



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE BIOLOGÍA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Estructura genética y sistemática de *Notocitellus adocetus* (Rodentia:
Sciuridae)

TESIS

Que presenta

BIÓL. SEBASTIÁN SÁNCHEZ SUÁREZ

Como requisito para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Biológicas

Tutor: **Doctor en Ciencias Omar Chassin Noria**

Co-tutora: **Doctora en Ciencias (Sistemática) Deneb García Avila**

Morelia, Michoacán, Julio de 2014





UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

DR. HÉCTOR GUILLÉN ANDRADE
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Estructura genética y sistemática de *Notocitellus adocetus* (Rodentia: Sciuridae)" presentado por el Biol. Sebastián Sánchez Suárez, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestro en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Morelia, Michoacán, a 5 de junio de 2014

MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA

Dr. Omar Chassin Noria
Director de Tesis

Dra. Denéb García Ávila
Co Directora

Dr. José Antonio Guerrero Enríquez

Dr. Omar Domínguez Domínguez

MC. María Concepción Apatiga Castelán

DEDICATORIA

Para mis padres **Yolanda Suárez Cuevas** y **Alfredo Sánchez Madrigal** gracias por todas sus enseñanzas, por su apoyo y su cariño.

Para mi familia con quien comparto además de una historia genealógica, experiencias, recuerdos, vivencias y memorias que definen la persona que soy. Gracias a todos ellos por su apoyo y cariño, en especial a **Don Juvenal Suárez Melgoza** que me enseñó el amor al campo y que el trabajo duro engrandece al hombre.

AGRADECIMIENTOS

A la **Colección Científica de Mamíferos de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH)** por el acceso a muestras de tejido de ejemplares de *Notocitellus adocetus* y *Notocitellus annulatus*.

A la **Dra. Deneb García Avila** por seguir enseñándome con mano firme, por todos sus comentarios, sugerencias y apoyo (08004781).

Al **Dr. Omar Chassin Noria** por la confianza que deposito en este proyecto, sus enseñanzas, sus consejos, y su apoyo (99002051).

A la **M. C. María Concepción Apátiga Castelán** por sus comentarios, apoyo en campo y enseñanzas, así como por las facilidades para acceder a la Colección Científica de Mamíferos de la UMSNH.

Al **Dr. Omar Domínguez Domínguez** por el acceso a primers y sus acertados comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorar este trabajo.

Al **Dr. José Antonio Guerrero Enríquez** por sus pertinentes comentarios y sugerencias, que enriquecieron este trabajo.

A mi **amigo Rogelio Gómez Sánchez** por la donación de ejemplares del Municipio de Tepalcatepec y su apoyo decidido.

A los **amigos(as)** que ayudaron de una u otra manera, en la realización de este trabajo.

A todas las **personas involucradas en el trabajo de campo**, en especial a todas las personas de Tierra Caliente que me brindaron su apoyo en las diferentes comunidades.

CONTENIDO

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Los conceptos de especie y subespecie en la sistemática	1
1.2 Marcadores moleculares	5
1.2.1 Utilidad en estructura genética	6
1.2.2 Utilidad de los marcadores moleculares en sistemática	6
1.3 Diversidad y estructura genética	7
1.4 Redes de haplotipos	8
1.5 Inferencia filogenética	9
1.5.1 Parsimonia	9
1.5.2 Neighbor -joining	10
1.6 Las ardillas como modelo de estudio	11
1.7 Análisis moleculares en Sciuridae	12
1.7.1 Análisis genéticos poblacionales	12
1.7.2 Arreglos sistemáticos en la familia	13
1.8 Especie de estudio: <i>Notocitellus adocetus</i>	14
1.8.1 Trabajos moleculares con <i>Notocitellus adocetus</i>	15
1.8.2 Antecedentes taxonómicos de <i>Notocitellus adocetus</i>	15
2. HIPÓTESIS	18
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo general	19
3.2 Objetivos particulares	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1 Trabajo de campo	20
4.2 Método de colecta	23
4.3 Trabajo de Laboratorio	23
4.3.1 Método de conservación	23
4.3.2 Método de extracción	24
4.3.3 Método de amplificación/ experimentos de PCR	24
4.3.4 Secuenciación	27
4.4 Ensamblaje y alineamiento de secuencias	27
4.5 Diversidad y estructura genética	28
4.5.1 Análisis de diversidad genética	28
4.5.2 Redes de haplotipos	28
4.5.3 Análisis de estructura genética	29
4.6 Inferencia filogenética	30
4.6.1 Parsimonia	30
4.6.2 Tiempos de divergencia de <i>Citb</i>	31
4.6.3 Análisis de distancias Neighbor-joining	32
5. RESULTADOS	33
5.1 Trabajo de campo	33
5.2 Trabajo de Laboratorio	33
5.2.1 Extracciones	33

5.2.2	Amplificación/ experimentos de PCR.....	33
5.3	Secuencias y alineamiento.....	35
5.4	Diversidad y estructura genética.....	35
5.4.1	Análisis de diversidad genética.....	35
5.4.2	Redes de haplotipos.....	38
5.4.3	Análisis de estructura genética.....	46
5.5	Inferencia filogenética.....	49
5.5.1	Parsimonia.....	49
5.5.2	Tiempos de divergencia de <i>Citb</i>	60
5.5.3	Análisis de distancias Neighbor-joining.....	61
6.	DISCUSIÓN.....	68
6.1	Método de conservación de las muestras de tejidos.....	68
6.2	Número de secuencias.....	68
6.3	Diversidad y estructura genética.....	69
6.3.1	Diversidad genética.....	69
6.3.2	Redes de haplotipos.....	70
6.3.3	Estructura genética y barreras geográficas.....	72
6.4	Inferencia filogenética.....	74
6.4.1	Aproximaciones filogenéticas con <i>Citb</i>	74
6.4.2	Tiempos de divergencia de <i>Citb</i>	75
6.4.3	Aproximaciones filogenéticas con RAG1.....	75
6.4.4	Aproximaciones filogenéticas concatenadas.....	76
6.4.5	Distancias genéticas.....	77
6.4.6	Clados y barreras.....	77
6.4.7	Comparación con datos morfométricos.....	78
6.5	¿ <i>Citb</i> y RAG1 dos historias?.....	78
6.6	Subjetividad en subespecies de <i>N. adocetus</i>	80
6.7	Implicaciones taxonómicas.....	80
6.8	Implicaciones para la conservación.....	82
7.	CONCLUSIONES.....	83
8.	LITERATURA CITADA.....	85
	ANEXO I.....	98

RESUMEN

El cuinique, *Notocitellus adocetus*, es una ardilla terrestre pequeña (315-366 mm de longitud total), endémica de México. Se distribuye en la cuenca del Balsas y cuenta con dos subespecies, *N. adocetus adocetus* y *N. adocetus infernatus* que se reconocen por los límites geográficos de sus áreas de distribución. Sin embargo, los análisis morfológicos y de sistemática filogenética basados en caracteres morfométricos no soportan la monofilia de ambas subespecies. En este proyecto se analiza la variación de las secuencias del gen mitocondrial *Citb* y el gen nuclear RAG1, para evaluar la estructura genética y monofilia de ambas subespecies. Se obtuvieron 108 muestras de individuos a lo largo del área de distribución en Michoacán y Guerrero de las dos subespecies. Se amplificaron 807 nucleótidos del *Citb* y 781 de RAG1 mediante PCR usando primers diseñados para tal fin. Los productos de amplificación se secuenciaron en un laboratorio de servicio y las secuencias de ADN se alinearon manualmente. Se estimó la diversidad haplotídica (h) y nucleotídica (π) de las subespecies, regiones geográficas y poblaciones para inferir su historia demográfica. Se construyó una red de haplotipos para analizar la distribución espacial de la variación genética y se determinó la diferenciación genética entre subespecies, poblaciones y regiones geográficas con un Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) y se infirió la presencia de barreras mediante un Análisis Espacial de Variación Molecular (SAMOVA). Finalmente se evaluó la monofilia de las subespecies con análisis de inferencia filogenética y se calcularon los tiempos de divergencia entre los clados principales de *Citb*. Se obtuvieron valores altos de h con los dos genes en las subespecies y regiones geográficas, mientras que π solo fue alta en *N. a. adocetus* con *Citb*. Se obtuvieron 15 haplotipos para *Citb*, que no fueron compartidos entre subespecies o regiones geográficas. Y 14 para RAG1 que se compartieron entre subespecies y regiones geográficas. La diferenciación genética resultó ser alta, particularmente entre la región Este y Oeste con los dos genes. El SAMOVA reporta el máximo porcentaje de variación al formar dos grupos, Este y Oeste, e infiere la presencia de una barrera geográfica entre estas poblaciones, que probablemente sea un brazo del Cinturón Volcánico Transmexicano (CVTM) que se prolonga hacia la Depresión del Balsas. Los resultados de los análisis de inferencia filogenética con los dos marcadores moleculares muestran, con altos valores de soporte, que las dos subespecies no se recuperan como monofiléticas sin embargo, recuperan dos clados, Este y Oeste, principalmente en los árboles de *Citb* y árboles concatenados, coincidiendo con los análisis de diferenciación y estructura genética. El que se recuperen a las subespecies como parafileticas coincide con resultados de análisis cladísticos previos basados en morfometría. Por lo tanto se sugiere que todos los individuos deberían ser tratados sólo como *Notocitellus adocetus*.

Palabras clave: Subespecies, Diferenciación y estructura genética, Inferencia filogenética, Monofilia, *Notocitellus adocetus*, *Citb*, RAG1.

SUMMARY

The cuinique, *Notocitellus adocetus*, is a small ground squirrel (315-366 mm total length), endemic to Mexico. It is distributed in the Balsas Basin and has two subspecies, *N. adocetus adocetus* and *N. adocetus infernatus* which are recognized by their home range geographical limits. However, cladistics analysis of morphometric data did not support the monophyly of this subspecies. In this project sequence variation of mitochondrial gene *Cytb* and nuclear RAG1 was analyzed to evaluate genetic structure and monophyly of both subspecies. We obtained 108 samples from individuals of both subspecies throughout their home range in Michoacan and Guerrero. A total of 807 nucleotides of *Cytb* and 781 of RAG1 were amplified by PCR reactions using primers designed for this purpose. The amplification products were sequenced in a laboratory service (Macrogen, Inc.) and DNA sequences were assembled and aligned manually. Haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π) of the subspecies, geographic regions and populations were estimated to infer their demographic history. An haplotypes network was constructed to analyze the spatial distribution of genetic variation. Also, the genetic differentiation was determined between subspecies, populations and geographic regions with an Analysis of Molecular Variance (AMOVA). Presence of geographic barriers was inferred by Spatial Analysis of Molecular Variance (SAMOVA). Finally the monophyly of subspecies was assessed with parsimony and genetic distance analyses. Divergence times among the major clades of *Cytb* were calculated using BEAST and Bayesian inference. Both genes, considering subspecies and geographical regions had high values of h , meanwhile π was high only for *N. a. adocetus* with *Cytb*. A total of 15 haplotypes of *Cytb*, were not shared between subspecies or geographic regions. On the other hand 14 haplotypes for RAG1 were shared among subspecies and geographic regions. Genetic differentiation with both genes was high, particularly between East and West region. The SAMOVA reports a maximum percentage of variation when forming two groups, East and West, and infers the presence of a geographical barrier between these populations. The probable geographic barrier that was identified is an arm of the Trans-Mexican Volcanic Belt (TMVB) extending to the Balsas Basin. Parsimony and genetic distance analyses showed that subspecies are not monophyletic. This result was obtained with both genes separately and concatenated; all analyses had high support values of Jackknife and Bootstrap. Nevertheless, *Cytb* analyses recovered two clades: East and West, results that coincides with analysis of genetic structure and differentiation. The results obtained in this investigation coincide with previous cladistics analysis based on morphometric data. Therefore, we suggest that all individuals should be treated only as *Notocitellus adocetus*.

Keywords: Subspecies, Differentiation and genetic structure, Phylogenetic inference, Monophyly, *Notocitellus adocetus*, *Cytb*, RAG1.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Los conceptos de especie y subespecie en la sistemática

Aunque no hay un consenso sobre un concepto de especie, independientemente del concepto que se use este debe servir como marco de referencia para tomar decisiones taxonómicas. Existe una larga discusión sobre el uso del concepto de especie (Ver, Valencia-Ávalos, 1991; Wheeler y Meier, 2000; Futuyma, 2005). Sin embargo, no es intención de este trabajo ahondar en la discusión que lleva algunas décadas y está lejos de resolverse completamente, pero se mencionan algunos de los conceptos aludidos por Futuyma (2005), en su revisión.

Existen varias propuestas desde diversos enfoques por ejemplo, el concepto biológico de especie la define como grupos de poblaciones naturales con entrecruzamiento y que están reproductivamente aislados de otros grupos (Mayr, 1996). Sin embargo, este concepto que ha sido ampliamente usado tiene serios problemas, ya que no considera especies con reproducción asexual o vegetativa, o aquellas que se han generado por hibridación, quedando fuera gran parte de la diversidad biológica y siendo de uso restringido a organismos sexuales donde se pudiera probar real o potencialmente el entrecruzamiento. Por otra parte, está el concepto evolutivo de especie que la define como el único linaje de poblaciones ancestro descendiente que mantienen su identidad ajena a otros linajes y tiene sus propias tendencias evolutivas y destino histórico (Wiley, 1978). Sin embargo, según la revisión de Valencia-Ávalos (1991), el concepto evolutivo no descarta la idea de polifilia, dado que linaje se ha definido como demos que comparten una historia común de descendencia no compartida por otros demos, pueden incluirse aquellas especies que se originan por hibridación, característica que hace a este concepto diferente del concepto de especie filogenética donde la monofilia es el carácter para definir especies. Por su parte Templeton (1989), desarrolla el concepto cohesivo de especie que define una especie como la unidad más inclusiva, que presenta cohesión fenotípica y genotípica, mantenida por mecanismos de cohesión. Otra aproximación es el concepto genealógico de especie, que menciona que las especies son grupos de organismos “exclusivos”, donde un grupo

exclusivo es uno cuyo miembros están todos más cercanos uno a otro que a cualquier otro organismo fuera del grupo (Baum y Shaw, 1995).

Más recientemente Mishler y De Luna (1997), tras analizar propuestas previas y sintetizándolas en un solo concepto, formulan su concepto filogenético de especie donde definen que *“una especie es el taxón menos inclusivo reconocido en una clasificación filogenética formal. Como en todos los niveles jerárquicos de taxa en tales clasificaciones, los organismos son agrupados en especies porque existe evidencia de monofilesis. Ciertos grupos son categorizados como especies en vez de otro rango de mayor nivel, porque son los grupos monofiléticos más pequeños considerados merecedores de reconocimiento formal. Este reconocimiento se basa en consideraciones sobre el grado de apoyo de caracteres, la estabilidad de los grupos monofiléticos y/o su importancia en los procesos biológicos que operan en los linajes en cuestión”*. Este concepto abarca dos componentes teóricos: agrupación y asignación de rango. Primero, los organismos han de ser agrupados en especies sobre la base de evidencia de monofilia (sinapomorfias), tal como es el caso en los demás niveles taxonómicos. Los criterios de entrecruzamiento en particular no deben ser usados para propósitos de agrupación. Segundo, los criterios para asignar el rango de especie a ciertos grupos monofiléticos deben ser pluralistas, es decir, han de variar en los diferentes organismos. En esta decisión de rango bien se pueden incluir criterios ecológicos o la presencia de barreras reproductivas en casos particulares (Mishler y De Luna, 1997; Guerrero *et al.*, 2004).

Por otra parte, la práctica de reconocer subespecies y la asignación de trinomios data desde los primeros días de la taxonomía Linneana. Hasta finales del siglo XIX, las subespecies no eran formalmente definidas y, a menudo se designaban a partir de variantes individuales (Mayr y Ashlock, 1991). Después de Darwin, los biólogos comenzaron a pensar en las jerarquías taxonómicas desde una perspectiva más evolutiva y empezaron a ver las subespecies como grupos naturales de relevancia taxonómica real (Jorgensen *et al.*, 2012). A pesar de esto, no se detuvo la designación indiscriminada de trinomios, haciendo que la legitimidad de esta práctica se cuestione (Wilson y Brown, 1953). Tradicionalmente, las

subespecies han sido reconocidas en base a las discontinuidades en la distribución geográfica de los rasgos fenotípicos. Y desde hace tiempo se ha establecido que las poblaciones aisladas tienen un impedimento físico para el flujo de genes con otras poblaciones, y por lo tanto se espera que esas poblaciones puedan divergir en forma aislada (Mayr y Ashlock, 1991). Sin embargo, hay subespecies que tienen rangos geográficos que colindan directamente, o incluso se superponen, por lo que cualquier adaptación fenotípica a los entornos locales tendrá que llevarse a cabo a pesar del flujo génico (Mandujano *et al.*, 2010). Situación en que se vuelve un reto mayor definir subespecies, ya que no hay un rango geográfico estrictamente circunscrito donde se observen las variaciones fenotípicas.

Con frecuencia se han definido arbitrariamente las áreas de distribución geográfica de varias subespecies, como por ejemplo en el caso del venado cola blanca. Y de hecho, las supuestas diferencias entre las subespecies se basan a menudo en opiniones personales y subjetivas respecto a las características o las mediciones de sólo uno o unos pocos ejemplares. Cuando además, se tiene una especie con alta capacidad de adaptación a diferentes ambientes es aún más difícil definir donde la distribución de una subespecie empieza y termina otra. Por lo que en algunos casos podemos esperar encontrar un gradiente de variaciones de una subespecie a otra y por lo tanto, los límites de distribución entre las subespecies se vuelven aún más difusos o inexistentes (Mandujano *et al.*, 2010).

Al día de hoy, la comunidad científica está dividida entre aquellos que piensan que las subespecies son válidas y aquellos que descartan su uso. Los que apoyan el uso de las subespecies insisten en la importancia de reconocer todas las distintas formas de vida con el fin de tener una imagen más completa y precisa de la biodiversidad del planeta (Fox, 1955; Mayr, 1982; Mulcahy, 2008). Esto es no sólo deseable, sino que puede ser valioso para la política de conservación (Ryder, 1986; Haig *et al.*, 2006; Phillimore y Owens, 2006) y el estudio de los procesos evolutivos (Smith y White, 1956; Amadon y Short, 1976; Barton, 1993). Adicionalmente incluso, algunos proponen redefinir el concepto y evaluar las subespecies ya nombradas de manera más rigurosa para confirmar su estatus o modificarlo. La vía para esto sería ampliar las colectas e incluir otras herramientas de determinación

taxonómica, solo entonces se podrá obtener información que contribuya al entendimiento de la variación infraespecífica (Wiens, 1982). Los críticos del uso de las subespecies, refieren a la mala representación de la biodiversidad debido a prácticas taxonómicas inconsistentes y la complejidad de la variación dentro y entre las especies (Wilson y Brown, 1953) y cómo es que esto puede confundir los esfuerzos de conservación (Zink, 2004; Haig *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta estos diferentes puntos de vista, es poco probable que se llegue a un consenso entre los científicos sobre cómo manejar las subespecies, aunque también se ha señalado que un consenso puede incluso que ni siquiera sea necesario (Fitzpatrick, 2010). Independientemente de su posición sobre el tema, la mayoría de los autores coinciden en que el uso de las subespecies requiere cierto nivel de revisión (Jorgensen *et al.*, 2012).

Un dilema fundamental del debate es la situación sin resolver de las subespecies como unidad evolutiva. La designación de subespecie se llega a dar a las poblaciones resultantes de cualquiera de los diversos fenómenos evolutivos. Sin embargo, debido a los variados marcos dentro de los cuales las subespecies se reconocen, no hay ningún fenómeno de *subespeciación* (Jorgensen *et al.*, 2012). No obstante, las subespecies podrían ser especies incipientes y / o el resultado de la adaptación a sus ambientes locales (Mayr, 1982). Cualquier cosa que podamos definir como subespecie reside en la zona gris entre una única especie monotípica y dos especies completas. Una de las definiciones más recientes para subespecie es: "un conjunto de poblaciones fenotípicamente similares de una especie que habitan una subdivisión geográfica del rango de la especie y que difieren taxonómicamente de otras poblaciones de esa especie" (Mayr y Ashlock, 1991). Por lo tanto, una comprensión completa de la gama y la expresión de la variación a lo largo del rango de distribución son fundamentales para cualquier interpretación de la subdivisión de una especie.

Las poblaciones que se identifican, a través de datos genéticos, que están separadas por saltos filogenéticos profundos y aun así logran cruzarse en contacto secundario, son posibles candidatas para el status de subespecies y podrían definirse como grupos de

poblaciones con real o potencial entrecruzamiento filogenéticamente distinguibles, pero reproductivamente compatibles con otros grupos (Avice y Ball, 1990).

Por su parte Mishler y De Luna (1997), mencionan que los criterios filogenéticos sobre sinapomorfia y monofilia son necesarios para la designación de grupos naturales y sólo los grupos monofiléticos pueden ser reconocidos y nombrados formalmente como grupos taxonómicos. De manera que, al recuperar a las subespecies como grupos naturales desde un enfoque filogenético sería posible nombrados formalmente como grupos taxonómicos.

1.2 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología como la evolución, la ecología, la bio-medicina, las ciencias forenses y los estudios de diversidad. En la actualidad existen varias técnicas moleculares que nos permiten conocer cómo se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta, como con los análisis de proteínas, o de manera directa con estudios de ADN (Eguiarte *et al.*, 2007).

Entre los marcadores moleculares destacan dos por su uso generalizado, las secuencias de ADN mitocondrial y de ADN nuclear. El ADN mitocondrial (ADNmt) ha sido usado ampliamente en estudios de estructura y diversidad genética, filogenéticos y filogeográficos en especies animales. El ADNmt es especialmente importantes para trazar historias filogeográficas y de estructura poblacional genética estrechamente relacionada al linaje, porque es de herencia uniparental, no recombina y tiene elevada tasa de cambio mutacional. Por otra parte el ADN nuclear (ADNn) también se ha usado en aproximaciones filogenéticas y de estructura genética aunque con menor frecuencia. En organismos eucariontes, la mayor parte de la información genética se encuentra contenida en el núcleo de la célula. El ADNn se encuentra empaquetado y asociado a proteínas histonas, conformando los cromosomas. Se considera que los organismos diploides tienen dos copias de cada región genética (locus) en los pares homólogos de los cromosomas, llamadas

alelos, y contienen regiones codificantes (exones) o no codificantes (intrones o regiones intergénicas) (Eguiarte *et al.*, 2007).

Los análisis más detallados de diferenciación de ADN pueden obtenerse justamente secuenciando la región de interés para diferentes individuos. Hasta hace no mucho tiempo, el uso de secuencias de ADN para los estudios de poblaciones no había sido extensivo. Sin embargo, actualmente el uso de secuencias es muy común y se ha aplicado en análisis de genética de poblaciones y problemas taxonómicos (Eguiarte *et al.*, 2007).

1.2.1 Utilidad en estructura genética

Hoy día, las secuencias de ADN constituyen la principal fuente de información para los análisis genéticos, los cuales permiten conocer el efecto de la pérdida de diversidad, la fragmentación, y la reducción del flujo génico en poblaciones estructuradas, con el fin de proponer estrategias de conservación o manejo para impedir la extinción de especies o poblaciones en particular. Por otro lado, este tipo de análisis genéticos también ayuda a establecer especies prioritarias para la conservación o definir poblaciones en riesgo de una especie, permitiendo por ejemplo, proponer unidades evolutivamente significativas (ESU) y unidades de manejo (UM), con ayuda de métodos de inferencia filogenética, en el ideal de poder proteger los procesos evolutivos que mantienen la diversidad biológica (Moritz, 2002; Eguiarte *et al.*, 2007). Pero para esto, es necesario contar con información cualitativa y cuantitativa de cambios en la estructura o composición genética que nos permitan estudiar las relaciones entre individuos, poblaciones y especies (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009).

1.2.2 Utilidad de los marcadores moleculares en sistemática

Se ha demostrado que los marcadores moleculares, son de gran utilidad para resolver problemas taxonómicos, particularmente en casos en que los datos morfológicos y morfométricos no proporcionan buena resolución (Lucas y Galián, 2009). Los marcadores moleculares, en específico las secuencias de ADN, han sido de utilidad taxonómica, ecológica y para la conservación en vertebrados (Avise *et al.*, 1998; Harrison *et al.*, 2003; Herron *et al.*, 2004; Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009; Helgen *et al.*,

2009). Entre los vertebrados los marcadores moleculares han sido útiles para resolver problemas taxonómicos. Por ejemplo, se utilizó el *Citb* para elevar subespecies de murciélagos al rango de especies (Guerrero *et al.*, 2004), entre peces ha permitido reconocer grupos genéticos bien diferenciados, probablemente especies, usando marcadores mitocondriales, *Citb*, y nucleares, RAG1 y S7, (Domínguez–Domínguez *et al.*, 2011). En reptiles, para elevar a nivel de especie algunas subespecies de lagartijas, se utilizaron dos regiones mitocondriales ND2 y tRNAs (Glor y Laport, 2012).

1.3 Diversidad y estructura genética

Los índices de diversidad proporcionan una medida de la cantidad de variación de una población, siendo especialmente útiles para hacer comparaciones entre poblaciones. Los más empleados en el estudio de la variabilidad a nivel de poblaciones son: la diversidad genética de Nei (o haplotídica) (h) y la diversidad nucleotídica (π). La diversidad haplotídica (h) es la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar sean diferentes, y la diversidad nucleotídica (π) es la probabilidad de que dos nucleótidos con homología de posición tomados al azar sean diferentes (Nei 1973; Guevara-Chumacero, 2009).

La estructura genética de una especie se refiere a la cantidad y distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones de dicha especie y es resultado de procesos microevolutivos, demográficos y biogeográficos. Para determinar la estructura genética, es necesario comprender el patrón de variación genética de la especie, es decir, evaluar la distribución espacial de los genotipos de los diferentes individuos (Slatkin, 1987; Guevara-Chumacero, 2009).

Cuando una población está subdividida geográficamente, generalmente presenta diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas en las diferentes subpoblaciones que la conforman. Dichas diferencias dependen principalmente de los niveles de flujo génico que exista entre las subpoblaciones (Nei, 1987). Los análisis genéticos usando métodos moleculares permiten evaluar la distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones para así

determinar la estructura genética de las especies (Milot *et al.*, 2000; Rodríguez-Gómez, 2010). Esto en conjunto con información sobre el espacio geográfico en el que se distribuyen las especies permite cuantificar que factores afectan la distribución de la variación genética (Manel *et al.*, 2003; Avise, 2009). La estructura genética de una especie está también influenciada por factores propios de la especie como pueden ser el sistema de apareamiento, capacidad de dispersión, vida gregaria, grado de sociabilidad y tamaño efectivo de las subpoblaciones. Y por factores externos como la estructura espacial del hábitat, cambios climáticos y la formación de barreras geográficas. Todos estos son factores que actúan de manera conjunta para modelar la estructura genética que reflejan las poblaciones actualmente.

De forma que se han desarrollado algunas metodologías para evaluar el efecto de la subdivisión en las poblaciones siendo una de las más usadas el de los estadísticos F propuestos por Wright (1951). Estos estadísticos de estructura poblacional miden la estructuración genética a diferentes niveles espaciales, ante un conjunto de poblaciones de una misma especie o en una población dividida en varias subpoblaciones y se pueden distinguir tres niveles de complejidad: el de los organismos individuales (F_{IS}), el de las diferentes poblaciones o subpoblaciones (F_{ST}) y el de la población total (F_{IT}). El parámetro F_{ST} se emplea ampliamente en estudios de genética de poblaciones y filogeografía. Además que los datos y simulaciones indican que el uso de F_{ST} para estimar flujo génico (Nm) es útil y sencillo (Eguiarte *et al.*, 2007; Guevara-Chumacero, 2009). Cabe mencionar que uno de los métodos más ampliamente usados para medir la diversidad genética entre poblaciones es el análisis molecular de varianza (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), análisis que es similar a los estadísticos F .

1.4 Redes de haplotipos

Una red es un conjunto de nodos en donde, para al menos un par de nodos, existe más de un camino que los conecta. A nivel interpoblacional es común el uso de redes de haplotipos en lugar de árboles filogenéticos en análisis poblacionales o filogeográficos. Las genealogías

trazan las relaciones evolutivas entre haplotipos o alelos que permiten reconstruir los procesos evolutivos con los principios de la coalescencia, además de que pueden considerar predicciones teóricas de la genética de poblaciones. Los métodos que utilizan estos principios tratan de modelar el pasado utilizando un proceso estocástico, esto es, la coalescencia, basado en el concepto de que los haplotipos en una población pueden ser rastreados hacia atrás en el tiempo hasta el punto en el que coalescen en un alelo ancestral común. Existen diversos métodos de redes, entre los cuales se encuentran el método de parsimonia estadística (Guevara-Chumacero, 2009).

