergadura mide típicamente 35 cm y llega a pesar entre 22 y 35 g. No existen diferencias de plumaje entre los sexos a lo largo su ciclo anual. Morfológicamente el playerito

occidental es muy similar al playerito semipalmeado (*C. pusilla*). Ambos playeritos se distinguen porque sus patas presentan coloración oscura y una pequeña membrana interdactilar. Sin embargo, la distribución de *C. pusilla* abarca más territorio en el Hemisferio Sur durante la época de invernación y *C. mauri* es ligeramente más corpulento. Finalmente, el pico de *C. mauri* es distintivamente más largo que en otras especies de playeritos y llega a medir entre 2.5 y 3 veces la distancia loreal del individuo (Wilson, 1994).



Figura 2. Morfología del playerito occidental *Calidris mauri*.

El playerito occidental presenta dimorfismo sexual invertido, donde la hembra es mayor en tamaño, su pico también es más alargado que en los machos. Page y Fearis (1971) propusieron que la longitud de machos abarca tallas <24.2mm y en las hembras, tallas >24.8 mm. El dimorfismo sexual invertido es un rasgo común entre la familia Scolopacidae donde el 84% de las 57 especies lo presentan (Colwell, 2010).

El plumaje básico del playerito occidental es grisáceo en todo el cuerpo excepto por el pecho que es de color blanco. El cuello y la parte inferior del rostro presentan también plumaje blanco. Las plumas blancas del pecho en el playerito mantienen este color a lo largo de todo el año. Se le puede distinguir una estrecha raya blanca de

plumas en ambas alas (Wilson, 1994). La coloración opaca del plumaje básico le permite lograr un camuflaje en el entorno de la época invernal. El desgaste en las plumas primarias permite diferenciar a los juveniles de los adultos ya que los primeros mantienen el plumaje básico durante al menos sus dos primeros ciclos migratorios (Colwell, 2010).

El plumaje alterno, presente en la época reproductiva está conformado por plumas color canela y café claro. Esta coloración resalta principalmente en las plumas escapulares. Además, este plumaje forma una corona color canela que se extiende desde la región ubicada entre los ojos hasta detrás de los orificios auditivos. No existen características que destaquen a los machos de las hembras con respecto a este plumaje. El plumaje alterno permite identificar al playerito de entre otras especies durante la temporada reproductiva (Wilson, 1994).

III. Comportamiento reproductivo.

Durante la temporada reproductiva, el hábitat del playerito lo constituyen planicies de hielo o inclusive pendientes montañosas suaves. Los machos arriban a los sitios de reproducción con anterioridad que las hembras siendo este un rasgo común en varias especies de calidrinos. El motivo de este comportamiento nace de la necesidad de competir por territorio para poder formar el nido (Colwell, 2010).

El playerito es una especie monógama donde el macho construye el nido y es el encargado de protegerlo de los depredadores. La hembra copula únicamente con un

macho y después deja el nido para alimentarse mientras almacena energía. La puesta se realiza en el nido y consta de cuatro huevos generalmente (Wilson, 1994). El macho protege los huevos al principio de la puesta, sin embargo, los huevos son incubados por ambos miembros de la pareja. La incubación tiene una duración de 21 días. El juvenil será cuidado por ambos padres por aproximadamente 20 días o hasta que aprenda el vuelo (Holmes, 1971).

Se ha observado que el playerito presenta fidelidad a los sitios de reproducción. El estudio de Holmes (1971), demostró que el 54% de los machos adultos y el 37% de las hembras adultas presentan filopatría. Johnson (2006) también analizó la fidelidad a los sitios de reproducción en el playerito occidental durante un periodo de siete años y encontró una incidencia del 65 % por regresar al sitio de reproducción en los machos, mientras que en el caso de las hembras la incidencia fue menor, únicamente un 40%. Solo un 4% de los playeritos occidentales recién nacidos regresan a su sitio de nacimiento en la siguiente temporada (Holmes, 1971). La noción de fidelidad a los sitios de origen es de utilidad cuando para establecer medidas de conservación en una (Colwell, 2010).

IV. Comportamiento migratorio.

El hábito de migrar es distintivo de los calidrinos dentro de las aves costeras. Este orden se caracteriza por tener zonas de reproducción propias de las latitudes árticas, lo que disminuye el riesgo de depredación durante la época de incubación de la

puesta. Los calidrinos realizan, a diferencia de los chorlitos y especies costeras tropicales, largas migraciones durante su ciclo anual (Colwell, 2010).

El playerito occidental presenta migración diferencial por edad y sexo. En un estudio realizado por Nebel y colaboradores (2002) se encontró una correlación positiva entre la cantidad de hembras encontradas en las agregaciones invernantes de playeritos y la distancia con respecto a los sitios de reproducción en Nome, Alaska. La proporción de juveniles tuvo dos máximos, uno en agregaciones cercanas a los sitios de reproducción y el otro en las ubicaciones más distantes de los mismos. Esta distribución en forma de “U” es característica de la especie. Aquellos juveniles que viajan hasta las latitudes bajas, permanecen durante el verano en sus primeras dos temporadas migratorias (Fernández *et al.*, 2006; O’Hara *et al.*, 2005).

En México, el playerito occidental se distribuye principalmente a lo largo la costa de la Península de Baja California y desde la zona del Delta del Río Colorado hacia la costa continental de México, ocupando la cadena de lagunas costeras de Sonora y Sinaloa. En algunas regiones de la costa occidental de la península de Baja California, la pérdida del hábitat y el disturbio humano han afectado notablemente la abundancia y distribución de las comunidades de aves acuáticas (Ruiz-Campos *et al.*, 2005). Las lagunas costeras de la región de Sonora y Sinaloa son cada vez más explotadas para la utilización de recursos alimenticios y esto junto con otras actividades crea un impacto en las agregaciones migrantes de *C. mauri*.

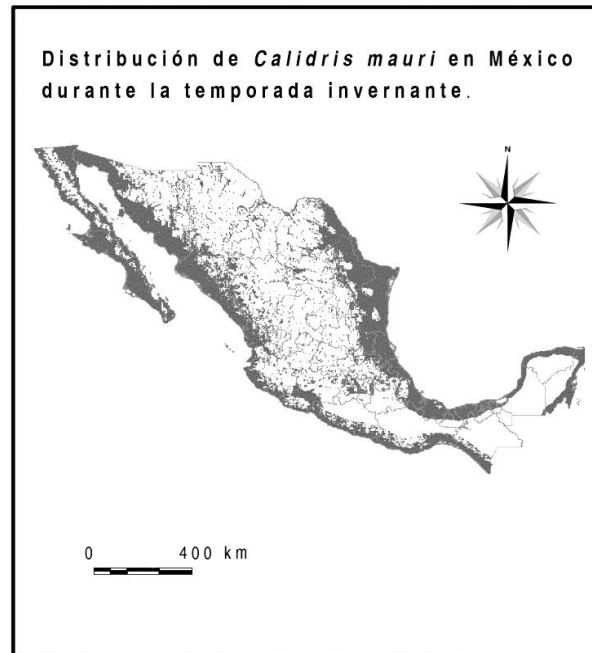


Figura 3. Distribución geográfica invernante de *Calidris mauri* en México. Tomado de CONABIO (2007).

VI. Los polimorfismos del ADN mitocondrial como marcadores genéticos.

El ADN mitocondrial es sin duda el marcador molecular más utilizado para el estudio de diversidad genética fauna (Nabholz *et al.*, 2009). Ciertas características como su neutralidad y su alta tasa de mutación hacen del ADN mitocondrial un excelente indicador de diferenciación genética y variabilidad molecular (Galtier, 2009). La quasi-nula recombinación, la herencia matrilineal y la facilidad de amplificación por métodos enzimáticos, ha potencializado el uso del ADNmt como marcador molecular para estudiar una gran variedad de aspectos ecológicos y evolutivos de una amplia gama de especies.

Si bien la acelerada tasa de sustitución nucleotídica en el ADNmt promueve su uso en el estudio de diversidad molecular, ha permitido además la acertada identificación molecular de muchas especies (Hebert, 2004). Su utilidad es evidente en el caso del proyecto global de *barcoding*, inicialmente impulsado por Avise y colaboradores (1987) y que se basa en la amplificación de los polimorfismos de los genes del citocromo b y de la citocromo c oxidasa I (COI).

Por otra parte, el ADNmt es fácil de amplificar ya que se presenta en múltiples copias (100-1,000) por célula. Es también una ventaja el que no contenga intrones y que las regiones intergénicas sean muy reducidas. Presenta regiones conservadas, pero sus niveles elevados de variabilidad (debidos a su alta mutabilidad) en ciertas zonas de la molécula han permitido estudiar la historia poblacional de algunas especies a partir de muestras tomadas en ventanas de tiempo bastante reducidas (Galtier, 2009).

Existen estudios detallados de la variabilidad mitocondrial en las aves. Por ejemplo, Nabholz (2009) encontró que la variabilidad nucleotídica promedio en el gen mitocondrial del citocromo b para el 15% de las especies de aves es menor al 4%. Por otro lado, Hughes (2007) comparó la variabilidad nucleotídica entre aves tropicales y aves migratorias de latitudes templadas tropicales y encontró tres veces mayor variabilidad en aves tropicales ($\pi_s=0.065$) que en aves de latitudes templadas ($\pi_s=0.023$).

Las desventajas de usar el ADNmt como marcador molecular son muy pocas: existen secuencias homologas a las mitocondriales y que se encuentran en el ADNn, estos pseudogenes mitocondriales son conocidas como NUMTs (Nuclear mitochondrial segments) y son el resultado de la transferencia de información por parte de la mitocondria hacia el núcleo (Ballard, 2004; Zink, 2008).

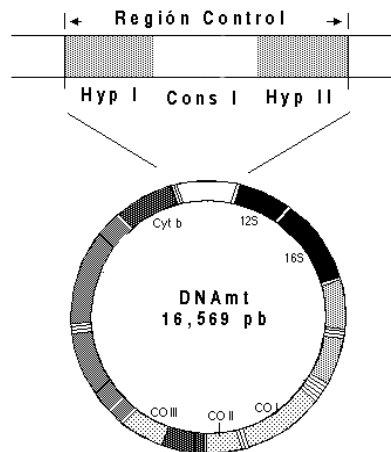


Figura 4. Esquema de una molécula de ADN mitocondrial en las aves. Se hace énfasis en la región control (RC) o D-Loop.

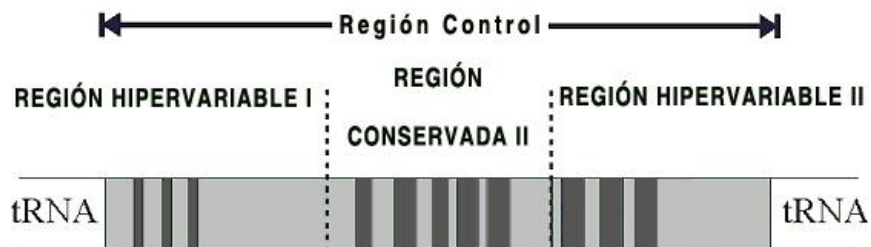


Figura 5. Esquema de la región control del ADNmt de las aves. Las zonas gris oscuro son regiones conservadas. Las zonas gris claro son regiones variables.

