

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

Diversidad y estructura genética espacio-temporal
de la ardilla terrestre del Perote (*Spermophilus perotensis*):
Implicaciones para su conservación

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ALEXANDER OCHOA HEIN

TUTOR: BIÓL. JAIME GASCA PINEDA

2008





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno Ochoa Hein Alexander 56229006 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 301078944
2. Datos del tutor Biól. Jaime Gasca Pineda
3. Datos del sinodal 1 Dr. Manuel Uribe Alcocer
4. Datos del sinodal 2 Dr. Gerardo Jorge Ceballos González
5. Datos del sinodal 3 Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns
6. Datos del sinodal 4 Dra. Ella Gloria Vázquez Domínguez
7. Datos del trabajo escrito Diversidad y estructura genética espacio-temporal de la ardilla terrestre del Perote (<i>Spermophilus perotensis</i>): Implicaciones para su conservación. 89 p 2008

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de
Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología de la
Universidad Nacional Autónoma de México

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Luis Eguiarte y a la Dra. Valeria Souza por haber sido parte esencial de mi formación académica y haber colaborado de manera cercana en la culminación de mi carrera. Por su apoyo, entusiasmo y confianza, muchas gracias.

A mi tutor y amigo Biól. Jaime Gasca, por su tiempo, dedicación y determinación para la realización de esta tesis. Por ser parte integral de este largo y sinuoso proceso de titulación, y por ser un excelente asesor dentro y fuera del laboratorio; ha sido un verdadero placer trabajar contigo.

Al Biól. Marco Rodríguez, por encargarse del diseño gráfico y enriquecer la presentación de este trabajo. Por tu amistad, muchas gracias.

A mis sinodales: Dr. Manuel Uribe, Dr. Gerardo Ceballos, Biól. Jaime Gasca, Dr. Luis Eguiarte y Dra. Ella Vázquez, por sus valiosos comentarios y observaciones.

Gracias infinitas a Paulina y Rodrigo, por haber colaborado generosamente en la colección de muestras biológicas en el campo.

Muchas gracias a Gaby, por obsequiarme reactivos para la obtención de datos experimentales.

Un agradecimiento especial al Dr. Gerardo Ceballos y M. C. Jesús Pacheco, por la generosa donación de material biológico.

Muchas gracias a todos los integrantes del laboratorio: Ale, Celes, Jaime, Marco, Richard, Sandra, Santiago, Eria, Morena, René, Rodrigo, Ana, Luisa, Robert, Germán, Andrea, Yis, Esmeralda, Enrique, Manuel, Changoleón, Alicia, Nuria y Doña Chivis. A las chicas trabajadoras del lab, Lau y Eri.

Un agradecimiento afectuoso a los psicópatas Paola y Román, por todas las experiencias y camaradería; por los sabios consejos, muchas gracias.

Un agradecimiento pleno a mis padres y Eric, por ser la mejor escuela y por su apoyo incondicional.

Finalmente, muchas gracias a Betzy, por los momentos vividos, por su sentido del humor y, sobretodo, por su amistad.

"Diversidad y estructura genética espacio-temporal
de la ardilla terrestre del Perote (*Spermophilus perotensis*):
Implicaciones para su conservación."

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
Genética de la Conservación.....	2
Marcadores Moleculares.....	3
Región control mitocondrial.....	3
Microsatélites.....	4
Diversidad y Estructura Genética.....	6
La ley de Hardy–Weinberg.....	6
Variación genética.....	7
Estructura genética.....	7
Distancia genética.....	9
Fragmentación del Hábitat.....	10
Evolución en poblaciones fragmentadas.....	10
<i>Deriva génica</i>	11
<i>Endogamia</i>	11
<i>Flujo génico</i>	12
<i>El vórtice de la extinción</i>	13
Caracterización de la Especie.....	14
Clasificación.....	14
Descripción.....	14
Historia natural y ecología.....	15
Distribución.....	16
Estado de conservación.....	18
Antecedentes.....	18
Justificación.....	20
OBJETIVOS.....	21
Objetivo general.....	21
Objetivos particulares.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Material Biológico.....	22
Extracción de ADN.....	23
Amplificación.....	23
Región control mitocondrial.....	23
Microsatélites.....	24

Secuenciación.....	25
Región control mitocondrial.....	25
Microsatélites.....	25
Variación genética.....	25
Estructura genética.....	26
Coeficientes F	26
Flujo génico.....	27
Varianza molecular.....	27
Distancias Genéticas.....	28
Asociación entre Distancias Genéticas y Distancias Geográficas.....	28
Red de Haplotipos.....	28
Filogenia molecular.....	29
Distribución <i>Mismatch</i>	29
Estimadores <i>Theta</i>	30
<i>Theta (S)</i>	30
<i>Theta (Hom)</i>	31
Tamaño Efectivo Poblacional.....	32
RESULTADOS.....	33
Variación Genética.....	33
Región control mitocondrial.....	33
Microsatélites.....	35
Diversidad haplotípica.....	35
Diversidad nucleotídica.....	37
Heterocigosis esperada.....	37
Estructura Genética.....	38
Coeficientes F	38
Índice de fijación F_{IS}	38
Índice de diferenciación genética F_{ST}	38
Flujo génico.....	40
Varianza molecular.....	41
Distancias Genéticas.....	42
Asociación entre Distancias Genéticas y Distancias Geográficas.....	44
Red de Haplotipos.....	45
Filogenia Molecular.....	46
Distribución <i>Mismatch</i>	47
Estimadores <i>Theta</i>	48
<i>Theta (S)</i>	48
<i>Theta (Hom)</i>	49

Tamaño Efectivo Poblacional.....	50
DISCUSIÓN.....	51
Consecuencias Genéticas de la Fragmentación del Hábitat.....	51
Red de Haplotipos y Filogenia Molecular.....	57
Implicaciones para la Conservación.....	58
Manejo de las poblaciones de <i>S. perotensis</i>	59
CONCLUSIONES.....	60
LITERATURA CITADA.....	61
APÉNDICES.....	71
Apéndice 1.....	71
Apéndice 2.....	73
Apéndice 3.....	74
Apéndice 4.....	80
Apéndice 5.....	82
Apéndice 6.....	83
Apéndice 7.....	84
Apéndice 8.....	85
Apéndice 9.....	86
Apéndice 10.....	87
Apéndice 11.....	88
Apéndice 12.....	89

RESUMEN

La diversidad genética se relaciona con la adecuación individual y con la capacidad de las poblaciones para adaptarse a la heterogeneidad ambiental. Por esta razón, la pérdida de diversidad genética constituye uno de los principales factores a considerarse para la conservación de una gran variedad de especies amenazadas, ya que su deterioro incrementa la probabilidad de extinción. La ardilla terrestre del Perote (*Spermophilus perotensis*) es una especie amenazada endémica del Valle del Oriental, México, que actualmente enfrenta problemas de fragmentación del hábitat; por tal motivo, se estimó la diversidad y estructura genética en poblaciones históricas y actuales utilizando marcadores moleculares mitocondriales y nucleares. Se encontró que la fragmentación del hábitat ha restringido en gran medida el flujo génico entre las poblaciones de esta especie y ha provocado divergencia reciente entre las mismas. Asimismo, se determinó que en la actualidad *S. perotensis* enfrenta problemas serios de pérdida de diversidad genética y niveles altos de endogamia. Consecuentemente, la protección del hábitat, el aumento en los tamaños efectivos poblacionales y la conectividad del hábitat deben ser considerados como una prioridad para la conservación de esta especie.

ABSTRACT

Genetic diversity is linked to individual fitness and to the ability of populations to adapt to environmental change. For this reason, loss of genetic diversity is a growing concern in the conservation of a variety of threatened species, because its deterioration increases the probability of extinction. The Perote ground squirrel (*Spermophilus perotensis*) is a threatened species endemic to the Oriental Basin, Mexico, that at present faces habitat fragmentation; therefore its genetic diversity and genetic structure was estimated in historic and recent populations using mitochondrial and nuclear molecular markers. It was found that habitat fragmentation has restricted to a large extent the gene flow between the populations of this species and has produced recent divergence among them. It was also determined that *S. perotensis* is currently facing serious problems associated with loss of genetic diversity and high inbreeding levels. Consequently, habitat protection, an increase in the effective population sizes, and habitat connectivity are to be given priority in the conservation of this species.

INTRODUCCIÓN

Genética de la Conservación

La diversidad biológica del planeta está disminuyendo como consecuencia directa o indirecta de las diferentes acciones humanas. Un gran número de especies se encuentran extintas y muchas otras están siendo erosionadas genéticamente, a tal grado que para sobrevivir requieren de la intervención de los humanos para optimizar su manejo y asegurar su supervivencia (Frankham *et al.*, 2002).

Desde sus inicios, la genética ha contribuido al campo de la conservación, pero fue hasta la década de 1980 cuando se le dio un valor en el campo del monitoreo, la protección y la restauración de la diversidad biológica (Frankham *et al.*, 2002). Uno de los objetivos clave de la genética de la conservación es ayudar a minimizar las extinciones, evitando los problemas relacionados con los tamaños efectivos pequeños, el efecto deletéreo de la endogamia y la pérdida de diversidad genética (Rocha y Gasca, 2007). Los análisis genéticos también permiten estudiar el efecto de la fragmentación y la reducción del flujo génico en poblaciones estructuradas, así como el efecto de la acumulación y pérdida de mutaciones deletéreas (Rocha y Gasca, 2007). A nivel de especie, con la genética se pueden resolver incertidumbres taxonómicas, definir unidades evolutivamente significativas y unidades de manejo, y en el ideal, proteger los procesos evolutivos que mantienen la diversidad biológica (Moritz, 2002). También, esta herramienta permite esclarecer los principios y procesos que han generado un patrón de distribución de la diversidad genética dentro de las especies (Avice, 2000). Por lo anterior, se puede considerar a la genética de la conservación como la aplicación de la genética con el fin de preservar a las especies como entidades dinámicas capaces de lidiar con el cambio ambiental (Frankham *et al.*, 2002).

En los estudios de la genética de la conservación, ya sean poblacionales, filogeográficos o taxonómicos, se utilizan marcadores moleculares para detectar los niveles de variación genética de una especie y estimar diferentes parámetros como la diferenciación genética, heterocigosis esperada, diversidad nucleotídica y haplotípica, con el propósito de valorar su estado de conservación y tomar decisiones para su protección y manejo (Lande y Barrowclough, 1987; Lande, 1988).

Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares constituyen métodos de análisis genético–moleculares que se basan en la detección de polimorfismos en proteínas y en ADN (Trejo, 2005). Los marcadores moleculares nos ayudan a detectar la variación genética que existe dentro y entre especies y han sido utilizados para resolver problemas que van desde la medicina forense hasta la biología de la conservación (Frankham *et al.*, 2002).

Existen muchos métodos directos e indirectos para detectar la variación genética. La secuenciación de ADN de genes mitocondriales se hace actualmente de manera rutinaria, mientras que los microsatélites (secuencias simples repetidas) se están convirtiendo en los marcadores moleculares predilectos para realizar estudios de genética de poblaciones (Frankham *et al.*, 2002).

Región control mitocondrial

Las características peculiares del ADN mitocondrial (ADNmt) de vertebrados, tales como su herencia por vía materna, la presencia de genes ortólogos haploides, la ausencia de recombinación, y su alta tasa de mutación hacen que esta molécula sea adecuada para estudios evolutivos (Larizza *et al.*, 2002).

El ADNmt es una molécula circular de 15–17 kb que contiene 37 genes involucrados con la fosforilación oxidativa (Alberts *et al.*, 2002). La principal región no codificante del ADNmt tiene ~1kb de longitud y es conocida como la región control o *D-loop* (Displacement loop). En mamíferos esta región se caracteriza por presentar tres dominios: el dominio ETAS (extended termination–associated sequence), el dominio central (CD, central domain) y el dominio CSB (conserved sequence blocks) (Brown *et al.*, 1986; *Fig. 1*). Los dominios ETAS y CBS (éste último de gran importancia por contener el origen de la replicación) presentan alta variación genética intraespecífica, mientras que el dominio central se encuentra altamente conservado (Sbisà *et al.*, 1997; *Fig. 1*).

A pesar de su importancia funcional, la región control es la parte más variable de todo el genoma mitocondrial, presentando una tasa de sustitución elevada en comparación con el resto de la mitocondria (Cann *et al.*, 1984). Por esta razón, ha sido utilizada para rastrear linajes femeninos, identificar patrones de migración, resolver incertidumbres taxonómicas, definir unidades de manejo y comprender aspectos importantes de la biología de las especies (Frankham *et al.*, 2002).

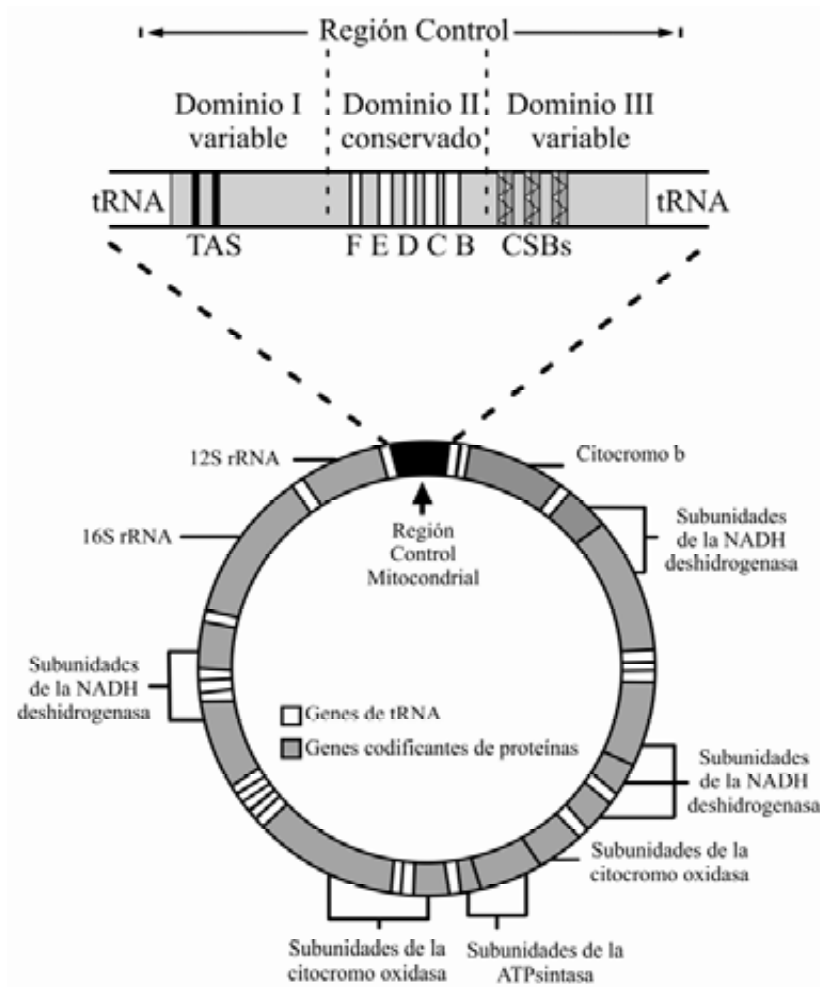


Fig. 1. Estructura general de la mitocondria y región control de vertebrados. ETAS, extended termination-associated sequence; CD, central domain; CBS, conserved sequence blocks. Dentro de cada dominio se muestran también los bloques de secuencias conservadas.

Microsatélites

Los microsatélites son secuencias simples repetidas (SSRs), cuya unidad de repetición puede ir de una a cinco pares de bases. Se encuentran en el núcleo de eucariontes y sus organelos (mitocondria y cloroplasto), así como parcialmente en procariontes y eubacterias (Hamada *et al.*, 1982; Gebhard y Zachau, 1983; Tautz y Renz, 1984; Greaves y Patient, 1985; Gross y Garrad, 1986; Schèfer *et al.*, 1986). Los microsatélites son de los marcadores moleculares más polimórficos debido a sus altas tasas de mutación, que pueden variar de 10^{-3} a 10^{-5} mutaciones de pares de bases por secuencia por generación (Schug *et al.*, 1997). Una de las ventajas de trabajar

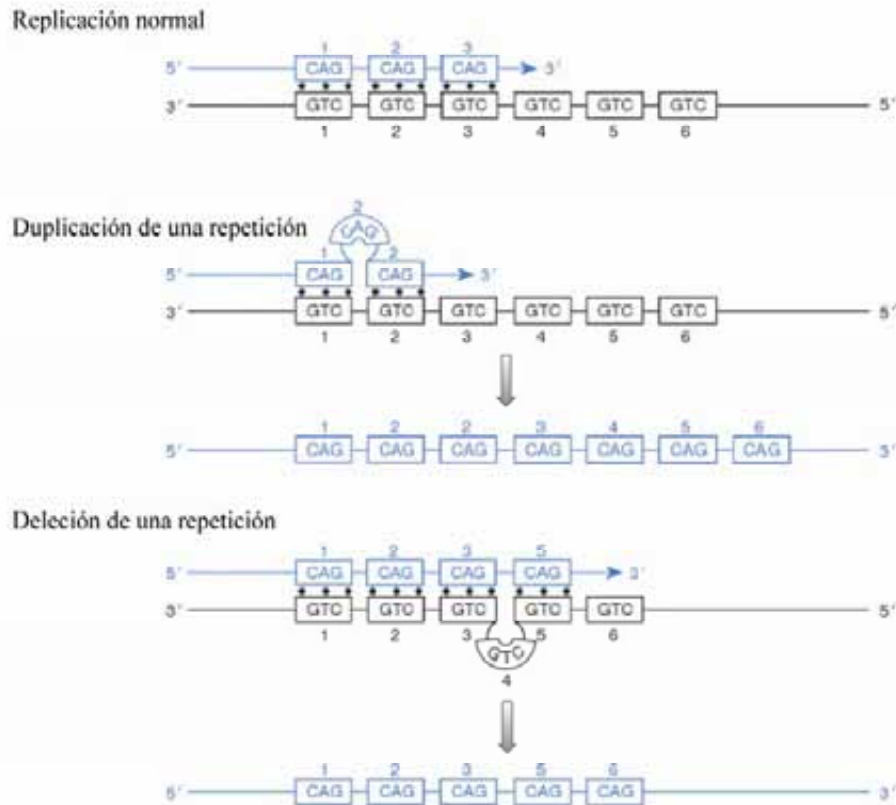


Fig. 2. Generación de duplicaciones o deleciones por error en el apareamiento durante la replicación entre repeticiones contiguas (tomado de Strachan y Read, 1999).

con microsatélites es que son marcadores moleculares codominantes, esto quiere decir que se pueden distinguir los individuos homocigos de los heterocigos (Goldstein y Pollock, 1997; Beaumont y Bruford, 1999). Debido a estas características, los microsatélites han sido utilizados ampliamente a nivel intraespecífico para evaluar sistemas de cruce, diversidad genética, flujo génico, parentesco y variación geográfica (Dowling *et al.*, 1996).

El mecanismo predominante por el cual mutan los segmentos de microsatélites es el *slipped-strand mispairing* (Chambers y MacAvoy, 2000). Cuando este mecanismo ocurre dentro de un arreglo de microsatélite durante la síntesis de ADN, puede dar como resultado la ganancia o pérdida de una o más unidades de repetición, dependiendo de si la nueva cadena de ADN se curva o la cadena templada lo hace, respectivamente (Fig. 2).

La comprensión de los procesos de mutación de los microsatélites es esencial dado que, a partir de éstos, se realizan estimaciones de diferentes parámetros poblacionales. Los modelos de

mutación que se emplean con mayor frecuencia son: el modelo de alelos infinitos (o IAM, por sus siglas en inglés; Kimura y Crow, 1964) y el modelo de mutación paso a paso (o SMM, por sus siglas en inglés; Kimura y Ohta, 1978). El primero supone que una mutación puede generar cualquier número de repeticiones, originando un estado alélico que no se encontraba previamente en la población; mientras que el segundo supone que la generación de nuevos alelos puede darse por la ganancia o la pérdida de una sola repetición, por lo que los alelos pueden mutar hacia un estado ya presente en la población.

Diversidad y Estructura Genética

La ley de Hardy–Weinberg

Los fundamentos de la genética de poblaciones se expresan en la ley de Hardy–Weinberg, la cual describe la distribución de las frecuencias genotípicas de una población y, establece que, después de una generación, éstas pueden conocerse en función de sus frecuencias alélicas (Hedrick, 2005). Esta ley describe lo que le ocurre a los alelos y a los genotipos en una población *ideal* que es infinitamente grande, con apareamiento al azar, y en donde no existe ninguna fuerza evolutiva (selección natural, mutación, deriva génica y migración). Bajo estas condiciones, el modelo de Hardy–Weinberg realiza dos predicciones:

- a) Las frecuencias de los alelos de la poza génica no cambian con el tiempo.
- b) Si se consideran dos alelos en un locus, A_1 y A_2 , entonces después de una generación con apareamiento al azar las frecuencias de los genotipos $A_1A_1 : A_1A_2 : A_2A_2$ en una población pueden ser calculados como:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1,$$

donde p = frecuencia del alelo A_1 y q = frecuencia del alelo A_2 .

Se dice que una población se encuentra en el *equilibrio de Hardy–Weinberg* cuando cumple estos criterios. No obstante, las poblaciones naturales evolucionan y, por ende, sus frecuencias alélicas y genotípicas fluctúan con el tiempo. Por esta razón, el equilibrio de Hardy–Weinberg constituye un modelo nulo que nos permite inferir qué fuerzas evolutivas están ejerciendo presión sobre una determinada población (Hedrick, 2005).