El algoritmo de parsimonia estadística estima el número máximo de diferencias de pares de bases entre secuencias que pueden atribuirse a una serie de mutaciones únicas en cada sitio de la secuencia; número al que se conoce como límite de parsimonia (con una confianza del 95 %). El programa no conecta a la red los haplotipos que difieren por un número de pares de bases que exceda dicho límite, por el supuesto de posible homoplasia. Entre los programas usados para hacer redes de haplotipos está TCS que permite estimar redes filogenéticas a partir de secuencias de ADN o de matrices de distancias nucleotídicas generando como resultado final una red que muestra las relaciones entre todos los haplotipos con base en el número mínimo de mutaciones (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009).

1.5 Inferencia filogenética

Dentro de los análisis de inferencia filogenética molecular, se usan diferentes métodos para hacer reconstrucciones y conocer las relaciones entre las poblaciones de la especie, o entre diferentes especies.

1.5.1 Parsimonia

Este método tiene su origen en la escuela cladista y se basa en el supuesto de que la hipótesis filogenética que comprenda el menor número de cambios será la que mejor refleje la filogenia real. Cuando la inferencia filogenética se basa en secuencias nucleotídicas, cada

sitio permite generar un agrupamiento que involucre el menor número de pasos (sustituciones). El número total de cambios evolutivos en un árbol (su longitud) es calculado como la suma de los cambios en cada sitio, y el árbol de mejor ajuste es el de menor longitud (Caraballo, 2013).

El método de búsqueda por Parsimonia implica evaluar el número de cambios, expresado como longitud, de todas las topologías posibles y elegir la más parsimoniosa. Esto tiene una limitante numérica que radica en el altísimo número de topologías posibles resultante de la combinación de muchos taxa. A partir de cierta cantidad de taxones no es operativo explicitar todas las topologías y debe aplicarse una metodología de búsqueda heurística que consiste en la generación de árboles al azar, utilizados como punto de partida y su posterior optimización mediante algoritmos de corte y empalme de ramas (Swofford *et al.*, 1996). Si bien existe la probabilidad de no hallar el árbol más parsimonioso, suele ser bastante baja gracias a la potencia de los algoritmos de búsqueda heurística. A menudo se encuentran más de un árbol igualmente parsimonioso, es decir con igual número de cambios, por lo que se realiza un árbol consenso, a menudo un conceso estricto, donde el árbol resultante es un consenso del conjunto de árboles igualmente parsimoniosos.

1.5.2 Neighbor -joining

El método del vecino más cercano o Neighbor - joining (NJ) es una metodología que usa distancias genéticas y es habitualmente el algoritmo que se usa para la construcción de árboles de distancias (Eguiarte *et al.*, 2007), ya que combina la velocidad computacional con la obtención de una única topología. Este es un método de agrupamiento basado en una matriz de distancias y carece de un criterio de optimización y, por lo tanto, no permite hacer comparaciones de ajuste entre árboles y datos. La matriz de distancias genéticas puede ser obtenida utilizando algún modelo de evolución molecular. A partir de una red, el método genera un primer agrupamiento de dos taxones de manera tal que se minimice la distancia global, las distancias son calculadas en base a la matriz de distancias pareadas obtenidas con el modelo de evolución molecular elegido. Una vez fijado el primer agrupamiento, y considerado a éste como un único taxón, se vuelve a buscar el segundo agrupamiento que

minimice la distancia global de este segundo árbol. Así, mediante la comparación de pares y la unión sucesiva de taxones, se obtiene una única topología por matriz de caracteres. La ventaja de este método reside en la rapidez con que es posible procesar los datos, así mismo destaca que los largos de rama resultan proporcionales al número de cambios (Caraballo, 2013).

1.6 Las ardillas como modelo de estudio

Los miembros de la familia de las ardillas, Sciuridae, son un sistema informativo relevante para estudiar el papel que desempeña el clima, la fragmentación de hábitat y la presencia de barreras en la estructura genética y la diversificación entre las especies. Las ardillas de tierra del género *Spermophilus* (sensu Hall, 1981) proporcionan valiosos estudios filogeográficos y de estructura genética en mamíferos ya que varias especies se encuentran hoy en día en las regiones inter-montañas que han sido profundamente influidas por perturbaciones ambientales extremas, no estacionales, tales como repetidos ciclos de glaciación y vulcanismo durante el Cuaternario (Van Tuinen *et al.*, 2008). Además, el trabajo previo sobre las relaciones filogenéticas entre la especies del género *Spermophilus* (sensu Hall, 1981) de Norte América encontró que especies estrechamente relacionadas están geográficamente próximas, lo que sugiere que la mayoría de las especies evolucionaron en o cerca de sus actuales rangos de distribución (Harrison *et al.*, 2003). Por lo tanto, las barreras geográficas que han contribuido a la especiación alopátrica en el género son probablemente las que se encuentran dentro de la actual distribución del grupo (Van Tuinen *et al.*, 2008).

La familia Sciuridae, es una de las más diversas y ampliamente distribuidas de mamíferos. Cuenta con 51 géneros y 278 especies distribuidas en todos los continentes con excepción de la Antártica y Australia (Thorington y Hoffmann, 2005). Sin embargo, no es una familia que sea con frecuencia objeto de estudios, a pesar de estar entre los roedores más conspicuos y ser abundantes, en muchos casos, en sus áreas de distribución.

Actualmente se reconocen 35 especies de ardillas en México, de las cuales 13 son endémicas. Representan 41.2% de las especies registradas para Norte y Centroamérica. La mayoría de las especies que se reportan para México son de hábitos terrestres, 21 especies en concreto, mientras que se reportan 14 especies de hábitos arborícolas (Valdez, 2003).

1.7 Análisis moleculares en Sciuridae

1.7.1 Análisis genéticos poblacionales

Los estudios genéticos poblacionales de estructura y diferenciación para la familia Sciuridae son escasos. Por ejemplo, Lamb *et al.* (1997), realizaron un análisis genético y filogeográfico usando enzimas de restricción del ADN mitocondrial (ADNmt) en *Sciurus aberti*, concluyeron que la combinación de eventos de vicarianza y dispersión son la explicación para la distribución fragmentada que presenta la especie en Estados Unidos, y que la evidencia mitocondrial permite diferenciar tres subespecies, *S. a. aberti*, *S. a. chuscensis* y *S. a. kaibabensis*, de las seis subespecies reconocidas. Por su parte, Good y Sullivan (2001), con un estudio genético, morfológico y filogeográfico con Citocromo b (*Citb*) de la especie *Tamias ruficaudatus*, endémica de las Montañas Rocosas de Estados Unidos, concluyeron que hay diferencias claras entre las subespecies, *Tamias ruficaudatus ruficaudatus* y *Tamias ruficaudatus simulans*.

Por otra parte Trizio *et al.* (2005), analizan la estructura genética de *Sciurus vulgaris* en bosques con una compleja historia de cambios del paisaje durante la última glaciación y reciente reconexión utilizando ADNmt y microsatélites, en donde encuentran una diferenciación significativa entre los sitios de estudio y una correlación significativa entre la distancia genética y geográfica solo a gran escala. O por ejemplo el trabajo de Wilson *et al.* (2005), que analiza la filogeografía de *Tamiasciurus hudsonicus*, en la región central de las Montañas Rocosas y en el que revelan la existencia de dos grandes clados que probablemente divergieron durante el Pleistoceno y un flujo de genes históricamente restringido como resultado de barreras geográficas.

En años más recientes, Van Tuinen *et al.* (2008), describen la estructura genética de *Spermophilus armatus* y realizan análisis filogeográficos y demográficos con los genes mitocondriales *Citb* y región control, en los que encuentran una divergencia intraespecífica en tres linajes y su concordancia con eventos volcánicos en Yellowstone, Estados Unidos. Otro ejemplo es el trabajo de Kryštufek *et al.* (2009), que indagan sobre la estructura genética espacial de *Spermophilus citellus* en la estepa del sureste de Europa mediante secuencias de *Citb*, y en el que reportan tres linajes divergentes que sugiere la existencia pasada de un evento de fragmentación causada por barreras biogeográficas eficaces. Por su parte, Lucas y Galián (2009), mediante un análisis molecular de la región control del ADNmt, genética de poblaciones y filogeografía confirman la peculiaridad morfológica y ecológica, de la subespecie *Sciurus vulgaris hoffmanni* de Sierra Espuña, en España y determinan que la diferenciación genética de la subespecie justifica una estrategia de conservación y de manejo. Un trabajo más reciente es el de Ochoa *et al.* (2012), que analizan los cambios temporales en la diversidad y estructura genética en *Xerospermophilus perotensis* utilizando la región control mitocondrial (ADNmt) y microsatélites nucleares, observando una tendencia general a la reducción en diversidad genética dentro de las poblaciones y un aumento en estructura genética entre ellas en años recientes.

1.7.2 Arreglos sistemáticos en la familia

Los caracteres moleculares en la familia Sciuridae también se han empleado para establecer relaciones filogenéticas de las especies de ciertos géneros. Por ejemplo, el estudio de Oshida y Masuda (2000), en el que mediante un estudio filogenético con *Citb* determinan las relaciones entre las especies del viejo y nuevo mundo del género *Sciurus*, así como su historia biogeográfica. Otro es el estudio filogenético de las especies de ardillas japonesas realizado por Oshida *et al.* (1996), con secuencias nucleotídicas de genes mitocondriales 12S de ARN ribosomal, en el que proponen que los géneros de ardillas voladoras *Pteromys* y *Petaurista* son monofiléticos respecto del resto de especies de Japón. Y finalmente el de Oshida *et al.* (2000a), para seis géneros de ardillas voladoras también con *Citb*, en el que

incluyen dentro de un mismo clado al género *Glaucomys*, único género de ardillas voladoras del nuevo mundo, con los géneros *Hylopetes* y *Petinomys*.

1.8 Especie de estudio: *Notocitellus adocetus*

Dentro de la familia Sciuridae encontramos a *Notocitellus adocetus*, el cuinique, una ardilla terrestre pequeña (315-366 mm de longitud total) de pelaje hispido, color café rojizo pálido, con el dorso y la cabeza en tonos más oscuros que las partes inferiores del cuerpo pero sin bandas dorsales, de rostro corto y ancho, con orejas cortas y una cola larga burdamente negra canosa con la mitad terminal bordeada con una banda negra subapical y sin anulaciones en la coloración (Hall, 1981; Best, 1995; Núñez, 2005). Esta ardilla terrestre es endémica de México, se distribuye en la región tropical de la cuenca del Balsas en los estados de Guerrero, Jalisco, México y Michoacán (Núñez, 2005; Valdez y Ceballos, 2005). Aunque también, existen registros para los estados de Tlaxcala, Hidalgo y el Distrito Federal (Villa-Ramírez *et al.*, 1991). Valdez y Ceballos (2005), sugieren que estos registros corresponden a organismos translocados como mascotas, dado que no hay reportes de poblaciones silvestres en estos estados. Recientemente se reportó una población pequeña de estas ardillas en la Reserva de Nanchititla, estado de México (Monroy-Vilchis *et al.*, 2010).

El cuinique es una especie omnívora que puede ocupar áreas agrícolas, en donde, dada la disponibilidad de recursos como maíz, frijol y sorgo, tiene el potencial de convertirse en plaga (Núñez, 2005). Por esta razón, los agricultores controlan su tamaño poblacional con veneno (obs. pers.). Es usual observar grupos de dos a cuatro cuiniques corriendo a cualquier hora del día en las áreas agrícolas, pero son más activos en el lapso de las 09:00 a las 11:00 horas (Villa, 1942). A pesar de ser perseguidas por los agricultores especialmente en época de lluvias y cosecha de maíz, su potencial reproductivo (especie poliestra) les permite conservar poblaciones estables (Núñez, 2005). La Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT- 2010 no la considera bajo ninguna categoría de riesgo (SEMARNAT, 2010). Y la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN por sus

siglas en inglés) la asigna en la categoría de Preocupación Menor o LC, por sus siglas en inglés (de Grammont y Cuarón, 2008).

1.8.1 Trabajos moleculares con *Notocitellus adocetus*

Los únicos trabajos moleculares que incluyen a *Notocitellus adocetus* son los de Harrison *et al.* (2003) y Herron *et al.* (2004). El primero estableció las relaciones filogenéticas de las ardillas terrestres con un muestreo taxonómico reducido y el segundo se centró en evaluar las relaciones de la familia Sciuridae incluyendo la mayoría de las especies de todos los géneros.

1.8.2 Antecedentes taxonómicos de *Notocitellus adocetus*

La taxonomía del cuinique es un claro ejemplo de un problema taxonómico a nivel de especie. Tradicionalmente, se le ha clasificado en el género *Spermophilus* como *S. adocetus* con sus respectivas subespecies (*S. a. adocetus* y *S. a. infernatus*, de acuerdo con Hall, 1981). Sin embargo, análisis filogenéticos moleculares recientes muestran que el género *Spermophilus* es parafilético (Harrison *et al.*, 2003; Herron *et al.*, 2004). Con base en estos estudios Helgen *et al.* (2009), realizaron la revisión del género *Spermophilus* y transfirieron *S. adocetus* y *S. annulatus* al género *Notocitellus* con sus dos subespecies (*N. a. adocetus* y *N. a. infernatus*). Estas dos subespecies se han delimitado considerando sus límites geográficos de distribución (Alvarez y Ramírez-Pulido, 1968; Hall, 1981). Se considera al Río Tepalcatepec como la barrera que determina la distribución de las subespecies. Hacia el norte del Río Tepalcatepec se distribuye *N. adocetus adocetus* y *N. adocetus infernatus* al sur de este río (Figura 1) (Alvarez y Ramírez-Pulido, 1968). Sin embargo, se han localizado poblaciones de *N. a. adocetus* al sur del Río Tepalcatepec y poblaciones de *N. a. infernatus* al norte del mismo (Alvarez y Ramírez-Pulido, 1968).

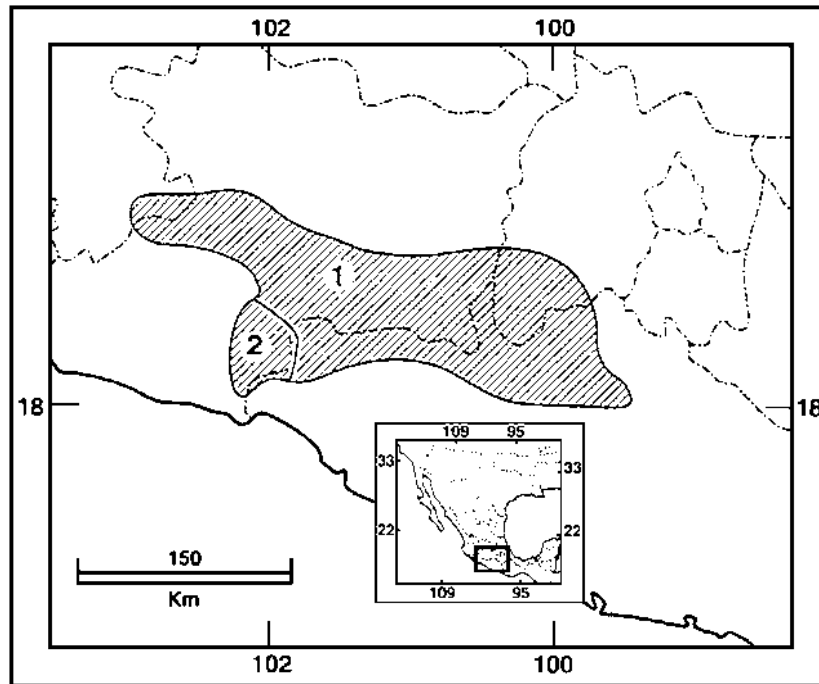


Figura 1. Distribución de *Notocitellus adocetus* (Tomado y modificado de Best, 1995): 1, *N. a. adocetus*; 2, *N. a. infernatus*.

Alvarez y Ramírez-Pulido (1968), con base en un estudio morfológico y morfométrico han propuesto que la diferencia morfológica entre las dos subespecies, es la longitud total de los organismos. Sin embargo, los autores no clarifican por completo las diferencias entre ambas subespecies ya que los caracteres diagnósticos que proponen, a excepción de la longitud total, se observan en poblaciones de las dos subespecies. Recientemente, se analizó cladísticamente la variación de 13 caracteres morfométricos del cráneo y cuatro medidas corporales en 53 individuos de las subespecies del cuinique y su grupo hermano (Sánchez-Suárez, 2012). Se encontró que las subespecies no son monofiléticas. La anchura mastoidea, anchura zigomática y longitud total sustentan estos resultados.

Esos antecedentes taxonómicos basados en caracteres morfológicos revelan la importancia de analizar datos moleculares como otra fuente de evidencia para evaluar si las subespecies se sustentan como monofiléticas. En este trabajo se analizará la estructura genética, los patrones filogeográficos y se realizarán análisis de inferencia filogenética molecular para

ayudar a resolver la taxonomía de las subespecies de *N. adocetus*, ya que este tipo de análisis han demostrado ser útiles para resolver problemas taxonómicos dado que recuperan grupos naturales. Se usara el enfoque de Mishler y De Luna (1997), que sugiere que los criterios filogenéticos sobre sinapomorfia y monofilia son necesarios para la designación de grupos naturales que puedan ser reconocidos y nombrados formalmente como grupos taxonómicos. Para esto se utilizará un marcador mitocondrial, específicamente el gen codificador *Citb*, así como el marcador nuclear RAG1.

2. HIPÓTESIS

Si el Río Tepalcatepec ha sido una barrera reproductiva y de flujo génico efectiva, entonces las subespecies de *Notocitellus adocetus* propuestas por Alvarez y Ramírez-Pulido (1968), Hall (1981) y Best (1995) se recuperarán como grupos monofiléticos, y la distribución de su diversidad genética mostrará una estructura geográfica marcada consistente con esta barrera.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Describir la estructura genética de *Notocitellus adocetus* y evaluar la monofilia de sus subespecies.

3.2 Objetivos particulares

1.- Describir la diversidad y estructura genética de las subespecies de *Notocitellus adocetus* a partir de evidencia molecular.

2.- Evaluar la monofilia de las subespecies de *Notocitellus adocetus* usando caracteres moleculares.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Trabajo de campo

Durante junio de 2012 a noviembre de 2013 se realizaron nueve salidas de campo para coleccionar muestras representativas de cada subespecie en 14 poblaciones, tanto en los extremos de su área de distribución como las zonas cercanas entre las subespecies con la finalidad de representar la diversidad genética (Figura 2). Se escogieron poblaciones de donde existen registros de colecta, que se reportan en la literatura (Villa, 1942; Alvarez y Ramírez-Pulido, 1968) y las registradas en la Colección Nacional de Mamíferos (CNMA), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y la Colección Científica de Mamíferos de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Además, se escogieron localidades en donde se conoce existen poblaciones de *N. adocetus* (obs. pers.) y que no han sido colectadas antes. Se obtuvieron también dos ejemplares de *Notocitellus annulatus*. El número de ejemplares colectados por población y su ubicación se resumen en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Poblaciones de *Notocitellus adocetus* colectadas con sus coordenadas y número de ejemplares.

Número	Estado	Población	Coordenadas	Número de ejemplares
1		Tepalcatepec, Municipio de Tepalcatepec. ^a	19° 11' 41.07" N, 102° 51' 48.71" O	9
2		Los Huarinches, Municipio de Tepalcatepec. ^a	19° 10' 8.381" N, 102° 53' 2.179" O	14
3		La Palma, Municipio de Múgica. ^a	18°59'37.96" N, 102°08'36.25" O	10
4		Nueva Italia, Municipio de Múgica. ^a	19°00'45.7" N, 102°05'49.6" O	11
5		Los Ciruelos, Municipio de La Huacana. ^a	18° 57' 9.046" N, 101° 53' 45.419" O	10
6		Gámbara, Municipio de Múgica. ^a	18°53'32.4" N, 102°8'29.9" O 18°50'50.6" N, 102°10'27.7" O	3
7	Michoacán	Cupuán del Río, Municipio de La Huacana. ⁱ	18°46'43.9" N, 102°12'11.3" O	2
8		Las Cruces, Municipio de Tumbiscatío. ⁱ	18° 44' 38.58" N, 102° 15' 10.42" O	2
9		Los Chivos, Municipio de Tumbiscatío. ⁱ	18°39'55" N, 102°14'0.1" O	16
10		Infiernillo, Municipio de Arteaga. ⁱ	18° 16' 34.578" N, 101° 54' 1.202" O	12
11		Iranche, Municipio de Tzitzio. ^a	19°17'16.8"N, 100°48'29.9" O	1
12		Melchor Ocampo, Municipio de Tuzantla. ^a	19°2'57.8"N, 100°42'0.1" O 19°4'10.2"N, 100°40'31.6" O	8
13		La Parota, Municipio de Huetamo. ^a	18°39'58.04" N, 100°52'57.40" O	6
14	Guerrero	Arcelia, Municipio de Arcelia. ^a	18° 18' 13.849" N, 100° 17' 9.743" O	2 (GenBank, solo <i>Citb</i>)
15	Michoacán	Churumuco, Municipio de Churumuco. ^a	18° 40' 5.9442" N, 101° 40' 3.6834" O	2
Total de ejemplares				108

^a *Notocitellus adocetus adocetus* sensu Hall, 1981.

ⁱ *Notocitellus adocetus infernatus* sensu Hall, 1981.

Tabla 2. Poblaciones de *Notocitellus annulatus* con sus coordenadas y número de ejemplares.

Número	Población	Coordenadas	Número de ejemplares
1	La Manzanillera, Municipio de Aquila, Michoacán	18° 21' 17.3196" N, 103° 30' 45.3852" O	2
2	Ostula, Municipio de Aquila, Michoacán	18° 29' 51.8676"N, 103° 28' 56.7006""O	2
			Colección Científica de Mamíferos UMSNH

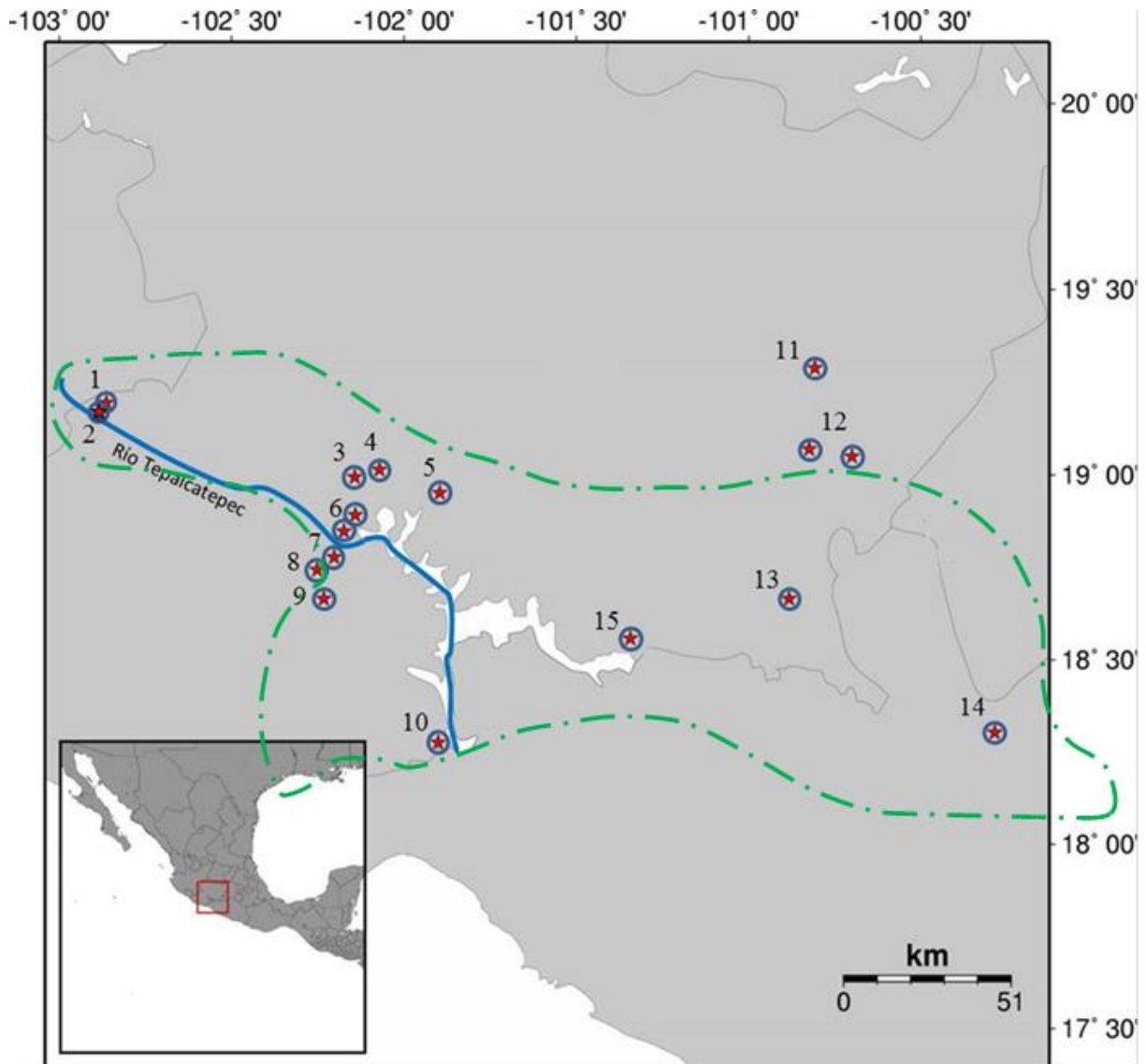


Figura 2. Poblaciones colectadas, (se indica el número de ejemplares entre paréntesis.): 1 Tepalcatepec (9); 2 Los Huarinches, Municipio de Tepalcatepec (14); 3 La Palma, Municipio de Múgica (10); 4 Nueva Italia, Municipio de Múgica (11); 5 Los Ciruelos, Municipio de La Huacana (10); 6 Gámbara, Municipio de Múgica (con dos sitios) (3); 7 Cupuán del Río, Municipio de La Huacana (2); 8 Las Cruces, Municipio de Tumbiscatío (2); 9 Los Chivos, Municipio de Tumbiscatío (16); 10 Infiernillo, Municipio de Arteaga (12); 11 Iranche, Municipio de Tzitzio (1); 12 Melchor Ocampo, Municipio de Tuzantla (con dos sitios) (8); 13 La Parota, Municipio de Huetamo (6); 14 Arcelia(2, GenBank solo para *Citb*); 15 Churumuco (2). La línea punteada verde delimita el área de distribución propuesta por Hall, 1981. Mapa generado en <http://www.seaturtle.org/maptool/>.

4.2 Método de colecta

Los individuos se capturaron con trampas tipo Sherman cebadas con una mezcla de crema de cacahuete, avena y vainilla, colocadas en transectos de trampas que variaron en cantidad y tiempo de trapeo según la distribución de las madrigueras, las condiciones de la localidad y de seguridad, pero siempre se recolectaron organismos de diferentes madrigueras en las poblaciones. También se obtuvieron muestras de individuos atropellados. De cada ejemplar se tomaron muestras de piel y pelo, así como muestras de músculo que se preservaron en etanol absoluto, sal, solución saturada de NaCl-DMSO y congeladas, de los ejemplares vivos se colectó sangre preservándola en solución de lisis (Ambriz-Morales 2009).

4.3 Trabajo de Laboratorio

4.3.1 Método de conservación

Con la primera muestra que se obtuvo de Gámbara, Municipio de Múgica, de un organismo que se encontró atropellado, se realizaron extracciones de ADN genómico de prueba (con el método que más adelante se detalla) usando el músculo fresco y también se probaron cuatro diferentes métodos de conservación de músculo: solución saturada de NaCl-DMSO, etanol absoluto, congelación a -20°C y sal. Resultando los métodos de conservación en sal y congelación los más efectivos para obtener extracciones exitosas (Figura 3).

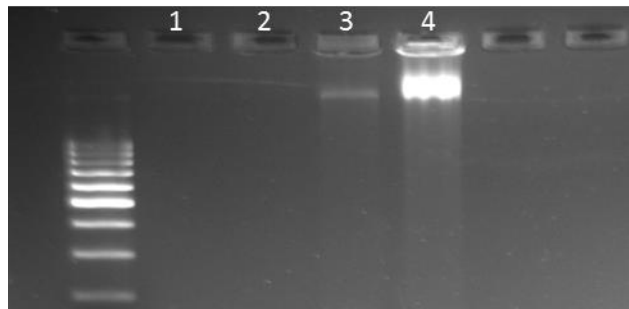


Figura 3. Extracciones de ADN con cuatro métodos de conservación de músculo: Marcador de 100 pb. Carril 1 músculo en solución saturada de NaCl-DMSO, carril 2 músculo en etanol absoluto, carril 3 músculo congelado y carril 4 músculo en sal.