En cuanto a la relación que pueda existir entre la variabilidad genética en el ADN mitocondrial y los tamaños efectivos de población de una especie (N_e), recientemente se ha especulado acerca de si existe realmente o no tal correlación. Esta especulación surgió a partir de la variación que existe en las tasas de mutación de este marcador para las diferentes especies. El debate ha sido abordado en recientes publicaciones (Bazin, 2006; Nabholz *et al.* 2008; Ellegren, 2009) y se ha sugerido que la diversidad genética en el ADN mitocondrial en animales no está asociada a variables biológicas de la especie (longevidad, tamaño de organismo, tamaño efectivo de población).

En el caso del playerito occidental no existe hasta el momento una estimación precisa para la tasa de evolución de su ADNmt. Wenink y colaboradores (1996) definieron para *C. alpina*, basándose en una extrapolación del trabajo de Quinn (1992) una tasa de sustitución de 14.8%/millón de años. La estimación de Quinn (1992) para la región control se utiliza generalmente en estudios de ADNmt aviar y es de 20.8%/millón de años. Quinn (1992) llegó a esta estimación basándose en un estudio de *Branta canadensis* donde encontró que la región control del ADNmt muta 10 veces más rápido que el resto de la molécula (Ritchie, 2001). Sin embargo, después de los hallazgos de Nabholz acerca de las variaciones en la tasa de mutación entre distintos órdenes de especies de vertebrados, no sería sensato realizar una estimación del tamaño poblacional careciendo de un conocimiento de las tasas de sustitución del marcador en la presente especie.

Justificación

El campo de estudio de la ecología molecular cuenta con pocas décadas de haberse gestado. Las aportaciones que ofrecen las técnicas moleculares a esta ciencia se consolidan a medida que se incrementa el número de marcadores moleculares y la información relacionada con los niveles de variabilidad genética presentes en las poblaciones naturales. Actualmente, distintas disciplinas biológicas dedican esfuerzos sustanciales a la recopilación de datos moleculares a partir de la naturaleza con el objeto de incorporarlos en el establecimiento de medidas acertadas para la conservación de la biodiversidad en el planeta (Parker *et al.*, 1998).

El declive en las poblaciones de aves playeras a escalas globales ha confirmado la vulnerabilidad de estas especies ante el efecto de las actividades antropogénicas en sus ambientes naturales (Morrison *et al.*, 2001). Es importante conocer las características biológicas que presentan estas especies desde el punto de vista genético ya que de esta manera, mejores estrategias de conservación pueden ser establecidas (Parker *et al.*, 1998). Aunque el playerito occidental no se considera una especie amenazada o en peligro de extinción, se trata de una especie bioindicadora (Fernández, 1996) en la que pueden estudiarse aspectos relacionados con el grado de afectación que experimentan actualmente los humedales de nuestro país.

A pesar de que los estudios publicados en relación al género *Calidris* son claros y bien fundamentados, los estudios que abordan el aspecto genético en las especies de playeritos son relativamente escasos. Algunos de los primeros trabajos publicados

que incorporan herramientas moleculares para el estudio del género *Calidris*, se realizaron en especies paleárticas como *C. alpina* (Wenink, 1993; Wennerberg, 2001), *C. canutus* (Buehler, 2003) y *C. temminckii* (Rönkä, 2008).

Recientemente se realizó un estudio genético para *C. mauri*. (Vilanova, 2006) donde se indagó en la diversidad genética presente para los playeritos occidentales invernantes de Bahía Santa María, México. Utilizando el ADNmt como marcador molecular se relacionaron las características genéticas de la agregación invernante con la dinámica demográfica que ocurre en esta laguna costera, la cuál es de significativa importancia para el ciclo migratorio de la especie.

Es solo hasta muy recientemente que se llevó a cabo un estudio de la identidad genética para diferentes agregaciones invernantes del playerito en México (Álvarez, 2011). Dicho estudio aborda las características genéticas comprendidas en las SSR's (microsatélites) del playerito occidental. El presente trabajo complementa la observación realizada por Álvarez (2011), utilizando un marcador distinto para un mismo juego de datos.

El ADN mitocondrial permite indagar en las circunstancias causales de la distribución actual de la especie. Destaca una ventaja específica la cual estriba en la carencia de recombinación en la información genética. Esta ventaja que aporta nitidez en las deducciones relativas a la historia demográfica de la especie (Zink *et al.*, 2008).

Hipótesis

Las evidencias de que *Calidris mauri* exhibe una fuerte fidelidad a las zonas de agregación invernal, así como a la preferencia de la especie por migrar a lo largo de corredor del Pacífico, pudiera reflejarse en una distribución no homogénea de los linajes mitocondriales durante el invierno. De esta manera, se espera que las agregaciones presentes en la costa del Pacífico sean genéticamente distintas a las de la costa del Atlántico

Objetivos

I. Objetivo general

El presente estudio es parte integral de un proyecto cuyo objetivo es el de evaluar, mediante la caracterización molecular con diferentes marcadores (ADN, isótopos estables y metales pesados), las preferencias de hábitat por parte de los individuos de las distintas agregaciones invernales del playerito occidental (*Calidris mauri*) durante su estancia invernal en las costas de México.

Como parte de la evaluación basada en marcadores genéticos moleculares, en este trabajo se empleó un marcador de ADN mitocondrial para determinar si la distribución de los polimorfismos en la región control mitocondrial del playerito occidental *Calidris mauri* es homogénea a lo largo de las costas de México. De esta forma se busca determinar si existe un nivel significativo de estructura genética en las agregaciones invernales de esta especie, que permita a su vez caracterizar a los individuos a lo largo de su ruta migratoria..

II. Objetivos particulares

1. Determinar la identidad genética de *Calidris mauri* en algunas de las principales agregaciones invernantes en las costas de México.
2. Estimar el nivel de estructura genética entre las distintas agregaciones invernantes de *C. mauri* en las costas mexicanas.
3. Describir el escenario demográfico que mejor explique los niveles de diversidad y de estructura genética observados en las agregaciones invernantes de *C. mauri* en México.

Área de estudio

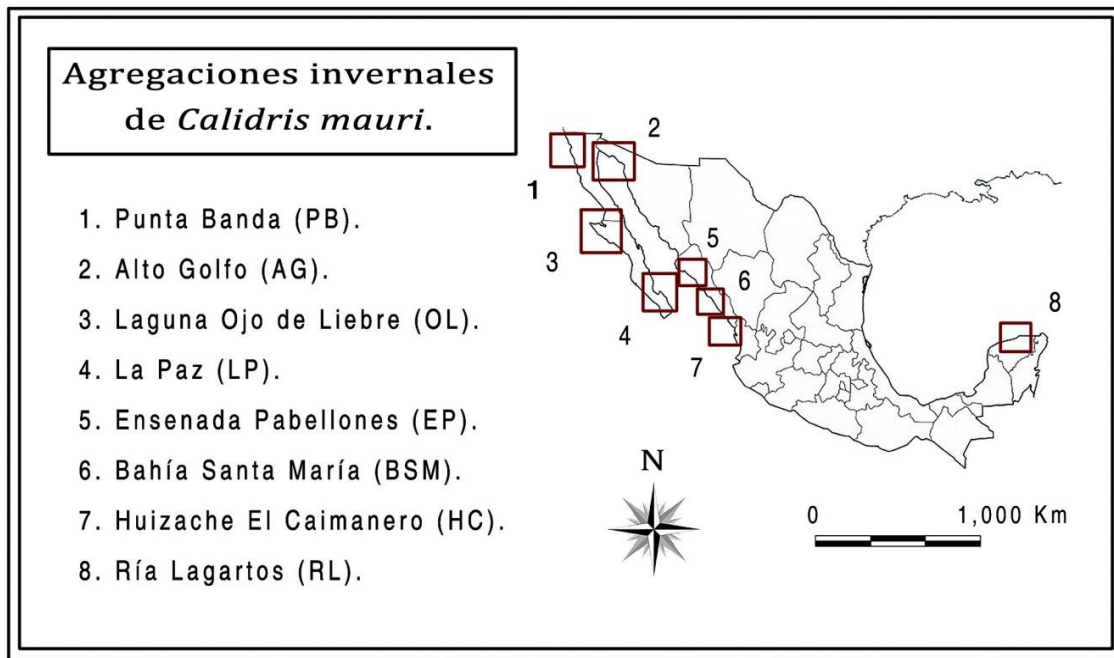


Figura 6. Localización de las agregaciones invernales de *Calidris mauri* estudiadas en el presente trabajo.

1. Punta Banda ($31^{\circ}43'00''\text{N}$; $116^{\circ}40'39''\text{W}$), **Baja California:** El Estero de Punta Banda tiene un área aproximada de 12 km^2 . Ha sido considerado en el Programa de Regiones Prioritarias para la Conservación de la CONABIO y es Área Importante para la Conservación de Aves (AICA) categoría 5. Presenta un clima templado (temperatura media anual de 16°C) con planicies lodosas y playas de arena. Se han reportado abundancias de *C. mauri* de 4,000 individuos.

2. Alto Golfo (32°28'36"N; 114°45'45"W), **Sonora:** La Ciénega de Santa Clara (ubicada dentro de la Reserva del Alto Golfo de California) fue decretada área natural protegida en 1993, es sitio de invernación de alrededor de 80 especies de aves costeras y durante la temporada invernante la abundancia de éstas fluctúa alrededor de los 100,000 individuos. Presenta playas arenosas de baja pendiente asociadas a un ecosistema semiárido. La ciénega de Santa Clara recibe los aportes fluviales del Río Colorado. Este lugar presenta uno de los climas más calurosos de México con temperaturas que alcanzan prácticamente los 50 °C en el verano. Sin embargo, las mínimas oscilan en los -5 °C.

3. Laguna Ojo de Liebre (27°57'32"N; 114°03'22" W), **Baja California Sur:** La laguna costera de Ojo de Liebre está ubicada en la Reserva de la Biósfera El Vizcaíno. Este cuerpo de agua recibe cerca de 250,000 individuos de aproximadamente 30 diferentes especies de aves. Las aguas de la laguna son especialmente salobres, la salina más grande del mundo está ubicada justo en esta zona. Las lluvias suceden en invierno (100 mm anuales) y el resto del año el clima oscila entre árido y templado.

4. Ensenada de La Paz (24°08'32"N; 110°18'39"W), **Baja California Sur:** Situada en la capital política de este estado. La abundancia de aves playeras oscila alrededor de 20,000 individuos. Carmona (2007) reportó que entre el 20 % y el 50% de los invernantes presentes en Ensenada de La Paz pertenecen a *C. mauri*. El clima de La Paz es caluroso durante todo el año. Presenta un clima seco donde la máxima precipitación pluvial sucede en los meses de agosto y septiembre (51-56 mm).

5. Bahía Santa María (25° 02'N; 108°18'W), **Sinaloa:** Es el humedal con mayor extensión en Sinaloa, comprende un área de 1,350 km², e incluye regiones de tulares, planicies lodosas, manglares y bahías abiertas. Sin embargo, el manglar es el tipo de hábitat que predomina en la bahía. La zona pantanosa sujeta a las condiciones de marea, es el principal sitio donde se agrega *C. mauri*. Se estima que el ecosistema llega a albergar hasta 500,000 individuos de varias especies de aves playeras.