Variación genética

La variación genética está determinada por un conjunto de secuencias de un locus que difieren entre sí, mejor conocidas como alelos. Esta variación puede generar cambios funcionales en la bioquímica o la morfología de un individuo, y tener impacto en su tasa de reproducción, supervivencia o conducta; por tal motivo, la variación genética constituye la materia prima de la evolución (Hedrick, 2005).

La variación genética de una población puede medirse como la cantidad de heterocigos que ésta presenta asumiendo el modelo de Hardy–Weinberg (Nei, 1987). A esta medida se le llama *heterocigosis esperada* y se calcula como:

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2,$$

donde k es el número de alelos y p_i la frecuencia del alelo i .

Otro parámetro que cuantifica la variación genética es la *diversidad nucleotídica*, que es equivalente al número promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias (Nei, 1987), esto es:

$$\pi = \sum_{ij} p_i p_j \pi_{ij},$$

donde p_i representa la frecuencia de la secuencia i , p_j la frecuencia de la secuencia j y π_{ij} la proporción de nucleótidos que difieren entre ambas secuencias.

Estructura genética

La distribución de la variación genética dentro y entre las poblaciones constituye la estructura genética (Trejo, 2005). Las especies frecuentemente presentan poblaciones subdivididas o estructuradas, en las cuales la migración es inexistente o muy limitada, ocasionando que éstas no muestren el comportamiento de una población única con apareamiento al azar (Hedrick, 2005).

La estructura poblacional puede deberse a factores geográficos, ecológicos o conductuales (Hedrick, 2005), y depende, en última instancia, de la interacción entre las diferentes fuerzas evolutivas, las cuales pueden generar aislamiento entre las subpoblaciones y contribuir a la diferenciación genética entre las mismas.

Para evaluar el efecto que tiene la subdivisión en las poblaciones, Wright (1921) definió tres *coeficientes F* en términos de un locus con dos alelos, relacionados directamente con los tres niveles que presenta una población subdividida, es decir, la variación genética distribuida a nivel poblacional (T), subpoblacional (S) e individual (I) (Hartl y Clark, 1997; Hedrick, 2005).

El parámetro F_{ST} nos ayuda a determinar el grado de diferenciación genética entre subpoblaciones y se define como una medida de la diferencia que existe entre la probabilidad de tomar al azar dos alelos idénticos dentro de una subdivisión y la probabilidad de tomar al azar dos alelos idénticos en toda la especie (Gillespie, 1998). La ecuación que define a F_{ST} según Wright (1921) es:

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T},$$

donde H_T es la heterocigosis esperada a nivel global y H_S es la heterocigosis promedio esperada a nivel subpoblacional. De este modo, si no hay subdivisión poblacional, F_{ST} tenderá a cero; mientras que en el caso contrario, para subpoblaciones que son muy distintas, F_{ST} tenderá a 1.

Otro parámetro que detecta el efecto de la subdivisión en las poblaciones es el índice de fijación F_{IS} , el cual mide la reducción de la heterocigosis de un individuo debido al apareamiento no aleatorio dentro de su subpoblación (Hartl y Clark, 1997); esto es:

$$F_{IS} = \frac{H_S - H_O}{H_T},$$

donde H_O es la heterocigosis promedio observada a nivel subpoblacional. Este coeficiente puede abarcar tanto valores positivos como negativos. Si F_{IS} tiende a -1 existe un exceso de heterocigos en la subpoblación, mientras que cuando tiende a 1 existe un exceso de homocigos dentro de la misma. Cuando F_{IS} no difiere significativamente de cero, la subpoblación presenta apareamiento al azar.

Por último, el estadístico F_{IT} o *coeficiente de endogamia total de un individuo*, mide la reducción en la heterocigosis de un individuo con respecto a la población total (Hartl y Clark, 1997), y se calcula de la siguiente manera:

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_O}{H_T}.$$

Al igual que con el índice de fijación F_{IS} , el coeficiente F_{IT} se aproxima a -1 cuando existe un exceso de heterocigos en la población, y a la unidad en caso contrario. Cuando el estadístico F_{IT} no difiere significativamente de cero, la población total presenta apareamiento al azar.

Distancia genética

La distancia genética representa las diferencias de las frecuencias alélicas entre dos poblaciones (Nei, 1987). Una de las medidas de distancia genética es la D_S de Nei (1987); para calcular este índice, primero se necesita obtener la identidad genética (I), que expresa la probabilidad de que la selección al azar de un alelo en dos poblaciones diferentes (x y y) sea igual a la probabilidad de hallar alelos idénticos dentro de cada una de las poblaciones (Hartl y Clark, 1997), esto es:

$$I = \frac{J_{xy}}{\sqrt{J_x J_y}},$$

donde

$$J_{xy} = \sum_{i=1}^k p_{i,x} p_{i,y}, \quad J_x = \sum_{i=1}^k p_{i,x}^2, \quad J_y = \sum_{i=1}^k p_{i,y}^2,$$

y $p_{i,x}$ y $p_{i,y}$ representan las frecuencias del alelo i en las poblaciones x y y , respectivamente. A partir de la identidad genética (I), la distancia genética (D_S) puede ser expresada como:

$$D_S = -\ln(I).$$

La identidad genética (I) toma valores que van de cero, si no se comparten alelos entre las poblaciones, hasta 1 si sus frecuencias alélicas son idénticas. La distancia genética (D_S) tiene un valor de cero si las poblaciones presentan frecuencias alélicas idénticas, y de infinito si no comparten ningún alelo (Hedrick, 2005).

Es de esperarse que las distancias genéticas y las distancias geográficas entre las poblaciones se correlacionen (Wright, 1943; Kimura y Weiss, 1964), a menos que barreras de diferentes tipos interrumpan el flujo génico (Hellberg, 1995). A este principio se le conoce como *aislamiento por distancia* (Wright, 1951) e indica que los individuos más cercanos geográficamente tienden a aparearse con mayor frecuencia en relación a aquellos que se encuentran más distantes.

Fragmentación del Hábitat

La fragmentación del hábitat puede definirse como la transformación de hábitat continuo en un mosaico de parches remanentes inmersos, generalmente, en una matriz de vegetación altamente modificada (Saunders *et al.*, 1991; Young *et al.*, 1996). La fragmentación incluye tres procesos: una reducción en el área de distribución, el surgimiento de unidades discretas separadas e incomunicadas, y el *efecto de borde*. El primer proceso implica cambios en el paisaje que rodea a los fragmentos remanentes; el segundo depende del tiempo de aislamiento, la distancia y la conectividad entre las poblaciones; y el tercero genera cambios físicos y bióticos asociados con la interacción entre dos ecosistemas adyacentes separados por una transición abrupta (Murcia, 1995; Laurance y Bierregaard, 1997).

En un nivel particular, las unidades demográficas son eliminadas o reducidas en tamaño, quedando poblaciones pequeñas y aisladas que son más susceptibles a la extinción local debido a la endogamia y disminución de la fecundidad (Eguiarte y Piñero, 1999), a la invasión de especies exóticas y transmisión de enfermedades (Suzán, 1998), y a las catástrofes naturales (Lande, 1988; Suzán, 1998). Además, la alteración del hábitat reduce la posibilidad de recolonización y el intercambio genético entre las poblaciones (Wilcox y Murphy, 1985).

Evolución en poblaciones fragmentadas

Los impactos genéticos de la fragmentación del hábitat dependen críticamente del flujo génico entre los fragmentos. Cuando existe flujo génico restringido la fragmentación conduce a una mayor endogamia y a la pérdida de diversidad genética, provocando divergencia entre los fragmentos e incrementado el riesgo de extinción de una especie (Gilpin y Soulé, 1986; Frankham *et al.*, 2002).

La mutación, la migración, la selección y la deriva génica determinan la evolución tanto de las poblaciones grandes como de las poblaciones pequeñas. No obstante, se considera que la deriva génica es la fuerza evolutiva de mayor relevancia para las poblaciones pequeñas (y por lo tanto de poblaciones fragmentadas), ya que ésta provoca pérdida de diversidad genética a corto plazo en función de los tamaños efectivos (Frankham *et al.*, 2002).

Deriva génica

La deriva génica es el cambio al azar en las frecuencias alélicas que resulta del muestreo de gametos de una generación a otra en poblaciones finitas (Hedrick, 2005). En última instancia, la deriva génica causará la fijación de un alelo dentro de una población (y la consecuente pérdida del resto) en función de su frecuencia inicial y del tamaño efectivo poblacional (Wright, 1931). Por esto, en poblaciones pequeñas, simplemente por azar, algunos alelos (especialmente los raros) pueden no pasar a la siguiente generación y perderse.

Asimismo, la deriva génica produce una pérdida de heterocigos de una población a una tasa dada por (Hedrick, 2005):

$$\frac{H_t}{H_0} = \left(1 - \frac{1}{2N_e}\right)^t,$$

donde H_0 es la heterocigosis esperada al tiempo cero, H_t la heterocigosis esperada al tiempo t y N_e es el tamaño efectivo de la población.

De esta manera, el muestreo al azar de gametos en poblaciones pequeñas acarrea tres consecuencias de vital importancia para la evolución y la conservación: cambios aleatorios en las frecuencias alélicas de una generación a la otra, pérdida de diversidad genética y fijación de alelos (que no necesariamente confieren ventajas selectivas) dentro de una población, y diversificación entre poblaciones derivadas de una fuente original (Frankham *et al.*, 2002).

Endogamia

La endogamia implica la reproducción entre individuos emparentados por ancestría (Frankham *et al.*, 2002). Este fenómeno, por sí mismo, no cambia las frecuencias alélicas de una población, pero sí aumenta la frecuencia de los homocigos dentro de la misma con respecto a lo estipulado por el principio de Hardy–Weinberg.

La probabilidad de que dos alelos homólogos de un individuo sean idénticos por descendencia se calcula mediante el *coeficiente de endogamia* f , el cuál es análogo al coeficiente F_{IS} , y mide las desviaciones que existen entre la heterocigosis observada (H_O) y la esperada ($2pq$):

$$f = 1 - \frac{H_o}{2pq}.$$

Por lo tanto, cuando existe endogamia, $H_o < 2pq$ y $f > 0$.

En poblaciones pequeñas, la probabilidad de encuentro con un pariente aumenta a tal grado que la endogamia es inevitable. De hecho, los coeficientes de endogamia se incrementan con el tiempo en función del tamaño efectivo poblacional (Hedrick, 2005):

$$f_t = 1 - \left(1 - \frac{1}{2N_e}\right)^t.$$

Evidentemente, la endogamia se incrementa a una mayor tasa en poblaciones pequeñas que en poblaciones grandes, y esta premisa es de vital importancia para la conservación de especies amenazadas porque este fenómeno aumenta la probabilidad de expresar alelos deletéreos que pueden afectar la adecuación promedio de una población, o lo que es lo mismo, provocar una *depresión por endogamia* (Frankham *et al.*, 2002).

Flujo génico

El flujo génico uniformiza a las poblaciones de una especie y contrarresta la diferenciación genética que pudiera ocurrir por el aislamiento geográfico (Slatkin, 1987). Este concepto se utiliza para indicar el movimiento que existe entre diferentes grupos que resulta en un intercambio genético (Hedrick, 2005); sin embargo, esto resulta muy difícil de cuantificarse en poblaciones naturales. Por esta razón, se han utilizado medidas de estructuración genética, tales como el coeficiente F_{ST} , para calcular el número de migrantes entre poblaciones.

Muchas poblaciones fragmentadas se comportan como islas, en donde existe un intercambio recíproco de individuos (Wright, 1951). De acuerdo con este modelo, el flujo génico entre las diferentes subpoblaciones puede ser estimado como:

$$Nm = \frac{1 - F_{ST}}{4F_{ST}},$$

donde Nm es equivalente al número de migrantes por generación. Además de éste, existen otros patrones de migración entre poblaciones fragmentadas, como el modelo de *stepping-stone* lineal y el modelo de *stepping-stone* bidimensional (Fig. 3).

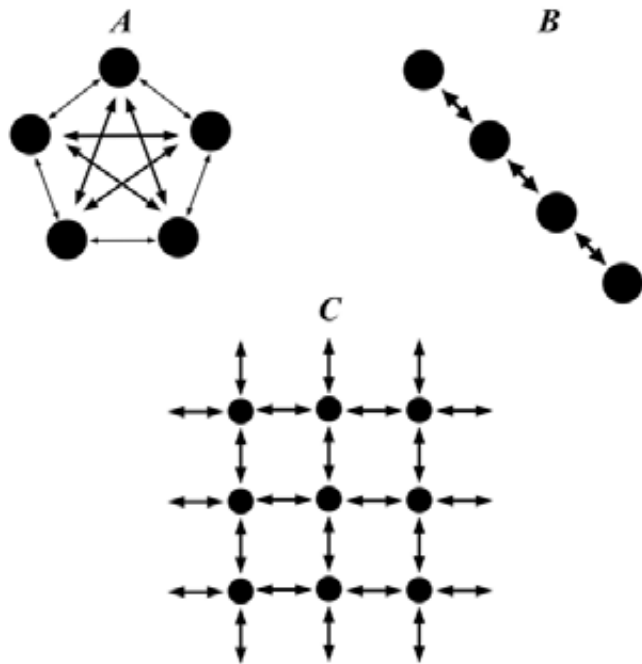


Fig. 3. Modelos de flujo génico en poblaciones fragmentadas (tomado de Frankham *et al.* 2002). A) Modelo de islas, en donde existe un intercambio recíproco de individuos en todas las poblaciones. B) Modelo de *stepping-stone* lineal, en donde solamente las poblaciones adyacentes intercambian migrantes. C) Modelo de *stepping-stone* bidimensional, en donde las poblaciones vecinas intercambian migrantes.

En términos generales, se ha propuesto que un migrante por generación, $Nm = 1$, es suficiente para contrarrestar los efectos de la deriva génica entre poblaciones (Wright, 1951; Slatkin, 1987); sin embargo, se recomiendan niveles mayores de flujo génico ($Nm > 5$) para especies amenazadas (Mills y Allendorf, 1996).

El vórtice de la extinción

Cuando las poblaciones son pequeñas son más propensas a la extinción, ya que los factores estocásticos (tanto genéticos como demográficos) aceleran su decline (Primack *et al.*, 2001). El vórtice de la extinción, en términos genéticos, se inicia cuando en una población con un tamaño efectivo reducido predominan la deriva génica y la endogamia. Como ya se explicó con anterioridad, ambos factores disminuyen la diversidad genética y favorecen la expresión de alelos deletéreos, los cuales inciden directamente sobre la adecuación individual y el potencial evolutivo de una especie. Cuando esto sucede, disminuye la tasa reproductiva y aumenta la mortalidad dentro de la población hasta que, con el tiempo, ésta se vuelve cada vez más pequeña y se extingue (Gilpin y Soulé, 1986; Fig. 4).

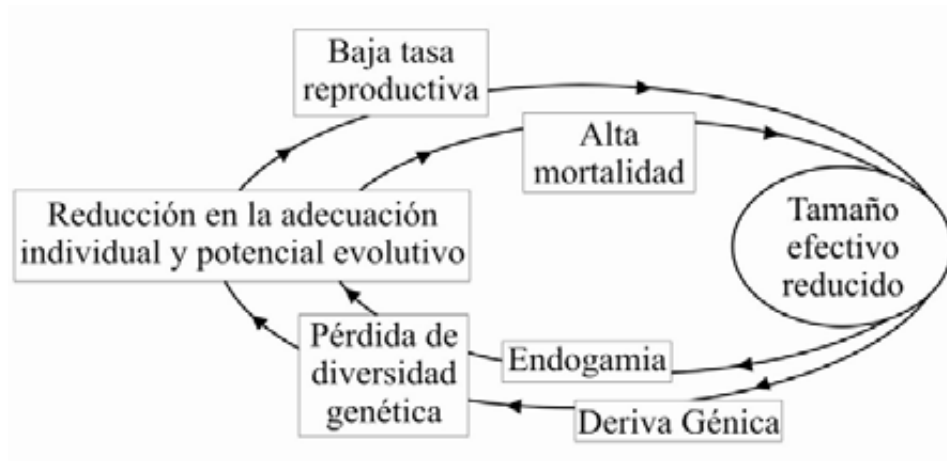


Fig. 4. Vórtice de la extinción (tomado de Rocha y Gasca, 2007).

Caracterización de la Especie

Clasificación

Spermophilus perotensis o ardilla terrestre del Perote (Merriam, 1893) es un roedor que pertenece a la familia Sciuridae, la cual incluye a los perros de las praderas, marmotas, ardillas terrestres, arborícolas y voladoras. En México esta familia se encuentra representada por siete géneros (*Ammospermophilus*, *Cynomys*, *Glaucomys*, *Sciurus*, *Spermophilus*, *Tamias* y *Tamiasciurus*) y 35 especies, de las cuales 13 son endémicas (Valdéz, 2003; Ceballos y Oliva, 2005).

Descripción

S. perotensis es una ardilla terrestre que presenta el cuerpo robusto, las patas cortas, y una cola que no sobrepasa el tercio de la longitud total del cuerpo (Fig. 5). La coloración del pelo en el dorso varía de canela leonada, con pequeñas manchas blancas o ligeramente rosadas. El moteado es irregular y poco evidente. La cabeza presenta una tonalidad más oscura que el resto del cuerpo. Alrededor del ojo se distingue un anillo blanquecino. Desde la parte media de la cola hasta el extremo distal presenta una mayor proporción de pelos negros entremezclados. La región ventral, incluyendo la parte interior de las patas, varía de rosa pálido hasta blanco grisáceo. Presenta cinco pares de mamas y no hay dimorfismo sexual (Howell, 1938; Hall, 1981; Ceballos y Oliva, 2005).



Fig. 5. Izquierda: *S. perotensis* en el ecotono matorral xerófilo–pastizal, Perote, Veracruz (Foto: Gerardo Ceballos). Derecha: *S. perotensis* saliendo de su madriguera en el Valle del Oriental (Foto: Universidad Veracruzana).

Historia natural y ecología

Habita en las laderas pedregosas de pendiente ligera y en sitios planos de suelos profundos de pastizales halófitos, con asociaciones de nopaleras, chollas y magueyes. En el límite de su distribución se encuentran cerca del bosque de pino. Se refugian en madrigueras que construyen en el suelo, pero también ocupan los túneles abandonados de tuzas (*Pappogeomys merriami*). La entrada es plana, y en ocasiones se encuentran en la base de los nopales o chollas (Valdéz y Ceballos, 1997).

Su actividad anual es de aproximadamente nueve meses, ya que en los meses más fríos del año, de diciembre a febrero, hiberna. La madurez sexual se alcanza antes del primer año de vida y, posiblemente, el tiempo generacional se encuentra entre 2.42–3.83 años (Zammuto, 1987). La época de reproducción se inicia con el apareamiento en mayo. El período de gestación comprende desde junio hasta agosto y es similar al reportado por ardillas del mismo género, entre 28 y 30 días. Tienen en promedio seis embriones y cuatro crías por camada (Davis, 1944; Valdéz y Ceballos, 1997), y los juveniles se observan desde julio a octubre.

Su alimentación es básicamente herbívora, consumiendo una gran variedad de plantas anuales; sin embargo, también consumen insectos. Viven en colonias, pero sus miembros ocupan sistemas de madrigueras individuales. Sólo se les ve en parejas durante el período de cópula y durante las primeras semanas después de que emergen de la madriguera por primera vez los juveniles (Valdéz y Ceballos, 1997).

Son simpátricas con otras ardillas terrestres como *Spermophilus variegatus* y *Spermophilus mexicanus*, y con mamíferos pequeños como tuzas (*Pappogeomys merriami*) y ratas canguro (*Dipodomys phillipsi*). Sus principales depredadores son la comadreja (*Mustela frenata*), algunas aves rapaces (*Buteo jamaicensis*) y, actualmente, perros domésticos (Ceballos y Oliva, 1997).

Las ardillas terrestres son especies clave para la dinámica y conservación de los pastizales donde habitan (Miller *et al.*, 1994), y tienen impactos profundos en las características bióticas y abióticas del ecosistema (Ceballos *et al.*, 1999). Al cavar sus madrigueras subterráneas, las ardillas remueven cantidades considerables de tierra al exterior, modificando la infiltración y el curso del agua en el suelo. Además, contribuyen a la fertilización del suelo y promueven la producción primaria mediante actividades de forrajeo (Ceballos *et al.*, 1999).

Distribución

S. perotensis es una especie endémica de México que se distribuye en el Valle del Oriental, entre los estados de Puebla y Veracruz, México (Fig. 6). Dicho Valle ocupa un área de 5250 km² y se encuentra rodeado por un cinturón de formaciones rocosas que incluye a la Sierra de Tlaxco al N, el volcán de La Malinche al W, la Sierra de Soltepec al S, y los volcanes Citlaltépetl y Cofre de Perote al E (Reyes Cortés, 1979). En esta región el clima es de tipo semiárido, con una precipitación media anual de 369.7 mm y lluvias temporales de junio a septiembre. La temperatura media anual es de 11.9 °C, aunque los rangos de temperatura pueden variar desde 14.7 °C en junio hasta 8.8 °C en enero (García, 1987).