4.3.2 Método de extracción

Para cada una de las muestras que se obtuvieron se hizo la extracción de ADN en laboratorio siguiendo el protocolo de FitzSimmons (1997). Se realizaron también extracciones de ejemplares de la Colección Científica de Mamíferos de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo siguiendo el mismo protocolo de extracción y con el método de resina Chelex ®. Las extracciones se corroboraron siempre por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con Syber Safe (Invitrogen), cargando 8µL de muestra.

4.3.3 Método de amplificación/ experimentos de PCR

Se amplificaron dos genes, uno mitocondrial y otro nuclear con la finalidad de tener evidencia de diferentes loci. Se eligió amplificar el gen *Citb* ya que es de herencia materna sin recombinación, así como por su alta tasa mutacional (Avise, 2000), y por la posibilidad de comparar los resultados obtenidos con trabajos reportados para la familia en los que se analizó esta misma región del genoma. Se decidió amplificar el gen nuclear RAG1, ya que resultó ser el más variable tras analizar los genes nucleares que se han secuenciado para la familia Sciuridae y que se encuentran depositados en el GenBank. Además de que el RAG1 ya ha sido empleado en otros trabajos que incluyen a la familia Sciuridae como el de Steppan *et al.* (2004), donde se sugiere que tal región sería efectiva para análisis filogenéticos en vertebrados.

Se probaron cinco pares de primers de uso general para mamíferos (Ambriz-Morales, 2009; Fabila-Blanco, 2010) para amplificar *Citb* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Con estos primers se probaron gradientes de temperatura, gradientes de Mg de 1.5 a 2.5 mM, diluciones, reamplificaciones, concentración del producto de PCR, y mejoradores como BSA (Albúmina de Suero Bovino), glicerol, DMSO (Dimetilsulfóxido) y formamida (Roux, 2003) (Figura 4). La reamplificación consistía en hacer una amplificación por PCR de manera convencional y después hacer otra amplificación tomando el producto de PCR de la primera amplificación como templado. Mientras que la concentración de producto se realizó al dejar evaporar el agua del producto de PCR para obtener mayor concentración de producto por μL . Sin embargo, usando las estrategias anteriores no se obtuvieron productos de PCR de buena calidad que se pudieran secuenciar.

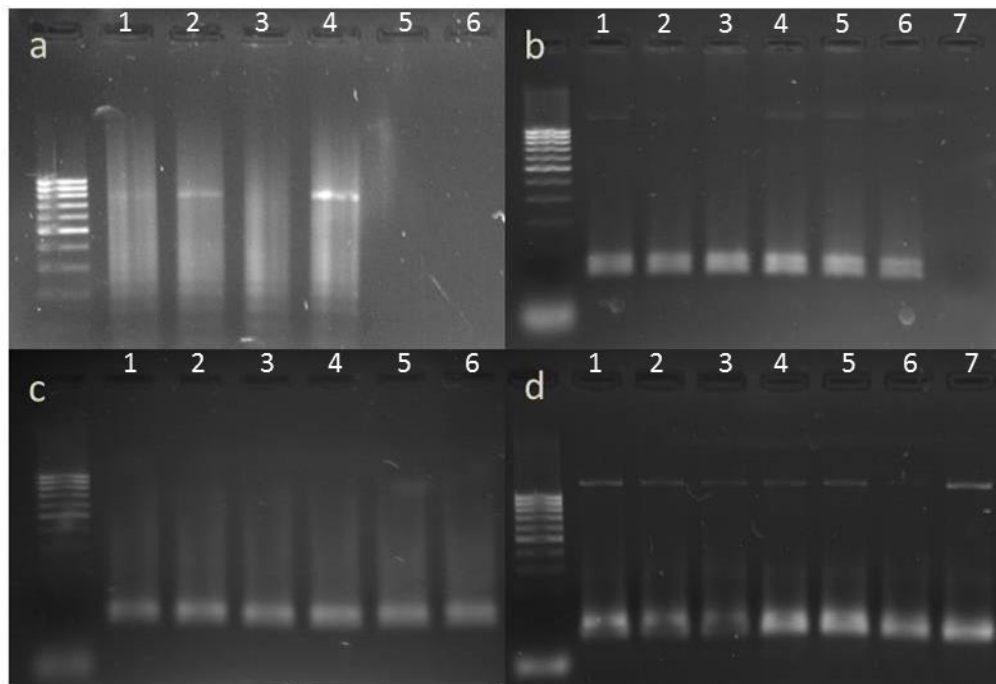


Figura 4. Algunas de las estrategias utilizadas para mejorar la PCR. a) Curva de Mg (1.5 a 6.5 mM), b) BSA (50mg/ μL), c) Reamplificación y d) Concentración del producto de PCR. Gel de agarosa a 1.5 % teñido con Syber Safe (Invitrogen) y cargando 3 μL del producto de PCR. En todos los casos el marcador es de 100 pb.

Por otra parte, se probaron los primers RAG1 y RAG9 para el gen RAG1 y al mismo tiempo otros para genes nucleares como S7R para amplificar el gen S7, RhodF y RhodR para el gen Rodopsina, GHF y GHR para el gen Hormona de crecimiento (Clements *et al.*, 2004; Ornelas-García *et al.*, 2008), todos estos usados en peces y que estaban disponibles en el Laboratorio de Análisis Molecular de Biología Acuática de la UMSNH, pero no se obtuvieron amplificaciones exitosas.

Por lo tanto, se decidió diseñar y sintetizar primers específicos para *Citb* y RAG1, a partir de los cuales se obtuvieron mejores resultados (ver Figura 5). Para *Citb* se diseñaron los primers con la herramienta Oligo DNA design tool (en línea www.macrogen.com). Para esto se usó una secuencia del gen *Citb* completo que está alojada en el GenBank (Número de acceso AF157843 de Harrison *et al.*, 2003). Para RAG1 se diseñaron los primers en base a una secuencia de *Marmota sibirica* (número de acceso del GenBank AY241493 de Stepan *et al.*, 2004), usando la herramienta <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> disponible en la plataforma del GenBank. Para el diseño y elección de los dos pares de primers, un par para *Citb* y otro para RAG1, se tomaron en cuenta criterios como; el par de primers que amplifique el fragmento más grande del gen, primers con la menor diferencia de temperaturas de alineamiento, primers con terminación 3' en G o C, que no tuvieran complementariedad, primers con tamaño entre 18 a 25 bases y con un contenido de G/C entre 45 y 55 % (Sharrocks, 1994).

Los primers diseñados para *Citb* fueron NaCitb F (5' AGCCATCCAAATCCTCACAG 3') y NaCitb R (5' TGGCCTCCAATTCAGGTTAG 3'), mientras que para RAG1 fueron RAG1NaF (5' GCAAGAGACAAAGCAGTTCAC 3') y RAG1NaR (5' CTCTTTGGATTCCTTGTGGC 3'), además se decidió sintetizar los primers S70 (5' TCCGAGTGGAAATTTAAGMTGTT 3') y S73 (5' GAGGAAGGTRTTGACACGGATG 3') primers usados para RAG1 previamente en esciúridos (Stepan *et al.*, 2004).

Se realizaron gradientes de temperatura, de 53 a 58 °C, y curvas de Mg, de 1.5 a 6.5 mM, para obtener las mejores condiciones de amplificación con todos los primers. Las condiciones de PCR que resultaron ser mejores y que se usaron para amplificar *Citb* fueron:

Buffer 10X (100 mM Tris, 500 mM KCl; pH 8.4), 2.5 mM de MgCl₂, 10 pmol de cada oligonucleótido, 0.2mM de dNTPs, 4 U de *Taq* polimerasa, 50-100 ng de ADN genómico y H₂O_{dd} hasta completar un volumen de 50µL. El programa de amplificación que se usó para *Citb*, fue el siguiente: 94°C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 58°C por 1 minuto y 72°C durante 1 minuto, más una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Para RAG1 se probaron las cuatro combinaciones de primers RAG1NaF y RAG1NaR, S70 y S73, RAG1NaF y S73, S70 y RAG1NaR; efectuando para todos los casos gradientes de temperatura, de 54 a 59 °C, y curvas de Mg, de 1.5 a 6.5 mM. Se decidió usar el par RAG1NaF y RAG1NaR (primers diseñados) para amplificar la región de interés ya que con estos se obtuvieron mejores bandas de amplificación. Las condiciones de PCR y el programa de amplificación que resultaron ser mejores y que se usaron para amplificar RAG1 fueron las mismas que en *Citb* excepto que la temperatura de alineamiento que se usó en este caso fue de 59°C. En todos los casos los productos de amplificación se revisaron por electroforesis, colocando 1µL de muestra de PCR en geles de agarosa 1.5% teñido con Syber Safe (Invitrogen).

4.3.4 Secuenciación

Los fragmentos obtenidos por PCR se enviaron a secuenciar a laboratorios de servicio en, Corea del Sur y Estados Unidos de América, (www.macrogen.com y www.htseq.org respectivamente).

4.4 Ensamblaje y alineamiento de secuencias

El ensamblaje de secuencias en los dos genes se realizó en el programa MEGA 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura *et al.*, 2011).

El alineamiento de secuencias se realizó manualmente para los dos genes con el programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011), usando de referencia una secuencia completa del gen *Citb* que está alojada en el GenBank (ver Tabla 3). Mientras que para el RAG1 se utilizó de referencia la secuencia de *Ictidomys tridecemlineatus* depositada también en el GenBank (ver Tabla 3).

4.5 Diversidad y estructura genética

4.5.1 Análisis de diversidad genética

Se estimó la diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) por población, así como de las regiones geográficas Norte (*N. adocetus adocetus*) y Sur (*N. adocetus infernatus*), y también Este y Oeste con el programa DnaSP (Librado y Rozas, 2009), usando los parámetros por defecto. Para interpretar la historia demográfica de cada población se usaron como base la combinación de los valores obtenidos de h y π como lo propone Grant y Bowen (1998), y Avise (2000).

4.5.2 Redes de haplotipos

Se construyeron las redes de haplotipos para los dos genes usando el Software TCS (Clement *et al.*, 2000), con probabilidad igual o mayor a 95%, para analizar la distribución espacial de los haplotipos. Las redes de haplotipos se sobrepusieron en mapas hipsográficos con vegetación generados en el Mapa Digital de México V 5 en línea, del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI).

Adicionalmente se ubicaron los haplotipos por población de cada gen en un mapa, con el fin de mostrar su distribución de manera gráfica. En este mapa se muestra la ubicación de las poblaciones dentro de la depresión del Balsas y se indican las provincias biogeográficas circundantes, así como las elevaciones presentes en la región, y los cauces del río

Tepalcatepec y Balsas. Para realizar el mapa se usaron las capas: División política estatal 1:4000000 (INEGI, 1990a), Hipsometría (INEGI, 1990b), Provincias biogeográficas de México (CONABIO, 1997), e Hidrografía (Maderey-R y Torres-Ruata, 1990), disponibles en línea en el Portal de Geoinformación del Sistema Nacional de Información sobre Biodiversidad. El mapa fue generado en ArcMap V. 9.3 con las capas mencionadas.

4.5.3 Análisis de estructura genética

Se determinó la diferenciación genética entre el total de poblaciones, así como entre poblaciones de las regiones geográficas Norte (*N. adocetus adocetus*) y Sur (*N. adocetus infernatus*), y también Este y Oeste para los dos genes, a partir de un análisis molecular de varianza (AMOVA) con el Software Arlequín (Excoffier y Lischer, 2010). También se estimó el flujo génico (Nm), entre poblaciones de las regiones geográficas Norte (*N. adocetus adocetus*) y Sur (*N. adocetus infernatus*), así como entre las regiones geográficas Este y Oeste usando los dos genes.

Además se realizó para *Citb* un Análisis Espacial de Variación Molecular (SAMOVA) mediante el programa SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al.*, 2002), el cual define grupos de poblaciones con base en su cercanía geográfica y su similitud genética, maximizando la diferenciación entre grupos. Este análisis permite inferir la existencia de barreras geográficas entre grupos (Dupanloup *et al.*, 2002). En el SAMOVA no se hacen agrupamientos *a priori*, solo se establece el número variable de agrupamientos para maximizar el porcentaje de variación entre grupos. Se probaron con dos, tres y cuatro grupos para encontrar el máximo de variación entre grupos. El resultado de este análisis se sobrepuso sobre el mapa descrito previamente.

4.6 Inferencia filogenética

4.6.1 Parsimonia

Con la finalidad de poner a prueba la monofilia de las subespecies, se realizó un análisis de parsimonia utilizando el programa PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) versión 4.0b10 (Swofford, 2002). Se seleccionaron dos especies como grupos externos: *Notocitellus annulatus* e *Ictidomys tridecemlineatus* ya que han sido reconocidas como especies hermanas de *N. adocetus* en diversos trabajos (Harrison *et al.*, 2003; Herron *et al.*, 2004; Thorington y Hoffmann, 2005; Helgen *et al.*, 2009). Las secuencias de *Notocitellus annulatus* se obtuvieron de los dos ejemplares colectados, de un ejemplar alojado en la Colección Científica de Mamíferos de la UMSNH y secuencias alojadas en el GenBank (Tabla 3). De *Ictidomys tridecemlineatus*, se utilizaron solamente secuencias alojadas en el GenBank (Tabla 3).

Para la construcción del árbol, se utilizó una búsqueda heurística con 100 réplicas de adición de ramas al azar e intercambio de ramas tipo TBR y manteniendo diez árboles por réplica. Esta estrategia de búsqueda se aplicó para cada gen por separado, así como para los datos de ambos genes concatenados. Para evaluar la robustez de los clados se realizaron métodos de remuestreo de caracteres con reemplazo (Bootstrap) y sin reemplazo (Jackknife). El análisis de Bootstrap se ejecutó con una búsqueda heurística con 100 réplicas de remuestreo, cada una con 10 réplicas al azar. Se dejó una remoción del 50% de los caracteres por cada una de las réplicas. Por su parte, el Jackknife se ejecutó con una búsqueda heurística con 100 réplicas de Jackknife cada una con 10 réplicas de adición de secuencias al azar y una remoción de 30% de caracteres (Mort *et al.*, 2000). Los valores de soporte se anotaron en los árboles de consenso estricto. Ambos métodos de soporte se realizaron para las particiones por separado así como para los datos concatenados.

Adicionalmente se obtuvieron las medidas de ajuste de los datos, índice de consistencia (CI), índice de homoplasia (HI) e índice de retención (RI).

También se realizó un análisis de Parsimonia, para cada gen, sólo considerando los haplotipos. Dado el número de ramas terminales, se decidió ejecutar una estrategia de búsqueda branch & bound (Kitching *et al.*, 1994), con 100 réplicas y la adición de secuencia de ramas más lejana (furthest). De igual manera se evaluó la robustez de los clados mediante un análisis de Bootstrap y de Jackknife con 100 réplicas cada uno y definiendo una búsqueda tipo branch & bound. También se obtuvieron las medidas de ajuste de los datos: índice de consistencia (CI), índice de homoplasia (HI) e índice de retención (RI). Y se realizaron los árboles de consenso estricto cuando se encontró más de un árbol igualmente parsimonioso.

Tabla 3. Número de acceso de las secuencias de los grupos externos alojadas en el GenBank.

Número de acceso	Referencia	Gen	Especie	Etiqueta utilizada
JX047306	Fernández, 2012	<i>Citb</i>	<i>Ictidomys tridecemlineatus</i>	<i>I tridecemlineatus</i>
AF157851	Harrison <i>et al.</i> , 2003	<i>Citb</i>	<i>Notocitellus annulatus</i>	<i>N annulatus 1</i>
AF157849	Harrison <i>et al.</i> , 2003	<i>Citb</i>	<i>Notocitellus annulatus</i>	<i>N annulatus 2</i>
XM_005327394	Acceso GenBank	RAG1	<i>Ictidomys tridecemlineatus</i>	<i>I tridecemlineatus</i>

4.6.2 Tiempos de divergencia de *Citb*

Primero se buscó el modelo de evolución molecular para *Citb* utilizando el programa JModelTest 2 (Darriba *et al.*, 2012). Posteriormente, se estimaron los tiempos de divergencia de los clados principales. Para esto, se utilizó un análisis bayesiano de coalescencia con el software BEAST v1.6.2 (Drummond y Rambaut, 2007), se seleccionó el modelo de evolución nucleotídica, de los disponibles en BEAST v1.6.2, más similar al estimado previamente y bajo el método de Bayesian Skyline Plot (BSP, Drummond *et al.*,

2005). Para ello se utilizó un reloj molecular relajado, calibrado con la tasa de mutación estimada para *Citb* en esciúridos norteamericanos de 1.52% / millón de años (Eddingsaas *et al.*, 2004; Van Tuinen *et al.*, 2008). Para el análisis se utilizaron 20,000,000 de generaciones, muestreando cada 1000 topologías. Después de revisar los valores posteriores de los “priors” mediante los Tamaños Efectivos de Muestra (Effective Size Sample, ESS) ≥ 200 , se descartó el 10% de las topologías para la reconstrucción del árbol consenso. Para ello, se seleccionaron las topologías con valores de soporte mayores al 50% (Posterior Probability Limit= 0.05) con límites de confianza mayores o igual al 95% (HPD \geq 95%).

4.6.3 Análisis de distancias Neighbor-joining

Con la finalidad de obtener los datos de distancias genéticas, se realizó un análisis de NJ en el programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011), con los parámetros por defecto. Se calcularon los valores de Bootstrap con 900 repeticiones para *Citb*, 800 para RAG1, y 1600 para los genes concatenados. Se eligieron estos valores dado que Mega re-muestra un carácter a la vez y estos valores permiten que todos los caracteres tengan la posibilidad de ser re-muestreados al menos una vez. Se estimaron las distancias genéticas p (p-distance) para conocer el porcentaje de distancia entre los clados principales y poblaciones de diferentes regiones geográficas.

5. RESULTADOS

5.1 Trabajo de campo

Producto de las salidas de campo y la donación de ejemplares por contactos de Tepalcatepec y Churumuco, Michoacán, se obtuvieron un total de 106 ejemplares de *Notocitellus adocetus* de 14 poblaciones, adicionalmente se obtuvieron dos secuencias de *N. adocetus* de ejemplares pertenecientes a Arcelia, Guerrero, esto solo para el gen mitocondrial (Harrison *et al.*, 2003; números de acceso GenBank en Tabla 4), para un total de 15 poblaciones (Ver Tabla 1). Además se obtuvieron dos ejemplares de *Notocitellus annulatus* de una población en la costa michoacana (Tabla 2).

5.2 Trabajo de Laboratorio

5.2.1 Extracciones

Se obtuvieron extracciones exitosas de los 106 ejemplares colectados. De las extracciones de ejemplares de la Colección Científica de Mamíferos de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo no hubo mucho éxito, ya que se obtuvieron bandas claras solo en tres de doce casos. Dos de las muestras en que se observó la banda de extracción eran de *N. adocetus* una de piel de un ejemplar colectado hace 23 años y otra de músculo de un ejemplar colectado en 2010, y la tercera fue de músculo de un ejemplar *N. annulatus* colectada en 1991. Con la resina Chelex ® no se obtuvieron extracciones exitosas.

5.2.2 Amplificación/ experimentos de PCR

Se obtuvieron amplificaciones por PCR para *Citb* de los 106 ejemplares colectados. Y para RAG1 se realizaron amplificaciones por PCR sólo de 40 ejemplares (Anexo I),

seleccionando al menos un individuo para cada población y un individuo para cada haplotipo mitocondrial, debido a que los marcadores moleculares nucleares tienden a ser menos variables y a que no se contaba con recursos suficientes para amplificar y secuenciar la misma cantidad que en *Citb*. Las bandas de amplificación de *Citb* resultaron siempre de mejor calidad que las de RAG1 excepto en las PCR de *N. annulatus* donde las bandas de amplificación fueron mejores en RAG1.

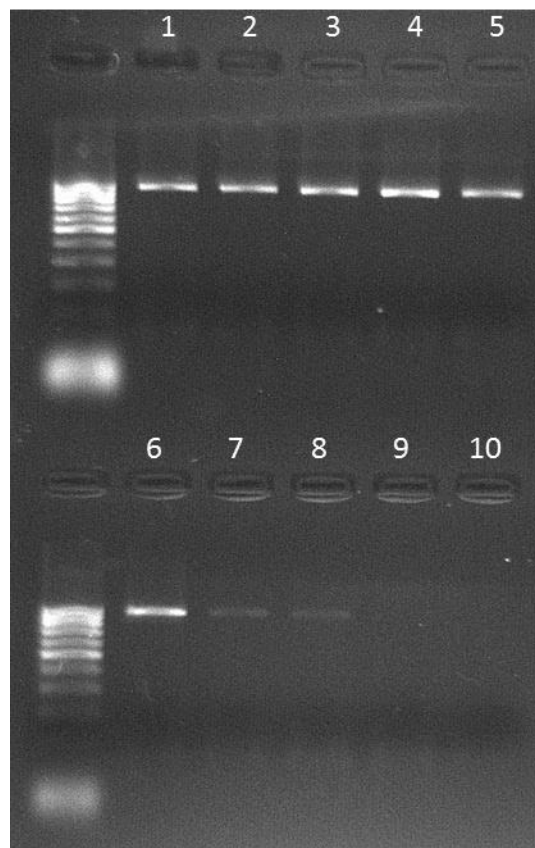


Figura 5. Productos de amplificación del gen *Citb* con los primers NaCitb F y NaCitb R, que se enviaron a secuenciar. Marcador 100 pb. Gel de agarosa a 1.5 % teñido con Syber Safe (Invitrogen) y cargando 1 μ L del producto de PCR.

5.3 Secuencias y alineamiento

Se obtuvieron 62 secuencias del gen mitocondrial *Citb*. Con los primers que se diseñaron (NaCitb F y NaCitb R), se esperaba un fragmento de 900 nucleótidos pero se eliminaron las porciones iniciales y finales de las secuencias debido a que presentaban baja calidad. Además, se integraron dos secuencias de la población de Arcelia, Guerrero depositadas en el GenBank (Tabla 4), para un total de 64 secuencias. Cada secuencia después del alineamiento fue de 807 nucleótidos.

Del gen nuclear RAG1 se obtuvieron 31 secuencias. Con los primers que se diseñaron (RAG1NaF y RAG1NaR), se esperaba un fragmento de 864 nucleótidos, se eliminaron las porciones iniciales y finales de las secuencias ya que tenían baja calidad. Cada secuencia después del alineamiento fue de 781 nucleótidos.

Tabla 4. Número de acceso de las secuencias de la población de Arcelia, Guerrero depositadas en el GenBank con el nombre de la subespecie y la etiqueta utilizada.

Número de acceso	Referencia	Subespecie	Etiqueta
AF157844	Harrison <i>et al.</i> , 2003	<i>Notocitellus adocetus adocetus</i>	Arcelia 1
AF157843	Harrison <i>et al.</i> , 2003	<i>Notocitellus adocetus adocetus</i>	Arcelia 2

5.4 Diversidad y estructura genética

5.4.1 Análisis de diversidad genética

Los valores de diversidad haplotídica (h) y nucleotídica (π) calculados para cada población y para cada región geográfica así como la interpretación de la historia demográfica como proponen Grant y Bowen (1998), y Avise (2000) (donde: $h > 0,5$ es alta y $\pi < 0,005$ es baja), se muestran en las Tablas 5 a 8. Se evaluó la h y π para las regiones Este y Oeste ya que tienen un número considerable de cambios nucleotídicos entre sí (se explica a detalle en las siguientes secciones). Para *Citb* la h resultó ser alta en las poblaciones de Gámbara,

Los Huarinches, Melchor Ocampo, Churumuco y Cupuán del Río así como en las regiones geográficas Este, Oeste, Norte (*N. a. adocetus* sensu Hall, 1981) y Sur (*N. a. infernatus* sensu Hall, 1981), mientras que la π fue alta solo en la población de Churumuco y en la región geográfica Norte (*N. a. adocetus*). En RAG1 por otra parte, la h fue alta en las poblaciones de Tepalcatepec, Huetamo, Melchor Ocampo, La Huacana, Cupuán del Río, Infiernillo, Las Cruces y Los Chivos así como en las poblaciones Este, Oeste, Norte (*N. a. adocetus*) y Sur (*N. a. infernatus*), mientras que la π fue alta solo en la población de Los Chivos.

Tabla 5. Diversidad haplotídica (h) y nucleotídica (π) por población para el gen *Citb*, se muestran subrayados los valores que se consideran altos (Grant y Bowen, 1998; Avise, 2000). n: número de ejemplares. NA: no aplica. Por encima de la línea poblaciones de *Notocitellus adocetus adocetus* sensu Hall, 1981; por debajo de la línea poblaciones de *Notocitellus adocetus infernatus* sensu Hall, 1981. **Interpretación demográfica** (Grant y Bowen, 1998; Avise, 2000): I. La población paso por un cuello de botella recientemente o es producto de un efecto fundador por un solo o pocos linajes de ADN mitocondrial; II. La población paso por un cuello de botella seguido de un rápido crecimiento poblacional y acumulación de mutaciones; III. La población es estable con una larga historia evolutiva o contacto secundario entre linajes diferenciados.

Población	n	Haplotipos	h	π	Interpretación demográfica
Gámbara	3	2	<u>0.667</u>	0.00165	II
Nueva Italia	5	2	0.400	0.00099	I
La Palma	5	2	0.400	0.00099	I
Tepalcatepec	6	2	0.333	0.00041	I
Los Huarinches	5	3	<u>0.800</u>	0.00248	II
Huetamo	6	1	0.00	0.00	NA
Melchor Ocampo	7	2	<u>0.571</u>	0.00071	II
Iranche	1	1	NA	NA	NA
La Huacana	8	1	0.00	0.00	NA
Churumuco	2	2	<u>1.00</u>	<u>0.00867</u>	III
Arcelia	2	1	0.00	0.00	NA
Cupuán del Río	2	2	<u>1.00</u>	0.00496	II

Infiernillo	5	2	0.400	0.00198	I
Las Cruces	2	1	0.00	0.00	NA
Los Chivos	5	1	0.00	0.00	NA

Tabla 6. Diversidad haplotídica (h) y nucleotídica (π) por población para el gen RAG1, se muestran subrayados los valores que se consideran altos (Grant y Bowen, 1998; Avise, 2000). n: número de ejemplares.

NA: no aplica. Por encima de la línea poblaciones de *Notocitellus adocetus adocetus* sensu Hall, 1981; por debajo de la línea poblaciones de *Notocitellus adocetus infernatus* sensu Hall, 1981.

Población	n	Haplotipos	h	π
Gámbara	1	1	NA	NA
Nueva Italia	1	1	NA	NA
La Palma	1	1	NA	NA
Tepalcatepec	3	2	<u>0.667</u>	0.00171
Los Huarinches	1	1	NA	NA
Huetamo	4	3	<u>0.833</u>	0.00448
Melchor Ocampo	6	4	<u>0.867</u>	0.00196
Iranche	1	1	NA	NA
La Huacana	2	2	<u>1.00</u>	0.00128
Churumuco	2	1	0.00	0.00
Cupuán del Río	2	2	<u>1.00</u>	0.00128
Infiernillo	3	3	<u>1.00</u>	0.00427
Las Cruces	2	2	<u>1.00</u>	0.00384
Los Chivos	2	2	<u>1.00</u>	<u>0.00764</u>

Tabla 7. Diversidad haplotídica (h) y nucleotídica (π) por región geográfica para el gen *Citb*, se muestran subrayados los valores que se consideran altos (Grant y Bowen, 1998; Avise, 2000). n: número de ejemplares. Se indican en paréntesis las subespecies como se reconocen a partir de la distribución, sensu Hall, 1981. **Interpretación demográfica** (Grant y Bowen, 1998; Avise, 2000): II. La población paso por un cuello de botella seguido de un rápido crecimiento poblacional y acumulación de mutaciones; III. La población es

estable con una larga historia evolutiva o contacto secundario entre linajes diferenciados. En *Citb* no hay haplotipos compartidos.

Región geográfica	n	Haplotipos	<i>h</i>	π	Interpretación demográfica
Norte (<i>N. a. adocetus</i>)	50	11	<u>0.841</u>	<u>0.00882</u>	III
Sur (<i>N. a. infernatus</i>)	14	4	<u>0.736</u>	0.00369	II
Oeste	48	12	<u>0.848</u>	0.00341	II
Este	16	3	<u>0.608</u>	0.00115	II
Total	64	15	<u>0.891</u>	<u>0.00852</u>	

Tabla 8. Diversidad haplotípica (*h*) y nucleotídica (π) por región geográfica para el gen RAG1, se muestran subrayados los valores que se consideran altos (Grant y Bowen, 1998; Avise, 2000). n: número de ejemplares.

Se indican en paréntesis las subespecies como se reconocen a partir de la distribución, sensu Hall, 1981.