6. Ensenada Pabellones (24° 25'N; 107° 33'W), **Sinaloa:** Ubicada a 53 km de Culiacán, Sinaloa. Es un complejo de lagunas, pantanos, esteros, humedales y marismas que se ha considerado estratégico para la conservación de la avifauna migratoria y residente de América. Alberga contingentes mayores a 300,000 individuos de ciertas especies durante los picos migratorios. Es sitio de invernación de especies de anátidos, playeros, acuáticas coloniales y alberga el 10% de la población mundial de la Avoceta Americana (*Recurvirostra americana*). En el sitio se realizan actividades de acuicultura, agricultura y actividades cinegéticas.

7. Huizache-Caimanero: (22° 55'49"N; 106° 04'24"W), **Sinaloa:** Caracterizada como un sistema lagunar tropical de barrera, esta laguna presenta un aislamiento relativo del mar lo que la condiciona a salinidades que oscilan grandemente (entre 3 - 60 ‰). Presenta un área de inundación del 63% de su extensión y las temperaturas de agua varían entre 20°C – 30°C. Su extensión oscila alrededor de los 175 km². Además de 36 arroyos, dos importantes ríos desembocan en el sistema lagunar: el Presidio al oeste y el Baluarte al este. Se estima que aloja a cerca de 200,000 individuos de aves compuestos por varias especies de aves costeras.

8. Reserva de la Biósfera Ría Lagartos (21°35'47"N; 88°09'52" W), Yucatán:

Presenta una extensión de 57,000 ha y se trata de una importante zona de anidación para aves acuáticas. Es zona crítica para la reproducción de 280 especies de aves y alberga a cerca de 80,000 individuos a lo largo del año. La región oeste presenta clima semiárido y la región central, clima cálido semihúmedo. El estero tiene una prolongación de 40 km y es común el tular-carrizal-pastizal, la selva baja caducifolia y el manglar.

Materiales y Métodos

I. Trabajo de Campo.

Como se menciona anteriormente, el presente trabajo de tesis forma parte del proyecto “*Caracterización morfológica, isotópica y genética de Calidris mauri en el Noroeste de México (PAPIIT IN212809-3)*”. Dicho proyecto está dirigido por el Dr. Guillermo Fernández Aceves del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM.

La recolecta de muestras la llevó a cabo durante los meses de noviembre y diciembre de 2008, así como en enero de 2009. Los individuos que conforman la muestra fueron capturados con ayuda de redes de niebla colocadas en la zona intermareal. Una vez removido de la red, cada individuo fue pesado (precisión 1 g) y medido (longitud del culmen, precisión 0.1mm). Estos atributos corporales junto con la coloración del plumaje fueron utilizados para determinar el sexo y grupo edad correspondiente. Posteriormente, a cada individuo se le extrajeron aproximadamente 100 µL de sangre con ayuda de un capilar. Las muestras de sangre se preservaron en tubos eppendorf que contenían 500 µL de “Queen's Lysis Buffer” (0.01 M Tris, 0.01 M NaCl, 0.01 M EDTA y 1% N-laurilsarcosina, ajustado a pH 7.5), se etiquetaron y refrigeraron (4 ° C) para procesarlas posteriormente en el laboratorio.

A partir de este esfuerzo de muestreo, se conservaron 410 muestras de sangre pertenecientes a individuos de *Calidris mauri* y correspondientes a cada una de las ocho localidades geográficas (Tabla I). Con base en el número de muestras, así como la

proporción de sexos y de edades, se seleccionaron solamente siete de las ocho localidades para el análisis. La muestra correspondiente al Estero de Punta Banda, Baja California únicamente fue considerada en el análisis global genético y fue descartada del análisis de estructura genética por ser pequeña en número e incluir exclusivamente machos adultos.

Tabla I. Detalle de las muestras de *C. mauri* empleadas en el presente estudio. Se indica el número de individuos por localidad (n), así como el sexo y el grupo de edad. Machos adultos (MA); Hembras adultas (HA); Machos jóvenes (MJ), Hembras jóvenes (HJ) y aquellas muestras de sexo y edad desconocidos (D).

Localidad	n	MA	HA	MJ	HJ	D
Alto Golfo (AG)	48	11	15	13	8	1
Punta Banda (PB)	11	0	0	11	0	0
Guerrero Negro (GN)	62	18	13	21	10	0
La Paz (LP)	61	14	11	27	6	3
Pabellones (EP)	53	16	5	9	18	5
Bahía Santa María (BSM)	56	15	12	16	11	2
El Caimanero (HC)	64	8	23	13	18	2
P. de Yucatán (YUC)	44	17	18	0	7	2
Desconocida (D)	11	0	0	0	0	11
Global	410	99	110	94	78	26

II. Trabajo de laboratorio.

i. Extracción de ADN genómico.

El método que se empleó para obtener el ADN genómico a partir de la sangre fue el mismo empleado por Vilanova (2006) para la extracción de ADN a partir del cañón o cálamo de las plumas. Aproximadamente la mitad de sangre preservada en amortiguador de Queen (300 μ L) se transfirió a un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL, agregando 200 μ L de la solución amortiguadora de extracción (Tris-HCl 200mM a pH 7.4, NaCl 250 mM, SDS al 0.5% y EDTA 25mM). Las muestras se agitaron vigorosamente en un vortéx y se incubaron a 65°C en constante rotación por alrededor de 1 hora para permitir la ruptura de las células. Posteriormente, a cada muestra se le agregaron 150 μ L de una solución amortiguadora con bromuro de hexadecil-trimetil amonio (Tris HCl 200mM a pH 8, EDTA 20 mM, CTAB al 2%, PVPP al 0.1%, SDS al 0.1% y 2- β -mercaptoetanol al 0.2%).

La mezcla se agitó usando vortex y se incubó por otros 15 min a 65 °C en agitación constante. El reactivo CTAB es un agente utilizado para la digestión de polisacáridos, normalmente utilizado en extracciones de ADN vegetal, se seleccionó para eliminar los coágulos formados por polisacáridos presentes en el plasma sanguíneo. En seguida de la incubación se agregaron 300 μ L de LiCl 5 M con el objeto de precipitar proteínas y otras impurezas en la mezcla. Al agregar el LiCl, se utilizó el vortex para incorporar el reactivo y se centrifugó a 12 000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a otro tubo estéril, en donde se agregaron 500 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 12 000 xg durante 10 minutos. La fase acuosa de

cada mezcla se recuperó en otro tubo con 500 μ L de Isopropanol al 99 % y se refrigeró a 4 °C durante 12 horas para favorecer la precipitación del ADN. Las muestras se centrifugaron a 12 000 x g durante 15 minutos, descartando posteriormente el isopropanol y haciendo un lavado del precipitado de ADN con 500 μ L etanol al 70%. De nuevo se centrifugó a 12 000 x g durante 5 minutos, se decantó el etanol y se secó el ADN en una centrífuga de vacío a 60°C por 10 minutos. Finalmente el ADN se resuspendió en 25 μ L de TE 0.1X (Tris- HCl 1 mM, EDTA 0.1 mM), incubando a 37 °C por 6 horas y almacenando posteriormente la muestra a -20°C.

ii. Evaluación de la calidad y cantidad de ADN.

La calidad y la cantidad de ADN total en las muestras se evaluó por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % con 0.05 μ g/mL de bromuro de etidio (EtBr). El tamaño y la integridad del ADN se estimaron comparando contra un marcador de peso molecular de concentración conocida (Invitrogen High ADN Mass™ Ladder). Cada muestra fue clasificada en función de la intensidad (cantidad) y el barrido (calidad) de la banda al visualizar el gel en una mesa de luz ultravioleta. Finalmente, con base en dicha clasificación, las muestras fueron diluidas para una concentración aproximada de entre 10 y 15 ng/ μ L para su posterior amplificación por PCR.

iii. Amplificación de la región control mitocondrial.

Mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Mullis y Falona, 1987), se amplificó un fragmento de 720 pares de bases (pb) correspondiente a la porción más variable de la región control del ADNmt y que es homóloga a la de otras especies del genero *Calidris* (Wenink *et al.* 1993, 1994, 1996, Wennerberg 2001; Buehler y Baker 2003, 2005).

El protocolo de amplificación y los cebadores se emplearon de acuerdo a lo reportado por Vilanova (2006), los últimos flanquean una sección de 745 pb (correspondientes al sitio 37 y hasta el 782 de la secuencia GenBank L20137): dCmRCmtFw (5'-CCCCATACTACATACCATC-3') y CmRCmtR (5'-GTCCCACAAGCATTTCATT-3').

Las reacciones de PCR se efectuaron a partir de 10 ng de ADN genómico en un volumen final de 25 μ L de una solución amortiguadora Tris-HCl 22 mM (pH 8.4) conteniendo KCl 55 mM, MgCl₂ 3.0 mM, dNTP's 220 μ M, 0.8 U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen™) y 0.3 μ M de cada cebador.

El perfil programado en el termociclador para la amplificación incluyó un ciclo de desnaturalización inicial de 4 minutos a 94°C y 30 ciclos con las siguientes condiciones: 45 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos para la reincorporación de los cebadores a 53°C y 30 segundos de extensión de la cadena a 72°C. Por último, se incorporó un ciclo adicional de extensión final por 5 minutos a 72°C. Las amplificaciones positivas y en las que se obtuvo suficiente producto de PCR fueron almacenadas a 4°C para posteriormente purificarlas usando columnas

PureLink™ PCR Clean-Up (Invitrogen™). La concentración final de los productos purificados fue evaluada por electroforesis en un gel de agarosa-EtBr.

iv. Secuenciación.

Aproximadamente 200 ng del producto de PCR purificado de cada muestra se mezclaron por separado con 500 picomoles de cada cebador en un volumen final de 12 µL y fueron enviadas a a SeqXcel Inc.¹ en San Diego, California, EE.UU. en donde se efectuó su secuenciación automatizada en un aparato ABI Prism 3100 (Automated Capillary ADN Sequencer) usando terminadores de secuencia BigDye® (Applied Biosystems). De esta forma, se secuenciaron de manera independiente, la cadena ligera y la cadena pesada del fragmento de ADN.

III. Trabajo de Gabinete.

i. Edición y comparación de las secuencias.

Los cromatogramas obtenidos de la secuenciación fueron revisados utilizando el programa Chromas Pro ver. 1.5 (Technelysium LTD), en el que se alinearon ambas cadenas para cada una de las muestras. Una vez que se revisaron las incongruencias entre cadenas, eliminando las ambigüedades, las regiones de los extremos correspondientes a las secuencias de los cebadores fueron removidas

¹ SeqXcel Inc. 11526 Sorrento Valley Road. Suite B2. San Diego, CA, EUA. <http://www.seqxcel.com>

Utilizando los programas MEGA 4.0 (Tamura *et al.* 2007) y DNAsp 5.10.01 (Librado y Rozas, 2009), se alinearon las secuencias consenso de los individuos, se identificaron los sitios variables y se definieron las secuencias únicas (haplotipos).

ii Estimadores de diversidad genética y análisis de varianza molecular.