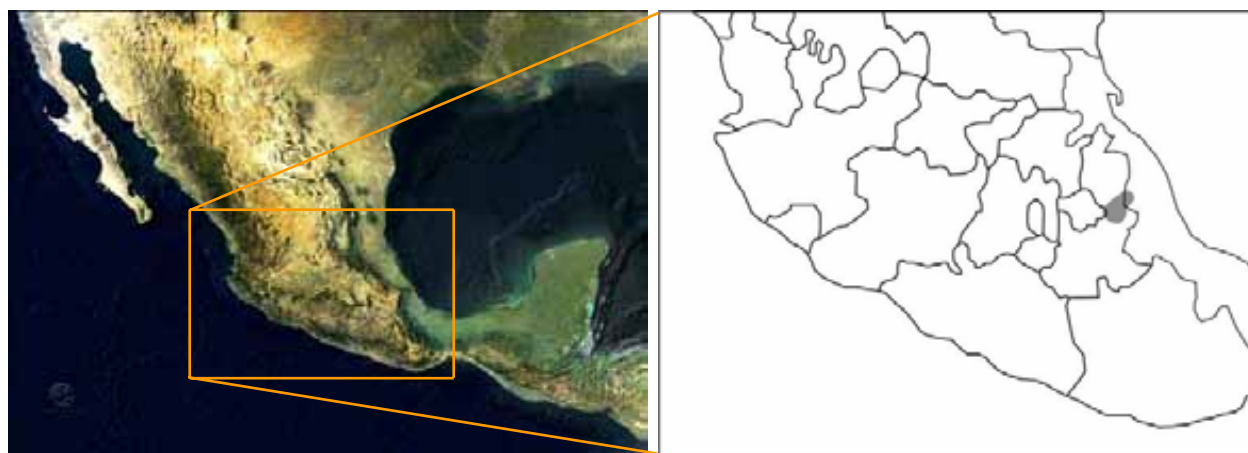


Fig. 6. Distribución potencial de *S. perotensis* en el Valle del Oriental, entre los estados de Puebla y Veracruz, México (tomado de Ceballos y Oliva, 1997).



Fig. 7. Localidades de captura de *S. perotensis* en el Valle del Oriental, entre los estados de Puebla y Veracruz. Localidad 1–Ciudad Serdán; Localidad 2–San Salvador El Seco; Localidad 3–Tepayahualco; Localidad 4–Pizarro; Localidad 5–Totalco; Localidad 6–Perote.

Estado de conservación

La ardilla terrestre del Perote presenta una distribución muy fragmentada, confinada exclusivamente al Valle del Oriental, entre los estados de Puebla y Veracruz (*Fig. 6*), y restringida a un gradiente altitudinal muy estrecho (2340–2370 msnm) (Ceballos y Oliva, 2005). Se ha reportado un fuerte impacto en su hábitat, especialmente el cercano a la carretera federal 140 (*Fig. 7*), en donde la vegetación natural ha sido modificada por la agricultura, el sobrepastoreo y la urbanización (Valdéz y Ceballos, 1997). La localidad tipo de esta especie se ha reducido considerablemente en las últimas décadas y la mayoría de sus poblaciones se encuentran muy separadas. Por esta razón, desde 1994 se le considera como una especie amenazada en México (NOM–059–ECOL–1994), aunque la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, 2008) la tiene enlistada en una categoría de bajo riesgo (Lr/nt).

Antecedentes

En 1994, Wauters y colaboradores describieron el efecto de la fragmentación del hábitat en la demografía y la variación genética de la ardilla roja (*Sciurus vulgaris*). En este estudio se observó que el tamaño de la población adulta varió de 17 a 29 ardillas en los fragmentos, y de 336 a 660 ardillas en terrenos no perturbados. También, se observó que la densidad poblacional en éstos últimos fue mayor que en los fragmentos. Se encontró que la similitud genética está inversamente correlacionada con el tamaño poblacional, y que la pérdida de variación genética y las densidades poblacionales observadas en los fragmentos son el resultado de tasas de migración reducidas.

En 1997, Barratt y colaboradores estudiaron la estructura genética de poblaciones fragmentadas de ardillas rojas (*S. vulgaris*) en el Reino Unido. Para dicho trabajo, se examinó la relación filogenética y la diversidad genética de 12 poblaciones fragmentadas del Reino Unido y tres localidades no perturbadas de la Europa continental. Para efectuar estos análisis se utilizaron 536 pb de la región control mitocondrial, encontrándose un total de 26 haplotipos. Se constató que las poblaciones no perturbadas mostraron mayores niveles de diversidad genética que las poblaciones fragmentadas, concluyéndose que los patrones de diversidad genética observados en éstos últimos corresponden a eventos de deriva génica recientes y que, debido a éstos, no fue posible asociar linajes maternos con su distribución geográfica.

En 1999, Gavin y colaboradores analizaron la estructura genética de la ardilla terrestre *Spermophilus brunneus brunneus*, que es endémica de los Estados Unidos y presenta una distribución fragmentada. Se utilizaron cinco isoenzimas para cuantificar diferentes índices de estructuración genética de 11 poblaciones de *S. b. brunneus*. Se encontró diferenciación genética en las localidades geográficamente más aisladas ($F_{ST} = 0.034\text{--}0.124$; $p < 0.05$) y se observó un fuerte efecto de aislamiento por distancia entre éstas, consistente con un modelo de flujo génico de tipo *stepping-stone*.

En 2001, Hale y colaboradores midieron el efecto de la fragmentación del hábitat en la estructura genética de poblaciones de ardillas rojas (*S. vulgaris*). Para este trabajo se emplearon cuatro microsatélites nucleares y se utilizaron especímenes colectados entre 1918 y 2000. Se encontró que, históricamente, la fragmentación del hábitat ha tenido un efecto sobre la estructura genética, la cual aumentó progresivamente conforme el grado de aislamiento de las poblaciones. En este trabajo también se informa que los esfuerzos actuales de restauración ecológica en el Reino Unido han contribuido a mantener la conectividad del hábitat y la cohesividad genética entre las poblaciones de esta especie.

En 2005, Garner y colaboradores examinaron la diversidad genética y la divergencia poblacional de las subespecies alopátricas *S. b. brunneus* y *S. b. endemicus*, provenientes de ambientes fragmentados. Para este trabajo se utilizaron ocho microsatélites nucleares, así como 474 pb de la región control mitocondrial. Los análisis nucleares revelaron que *S. b. brunneus* exhibió mayores niveles de diversidad genética ($H_E = 0.58$) que *S. b. endemicus* ($H_E = 0.43$); por su parte, casi todos los coeficientes de diferenciación genética de las poblaciones de estas subespecies resultaron ser significativos ($F_{ST} > 0$; $p < 0.05$), y los índices de distancia genética variaron de $D_S = 0.09\text{--}0.39$ para *S. b. brunneus* y de $D_S = 0.04\text{--}0.64$ para *S. b. endemicus*. En cuanto a la información mitocondrial, se encontraron en total 12 haplotipos (tres para *S. b. brunneus* y nueve para *S. b. endemicus*). De manera alarmante, todas las poblaciones examinadas de *S. b. brunneus* mostraron una diversidad haplotípica de $H_d = 0$, mientras que, en promedio, este índice fue de $H_d = 0.37$ para las poblaciones de *S. b. endemicus*. Cabe mencionar también que éstas últimas mostraron en promedio una diversidad nucleotídica de $\pi = 0.0017$. Finalmente, no se detectó un patrón filogeográfico a nivel intraespecífico porque no fue posible agrupar muestras procedentes de la misma población.

En 2005, Selonen y colaboradores estudiaron la diversidad genética de *Pteromys volans*, una ardilla voladora de los bosques boreales de Finlandia. Para este trabajo se utilizaron siete

microsatélites nucleares, y se concluyó que la fragmentación del hábitat ha ocasionado estructuración genética reciente y aislamiento por distancia entre las poblaciones de esta especie. Estudios con radiotelemetría revelaron que las habilidades dispersoras de estas ardillas son muy buenas; sin embargo, los valores de diferenciación genética indicaron que el flujo génico entre las poblaciones distantes es limitado. A pesar de que los índices de diversidad genética de *P. volans* fueron similares al reportado para otras especies de ardillas, los autores concluyeron que la conservación de parches de hábitat prístinos es primordial para mantener la cohesividad genética entre las poblaciones de ardillas voladoras.

Justificación

La diversidad genética se relaciona con la adecuación individual (Coulson *et al.*, 1998; Coltman *et al.*, 1999; Cassinello *et al.*, 2001) y con la capacidad de las poblaciones para adaptarse a la heterogeneidad ambiental (Lande, 1988; Lacy, 1997). Por esta razón, la pérdida de diversidad genética constituye uno de los principales factores a considerarse para la conservación de una gran variedad de especies amenazadas (Frankham *et al.*, 2002; Garner *et al.*, 2005a), ya que su deterioro incrementa la probabilidad de extinción (Boyce, 1992; Hedrick, 1995; Reed y Frankham, 2003).

Además, se ha observado que la fragmentación del hábitat restringe en gran medida el flujo génico entre las poblaciones naturales (Lacy, 1988; Clarke y Young, 2000) e intensifica los problemas asociados con la endogamia y la deriva génica (Templeton y Read, 1994; Frankham *et al.*, 2002). A medida que la distancia geográfica entre los fragmentos y el tiempo a partir del aislamiento se incrementan, se espera que disminuya la diversidad genética en las poblaciones, provocando divergencia entre éstas (Frankham *et al.*, 2002).

Debido a esto, es necesario implementar estudios de genética en especies amenazadas para comprender la magnitud de las fuerzas evolutivas que imperan en sus poblaciones y de esta manera optimizar esfuerzos para su conservación. Así, es relevante conocer los niveles de diversidad y estructuración genética de *S. perotensis*, una especie con una distribución altamente fragmentada, amenazada y endémica de México.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar el impacto de la fragmentación del hábitat en la diversidad y estructura genética de la ardilla terrestre del Perote (*S. perotensis*).

Objetivos Particulares

- Comparar la diversidad y la estructura genética entre poblaciones históricas y actuales de *S. perotensis*.
- Conocer diversos aspectos de su biología mediante el uso de diferentes marcadores moleculares.
- Proponer estrategias para la protección y manejo de esta especie endémica de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Para el presente trabajo se utilizaron 34 ejemplares históricos de *S. perotensis* provenientes de cinco poblaciones (Tabla 1; Fig. 7), colectados entre 1990 y 1992 por el Dr. Manuel Valdéz (Apéndice 4). De éstos, fue posible aislar tejido dactilar para estudios genéticos posteriores.

Del mismo modo, en julio del 2007, se capturaron 44 ardillas provenientes de tres poblaciones (Tabla 1; Fig. 7; Apéndice 4) utilizando trampas Tomahawk y crema de cacahuete con avena como carnada. De éstos, se extrajeron manualmente 200 pelos de la punta de la cola y se cortaron 2 mm del tejido de la misma, los cuales fueron colocados y etiquetados en sobres de papel y tubos con alcohol al 70%, respectivamente. Posteriormente, cada individuo capturado fue sanado con agua oxigenada y marcado con violeta de genciana, para después ser liberado en el campo.

Es importante mencionar que, para los propósitos del presente trabajo, se refirió como *ejemplares históricos* a los individuos colectados entre 1990–1992, y *ejemplares actuales* a los colectados en el 2007.

Tabla 1. Ubicación geográfica de las poblaciones de *S. perotensis* utilizadas para este estudio.

Población	n	Estado	Coordenadas	
			N	W
Ejemplares históricos de <i>S. perotensis</i>				
Tepeyahualco [†]	5	Puebla	19°29'00''	97°30'00''
Totalco [§]	15	Veracruz	19°30'00''	97°21'00''
Perote	12	Veracruz	19°34'25''	97°14'47''
Ciudad Serdán	1	Puebla	18°52'35''	97°20'45''
San Salvador El Seco	1	Puebla	19°15'00''	97°34'00''
Total	34			
Ejemplares actuales de <i>S. perotensis</i>				
Tepeyahualco [†]	16	Puebla	19°29'08.69''	97°29'08.23''
Totalco [§]	14	Veracruz	19°31'20.27''	97°19'57.85''
Pizarro	14	Puebla	19°29'03.13''	97°27'24.26''
Total	44			

[†] [§] = poblaciones en común para ambos muestreos.

Extracción de ADN

La extracción de ADN del tejido dactilar y del tejido de la cola de las ardillas se efectuó utilizando el Dneasy™ Tissue Kit modificado (Qiagen Co., USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante (*Apéndice 1*). Para la extracción de ADN del pelo de las ardillas se utilizó la resina quelante Chelex (Resina BioRad Chelex 100), la cual es capaz de recuperar grandes cantidades de material genético en muestras limitadas (*Apéndice 2*).

Amplificación

Región control mitocondrial

Para amplificar la región control mitocondrial en los ejemplares actuales se utilizaron los primers L15933 y H637 (Oshida *et al.*, 2001; *Tabla 2*; *Fig. 8*). Debido a que en los ejemplares históricos el ADN se encontraba fragmentado, la amplificación de dicha región fue posible mediante el diseño de cuatro primers internos, los cuales fueron acoplados con los primers externos antes mencionados de la siguiente manera: L15933/CR1R, CR1F/CR2R y CR2F/H637 (*Tabla 2*; *Fig. 8*).

Todas las reacciones de PCR (Polymerase Chain Reaction) contenían 25 ng/μl de ADN, 1X de Tris-HCl pH 8.3, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP's, 0.4 μM de cada primer y 3 U Taq polimerasa (Applied Biosystems), para un volumen final de 25 μl. Todas las amplificaciones incluyeron un ciclo inicial de desnaturalización de 3 min a 95 °C, seguidas por 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 50 °C y 2 min a 72 °C. La extensión final fue de 10 min a 72 °C (Kolstia *et al.*, 2000, modificado).

Tabla 2. Primers utilizados para amplificar la región control mitocondrial en *S. perotensis*.

Primer		Secuencia (5'–3')	Referencia
L15933	F	CTCTGGTCTTGTAACCAAAAATG	Oshida <i>et al.</i> , 2001
CR1R	R	GGTAGGGGATAGTCATTTGG	El presente estudio, 2008
CR1F	F	CCAAATGACTATCCCCTACC	El presente estudio, 2008
CR2R	R	GGTGAGTCCCTGCATCCCC	El presente estudio, 2008
CR2F	F	GGGGGATGCAGGGACTCACC	El presente estudio, 2008
H637	R	AGGACCAAACCTTTGTGTTTATG	Oshida <i>et al.</i> , 2001

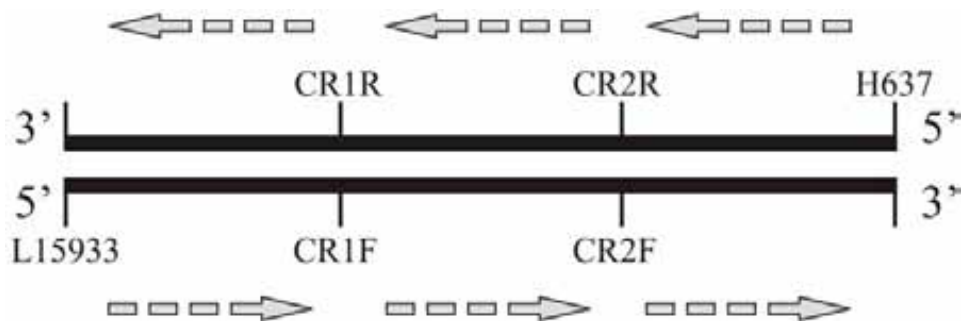


Fig. 8. Primers mitocondriales externos (L15933 y H637) e internos (CR1F, CR2F, CR1R y CR2R) utilizados para amplificar la región control de *S. perotensis*. Las flechas indican el sentido de la replicación (5'–3').

Microsatélites

Para cada muestra se emplearon dos microsatélites nucleares: IGS–110b (May *et al.*, 1997) y A8 (Jones *et al.*, 2005) (Tabla 3). Las reacciones de PCR para ambos marcadores moleculares se llevaron a cabo en volúmenes finales de 10 μ l que contenían 25 ng/ μ l ADN, 1X de Tris–HCl pH 8.3, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP's, 0.4 μ M de un primer forward fluorescente, 0.4 μ M del primer reversa y 3 U Taq polimerasa (Applied Biosystems) (Tabla 3). Las condiciones de amplificación para cada marcador molecular fueron de 3 min a 94 °C, seguidas de 30–35 ciclos de 1 min a 94 °C, 30 s a T_a °C, 30 s a 72 °C, y una temperatura de extensión de 4 min a 72 °C (Tabla 3).

Tabla 3. Loci de microsatélites amplificados para *S. perotensis*.

Locus	Secuencia (5'–3')	Unidad de repetición	T_a *	C [¶]	Referencia
IGS–110b	F CCATGGAAGCATGTCTGGTG	TGC	52	35	May <i>et al.</i> , 1997
	R TGCTTCCTGATTTCAAAGTTGC				
A8	F ATCACGGCATTGCTCTTAC	GT	57	30	Jones <i>et al.</i> , 2005
	R ATTCCAACCAAACAGTTGTAGA				

* T_a = temperatura de alineación; ¶C = número de ciclos.

Secuenciación

Región control mitocondrial

La secuenciación de los fragmentos amplificados de la región control mitocondrial se llevó a cabo en Macrogen Inc. (Seúl, Korea), utilizando un secuenciador automático 3730xl. Para evitar problemas de contaminación, cada muestra fue secuenciada por duplicado. Los electrofenogramas se compararon y alinearon haciendo uso del programa BioEdit 5.0.6 (Hall, 1999). Para verificar su autenticidad, las secuencias compiladas se sometieron a un análisis de BLAST estándar nucleótido–nucleótido (Altschul *et al.*, 1990) en la base de datos de GenBank.

Microsatélites

La genotipificación de los microsatélites nucleares se realizó en un secuenciador ABI–Avant 100 utilizando 9 µl de Big Dye Terminator Sequencing kit (Applied Biosystems), 0.5 µl de LIZ–600 (Applied Biosystems) y 0.5 µl del producto de PCR, sometiendo la muestra a un paso previo de desnaturalización a 95°C durante 5 min. De igual manera, cada muestra fue genotipificada por duplicado.

Variación Genética

Las frecuencias alélicas de cada población fueron calculadas de acuerdo con la fórmula:

$$p_i = \frac{x_i}{n},$$

donde x_i representa el número de veces que se obtiene el alelo i en una muestra con n copias de genes.

Para la información haploide, la diversidad haplotípica fue estimada conforme a las predicciones originales de Nei (1987), utilizando una corrección para muestras pequeñas:

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

La desviación estándar de Hd fue calculada como (Nei, 1987):

$$DE(Hd) = \sqrt{\frac{2}{n(n-1)} \left\{ 2(n-2) \left[\sum_{i=1}^k p_i^3 - \left(\sum_{i=1}^k p_i^2 \right)^2 \right] + \sum_{i=1}^k p_i^2 - \left(\sum_{i=1}^k p_i \right)^2 \right\}}.$$

Para la información diploide, la heterocigosis esperada H_E y su desviación estándar fueron calculadas asumiendo que $n = 2n$ (Nei, 1987).

La diversidad nucleotídica en las diferentes poblaciones fue estimada como (Tajima, 1993):

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum_{ij} p_i p_j \pi_{ij}.$$

La desviación estándar de π fue calculada de la siguiente manera (Nei, 1987):

$$DE(\pi) = \sqrt{\frac{4}{n(n-1)} \left[(6-4n) \left(\sum_{i<j} p_i p_j \pi_{ij} \right)^2 + (n-2) \sum p_i p_j p_k \pi_{ij} \pi_{ik} + \sum_{i<j} p_i p_j \pi_{ij}^2 \right]}.$$

Posteriormente, se realizó una prueba *t-Student* para comprobar si existen diferencias significativas entre la Hd , H_E y π de las poblaciones históricas y las poblaciones actuales.

Para finalizar, se realizó una curva de rarefacción tabulando el número acumulativo de haplotipos encontrados en las poblaciones históricas y en las poblaciones actuales con respecto al tamaño de muestra (Leonard *et al.*, 2005). Para lograr esto, se realizó un *remuestreo* de los haplotipos mitocondriales en Microsoft® EXCEL 2000, estimando el número de haplotipos sorteados de acuerdo con su frecuencia en la muestra y con el tamaño de la misma.

Estructura Genética

Coefficientes F

Los coeficientes F utilizados para el presente estudio se basaron en las ecuaciones de Cockerham y Weir (1987), asumiendo un modelo de alelos infinitos (IAM), esto es:

$$F_{IS} = \frac{Q_1 - Q_2}{1 - Q_2}, \quad F_{ST} = \frac{Q_2 - Q_3}{1 - Q_3},$$

donde Q_1 es la probabilidad de identidad de dos genes tomados del mismo individuo, Q_2 la probabilidad de identidad de dos genes tomados de diferentes individuos de la misma población y

Q_3 la probabilidad de identidad de dos genes tomados de dos diferentes poblaciones. Se decidió utilizar este modelo, y no el de mutación paso a paso (SMM), por ser un estimador menos sesgado para tamaños de muestra pequeños y pocos loci (Gaggiotti *et al.*, 1999). Los niveles de significancia de cada estadístico fueron evaluados con el programa GENEPOP 4.0 (Rousset, 2007) utilizando 1000 permutaciones.

Flujo génico

El flujo génico entre las diferentes poblaciones de *S. perotensis* se calculó a partir de la fórmula (Wright, 1951; Slatkin, 1995):

$$M = \frac{1 - F_{ST}}{2F_{ST}},$$

donde $M = N_f m$ (número de hembras migrantes por generación) para información mitocondrial y $M = 2Nm$ para información nuclear.