Región geográfica	n	Haplotipos	<i>h</i>	π	Haplotipos compartidos
Norte (<i>N. a. adocetus</i>)	22	10	<u>0.892</u>	0.00485	4 compartidos
Sur (<i>N. a. infernatus</i>)	9	8	<u>0.972</u>	0.00405	
Oeste	20	10	<u>0.911</u>	0.00441	2 compartidos
Este	11	6	<u>0.855</u>	0.00293	
Total	31	14	<u>0.925</u>	0.00479	

5.4.2 Redes de haplotipos

De las muestras secuenciadas para *Citb* resultaron 15 haplotipos (Tabla 9 y Figura 9). Se nombraron a los haplotipos con la letra C de *Citb* y un número que fue consecutivo. La mayoría de los haplotipos se separan por uno o dos pasos mutacionales, el número de pasos mutacionales máximo entre haplotipos para la red fue de 11. TCS identifica el haplotipo

ancestral que resulto ser C1. Cabe destacar que no hay ningún haplotipo compartido entre las poblaciones del sur y norte del Rio Tepalcatepec (Figura 7). Y que los 11 pasos mutacionales que existen entre los haplotipos C6 y C1, definen dos grupos, por un lado el grupo Este con los haplotipos C6, C7y C8 y por el otro lado el grupo Oeste con el resto de los haplotipos. No hay haplotipos compartidos entre las poblaciones Este y Oeste (Figura 7).

Mientras que de las muestras secuenciadas para RAG1 resultaron 14 haplotipos (Tabla 10 y Figura 10). Se nombraron a los haplotipos con la letra R de RAG1 y un número consecutivo. La mayoría de los haplotipos se separan por uno o dos pasos mutacionales, el número de pasos mutacionales máximo entre haplotipos para la red fue de tres. TCS identificó como el haplotipo ancestral a R1. Se comparten cuatro haplotipos entre las poblaciones del sur y norte del Rio Tepalcatepec, y solo se comparte un haplotipo entre organismos del Este y Oeste (Figura 8).

Tabla 9. Lista de haplotipos del gen *Citb* con sus frecuencias absolutas (n) y los ejemplares que lo comparten.

Haplotipo	n	Subespecie	Ejemplares con el haplotipo
C1	4	<i>N. a. adocetus</i>	Gámbara 2*, Gámbara 3, La Palma 19 y Nueva Italia 28
C2	9	<i>N. a. adocetus</i>	Nueva Italia 1*, Nueva Italia 2, Gámbara 1, La Palma 1, La Palma 7 La Palma 21, La Palma 23, Nueva Italia 29 y Nueva Italia 34
C3	15	<i>N. a. adocetus</i>	Tepalcatepec 1*, Tepalcatepec 3, Tepalcatepec 4, Tepalcatepec 5, Tepalcatepec 6, Los Huarinches 10, La Huacana 1, La Huacana 2, Los Huarinches 2, La Huacana 3, La Huacana 4, La Huacana 5, La Huacana 8, La Huacana 9 y La Huacana 10
C4	1	<i>N. a. adocetus</i>	Tepalcatepec 2*

C5	2	<i>N. a. adocetus</i>	Los Huarinches 1* y Los Huarinches 11
C6	9	<i>N. a. adocetus</i>	Huetamo 1*, Huetamo 2, Huetamo 3, Huetamo 4, Huetamo 5, Huetamo 6, Melchor Ocampo 1, Melchor Ocampo 2 y Melchor Ocampo 4
C7	5	<i>N. a. adocetus</i>	Iranche 1*, Melchor Ocampo 5, Melchor Ocampo 6, Melchor Ocampo 7 y Melchor Ocampo 8
C8	2	<i>N. a. adocetus</i>	Arcelia 1* y Arcelia 2
C9	6	<i>N. a. infernatus</i>	Cupuán 1*, Los Chivos 1, Los Chivos 2, Los Chivos 3, Los Chivos 12 y Los Chivos 13
C10	3	<i>N. a. infernatus</i>	Cupuán 2*, Las Cruces 1 y Las Cruces 2
C11	1	<i>N. a. infernatus</i>	Infiernillo 2*
C12	4	<i>N. a. infernatus</i>	Infiernillo 1*, Infiernillo 5, Infiernillo 9 e Infiernillo 11
C13	1	<i>N. a. adoceuts</i>	Churumuco 1*
C14	1	<i>N. a. adoceuts</i>	Churumuco 2*
C15	1	<i>N. a. adoceuts</i>	Los Huarinches 12*

* Ejemplar representante del haplotipo para los análisis de Parsimonia solo con haplotipos.

Tabla 10. Lista de haplotipos del gen RAG1 con sus frecuencias absolutas y los ejemplares que lo comparten.

Haplotipo	n	Subespecie	Ejemplares con el haplotipo
R1	3	<i>N. a. adocetus</i> <i>N. a. infernatus</i>	Melchor Ocampo 1*, Melchor Ocampo 5 e Infiernillo 5
R2	1	<i>N. a. infernatus</i>	Los Chivos 3*
R3	6	<i>N. a. adocetus</i>	Huetamo 1*, Huetamo 6, Los Huarinches 1, Gámbara 2, Melchor Ocampo 4 y Melchor Ocampo 8
R4	2	<i>N. a. adocetus</i>	Iranche 1* y Melchor Ocampo 7
R5	1	<i>N. a. infernatus</i>	Infiernillo 2*

R6	1	<i>N. a. adocetus</i>	Huetamo 2*
R7	1	<i>N. a. infernillo</i>	Cupuán 1*
R8	2	<i>N. a. infernillo</i>	Cupuán 2* y La Huacana 4
		<i>N. a. adocetus</i>	
R9	5	<i>N. a. adocetus</i>	La Huacana 3, Las Cruces 2, Tepalcatepec 2,
		<i>N. a. infernatus</i>	Churumuco 1* y Churumuco 2
R10	2	<i>N. a. adocetus</i>	Tepalcatepec 1* y Tepalcatepec 17
R11	3	<i>N. a. adocetus</i>	Nueva Italia 10*, Los Chivos 13, y La Palma
		<i>N. a. infernatus</i>	24
R12	2	<i>N. a. infernatus</i>	Las Cruces 1* e Infernillo 1
R13	1	<i>N. a. adocetus</i>	Melchor Ocampo 2*
R14	1	<i>N. a. adocetus</i>	Huetamo 3*

* Ejemplar representante del haplotipo para los análisis de Parsimonia solo con haplotipos.

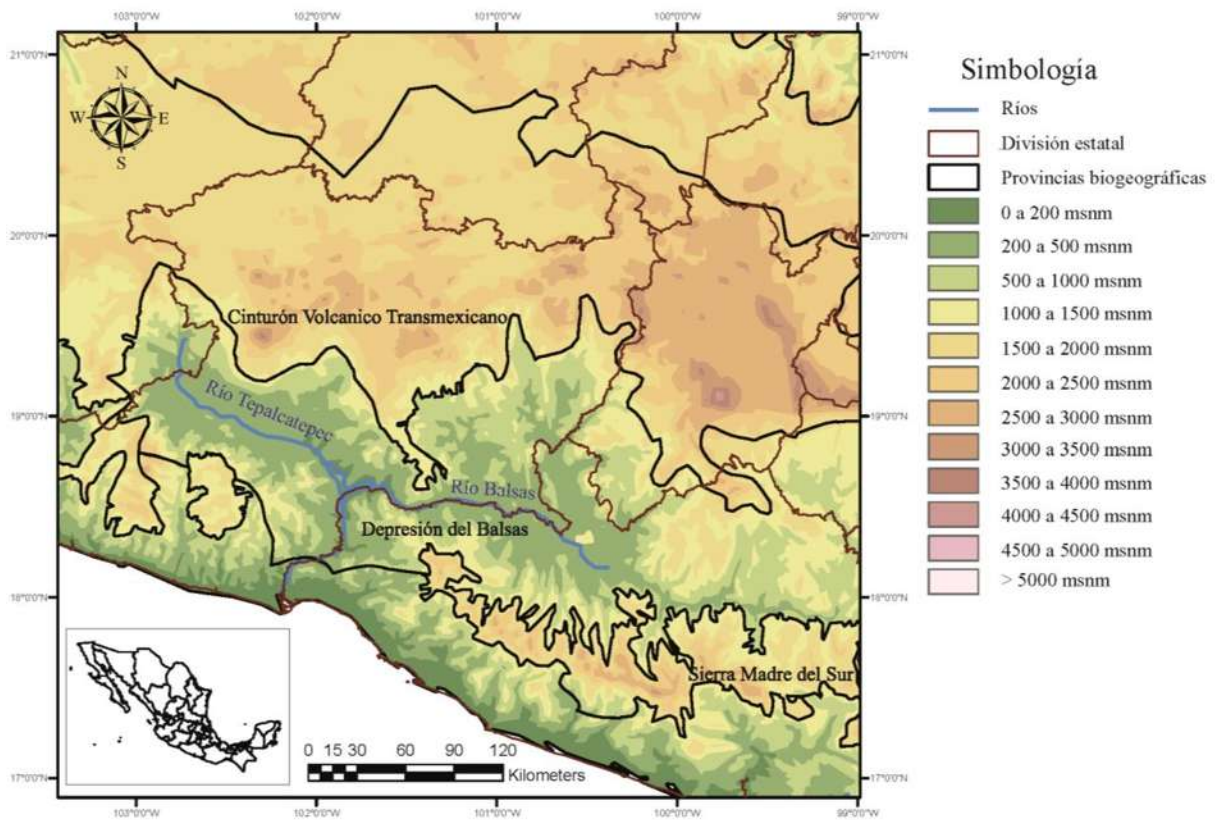


Figura 6. Mapa de elevaciones que comprende las provincias biogeográficas (CONABIO, 1997), Cinturón Volcánico Transmexicano y Depresión del Balsas, esta última área donde se distribuye *N. adocetus*. Se indican los ríos Balsas y Tepalcatepec.

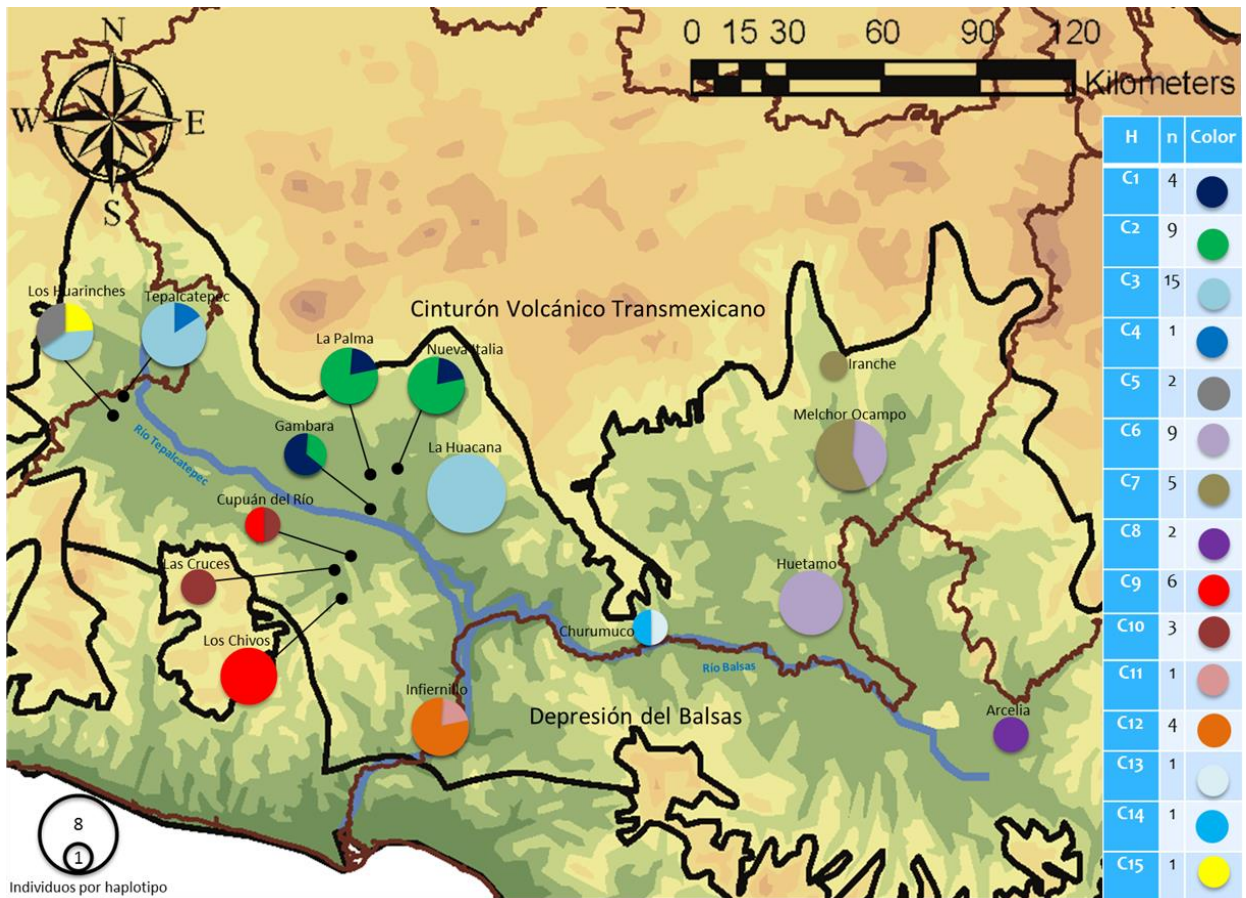


Figura 7. Haplotipos de Citocromo b por población. Los círculos están en la ubicación geográfica de cada población o en su caso se indica con un círculo negro la ubicación exacta. Cada color representa un haplotipo diferente como se indica del lado derecho, para detalles de los haplotipos (H) referirse a la Tabla 9. El tamaño del círculo representa el número de individuos por haplotipo (ver escala en figura).

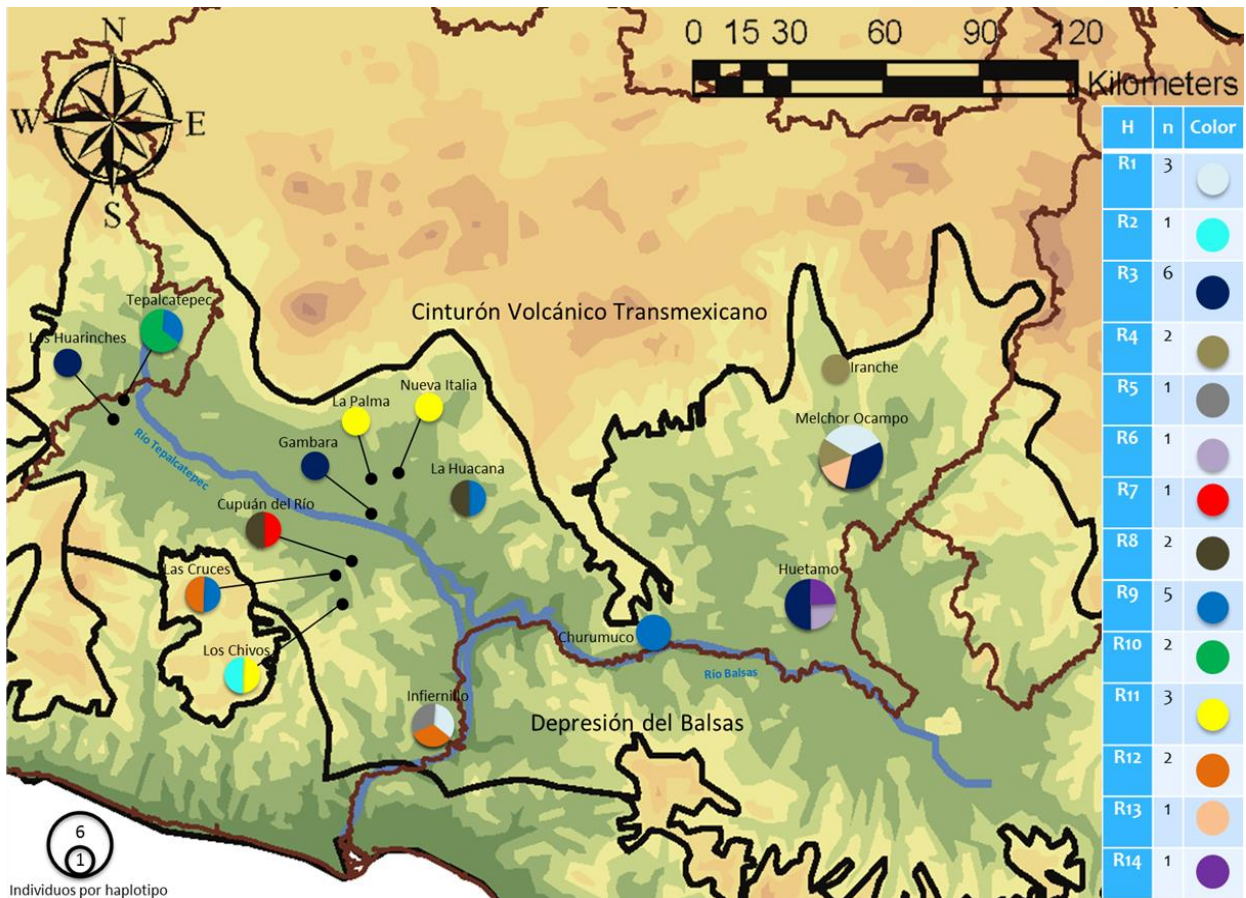


Figura 8. Haplotipos de RAG1 por población. Los círculos están en la ubicación geográfica de cada población o en su caso se indica con un círculo negro la ubicación exacta. Cada color representa un haplotipo diferente como se indica del lado derecho, para detalles de los haplotipos (H) referirse a la Tabla 10. El tamaño del círculo representa el número de individuos por haplotipo (ver escala en figura).

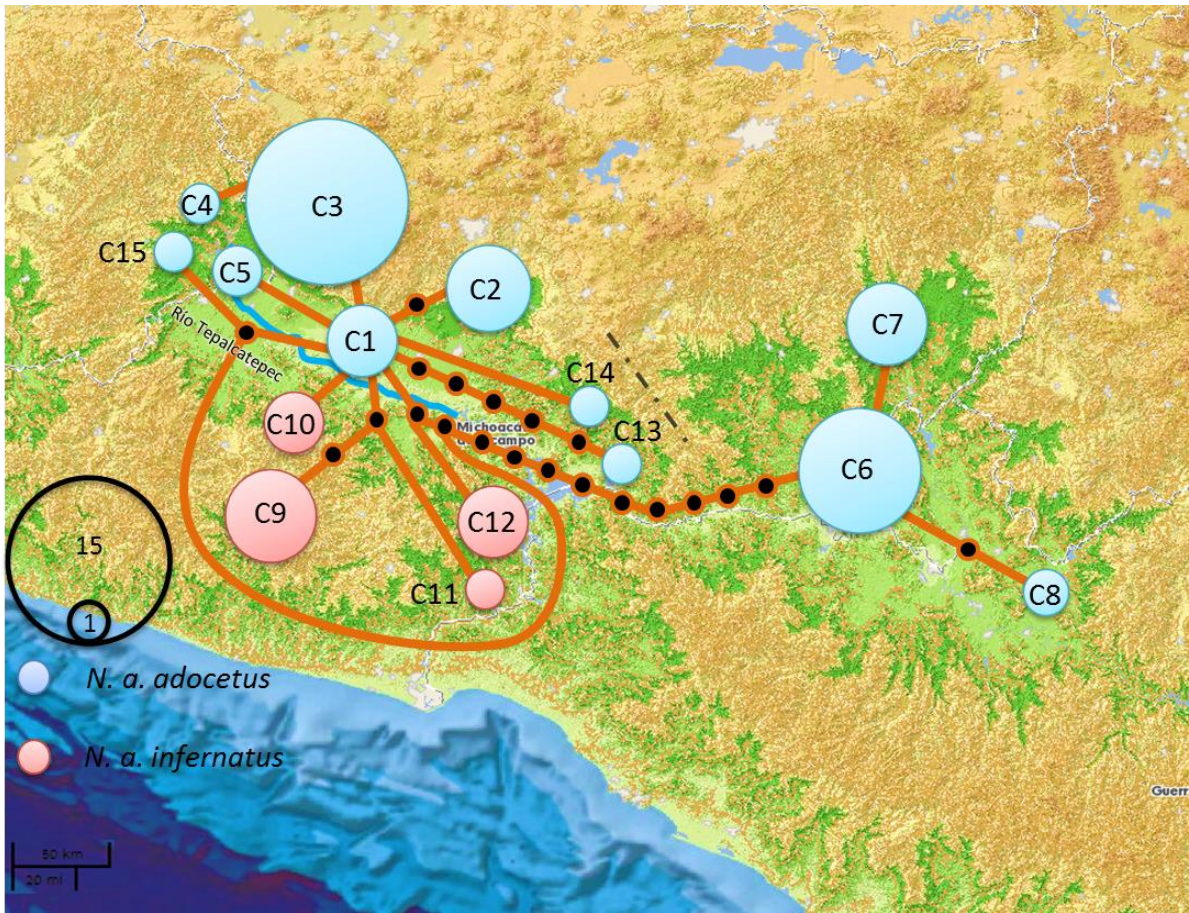


Figura 9. Red de haplotipos de *Citb* creada en TCS mediante parsimonia con probabilidad igual o mayor a 95%. Cada línea representa un cambio mutacional y cada círculo un paso mutacional adicional. El tamaño del círculo representa el número de ejemplares que comparten el haplotipo. Los círculos están aproximadamente sobre las localidades. La línea punteada indica las elevaciones montañosas entre las poblaciones Oeste y Este pertenecientes al Cinturón Volcánico Transmexicano. Para detalles de los haplotipos referirse a la Tabla 9. En el mapa los colores verdes representan altitudes menores a los 1000 msnm y las cafés altitudes mayores y regiones montañosas.

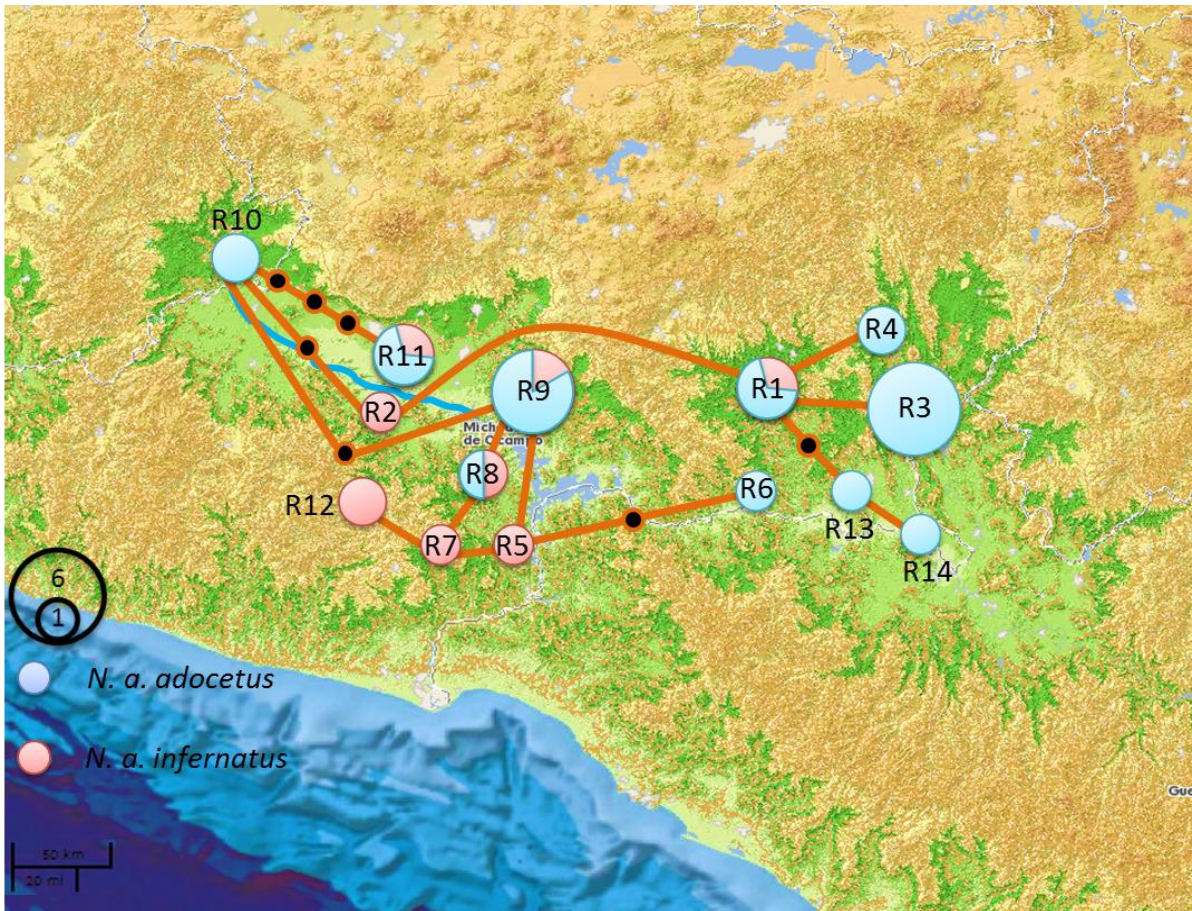


Figura 10. Red de haplotipos de RAG1 creada en TCS mediante parsimonia con probabilidad igual o mayor a 95%. Cada línea representa un cambio mutacional y cada círculo un paso mutacional adicional. El tamaño del círculo representa el número de ejemplares que comparten el haplotipo. Los círculos están aproximadamente sobre las localidades. Para detalles de los haplotipos referirse a la Tabla 10. En el mapa los colores verdes representan altitudes menores a los 1000 msnm y las cafés altitudes mayores y regiones montañosas.

5.4.3 Análisis de estructura genética

Los resultados del AMOVA para el gen *Citb* entre poblaciones arrojaron un $\Phi_{ST} = 0.88967$ ($P < 0.05$). Hartl y Clark (1989), consideran que valores de diferenciación de 0 a 0.05 indican poca diferenciación genética, de 0.05 a 0.15 indican diferenciación genética moderada, de 0.15 a 0.25 indican una gran diferenciación genética y por encima de 0.25 indica diferenciación genética muy grande. Por lo tanto, según el valor obtenido la

diferenciación genética es muy alta y significativa. El AMOVA entre subespecies resultó en un $\Phi_{ST} = 0.22522$ ($P < 0.05$), de manera que la diferenciación genética es alta (Hartl y Clark, 1989) y significativa. Adicionalmente se realizó un AMOVA entre las poblaciones del Este y el Oeste, es decir las poblaciones de Iranche, Huetamo, Melchor Ocampo y Arcelia (Este, poblaciones 11, 12, 13 y 14 en Figura 2) contra el resto de las poblaciones (Oeste), ya que muestran un considerable número de cambios nucleotídicos entre haplotipos, 11 cambios, entre los dos grupos, resultando de esta un $\Phi_{ST} = 0.83870$ ($P < 0.05$) de manera que la diferenciación genética es muy alta (Hartl y Clark, 1989) y significativa.

Los resultados del AMOVA para el gen RAG1 entre poblaciones arrojó un $\Phi_{ST} = 0.41123$ ($P < 0.05$), por lo tanto la diferenciación genética es muy alta (Hartl y Clark, 1989) y significativa. El AMOVA entre subespecies resultó en un $\Phi_{ST} = 0.07292$ ($P > 0.05$) aunque no es significativo. También se realizó un AMOVA entre las poblaciones del Este (Iranche, Huetamo y Melchor Ocampo; 11, 12 y 13 respectivamente en Figura 2) y el Oeste (resto de las poblaciones), resultando de esta un $\Phi_{ST} = 0.32463$ ($P < 0.05$) de manera que la diferenciación genética es muy alta (Hartl y Clark, 1989) y significativa.

Respecto del flujo génico para *Citb* se obtuvo entre poblaciones del Norte y Sur un $Nm = 1.72002$, entonces existe flujo génico entre lo que se consideran subespecies. Mientras que entre las poblaciones del Este y el Oeste se obtuvo un $Nm = 0.09616$, por lo tanto no existe flujo génico entre estas poblaciones. Para RAG1 entre subespecies, se obtuvo que $Nm = 6.35682$, es decir, existe flujo génico entre lo que se consideran subespecies. Y entre las poblaciones del Este y el Oeste se obtuvo $Nm = 1.04024$, por lo tanto también existe flujo génico entre estas poblaciones.

En el SAMOVA realizado para *Citb*, de las tres agrupaciones que se probaron, el máximo porcentaje de variación se obtuvo en el arreglo de dos grupos (82.03%, $P < 0.05$). Este arreglo separó a las poblaciones del Este y Oeste, además el análisis infiere la existencia de una barrera geográfica entre estas poblaciones (Figuras 11 y 12).