Utilizando Arlequin V.3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) se calcularon los índices de diversidad molecular a nivel haplotípico y nucleotídico. La diversidad haplotípica (H) y su varianza asociada, se calcularon de acuerdo a Nei (1987) con ayuda del programa Arlequin V.3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). La diversidad haplotípica (H) corresponde a la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar en la muestra, sean distintos y se calculó de la siguiente manera:

$$H = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

Donde: n corresponde al número de copias de haplotipos presentes en la muestra, k , es el número de haplotipos distintos en la muestra y p_i es la frecuencia del haplotipo i .

Por su parte, la diversidad nucleotídica (π) y su varianza se calcularon mediante los algoritmos de Tajima (1983) y Nei (1987). La diversidad nucleotídica se calculó de la siguiente manera:

$$\pi_n = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j < i} p_i p_j d_{ij}}{L}$$

Donde d_{ij} , es el número de mutaciones por nucleótido estimadas desde la divergencia de los haplotipos i y j , k es el número de haplotipos y p_i es la frecuencia del haplotipo i . L es el número de nucleótidos en la secuencia.

El estadístico D de Tajima se calculó a través del programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005), el cual se utiliza para evaluar la hipótesis nula de neutralidad en el proceso de evolución del marcador. Este estadístico compara el número de sitios segregantes en la muestra y el promedio de diferencias pareadas y supone que los dos parámetros deberían obtener el mismo valor en un modelo sin recombinación. Las diferencias encontradas se le atribuyen a los efectos de selección, circunstancias demográficas como un cuello de botella o una expansión demográfica. El índice se define así:

$$D = \frac{\theta_{\pi} - \theta_s}{\sqrt{\text{Var}(\theta_{\pi} - \theta_s)}}$$

Donde $\theta_{\pi} = \pi$, $\theta_s = S / \sum(1/i)$, donde S es el número de sitios segregantes.

Un modelo de diferencias nucleotídicas pareadas se utilizó para calcular los índices estadísticos de diferenciación genética de Wright (F_{ST}) y en el caso de sus análogos Φ_{ST} , se utilizaron las distancias genéticas basadas en el modelo de sustitución nucleotídica más acorde a los datos. Las evaluaciones para los modelos de sustitución nucleotídica se efectuaron en el programa jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008).

Posteriormente se llevaron a cabo los análisis de la varianza molecular (AMOVA), que con el objeto de determinar la presencia de estructura genética entre los individuos de las diferentes agregaciones invernales, se plantearon de la siguiente forma:

1. Entre las localidades para evaluar si existe un patrón de uso diferencial de los corredores migratorios y estimar los niveles de conectividad entre las distintas agregaciones.
2. Entre sexos (hembras, H; machos M) para evaluar si la migración diferencial tiene un efecto en la distribución de la variabilidad genética.
3. Entre edades (adultos, A; joven, J) para determinar si los grupos de adultos y jóvenes que invernan en México pertenecen a un mismo grupo genético.

Para todas las pruebas, la significancia se determinó con base en 10,000 permutaciones usando los intervalo de confianza al 95% ($\alpha=0.05$).

iii. Demografía histórica y filogenia intraespecífica.

El análisis de la demografía histórica se efectuó con base en la prueba de neutralidad selectiva de Tajima (1996), que modela la diversidad genética esperada bajo diferentes escenarios demográficos. Todas estas pruebas se realizaron con ayuda del programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). Los índices de neutralidad

toman valores negativos cuando en la muestra se observa un número mayor de haplotipos al que se esperaría si la población estuviera en equilibrio demográfico (población de tamaño constante, relativamente estable y cercano a la capacidad de carga).

El programa TreeView (Page, 2001) se utilizó para construir un árbol filogenético de haplotipos basado en el modelo de Tamura-Nei de evolución neutral. También, un árbol se dedujo a partir del número de diferencias apareadas presentes en las secuencias haplotípicas. El método de distancias apareadas evalúa grupos no ponderados y utiliza la sumatoria de las medias aritméticas de las diferencias que existen entre las secuencias para así organizar las ramas del árbol. Cada una de las ramas del árbol corresponde a uno de los haplotipos en la muestra. El árbol es computado entonces por el programa partiendo de una matriz de distancias que considera al vecino más cercano (Neighbor-Joining) para dar estructura a la ramificación del árbol. El árbol que se consideró para los resultados fue generado en base a un logaritmo correspondiente al modelo de Tamura-Nei de evolución neutral con una corrección $\gamma = 0.01$. Este modelo fue propuesto por el programa Model Test como uno de los algoritmos de mejor ajuste para el tipo de datos con los que se contaba.

Resultados

I. Extracción, amplificación y secuenciación del DNAm.

Se lograron extraer entre 100 y 200 ng de DNA de alto peso molecular (>1 Kb) a partir de un promedio de 50 μ L de plasma sanguíneo de *C. mauri*. Se trabajó con 410 muestras provenientes de las ocho localidades muestreadas. El grupo de muestras provenientes de la localidad de Punta Banda no se consideró en el análisis de diferenciación genética debido a que la proporción de hembras y machos no fue consistente con el resto de las agregaciones y el tamaño de muestra (n=11) fue menor que en el resto de las localidades.

El tamaño de las secuencias del fragmento amplificado fue de aproximadamente 749 pb, sin embargo, después de la edición de los sitios correspondientes a los cebadores y de los sitios con ambigüedades presentes en los extremos de las cadenas, se logró recuperar en todos los individuos un fragmento de 635 pb sin ambigüedades en la secuencia (Tabla II). La composición nucleotídica de la muestra fue relativamente heterogénea (C = 25.04%; T= 30.53%; A= 25.07%; G= 19.36%).

Tabla II. Secuencia correspondiente al haplotipo WESA001. Los números entre corchetes indican la posición del último nucleótido dentro de la secuencia. La secuencia se encuentra en dirección 3'-5'.

AATGAACCTAGGAATATTCACATACTACGTACTAAACCCATCAACTTGCT	[50]
AGAATTATACATAACAAACCCCTCGAAAGTGTACGGCAGTGCTTTAACACA	[100]
CGCTATGAATGGTCTAAGTGCAGACAGTTCGAAAACCTTTGAAGTGCACA	[150]
CCAGTCGTACCAGGTTATTTATTAATCGAGCTCCTCACGTGAAATCAGCA	[200]
ACCCGGCGTAAGTAATGTCCTGCGTTACTAGCTTCAGGCCCATTCCTTTCC	[250]
CCCTAAACCCCTAGCACAACTTGCTCTTTTGCGCCTCTGGTTCTATGTCA	[300]
GGGCCATAAATAGGTTAATACTCATAACTTGCTCTTTACGAATACATCTG	[350]
GTTGGCTATATATCACCATTTTCGTCCGTGATCGCGGCATTCCAAAATTC	[400]
TTATACTTTTGGTTCCTTTTTTTTTTTGGGGGGTCTTACAGGTTGCCCTC	[450]
CCAGCGCAACGGGTGAATACAATCTAAGACCTGTGCATCTCATGCGTTGC	[500]
GGCCTTATTTTGGCCCTCAGGCGTACTGAATGAGACGGTTTCAAGTGTT	[550]
TGGGGAATCATATCAACACTGATGCACTTTGTTTTTACTTGGTTATGGC	[600]
CTCCCCGCAAGCAGCGTTCATGCCACTGTTTAATG	[635]

Tabla III. Frecuencia relativa de los haplotipos mitocondriales de *C. mauri* agrupados por agregación invernante. Las abreviaciones empleadas para denotar las localidades corresponden a las descritas en la Tabla I.

Haplotipo	AG	PB	GN	LP	EP	HC	BSM	YUC	D	Total	<i>f</i>
WESA001	24	7	27	37	19	29	29	24	4	200	48.78%
WESA003	0	0	2	2	5	1	1	3	0	14	3.41%
WESA004	0	0	5	1	1	1	3	1	0	12	2.92%
WESA005	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0.48%
WESA008	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.24%
WESA010	0	1	1	2	0	0	2	2	0	8	1.95%
WESA013	0	0	0	0	0	1	3	0	0	4	0.97%
WESA020	0	1	1	0	0	0	1	0	0	3	0.73%
WESA024	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0.48%
WESA025	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0.24%
WESA027	2	0	0	0	1	0	0	1	0	4	0.97%
WESA033	0	0	1	1	1	1	0	0	0	4	0.97%
WESA036	2	0	1	0	4	4	1	0	1	13	3.17%
WESA042	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.24%
WESA043	1	0	1	0	0	1	1	0	0	4	0.97%
WESA044	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0.48%
WESA045	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0.48%
WESA046	3	0	0	0	1	3	0	0	0	7	1.70%
WESA047	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.24%
WESA048	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.24%
WESA049	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.48%
WESA050	1	0	0	1	0	0	0	1	0	3	0.73%
WESA051	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0.48%
WESA052	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.24%
WESA053	2	0	0	0	2	2	0	0	0	6	1.46%
WESA054	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.24%
WESA055	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.24%
WESA056	1	0	3	2	0	0	0	1	0	7	1.70%
WESA057	0	0	0	1	1	1	1	0	0	4	0.97%
WESA058	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0.48%
WESA059	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0.24%
WESA060	0	0	1	0	2	1	2	1	0	7	1.70%
WESA061	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0.24%
WESA062	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0.24%
WESA063	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0.24%

Haplotipo	AG	PB	GN	LP	EP	HC	BSM	YUC	D	Total	<i>f</i>
WESA064	0	0	0	1	2	0	0	0	0	3	0.73%
WESA065	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0.48%
WESA066	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0.24%
WESA067	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0.24%
WESA068	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0.24%
WESA069	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0.24%
WESA070	0	0	0	0	1	3	0	0	0	4	0.97%
WESA071	0	0	2	0	1	0	1	0	1	5	1.21%
WESA072	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0.24%
WESA073	0	0	0	0	0	2	1	0	0	3	0.73%
WESA074	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.24%
WESA075	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.24%
WESA076	0	0	0	0	0	3	1	1	0	5	1.21%
WESA077	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.24%
WESA078	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	0.48%
WESA079	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.24%
WESA080	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.24%
WESA081	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.24%
WESA082	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.24%
WESA083	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.24%
WESA084	0	0	1	2	0	0	0	0	0	3	0.73%
WESA085	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0.24%
WESA086	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0.24%
WESA087	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0.24%
WESA088	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0.24%
WESA089	0	0	3	1	0	0	2	1	1	8	1.95%
WESA090	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2	0.48%
WESA091	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.24%
WESA092	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.24%
WESA093	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0.48%
WESA094	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2	0.48%
WESA095	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2	0.48%
WESA096	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.24%
WESA097	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.24%
WESA098	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0.48%
WESA099	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.24%
WESA100	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.24%
WESA101	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.24%
WESA102	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0.24%
WESA103	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0.24%

Haplotipo	AG	PB	GN	LP	EP	HC	BSM	YUC	D	Total	<i>f</i>
WESA104	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0.24%
WESA105	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0.24%
WESA106	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0.24%
WESA107	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0.24%
WESA108	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0.24%
WESA109	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0.24%
WESA110	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0.24%
WESA111	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0.24%
WESA112	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0.24%
WESA113	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0.24%
WESA114	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.24%
WESA115	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0.48%

II. Diversidad Genética.

El alineamiento y la comparación de las secuencias permitieron la identificación de 56 sitios variables que definieron un total de 87 haplotipos en *C. mauri* (Apéndice 1). De estos sitios, 39 resultaron transiciones, 12 transversiones y dos deleciones. El número de sitios filogenéticamente informativos fue de 28, lo que representa tan sólo el 7.7% del total de la secuencia analizada.