Varianza molecular

Para saber cómo se encuentra distribuida la variación genética dentro de cada una de las poblaciones examinadas se realizó un análisis de varianza molecular o AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992) utilizando el programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2007). Este análisis arroja estimados de los componentes de la varianza y valores análogos a los coeficientes F , designados como estadísticos Φ , reflejando la correlación de la diversidad genética a diferentes niveles de subdivisión jerárquica.

Los estadísticos Φ fueron calculados de la siguiente manera:

$$\Phi_{ST} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2}, \quad \Phi_{IS} = \frac{\sigma_b^2}{\sigma_b^2 + \sigma_c^2}, \quad \Phi_{IT} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}{\sigma_T^2},$$

donde σ_T^2 constituye la varianza molecular total, σ_a^2 el componente de la covarianza que se debe a las diferencias alélicas entre las poblaciones, σ_b^2 el componente de la covarianza que se debe a las diferencias alélicas en las poblaciones dentro de un grupo y σ_c^2 el componente de la covarianza que se debe a las diferencias entre los alelos de una población. Los niveles de significancia de cada estadístico Φ fueron calculados utilizando 1000 permutaciones.

Distancias Genéticas

Para observar diferencias genéticas a nivel interpoblacional, se construyeron dos dendogramas UPGMA con el programa PHYLIP 3.6 (Felsenstein, 2005). El primero se basó en el número de diferencias pareadas observadas entre las secuencias de la región control mitocondrial de cada población; esto es:

$$d_{xy} = \sum_{i=1}^L \delta_{xy}(i),$$

donde $\delta_{xy}(i)$ constituye la función de Kronecker, igual a 1 si los alelos del i -ésimo locus son idénticos para los dos haplotipos, e igual a 0 en caso contrario. Para el segundo dendograma, se utilizó una matriz de distancias genéticas de Nei (1987) generada en el programa TFGPA 1.3 (Miller, 1997).

Asociación entre Distancias Genéticas y Distancias Geográficas

Se realizó la prueba de Mantel (1967) con el programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2007) para verificar que las matrices de valores de distancias genéticas y de distancias geográficas realmente estén correlacionadas. Dicha prueba consiste en asociar dos o más matrices mediante permutaciones que permiten obtener una distribución empírica nula del coeficiente de correlación. De esta manera, es posible comprobar si existe aislamiento por distancia en las poblaciones de estudio.

La matriz de distancias geográficas se calculó a partir de las coordenadas geográficas con el programa ARCVIEW 3. Los niveles de significancia de cada prueba fueron evaluados con el programa TFGPA 1.3 (Miller, 1997) utilizando 1000 permutaciones.

Red de Haplotipos

La red de haplotipos mitocondriales se generó con el programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000), que utiliza parsimonia estadística (Templeton *et al.*, 1992) para hacer un algoritmo que comienza estimando el número máximo de diferencias entre haplotipos como resultado de sustituciones simples con un 95% de confianza. Después se conectan los haplotipos hasta que el límite de parsimonia es alcanzado, que en este caso fue de cinco pasos mutacionales.

Filogenia Molecular

Con base en los haplotipos mitocondriales se elaboró una filogenia molecular con el método Neighbor-Joining, incorporando el modelo de sustitución Kimura 2-parámetros (Kimura, 1980). Dicho árbol fue construido con el programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) utilizando una secuencia de la región control mitocondrial de *Spermophilus spilosoma* (No. en GenBank DQ106858) como grupo externo. Asimismo, a cada nodo se le asignó un valor de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) para 1000 réplicas con el fin de mostrar la validez estadística de la topología obtenida.

Distribución *Mismatch*

Una distribución *mismatch* es una tabulación del número de diferencias por pares entre todas las secuencias de ADN en una muestra (Harpending, 1994). Mediante esta tabulación es posible obtener información sobre los tamaños poblacionales pasados de una especie (Rogers, 1995), ya que un crecimiento poblacional súbito o un cuello de botella reciente produce distribuciones unimodales, mientras que una población con tamaño estable produce distribuciones *arrugadas* y *erráticas* (Slatkin y Hudson, 1991). De acuerdo con estos últimos autores, una población estable presenta una distribución geométrica:

$$Q(i) = \frac{1}{1 + \theta} \left(\frac{\theta}{1 + \theta} \right)^i,$$

donde i es equivalente al número de sitios polimórficos entre cada par de secuencias de ADN y $\theta = 2N_{ef}u$, siendo N_{ef} el tamaño efectivo poblacional de las hembras y u la tasa de mutación por secuencia de ADN por generación.

Los valores esperados de diferencias pareadas de una población que ha experimentado una expansión súbita o un cuello de botella reciente pueden obtenerse con base en el modelo de Rogers y Harpending (1992), que contempla tres parámetros: N_0 , N_1 y t (N_0 = tamaño efectivo poblacional inicial de las hembras, N_1 = tamaño efectivo poblacional de las hembras posterior al crecimiento o decrecimiento de la población inicial, t = número de generaciones entre N_0 y N_1). A partir de éstos se obtienen la theta inicial ($\theta_0 = 2N_0u$), la theta final ($\theta_1 = 2N_1u$) y la tau ($\tau = 2ut$). De acuerdo con este modelo, es posible calcular θ_0 y τ de una serie de secuencias asumiendo que θ_1 es infinito.

Ambos modelos fueron simulados en el programa DnaSP 4.10 (Rozas *et al.*, 2003), utilizando las secuencias mitocondriales de la muestra total. En Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2007), se realizó una prueba estadística para evaluar si estas muestras han experimentado una expansión demográfica súbita.

Estimadores *Theta*

Dado que $\theta = 2Mu$ (donde $M = N_{ef}$ para información mitocondrial y $M = 2N_e$ para información nuclear), este índice se convierte en un estimador indirecto del tamaño efectivo poblacional. Para las secuencias mitocondriales se utilizó el estimador θ_S (Watterson, 1975), mientras que para la información nuclear se utilizó el estimador θ_H (Zouros, 1979).

Theta (S)

Para las secuencias mitocondriales se utilizó parámetro θ_S (Watterson, 1975; Nei, 1987), asumiendo que las mutaciones son selectivamente neutras y que no existe recombinación; esto es:

$$\theta_S = \frac{S}{a_1},$$

donde S es la proporción de sitios segregantes de una muestra de n secuencias de ADN y

$$a_1 = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}.$$

La desviación estándar de θ_S se estimó como (Tajima, 1993):

$$DE(\theta_S) = \sqrt{\frac{a_1^2 S + a_2 S^2}{a_1^2 (a_1^2 + a_2)}},$$

donde

$$a_2 = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i^2}.$$

Se utilizó la prueba de Tajima (1989) para determinar si los patrones de variación encontrados en las secuencias de la región control mitocondrial son consistentes con la teoría neutral. Esta prueba se define mediante el estadístico D , el cual fue estimado de la siguiente manera:

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

donde $\theta_\pi = \pi$. Si la población se encuentra en equilibrio neutral, entonces el estadístico $D = 0$. Si algunas de las variantes alélicas son ligeramente deletéreas, $\theta_S > \theta_\pi$ y $D < 0$. Por el contrario, cuando existe ventaja del heterócigo, $\theta_S < \theta_\pi$ y $D > 0$ (Hedrick, 2005). Los niveles de significancia del estadístico D fueron evaluados utilizando 1000 permutaciones con el programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2007), asumiendo selección neutral y equilibrio poblacional.

Theta (Hom)

Para los microsatélites se estimó el número de mutaciones por generación θ_H (Zouros, 1979) a partir de la homocigosis esperada (Hom_E), asumiendo un modelo de alelos infinitos (IAM) y que las poblaciones se encuentran en equilibrio entre la deriva génica y la mutación, esto es:

$$\theta_H = \frac{1 - Hom_E}{Hom_E},$$

donde

$$Hom_E = 1 - H_E.$$

La desviación estándar de θ_{Hom} fue estimada como (Chakraborty y Weiss, 1991):

$$D.E.(\theta_H) = \frac{(2 + \theta)^2 (3 + \theta)^2 D.E.(H_E)}{H_E^2 (1 + \theta) [(2 + \theta)(3 + \theta)(4 + \theta) + 10(2 + \theta) + 4]}.$$

Para finalizar, se realizó una prueba *t-Student* para comprobar si existen diferencias significativas entre la θ_S y θ_H de las poblaciones históricas y las poblaciones actuales.

Tamaño Efectivo Poblacional

Se utilizó el modelo de pérdida de diversidad genética para calcular el tamaño efectivo de las poblaciones de Tepeyahualco y Totalco; esto es (Hedrick, 2005):

$$\frac{H_t}{H_0} = e^{-\frac{t}{M}},$$

donde $M = N_{ef}$ para información mitocondrial y $M = 2N_e$ para información nuclear. Para obtener

el parámetro H_t/H_0 se utilizaron los valores de diversidad haplotípica (H_d) y heterogicosis esperada (H_E) de la *Tabla 4*. Para calcular la constante t (número de generaciones), se consideró que ha transcurrido un lapso de 17 años entre las colectas de ejemplares históricos y actuales (*Apéndice 4*), y que el tiempo generacional de las ardillas terrestres es $T_G = 2.42\text{--}3.83$ años (Zammuto, 1987).

RESULTADOS

Variación Genética

Región control mitocondrial

Se amplificaron y secuenciaron 1145 pb de la región control mitocondrial de la muestra total (78 individuos), obteniéndose 12 haplotipos que fueron denominados con las letras A–L (*Apéndice 3*). En su totalidad, esta región mostró 21 sitios polimórficos, y todas las mutaciones observadas fueron transiciones; esto es, mutaciones en las cuales se reemplaza una pirimidina con otra pirimidina (C↔T) o una purina con otra purina (A↔G) (*Apéndice 3*).

Con respecto al número de haplotipos, se encontraron diferencias notables entre la muestra histórica y la muestra actual. Por ejemplo, los ejemplares históricos mostraron 10 haplotipos, mientras que en los ejemplares actuales solamente se observaron seis (*Fig. 9A; Apéndice 4*). Además, las poblaciones históricas presentaron en conjunto cinco haplotipos únicos (haplotipos que no se encontraron en ninguna otra población), mientras que las poblaciones actuales presentaron en total dos haplotipos únicos (*Fig. 9A; Apéndice 4*). Cabe señalar que, pese a ser pequeña, en la muestra histórica se recuperaron cuatro de los seis haplotipos encontrados la muestra actual (haplotipos A, D, E y F; *Fig. 9A; Apéndice 4*).

También, se observaron diferencias temporales en las poblaciones de Tepeyahualco y Totalco. En la muestra histórica de Tepeyahualco se encontraron cuatro haplotipos (A, E, F y K), mientras que en la muestra actual de esta población se recuperaron solamente dos (E y F) (*Fig. 9B; Apéndice 4*). Por su parte, en la población actual de Totalco se observaron dos haplotipos mitocondriales (A y B), mientras que en la muestra histórica de esta población el número de haplotipos encontrados fue de cinco (A, D, G, H e I) (*Fig. 9B; Apéndice 4*).

En los ejemplares históricos, el haplotipo A se encuentra compartido entre las poblaciones de San Salvador El Seco, Tepeyahualco, Perote y Totalco, mientras que el haplotipo H se comparte entre las poblaciones de Perote y Totalco (*Fig. 9B; Apéndice 4*). En la actualidad, se observa que Pizarro y Tepeyahualco comparten dos haplotipos (E y F), mientras que Totalco no comparte haplotipos con ninguna población (*Fig. 9B; Apéndice 4*).

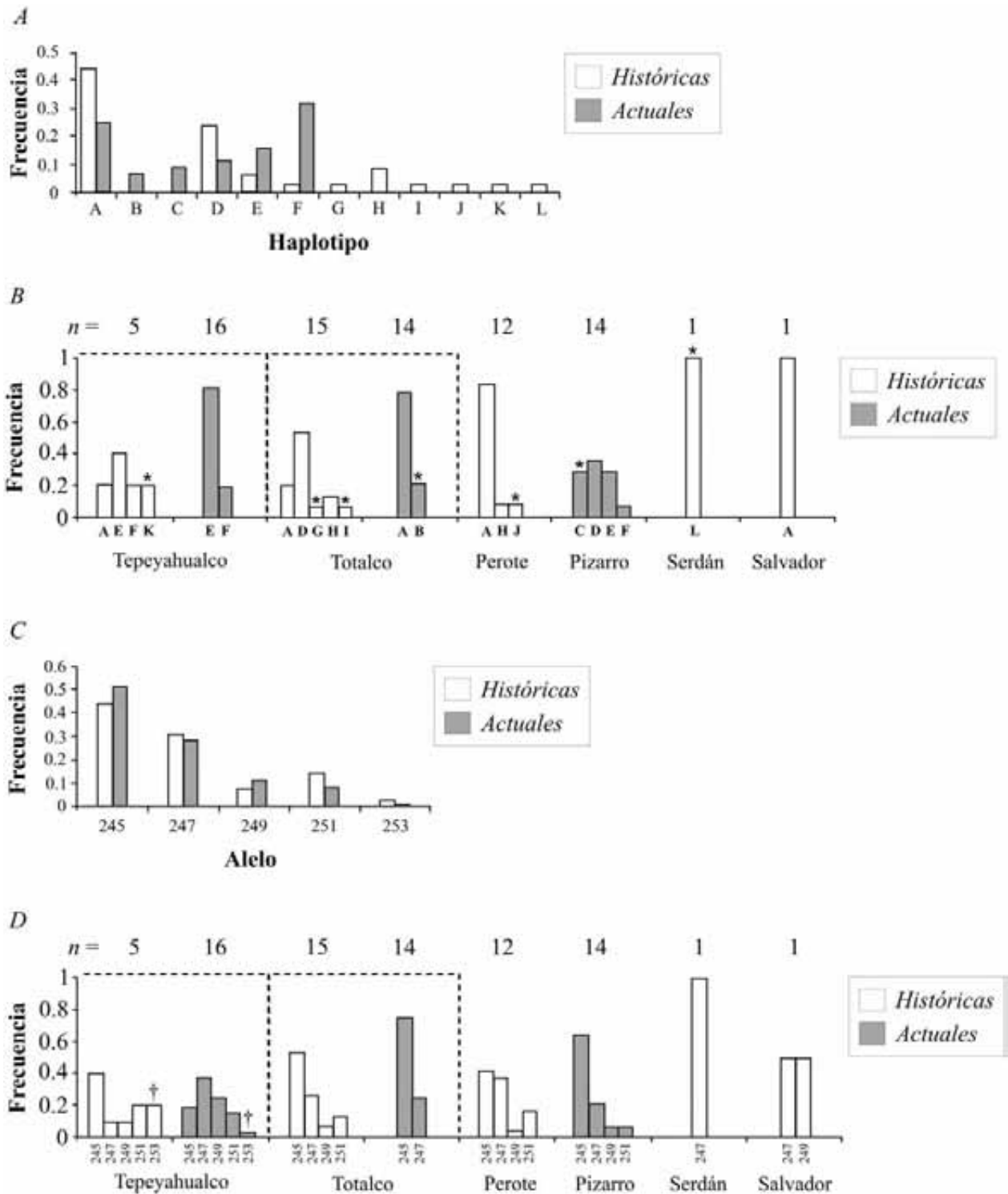


Fig. 9. A) Frecuencias de los haplotipos mitocondriales de la muestra histórica global y la muestra actual global. B) Frecuencias de los haplotipos mitocondriales por población; *haplotipos únicos por población. C) Frecuencias alélicas del microsatélite nuclear A8 de la muestra histórica global y la muestra actual global. D) Frecuencias alélicas del microsatélite nuclear A8 por población; † alelos nucleares únicos por población. Los recuadros punteados se refieren a las poblaciones en común para ambos muestreos.

Microsatélites

En cuanto a la información nuclear, solamente el microsatélite A8 resultó ser polimórfico, mostrando cinco alelos que correspondieron al peso molecular de los fragmentos amplificados (245, 247, 249, 251 y 253; *Fig. 9C; Apéndice 4*). El microsatélite nuclear IGS-110b no mostró variación genética (todos los fragmentos amplificados correspondieron a un alelo de 131 pb), por lo que no fue incorporado a estudios genéticos posteriores.

Con el microsatélite A8 se encontraron semejanzas entre la muestra histórica y la muestra actual, ya que éstas presentaron los mismos alelos nucleares (245, 247, 249, 251 y 253; *Fig. 9C; Apéndice 4*). Con respecto a las poblaciones de Tepeyahualco y Totalco, solamente ésta última ha sufrido la pérdida de alelos (249 y 251) en los últimos años (*Fig. 9D; Apéndice 4*).

En un nivel particular, se observó que, tanto la población actual de Pizarro, como las poblaciones históricas de Perote y Totalco, presentaron los mismos alelos nucleares (245, 247, 249 y 251; *Fig. 9D*). Por su parte, la población de Tepeyahualco mostró un alelo (253) que no fue encontrado en ninguna otra población (*Fig. 9D*).

Diversidad haplotípica

Con respecto a la diversidad haplotípica (H_d), se obtuvieron resultados discordantes entre la muestra histórica y la actual. Por ejemplo, se observó que, a nivel global, los ejemplares actuales presentaron una mayor diversidad haplotípica que los históricos (*Tabla 4*); mientras que, por su parte, el análisis estadístico indicó que las poblaciones históricas exhibieron la mayor diversidad haplotípica ($t = 2.58$, g. l. = 4, $p < 0.05$; *Apéndice 5*).

La curva de rarefacción sugiere que los ejemplares históricos pudieron haber presentado más del doble de los haplotipos encontrados en los ejemplares actuales (*Fig. 10*), y es posible que las poblaciones de Tepeyahualco y Totalco hayan perdido diversidad haplotípica en los últimos años (*Tabla 4*).

En lo que a las poblaciones históricas se refiere, Perote presentó la diversidad haplotípica más baja ($H_d = 0.318$) y Tepeyahualco la diversidad haplotípica más alta ($H_d = 0.900$) (*Tabla 4*). Con respecto a las actuales, Pizarro exhibió la diversidad haplotípica más elevada ($H_d = 0.758$) y Tepeyahualco la diversidad más baja ($H_d = 0.325$) (*Tabla 4*).

Tabla 4. Valores de diversidad genética y diversidad nucleotídica.

Población	<i>n</i>	Marcador mitocondrial		Marcador nuclear
		<i>Hd</i> ± <i>DE</i>	π ± <i>DE</i>	<i>H_E</i> ± <i>DE</i>
Ejemplares históricos de <i>S. perotensis</i>				
Tepeyahualco [†]	5	0.900 ± 0.161	0.0021 ± 0.0005	0.822 ± 0.097
Totalco [§]	15	0.695 ± 0.109	0.0012 ± 0.0003	0.628 ± 0.063
Perote	12	0.318 ± 0.164	0.0006 ± 0.0004	0.685 ± 0.052
Promedio	–	0.638 ± 0.295	0.0013 ± 0.0008	0.712 ± 0.100
Tepeyahualco + Totalco	20	0.811 ± 0.071	0.0015 ± 0.0003	0.686 ± 0.057
Global [¶]	34	0.756 ± 0.060	0.0018 ± 0.0006	0.685 ± 0.033
Ejemplares actuales de <i>S. perotensis</i>				
Tepeyahualco [†]	16	0.325 ± 0.125	0.0011 ± 0.0004	0.760 ± 0.039
Totalco [§]	14	0.363 ± 0.130	0.0003 ± 0.0001	0.389 ± 0.084
Pizarro	14	0.758 ± 0.060	0.0023 ± 0.0003	0.550 ± 0.091
Promedio	–	0.482 ± 0.240	0.0012 ± 0.0010	0.566 ± 0.186
Tepeyahualco + Totalco	30	0.681 ± 0.050	0.0017 ± 0.0001	0.684 ± 0.037
Global	44	0.803 ± 0.030	0.0020 ± 0.0002	0.646 ± 0.036

Hd = diversidad haplotípica; π = diversidad nucleotídica; *H_E* = heterocigosis esperada; *DE* = desviación estándar. † § = poblaciones en común para ambos muestreos. ¶ Nota: Para el análisis global de las muestras históricas se tomaron en cuenta las poblaciones de Ciudad Serdán y San Salvador El Seco.

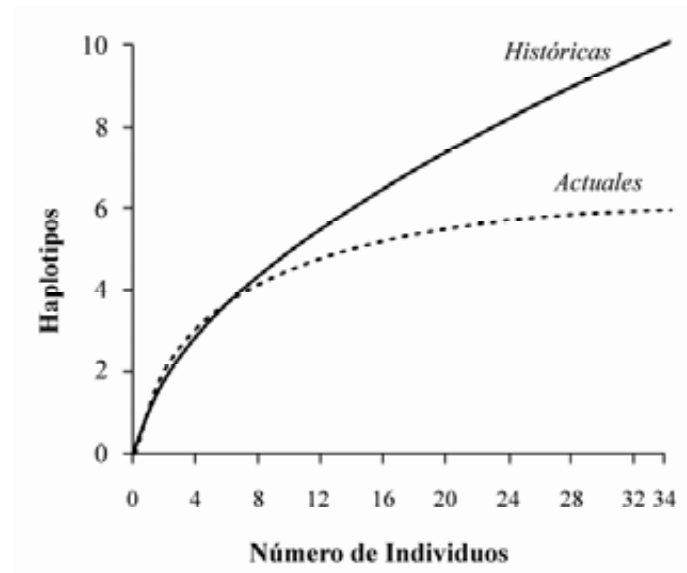


Fig. 10. Número acumulado de haplotipos mitocondriales encontrados en la muestra total de poblaciones históricas (línea continua) y poblaciones actuales (línea punteada) de *S. perotensis*.