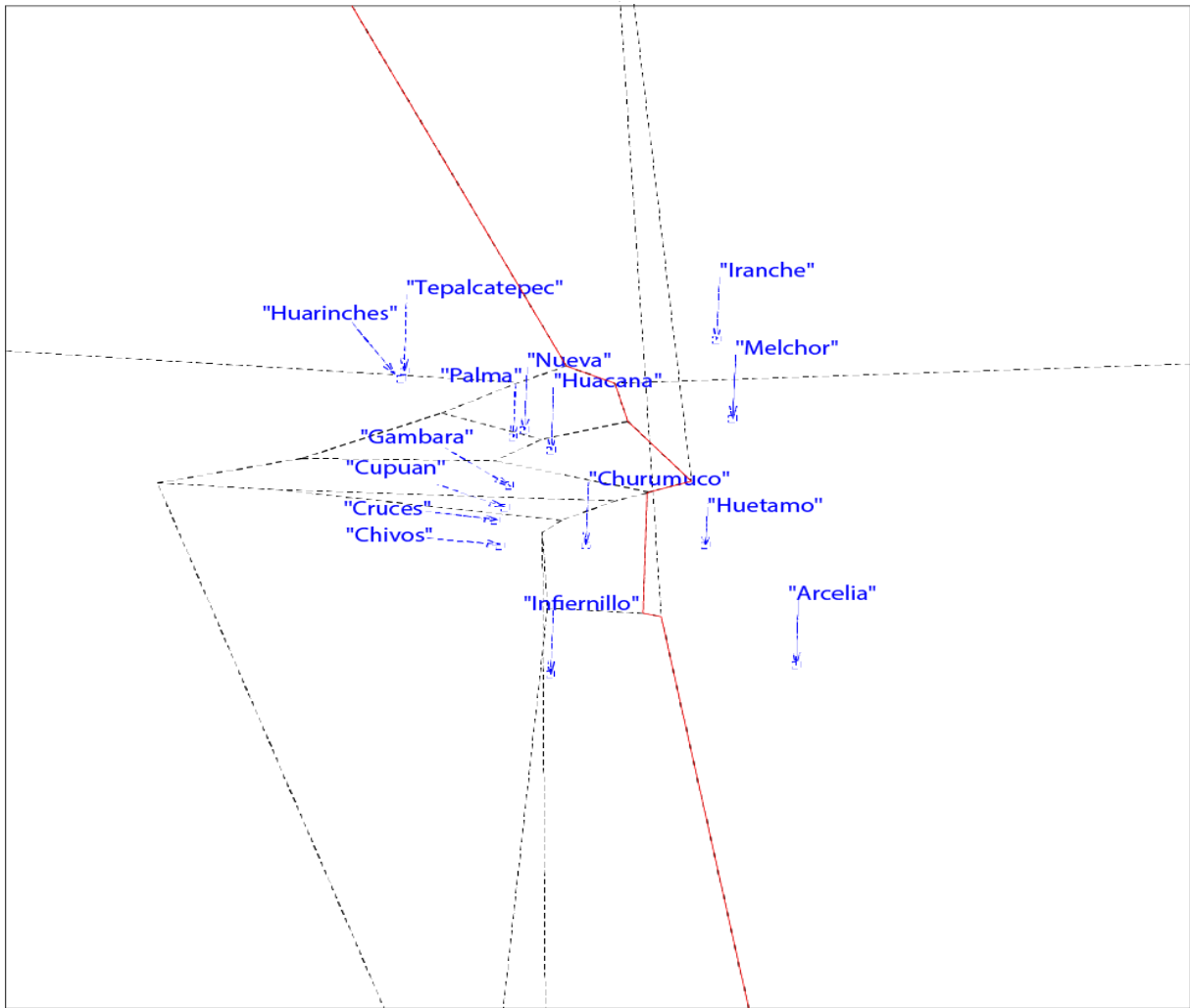


Figura 11. Descripción gráfica del resultado del SAMOVA. La línea roja indica la existencia de una barrera geográfica entre las poblaciones del Este y Oeste.

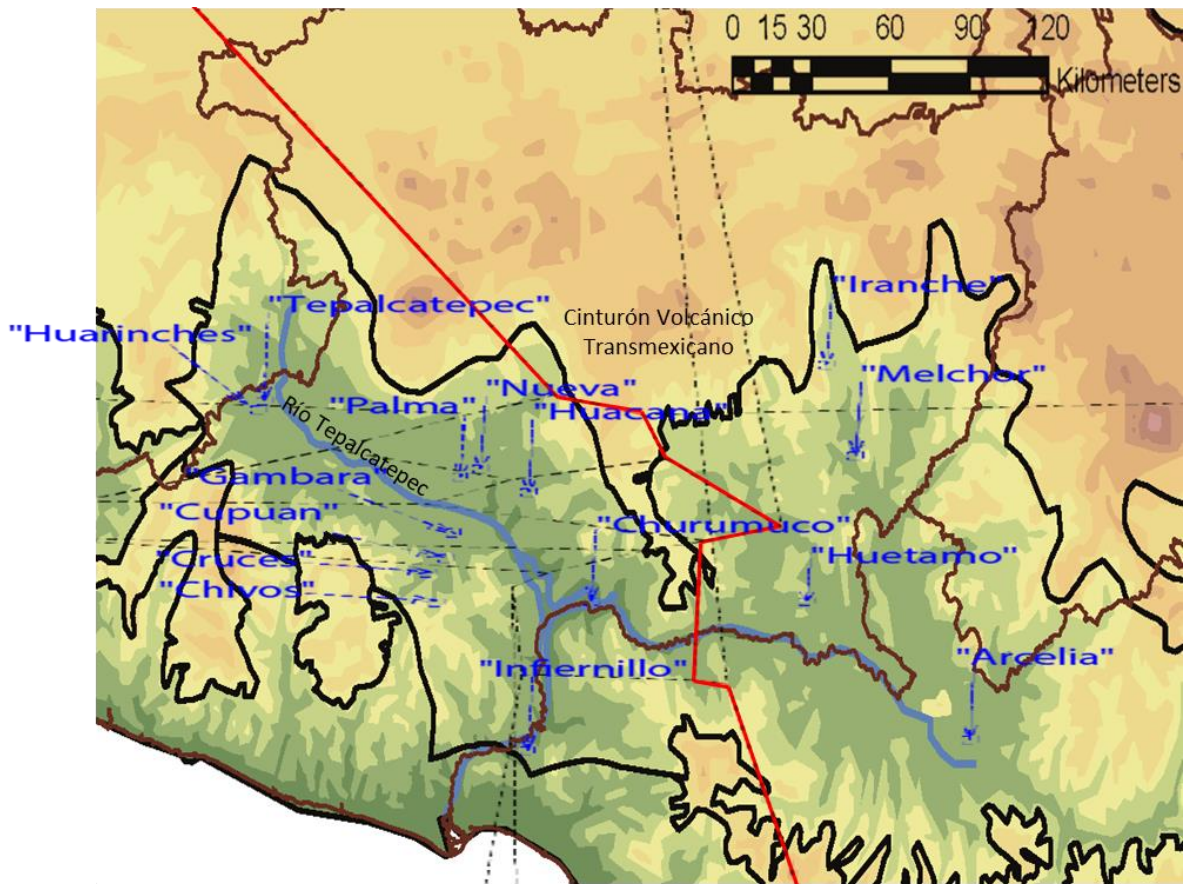


Figura 12. Resultado del SAMOVA empalmado con el mapa de provincias biogeográficas. La línea roja indica la existencia de una barrera geográfica, que coincide con un brazo medio del Cinturón Volcánico Transmexicano, entre las poblaciones del Este y Oeste.

5.5 Inferencia filogenética

En las matrices usadas en la inferencia filogenética y los árboles, se usó como etiqueta para cada ejemplar el nombre de la población a la que pertenecen y un número.

5.5.1 Parsimonia

Citocromo b

Resultado del alineamiento del gen *Citb* con los grupos externos se obtuvieron 67 secuencias, 64 del grupo interno y tres del grupo externo, cada una con 807 nucleótidos,

203 de estos fueron variables y 107 fueron parsimoniosamente informativos. Las secuencias de *Citb* de los grupos externos se obtuvieron del Genbank (Ver Tabla 3).

Con el método de Parsimonia usando todas las secuencias del gen *Citb*, se encontraron siete árboles igualmente parsimoniosos a partir de la búsqueda heurística ejecutada, por lo que se realizó un consenso estricto (Figura 13). La longitud del árbol fue de 227 pasos. Respecto de las medidas de ajuste de los datos al excluir los caracteres no informativos se obtuvo un índice de consistencia (CI) de 0.8626, el índice de homoplasia (HI) de 0.1374 y el índice de retención (RI) de 0.9544.

En el consenso estricto (Figura 13), se ve que los grupos externos se separan claramente del grupo interno. Se observa que las subespecies reconocidas, *N. adocetus adocetus* y *N. adocetus infernatus* no se recuperan monofiléticas. El árbol de consenso destaca claramente dos clados con abundantes politomías a los que se denominaron clado Oeste (indicado en naranja en la Figura 13) y clado Este (indicado en amarillo en la Figura 13). El clado Oeste tuvo un buen soporte de Jackknife (72) y bajo de Bootstrap (58), y es en este clado en donde se ubican organismos de *N. a. adocetus* (líneas azules) y *N. a. infernatus* (líneas rojas). Al interior se rescataron seis grupos pero con politomías internas. Por otro lado, el clado Este, incluye únicamente individuos de *N. a. adocetus* de poblaciones del Este (Huetamo, Melchor Ocampo, Iranche y Arcelia) con valores de soporte altos (100) de Jackknife y Bootstrap. Al interior del clado Este se recuperaron dos grupos: uno conteniendo a los individuos de Arcelia y otro manteniendo a organismos de Melchor Ocampo e Iranche. Es claro que el análisis de parsimonia con todas las secuencias de *Citb* no recuperó monofiléticas a las subespecies.

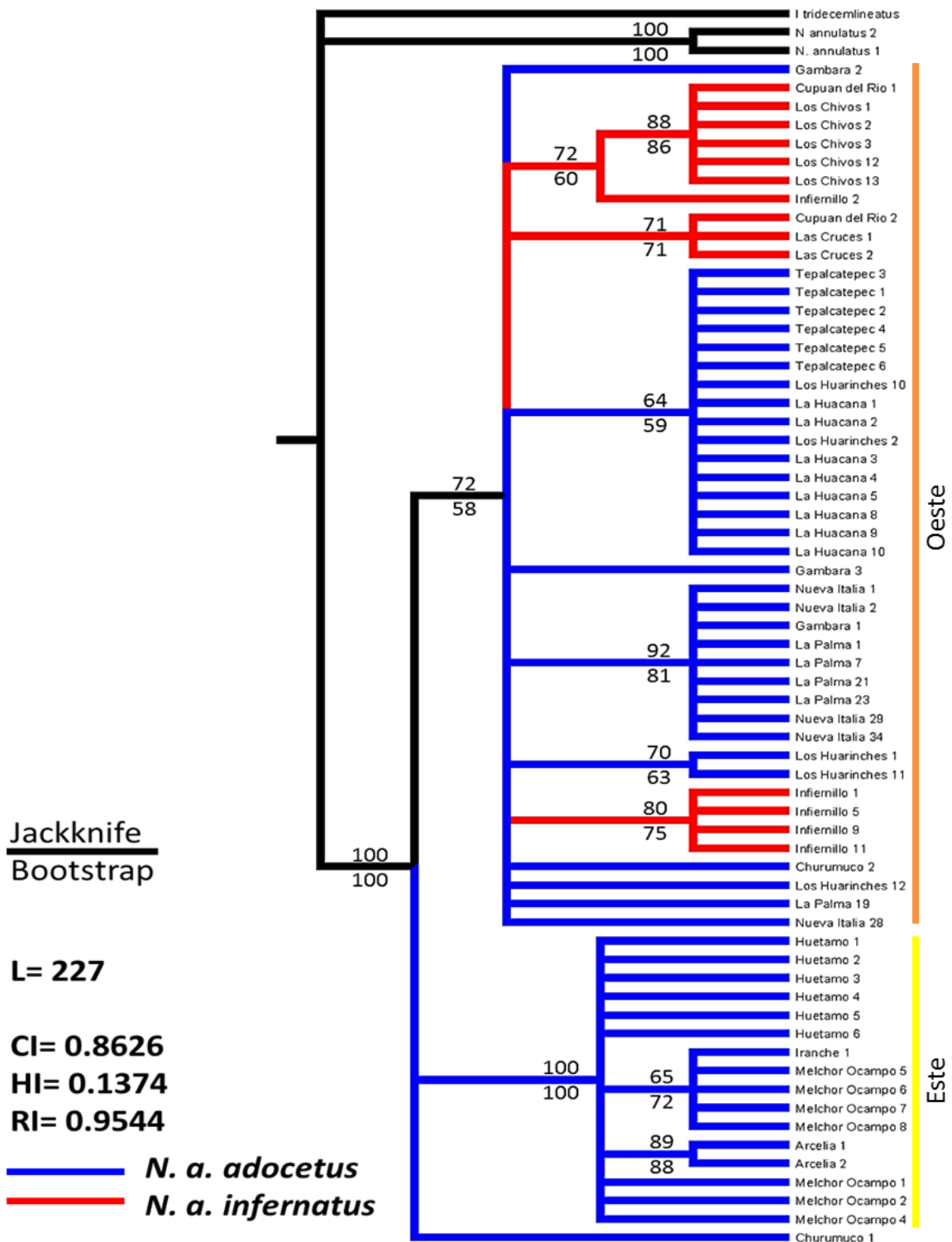


Figura 13. Consenso estricto usando el método de Parsimonia con el gen Citocromo b. L=longitud, CI= índice de consistencia, HI índice de homoplasia, RI=índice de retención. CI e HI excluyendo caracteres no informativos.

De la búsqueda realizada con los haplotipos de *Citb*, sólo 102 caracteres fueron parsimoniosamente informativos y se recuperaron siete árboles igualmente parsimoniosos de 227 pasos. El consenso estricto (Figura 14) agrupa en una politomía a ocho haplotipos, de ambas subespecies, en lo que se denominó clado Oeste quedando fuera de esta politomía, como grupo hermano, el haplotipo C15, también del clado Oeste. Y al igual que en el árbol en que se usaron todas las secuencias (Figura 13), como grupo hermano el clado Este, con politomías internas, con los haplotipos del Este (C6, C7 y C8) y finalmente como grupo hermano de los anteriores se observa al haplotipo C13 (Churumuco), que cabe señalar se localiza entre el Este y el Oeste justo abajo del brazo del CVTM. Los valores de soporte de Jackknife y Bootstrap para el clado Oeste fueron de 79 y 61 respectivamente. El clado Este tuvo un valor de Jackknife y Bootstrap de 100 (Figura 14).

Finalmente, esta matriz de datos obtuvo, excluyendo los caracteres no informativos, un índice de consistencia (CI) de 0.8560, un índice de homoplasia (HI) de 0.1440 y un índice de retención (RI) de 0.8994.

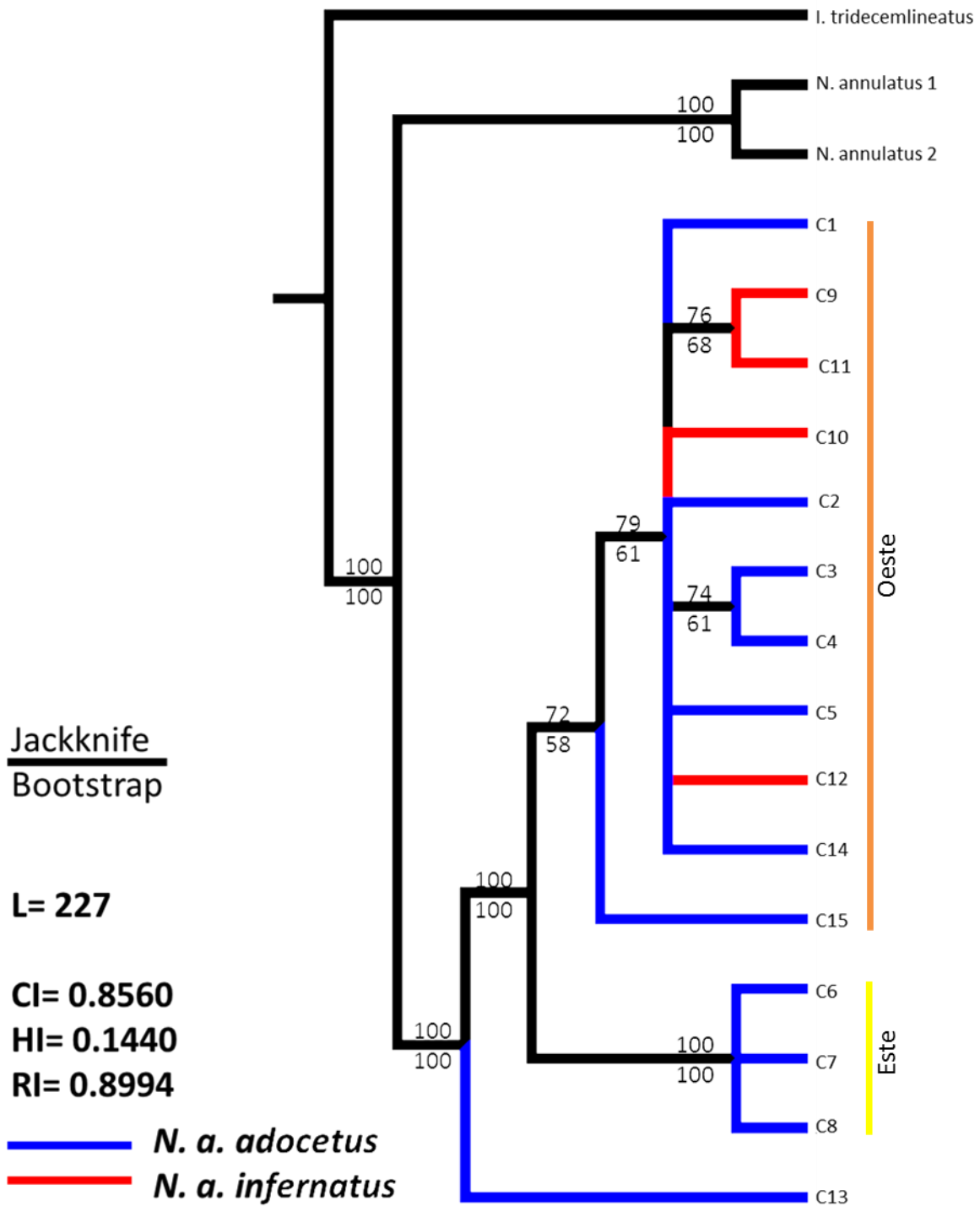


Figura 14. Consenso estricto usando solo los haplotipos aplicando el método de Parsimonia con el gen Citocromo b. L=longitud, CI= índice de consistencia, HI índice de homoplasi, RI=índice de retención. CI e HI excluyendo caracteres no informativos. Para ver detalles de los haplotipos referirse a la Tabla 9.

RAG1

En RAG1 resultado del alineamiento manual con los grupos externos se obtuvieron 35 secuencias, 31 del grupo interno y cuatro del grupo externo, con 781 nucleótidos, 34 de estos fueron variables y 12 fueron parsimoniosamente informativos. Las secuencias de los grupos externos para RAG1 se obtuvieron del Genbank (Ver Tabla 3), en el caso de *I. tricedemlineatus*, de la Colección Científica de Mamíferos de la UMSNH para *N. annulatus* 3 y de colecta en campo en la Mazanillera, Mich. caso de *N. annulatus* 1 y *N. annulatus* 2 (Ver Tabla 2). Igualmente en la matriz usada en la reconstrucción filogenética y los árboles, se usó como etiqueta para cada ejemplar el nombre de la población a la que pertenece y un número.

El análisis de Parsimonia usando todas las secuencias de RAG1, recuperó 336 árboles, con una longitud de 42 pasos. Se realizó un árbol de consenso estricto (Figura 15). Respecto de las medidas de ajuste, excluyendo los caracteres no informativos, se obtuvo un índice de consistencia (CI) 0.6500, índice de homoplasia (HI) de 0.3500 y uno de retención (RI) de 0.9544. El árbol de consenso estricto para RAG1 (Figura 15) muestra poca resolución, esto es de esperarse ya que generalmente los genes nucleares varían poco en comparación a los genes mitocondriales, y destaca que en algunos de los clados resueltos se mezclan individuos de las dos subespecies. Esto es, RAG1 tampoco recupera a las subespecies monofiléticas. El grupo que mantiene 11 individuos en una politomía, sin valores de soporte, contiene ejemplares tanto del Este (en su mayoría) y del Oeste mismos que representan a las dos subespecies. Se rescatan tres clados más, cada uno contiene dos ejemplares y otro con tres, pero todos colapsan en la base.

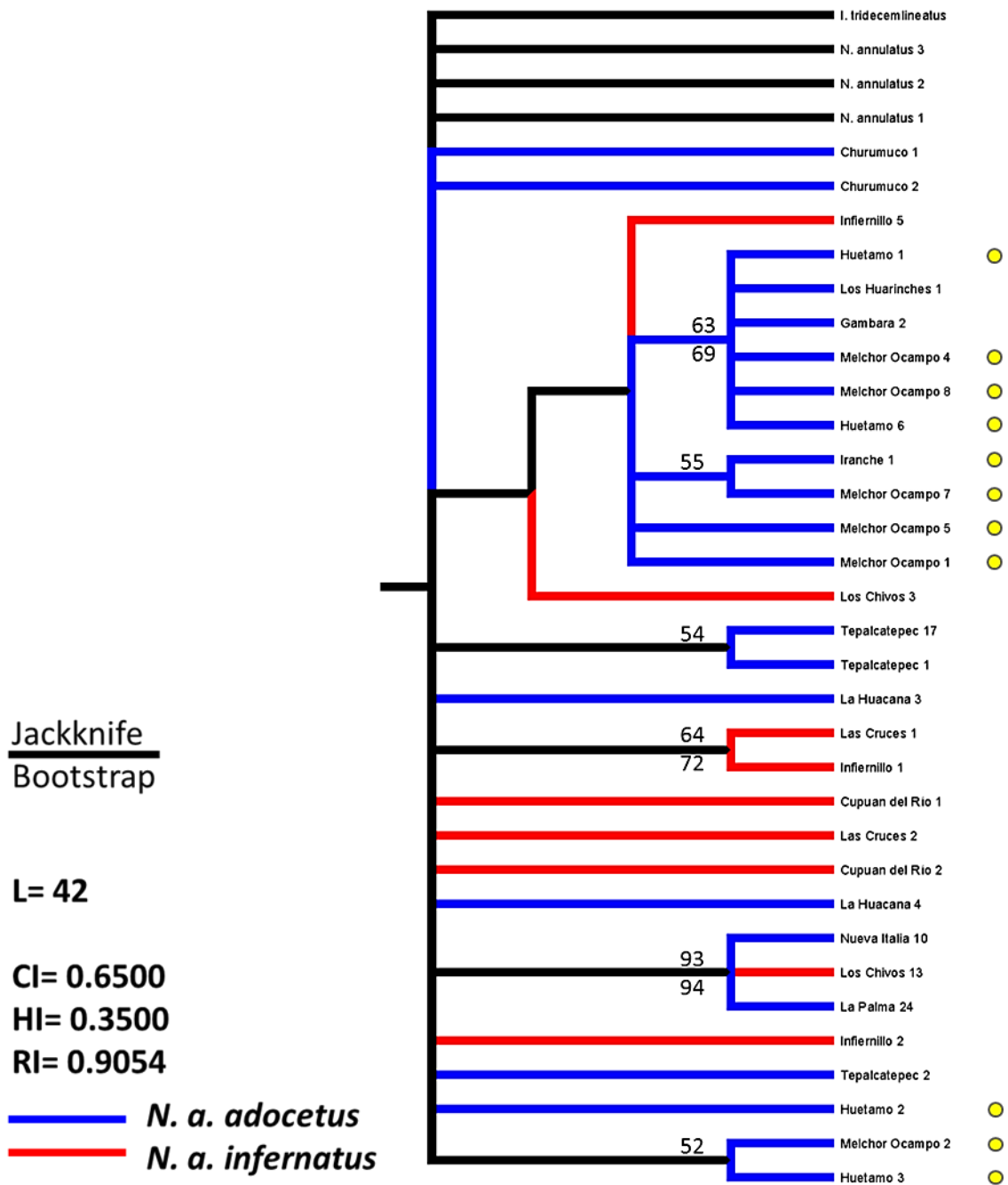


Figura 15. Consenso estricto usando el método de Parsimonia con el gen RAG1. L=longitud, CI= índice de consistencia excluyendo caracteres no informativos, HI índice de homoplasia excluyendo caracteres no informativos, RI=índice de retención. Se indican con círculos amarillos los ejemplares del Este, el resto son del Oeste.

De la búsqueda realizada sólo con los haplotipos de RAG1 sólo 7 caracteres fueron parsimoniosamente informativos y se recuperaron 332 árboles igualmente parsimoniosos, con una longitud de 42 pasos. Se realizó un consenso estricto (Figura 16).

El árbol de consenso está completamente colapsado en la base y sólo se recuperan dos grupos. El primero contiene tres haplotipos de *N. a. adocetus*, con representantes del Este y Oeste (R3, R4, R1), con un valor de soporte de Jackknife de 67, y uno del Oeste perteneciente a *N. a. infernatus* (R2). El R1 (línea verde) es un haplotipo compartido entre *N. a. adocetus* y *N. a. infernatus*. Y el otro grupo (R12 y R14), con valores de soporte de Jackknife y Bootstrap de 67, contiene haplotipos del Este. En el primer grupo se encuentran representantes de las dos subespecies. Esto es, RAG1 tampoco recupera monofiléticas a las subespecies. En este árbol es más evidente que los organismos que se consideran de subespecies diferentes comparten haplotipos (indicados en verde). Los valores de soporte de Jackknife y Bootstrap en general fueron relativamente bajos. Las medidas de ajuste de los datos que se obtuvieron son como sigue: índice de consistencia (CI) de 0.5333, índice de homoplasia (HI) de 0.4667 y un índice de retención (RI) de 0.6957, esto excluyendo los caracteres no informativos.

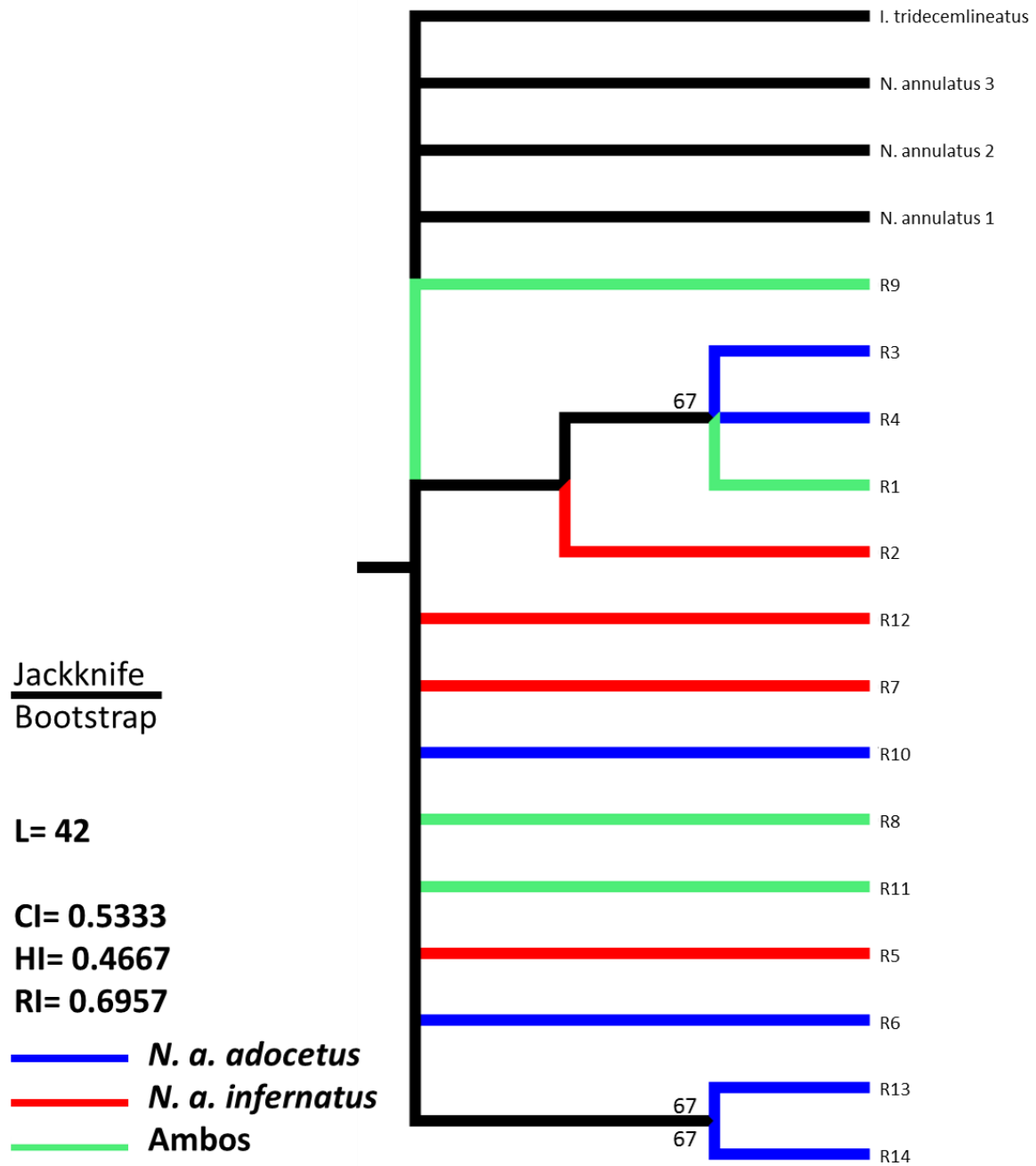


Figura 16. Consenso estricto usando solo los haplotipos de RAG1 aplicando el método de Parsimonia. L=longitud, CI= índice de consistencia, HI índice de homoplasia, RI=índice de retención. CI e HI excluyendo caracteres no informativos. Para ver detalles de los haplotipos referirse a la Tabla 10.