Los haplotipos se nombraron con base en la nomenclatura empleada anteriormente para la especie (Vilanova, 2006). Únicamente haplotipos etiquetados como WESA42 o más alto (WESA43, WESA44, etc...) son particulares de este trabajo. Cerca del 50% de los individuos compartieron el haplotipo más común (WESA01), el cual estuvo presente en todas las localidades en una proporción similar. Por su parte, cerca del 12% de la muestra correspondió a aquellos haplotipos representados por sólo un individuo (Tabla III).

Aunque más adelante se discutirán las similitudes y diferencias entre el presente estudio y el trabajo previo de Vilanova (2006), resulta importante destacar ahora que el análisis conjunto de estos datos, dio como resultado un total de 115 haplotipos registrados para las agregaciones invernales de México. Mucho más importante e interesante resultó el hecho de que el 85% de los haplotipos aquí reportados no se registraron en el estudio anterior y que 60% de los haplotipos previamente reportados no se observaron en la presente muestra.

El estudio de Vilanova (2006) es específico para la localidad de Bahía Santa María. En este lugar su análisis identificó 41 haplotipos presentes en 241 individuos. A partir de la muestra estudiada ($n=410$), se encontraron 13 de estos haplotipos, a partir en 56 individuos ubicados en BSM. Es decir, únicamente el 25 % de aquellos reportados en su estudio. Cabe mencionar que se encontraron ocho haplotipos nuevos en esta localidad. Al ser más corta la secuencia utilizada en este trabajo, una fracción de los haplotipos presentes en el trabajo de Vilanova no pudieron ser identificados debido a la ausencia de particulares sitios variables en el análisis.

La diversidad haplotípica (H) para la muestra global fue de $H=0.757$ ($d.e.=0.024$). El número promedio de diferencias pareadas entre todas las secuencias fue de 1.534 ($d.e.=0.922$), por lo que la diversidad nucleotídica de la muestra fue del 0.20% ($\pi_n=0.002$; $d.e.=0.002$). Las razones individuos/haplotipo, así como las estimaciones de diversidad haplotípica (H), el número de diferencias pareadas (π) y la diversidad nucleotídica (π_n) para cada una de las agregaciones se resumen en la Tabla IV.

Tabla IV. Diversidad genética en las agregaciones invernales de *C. mauri* en México. Los códigos de las localidades corresponden a aquellos empleados en la Tabla I.

Localidad	n	nH	n/nH	H (d.e.)	π (d.e.)	π_n(d.e.)
AG	48	19	2.53	0.749 (0.068)	1.635 (1.090)	0.003 (0.002)
PB	11	5	2.20	0.618 (0.164)	1.273 (0.975)	0.002 (0.002)
GN	62	24	2.58	0.804 (0.051)	1.712 (1.124)	0.003 (0.002)
LP	61	20	3.05	0.633 (0.073)	1.183 (0.854)	0.002 (0.001)
BSM	56	21	2.67	0.731 (0.066)	1.289 (0.910)	0.002 (0.001)
EP	53	25	2.12	0.862 (0.043)	1.987 (1.265)	0.003 (0.002)
HC	64	25	2.56	0.790 (0.053)	1.461 (0.996)	0.002 (0.002)
YUC	44	18	2.44	0.704 (0.078)	1.282 (0.911)	0.002 (0.001)
D	11	7	1.57	0.873 (0.089)	1.782 (1.256)	0.003 (0.002)
Global	410	87	4.71	0.757 (0.024)	1.534 (0.922)	0.002 (0.002)

Como puede observarse en la Tabla IV, los distintos estimadores de diversidad genética fueron muy similares entre las localidades, lo que sugiere que no existe una distribución geográfica diferencial de las variantes genéticas en las agregaciones invernales de México.

III. Estructura Genética.

De entre los modelos de sustitución nucleotídica analizados a través del *jModelTest* v0.1.1, se seleccionó al modelo de Tamura-Nei con corrección gamma ($\alpha=0.01$) y sitios invariables. Aunque este modelo no fue el de mayor ajuste, sino el quinto de entre los 82 modelos probados (Apéndice 2), se seleccionó con base en que las diferencias entre los mejor calificados fue mínima y con fines comparativos, ya que dicho modelo fue el empleado en un estudio previo (cf. Vilanova 2006).

Con base en este modelo de sustitución se calcularon las distancias genéticas entre los haplotipos y se efectuaron los análisis de varianza molecular (AMOVA) entre las 7 agregaciones invernantes de *C. mauri*, observando diferencias significativas sólo al considerar las distancias moleculares (Tabla V).

Tabla V. Partición de la varianza para el análisis de diferenciación genética para las agregaciones invernantes de *C. mauri* en México.

	Partición de la varianza			<i>p</i> (d.e.)
	Entre agregaciones	Entre individuos		
F_{ST}	0.0057	0.57%	99.43%	0.081 (0.003)
Φ_{ST} *	0.0214	2.14%	97.86%	<0.050 (0.000)
Φ_{ST} **	0.02166	2.17%	97.83%	<0.050 (0.000)

*Distancia molecular calculada con base en el número de diferencias pareadas (pairwise-differences).

**Distancia molecular calculada con base en el modelo de Tamura-Nei ($\alpha=0.01$).

Al realizar las comparaciones pareadas por agregación invernal, sólo ocho de las 21 comparaciones resultaron significativas para los índices de fijación genética de Wright (F_{ST}), mientras que cinco lo fueron al utilizar el índice Φ_{ST} (Tabla VI, Apéndice 3).

La prueba de diferenciación genética por distancias moleculares (Φ_{ST}) se realizó utilizando el modelo de Tamura-Nei ($\gamma=0.01$). La comparación genética fue significativa para: Alto Golfo y La Laguna Ojo de Liebre; La Paz y El Alto Golfo; La Paz y Ensenada Pabellones; La Paz y El Caimanero; y finalmente El Alto Golfo y Santa María.

Estas comparaciones se observan en la Tabla VI. Para observar los valores de prueba estadística (p) y el resto de los valores de Φ_{ST} se debe consultar el Anexo 3.

Tabla VI. Diferenciación genética entre agregaciones invernantes de *C. mauri* estimada con base en los índices de fijación genética. Los valores de F_{ST} se presentan en la diagonal inferior y los valores de Φ_{ST} en la diagonal superior. Sólo se presentan los valores que resultaron significativos. Los códigos de las localidades corresponden a aquellos empleados en la Tabla I.

	AG	GN	LP	EP	BSM	HC	YUC
AG	0.000	0.033	0.050	<i>n.s.</i>	0.053	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
GN	0.004	0.000	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
LP	0.007	<i>n.s.</i>	0.000	0.050	<i>n.s.</i>	0.013	<i>n.s.</i>
EP	<i>n.s.</i>	0.004	0.039	0.000	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
BSM	0.001	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	0.015	0.000	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
HC	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	0.016	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	0.000	<i>n.s.</i>
YUC	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	0.000

Debido a que la distribución demográfica en la especie es un rasgo descriptivo durante la época de invernación, se analizaron las características genéticas por sexo y edad. Se definieron primero grupos generales de machos y hembras así como de juveniles y adultos y en seguida se definieron 4 grupos integrales compuestos por el sector de los machos adultos (MA), los machos juveniles (MJ), las hembras adultas (HA) y las hembras juveniles (HJ). En la Tabla X se muestra la diversidad haplotípica para los primeros cuatro grupos, así como su diversidad nucleotídica y número de diferencias pareadas.

Tabla VII. Diversidad haplotípica y nucleotídica en *C. mauri* en grupos con respecto al sexo y a la edad. Los códigos de sexo y edad corresponden a los usados en la Tabla I.

	n	nH	H (d.e.)	π (d.e.)	π_n (d.e.)
Machos	209	56	0.733 (0.034)	1.510 (0.912)	0.00237 (0.0015)
Hembras	176	50	0.766 (0.034)	1.529 (0.922)	0.00240 (0.0016)
Adultos	201	52	0.707 (0.036)	1.364 (0.846)	0.00214 (0.0014)
Jóvenes	197	62	0.796 (0.030)	1.677 (0.988)	0.00264 (0.0017)
MA	99	30	0.709 (0.514)	1.338 (0.838)	0.00210 (0.0014)
HA	97	31	0.689 (0.054)	1.381 (0.857)	0.00217 (0.0015)
HJ	78	31	0.842 (0.039)	1.685 (0.998)	0.00265 (0.0017)
MJ	110	44	0.759 (0.045)	1.667 (0.987)	0.00262 (0.0017)

Se realizó una AMOVA (Tabla VI) para comparar genéticamente las componentes demográficas en las agregaciones invernantes de *C. mauri*. Para la prueba de diferenciación de índices de fijación genética (F_{ST}) se utilizaron las frecuencias haplotípicas y para su homólogo Φ_{ST} , se utilizó el modelo de Tamura-Nei de distancias moleculares ($\gamma=0.01$). La AMOVA se realizó con un I.C. del 95% ($\alpha=0.05$).

Tabla VIII. Diferenciación genética entre diferentes grupos demográficos de *C. mauri* para las agregaciones invernales en México.

Grupo	F_{ST}	p	Φ_{ST}*	P
Machos vs. Hembras	0.00029	0.2973	0.00132	0.1920
Juveniles vs. Adultos	0.00299	0.1083	0.00089	0.2421

*Se utilizó el modelo de Tamura-Nei de distancias moleculares ($\gamma=0.01$). Los valores están tomados de una prueba exacta de diferenciación en un AMOVA realizada al 95 % de I.C. ($\alpha=0.05$).

Tabla IX. Diferenciación genética entre los grupos de edad y sexo en las agregaciones invernales de *C. mauri*. Los códigos de los grupos corresponden a los usados en la Tabla I.

	F_{ST}	p	Φ_{ST}*	P
MA vs. HA	0.00241	0.6028	0.0009	0.2341
MA vs. HJ	0.01336	0.0382	0.0041	0.1453
MA vs. MJ	0.00226	0.6241	0.0017	0.6594
MJ vs. HA	0.00147	0.4834	0.0018	0.2341
MJ vs. HJ	0.00753	0.0772	0.00208	0.2375
HJ vs HA	0.01657	0.0230	0.00411	0.1360

Valores tomados de una AMOVA realizada al 95 % de I.C. ($\alpha=0.05$).

IV. Demografía histórica y filogenia intraespecífica.

La prueba de neutralidad D de Tajima tuvo valores significativos para todas las agregaciones, los cuales fueron negativos y oscilaron entre -1.4 y -2.3, lo cual corresponde a un escenario de expansión demográfica para la población (Tabla X).

Tabla X. Prueba de Tajima para determinar el escenario demográfico histórico de las agregaciones invernantes de *C. mauri* en México. Los códigos de las localidades corresponden a aquellos empleados en la Tabla I.