Diversidad nucleotídica

Con respecto a la diversidad nucleotídica (π), también se obtuvieron resultados discordantes entre la muestra histórica y la muestra actual. Pese a que el análisis global indicó que los ejemplares actuales exhibieron una mayor diversidad nucleotídica que los históricos, el análisis estadístico reveló que, en promedio, éstos últimos presentaron una mayor diversidad nucleotídica ($t = 104.60$, g. l. = 4, $p < 0.05$; *Tabla 4*; *Apéndice 6*). Actualmente, Tepeyahualco y Totalco muestran una diversidad nucleotídica menor que la manifestada en el pasado; no obstante, el análisis conjunto entre ambas poblaciones (Tepeyahualco + Totalco) señaló lo contrario (*Tabla 4*).

En cuanto a las poblaciones históricas, Perote presentó la diversidad nucleotídica más baja ($\pi = 0.0006$), mientras que Tepeyahualco mostró la diversidad nucleotídica más alta ($\pi = 0.0021$) (*Tabla 4*). Con respecto a las actuales, Totalco presentó la diversidad nucleotídica más baja ($\pi = 0.0003$) y Pizarro la diversidad nucleotídica más alta ($\pi = 0.0023$), siendo inclusive mayor que la exhibida por las poblaciones históricas (*Tabla 4*).

Heterocigosis esperada

A nivel global, los ejemplares históricos mostraron una mayor heterocigosis esperada (H_E) que los actuales (*Tabla 4*). Este resultado también fue corroborado por el análisis estadístico, el cual indicó que, en promedio, las poblaciones históricas presentaron una mayor heterocigosis esperada que las actuales ($t = 6.97$, g. l. = 4, $p < 0.05$; *Apéndice 7*). También, se observaron diferencias temporales en Tepeyahualco y Totalco, donde la heterocigosis esperada fue mayor en las poblaciones históricas que en las actuales (*Tabla 4*).

En cuanto a las poblaciones históricas, Tepeyahualco presentó la heterocigosis esperada más alta ($H_E = 0.822$), mientras que Totalco mostró la heterocigosis más baja ($H_E = 0.685$) (*Tabla 4*). Esta tendencia también se observó en las poblaciones actuales, donde Tepeyahualco presentó la heterocigosis esperada más alta ($H_E = 0.760$) y Totalco la heterocigosis más baja ($H_E = 0.389$) (*Tabla 4*).

Estructura Genética

Coeficientes F

Índice de fijación F_{IS}

Los índices de fijación F_{IS} inferidos a partir del microsatélite nuclear A8 (*Apéndice 4*) indican que la población histórica de Perote y todas las poblaciones actuales de *S. perotensis* manifiestan un exceso de homocigos ($F_{IS} > 0$, $p < 0.05$; *Tablas 5A y 5B*). Además, se observó que los índices de fijación F_{IS} en las poblaciones de Tepeyahualco y Totalco han aumentado significativamente en los últimos años; por ejemplo, en la población de Tepeyahualco el índice de fijación F_{IS} ha aumentado de -0.250 ($p > 0.05$; *Tabla 5A*) a 0.350 ($p < 0.05$; *Tabla 5B*), mientras que en la población de Totalco este índice ha aumentado de 0.177 ($p > 0.05$; *Tabla 5A*) a 0.458 ($p < 0.05$; *Tabla 5B*). Por su parte, un análisis global reveló que, tanto en la muestra histórica, como en la muestra actual, existe un exceso de homocigos ($F_{IS} = 0.238$, $p < 0.05$; $F_{IS} = 0.405$, $p < 0.05$; respectivamente), aunque cabe señalar que, en esta última, el coeficiente F_{IS} es mayor.

Índice de diferenciación genética F_{ST}

Todas las poblaciones (tanto las históricas como las actuales) presentaron cierto grado de diferenciación genética ($F_{ST} > 0$, $p < 0.05$) cuando se utilizó la región control mitocondrial como marcador molecular (*Tablas 5A y 5B*). En cuanto a este respecto, el mayor índice de diferenciación genética mitocondrial entre las poblaciones históricas se observó entre Totalco–Perote ($F_{ST} = 0.371$, $p < 0.05$; *Tabla 5A*). Por si esto fuera poco, todas las poblaciones actuales de *S. perotensis* rebasaron esta cifra, lo que indica que existen altos niveles de estructuración mitocondrial en esta especie en la actualidad (*Tabla 5B*). También, se observó estructuración mitocondrial entre la población histórica y la población actual de Tepeyahualco ($F_{ST} = 0.301$, $p < 0.05$), entre la población histórica y la población actual de Totalco ($F_{ST} = 0.369$, $p < 0.05$), y entre la muestra histórica global y la muestra actual global ($F_{ST} = 0.076$, $p < 0.05$).

Con respecto al microsatélite nuclear A8, no se observó diferenciación genética en las poblaciones históricas de *S. perotensis* (Tabla 5A). En contraste, algunas poblaciones actuales, como Tepeyahualco–Totalco ($F_{ST} = 0.235$, $p < 0.05$) y Tepeyahualco–Pizarro ($F_{ST} = 0.138$, $p < 0.05$) mostraron diferenciación genética con este marcador molecular (Tabla 5B). No se observó estructuración nuclear entre la población histórica y la población actual de Tepeyahualco ($F_{ST} = 0.031$; $p > 0.05$), entre la población histórica y la población actual de Totalco ($F_{ST} = 0.021$; $p > 0.05$), ni entre las muestra histórica global y la muestra actual global ($F_{ST} = -0.008$; $p > 0.05$).

Tabla 5A. Coeficientes F de las poblaciones históricas de *S. perotensis*.

Población	Tepeyahualco	Totalco	Perote
Tepeyahualco	-0.250	-0.004	-0.009
Totalco	0.193**	0.177	-0.031
Perote	0.355**	0.371**	0.524*

En la diagonal principal (sombreado) se muestran los índices de fijación F_{IS} de las poblaciones históricas de *S. perotensis*. Las cifras por debajo de la diagonal principal indican los valores de diferenciación genética F_{ST} derivados de la región control mitocondrial. Las cifras por encima de la diagonal principal indican los valores de F_{ST} obtenidos con el microsatélite nuclear A8. * $F_{IS} > 0$, $p < 0.05$. ** $F_{ST} > 0$, $p < 0.05$.

Tabla 5B. Coeficientes F de las poblaciones actuales de *S. perotensis*.

Población	Tepeyahualco	Totalco	Pizarro
Tepeyahualco	0.350*	0.235**	0.138**
Totalco	0.657**	0.458*	-0.024
Pizarro	0.399**	0.440**	0.228*

En la diagonal principal (sombreado) se muestran los índices de fijación F_{IS} de las poblaciones actuales de *S. perotensis*. Las cifras por debajo de la diagonal principal indican los valores de diferenciación genética F_{ST} derivados de la región control mitocondrial. Las cifras por encima de la diagonal principal indican los valores de F_{ST} obtenidos con el microsatélite nuclear A8. * $F_{IS} > 0$, $p < 0.05$. ** $F_{ST} > 0$, $p < 0.05$.

Flujo génico

Los valores de flujo génico inferidos a partir de la región control mitocondrial son muy bajos. De hecho, casi ningún valor superó la unidad en cuanto al número de hembras migrantes por generación (N_m) entre las diferentes poblaciones. De acuerdo con este marcador, las poblaciones históricas presentaron mayor flujo génico que las poblaciones actuales (Tablas 6A y 6B). En lo que respecta al microsatélite nuclear A8, se observaron valores de flujo génico muy altos entre las poblaciones históricas (Tabla 6A), a diferencia de las poblaciones actuales de Tepeyahualco–Totalco y Tepeyahualco–Pizarro, donde el flujo génico fue muy limitado (Tabla 6B).

Los valores de flujo génico entre Tepeyahualco–Totalco han disminuido considerablemente en los últimos años. Por ejemplo, en el pasado estas poblaciones intercambiaban 2.095 hembras por generación, mientras que en la actualidad intercambian solamente 0.261 hembras por generación. Por su parte, el marcador nuclear indicó que, históricamente, el flujo génico entre Tepeyahualco–Totalco era muy alto ($N_m = \infty$), mientras que en el presente los eventos migratorios entre estas poblaciones son escasos ($N_m = 0.816$) (Tablas 6A y 6B).

Tabla 6A. Valores de flujo génico entre las diferentes poblaciones históricas de *S. perotensis*.

Población	Tepeyahualco	Totalco	Perote
Tepeyahualco		Infinito	Infinito
Totalco	2.095		Infinito
Perote	0.909	0.848	

Las cifras por debajo de la diagonal principal (sombreado) indican el número de migrantes femeninos por generación (N_m) derivados de la región control mitocondrial. Las cifras por encima de la misma indican los valores de N_m obtenidos con el microsatélite nuclear A8.

Tabla 6B. Valores de flujo génico entre las diferentes poblaciones actuales de *S. perotensis*.

Población	Tepeyahualco	Totalco	Pizarro
Tepeyahualco		0.816	1.558
Totalco	0.261		Infinito
Pizarro	0.754	0.637	

Las cifras por debajo de la diagonal principal (sombreado) indican el número de migrantes femeninos por generación (N_m) derivados de la región control mitocondrial. Las cifras por encima de la misma indican los valores de N_m obtenidos con el microsatélite nuclear A8.

Varianza molecular

El análisis de varianza molecular (AMOVA) indicó que en los ejemplares históricos la mayor parte de la variación genética mitocondrial se encontraba agrupada dentro de las poblaciones (68.24%), mientras que el restante 31.76% de la variación se encontraba concentrada entre las diferentes poblaciones (*Tabla 7A*). En contraste, cambios recientes en la estructura genética de esta especie han provocado que el mayor porcentaje de la variación molecular mitocondrial se distribuya entre las poblaciones (50.47%; *Tabla 7B*), ocasionando un aumento en el estadístico Φ_{ST} (*Tablas 7A y 7B*).

En cuanto a la información nuclear, se observó que el 78.96% de la variación genética histórica se encontraba concentrada entre individuos de diferentes poblaciones ($\Phi_{IT} = 0.210$; *Tabla 7C*), mientras que, en la actualidad, este índice ha decrecido hasta ocupar el 56.83% de la variación total ($\Phi_{IT} = 0.432$; *Tabla 7D*). Asimismo, este análisis reveló que, en la actualidad, existe estructuración nuclear entre las poblaciones ($\Phi_{ST} = 0.143$, $p < 0.05$; *Tabla 7D*), cosa que no sucedía en el pasado ($\Phi_{ST} = -0.019$; $p > 0.05$; *Tabla 7C*). Por último, el porcentaje de la variación nuclear comprendido entre individuos de la misma población aumentó de 22.92% ($\Phi_{IS} = 0.225$, $p < 0.05$; *Tabla 7C*) a 28.84% ($\Phi_{IS} = 0.337$, $p < 0.05$; *Tabla 7D*).

Tabla 7A. Análisis de varianza molecular de la región control mitocondrial de los ejemplares históricos.

Origen de la variación	g. l.	Suma de cuadrados	Componente de la varianza	% de la variación	Estadístico Φ
Entre poblaciones	2	3.240	0.135	31.76	$\Phi_{ST} 0.318^*$
Dentro de poblaciones	29	8.417	0.290	68.24	

* $p < 0.05$

Tabla 7B. Análisis de varianza molecular de la región control mitocondrial de los ejemplares actuales.

Origen de la variación	g. l.	Suma de cuadrados	Componente de la varianza	% de la variación	Estadístico Φ
Entre poblaciones	2	7.550	0.242	50.47	$\Phi_{ST} 0.505^*$
Dentro de poblaciones	41	9.723	0.237	49.53	

* $p < 0.05$

Tabla 7C. Análisis de varianza molecular del microsatélite nuclear A8 de los ejemplares históricos.

Origen de la variación	g. l.	Suma de cuadrados	Componente de la varianza	% de la variación	Estadístico Φ
Entre poblaciones	2	0.591	-0.006	-1.88	Φ_{ST} -0.019
Entre individuos de la misma población	29	12.175	0.077	22.92	Φ_{IS} 0.225*
Entre individuos de diferentes poblaciones	32	8.500	0.2656	78.96	Φ_{IT} 0.210*

* $p < 0.05$ **Tabla 7D.** Análisis de varianza molecular del microsatélite nuclear A8 de los ejemplares actuales.

Origen de la variación	g. l.	Suma de cuadrados	Componente de la varianza	% de la variación	Estadístico Φ
Entre poblaciones	2	3.631	0.049	14.33	Φ_{ST} 0.143*
Entre individuos de la misma población	41	15.960	0.098	28.84	Φ_{IS} 0.337*
Entre individuos de diferentes poblaciones	44	8.500	0.193	56.83	Φ_{IT} 0.432*

* $p < 0.05$

Distancias Genéticas

En general, se encontraron semejanzas entre el dendograma de diferencias pareadas (d_{xy}) basado en la región control mitocondrial y el dendograma de distancias genéticas (D_S) basado en el microsatélite nuclear A8 (Fig. 11). Por ejemplo, en ambos esquemas, no se observó una correspondencia temporal entre las poblaciones de *S. perotensis*; esto es, las poblaciones históricas y las actuales no se agruparon en el mismo clado (Fig. 11). Espacialmente, tampoco se observó una asociación entre las poblaciones históricas y actuales de Tepeyahualco o Totalco (Fig. 11). Otras poblaciones, como Perote (histórico) y Totalco (histórico), mostraron afinidades genéticas muy cercanas, mientras que la población actual de Tepeyahualco se encontró muy distante al resto de las poblaciones (Fig. 11).

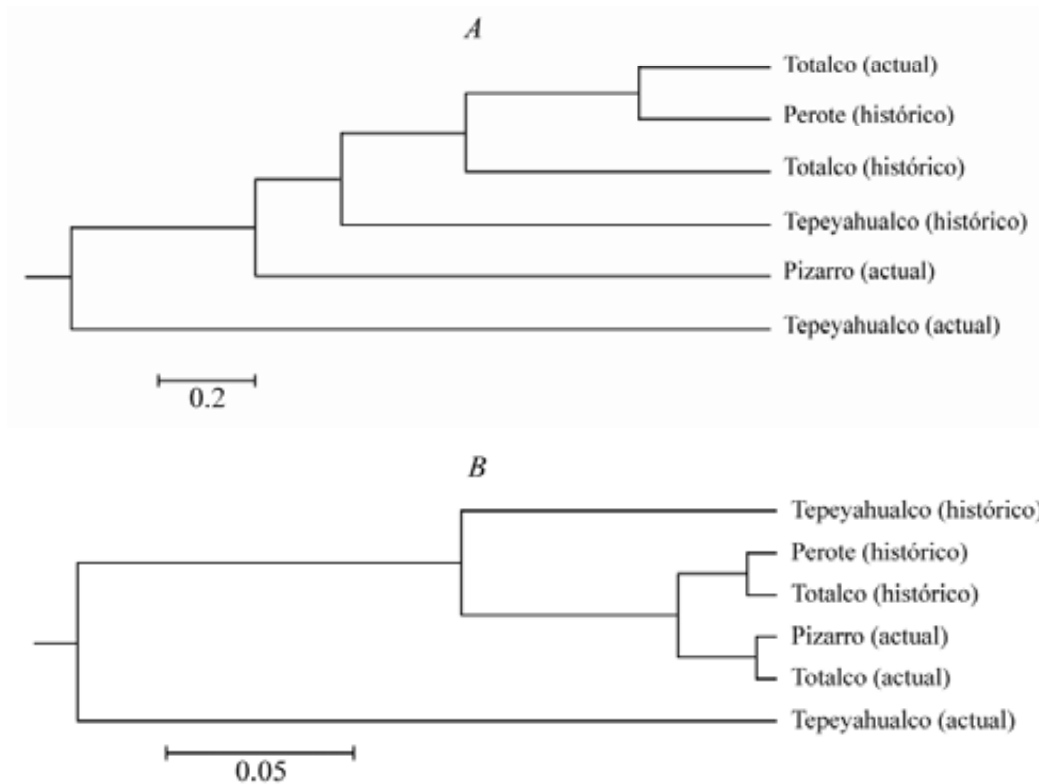


Fig. 11. Dendrogramas UPGMA de distancias genéticas entre las poblaciones históricas y actuales. A) Dendograma basado en el número de diferencias pareadas (d_{xy}) de la región control mitocondrial. La escala de la distancia genética representa 0.2 diferencias pareadas entre las poblaciones. B) Dendograma basado en la distancia genética (D_S) del microsatélite nuclear A8. La escala representa 0.05 unidades de distancia genética entre las poblaciones.

Con respecto al dendograma basado en las diferencias pareadas (d_{xy}), Totalco (actual) y Perote (histórico) se agruparon en el mismo clado (Fig. 11A). A partir de éste, surgieron las poblaciones Totalco (histórico), Tepeyahualco (histórico) y Pizarro (actual), respectivamente. La población Tepeyahualco (actual) se encontró en la parte basal del dendograma (Fig. 11A).

En el dendograma basado en las distancias genéticas (D_S) se observó que, las poblaciones históricas de Perote y Totalco, por un lado, y las poblaciones actuales de Pizarro y Totalco, por el otro, se agruparon en el mismo clado (Fig. 11B). A su vez, estas cuatro poblaciones se agruparon en el mismo clado, encontrándose muy distantes a Tepeyahualco (histórico) y Tepeyahualco (actual) (Fig. 11B).

Asociación entre Distancias Genéticas y Distancias Geográficas

Todas las pruebas de Mantel efectuadas para encontrar una asociación entre distancias genéticas y distancias geográficas resultaron no significativas ($p > 0.05$; Fig. 12). No obstante, parece existir una tendencia de aislamiento por distancia entre las poblaciones históricas sin importar el marcador molecular utilizado (Figs. 12A y 12C); la pendiente indica que entre más lejanas se encuentren las poblaciones, mayor distancia genética existe entre ellas. Para los otros casos, se obtuvieron valores de regresión lineal muy bajos (Figs. 12B y 12D). Cabe señalar también que los índices d_{xy} y D_S entre las poblaciones Tepeyahualco–Totalco han aumentado considerablemente en los últimos años (Fig. 12; Apéndice 8).

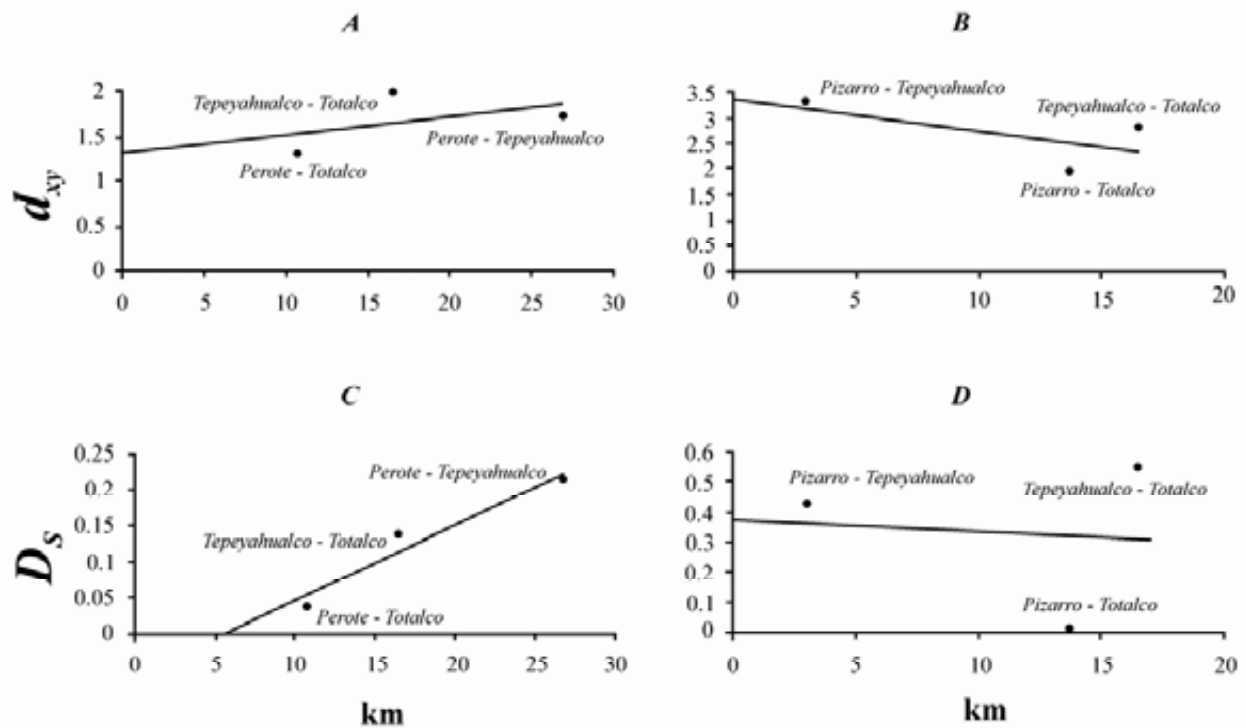


Fig. 12. Pruebas de Mantel de las poblaciones de *S. perotensis* basadas en 1000 réplicas. A) Relación entre las diferencias pareadas (d_{xy}) del ADNmt y las distancias geográficas (km) de las poblaciones históricas ($r = 0.499$, $p > 0.05$). B) Relación entre las diferencias pareadas (d_{xy}) del ADNmt y las distancias geográficas (km) de las poblaciones actuales ($r = -0.612$, $p > 0.05$). C) Relación entre las distancias genéticas nucleares (D_S) y las distancias geográficas (km) de las poblaciones históricas ($r = 0.972$, $p > 0.05$). D) Relación entre las distancias genéticas nucleares (D_S) y las distancias geográficas (km) de las poblaciones actuales ($r = -0.099$, $p > 0.05$).