Concatenados

El análisis de los genes concatenados (*Citb* y *RAG1*) se realizó con 34 secuencias, 31 del grupo interno y tres del grupo externo. Las secuencias de los grupos externos se obtuvieron del Genbank (Tabla 3) y de los organismos colectados (Ver Tabla 2). El total de caracteres en la matriz de datos fue de 1588 nucleótidos, de los cuales 236 fueron variables y 117 fueron parsimoniosamente informativos.

La búsqueda heurística realizada recuperó seis árboles igualmente parsimoniosos de 282 pasos. Se realizó un consenso estricto (Figura 17). Respecto de las medidas de ajuste, al excluir los caracteres no informativos, se obtuvo un índice de consistencia (CI) de 0.7607, un índice de homoplasia (HI) de 0.2393 y un índice de retención (RI) de 0.8929.

En el árbol de consenso estricto se observan dos clados principales, en el primero de los clados, clado Oeste, destaca que las secuencias de las dos subespecies se mezclan, ya que se encuentran en este clado organismos que se consideran *N. a. adocetus* y *N. a. infernatus*. En el segundo clado, clado Este, se observa que se recuperan exclusivamente organismos de las poblaciones del Este; Huetamo, Melchor Ocampo e Iranche. Cabe destacar que el árbol presenta en su mayoría clados con altos valores de Jackknife y Bootstrap y que los clados con las medidas de soporte más bajas no son inferiores a 54. De tal suerte que la reconstrucción filogenética con Parsimonia usando información mitocondrial y nuclear combinadas, tampoco recupera a las subespecies como monofiléticas.

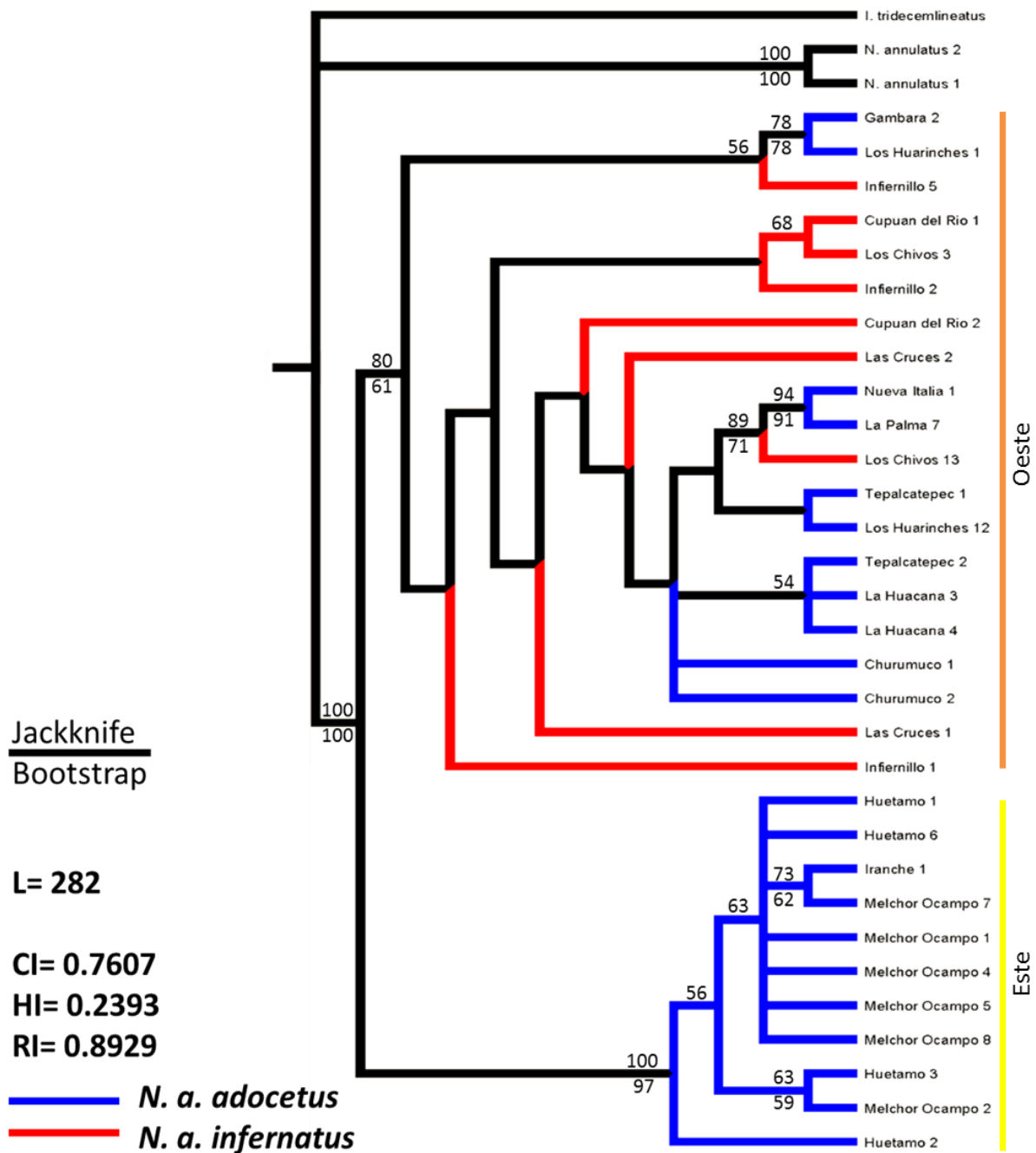


Figura 17. Consenso estricto usando el método de Parsimonia con los genes Citocromo b y RAG1 concatenados. L=longitud, CI= índice de consistencia excluyendo caracteres no informativos, HI índice de homoplasia excluyendo caracteres no informativos, RI=índice de retención.

5.5.2 Tiempos de divergencia de *Citb*

El análisis en JModelTest 2.0 determinó que el modelo que se ajusta mejor a las secuencias de *Citb* con base en el Criterio de Akaike es TIM2+I, con un valor de $-\ln L = 2054.2678$. El modelo de evolución molecular TIM1 tienen seis parámetros libres, frecuencias de bases desiguales y tasas de sustitución AC=AT; CG=GT; AG; CT (Posada, 2008).

Para calcular los tiempos de divergencia, se utilizó el modelo de evolución nucleotídica TN93 (Tamura y Nei, 1993) ya que este fue el más similar, de los disponibles en BEAST v1.6.2, al estimado previamente por JModelTest 2.

El análisis de tiempos de divergencia recupera el mismo patrón general que el análisis de Parsimonia con *Citb* y con los datos concatenados, los ejemplares de las poblaciones del Oeste en un clado mientras que los ejemplares de las poblaciones del Este en otro clado. Se estimó un tiempo de divergencia (con un intervalo de confianza del 95%) de 0.3218 a 1.0942 millones de años (MA) para el nodo que indica la separación en Este y Oeste de las poblaciones de *N. adocetus* (Figura 18). La edad calculada para el nodo en el que coalescen las poblaciones del Oeste fue de 0.1554 – 0.5858 MA. Mientras que, el nodo en el que coalescen las poblaciones del Este es el más reciente ya que data de hace 0.0183 – 0.1995 MA.

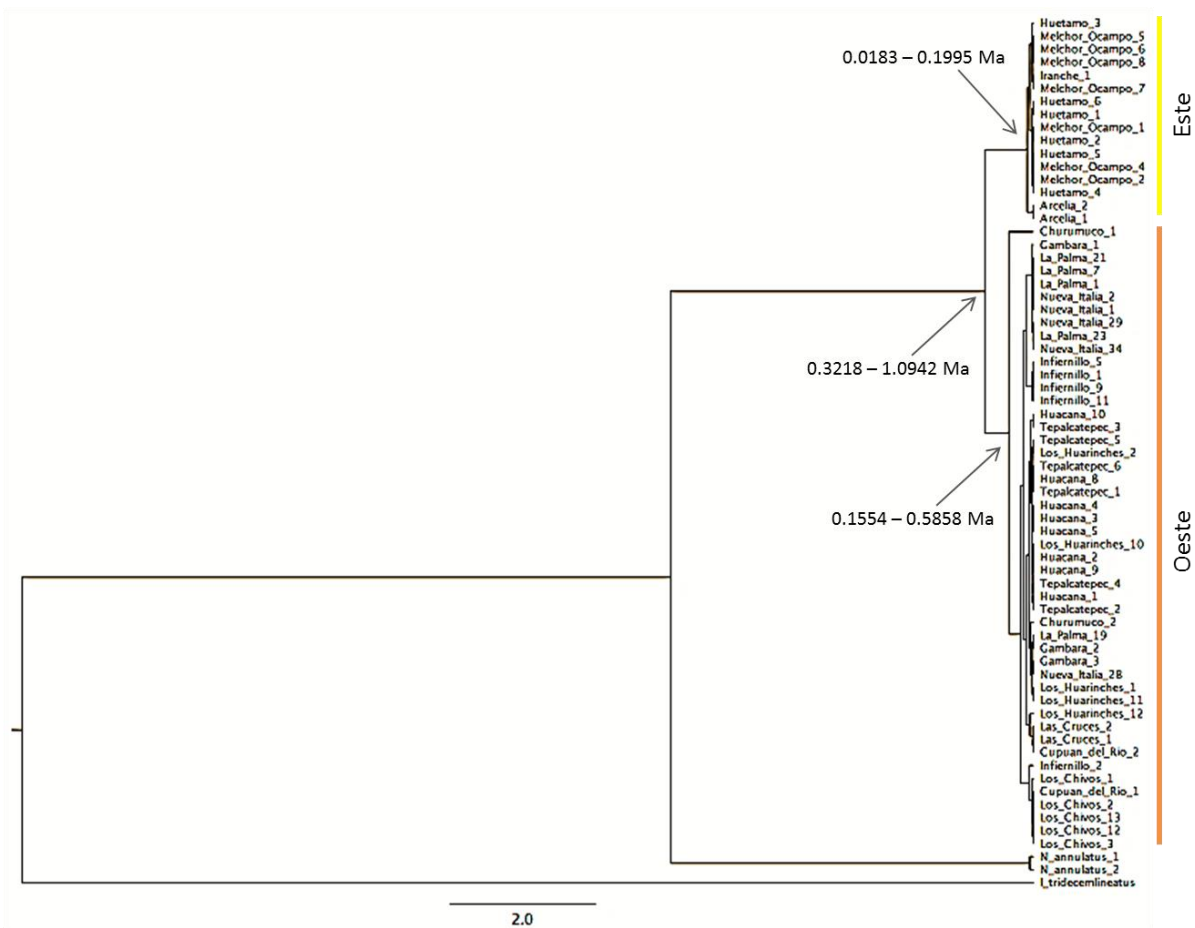


Figura 18. Tiempos de divergencia de los clados principales con *Citb* mediante un análisis bayesiano de coalescencia.

5.5.3 Análisis de distancias Neighbor-joining

Citocromo b

En el árbol de NJ con *Citb* (Figura 19) encontramos que se recuperan los mismos clados internos que en los análisis de Parsimonia. De manera general el árbol se divide en dos grandes clados, el clado Oeste con 92 de soporte de Bootstrap y el clado Este con 99 de soporte de Bootstrap. El clado Oeste, incluye a todos los organismos de las poblaciones del Oeste de *N. a. adocetus* mezclados con los ejemplares de *N. a. infernatus*, estos últimos se recuperan en tres clados internos. En el clado Este por su parte, se ubican los ejemplares de las poblaciones del Este; Huetamo, Melchor Ocampo, Iranche y Arcelia. De manera que no se recuperan las dos subespecies en clados independientes y separados, sino que se

recuperan más bien como más cercanos genéticamente los ejemplares de las dos subespecies que los organismos del Este y Oeste de la subespecie *N. a. adocetus*.

La distancia genética p (p-distance) entre las poblaciones de *N. a. adocetus* (Norte) y *N. a. infernatus* (Sur) fue de 0.84%. Mientras que la distancia entre las poblaciones del Este y Oeste resultó de más del doble con 1.77 % de distancia.

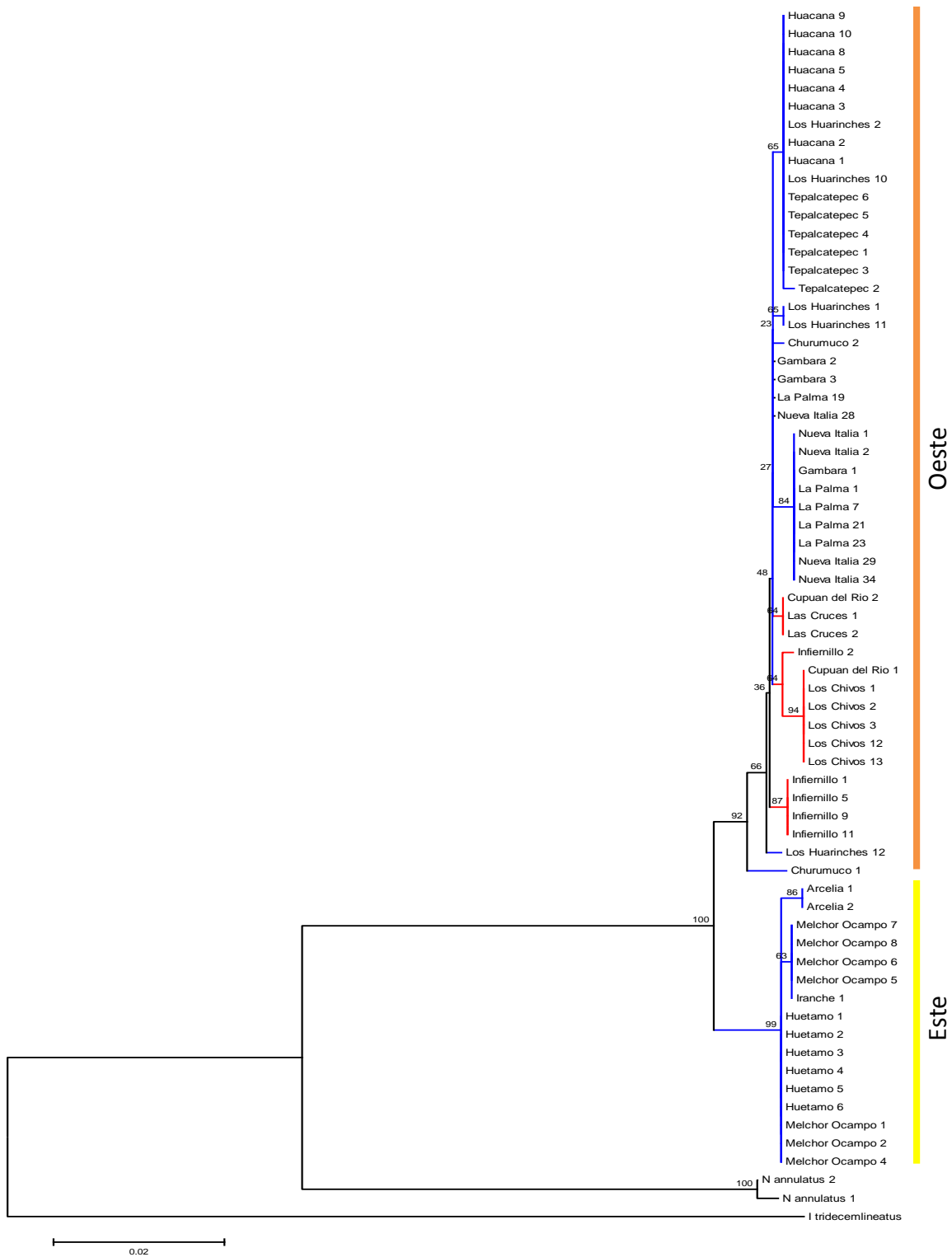


Figura 19. Árbol de NJ con el gen Citocromo b. Se indican las subespecies reconocidas *N. a. infernatus* en rojo y *N. a. adocetus* en azul. La escala indica distancias genéticas p (p-distance). Se indican los valores Bootstrap.

RAG1

En el árbol de NJ con RAG1 (Figura 20), también se observa que individuos de *N. a. adocetus* y *N. a. infernatus* (Norte y Sur, respectivamente) se mezclan. De igual manera se observa que en un solo clado se mezclan organismos de las poblaciones del Este y Oeste. En general los valores de Bootstrap fueron muy bajos, a excepción del grupo que sostiene a representantes de Nueva Italia, Los Chivos y la Palma que tuvieron un valor de 97 de Bootstrap. Resalta el hecho de que la distancia genética (1.11%) entre las poblaciones de *N. adocetus* y su grupo externo (*N. annulatus*) es muy corta, comparado con el árbol de NJ obtenido de las secuencias mitocondriales (*Citb*).

Los datos de distancias genéticas p (p-distance) entre subespecies, poblaciones Norte y Sur, fueron de 0.48%. Mientras que la distancia genética entre Este y Oeste fue mayor, con un valor de 0.56%.



Figura 20. Árbol de NJ con el gen RAG1. Se indican las subespecies reconocidas *N. a. infernatus* en rojo y *N. a. adocetus* en azul. La escala indica distancias genéticas p (p-distance). Se indican los valores Bootstrap. Se indican con círculos amarillos los ejemplares del Este, el resto son del Oeste.

Concatenados

Al combinar la evidencia mitocondrial con la nuclear, se recuperó un árbol de NJ en donde se observa claramente los dos grupos de Este y Oeste (Figura 21) como previamente fue

señalado en los análisis de Parsimonia con los datos concatenados. El clado Oeste mantuvo mezclados a todos los ejemplares de las poblaciones del Oeste de *N. a. adocetus* con los ejemplares de *N. a. infernatus*. Este clado tuvo un valor alto (91) de soporte de Bootstrap. Por otra parte en un clado independiente con 99 de soporte de Bootstrap, se ubicó el clado Este, en donde se observan a los ejemplares de *N. a. adocetus* del Este. Por lo tanto, este análisis tampoco recupera en clados independientes a las dos subespecies.

La distancia genética p (p-distance) entre las poblaciones de *N. a. adocetus* (Norte) y *N. a. infernatus* (Sur) fue de 0.76%. Mientras que la distancia entre las poblaciones del Este y Oeste resultó 50% mayor, con un valor de 1.14 %.

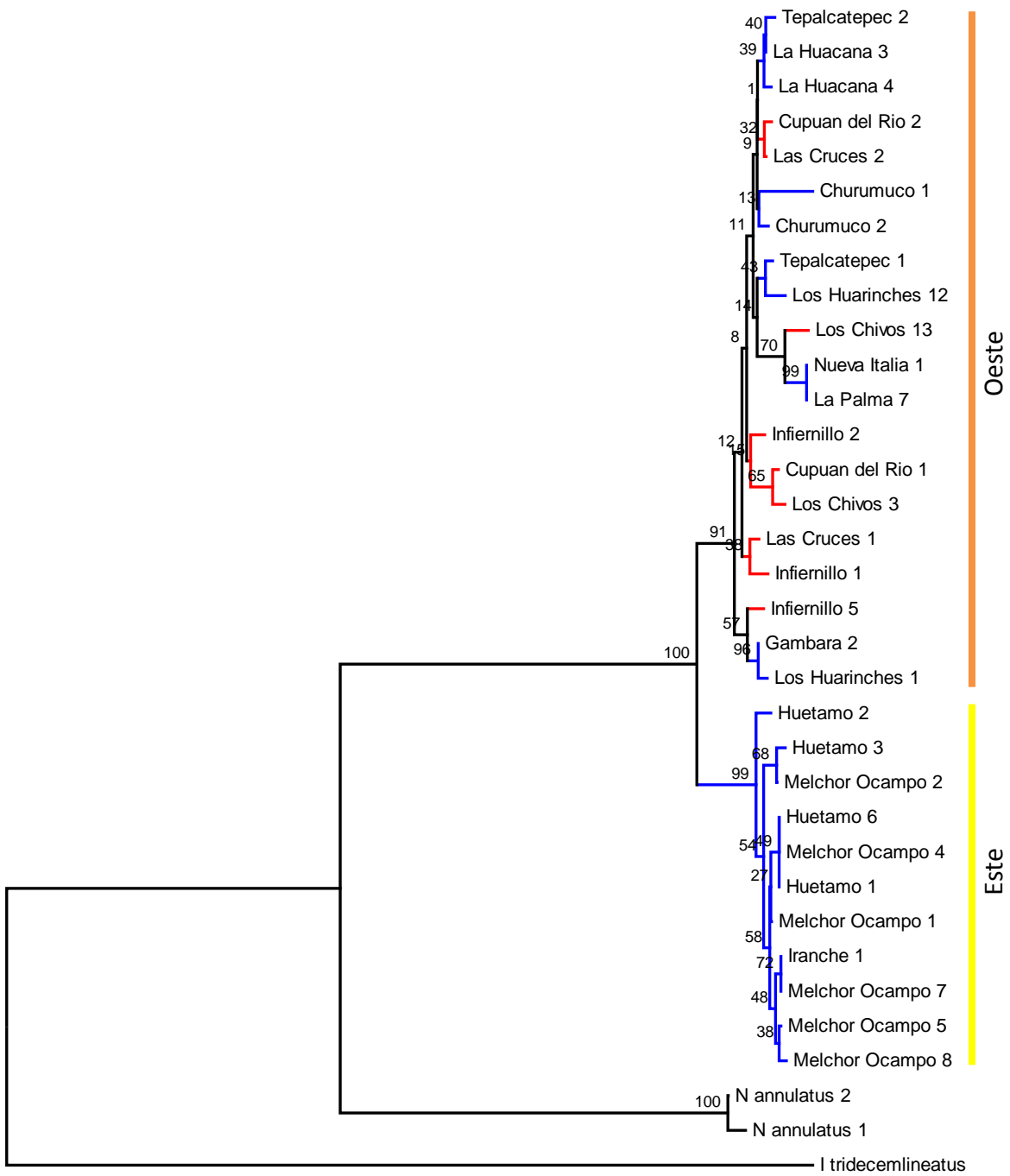


Figura 21. Árbol de NJ con los genes Citocromo b y RAG1 concatenados. Se indican las subespecies reconocidas *N. a. infernatus* en rojo y *N. a. adocetus* en azul. La escala indica distancias genéticas p (p -distance). Se indican los valores Bootstrap.

6. DISCUSIÓN

6.1 Método de conservación de las muestras de tejidos

El haber obtenido los mejores resultados en las extracciones de ADN usando musculo conservado en sal, respecto de otros métodos de conservación, resultó ser muy relevante ya que nos indica que basta con llevar sal para conservar el tejido y que no se requiere de dispositivos especializados ni de llevar grandes cantidades de equipo para preservar las muestras de los ejemplares capturados o de organismos que se encontraron atropellados y que sirvieron para este trabajo, algo importante dado la logística para ir a campo y la situación de riesgo existente en el área de colecta. Siendo esto importante para cualquier trabajo que involucre coleccionar muestras de músculo de mamíferos en áreas conflictivas.

6.2 Número de secuencias

Al comparar el número de individuos que se obtuvieron entre las colectas y donaciones, 106 ejemplares, con el número de secuencias obtenidas de ellos para *Citb*, 62 secuencias, es evidente que no se obtuvieron secuencias de todos los ejemplares (Anexo I), esto se debe a que hubo un par de esfuerzos de secuenciación de los que no se obtuvieron resultados exitosos. Sin embargo, se tienen secuencias de todas las poblaciones colectadas y se tienen al menos cinco ejemplares por población cuando la cantidad de ejemplares obtenidos de cada población lo permitió, en caso de que se tuvieran menos de cinco ejemplares de una población se secuenciaron todos.

En el caso de RAG1 se secuenciaron solo 31 ejemplares (Anexo I), al menos uno por población y por haplotipo mitocondrial encontrado, ya que generalmente los genes nucleares varían menos (Brown, 1979), que los mitocondriales. A pesar de esto, se

considera que la selección de muestras para secuenciar fue adecuada dado que se representó la variación geográfica y fue posible combinar la evidencia mitocondrial y nuclear. Además, a pesar de contar con una muestra pequeña de la evidencia nuclear fue posible reconstruir la historia y tener el patrón de variación genético tanto mitocondrial como nuclear.

6.3 Diversidad y estructura genética

6.3.1 Diversidad genética

La comparación de los valores de diversidad haplotídica (h) entre marcadores moleculares, muestra que para los dos genes la h es alta en todas las regiones geográficas con valores de 0.608- 0.848 en *Citb* (Tabla 7) y de 0.855- 0.972 para RAG1 (Tabla 8). Cabe mencionar que RAG1 tiene más poblaciones con valores altos de h , ocho poblaciones en comparación de las cinco en *Citb*. El hecho de que haya valores ligeramente más altos de h en RAG1, tanto en las poblaciones como por regiones geográficas, tiene que ver con que hay más diversidad en RAG1 ya que cuenta con 14 haplotipos en 31 secuencias, mientras que *Citb* cuenta casi con el mismo número de haplotipos, 15 haplotipos, en poco más del doble de secuencias, 64 secuencias.

Concretamente para las regiones geográficas, la mayor h la exhibe la región Sur en RAG1 y la región Oeste en *Citb*, esto debido en parte a que son las áreas que presentan el mayor número de haplotipos en cada uno de los genes (Figuras 7 y 8) y a que el hábitat en esta área presenta mejores condiciones como se pudo constatar en campo. Mientras que se observa menos h para la región Este tanto en *Citb* como en RAG1, esto podría deberse a que es el área con menor número de haplotipos en los dos genes y a que las poblaciones del Este están en una zona más alta y pudieron estar expuestas a mayores impactos de cambio climático y cambios de vegetación. Además se observó que las poblaciones del Este se encuentran en zonas con hábitat naturalmente más fragmentado, es decir hay más

discontinuidades de hábitat en comparación de la zona Oeste donde es un valle continuo con la misma vegetación y altitud, y se ha documentado que la fragmentación y discontinuidad de hábitat disminuyen la diversidad en ardillas (Ochoa *et al.*, 2012) en comparación con ardillas que no tienen hábitat fragmentado (Trizio *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2005).

Respecto de la diversidad nucleotídica (π), se observa que no coinciden en las mismas poblaciones los valores altos de π en los dos genes, en *Citb* la π fue alta en la población de Churumuco y en la región geográfica Norte, mientras que en RAG1 la π fue alta solo en la población de Los Chivos. Para el caso de *Citb*, en Churumuco el valor alto de π tiene que ver con que en esta población se encuentran los dos haplotipos privados que tienen más cambios de nucleótidos, mientras que el valor alto de π en la región Norte está relacionado con que es la región que tiene el mayor número de haplotipos además que existe entre ellos la mayor cantidad de cambios de nucleótidos respecto de las otras regiones (se ilustra en Figuras 7 y 9). Para el caso de RAG1 el valor alto de π en Los Chivos tiene que ver con que uno de los dos haplotipos presentes en la población es privado y el otro es el que más cambios nucleotídicos tiene (se ilustra en Figuras 8 y 10).

6.3.2 Redes de haplotipos

Al comparar los haplotipos que se comparten entre poblaciones y regiones geográficas por gen, destaca que RAG1 comparte más haplotipos que *Citb* entre las poblaciones y regiones geográficas. En *Citb* se observan de uno o dos haplotipos en cada población y solo en una población tres haplotipos y estos haplotipos se comparten solo entre poblaciones muy cercanas y nunca entre regiones geográficas (Figura 7), mientras que en RAG1 se observan de uno a cuatro haplotipos por población y estos haplotipos se comparten entre poblaciones cercanas y lejanas así como entre regiones geográficas (Figura 8).