Localidad	D' Tajima	P
AG	-1.8361	0.0120
PB	-1.8969	0.0070
GN	-2.1506	0.0010
LP	-2.2928	0.0010
EP	-1.4839	0.0380
BSM	-2.2063	0.0000
HC	-2.2376	0.0010
YUC	-2.0605	0.0030
Global	-2.1996	< 0.05

Este escenario estuvo sustentado también por el análisis de la distribución de las diferencias pareadas entre haplotipos (mismatch distribution) y la topología de la red de mínima separación de los haplotipos. Como puede observarse en la figura 7, los datos se ajustan mejor a un escenario de expansión demográfica en algún momento reciente de la historia evolutiva de la población, no así a un escenario en el que la población se mantuviera de tamaño relativamente constante. De igual forma, la topología radiada de la red de mínima separación (Fig. 8), refleja claramente como la población tuvo un episodio de crecimiento demográfico súbito a partir del haplotipo central y de mayor frecuencia (WESA01)

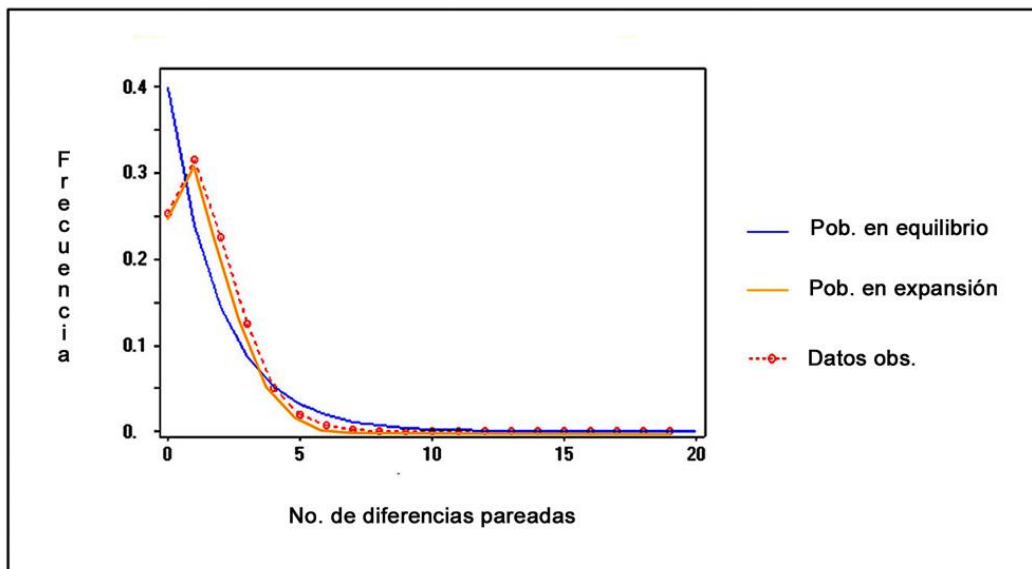


Figura 7. Distribución de las diferencias pareadas observadas entre los haplotipos mitocondriales de *C. mauri*.

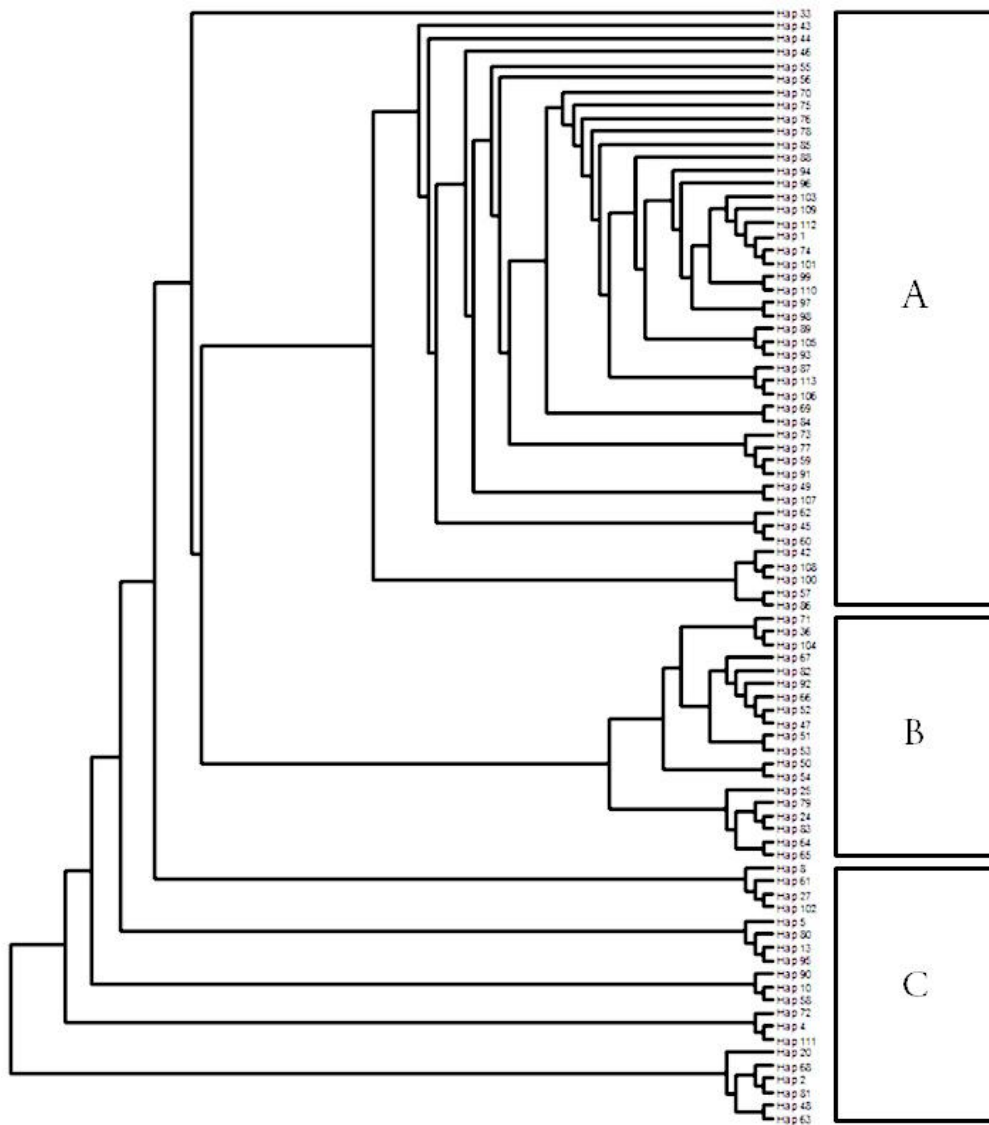


Figura 9. Topología del árbol filogenético de haplotipos mitocondriales para *C. mauri*.

Se realizó un árbol de coalescencia entre haplotipos (Fig. 9) basándose en las distancias moleculares. Se pueden observar tres grupos (A, B y C) donde el grupo C es el más antiguo y contiene al haplotipo WESA01. Los haplotipos WESA03, WESA04 y WESA36 probablemente derivaron de WESA01 y dieron origen al resto de los haplotipos en los grupos B y C.

Discusión

I. Variabilidad genética.

Los niveles de variabilidad genética para el playerito obtenidos en este trabajo son congruentes con los resultados obtenidos Vilanova (2006). El trabajo de Vilanova (2006) utiliza el ADN mitocondrial como marcador en su estudio. Sin embargo, dicho trabajo estudió específicamente la localidad de Bahía Santa María. A partir de una secuencia de 685 pb perteneciente también a la RC, encontró 41 haplotipos a partir de 179 individuos. La diversidad haplotípica encontrada en el trabajo de Vilanova (2006) fue alta ($H=0.79$) y la diversidad nucleotídica baja ($\pi_n=0.0029$).

Es importante señalar que únicamente el 60% del total de haplotipos descritos por Vilanova (2006) se encuentra presente en la muestra estudiada en este trabajo. Así mismo, la proporción de haplotipos reportados por Vilanova (2006) encontrados en Bahía Santa María en este trabajo es de solo el 25%. Esta situación orilla a suponer que existe un mayor número de haplotipos presentes en la población global. El tamaño de muestra utilizado en este trabajo para BSM representa únicamente el 0.02% de la población migrante anual en este sitio, la cual está estimada en 300,000 individuos (Engilis *et al.*, 1998). Si consideramos que la población global está estimada en 3.5 millones, caemos en cuenta que la constitución haplotípica presente en la especie debe ser varios órdenes de magnitud mayor que lo que se puede reportar en este trabajo. Sin embargo, los índices de variabilidad y la información genética utilizada para deducir la estructura genética continua siendo confiable para el conjunto de datos. Esta afirmación se basa en dos situaciones. Primero, la estructura

de la composición haplotídica en la población es bien definida: el 50% de los individuos comparten el mismo haplotipo (WESA001), mientras que el 50% restante porta haplotipos de baja frecuencia. Esta situación persiste en los tres trabajos mencionados, lo que nos permite sugerir que la composición global asemeja esta distribución. En segundo término, los índices de diversidad genética tienen atributos de un indicador cualitativo, son hasta cierto punto independientes de la N global. La mayoría de los autores coinciden en que a partir de $n > 35$ el tamaño de muestra es suficiente para obtener índices confiables de la genética de una población a mesoescala. Se trata de indicadores relativos que conservan las proporciones a medida que la población que describen aumenta.

Estudios concisos se han realizado acerca de la diversidad genética de otras especies de playeritos: *C. canutus*, (Buheler *et al.*, 2005), *C. alpina* (Buheler *et al.*, 2005), *C. fuscicollis* (Wennerberg y Burke, 2001), *C. ferruginea* (Wennerberg, *et al.*, 2002), y *C. temminckii* (Rönkä *et al.*, 2008). Resultado de estos estudios, se ha corroborado que existe un índice bajo en la variabilidad genética nuclear y mitocondrial en el género *Calidris*. La diversidad genética determinada en este trabajo para el playerito occidental se ubica dentro del intervalo de variabilidad reportado en otros miembros congénéricos (Tabla XI). Si bien el género está caracterizado por números poblacionales elevados, su variabilidad genética es inusualmente baja. A este respecto, Nabholz (2009) publicó que el intervalo de diversidad nucleotídica para las aves costeras árticas oscila alrededor de $\pi_n = 0.040$ (+/- 0.041). Es un hecho que la diversidad nucleotídica se ha mantenido más elevada en especies tropicales que en las árticas y esto se debe a la historia paleoclimática que han atravesado ambos grupos de

animales. Las aves tropicales han experimentado una evolución ininterrumpida a lo largo de aproximadamente 700,000 años, mientras que las aves de latitudes templadas y árticas han enfrentado al menos siete eventos conocidos de glaciación que los han orillado a experimentar cuellos de botella en sus poblaciones. El hecho de que una población manifieste una diversidad nucleotídica baja no significa que se trate de una unidad ecológica débil forzosamente o que amerite urgencia en su estatus de conservación.

Tabla XI. Comparación de la diversidad genética en el ADNmt entre distintas especies de especies del género *Calidris*.