Red de Haplotipos

La red de haplotipos mitocondriales reveló que no existe una asociación clara entre los linajes maternos de *S. perotensis* y su distribución geográfica (Fig. 13). De acuerdo con este esquema, deberían existir, al menos, otros cuatro haplotipos mitocondriales (puntos negros) que no fueron encontrados en la muestra.

El haplotipo más frecuente y con mayor número de conexiones fue el haplotipo A, que pertenece a las poblaciones históricas de San Salvador El Seco, Perote y Tepeyahualco, así como a la población histórica y actual de Totalco (Fig. 13; Apéndice 4). Los haplotipos B, D, E y H presentaron solamente una mutación de diferencia con respecto al haplotipo central. Los haplotipos G y K, y los haplotipos C, F, I y J, presentaron dos y tres mutaciones de diferencia con respecto al mismo haplotipo, respectivamente. A partir del haplotipo G se conectaron los haplotipos C e I, mientras que del haplotipo D se conectaron los haplotipos F y K. El haplotipo L, que proviene de Ciudad Serdán, no pudo ser conectado a la red debido a que no alcanzó el límite máximo de parsimonia (Fig. 13).

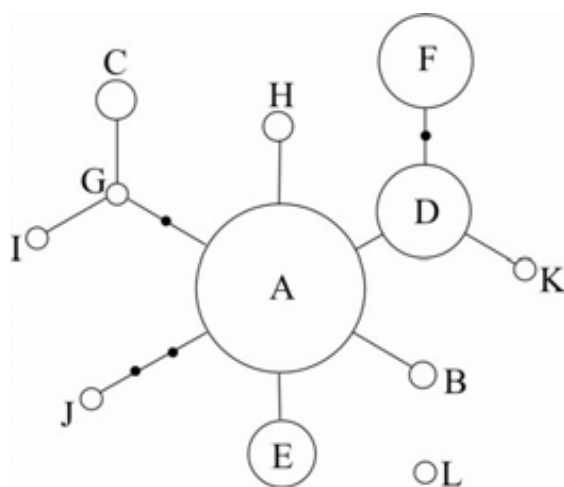


Fig. 13. Red de haplotipos de ADNmt de *S. perotensis*. El tamaño del círculo representa la frecuencia del haplotipo en relación con la muestra total. Cada línea en la red denota un cambio mutacional simple. Los círculos negros representan haplotipos hipotéticos que no se encontraron en la muestra.

Filogenia Molecular

El árbol Neighbor–Joining muestra que Ciudad Serdán, que es la población más aislada, presentó el haplotipo más raro y basal (haplotipo L; *Fig. 14*). A partir de éste, se formaron dos grupos: uno constituido por los haplotipos C, G e I, y otro conformado por los haplotipos restantes (*Fig. 14*). En cuanto al primer grupo, se observó que el haplotipo C (que proviene de Pizarro) originó un clado constituido por los haplotipos G e I, que provienen de la población histórica de Totalco (*Fig. 14*). En cuanto al segundo grupo, se observó que del haplotipo J (que fue encontrado en la población de Perote) surgieron dos clados: uno conformado por los haplotipos D, F y K, y otro compuesto por los haplotipos A, B, E y H (*Fig. 14*). A partir del haplotipo K (que proviene de la población histórica de Tepeyahualco) se originaron los haplotipos D y F, que guardan relaciones filogenéticas cercanas (*Fig. 14*). Asimismo, del haplotipo H (que fue encontrado en las poblaciones históricas de Perote y Totalco) se derivó un grupo no resuelto constituido por los haplotipos A, B y E (*Fig. 14*).

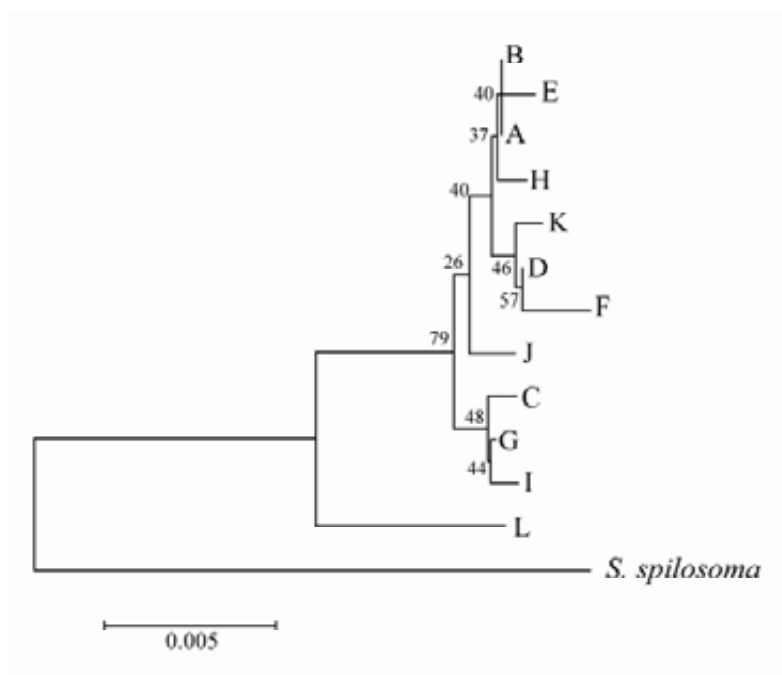


Fig. 14. Relación filogenética de los 12 haplotipos (A–L) de la región control mitocondrial (1145 pb) de *S. perotensis*. El árbol fue construido con el método Neighbor–Joining usando un modelo de sustitución Kimura 2–parámetros (Kimura, 1980). La escala de la distancia genética representa 0.005 sustituciones esperadas por sitio bajo este modelo de sustitución. El número junto a cada nodo representa los porcentajes de los valores de bootstrap para 1000 réplicas.

Distribución *Mismatch*

La muestra total exhibió una distribución *mismatch* multimodal que correspondió a crestas de una, tres y seis diferencias pareadas entre las secuencias del ADNmt; los valles, por su parte, correspondieron a dos y cinco diferencias pareadas, principalmente (Fig. 15). Dicha distribución parece no ajustarse a ningún modelo demográfico simulado (crecimiento constante y crecimiento exponencial/cuello de botella), y la prueba de expansión demográfica súbita resultó no significativa ($p > 0.05$; Fig. 15).

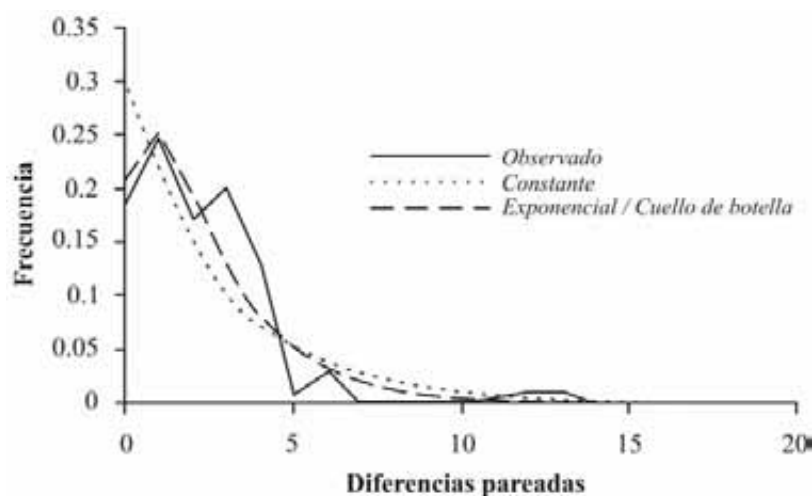


Fig. 15. Diferencias pareadas del ADNmt de la muestra total de *S. perotensis* asumiendo dos modelos demográficos: crecimiento constante y crecimiento exponencial/cuello de botella.

Estimadores *Theta*

Theta (θ_S)

A nivel global, los ejemplares históricos presentaron una $\theta_S = 4.891$, mientras que en los ejemplares actuales dicho índice fue mucho menor ($\theta_S = 1.839$) (Tabla 9). A pesar de este resultado, no se observaron diferencias significativas en la θ_S entre las poblaciones históricas y las actuales ($t = 0.93$, g. l. = 4, $p > 0.05$; Apéndice 9). Por su parte, se observó que en Tepeyahualco y Totalco el índice θ_S fue mayor en las poblaciones históricas que en las actuales; de hecho, el análisis conjunto entre ambas poblaciones (Tepeyahualco + Totalco) confirmó este resultado (Tabla 9).

Con respecto a las poblaciones históricas, Perote presentó la menor θ_S (1.325), mientras que Tepeyahualco mostró la mayor θ_S (2.400) (Tabla 9). En las poblaciones actuales, Totalco mostró la menor θ_S (0.315) y Pizarro la mayor θ_S (2.201) (Tabla 9).

Tabla 9. Estimadores *theta* y prueba de neutralidad.

Población	<i>n</i>	Marcador mitocondrial		Marcador nuclear
		$\theta_S \pm DE$	<i>D</i>	$\theta_H \pm DE$
Ejemplares históricos de <i>S. perotensis</i>				
Tepeyahualco [†]	5	2.400 ± 1.513	0	3.713 ± 2.682
Totalco [§]	15	1.538 ± 0.848	-0.281	1.367 ± 0.413
Perote	12	1.325 ± 0.794	-1.747*	1.599 ± 0.434
Promedio	–	1.754 ± 0.570	–	2.226 ± 1.293
Tepeyahualco + Totalco	20	2.537 ± 1.165	-1.156	1.665 ± 0.462
Global [¶]	34	4.891 ± 1.789	-2.007*	1.681 ± 0.290
Ejemplares actuales de <i>S. perotensis</i>				
Tepeyahualco [†]	16	1.206 ± 0.707	0.324	2.468 ± 0.563
Totalco [§]	14	0.315 ± 0.315	0.245	0.474 ± 0.168
Pizarro	14	2.201 ± 1.118	0.621	0.916 ± 0.344
Promedio	–	1.240 ± 0.944	–	1.286 ± 1.047
Tepeyahualco + Totalco	30	1.262 ± 0.661	1.371	1.646 ± 0.290
Global	44	1.839 ± 0.810	0.703	1.380 ± 0.226

θ_S = estimador *theta* de Watterson (1975); *D* = prueba de neutralidad de Tajima (1989); θ_H = estimador *theta* de Zouros (1979); *DE* = desviación estándar. † § = poblaciones en común para ambos muestreos. ¶ Nota: Para el análisis global de las muestras históricas se tomaron en cuenta las poblaciones de Ciudad Serdán y San Salvador El Seco. **p* < 0.05.

La prueba de Tajima (1989) indicó que en la población de Pizarro y en la muestra histórica global podrían existir haplotipos mitocondriales ligeramente deletéreos (*D* < 0, *p* < 0.05; *Tabla 9*). Para el resto de las poblaciones y muestras las variantes alélicas fueron selectivamente neutras (*p* > 0.05; *Tabla 9*).

Theta (*Hom*)

En conjunto, los ejemplares históricos mostraron una θ_H mayor que los ejemplares actuales (*Tabla 9*); sin embargo, con respecto a este parámetro, no se apreciaron diferencias significativas entre las poblaciones de ambas muestras (*t* = 0.81, g. l. = 4, *p* > 0.05; *Apéndice 10*). Los análisis individuales, así como el análisis conjunto, revelaron que en Tepeyahualco y Totalco el índice θ_H ha disminuido en los últimos años (*Tabla 9*). De las poblaciones históricas, Tepeyahualco mostró

la mayor θ_H (3.713), mientras que Totalco presentó la menor θ_H (1.367) (*Tabla 9*). Esta tendencia se mantiene en las poblaciones actuales, donde Tepeyahualco mostró la mayor θ_H (2.468) y Totalco la menor θ_H (0.474) (*Tabla 9*).

Tamaño Efectivo Poblacional

En general, se apreciaron semejanzas en los tamaños efectivos femeninos (N_{ef}) de Tepeyahualco y Totalco, y diferencias considerables entre los tamaños efectivos (N_e) de ambas poblaciones (*Tabla 10*). Se estimó que Tepeyahualco presenta un tamaño efectivo femenino de $N_{ef} = 4.36-6.90$ y un tamaño efectivo poblacional de $N_e = 28.26-44.72$; mientras que, para Totalco, se calculó un tamaño efectivo femenino de $N_{ef} = 6.82-10.79$ y un tamaño efectivo poblacional de $N_e = 4.64-7.34$ (*Tabla 10; Apéndice 11*).

Tabla 10. Tamaños efectivos estimados para las poblaciones de Tepeyahualco y Totalco.

Población	N_{ef}	N_e
Tepeyahualco	4.36–6.90	28.26–44.72
Totalco	6.82–10.79	4.64–7.34

N_{ef} = tamaño efectivo femenino; N_e = tamaño efectivo poblacional.

DISCUSIÓN

Consecuencias Genéticas de la Fragmentación del Hábitat

El presente trabajo sugiere que, en tan solo 17 años, *S. perotensis* ha sufrido pérdida de diversidad genética y cambios en su estructura genética debido a la reducción drástica en su área de distribución y a la creación de parches poblacionales aislados. Para empezar, la curva de rarefacción sugiere que las poblaciones históricas tenían, por lo menos, el doble de los haplotipos mitocondriales encontrados en la actualidad. Históricamente, la población de Totalco presentaba cinco haplotipos mitocondriales, y en la actualidad esta misma población exhibe solamente dos haplotipos. Lo mismo ha sucedido con la población de Tepeyahualco, que en los últimos años ha perdido dos haplotipos. Los resultados obtenidos sugieren también que estas poblaciones han estado perdiendo diversidad genética nuclear, aunque la tasa de pérdida de la misma ha sido menor. La pérdida abrupta de diversidad haplotípica podría deberse a que los genes mitocondriales presentan un tamaño efectivo cuatro veces menor que los genes nucleares y, en poblaciones pequeñas y aisladas, las fluctuaciones alélicas podrían ser considerables, incrementándose la probabilidad de fijación de un alelo y la consecuente pérdida del resto (Hughes *et al.*, 1999; Sunnucks, 2000). De acuerdo con la prueba de neutralidad (Tajima, 1989), es probable que, exceptuando a la población histórica de Pizarro y a la muestra histórica global, la pérdida de diversidad mitocondrial se deba a eventos de deriva génica.

A pesar de que los análisis globales indicaron que *S. perotensis* no ha sufrido pérdida de diversidad mitocondrial, esta conclusión puede resultar engañosa porque en la muestra histórica global existe poca representatividad de los datos. Es posible que, para este caso, el análisis más adecuado sea el de sitios segregantes entre cada par de secuencias (θ_S), el cual indicó justamente lo contrario.

Las poblaciones actuales de *S. perotensis* exhibieron una diversidad haplotípica similar a otras especies que presentan distribuciones fragmentadas (Barrat *et al.*, 1999; Garner *et al.*, 2005b); en contraste con este suceso, otros estudios realizados con especies que presentan distribuciones continuas revelaron mayores índices de diversidad mitocondrial (Trizio *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2005). Además, parece ser que la fragmentación del hábitat tiene un efecto negativo sobre el número de haplotipos encontrados y la diversidad nucleotídica de distintas especies de ardillas (Tabla II). Con respecto a la información nuclear, en la actualidad,

Tabla II. Medidas de la variación genética del ADNmt en diversas especies de ardillas.

Autores	Especie	Población	n		Haplotipos encontrados		Tamaño del fragmento (pb)	Hd		π		
			Parcial	Total	Parcial	Total		Parcial	Promedio	Parcial	Total	
Barratt <i>et al.</i> , 1999	<i>S. vulgaris*</i>	Fif	10		2			0.200				
		Lan	21		2			0.268				
		The	13		2			0.385				
		Arg	8		5			0.786				
		Cum	11		1			0				
		Spa	16		5			0.695				
		Kie	9	207	1	26	536	0.000	0.350			-
		Arr	4		2			0.667				
		Tor	8		2			0.250				
		Jer	57		2			0.301				
		IoW	7		2			0.480				
		Clo	10		2			0.328				
		Hal	4		1			0				
		Bav	10		6			0.889				
		Bel	19		1			0				
		TF	2		1			0				
		NIDGSI	14	21	1	3	558	0	0	0	0	0
		LV	5		1			0				
		Garner <i>et al.</i> , 2005	<i>S. b. brimmeus*</i>	SB	4		2			0.50		
BC	6				3			0.70				
SH	5				3			0.67				
CP	4			29	1	9	558	0	0.37	0	0.0017	
HG	5				2			0.40				
Sk	2				2			0.67				
RH	4				1			0				
HB	3				1			0				
CED	14				7			0.82				
Trizio <i>et al.</i> , 2005	<i>S. vulgaris</i>	OGA	16		8			0.90				
		SAN	7	70	5	23	378	0.90	0.864	0.02	0.018	
		COG	16		5			0.91				
		RHE	17		9			0.79				

Hd = diversidad haplotípica de la región control mitocondrial; π = diversidad nucleotídica de la región control mitocondrial. *Estudios realizados con poblaciones fragmentadas.

Tabla 11. Medidas de la variación genética del ADNmt en diversas especies de ardillas (continuación).

Autores	Especie	Población	<i>n</i>		Haplotipos encontrados		Tamaño del fragmento (pb)	<i>Hd</i>		π			
			Parcial	Total	Parcial	Total		Parcial	Promedio	Parcial	Total		
Wilson <i>et al.</i> , 2005	<i>T. hudsonicus</i>	Black Hills	9		3			0.667		0.003			
		Bighorn	13		4			0.731		0.015			
		Laramie	15		4			0.552		0.002			
		Medicine Bow	4		1			0		0			
		Sierra Madre	6		3			0.600		0.002			
		Gore	8		3			0.607		0.003			
		Rampart	12		4			0.561		0.014			
		Beartooth	8		3			0.714		0.011			
		Gros Ventre	8	153	6	35	273-275	0.929	0.646	0.022	0.0081		
		Wind River	13		6			0.846		0.011			
		Bear River	6		4			0.867		0.012			
		Caribou	5		3			0.700		0.015			
		Wasatch	1		1			-		-			
		Centennial	1		1			-		-			
		Wet	11		3			0.473		0.003			
		Culebra	12		3			0.682		0.004			
		Cristo	21		7			0.757		0.005			
		El presente estudio, 2008	<i>S. perotensis*</i> (histórica)	Serdán	1		1			-		-	
				Salvador	1		1			-		-	
				Tepeyahualco	5	34	4	10	1145	0.900	0.638	0.0021	0.0013
Totalco	15				5			0.695		0.0012			
Perote	12				3			0.318		0.0006			
El presente estudio, 2008	<i>S. perotensis*</i> (actual)	Tepeyahualco	16		2			0.325		0.0011			
		Totalco	14	44	2	6	1145	0.363	0.482	0.0003	0.0012		
		Pizarro	14		4			0.758		0.0023			

Hd = diversidad haplotípica de la región control mitocondrial; π = diversidad nucleotídica de la región control mitocondrial. *Estudios realizados con poblaciones fragmentadas.

S. perotensis presenta índices de heterocigosis esperada comparables al de otras especies de ardillas (Garner *et al.*, 2005b; Selonen *et al.*, 2005; Trizio *et al.*, 2005), aunque es importante resaltar que, en el pasado, esta especie presentaba una heterocigosis esperada verdaderamente alta ($H_E = 0.7150$) (Tabla 12).

Por otro lado, los índices de fijación F_{IS} señalaron que en todas las poblaciones actuales de *S. perotensis* existe un exceso de homócigos, y esto podría sugerir que las poblaciones son tan pequeñas que el contacto entre parientes es inevitable. Como se mencionó con anterioridad, esto es muy peligroso porque la endogamia aumenta la frecuencia de los homócigos dentro de una población y favorece la expresión de alelos deletéreos, causando reducciones drásticas en los tamaños poblacionales (Gilpin y Soulé, 1986; Frankham *et al.*, 2002). Los datos presentados en la Tabla 12 señalan que la endogamia es un evento poco frecuente en las poblaciones de ardillas y, curiosamente, se ha reportado que las ardillas terrestres y otros roedores evitan la reproducción entre parientes (Clarke y Faulkes, 1999; Mateo, 2003; Sherborne *et al.*, 2007). Por lo anterior, y como así lo indican los valores de diferenciación genética y flujo génico, es probable que las poblaciones actuales de *S. perotensis* se encuentren aisladas y las oportunidades de apareo con individuos no emparentados de otras poblaciones sean escasas.

Otro factor que bien podría explicar el exceso de homócigos en una población es el efecto Wahlund. En cuanto a esta posibilidad, se ha establecido que en una población pueden existir submuestras heterogéneas con diferentes frecuencias alélicas y, debido a esto, podría darse una deficiencia de heterócigos y un exceso de homócigos en la muestra total, aún si estas submuestras se encontraran en el equilibrio de Hardy–Weinberg (Wahlund, 1928). Sin embargo, éste podría no ser el caso porque la estructura poblacional de *S. perotensis* se encuentra bien definida y, al parecer, las poblaciones no están conformadas por submuestras heterogéneas.