En las redes de haplotipos, por otro lado los haplotipos ancestrales que sugiere TCS en la red de *Citb* y RAG1 no se ubican en las mismas poblaciones, para el gen *Citb* es C1

presente en las poblaciones de Gámbara, La Palma, y Nueva Italia (Tabla 9), todas estas poblaciones del Oeste ubicadas al norte del río Tepalcatepec, mientras que para RAG1 el haplotipo ancestral es R1 presente en las poblaciones de Melchor Ocampo e Infiernillo, R1 es un haplotipo compartido entre poblaciones del Este (*N. a. adocetus*) y Sur (*N. a. infernatus*) (Tabla 10), sin embargo estos dos haplotipos si coinciden en ser el haplotipo que dio origen a las poblaciones del Sur en los dos genes (Figuras 9 y 10). Es importante destacar que en los árboles los clados internos coinciden con los haplotipos que reporta la red de haplotipos.

Las redes de haplotipos indican que los ejemplares de las poblaciones del Oeste de *N. a. adocetus* son más cercanos a *N. a. infernatus* que a los propios ejemplares de *N. a. adocetus* de las poblaciones del Este. Y existen muchos más pasos mutacionales, en la red de haplotipos de *Citb*, entre las poblaciones de *N. a. adocetus* del Este y Oeste que los que existen entre los ejemplares de *N. a. adocetus* del Oeste y los de *N. a. infernatus* mientras que en la red de haplotipos con RAG1 existen dos veces más haplotipos compartidos entre las poblaciones del Sur y el Oeste que entre las del Este y Oeste o el Sur y Este.

Las diferencias que existen entre las redes de haplotipos del gen *Citb* y RAG1 no son algo atípico, ya que se ha visto que existen diferencias entre genes mitocondriales y nucleares entre las aproximaciones filogeográficas en vertebrados. Se ha reportado por ejemplo que las redes de haplotipos de RAG1 no coinciden, o lo hacen parcialmente, con las redes de genes mitocondriales. Sin embargo, cuando coinciden parcialmente las redes de RAG1 y mitocondriales se observan haplotipos compartidos entre poblaciones cercanas y alejadas (Barata *et al.*, 2012), o incluso haplotipos anidados con los de especies hermanas (Timpe *et al.*, 2009).

Aunado a lo anterior se ha reportado que los marcadores moleculares nucleares como RAG1, presentan menor variación nucleotídica y un menor número de haplotipos en comparación con los marcadores mitocondriales (Timpe *et al.*, 2009; Barata *et al.*, 2012; Hauswaldt *et al.*, 2014).

6.3.3 Estructura genética y barreras geográficas.

Los valores globales de diferenciación genética mitocondrial y nuclear de *N. adocetus* fueron altos (mitocondrial $\Phi_{ST} = 0.88967$ y nuclear $\Phi_{ST} = 0.41123$) en comparación con valores de *Xerospermophilus perotensis* (mitocondrial $F_{ST} = 0.499$ y nuclear $F_{ST} = 0.060$) y *Sciurus vulgaris* (mitocondrial $F_{ST} = 0.100$ y nuclear $F_{ST} = 0.04$) especies que sufren de fragmentación o discontinuidad de hábitat (Trizio *et al.*, 2005; Ochoa *et al.*, 2012). Los valores de diferenciación genética mitocondrial más similares a los encontrados en este trabajo son los reportados en poblaciones de *Sciurus vulgaris hoffmanni* que no presentan fragmentación en su hábitat ($F_{ST} = 0.71077$), en este caso Lucas y Galián (2009) atribuyeron esta alta diferenciación al aislamiento geográfico.

El AMOVA entre las subespecies reconocidas *N. a. adocetus* y *N. a. infernatus*, poblaciones del Norte y poblaciones del Sur respectivamente, con *Citb* mostraron valores altos de diferenciación ($\Phi_{ST} = 0.22522$), mientras que con RAG1 el análisis no fue significativo entre las subespecies. Por su parte los valores de diferenciación entre Este y Oeste coinciden al ser muy altos tanto con *Citb* ($\Phi_{ST} = 0.83870$), como con RAG1 ($\Phi_{ST} = 0.32463$). Cabe destacar que los valores de diferenciación genética con *Citb* entre Este y Oeste son al menos tres veces más grandes en orden de magnitud que entre subespecies.

Respecto de los valores de flujo génico (Nm) cabe destacar que entre las subespecies reconocidas *N. a. adocetus* y *N. a. infernatus* existe flujo génico tanto con *Citb* como con RAG1, aunque el valor para RAG1 es casi cuatro veces mayor. Mientras que entre las poblaciones del Este y Oeste no existe flujo génico con *Citb* pero sí con RAG1, aunque apenas alcanza el valor de uno, y es por lo menos seis veces menor que el valor de flujo génico que existe entre las subespecies con este marcador.

De manera que los resultados de los AMOVAS y el flujo génico sugieren que podría haber una barrera geográfica entre las poblaciones del Este y Oeste mucho más fuerte que lo que

podría ser el Río Tepalcatepec ya que existe más diferenciación y menor flujo génico entre estas poblaciones que entre las del Norte y el Sur (subespecies). No es de extrañar que el Río Tepalcatepec no funcione como una barrera efectiva ya que por ejemplo el Río Danubio, río más grande y caudaloso, no funcionó como una barrera histórica para las poblaciones de la ardilla *Spermophilus citellus* según un análisis con *Citb* (Kryštufek *et al.*, 2009). Además, el Río Tepalcatepec tampoco funciona como una barrera para poblaciones de otras especies de mamíferos como *Odocoileus virginianus* según un análisis de ADNmt (Ambriz-Morales, 2009).

Por esta razón se vuelven muy relevantes los resultados del SAMOVA para *Citb*, ya que el máximo porcentaje de variación se encontró al formar dos grupos que coinciden con la separación del Este y Oeste. Adicionalmente el análisis que permite inferir la existencia de barreras geográficas sugiere la existencia de una barrera entre estos dos grupos, Este y Oeste, y al empalmar el resultado del análisis sobre el mapa coincide con una elevación montañosa perteneciente al Cinturón Volcánico Transmexicano (CVTM) (Figura 12), este brazo del CVTM se prolonga hacia la Depresión del Balsas de norte a sur en su parte media (Figura 6 o 12).

Esta elevación montañosa que forma parte del CVTM se ubica a la derecha de las poblaciones de La Huacana y arriba de las de Churumuco (ver Figura 7 y/o 8) y supera los 1500 msnm (Figura 6), altitud a la que no se conoce se haya establecido alguna población silvestre de cuiniques o existan condiciones ambientales o climáticas para que se establezcan. Tal elevación montañosa se puede apreciar en la Figura 9 indicada con una línea punteada y en la Figura 6 y 7 se observa delimitado el CVTM.

El CVTM ha tenido alta actividad desde su origen hasta la actualidad y se ha sugerido que se limita al Cuaternario, estudios recientes y detallados muestran que se pudo haber formado a partir de dos eventos volcánicos: el primero, en el que surge el CVTM, en el Mioceno Tardío hace aproximadamente 16 a 26 MA, y el segundo evento en el Plioceno-Pleistoceno (~5 - 2 MA) (Carrasco- Núñez *et al.*, 1997; Garduño-Monroy *et al.*, 2009;

Ferrari *et al.*, 2011). Mientras que la actual configuración de la depresión del Balsas está dada por varios eventos, con un origen probable en el Cretácico Inferior (~99-140 MA) (López-Ramos, 1981; Ferrari *et al.* 2002; Gómez-Tuena *et al.* 2005). De tal suerte que la depresión del Balsas es mucho más antigua que el CVTM, de manera que *N. adocetus* pudo haberse distribuido a lo largo y ancho de la depresión del Balsas teniendo las condiciones ambientales y climáticas para que así fuera, y el CVTM venir a formar una barrera geográfica posteriormente ya que terminó de formarse en el Plioceno-Pleistoceno (~5 – 2 MA), así como una barrera por discontinuidad de hábitat por las especies de flora que se establecieron en el CVTM, que no sirven de alimento para *N. adocetus*, y una barrera climática. Esta hipótesis apoyaría los resultados de los AMOVAS, SAMOVA y resultados que más adelante se discuten.

6.4 Inferencia filogenética

6.4.1 Aproximaciones filogenéticas con *Citb*

En los árboles de *Citb* de Parsimonia y NJ se observa claramente que no se recuperan como monofiléticas a las subespecies reconocidas sensu Hall, 1981. En todos los árboles de *Citb* vemos el mismo patrón que en las redes de haplotipos, los ejemplares de las poblaciones de *N. a. adocetus* del Oeste más cercanos a los de las poblaciones de *N. a. infernatus* y en un mismo clado, mientras que los ejemplares de poblaciones de *N. a. adocetus* del Este en un clado independiente. De manera que en todos los árboles de *Citb* y de genes concatenados se recuperan dos clados principales que se denominaron Este y Oeste (indicados en naranja y amarillo en las Figuras 13, 14, 17, 19 y 21) clados que presentan altos valores de soporte de Bootstrap y Jackknife en Parsimonia y de Bootstrap en NJ.

El que se recuperen dos clados bien soportados, con información mitocondrial, dentro de una especie es un patrón que se ha visto en otros mamíferos, por ejemplo en la especie de primate *Callicebus lugens*, se recuperan dos clados determinados por el Rio Negro como

una barrera geográfica natural (Casado *et al.*, 2007). Mientras que en la ardilla *Otospermophilus beecheyi* se recuperan tres clados que corresponden cada uno a una región geográfica de la distribución, además de que en uno de estos clados, el clado sur, se anidan las ejemplares de su especie hermana *O. atricapillus*, de manera que proponen tratarlas como una sola especie *O. beecheyi* (Álvarez-Castañeda y Cortés-Calva, 2011). Otro caso es el de las especies de marsupiales *Monodelphis brevicaudata* y *M. domestica* donde se recuperan dos clados para cada especie, evidenciando dos regiones geográficas y dos biomas (Carvalho *et al.*, 2011). Por otra parte en el ratón africano *Praomys misonnei* se presentan dos clados que han sido delimitados por una línea volcánica que impedía el intercambio entre las poblaciones (Nicolas *et al.*, 2012).

6.4.2 Tiempos de divergencia de *Citb*

El árbol de *Citb* (Figura 18) con las estimaciones de tiempos de divergencia (0.3218 a 1.0942 MA) entre Este y Oeste indican que esta separación fue posterior a que terminara de formarse el CVTM estimada en ~5 a 2 MA (Carrasco- Núñez *et al.*, 1997; Garduño-Monroy *et al.*, 2009; Ferrari *et al.*, 2011), y que generó probablemente una barrera geográfica y posteriormente climática, esto debido a que la aparición de una elevación montañosa genera cambios de temperatura en las partes altas, así como cambios de vegetación o humedad relativa, factores que se sabe son limitantes (Cox y Moore, 2010). Lo anterior refuerza el hecho de que el CVTM es la barrera que separa a las poblaciones de cuinique más que el río Tepalcatepec. Las poblaciones del clado Oeste están aisladas desde hace 0.1554- 0.5858 MA, mientras las poblaciones del Este hace 0.0183- 0.1995, según *Citb*.

6.4.3 Aproximaciones filogenéticas con RAG1

Tampoco en ninguno de los árboles con RAG1 con las diferentes metodologías de inferencia filogenética se observa que se recuperen monofiléticas a las subespecies. Pero a diferencia de *Citb* no se recuperan los dos clados Este y Oeste de manera tan clara.

En el árbol de RAG1 mediante Parsimonia (Figura 15) se recuperan a los ejemplares de poblaciones de *N. a. infernatus* mezclados en una politomía mayormente con ejemplares de *N. a. adocetus* del Oeste. Por otra parte se forma un clado con la mayoría de los ejemplares de *N. a. adocetus* del Este junto con solo uno de los ejemplares de *N. a. infernatus*. Esto refuerza lo visto en las redes de haplotipos, en donde, claramente, se observan haplotipos compartidos entre Norte y Sur.

Mientras que el árbol de NJ de RAG1 (Figura 20), muestra dos cladogramas principales uno que incluye a la mayoría de los organismos de *N. a. infernatus*, excepto dos, junto con la mayoría de los ejemplares de *N. a. adocetus* del Oeste, excepto dos, y uno de *N. a. adocetus* del Este. En el otro clado se observan todos los ejemplares, excepto uno, de *N. a. adocetus* del Este con dos de *N. a. infernatus* y dos de *N. a. adocetus* del Oeste. Es decir el mismo patrón que se ha visto con anterioridad, la mayoría de los ejemplares de *N. a. adocetus* del Oeste con la mayoría de los ejemplares de *N. a. infernatus* en un clado, y en otro clado los ejemplares de *N. a. adocetus* del Este, excepto uno.

6.4.4 Aproximaciones filogenéticas concatenadas

Los árboles de Parsimonia y NJ de los dos genes concatenados (Figuras 17 y 21) muestran mayor poder de resolución y congruencia, esto debido a que se incrementa el número de caracteres informativos, de tal suerte que en los árboles de genes concatenados no se recuperan como monofiléticas a las dos subespecies. Los árboles con genes concatenados recuperan dos grandes cladogramas, en el primer clado se recuperan los ejemplares de las poblaciones de *N. a. infernatus* y *N. a. adocetus* del Oeste, clado Oeste, mientras que en el segundo clado se recuperan exclusivamente ejemplares de las poblaciones del Este, clado Este. Esto demuestra que la información mitocondrial y nuclear concatenadas indican una separación de las poblaciones en Este y Oeste, resultado similar al análisis con redes de haplotipos.

6.4.5 Distancias genéticas

Respecto del análisis de distancia a partir de NJ, las distancias genéticas p con *Citb* entre las poblaciones de *N. a. adocetus* y *N. a. infernatus* (0.84%) fueron de menos de la mitad que la distancia entre las poblaciones del Este y Oeste (1.77 %). De manera que las distancias genéticas indican también que existe mayor diferencia entre las poblaciones del Este y Oeste que entre las subespecies. Sin embargo es importante resaltar que aunque se encuentran en clados independientes las poblaciones del Este y Oeste, o existe monofilia en el caso de Parsimonia entre estas poblaciones, este grado de diferenciación genética se encuentra por debajo de los mínimos reportados para especies hermanas de mamíferos (6.4%; Avise *et al.*, 1998), especies del género *Sciurus* (4.9%; Oshida y Masuda, 2000), especies voladoras de ardillas (2.4%; Oshida *et al.* 2000a), o especies asiáticas del género *Petaurista* (3.8%; Oshida *et al.*, 2000b). Sin embargo Harrison *et al.*, (2003), han reportado valores entre 1 - 18.3% de diferenciación genética entre especies del género *Spermophilus* sensu Hall (1981).

Para los análisis de distancia a partir de NJ con RAG1 y con los genes concatenados, *Citb* y RAG1, entre las poblaciones de *N. a. adocetus* y *N. a. infernatus* (con RAG1 0.48%. y concatenados 0.76%) el valor fue menor también, en comparación al valor de distancia entre las poblaciones del Este y Oeste (con RAG1 0.56%. y concatenados 1.14 %) en ambos casos. Estos resultados caen dentro de lo reportado en otros vertebrados, por ejemplo Farias y Hrbek (2008), obtuvieron distancias no corregidas, para una matriz concatenada de genes nucleares y mitocondriales, que van de 0.50% a 4.11% en peces. A pesar de estos valores los autores concluyeron que *Symphysodon* está en proceso de diversificación.

6.4.6 Clados y barreras

Finalmente, todos los análisis de inferencia filogenética realizados con *Citb* y datos concatenados indican claramente que existen dos clados: uno Este y otro Oeste. Esto no ocurre con RAG1 (ver Figuras 15 y 20). Este resultado se atribuye a que existen haplotipos

compartidos entre Este y Oeste en RAG1. El que se recuperen en clados diferentes los ejemplares del Oeste y el Este puede deberse a la elevación montañosa, perteneciente al CVTM que se encuentra entre estas poblaciones y que representan una barrera geográfica y climática como se mencionó anteriormente. Es importante resaltar que como se mencionó en la sección de Introducción, *Notocitellus adocetus* se distribuye exclusivamente en la Depresión del Balsas donde las elevaciones no sobrepasan los 1000 msnm y como se puede ver en la Figura 6, la elevación montañosa perteneciente al CVTM que se extiende hacia la Depresión del Balsas y que se encuentra entre las poblaciones Este y Oeste tiene altitudes superiores a los 1500 msnm.

6.4.7 Comparación con datos morfométricos

Como se ha visto ninguno de los métodos de inferencia filogenética, sea por particiones separadas o concatenadas, recupera como monofiléticas a las subespecies. Es importante mencionar que al igual que con los caracteres moleculares, el análisis de la variación morfométrica en poblaciones de las subespecies de *N. adocetus* mediante 13 caracteres morfométricos del cráneo y cuatro medidas corporales (Sánchez-Suárez, 2012), tampoco recuperó a las dos subespecies como monofiléticas.

6.5 ¿Citb y RAG1 dos historias?

Para las diferencias que existen entre *Citb* y RAG1 en las redes de haplotipos y árboles, la posible explicación podría ser el pequeño tamaño de muestra que se utilizó para RAG1 y el flujo de genes mediado por sexo, en donde los machos parecieran estar migrando entre poblaciones mientras las hembras no lo hacen y no comparten haplotipos.

Lo anterior dado que en las ardillas terrestres los machos son los que tienden a dispersarse más como sugieren varios estudios compilados por Nunes (2007), y que las ardillas terrestres suelen vivir en nidos comunes, que son generalmente agregaciones de hembras y crías, en los cuales las hembras son generalmente pertenecientes a una misma familia, es

decir son parientes cercanos, y rara vez permiten el ingreso de una hembra de otro nido. Sin embargo el vivir en grupo tiene algunas consecuencias negativas como el infanticidio, que se cree se practica como una manera de incrementar los beneficios en la descendencia propia ya que incrementa los valores de nutrición, al comerse a las crías asesinadas, se reduce la competencia por los recursos, y aumenta potencialmente la cooperación de hembras cuyas crías han sido asesinadas, y quien por lo tanto no tienen crías que cuidar.

Estas hembras sin crías cooperan en actividades como defensa de territorio, vigilancia de los depredadores y mantenimiento de las madrigueras, actividades de vital importancia para la supervivencia del nido colectivo (Thorington *et al.*, 2012). Las ardillas terrestres son generalmente muy territoriales y tal conducta es de importancia trascendental para su supervivencia ya que por ejemplo, las hembras lactantes que defienden efectivamente su territorio tienen acceso permanente a recursos alimenticios cerca de sus madrigueras y túneles para ellas y sus crías, además de que protegen exitosamente a las crías del infanticidio. Y como se ha podido constatar en campo *N. adocetus* es extremadamente vigilante, por lo general parándose en las patas traseras o sentándose para escuchar y observar algún peligro como se ha reportado para otras ardillas de hábitos terrestres (Yensen y Sherman, 2003). Todo esto aunado a que las hembras de ardillas terrestres tienden a mostrar filopatría al sitio en que nacieron por lo que no se mueven mucho a diferencia de los machos, además los machos tienden a presentar ámbitos hogareños mayores que las hembras (Armitage, 1981; Yensen y Sherman, 2003).

Se ha reportado en otros grupos de mamíferos, como las mangostas rayadas, que la territorialidad y filopatría genera alta estructura y diferenciación genética entre poblaciones a pesar de que estas poblaciones tengan territorios cercanos geográficamente o sobrepuestos, esto debido a que esta especie es muy eficiente defendiendo su territorio de individuos de otras poblaciones (Nichols *et al.*, 2012). De igual manera se reporta estructuración genética similar en aves donde hembras y machos cooperan en la crianza y son altamente filopátricos (Woxvold *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos en *Notocitellus adocetus* demuestran que, dado la territorialidad y alta filopatría de las hembras, la información mitocondrial nos muestra una historia. Mientras que, en el gen nuclear hay haplotipos compartidos entre Este y Oeste y esto se explica por el comportamiento de los machos que tienen rangos hogareños mayores y poca filopatría.

6.6 Subjetividad en subespecies de *N. adocetus*

Tradicionalmente las subespecies han sido reconocidas con base en las discontinuidades en la distribución geográfica de los rasgos fenotípicos, y que con frecuencia se definen un tanto arbitrariamente las áreas de distribución geográfica (Mandujano *et al.*, 2010), o se definen subespecies usando la distribución como el más importante de los atributos. Además, las diferencias entre subespecies se basan a menudo en opiniones personales y subjetivas respecto a las características o las mediciones de sólo uno o unos pocos ejemplares. Tal es el caso de *N. adocetus* donde se define la distribución de las subespecies tomando atributos geográficos como limitantes, el Río Tepalcatepec como barrera geográfica *a priori*, sin haberlos probado antes ni después, además de que las subespecies fueron definidas hace más de 50 años en función de la opinión de dos investigadores (Alvarez y Ramírez-Pulido, 1968) que hicieron la última revisión taxonómica de la especie con muestreo reducido, mucho menor que el de este trabajo, y a partir de caracteres diagnósticos que varían aun dentro de una misma población, donde toman un solo carácter, la longitud total del cuerpo como carácter diagnóstico para definir las subespecies.

6.7 Implicaciones taxonómicas

Dado los resultados de la inferencia filogenética con los dos genes, en particiones separadas y concatenados, y los análisis de distancias y estructura genética se puede decir que no existen las subespecies como están propuestas, cabe mencionar que la clasificación

taxonómica es resultado de una hipótesis que debe ponerse a prueba constantemente y no puede basarse en la percepción de un investigador o el análisis de un solo tipo de caracteres con muestreo reducido. Por lo que se indica, con base en los resultados de este trabajo y resultados de análisis cladísticos previos basados en morfometría (Sánchez-Suárez, 2012), que *N. adocetus adocetus* y *N. adocetus infernatus* no son entidades naturales y que todos los individuos deberían ser tratados sólo como *Notocitellus adocetus*.

Como se expuso previamente, la diferenciación genética de 1.77% del *Citb* entre las poblaciones del Este y Oeste apuntan a que el grado de diferenciación encontrada no es suficiente para reconocer a ambos grupos como especies. Esto aunado a que la información nuclear no recupera los clados Este y Oeste claramente (ver Figuras 15 y 20) y que no se observaron características morfológicas evidentes que diferencien a los organismos del Este y Oeste. La literatura sugiere en especies hermanas de mamíferos (Avice *et al.*, 1998) o de ardillas (Oshida y Masuda, 2000; Oshida *et al.* 2000a; Oshida *et al.*, 2000b) un nivel de diferenciación genética mayor a 2.4%. Hay ejemplos, en dónde para elevar a nivel de especie a una subespecie, se obtuvieron valores de diferenciación genética por arriba del 3% como es el caso de *Artibeus triomylus* (Guerrero *et al.*, 2004).

A partir de los resultados obtenidos se puede decir que existen dos linajes genéticos marcados, al menos para el caso de *Citb*, con relativa concordancia en RAG1 que probablemente sería más clara con mayor muestreo, se hipotetiza que tales linajes de seguir aislados llegarían a formar dos especies diferentes. Sin embargo, sería adecuado también analizar si existen o no diferencias morfológicas y/o morfométricas con un análisis exhaustivo de morfología y morfometría geométrica, por lo que no se descarta que pueda tratarse de dos especies.

6.8 Implicaciones para la conservación

A pesar de que las poblaciones del cuinique no se consideran en peligro y no se encuentran actualmente en ninguna categoría de riesgo de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT- 2010 (SEMARNAT, 2010), y la IUCN la asigna en la categoría de Preocupación Menor (de Grammont y Cuarón, 2008), si es importante tomar medidas precautorias para su conservación. La literatura maneja que estas ardillas son poliestras, sin embargo, las observaciones de campo llevan a pensar que pudieran ser monoestras, dado que durante las colectas sólo se observó una hembra preñada. De tal forma que, matarlas indiscriminadamente como lo hacen los agricultores puede afectar seriamente las poblaciones.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten además adoptar, de manera precautoria y a reserva de estudios de ecología poblacional, una de las estrategias para conservación a nivel intraespecífico más extendida, las Unidades de Manejo (UM) (Moritz, 1994). Ya que existe divergencia importante y monofilia recíproca para el gen *Citb*, como lo indican las redes de haplotipos, porcentaje de diferenciación genética, y la inferencia filogenética, entre las poblaciones Este y Oeste. De forma que se proponen dos UM, una para las poblaciones del Este y otra para las poblaciones del Oeste. En este sentido las poblaciones que estarían en mayor riesgo son las del Este, dada la discontinuidad de hábitat natural que existe en esta región.

7. CONCLUSIONES

Tanto *Citb* como RAG1 presentaron diversidad haplotídica (h) alta en todas las regiones geográficas, mientras la diversidad nucleotídica (π) fue alta solo con el gen *Citb* en la región geográfica Norte.

Las AMOVAS mostraron valores de Φ_{ST} altos o muy altos y significativos entre las regiones Norte y Sur, y Este y Oeste con el gen *Citb* y entre la región Este y Oeste con el gen RAG1. En el caso de *Citb* los valores de Φ_{ST} fueron al menos tres veces más altos entre el Este y el Oeste que entre el Norte y Sur.

Los análisis de estructura genética sugieren que las elevaciones montañosas pertenecientes al Cinturón Volcánico Transmexicano es más una barrera histórica que el propio Río Tepalcatepec para las poblaciones de *N. adocetus*.

El patrón antes mencionado se observa también en las redes de haplotipos, de manera más precisa en la de *Citb*.

Según reflejan las diferencias en las redes de haplotipos de los dos genes posiblemente existe flujo de genes mediado por sexo asociado a la biología propia de la especie como los nidos comunales, filopatría de la hembra y defensa de la madriguera por parte de las hembras, así como mayor dispersión de los machos.

Las redes de haplotipos no muestran como dos grupos independientes a las poblaciones del Sur y Norte ya que en el gen RAG1 se comparten haplotipos entre poblaciones lejanas y entre todas las regiones geográficas, mientras que en *Citb* Norte y Sur están a uno o dos pasos mutacionales en comparación de los 11 que existen entre poblaciones del Este y Oeste.

Ninguna de las búsquedas filogenéticas o árboles, sea con los dos genes por separado o concatenados, recuperan como monofiléticas a las subespecies. Ya que *N. adocetus adocetus* y *N. adocetus infernatus* no son entidades naturales, todos los individuos deberían ser tratados sólo como *Notocitellus adocetus*.

La distribución de clados que se recuperó en la inferencia filogenética parece reflejar también en estos análisis, que hay más influencia de las elevaciones montañosas pertenecientes al Cinturón Volcánico Transmexicano como barrera geográfica que del Río Tepalcatepec.

Las poblaciones del Este y Oeste conforman dos linajes genéticos marcados, al menos para el caso de *Citb*, con relativa concordancia en RAG1. Que pueden ser propuestos como dos UM con fines de conservación.

Las poblaciones del Este y Oeste deberían ser analizadas exhaustivamente, mediante herramientas como la morfometría geométrica, para probar si existen o no diferencias morfológicas y/o morfométricas, entre ellas.

8. LITERATURA CITADA

- Alvarez, T. y J. Ramírez-Pulido. 1968. **Descripción de una nueva subespecie de *Spermophilus adocetus* (Rodentia, Sciuridae) de Michoacán, México y estado taxonómico de *S. a. arceliae* (Villa R., 1942).** Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural **29**: 181-189.
- Álvarez-Castañeda, S. y P. Cortés-Calva. 2011. **Genetic evaluation of the Baja California rock squirrel *Otospermophilus atricapillus* (Rodentia: Sciuridae).** Zootaxa **3138**: 35–51.
- Amadon, D. y L. L. Short. 1976. **Treatment of subspecies approaching species status.** Systematic Zoology **25**: 161–167.
- Ambriz-Morales, P. 2009. **Evolución de polimorfismo mitocondrial en subespecies de venado cola blanca *Odocoileus virginianus* del estado de Michoacán México.** Tesis de Licenciatura. Fac. de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 75 pp.
- Armitage, K. B. 1981. **Sociality as a life-history tactic of ground squirrels.** Oecologia **48**: 36-49.
- Avise, J.C. 2000. **Phylogeography: The History and Formation of Species.** Harvard University Press, Cambridge. 447 pp.
- Avise, J. C. 2009. **Phylogeography: retrospect and prospect.** Journal of Biogeography **36**: 3-15.
- Avise, J. C., D. Walker y G. C. Johns. 1998. **Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography.** Proceedings of the Royal Society of London B **265**: 1707-1712.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, L. E. Neigel, C. A. Reeb y N. C. Saunders. 1987. **Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics.** Annual Review in Ecology and Systematics **18**: 489–522.