Especie	<i>n</i>	<i>n_H</i>	Estimación poblacional	π_n	Fuente
<i>C. mauri</i>	410	87	3'500,000	0.0024	Este trabajo.
<i>C. canutus</i>	91	25	1'145,000	0.002	Buheler <i>et al.</i> , 2005.
<i>C. alpina</i>	208	53	3'500,000	0.0036	Buheler <i>et al.</i> , 2005.
<i>C. temminckii</i>	127	7	80,000	0.0018	Rönkä <i>et al.</i> , 2008.
<i>C. fuscicollis</i>	52	21	1'120,000	0.003	Wennerberg <i>et al.</i> , 2002

Los sitios de reproducción del playerito están bien delimitados y pudiéramos inclinarnos a pensar que los niveles de variabilidad bajos son reflejo de una tasa elevada de endogamia. Sin embargo, estos índices de variabilidad tienen implicaciones muy claras con su historia demográfica. Varios trabajos coinciden en el hecho de que los niveles de variabilidad genética en las poblaciones de aves árticas se encuentra en recuperación después de un severo cuello de botella sufrido durante el Pleistoceno

tardío, más precisamente alrededor del episodio Wisconsiniano de glaciación (Drovetski *et al.*, 2004; Hughes, 2007; Colwell, 2010). Estos trabajos coinciden también en que el grupo de las aves costeras se encuentra atravesando una expansión demográfica reflejada en sus elevados números poblacionales.

Las rutas y patrones migratorios, así como las áreas de reproducción de las aves costeras sufrieron cambios importantes durante los ciclos glaciales que sucedieron en el Pleistoceno (Rappole y Jones, 2003; Drovetski *et al.*, 2004; Buehler y Baker, 2005).

No sólo los máximos glaciares responsables de convertir en desierto ártico a las regiones de tundra fueron disminuyeron las poblaciones de estas especies, sino que también los periodos interglaciares donde subió el nivel del mar eliminaron los sitios utilizados por las comunidades de aves árticas. Muchos ambientes de bosque ártico quedaron convertidos en playas durante el episodio interglacial que procedió a la última gran glaciación (aproximadamente hace 70, 000 – 10, 000 años). Es posible que no haya transcurrido el tiempo necesario para que los ambientes sedimentarios adecuados se formaran y se contara con una población generosa de bivalvos y crustáceos, alimento fundamental de las aves costeras (Buehler y Baker, 2006). El severo cuello de botella poblacional se refleja actualmente en los índices genéticos de las poblaciones de aves costeras que habitan el mundo.

La diversidad haplotípica en la muestra global es alta, $H= 0.7572$, este valor indica que los números de la población global de la especie son altos, lo cual concuerda con las características del playerito occidental. La distribución de la variación genética en una población está influenciada por las fuerzas microevolutivas que están actuando en

ella, en el caso de la RC del DNAm el índice de mutación presente es alto y esto ayuda a que el *pool* de haplotipos presentes en la población sea elevado y se incremente rápidamente.

La diversidad haplotípica también está asociada con el flujo génico y con el comportamiento de la especie dentro del contexto de distribución geográfica. Continuando con el trabajo de genética poblacional que se había realizado a partir de la variación aloenzimática en las especies, Avise (1994) correlacionó la diversidad haplotípica del ADN mitocondrial con la distribución geográfica de una especie. Así, consideremos el hecho de que una estructura espacial definida es más difícil de observar en una especie migratoria. Las especies migratorias abandonan las zonas de reproducción en grupos relativamente grandes. El orden espacial de los individuos en se pierde a lo largo de la migración. Al momento de distribuirse en las comunidades de invernación, siempre sucede un reacomodo. Se ha observado que, a lo largo de las rutas migratorias, en algunas localidades se congregan grandes fracciones de la población global (Wilson, 1994), esto evita el que la composición genética en estos sitios presente estructura alguna. En el caso del playerito occidental, existe un comportamiento de distribución demográfica durante la migración definido por el hecho de que las hembras migran a latitudes más bajas que los machos (Nebel *et al.*, 2002). Este hecho aunado a que algunos juveniles pasen sus primeros dos años en las zonas de invernación (Fernández *et al.*, 2006; O'Hara *et al.*, 2005) permitiría suponer *per se* un sesgo en la distribución espacial de las variante genéticas. Por esta razón, es probable que la distribución espacial de dichas variantes en las zonas de reproducción no se mantenga durante la estancia en las zonas de invernación.

II. Estructura genética.

La prueba estadística para diferenciación genética (Tabla V) resultó únicamente significativa para la diferenciación molecular (Φ_{ST}), mientras que por frecuencias de haplotipos no es significativa. Estos resultados aportan sustancia para manejar la población de invernantes como una unidad genética independiente de sus preferencias por los sitios de invernación. Es decir, no existe una composición haplotípica estructurada en la zona de invernación. La presencia de un gran número de haplotipos mitocondriales y la distribución semejante en cuanto a las proporciones presentes en cada agregación evita que se observe una estructura genética definida.

Las distancias moleculares entre los haplotipos y el hecho de que exista un número grande de haplotipos permite que la diferencia entre agregaciones sea significativa con respecto a composición nucleotídica (Φ_{ST}), sin embargo el grado de diferenciación es mínimo. Se esperaría que a medida que el tiempo avance, este rasgo se vuelva más pronunciado. Este resultado no forzosamente sugiere una estructura en los procesos de entrecruzamiento de la especie, se debe a los procesos de mutación que actúan sobre el marcador.

La prueba comparativa de diferenciación entre agregaciones (Tabla VI) propone diferencias muy sutiles en las agregaciones. Los resultados indican muy claramente que no existen diferencias tangibles entre las agregaciones, aún cuando existen seis comparaciones que resultaron significativas. El grado de diferenciación es prácticamente despreciable en ambos estadísticos (por frecuencias de haplotipos y

con respecto a distancias moleculares). Únicamente es rescatable la diferenciación que existe entre La Paz y Ensenada Pabellones derivada de su composición haplotípica (F_{ST}). La diferencia en la composición genética de La Paz y Ensenada Pabellones se pudiera deber a que los migrantes que las habitan arriban via las dos distintas rutas descritas para los invernantes de *C. mauri* en México (Carmona *et al.*, 2004). Estas dos rutas descritas implican que un sector de la población de migrantes utilice la península de Baja California y otro sector sobrevuele el macizo continental correspondiente a los estados de Sonora y Sinaloa.

La prueba de diferenciación molecular entre las agregaciones sustenta el supuesto de que la agregación de La Paz recibe individuos con características diferentes al resto de las agregaciones. No existen diferencias entre las agregaciones del Atlántico y las del Pacífico. Bahía Santa María presentó diferencias con el Alto Golfo y esto se puede deber a la distancia geográfica evidentemente y al hecho de que la población invernante de ambos sitios es característica de entre otras agregaciones ya que reciben un gran número de playeritos cada temporada. Una vez más podemos inclinarnos por la suposición de que no existe una estructura genética asociada o causal a la genética de la especie.

Dos localidades de la península de Baja California presentaron diversidades haplotípica por debajo y por encima que el resto de las agregaciones. Es contradictorio que las localidades pertenezcan a una ruta migratoria común (la peninsular) y sin embargo presenten índices de diversidad diferentes, aunque debe tomarse en cuenta que dicha diferencia pudiera deberse a un sesgo en el muestreo. Únicamente podemos

destacar que La Paz presentó una proporción de juveniles un 30% mayor a la respectiva en Guerrero Negro. Esto es consistente con el comportamiento migratorio de la especie (Fernández *et al.*, 2006) y pudiera explicar la situación ya que los juveniles están asociados a las madres y así, ambos presentan el mismo perfil genético en su ADNmt.

Existe una mayor diversidad en los haplotipos representados por los juveniles especialmente en las hembras juveniles donde encontramos la mayor diversidad. Debido a que existe un comportamiento demográfico que divide a los juveniles en aquellos que pasan su primera temporada migrando y aquellos que la pasan en las zonas tropicales de invernación (Fernández *et al.*, 2006), sería interesante conocer la identidad genética de los jóvenes de las agregaciones invernales de latitudes tropicales para corroborar si existen diferencias genéticas asociadas a ese grupo. Los grupos de edad y sexo no fueron significativamente distintos de acuerdo con la prueba AMOVA (Tablas VIII y IX).

Los resultados coinciden con las características que se observan a partir del trabajo realizado por Álvarez (2011) con base en nueve loci microsatelitales. Si bien la naturaleza del ADNmt y de los microsatélites refleja distintos aspectos de una población (el primero no tiene recombinación y es matrilineal, mientras que el segundo sufre recombinación y es biparental), es posible contrastarlos en el sentido de que ambos están indicando que la estructura genética en las zonas invernantes es casi nula. A pesar de estos resultados, aún es necesario investigar la estructura

presente en las zonas de reproducción para poder establecer si la población es efectivamente panmítica.

III. Historia demográfica.

Los resultados obtenidos concuerdan con el panorama paleoecológico que se conoce para los playeritos en general (Buheler y Baker, 2005; Colwell, 2010). La población global de *C. mauri* presenta una evidente huella de expansión demográfica en su ADNmt. La prueba de D de Tajima (Tabla X) resultó significativa para todas las agregaciones y sus valores negativos corresponden al de un escenario de expansión demográfica, lo que coincide con los resultados obtenidos por Vilanova (2006) para esta especie.

El ajuste de los datos al comportamiento de un escenario de expansión demográfica y un escenario de reducción de la población (Fig. 7), se sustenta con la topología radiada de la red de mínima separación (MSN, Fig. 8). Este diagrama MSN permite inferir que el haplotipo más antiguo, a partir del cual han radiado los demás haplotipos, es el WESA001. De la misma forma, al parecer los haplotipos WEeSAa003, WEeSAa004 y WEeSAa036 son también de los más ancestrales, pues de ellos han derivado otros menos frecuentes (Figs. 8 y 9).

Conclusiones

La diversidad haplotípica para *C. mauri* es alta ($H=0.7572$) y resulta congruente con la abundancia de su población global, estimada en 3.5 millones de individuos.

La diversidad nucleotídica de la especie es baja ($\pi_n=0.0024$) debido a la expansión súbita, que aparentemente ocurrió después de la última glaciación, evidenciada del análisis del polimorfismo en los haplotipos mitocondriales.

Aunque el anillado y la telemetría han aportado evidencias de una fuerte fidelidad de *C. mauri* a los sitios de invernación, no se encontró evidencia genética que sustente una clara estructuración genética en las agregaciones presentes en México durante la temporada invernal.

Referencias

- ÁLVAREZ, A.R., 2011. Diferenciación genética de las agregaciones invernantes del playerito occidental en México. Tesis de maestría. UABC. 88 p.
- BALLARD, W., Whitlock, M. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13: 729-744.
- BISHOP, M.A., Warnock, N. y Takekawa, J.Y. 2006. Spring migration patterns in Western Sandpipers *Calidris mauri*. En: *Waterbirds around the world*. G.C. Boere, C.A. Galbraith y D.A. Stroud (eds.). The Stationery Office, Edinburgh, UK. 545-550 pp.
- BUEHLER, D. y Baker, A. 2003. Characterization of the red knot (*Calidris canutus*) mitochondrial control region. *Genome* 46: 565-572.
- BUEHLER, D. y Baker, A. 2006. Reconstructing palaeoflyways of the late Pleistocene and early Holocene Red Knot *Calidris canutus*. *Ardea* 94: 485-498.
- BUEHLER, D. y Baker, A. 2005. Population divergence times and historical demography in Red Knots and Dunlins. *The Condor*. 107: 597-513.
- BURGER, J. y Gochfeld, M. 2004. Marine birds as sentinels of environmental pollution. *EcoHealth* 1: 263-274.
- CARMONA, R., Ruiz-Campos, G. y Barbata, G. 2004. Seasonal abundance of migrant shorebirds in Baja California Peninsula, Mexico, and California, USA. *Water study group Bulletin* 105:65-70.
- CARMONA, R., 2007. Dinámica poblacional y uso de hábitat de las aves playeras en Ensenada de La Paz, como componente del corredor migratorio del Pacífico. Tesis doctoral. UABC. México.
- COLWELL, M.A. 2010. *Shorebird Ecology, Conservation and Management*. University of California Press. EEUU.