Por su parte, los resultados obtenidos indican que existe una mayor estructuración mitocondrial que nuclear. En cuanto a este respecto, se ha observado que muchos mamíferos, incluyendo las ardillas terrestres, exhiben dispersión por vía masculina y filopatría femenina (Sherman y Morton, 1984), y que, por lo mismo, la estructura genética basada en ADNmt puede diferir de los patrones detectados por loci nucleares (Moritz, 1994; Paetkau *et al.*, 1997).

Los datos presentados también sugieren que la fragmentación del hábitat ha provocado divergencia reciente entre las poblaciones de *S. perotensis*, ya que los coeficientes de diferenciación genética F_{ST} se han incrementado de manera significativa en los últimos años. También, es posible que este fenómeno haya generado mayor estructuración genética en estas poblaciones, modificando la distribución de la varianza molecular y provocando un aumento en

Tabla 12. Medidas de la variación genética del ADN nuclear en diversas especies de ardillas.

Autores	Especie	Población		n		Microsatélites utilizados	H_E		F_{IS}
		Parcial	Total	Parcial	Promedio				
Garner <i>et al.</i> , 2005b	<i>S. b. braunensis</i> *	SG	31	201	GS3, GS12, GS17, GS26, IGS-1106, B109, B126, D117	0.58	0.58	NS	
		TF	61			0.54		NS	
		SM	18			0.62		NS	
		CS	26			0.57		NS	
		ChS	10			0.54		NS	
		LV	23			0.59		NS	
PV	32	0.60	NS						
Garner <i>et al.</i> , 2005b	<i>S. b. endemicus</i> *	SB	33	266	GS3, GS12, GS17, GS26, IGS-1106, B109, B126, D117	0.37	0.43	NS	
		BC	55			0.50		NS	
		SH	21			0.48		**	
		CP	24			0.47		NS	
		HG	11			0.50		NS	
		Sk	19			0.50		NS	
		RH	82			0.40		NS	
		HB	21			0.24		NS	
		Litti	24			0.606		-0.048	
		Kuusankoski	30			0.701		0.002	
Selonen <i>et al.</i> , 2005	<i>P. volans</i> *	Nuukio	18	159	Pvo110, Pvo141, Pvo174, Pvo1E1, Pvo1E5, Pvo1E6, Pvo1E10	0.748	0.656	-0.009	
		Anjalankoski E	42			0.724		-0.067	
		Anjalankoski W	10			0.698		0.068	
		Alavus	15			0.586		-0.032	
		Mustasaari	8			0.654		0.149	
		Luoto	12			0.534		-0.104	
		CED	28			0.548		0.03	
		OGA	43			0.598		0.02	
		VAF	64			0.615		0.12**	
		BOR	35			0.564		-0.04	
		COG	59			0.493		0.01	
		RHE	60			0.562		0.15**	
El presente estudio, 2008	<i>S. perotensis</i> * (histórica)	Serdán	1	34	A8	-	0.715	-	
		Salvador	1			-		-	
		Tepeyahualco	5			0.822		-0.250	
		Totalco	15			0.628		0.177	
		Perote	12			0.685		0.524**	
		Tepeyahualco	16			0.760		0.350**	
El presente estudio, 2008	<i>S. perotensis</i> * (actual)	Totalco	14	44	A8	0.389	0.566	0.458**	
		Pizarro	14			0.550		0.228**	

H_E = heterocigosis esperada. *Estudios realizados con poblaciones fragmentadas. ** $F_{IS} > 0, p < 0.05$; NS = no significativo.

todos los estadísticos Φ , independientemente del marcador molecular utilizado. En cuanto a este respecto, diversos estudios han concluido que las ardillas son especialmente vulnerables a la fragmentación del hábitat, mostrando diferenciación genética entre sus poblaciones (Barrat *et al.*, 1999; Gavin *et al.*, 1999; Garner *et al.*, 2005b; Selonen *et al.*, 2005).

Un resultado relevante es el obtenido con los dendogramas de distancias genéticas. En éstos, se aprecia que no existe concordancia espacial ni temporal entre las poblaciones de *S. perotensis*. Por ejemplo, se esperaría que las poblaciones históricas y actuales de Tepeyahualco o Totalco se agruparan en el mismo clado, o que las poblaciones históricas se agruparan en uno y las actuales en otro. Por lo mismo, las topologías observadas sugieren que en estas poblaciones están ocurriendo cambios genéticos recientes a gran escala, inducidos, quizá, por la deriva génica.

Estudios realizados con isoenzimas y microsatélites nucleares en ardillas (Gavin *et al.*, 1999; Hale *et al.*, 2001) apuntan que, en hábitats fragmentados, es posible observar una correlación positiva entre las distancias genéticas y las distancias geográficas. Dicho patrón parece surgir en las poblaciones históricas, e indica que las poblaciones más alejadas son las más divergentes; no obstante, el análisis con las poblaciones actuales resultó contrario a lo esperado. Posiblemente, cambios recientes en la composición genética de estas poblaciones han provocado que, en la actualidad, este patrón se vuelva difuso. A pesar de obtener buenas regresiones lineales, cabe señalar que ninguna prueba de Mantel resultó significativa porque el número de puntos del espacio muestral es muy limitado. Por lo anterior, debería considerarse en el futuro trabajar con mayor número de poblaciones.

Por último, y como así lo indican los valores de *theta* y de tamaños efectivos inferidos a partir de la diversidad genética, es probable que las poblaciones de *S. perotensis* hayan decrecido en los últimos años. En cuanto a este respecto, se ha propuesto que los parches poblacionales creados por la fragmentación del hábitat son más susceptibles a la extinción local debido a la endogamia y a la disminución de la fecundidad (Eguiarte y Piñero, 1999), a la invasión de especies exóticas y transmisión de enfermedades (Suzán, 1998), y a variaciones en el microclima por el efecto de borde (Saunders *et al.*, 1991). Otros autores, como Wauters y colaboradores (1994), han sugerido que los parches de hábitat presentan bajas densidades poblacionales como resultado de tasas de migración reducidas entre los fragmentos remanentes, lo que coincide con los resultados obtenidos en este trabajo.

Red de Haplotipos y Filogenia Molecular

De acuerdo con la teoría de la coalescencia (Schaal *et al.*, 1998), los haplotipos con mayor distribución, mayor número de conexiones y al centro de la red pueden ser considerados como los ancestrales, mientras que es muy probable que los haplotipos de las puntas sean más jóvenes que los interiores a los cuales están conectados; por lo mismo, podría considerarse al haplotipo A como el ancestral de la especie, el cual, efectivamente, aparece en la muestra histórica y se mantiene en la actual. A partir de éste, se conectaron la gran mayoría de los haplotipos, presentando pocos pasos mutacionales entre sí, y mostrando una topología en forma de estrella. Un caso interesante lo representa el haplotipo L, que no pudo ser conectado a la red y pertenece a la población más alejada geográficamente (Ciudad Serdán). Por lo mismo, podría manejarse como una posibilidad la existencia de dos linajes, uno perteneciente a la región septentrional del Valle del Oriental, y otro perteneciente a la región meridional, aunque deberá considerarse en el futuro un muestreo más amplio que involucre poblaciones cercanas a Ciudad Serdán.

Curiosamente, no se observó una asociación entre los linajes femeninos y su distribución geográfica. Estudios previos con ardillas (Herron *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2005; Van Tuinen *et al.*, 2008) han demostrado la existencia de estructuración mitocondrial atribuible principalmente a cambios climáticos, orogénicos o tectónicos, por lo que el patrón observado en *S. perotensis* podría deberse a la ausencia histórica de barreras geográficas o ecológicas en el Valle del Oriental.

Por otro lado, el árbol de Neighbor-Joining sugiere que *S. perotensis* forma un grupo genéticamente independiente de *S. pilosoma*, y que cada haplotipo mitocondrial guarda relaciones filogenéticas cercanas. Un estudio reciente de historia filogenética y evolutiva de ardillas terrestres (Harrison *et al.*, 2003) concluyó que *S. pilosoma* forma un grupo parafilético con respecto a *S. perotensis*, que es monofilético. De acuerdo con este autor, es posible que ambas especies hayan divergido en el Pleistoceno, hace 1.7 millones de años, con la formación de vastas llanuras en México y la apertura de nuevos nichos ecológicos. A pesar de que la distribución *mismatch* indicó que no ha existido una expansión demográfica reciente en *S. perotensis*, la topología observada en la red de haplotipos, así como la ausencia de grandes discontinuidades genéticas en la misma, podrían sugerir, como en el caso anterior, que la especie es muy reciente (Templeton, 2006).

Implicaciones para la Conservación

Para un manejo adecuado de los recursos naturales y, por ende, de los recursos económicos, es necesario definir el tamaño mínimo poblacional requerido para que una especie sea genéticamente viable a largo plazo. Esta idea pretende preservar a las especies como entidades dinámicas capaces de lidiar con el cambio ambiental, enfocándose principalmente en evitar la depresión por endogamia e impedir la pérdida de diversidad genética.

Una medida razonable para cumplir este objetivo consiste en conservar el 90% de la diversidad genética de una especie en los próximos 100 años (Frankham *et al.*, 2002). De acuerdo con esta premisa, el tamaño mínimo poblacional viable para *S. perotensis* debería ser de $N_e \approx 124\text{--}196$ individuos (Apéndice 12). En términos generales se ha establecido que un tamaño efectivo poblacional de $N_e \gg 50$ es suficiente para evitar la depresión por endogamia y retener la adecuación promedio a corto plazo, aunque se recomienda un tamaño efectivo de $N_e = 500\text{--}5000$ para retener el potencial evolutivo de especies amenazadas (Tabla 13).

Tabla 13. Estimados del tamaño efectivo poblacional (N_e) necesario para preservar la *salud* genética de una especie.

Objetivo	N_e	Tiempo de recuperación (generaciones)	Referencia
Retener la adecuación promedio	50		Franklin, 1980; Soulé, 1980.
Retener el potencial evolutivo	500 5000 570–1250	$10^2\text{--}10^3$	Franklin, 1980; Lande y Barrowclough, 1987 Lande, 1995 Franklin y Frankham, 1998
Retener la diversidad genética en un locus	$10^5\text{--}10^6$	$10^5\text{--}10^7$	Lande y Barrowclough, 1987
Evitar la acumulación de mutaciones deletéreas	1000 100 12		Lande, 1995 Lynch <i>et al.</i> 1995 Charlesworth <i>et al.</i> 1993

Manejo de las poblaciones de *S. perotensis*

El presente trabajo sugiere que los tamaños efectivos de las poblaciones actuales de *S. perotensis* son insuficientes para evitar la depresión por endogamia y retener el potencial evolutivo de la especie a largo plazo. Si la deriva génica es la fuerza evolutiva imperante en estas poblaciones, la pérdida de diversidad genética podría ser muy significativa en pocas generaciones aún si mantenemos constantes sus tamaños efectivos en el futuro. Un aumento en los tamaños efectivos de las poblaciones de la ardilla terrestre del Perote no sólo ayudaría a minimizar la pérdida de diversidad genética, sino que evitaría también el riesgo de extinción de la especie por causa de otros eventos estocásticos (demográficos, ambientales y catastróficos; Lande, 1988).

Uno de los más grandes retos en la conservación de especies amenazadas radica en mantener la cohesión genética entre sus poblaciones. Las opciones de manejo para aumentar la diversidad genética y minimizar la endogamia y el riesgo de extinción de una especie con hábitat altamente fragmentado son (Frankham *et al.*, 2002):

- a) Incrementar el área de distribución.
- b) Aumentar artificialmente la tasa de migración entre poblaciones por translocación de individuos.
- c) Restablecer poblaciones en áreas donde anteriormente habían sido extirpadas.
- d) Crear corredores biológicos.

Los resultados obtenidos sugieren que los valores de flujo génico entre las poblaciones actuales de *S. perotensis* son, en la mayoría de los casos, insuficientes para contrarrestar los efectos negativos de la deriva génica (Wright, 1951; Slatkin, 1987; Mills y Allendorf, 1996). Un aumento en el número de migrantes por generación entre estas poblaciones ayudaría a uniformizar y restaurar la diversidad genética en las poblaciones deterioradas, y contrarrestar la diferenciación genética que pudiera ocurrir por el aislamiento geográfico (Polans y Allard, 1989; Spielman y Frankham, 1992; Richards, 2000).

El análisis de varianza molecular indicó que un porcentaje sustancial de la variación genética mitocondrial actual de *S. perotensis* se encuentra distribuida entre las poblaciones (50.47%; *Tabla 8C*), por lo que convendría conservarlas en conjunto. También es relevante contemplar esta estrategia porque se ha observado que las ardillas presentan patrones de dispersión de tipo *stepping-stone* entre parches de hábitat (Gavin *et al.*, 1999; Hale *et al.*, 2001), y la desaparición

de una población central podría limitar el flujo génico entre las poblaciones periféricas y contribuir aún más a la divergencia entre éstas últimas.

Por último, la protección del hábitat y el retiro de depredadores introducidos (como los perros domésticos) deben ser considerados como una prioridad para la conservación de la ardilla terrestre del Perote. La alteración del hábitat podría reducir la posibilidad de colonización en parches de hábitat disponibles (Wilcox y Murphy, 1985) y restringir seriamente la distribución de esta especie. A su vez, existen trabajos que ratifican la importancia de retirar cualquier tipo de fauna exótica para evitar la extinción de roedores endémicos de México (Mellink *et al.*, 2002; Vázquez-Domínguez *et al.*, 2004; Vega *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

- La presente investigación sugiere que la ardilla terrestre del Perote (*S. perotensis*) ha perdido diversidad genética en los últimos 17 años debido a que, presumiblemente, sus poblaciones han disminuido de tamaño y en ellas predomina la deriva génica.
- Es probable que la fragmentación del hábitat haya provocado divergencia reciente entre las poblaciones de *S. perotensis*, así como niveles altos de endogamia en cada una de éstas.
- El uso de diferentes marcadores moleculares nos permite revelar diversos aspectos de la biología de las especies. En este caso, los resultados obtenidos de estructuración mitocondrial y nuclear sugieren que las hembras casi no migran entre poblaciones, a diferencia de los machos, que funcionan como vectores de dispersión.
- La protección y la conectividad del hábitat, y el aumento en los tamaños efectivos poblacionales deben ser considerados como una prioridad para la conservación de esta especie.
- En el corto plazo, estos resultados indican que es necesario un manejo de las poblaciones que incluya movimiento de individuos entre ellas para incrementar la diversidad genética.
- A mediano plazo, se requiere estructurar una estrategia que vincule espacialmente estas poblaciones para que el intercambio genético se lleve a cabo sin asistencia de manejo.

LITERATURA CITADA

- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y P. Walter.** 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. Myers y D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403–410.
- Avise, J. C.** 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press.
- Barratt, E. M., J. Gurnell, G. Malarky, R. Deaville y M. W. Bruford.** 1999. Genetic structure of fragmented populations of red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in the UK. *Mol. Ecol.* **8**: S55–S63.
- Beaumont, M. A. y M. W. Bruford.** 1999. Microsatellites in conservation genetics. En *Microsatellites: Evolution and Applications*. D. B. Goldstein y C. Shlötterer, eds. Oxford University Press.
- Boyce, M. S.** 1992. Population viability analysis. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **23**: 481–497.
- Brown, G. G., G. Gadaleta, G. Pepe, C. Saccone y E. Sbisá.** 1986. Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* **192**: 503–511.
- Cann, R. L., W. M. Brown y A. C. Wilson.** 1984. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics* **106**: 479–499.
- Casinello, J., M. Gomendio y E. R. S. Roldan.** 2001. Relationship between coefficient of inbreeding and parasite burden in endangered gazelles. *Conserv. Biol.* **15**: 1171–1174.
- Ceballos, G., J. Pacheco y R. List.** 1999. Influence of prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) on habitat heterogeneity and mammalian diversity in Mexico. *J. Arid Environ.* **41**: 161–172.
- Ceballos, G. y G. Oliva.** 2005. *Los mamíferos silvestres de México*. CONABIO / Fondo de Cultura Económica.
- Chakraborty, R. y K. M. Weiss.** 1991. Genetic variation of the mitochondrial DNA genome in American Indians is at mutation–drift equilibrium. *Am. J. Hum. Genet.* **86**: 487–506.
- Clarke F. M. y C. G. Faulkes.** 1999. Kin discrimination and female mate choice in the naked mole–rat *Heterocephalus graber*. *Proc. Biol. Sci.* **266**: 1995–2002.

- Clarke G. M. y A. G. Young.** 2000. Genetics, demography and the conservation of fragmented populations. En *Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations*. A. G. Young y G. M. Clarke, eds. Cambridge University Press.
- Clement M., D. Posada y K. A. Crandall.** 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* **9**: 1657–1660.
- Cockerham, C. C. y B. S. Weir.** 1987. Correlations, descent measures: drift with migration and mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 8512–8514.
- Coltman, P. W., J. G. Pilkington, J. A. Smith y J. M. Pemberton.** 1999. Parasite mediated selection against inbred soay sheep in a free-living, island population. *Evolution* **53**: 1259–1267.
- Coulson, T. N., J. M. Pemberton, S. D. Albon, M. Beamont, T. C. Marshall, J. Slate, F. E. Guinness y T. H. Clutton-Brock.** 1998. Microsatellites reveal heterosis in red deer. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* **265**: 489–495.
- Chambers, G. K. y E. S. MacAvoy.** 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **126**: 455–476.
- Charlesworth, D., M. T. Morgan y B. Charlesworth.** 1993. Mutation accumulation in finite populations. *J. Hered.* **84**: 321–325.
- Davis, W. B.** 1944. Notes on mexican mammals. *J. Mamm.* **25**: 370–402.
- Dowling, T. E., C. Moritz, J. D. Palmer y L. H. Rieseberg.** 1996. Nucleic acids III: analysis of fragments and restriction sites. En *Molecular Systematics*. D. H. Hillis, C. Moritz y B. K. Mable, eds. Sinauer Associates, Inc.
- Eguiarte, L. E. y D. Piñero.** 1999. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. En *La Evolución Biológica*. J. Núñez-Farfán y L. E. Eguiarte, eds. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Excoffier, L., P. E. Smouse y J. M. Quattro.** 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479–491.
- Excoffier, L., G. Laval y S. Schneider.** 2007. Arlequin ver. 3.11: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**: 47–50.
- Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783–791.

- Felsenstein, J.** 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle..
- Frankham, R., J. D. Ballou y D. A. Briscoe.** 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.
- Franklin, I. R.** 1980. Evolutionary change in small populations. En *Conservation Biology: An Evolutionary–Ecological Perspective*. M. E. Soulé y B. A. Wilcox, eds. Sinauer Associates, Inc.
- Franklin, I. R. y Frankham R.** 1998. How large must populations be to retain evolutionary potential. *Anim. Conserv.* **1**: 69–71.
- Gaggiotti, O. E., O. Lange, K. R. Rassmann y C. A. Gliddon.** 1999. A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Mol. Ecol.* **8**: 15–13.
- García, E.** 1987. *Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Koeppen*. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Garner, A., J. Rachlow y J. Hicks.** 2005a. Patterns of genetic diversity and its loss in mammalian populations. *Conserv. Biol.* **19**: 1215–1221.
- Garner, A., J. L. Rachlow y L. P. Waits.** 2005b. Genetic diversity and population divergence in fragmented habitats: Conservation of Idaho ground squirrels. *Conserv. Genet.* **6**: 759–774.
- Gavin, T. A., P. W. Sherman, E. Yensen y B. May.** 1999. Population genetic structure of the northern Idaho ground squirrel (*Spermophilus brunneus brunneus*). *J. Mamm.* **80**: 156–168.
- Gebhard, W. y H. G. Zachau.** 1983. Simple DNA sequences and dispersed repetitive elements in the vicinity of mouse immunoglobulin K light chain genes. *J. Mol. Biol.* **170**: 567–573.
- Gilpin, M. W. y M. E. Soulé.** 1986. Minimum viable populations: processes of species extinction. En *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity*. M. E. Soulé, ed. Sinauer Associates, Inc.
- Gillespie, J. H.** 1998. *Population Genetics: A Concise Guide*. The John Hopkins University Press.
- Goldstein, D. B. y D. D. Pollock.** 1997. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *J. Hered.* **88**: 335–342.
- Greaves, D. R. y R. K. Patient.** 1985. (AT)_n is an interspersed repeat in the *Xenopus* genome. *EMBO J.* **10**: 2617–2626.