- Awise, J. C. y R. M. Ball. 1990. **Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy**. Oxford Surveys in Evolutionary Biology 7: 45–67.
- Barata, M., S. Carranza y D. J. Harris. 2012. **Extreme genetic diversity in the lizard *Atlantolacerta andreanskyi* (Werner, 1929): A montane cryptic species complex**. BMC Evolutionary Biology 12: 167.
- Barton, N. H. 1993. **Why species and subspecies?** Current Biology 3: 797–799.
- Baum, D. A. y K. L. Shaw. 1995. **Genealogical perspectives on the species problem**. En: Hoch, P. C. y A. G. Stephenson (Eds.). Molecular and experimental approaches to plant biosystematics. Missouri Botanical Garden. St. Louis, Missouri, EUA. pp. 289-303.
- Best, T. L. 1995. *Spermophilus adocetus*. Mammalian Species 504: 1-4.
- Brown, W. M., M. George, Jr., y A. C. Wilson. 1979. **Rapid evolution of animal mitochondrial DNA**. Proceedings of the National Academy of Sciences. 76: 1967-1971.
- Caraballo, D. A. 2013. **Evolución de un complejo de especies de *Ctenomys* (Octodontidae, Rodentia) del noreste argentino: filogenia, variabilidad cromosómica y dinámica del ADN satélite**. Tesis de Doctorado. Fac. de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. 174 pp.
- Carrasco- Núñez, G., A. Gómez-Tuena, y L. Lozano V. 1997; **Geologic Map of Cerro Grande Volcano and Surrounding Area, Central Mexico**. Geological Society of America Map and Chart Series MCH 081. Boulder, Colorado, EUA. pp 1-10.
- Carvalho B. A., L. F. B. Oliveira, A. Langguth, C. C. Freygang, R. S. Ferraz y M. S. Mattevi. 2011. **Phylogenetic relationships and phylogeographic patterns in *Monodelphis* (Didelphimorphia: Didelphidae)**. Journal of Mammalogy 92: 121–133.
- Casado, F., C. R. Bonvicino, y H. N. Seuánez .2007. **Phylogeographic Analyses of *Callicebus lugens* (Platyrrhini, Primates)**. Journal of Heredity 98: 88-92.

- Clement, M., D. Posada y K. A. Crandall. 2000. **TCS: a computer program to estimate gene genealogies**. *Molecular Ecology* **9**: 1657-1659.
- Clements, M. D., H. L. Bart Jr., y D. L. Hurley. 2004. **Isolation and characterization of two distinct growth hormone cDNAs from the tetraploid smallmouth buffalofish (*Ictiobus bubalus*)**. *General and Comparative Endocrinology* **136**: 411-418.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 1997. **Provincias biogeográficas de México**. Escala 1:4 000 000. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D. F.
- Cox, C. B. y P. D. Moore. 2010. **Biogeography. An ecological and evolutionary approach**. 8a ed. John Wiley & Sons, Inc. EUA. 490 pp.
- de Grammont, P.C. y A. Cuarón. 2008. *Spermophilus adocetus*. En: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2013.2. <www.iucnredlist.org>. (Accesada en marzo de 2014).
- Domínguez–Domínguez O. y E. Vázquez–Domínguez. 2009. **Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación**. *Animal Biodiversity and Conservation* **1**: 59-70.
- Dupanloup, I., S. Schneider y L. Excoffier. 2002. **A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations**. *Molecular Ecology* **11**:2571-2581.
- Drummond, A. J. y A. Rambaut. 2007. **BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees**. *BMC Evolutionary Biology* **7**: 214.
- Drummond, A. J., A. Rambaut, B. Shapiro y O. G. Pybus. 2005. **Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences**. *Molecular Biology and Evolution* **22**: 1185-1192
- Eddingsaas, A. A., B. K. Jacobsen, E. P. Lessa, y J. A. Cook. 2004. **Evolutionary history of the arctic ground squirrel (*Spermophilus parryii*) in nearctic beringia**. *Journal of Mammalogy* **85**: 601–610.
- Eguiarte, L. E., V. Souza y X. Aguirre. (Compiladores). 2007. **Ecología Molecular**. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. D. F., México. 592 pp.

- Excoffier, L. y H. E. L. Lischer. 2010. **Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows**. *Molecular Ecology Resources* **10**: 564-567.
- Excoffier, L., P. Smouse y J. Quattro. 1992. **Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data**. *Genetics* **131**: 479- 491.
- Fabila-Blanco, A. 2010. **Genotipificación mitocondrial de especies de mamíferos de la región del Bajo Balsas, Michoacán**. Tesis de Licenciatura. Fac. de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 63 pp.
- Farias, I. P. y T. Hrbek. 2008. **Patterns of diversification in the discus fishes (*Symphysodon* spp. Cichlidae) of the Amazon basin**. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **49**: 32–43
- Fernández, J. A. 2012. **Phylogenetics and biogeography of the microendemic rodent *Xerospermophilus perotensis* (Perote ground squirrel) in the Oriental Basin of Mexico**. *Journal of Mammalogy* **93**: 1431-1439.
- Ferrari, L., M. López-Martínez y J. Rosas-Elguera. 2002. **Ignimbrite flare-up and deformation in the southern Sierra Madre Occidental, western México; Implications for the late subduction in history of Farallón plate**. *Tectonics* **21**: 1-24.
- Ferrari, L., T. M. Orozco-Esquivel, V. Manea y M Manea. 2011. **The dynamic history of the Trans-Mexican Volcanic Belt and the Mexico subduction zone**. *Tectonophysics*, doi:10.1016/j.tecto.2011.09.018.
- Fitzpatrick, J. W. 2010. **Subspecies are for convenience**. *Ornithological Monographs* **67**: 54–61.
- Fitzsimmons, N. 1997. **Male marine turtles: Gene flow, philopatry and mating systems of the green turtle *Chelonia mydas***. Tesis Doctoral. Universidad de Queensland. Australia. 241 pp.
- Fox, R. M. 1955. **On subspecies**. *Systematic Zoology* **4**: 93–95.

- Futuyma, D. J. 2005. **Evolution**. Sinauer Associates Incorporated. Sunderland, MA. EUA. 603 pp.
- Garduño-Monroy V. H., J. Chávez-Hernández, J. Aguirre-González, R. Vázquez-Rosas, A. H. Mijares, I. Israde-Alcántara, V. M. Hernández-Madrigal, M. A. Rodríguez-Pascua y L. R. Pérez. 2009. **Zonificación de los periodos naturales de oscilación superficial en la ciudad de Pátzcuaro, Mich. México, con base en microtemores y estudios paleosismología**. Revista Mexicana de Ciencias Geológicas, **26**: 623-637.
- Gómez-Tuena, A., M. Orozco-Esquivel y L. Ferrari. 2005. **Petrogénesis ígnea de la Faja Volcánica Transmexicana**. Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana **57**: 227-283.
- Good, J. M. y J. Sullivan. 2001. **Phylogeography of the red-tailed chipmunk (*Tamias ruficaudus*), a northern Rocky Mountain endemic**. Molecular Ecology **10**: 2683-2695.
- Grant, W. S. y B. W. Bowen. 1998. **Shallow Population Histories in Deep Evolutionary Lineages of Marine Fishes: Insights From Sardines and Anchovies and Lessons for Conservation**. The Journal of Heredity **89**: 415-426.
- Guerrero, J. A., E. De Luna, y D. González. 2004. **Taxonomic status of *Artibeus jamaicensis triomylus* inferred from molecular and morphometric data**. Journal of Mammalogy **85**:866–874.
- Guevara-Chumacero, L. M. 2009. **Patrones filogeográficos de *Pteronotus davyi* (Chiroptera: Mormoopidae) en México, basados en la región control**. Tesis de Doctorado. División de Ciencias Biológicas y de la Salud Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa. Distrito Federal, México. 193 pp.
- Guevara-Chumancero, L. M., R. López-Wilchis, F. F. Pedroche e I. A. Barriga-Sosa. 2006. **Análisis estructural del gen mitocondrial Citocromo b y de la región control de *Cynomys mexicanus* y *Spermophilus pilosoma* (Rodentia: Sciuridae)**. Acta Zoológica Mexicana (n.s.) **22**: 123-125

- Haig, S. M., E. A. Beever, S. M. Chambers, H. M. Draheim, B. D. Dugger, S. Dunham, E. Elliott-Smith, J. B. Fontaine, D. C. Kesler, B. J. Knaus, I. F. Lopes, P. Loschi, T. D. Mullins, L. M. Sheffield. 2006. **Taxonomic considerations in listing subspecies under the U.S. Endangered Species Act.** *Conservation Biology* **20**: 1584–1594.
- Hall, E. R. 1981. **The mammals of North America.** Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, EUA. 1181 pp.
- Harrison, R. G., S. M. Bogdanowicz, R. S. Hoffman, E. Yensen y P. W. Sherman. 2003. **Phylogeny and Evolutionary History of the Ground Squirrels (Rodentia: Marmotinae).** *Journal of Mammalian Evolution* **10**: 249-276.
- Hartl, D. L. y A. G. Clark. 1989. **Principles of Population Genetics.** 2ª ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc. 682 pp.
- Hauswaldt, J. S., C. Angelini, M. Gehara, E. Benavides, A. Polok y S. Steinfartz. 2014. **From species divergence to population structure: a multimarker approach on the most basal lineage of Salamandridae, the spectacled salamanders (genus *Salamandrina*) from Italy.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **70**: 1–12.
- Helgen, K. M., F. R. Cole, L. E. Helgen y D. E. Wilson. 2009. **Generic revision in the holarctic ground squirrel genus *Spermophilus*.** *Journal of Mammalogy* **90**: 270-305.
- Herron, M. D., T. A. Castoe y C. L. Parkinson. 2004. **Sciurid phylogeny and the paraphyly of Holarctic ground squirrels (*Spermophilus*).** *Molecular Phylogenetics and Evolution* **31**: 1015-1030.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), Ita-Rubio de, L., I. Escamilla-Herrera, C. García-de León y Ma. C. Soto-Núñez. 1990a. **División Política Estatal 1:4000000**, I.1.2. Atlas Nacional de México. Vol. I. Escala 1:4000000. Instituto de Geografía, UNAM. México.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), Lugo-Hupb J., R. Vidal Zepeda, A. Fernández-Equiarte, A. Gallegos-García, J. Zavala-H y otros. 1990b. **Hipsometría.** Extraído de Hipsometría y Batimetría, I.1.1. Atlas Nacional de México. Vol. I. Escala 1:4000000. Instituto de Geografía, UNAM. México.

- Jorgensen, M. C., P. Sierwald y R. J. Mason-Gamer. 2012. **A review of subspecies recognition in polydesmidan millipedes (Diplopoda) with a revision of the subspecies of Euryuridae (Xystodesmoidea)**. *Zoologica Scripta* **42**: 317–326.
- Kitching, I. J., P. L. Forey, C. J. Humphries, y D. M. Williams. 1998. **Cladistics: The theory and practice of parsimony analysis**. 2da edición. The Systematics Association.
- Kluge, A. G. 1998. **Total Evidence Or Taxonomic Congruence: Cladistics Or Consensus Classification**. *Cladistics* **14**: 151-158.
- Kryštufek, B., J. Bryja y E. V. Bužan. 2009. **Mitochondrial phylogeography of the European ground squirrel, *Spermophilus citellus*, yields evidence on refugia for steppic taxa in the southern Balkans**. *Heredity* **103**: 129–135.
- Lamb, T., T. R. Jones y P. J. Wettstein. 1997. **Evolutionary genetics and phylogeographic of tassel-eared squirrels (*Sciurus aberti*)**. *Journal of Mammalogy* **78**: 117-133.
- Librado, P. y J. Rozas. 2009. **DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data**. *Bioinformatics* **25**: 1451-1452.
- López-Ramos E. 1981. **Paleogeografía y tectónica del Mesozoico de México**. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* **5**: 158-177.
- Lucas, J. M. y J. Galián. 2009. **Análisis molecular de *Sciurus vulgaris hoffmanni* Valverde, 1967 (Rodentia: Sciuridae) e implicaciones para su conservación**. *Anales de Biología* **31**:81-91.
- Maderey-R, L. E. y C. Torres-Ruata. 1990. **Hidrografía**. Extraído de Hidrografía e hidrometría, IV.6.1 (A). Atlas Nacional de México. Vol. II. Escala 1: 4000000. Instituto de Geografía, UNAM. México.
- Mandujano, S., C. A. Delfín-Alonso y S. Gallina. 2010. **Comparison of geographic distribution models of white-tailed deer *Odocoileus virginianus* (Zimmermann, 1780) subspecies in Mexico: biological and management implications**. *THERYA* **1**: 41-68.
- Manel, S., M. K. Schwartz, G. Luikart y P. Taberlet. 2003. **Landscape genetics: combining lanscape ecology and population genetics**. *Trends in Ecology and Evolution* **18**: 189-197.

- Mayr, E. 1982. **Of what use are subspecies?** The Auk **99**: 593–595.
- Mayr, E. 1996. **What is a species and what is not?** Philosophy of Science **63**: 262–277.
- Mayr, E. y P. D. Ashlock. 1991. **Principles of Systematic Zoology**. 2a ed. McGraw-Hill. New York, EUA. 475pp.
- Milot, E., H. L. Gibas y K. A. Hobson. 2000 **Phylogeography and genetic structure of northern populations of the yellow warbler (*Dendroica petechia*)**. Molecular Ecology **9**: 667- 681.
- Mishler, B. D. y E. de Luna. 1997. **Sistemática filogenética y el concepto de especie**. Boletín de la Sociedad Botánica de México **60**: 45-57.
- Monroy-Vilchis, O., M. M. Zarco-González, J. Ramírez-Pulido y U. Aguilera-Reyes. 2011. **Diversidad de mamíferos de la Reserva Natural Sierra Nanchititla, México**. Revista Mexicana de Biodiversidad **82**: 237-248.
- Moritz, C. 1994. **Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation**. Trends in Ecology and Evolution **9**:373-375.
- Moritz, C. 2002. **Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it**. Systematic Biology **51**:238-254
- Mort, M. E., P. S. Soltis, E. D. Soltis, y M. L. Mabry. 2000. **Comparison of three methods for estimating internal support on phylogenetic trees**. Systematic Biology **49**:160-171.
- Mulcahy, D. G. 2008. **Phylogeography and species boundaries of the western North American Nightsnake (*Hypsiglena torquata*): revisiting the subspecies concept**. Molecular Phylogenetics and Evolution **46**: 1095–1115.
- Nei M. 1973 **Analysis of gene diversity in subdivided populations**. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **70**: 3321- 3323.
- Nei, M. 1987. **Molecular evolutionary genetics**. Columbia University Press, New York. 512 pp.
- Nichols, H. J., N. R. Jordan, G. A. Jamie, M. A. Cant y J. I. Hoffman. 2012. **Fine-scale spatiotemporal patterns of genetic variation reflect budding dispersal coupled with strong natal philopatry in a cooperatively breeding mammal**. Molecular Ecology **21**: 5348–5362.

- Nicolas, V., A. D. Missoup, M. Colyn, C. Cruaud y C. Denys. 2012. **West-Central African Pleistocene Lowland Forest Evolution Revealed by the Phylogeography of Misonne's Soft-Furred Mouse**. *African Zoology* **47**: 100–112
- Nunes, S. 2007. **Dispersal and philopatry**. En: Wolff, J. y P. Sherman (Eds.). *Rodent societies, an ecological and evolutionary perspective*. The University of Chicago Press. Chicago EUA. pp. 150-162.
- Núñez, G. A. 2005. **Los Mamíferos Silvestres de Michoacán Diversidad, Biología e Importancia**. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. 448 pp.
- Ochoa, A., J. Gasca, G. J. Ceballos y L. E. Eguiarte. 2012. **Spatiotemporal population genetics of the endangered Perote ground squirrel (*Xerospermophilus perotensis*) in a fragmented landscape**. *Journal of Mammalogy* **93**: 1061-1074
- Ornelas-García, C. P., O. Domínguez-Domínguez e I. Doadrio. 2008. **Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies**. *BMC Evolutionary Biology* **8**: 1-17.
- Oshida, T. y R. Masuda. 2000. **Phylogeny and zoogeography of six squirrel species of genus *Sciurus* (Mammalia, Rodentia) inferred from cytochrome b gene sequences**. *Zoological Science Tokyo* **17**: 405-409.
- Oshida, T., R. Masuda y M. C. Yoshida. 1996. **Phylogenetic relationships among Japanese species of the family Sciuridae (Mammalia, Rodentia), inferred from nucleotide sequences of mitochondrial 12S ribosomal RNA genes**. *Zoological Science Tokyo* **13**: 615-620.
- Oshida, T., L. K. Lin, H. Yanagawa, H. Endo y R. Masuda. 2000a. **Phylogenetic relationships among six flying squirrel genera, inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences**. *Zoological Science Tokyo* **17**: 485-489.
- Oshida, T., L. K. Lin, R. Masuda y M. C. Yoshida. 2000b. **Phylogenetic relationships among Asian species of *Petaurista* (Rodentia, Sciuridae), Inferred from Mitochondrial Cytochrome b Gene Sequences**. *Zoological Science Tokyo* **17**: 123-128.

- Phillimore, A. B. y I. P. F. Owens. 2006. **Are subspecies useful in evolutionary and conservation biology?** Proceedings of the Royal Society of London, Series B **273**: 1049–1053.
- Posada, D. 2008. **jModelTest: Phylogenetic Model Averaging.** Molecular Biology and Evolution **25**: 1253-1256.
- Rodríguez-Gómez, F. C. 2010. **Filogeografía y variación fenotípica del colibrí *Amazilia cyanocephala* (Aves: Trochilidae) en México.** Instituto de Ecología, A. C. Xalapa. Veracruz, México. 59pp.
- Roux, K. H. 2003. **Optimization and Troubleshooting in PCR.** En: Dieffenbach, C. W. y G. S. Dveksler (Eds.). PCR Primer: A Laboratory Manual 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, EUA. pp. 35-42.
- Ryder, O. A. 1986. **Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies.** Trends in Ecology and Evolution **1**: 9–10.
- Sánchez-Suárez, S. 2012. **Análisis cladístico de la variación morfométrica en poblaciones de las subespecies de *Notocitellus adocetus* (Rodentia: Sciuridae).** Tesis de Licenciatura. Fac. de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- Slatkin, M. 1987. **Gene flow and the geographic structure of natural populations.** Science **236**: 787- 792.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. **Norma Oficial Mexicana. NOM-059-SEMARNAT-2001. Protección ambiental - Especies nativas de México de flora y fauna silvestres - Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio - Lista de especies en riesgo.** Diario Oficial de la Federación, Segunda sección, 30 de diciembre, México, D. F. pp.1-78.
- Sharrocks, A. D. 1994. **The design of primers for PCR.** En: Griffin, H. G. y A. M. Griffin (Eds.). PCR technology: Current innovations. CRC Press. Boca Raton, Florida, EUA. pp. 5-11.
- Smith, H. M. y F. N White. 1956. **A case for the trinomen.** Systematic Zoology **5**: 183–190.

- Steppan, J. S., B. L. Storz y R. S. Hoffmann. 2004. **Nuclear DNA phylogeny of the squirrels (Mammalia: Rodentia) and the evolution of arboreality from c-myc and RAG1**. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **30**:703–719.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP. **Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods)**. Versión 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, EUA.
- Swofford, D. L., Olsen, G. J., Waddell, P. J. y Hillis, D. M. 1996. **Phylogenetic Inference**. En Hillis, D. M., C. Moritz, y B. K. Mable (Eds.), *Molecular systematics* 2 ed. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts, EUA. pp. 407-425.
- Tamura, K. y M. Nei. 1993. **Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees**. *Molecular Biology and Evolution* **10**: 512–526.
- Templeton, A. R. 1989. **The meaning of species and speciation: a genetic perspective**. En: Ereshefsky, M. (Ed.). *The units of evolution: Essays on the nature of species*. Massachusetts Institute of Tecnology Press. Cambridge, Massachusetts, EUA. pp. 159-183.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins y T. J. Gibson. 1994. **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice**. *Nucleic Acids Research* **22**:4673-4680.
- Thorington, R. W. Jr y R. S. Hoffmann. 2005. **Family Sciuridae**. En: Wilson, D. E. y D. M. Reeder (Eds.). *Mammals Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. 3a ed. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland, EUA. pp. 754-818.
- Thorington, R. W. Jr., J. L. Koprowski, M. A. Steele y J. F. Whatton. 2012. **Squirrels of the World.**: The Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland, EUA. 459 pp.
- Timpe, E. K., S. P. Graham y R. M. Bonett. 2009. **Phylogeography of the Brownback Salamander reveals patterns of local endemism in Southern Appalachian springs**. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **52**: 368–376.

- Trizio, I., B. Crestanello, P. Galbusera, L. A. Wauters, G. Tosi, E. Matthysen y H. C. Hauffe. 2005. **Geographical distance and physical barriers shape the genetic structure of Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in the Italian Alps.** *Molecular Ecology* **14**: 469–481.
- Valdez, M. 2003. **Las ardillas de México.** *Biodiversitas* **51**: 1-7.
- Valdez, A. M. y G. Ceballos. 2005. *Spermophilus adocetus* (Merriam, 1903). En: Ceballos, G. y G. Oliva (Eds.). *Los Mamíferos Silvestres de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad/Fondo de Cultura Económica, México, D. F. pp. 559–560.
- Valencia-Ávalos, S. 1991. **El problema de la especie.** *Ciencias* **24**: 13-22.
- Van Tuinen, M., K. O’Keefe, U. Ramakrishnan y E. A. Hadly. 2008. **Fire and ice: genetic structure of the Uinta ground squirrel (*Spermophilus armatus*) across the Yellowstone hotspot.** *Molecular Ecology* **17**: 1776–1788.
- Vázquez-Domínguez, E., S. Castañeda-Rico, T. Garrido-Garduño y T. A. Gutiérrez-García. 2009. **Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución.** *Revista Chilena de Historia Natural* **82**: 277-297.
- Villa R., B. 1942. **Los cuiniques de Arcelia *Citellus adocetus arceliae*, Sub. Sp. Nov.** *Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional de México* **13**:357-368.
- Villa-Ramírez, B., V. Sánchez-Cordero, y B. Villa-Cornejo. 1991. **La ardilla terrestre *Spermophilus adocetus* (Rodentia: Sciuridae) en la región central de México y su situación taxonómica.** *Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional de México. Serie Zoología* **62**:511-519.
- Wheeler, Q. D. y R. Meier (Eds.). 2000. **Species concepts and phylogenetic theory: A debate.** Columbia University Press. New York, EUA. 230 pp.
- Wiens, J. A. 1982. **Forum: Avian Subspecies in the 1980’s.** *The AUK*. **99**: 593-615.
- Wiley, E. O. 1978. **The evolutionary species concept reconsidered.** *Systematic Biology*, **27**: 17–26.
- Wilson, E. O. y W. L. Brown. 1953. **The subspecies concept and its taxonomic application.** *Systematic Zoology* **2**: 97–111.

- Wilson, G. M., R. A. Den Bussche, K. Mcbee, L. A. Johnson y C. A. Jones. 2005. **Intraspecific phylogeography of red squirrels (*Tamiasciurus hudsonicus*) in the central Rocky Mountain region of North America.** *Genetica* **125**: 141–154.
- Woxvold, I. A., G. J. Adcock y R. A. Mulder. 2006. **Fine-scale genetic structure and dispersal in cooperatively breeding apostlebirds.** *Molecular Ecology* **15**: 3139–3146.
- Wright, S. D. 1951. **The genetical structure of populations.** *Annals of Eugenics* **15**: 323–354.
- Yensen, E. y P. W. Sherman. 2003. **Ground Squirrels.** En: Feldhamer, G. A., B. C. Thompson y J. A. Chapman (Eds.). *Wild Mammals of North America: Biology, Management, and Conservation*. 2a ed. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland, EUA. pp. 211-231.
- Zink, R. M. 2004. **The role of subspecies in obscuring avian biological diversity and misleading conservation policy.** *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* **271**: 561-564.

ANEXO I

Relación de organismos colectados, PCR realizadas y secuencias obtenidas

No.	Población /individuo	Sexo	PCR <i>Citb</i>	Secuencia <i>Citb</i>	PCR RAG1	Secuencia RAG1
1.	Infiernillo 1	♂	X	X	X	X
2.	Infiernillo 2	♀	X	X	X	X
3.	Infiernillo 3	♂	X			
4.	Infiernillo 4	♀	X			
5.	Infiernillo 5	♂	X	X	X	X
6.	Infiernillo 6	♀	X			
7.	Infiernillo 7	♂	X			
8.	Infiernillo 8	♂	X			
9.	Infiernillo 9	♂	X	X		
10.	Infiernillo 10	♀	X			
11.	Infiernillo 11	♀	X	X		
12.	Infiernillo 12	♂	X			
13.	Nueva Italia 17	♀	X			
14.	La palma 1/18	♀	X	X		
15.	La palma 19	♀	X	X		
16.	La palma 20	♀	X			
17.	La palma 21	♂	X	X		
18.	La palma 22	♀	X			
19.	La palma 23	♀	X	X		
20.	La palma 24/7	♀	X	X	X	X
21.	La palma 25	♀	X			
22.	La palma 26	♂	X			
23.	La palma 27	♂	X			
24.	La palma 28	♂	X			
25.	La palma 29	♀	X			
26.	Nueva Italia 30	♀	X			
27.	Nueva Italia 31	♂	X			
28.	Nueva Italia 32	♀	X			
29.	Nueva Italia 33	♀	X			
30.	Nueva Italia 34	♂	X	X		
31.	Nueva Italia 35	♂	X			
32.	Huetamo 1	♀	X	X	X	X
33.	Huetamo 2	♀	X	X	X	X
34.	Huetamo 3	♀	X	X		
35.	Huetamo 4	♂	X	X		
36.	Huetamo 5	♂	X	X		
37.	Huetamo 6	♀	X	X	X	X
38.	Los Chivos 1	♀	X	X		
39.	Los Chivos 2	♀	X	X		

40.	Los Chivos 3	♀	X	X	X	X
41.	Los Chivos 4	♂	X			
42.	Los Chivos 5	♂	X			
43.	Los Chivos 6	♂	X			
44.	Los Chivos 7	♂	X			
45.	Los Chivos 8	♂	X			
46.	Los Chivos 9	♂	X			
47.	Los Chivos 10	♂	X			
48.	Los Chivos 11	♂	X			
49.	Los Chivos 12	♂	X	X		
50.	Los Chivos 13	♂	X	X	X	X
51.	Los Chivos 14	♂	X	X		
52.	Los Chivos 15	♀	X	X		
53.	Los Chivos 16	♂	X	X		
54.	La Huacana 1	♀	X	X		
55.	La Huacana 2	♀	X	X		
56.	La Huacana 3	♂	X	X	X	X
57.	La Huacana 4	♂	X	X	X	X
58.	La Huacana 5	♀	X	X		
59.	La Huacana 6	♀	X			
60.	La Huacana 7	♀	X			
61.	La Huacana 8	♂	X	X		
62.	La Huacana 9	♀	X	X		
63.	La Huacana 10	♀	X	X		
64.	Churumuco 1	♂	X	X	X	X
65.	Churumuco 2	♀	X	X	X	X
66.	Gámbara 1	-	X	X		
67.	Gámbara 2	♂	X	X	X	X
68.	Gámbara 3	♂	X	X		
69.	Cupuán del Río 1	♀	X	X	X	X
70.	Cupuán del Río 2	♀	X	X	X	X
71.	Las Cruces 1	♂				
72.	Las Cruces 2	♂				
73.	Nueva Italia 1/ 10	♀	X	X	X	X
74.	Nueva Italia 2	♂	X	X	X	X
75.	Tepalcatepec 1	♀	X	X	X	X
76.	Tepalcatepec 2	♀	X	X	X	X
77.	Tepalcatepec 3	♂	X	X		
78.	Tepalcatepec 4	♀	X	X		
79.	Tepalcatepec 5	♂	X	X		
80.	Tepalcatepec 6	♀	X	X		
81.	Tepalcatepec 7	♂	X			
82.	Tepalcatepec 8	♀	X			
83.	Tepalcatepec 9	♀	X			
84.	Los Huarinches 12/ Tepalcatepec 17	♀	X	X	X	X

85.	Melchor Ocampo 1	♀	X	X	X	X
86.	Melchor Ocampo 2	♀	X	X	X	X
87.	Melchor Ocampo 3	♂	X			
88.	Melchor Ocampo 4	♂	X	X	X	X
89.	Melchor Ocampo 5	♂	X	X	X	X
90.	Melchor Ocampo 6	♀	X	X		
91.	Melchor Ocampo 7	♂	X	X	X	X
92.	Melchor Ocampo 8	♀	X	X	X	X
93.	Iranche 1	♂	X	X	X	X
94.	Los Huarinches 1	♂	X	X	X	X
95.	Los Huarinches 2	♂	X	X		
96.	Los Huarinches 3	♀	X			
97.	Los Huarinches 4	♂	X			
98.	Los Huarinches 5	♂	X			
99.	Los Huarinches 6	♀	X			
100.	Los Huarinches 7	♂	X			
101.	Los Huarinches 8	♂	X			
102.	Los Huarinches 9	♂	X			
103.	Los Huarinches 10	♂	X	X		
104.	Los Huarinches 11	♂	X	X		
105.	Los Huarinches 13	♂	X			
106.	Los Huarinches 14	♀	X			