- DROVETSKI, S., Zink, R., Rohwer, S. y Fadeev, I. 2004. Complex biogeographic history of a Holarctic passerine. *Proceedings of The Royal Society*. 271: 545–551.
- ELLEGREN, H. 2009. Is genetic diversity really higher in large populations? *Journal of Biology* 8:41.
- EXCOFFIER, L. G. Laval, y S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- FERNÁNDEZ, G. 1996. Tasas de retorno y residencia de *Calidris mauri* (Charadriiformes: Scolopacidae) en el Estero Punta Banda (B.C., México), en la temporada invernal de 1995-1996. Tesis de maestria. CICESE. México.
- FERNÁNDEZ, J.G, de la Cueva, H. y Warnock N. 2001. Phenology and length of stay of transient and wintering western sandpipers at Estero Punta Banda, Mexico. *J. Field Ornithology* 72:509-520.
- FERNÁNDEZ, G. y Lank, D.B. 2006. Sex, age, and body size distributions of western sandpipers during the nonbreeding season with respect to local habitat. *Condor* 108:547-557.
- GALTIER, N., Nabholz, B., Glémin, S. y Hurst, G.D. 2009. Mitochondrial DNA as marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* 18:4541-4550.
- ENGILIS, A., Jr., Oring, L.W., Carrera, E., Nelson, J.W. y Martinez, A. 1998. Shorebird surveys in Ensenada Pabellones and Bahia Santa Maria, Sinaloa, México: Critical winter habitats for Pacific flyway shorebirds. *Wilson Bulletin* 110: 332-341.
- HAIG, S.M. y Gratto-Trevor, C.L., Mullins, T.D. y Colwell, M.A. 1997. Population identification of western hemisphere shorebirds throughout the annual cycle. *Molecular Ecology* 6: 413-427.

- HEBERT, P.D.N, Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S. y Francis, C.M. 2004. Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLOS Biology* 2 (10): 1657-1663.
- HOLMES, R.T. 1971. Density, habitat, and the mating system of the Western Sandpiper (*Calidris mauri*). *Oecologia* 7: 191-208
- HUGHES, A.L. y Hughes, M.A. 2007. Coding sequence polymorphism in avian mitochondrial genomes reflects population histories. *Molecular Ecology* 16: 1369-1376.
- JOHNSON, M. 2006. Demography and Behavior of Western Sandpipers (*Calidris mauri*) Breeding on the Yukon-Kuskokwim River Delta, Alaska. Tesis doctoral. Virginia Polytechnic Institute and State University.
- KRAAIJEVELD, K. 2008. Non-breeding habitat preference affects ecological speciation in migratory waders. *Naturwissenschaften*. 95: 347-354.
- MARTIN, A. y Palumbi, S. 1993. Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Evolution* 90: 4087-4091.
- MORRISON, R. I. G., Aubry, Y., Butler, R. W., Beyersbergen, G. W., Donaldson, Gratto-Trevor, C. L. 2001. Declines in North American shorebird populations. *Wader Study Group Bulletin* 94:34-38.
- NABHOLZ, B., Mauffrey, J., Bazin, E., Galtier, N. y Glemin, S. 2008. Determination of Mitochondrial Genetic Diversity in Mammals. *Genetics* 178: 351-361.
- NABHOLZ, B., Glémin, S. y Galtier, N. 2009. The erratic mitochondrial clock: variations of mutation rate, not population size, affect mtDNA diversity across birds and mammals. *BMC Evolutionary Biology* 9: 54.
- NEBEL, S., Lank, D., O'Hara, P. y Fernández, G. 2002. Western Sandpipers (*Calidris mauri*) during the nonbreeding season: spatial segregation on a hemispheric scale. *Auk* 119:922-928.

- O'HARA, P., Fernández, G., Lank, D., Becerril, F. y de la Cueva, H.. 2005. Life history varies with migratory distance in Western Sandpipers *Calidris mauri*. *Journal of Avian Biology* 36: 191–202.
- PAGE, R.D.M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- PARKER, P.G., Snow, A., Schug, M., Booton, G., y Fuerst, P. 1998. What molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79 (2): 361-382.
- PIGANEAU, G. y Eyre-Walker, A. 2009. Evidence for Variation in the Effective Population Size of Animal Mitochondrial DNA. *PLOS One* 4(2): 1-8.
- POSADA, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.
- PIATT, J. 2007. Seabirds as indicators of marine ecosystems. *Marine Ecology Progress* 352: 199-204.
- QUINN, T.W. 1992. The genetic legacy of Mother Goose—phylogeographic patterns of lesser snow goose *Chen caerulescens caerulescens* maternal lineages. *Mol. Ecol.* 1:105–117.
- RAPPOLE, J. y Jones, P. 2003. Evolution of old and new world migration systems. The avian calendar: exploring biological hurdles in the annual cycle. *Ardea* 90 (Special Issue): 525-537.
- RITCHIE, P.A., 2001. The Evolution of the mitochondrial DNA control region in the Adélie Penguins of Antarctica. Tesis doctoral. Massey University.
- RÖNKÄ, A., Kvist, L., Karvonen, J. y Koivula, K. 2008. Population genetic structure in the Temminck's stint *Calidris temminckii*, with an emphasis on Fennoscandian populations. *Conservation Genetics* 9: 29-37.

- ROZAS, J. y Librado, P. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- SMITH, S.B. y McWilliams, S.R. 2010. Patterns of Fuel use and Storage in Migrating Passerines in Relation to Fruit Resources at Autumn Stopover Sites. *The Auk* 127(1): 108-118.
- TAMURA, K., Dudley, J., Nei, M. y Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- THOMAS, G.H., Lanctot, R.B. y Székely, T. 2006. Population declines in North American shorebirds: Ecology, life-history and sexual selection. *En: Waterbirds around the world*. G.C. Boere, C.A. Galbraith y D.A. Stroud (eds). The Stationery Office, Edinburgh, UK. p. 207-208.
- VILANOVA, C. 2006. Identidad y estructura genética de la población invernante del Playerito Occidental (*Calidris mauri*) en Bahía Santa Maria, Sin., México. Tesis de licenciatura. UABC. México. 103 pp.
- WENNERBERG, L. 2001. Breeding origin and migration pattern of dunlin (*Calidris alpina*) revealed by mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology* 10: 1111-1120.
- WENINK, P.W., Baker, A. y Tilanus, M. 1993. Hypervariable-control-region sequences reveal global population structuring in a long-distance migrant shorebird, the Dunlin (*Calidris alpina*). *Evolution* 90: 94-98.
- WENINK, P.W., Baker, A., Rösner, H., Tilanus, M. 1996. Global mitochondrial DNA phylogeography of Holarctic breeding dunlins (*Calidris alpina*). *Evolution* 50:318-330.
- WINK, M. 2006. Use of DNA markers to study bird migration. *Journal of Ornithology* 147: 234-244.

- WILSON, W.H. 1994. Western Sandpiper (*Calidris mauri*). *En: The Birds of North America*, No. 90. A. Poole y F. Gill (eds.). Philadelphia. The Academy of Natural Sciences; Washington, D.C. The American Ornithologists' Union.
- YDENBERG, R.C. y Niehaus, A. 2005. Interannual differences in the relative timing of southward migration of male and female western sandpipers (*Calidris mauri*). *Natuwisenchaften* 92: 332-335.
- ZINK, R. y Barrowclough, G. 2008. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular Ecology* 17: 2107-2121.

Apéndice 2

Modelos de sustitución nucleotídica con el mejor ajuste algorítmico para el juego de datos analizado para *C. mauri*.

Modelo	ln L
TVM + I +G	-1,583.68
GTR + I +G	-1,583.75
TIM1 + I +G	-1,586.57
TPM3uf + I +G	-1,587.56
TrN + I +G	-1,587.63
TPM1uf + I +G	-1,587.78
SYM + I +G	-1,591.06
K80 + I	-1,623.17
JC + I +G	-1,632.38

Significado de las siglas para los modelos de sustitución: (G=Utiliza corrección gamma; I=Considera sitios invariables). TVM-(Posada), K80-(Kimura), JC-(Jukes-Cantor), GTR-(General Time Reversible), TIM1-(Posada), TrN-(Tamura-Nei), TPM3uf-(Kimura con modificaciones).

Apéndice 3

Detalle de los valores en los comparativos de las AMOVAs entre agregaciones.

I. Valores de F_{ST} entre agregaciones invernantes de *C. mauri*.

	AG	OL	LP	EP	HC	YUC	BSM
AG	0.0000						
OL	0.0042	0.0000					
LP	0.0069	0.0153	0.0000				
EP	0.0097	0.0044	0.0388	0.0000			
HC	0.0050	0.0027	0.0163	0.0011	0.0000		
YUC	0.0024	0.0007	0.0074	0.0161	0.0034	0.0000	
BSM	0.0002	0.0026	0.0008	0.0149	0.0009	0.0083	0.0000

II. *P*-valores para la AMOVA de F_{ST} entre agregaciones invernantes de *C. mauri*.

	AG	OL	LP	EP	HC	YUC	BSM
AG	0.0000						
OL	0.2110	0.0000					
LP	0.1628	0.0605	0.0000				
EP	0.0097	0.1886	0.0064	0.0000			
HC	0.6840	0.2373	0.0517	0.3023	0.0000		
YUC	0.4469	0.3312	0.7944	0.0679	0.2370	0.0000	
BSM	0.3254	0.5057	0.3075	0.0613	0.4009	0.8515	0.0000

III. Valores de Φ_{ST} entre las agregaciones invernantes de *C. mauri*.

	AG	OL	LP	EP	HC	YUC	BSM
AG	0.0000						
OL	0.0042	0.0000					
LP	0.0069	0.0153	0.0000				
EP	0.0097	0.0044	0.0388	0.0000			
HC	0.0050	0.0027	0.0163	0.0011	0.0000		
YUC	0.0024	0.0007	0.0074	0.0161	0.0034	0.0000	
BSM	0.0002	0.0026	0.0008	0.0149	0.0009	0.0083	0.0000

IV. *P*-valores para la AMOVA de Φ_{ST} entre agregaciones invernantes de *C. mauri*.

	AG	OL	LP	EP	HC	YUC	BSM
AG	0.0000						
OL	0.0042	0.0000					
LP	0.0069	0.0153	0.0000				
EP	0.0097	0.0044	0.0388	0.0000			
HC	0.0050	0.0027	0.0163	0.0011	0.0000		
YUC	0.0024	0.0007	0.0074	0.0161	0.0034	0.0000	
BSM	0.0002	0.0026	0.0008	0.0149	0.0009	0.0083	0.0000

Apéndice 4

Redes de mínima separación entre haplotipos (MSN) para las diferentes agregaciones invernantes de *C. mauri*.