- Gross, D. S. y W. T. Garrad.** 1986. The ubiquitous potential Z-forming sequence of eucaryotes, (dT-dG)_n.(dC-dA)_n, is not detectable in the genomes of eubacteria, archaeobacteria, or mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 3010–3013.
- Hale, M. L., P. W. Lurz, M. D. Shirley, S. Rushton, R. M. Fuller y K. Wolff.** 2001. Impact of landscape management on the genetic structure of red squirrel populations. *Science* **293**: 2246–2248.
- Hall, E. R.** 1981. *The Mammals of North America*. John Wiley & Sons.
- Hall, T. A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95–98.
- Hamada, H., M. G. Petrino y T. Kakunaga.** 1982. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionary diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**: 6465–6469.
- Harpending, H. C.** 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.* **66**: 591–600.
- Harrison, R. G., S. T. Bogdanowicz, R. S. Hoffmann, E. Yensen y P. W. Sherman.** 2003. Phylogeny and evolutionary history of the ground squirrels (Rodentia: Marmotinae). *J. Mamm. Evol.* **10**: 249–276.
- Hartl, D. L. y Clark A. G.** 1997. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc.
- Hedrick, P. W.** 1995. Gene flow and genetic restoration: The Florida panther as a case study. *Conserv. Biol.* **9**: 996–1007.
- Hedrick, P. W.** 2005. *Genetics of Populations*. Jones and Bartlett Publishers.
- Hellberg, M. E.** 1995. Stepping-stone gene flow in the solitary coral *Balanophyllia elegans*: equilibrium and non-equilibrium at different spatial scales. *Mar. Biol.* **123**: 573–581.
- Herron, M. D., J. M. Waterman y C. L. Parkinson.** 2005. Phylogeny and historical biogeography of African ground squirrels: the role of climate change in the evolution of *Xerus*. *Mol. Ecol.* **14**: 2773–2788.
- Howell, A. H.** 1938. Revision of the North American ground squirrels, with a classification of the North American Sciuridae. *North America Fauna* **56**: 1–256.
- Hughes, J., M. Ponniah, D. Hurwood, S. Chenoweth y A. Arthington.** 1999. Strong genetic structuring in a habitat specialist, the Oxleyan Pygmy Perch *Nannoperca oxleyana*. *Heredity* **83**: 5–14.

- Jones, R.T., A. P. Martin, A. J. Mitchell, S. K. Collinge y C. Ray.** 2005. Characterization of 14 polymorphic microsatellite markers for the black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*). *Mol. Ecol. Notes* **5**: 71–73.
- Kimura, M. y J. F. Crow.** 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* **49**: 725–738.
- Kimura, M. y G. H. Weiss.** 1964. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* **49**: 561–576.
- Kimura, M. y T. Ohta.** 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**: 2868–2872.
- Kimura, M.** 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**: 111–120.
- Kolstia, S., M. Ruohonen-Lehto, R. Väiölä y V. Sirkka-Liisa.** 2000. Phylogenetic information in inter-SINE and inter-SSR fingerprints of the Artiodactyla and evolution of the Bov-ta SINE. *Heredity* **84**: 37–45.
- Lacy, R. C.** 1988. A report on population genetics in conservation. *Conserv. Biol.* **2**: 245–247.
- Lacy, R. C.** 1997. Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *J. Mamm.* **78**: 320–335.
- Lande, R. y G. F. Barrowclough.** 1987. Effective population size, genetic variation, and their use in population management. En *Viable Populations for Conservation*. M. E. Soulé, ed. Cambridge University Press.
- Lande, R.** 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science* **241**: 1455–1460.
- Lande, R.** 1995. Mutation and conservation. *Conserv. Biol.* **9**: 782–791.
- Larizza, A., G. Pesole, A. Reyes, E. Sbisá y C. Saccone.** 2002. Lineage specificity of the evolutionary dynamics of the mtDNA D-loop region in rodents. *J. Mol. Evol.* **54**: 145–155.
- Leonard, J. A., C. Vilá y R. K. Wayne.** 2005. Legacy loss: genetic variability and population size of extirpated US grey wolves (*Canis lupus*). *Mol. Ecol.* **14**: 9–17.
- Lynch, M., J. Conery y R. Burger.** 1995. Mutation meltdowns in sexual populations. *Evolution* **49**: 1067–1088.
- Mantel, N.** 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* **27**: 209–220.

- Mateo, J. M.** 2003. Kin recognition in ground squirrels and other rodents. *J. Mamm.* **84**: 1163–1181.
- May, B., T. A. Gavin, P. W. Sherman y T. M. Korves.** 1997. Characterization of microsatellite loci in the northern Idaho ground squirrel, *Spermophilus brunneus brunneus*. *Mol. Ecol.* **6**: 399–400.
- Mellink, E., G. Ceballos y E. Luevano.** 2002. Population demise and extinction threat of the Angel de la Guarda deer mouse (*Peromyscus guardia*). *Biol. Conserv.* **108**: 107–111.
- Merriam, C.** 1893. Description of eight new ground squirrels of the genera *Spermophilus* and *Tamias* from California, Texas, and Mexico. *Proc. Biol. Soc. Wash.* **8**: 129–138.
- Miller, B., G. Ceballos y R. Reading.** 1994. The prairie dog and biotic diversity. *Conserv. Biol.* **8**: 677–681.
- Miller, M. P.** 1997. Tools for population genetic analyses (TFGPA) 1.3: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetics data.
- Mills, L. S. y F. W. Allendorf.** 1996. The one–migrant–per–generation rule in conservation and management. *Conserv. Biol.* **10**: 1509–1518.
- Moritz, C.** 1994. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Mol. Ecol.* **3**: 401–411.
- Moritz, C.** 2002. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Syst. Biol.* **51**: 238–254
- Nei, M.** 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press.
- Oshida, T., K. Ikeda, K. Yamada y R. Masuda.** 2001. Phylogeography of the Japanese giant flying squirrel, *Petaurista leucogenys*, based on mitochondrial DNA control region sequences. *Zool. Sci. Tokio.* **18**: 107–114.
- Paetkau, D., L. P. Waits, P. L. Clarkson, L. Craighead y C. Strobeck.** 1997. An empirical evaluation of genetic distance statistics using microsatellite data from bear (Ursidae) populations. *Genetics* **147**: 1943–1957.
- Polans, N. O. y R. W. Allard.** 1989. An experimental evaluation of the recovery potential of ryegrass populations from genetic stress resulting from restriction of population size. *Evolution* **43**: 1320–1324.
- Primack, R., R. Rozzi, P. Feisinger, R. Dirzo y F. Masardo.** 2001. *Fundamentos de Conservación Biológica*. Fondo de Cultura Económica.

- Reed, D. H. y R. Frankham.** 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conserv. Biol.* **17**: 230–237
- Reyes Cortés, M.** 1979. *Geología de la Cuenca del Oriental*. Colección Científica, Departamento de Prehistoria, Instituto Nacional de Antropología e Historia, **71**.
- Richards, C. M.** 2000. Inbreeding depression and genetic rescue in a plant metapopulation. *Am. Natur.* **155**: 383–394.
- Rocha, M. y J. Gasca.** 2007. Ecología molecular de la conservación. En *Ecología Molecular*. L. Eguiarte y V. Souza, eds. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rogers, A. R. y H. Harpending.** 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* **9**: 552–569.
- Rogers, A. R.** 1995. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution* **49**: 608–615.
- Rousset, F.** 2007. GENEPOP 4.0 for Windows and Linux.
- Rozas, J., J. C. Sánchez-DelBarrio, X. Messeguer y R. Rozas.** 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**: 2496–2497.
- Saunders, D. A.** 1991. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conserv. Biol.* **5**: 18–32.
- Sbisà, E., F. Tanzariello, A. Reyes, G. Pesole y C. Saccone.** 1997. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene*. **205**: 125–140.
- Schaal, B. A., D. A. Hayworth, K. M. Olsen, J. T. Rauscher y W. A. Smith.** 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospectus. *Mol. Ecol.* **7**: 465:474.
- Schèfer, R., S. Ali y J. T. Epplen.** 1986. The organization of the evolutionarily conserved GATA/GACA repeats in the mouse genome. *Chromosoma* **93**: 502–510.
- Schug, M. D., T. F. Mackay y C. F. Aquadro.** 1997. Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet.* **15**: 99–102.
- Secretaría de Desarrollo Social.** 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-94, que determina las especies y subespecies de flora y fauna solvestres terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras, y las sujetas a protección especial, y que establece especificaciones para su protección. *Diario Oficial de la Nación* **438**: 2–60.

- Selonen, V., J. N. Painter y I. K. Hanski.** 2005. Microsatellite variation in the Siberian flying squirrel in Finland. *Ann. Zool. Fennici.* **42:** 505–511.
- Sherborne, A., M. Thom, S. Paterson, F. Jury, W. Ollier, P. Stockley, R. Beynon y J. Hurst.** 2007. The genetic basis of inbreeding avoidance in house mice. *Curr. Biol.* **17:** 2061–2066.
- Sherman, P. W. y M. L. Morton.** 1984. Demography of Belding's ground squirrels. *Ecology* **65:** 1617–1628.
- Slatkin, M.** 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* **263:** 787–792.
- Slatkin, M. y R. R. Hudson.** 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* **129:** 555–562.
- Slatkin, M.** 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* **139:** 457–462.
- Soulé, M. E.** 1980. Thresholds for survival: maintaining fitness and evolutionary potential. En *Conservation Biology: An Evolutionary–Ecological Perspective*. M. E. Soulé y B. A. Wilcox, eds. Sinauer Associates, Inc.
- Spielman, D. y R. Frankham.** 1992. Modelling problems in conservation genetics using captive *Drosophila* populations: improvement in reproductive fitness due to immigration of one individual into small partially inbred populations. *Zoo Biol.* **11:** 343–351.
- Strachan, T. y Read, A. P.** 1999. *Human Molecular Genetics 2*. Garland Science.
- Suzán, G. A.** 1998. *Rabia, toxoplasma y parvovirus en mamíferos silvestres de dos reservas del Distrito Federal*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sunnucks, P.** 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol. Evol.* **15:** 199–203.
- Tajima, F.** 1993. Measurement of DNA polymorphism. En *Mechanisms of Molecular Evolution*. N. Takahata y A. G. Clark, eds. Sinauer Associates, Inc.
- Tajima, F.** 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123:** 585–595.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei y S. Kumar.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24:** 1596–1599.
- Tautz, D. y M. Renz.** 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucl. Acids. Res.* **12:** 4127–4138.

- Templeton, A. R., K. A. Crandall y C. F. Sing.** 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. *Genetics* **132**: 619–633.
- Templeton, A. R. y B. Read.** 1994. Inbreeding: One word, several meanings, much confusion. En *Conservation Genetics*. V. Loeschcke, J. Tomiuk y S. K. Jain, eds. Birhäuser Verlag.
- Templeton, A. R.** 2006. *Population genetics and microevolutionary theory*. John Wiley and Sons Inc.
- Trejo, L.** 2005. *Genética de poblaciones de Agave striata Zucc.* Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 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. *Mol Ecol.* **14**: 469–481.
- Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza.** 2008. *Categorías de las listas rojas de la UICN*. Gland, Suiza. www.iucn.org.
- Valdéz, M. y G. Ceballos.** 1997. Conservation of endemic mammals of Mexico: The Perote ground squirrel (*Spermophilus perotensis*). *J. Mamm.* **78**: 74–82.
- Valdéz, M.** 2003. Las ardillas de México. *Biodiversitas* **8**: 1–7.
- 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. *Mol. Ecol.* **17**: 1776–1788.
- Vázquez-Domínguez, E., G. Ceballos y J. Cruzado.** 2004. Extirpation of an insular subspecies by a single introduced cat: the case of the endemic deer mouse *Peromyscus guardia* on Estanque Island, Mexico. *Oryx* **38**: 347–350.
- Vega, R., E. Vázquez-Domínguez, A. Mejía-Puente y A. Cuarón.** 2007. Unexpected high levels of genetic variability and the population structure of an island endemic rodent (*Oryzomys couesi cozumelae*). *Biol. Conserv.* **137**: 210–222.
- Wahlund, S.** 1928. Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen von Stadtpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas* **11**: 65–106.
- Watterson, G. A.** 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor. Pop. Biol.* **7**: 256–276.

- Wauters, L., Y. Hutchinson, D. T. Parkin y A. A. Dhondt.** 1994. The effects of habitat fragmentation on demography and on the loss of genetic variation in the red squirrel. *Proc. R. Soc. Lond.* **255**: 107–111.
- Wilcox, B. A. y D. D. Murphy.** 1985. Conservation strategy: the effects of fragmentation on extinction. *Am. Natur.* **125**: 879–887.
- 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. *Genetics* **125**: 141–154.
- Wright, S.** 1921. Systems of mating. *Genetics* **6**: 111–178.
- Wright, S.** 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics* **16**: 97–159.
- Wright, S.** 1943. Isolation by distance. *Genetics* **28**: 114–138.
- Wright, S.** 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* **15**: 323–354.
- Young, A., T. Boyle y T. Brown.** 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol. Evol.* **11**: 413–418.
- Zammuto, R. M.** 1987. Life histories of mammals: analyses among and within *Spermophilus columbianus* life tables. *Ecology* **68**: 1351–1363.
- Zouros, E.** 1979. Mutation rates, population sizes and amounts of electrophoretic variation of enzyme loci in natural populations. *Genetics* **92**: 623–646.

APÉNDICES

Apéndice 1

Dneasy™ Tissue Kit modificado (Qiagen Co., USA)

1. Cortar un trozo de tejido de 5 x 5 mm y colocarlo en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
2. Agregar 1 ml de agua pura estéril, vórtex por 15 s, remover el agua y repetir una vez más. Si el tejido está demasiado sucio repetir hasta que el agua no se enturbie.
3. Para hidratar el tejido, agregar 1 ml de solución PBS, vórtex por 15 s, sellar el tubo con parafilm y dejar reposando a 55 °C toda la noche.
4. De ser posible, cortar el tejido en pedazos más pequeños y colocarlos en un tubo nuevo.
5. Agregar 180 µl de buffer ATL más 20 µl de proteinasa K.
6. Sellar el tubo, incubar a 55 °C toda la noche y vórtex periódicamente. El tejido debe estar completamente digerido, de lo contrario, agregar 10 µl de proteinasa K y continuar la digestión hasta que el buffer no tenga sólidos.
7. Agregar 200 µl de buffer AL, vórtex e incubar a 70 °C por 10 min.
8. Agregar 200 µl de etanol al 100%, vórtex hasta homogeneizar y aplicar la solución a la columna.
9. Centrifugar a 14,000 rpm por 1 min, desechar el tubo de colecta junto con lo centrifugado.
10. Colocar la columna en un tubo de colecta nuevo, agregar 500 µl de buffer AW1 wash y centrifugar a 14,000 rpm por 1 min, desechar el tubo de colecta junto con lo centrifugado.
11. Agregar 500 µl de buffer AW2 wash y centrifugar a 14,000 rpm por 1 min, desechar lo centrifugado y colocar la columna en el mismo tubo de colecta.
12. Centrifugar a 14,000 rpm por 2 min y desechar el tubo de colecta junto con lo centrifugado.
13. Colocar la columna en un tubo nuevo y etiquetado de 1.5 ml. Diluir el ADN con 100 µl de buffer AE precalentado a 65 °C, incubar la columna a temperatura ambiente por 3 min y centrifugar a 14,000 rpm por 1 min.

14. Reaplicar la solución con el ADN a la columna, incubar 3 min a temperatura ambiente y centrifugar a 14,000 rpm por 1 min.

15. Hacer alícuotas y congelar la solución con el ADN.

Reactivos

PBS

- NaCl 8 g
- KCl 0.2 g
- Na₂HPO 1.44 g
- KH₂PO₄ 0.24 g
- Aforar en 800 ml, ajustar pH a 7.4, esterilizar.

Buffers

- ATL
- AW1 wash
- AW2 wash
- AE
- Proporcionados por el fabricante.

Apéndice 2

Protocolo de extracción de ADN de pelo usando Chelex

1. Colocar 25 pelos en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
2. Agregar 1 ml de agua pura estéril, vórtex por 15 s, remover el agua y repetir una vez más. Si el tejido está demasiado sucio repetir hasta que el agua no se enturbie.
3. Para hidratar el tejido, agregar 1 ml de solución PBS, vórtex por 15 s, sellar el tubo con parafilm y dejar reposando a 65°C toda la noche.
4. Cortar las raíces de los pelos y colocarlas en un tubo nuevo que contenga 100 µl de Chelex 10%.
5. Agregar 15 µl de Proteinasa K e incubar a 61 °C hasta que el tejido se disuelva.
6. Colocar en hielo durante 5–10 min.
7. Centrifugar 3 min a 10,000 rpm.
8. Tomar el sobrenadante cuidando de no tocar el precipitado y colocar en un tubo nuevo.
9. Hacer alícuotas y congelar la solución con el ADN.

Reactivos

- PBS
- NaCl 8 g
- KCl 0.2 g
- Na₂HPO 1.44 g
- KH₂PO₄ 0.24 g
- Aforar en 800 ml, ajustar pH a 7.4, esterilizar.

10% Chelex

- 10 g Chelex (Resina BioRad Chelex 100)
- Aforar en 100 ml.

Apéndice 4

Datos de colecta e información genética de los ejemplares históricos y actuales de *S. perotensis*

Individuo	Población	Año de colecta	Haplotipo	Genotipo
Ejemplares históricos de <i>S. perotensis</i>				
70TEPE	Tepeyahualco	1990	E	245 / 253
71TEPE	Tepeyahualco	1990	K	245 / 251
72TEPE	Tepeyahualco	1990	E	245 / 251
73TEPE	Tepeyahualco	1990	A	247 / 253
92TEPE	Tepeyahualco	1991	F	245 / 249
56TOT	Totalco	1990	D	245 / 245
57TOT	Totalco	1990	G	245 / 249
58TOT	Totalco	1990	D	245 / 247
59TOT	Totalco	1990	A	245 / 247
60TOT	Totalco	1990	D	245 / 251
61TOT	Totalco	1990	D	251 / 251
62TOT	Totalco	1990	H	245 / 245
63TOT	Totalco	1990	D	245 / 247
64TOT	Totalco	1990	D	247 / 247
65TOT	Totalco	1990	D	245 / 245
67TOT	Totalco	1990	D	245 / 247
80TOT	Totalco	1991	A	245 / 251
82TOT	Totalco	1991	I	247 / 247
86TOT	Totalco	1991	H	245 / 245
88TOT	Totalco	1991	A	245 / 249
68PER	Perote	1990	A	247 / 247
69PER	Perote	1990	A	245 / 247
81PER	Perote	1991	A	247 / 247
83PER	Perote	1991	A	245 / 245
84PER	Perote	1991	A	247 / 247
87PER	Perote	1991	H	245 / 245
97PER	Perote	1992	A	245 / 249
98PER	Perote	1991	A	247 / 251
99PER	Perote	1991	A	245 / 245
100PER	Perote	1992	A	251 / 251
101PER	Perote	1992	A	245 / 251
102PER	Perote	1992	J	245 / 245
91SER	Ciudad Serdán	1991	L	247 / 247
95SAN	San Salvador El Seco	1991	A	247 / 249

Individuo	Población	Año de colecta	Haplotipo	Genotipo
Ejemplares actuales de <i>S. perotensis</i>				
1TEPE	Tepeyahualco	2007	F	247 / 249
2TEPE	Tepeyahualco	2007	F	247 / 249
3TEPE	Tepeyahualco	2007	E	245 / 247
4TEPE	Tepeyahualco	2007	F	247 / 253
5TEPE	Tepeyahualco	2007	F	247 / 249
6TEPE	Tepeyahualco	2007	F	245 / 245
7TEPE	Tepeyahualco	2007	F	247 / 249
8TEPE	Tepeyahualco	2007	F	249 / 251
9TEPE	Tepeyahualco	2007	F	247 / 247
10TEPE	Tepeyahualco	2007	F	251 / 251
11TEPE	Tepeyahualco	2007	F	247 / 247
12TEPE	Tepeyahualco	2007	E	249 / 249
13TEPE	Tepeyahualco	2007	E	247 / 247
14TEPE	Tepeyahualco	2007	F	251 / 251
15TEPE	Tepeyahualco	2007	F	245 / 249
16TEPE	Tepeyahualco	2007	F	245 / 245
2SP	Totalco	2007	A	245 / 245
3SP	Totalco	2007	B	245 / 247
4SP	Totalco	2007	A	245 / 245
5SP	Totalco	2007	B	245 / 245
6SP	Totalco	2007	B	245 / 247
1TOT	Totalco	2007	A	245 / 245
2TOT	Totalco	2007	A	247 / 247
3TOT	Totalco	2007	A	245 / 245
4TOT	Totalco	2007	A	245 / 245
5TOT	Totalco	2007	A	245 / 245
6TOT	Totalco	2007	A	245 / 247
7TOT	Totalco	2007	A	247 / 247
8TOT	Totalco	2007	A	245 / 245
9TOT	Totalco	2007	A	245 / 245
1PUE	Pizarro	2007	C	245 / 245
2PUE	Pizarro	2007	C	245 / 245
3PUE	Pizarro	2007	C	245 / 245
4PUE	Pizarro	2007	D	245 / 247
5PUE	Pizarro	2007	E	245 / 251
6PUE	Pizarro	2007	F	245 / 245
7PUE	Pizarro	2007	C	245 / 247
8PUE	Pizarro	2007	D	245 / 245
9PUE	Pizarro	2007	D	245 / 247
10PUE	Pizarro	2007	D	245 / 247
11PUE	Pizarro	2007	E	245 / 245
12PUE	Pizarro	2007	E	245 / 251
13PUE	Pizarro	2007	D	247 / 247
14PUE	Pizarro	2007	E	249 / 249

Apéndice 5

Prueba *t-Student* de *Hd* entre las poblaciones históricas y actuales de *S. perotensis*

Hipótesis nula (H_0) = los estimados de *Hd* entre las dos muestras son estadísticamente iguales.

Hipótesis alternativa (H_a) = la *Hd* de las poblaciones históricas es mayor que la *Hd* de las poblaciones actuales.

	Muestra histórica (<i>Hd</i>)	Muestra actual (<i>Hd</i>)
Tepeyahualco	0.900	0.325
Totalco	0.695	0.363
Perote	0.318	–
Pizarro	–	0.758
Promedio \bar{X}	0.638	0.482
Varianza σ	0.087	0.058

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\sigma_p^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} = \frac{0.638 - 0.482}{0.005 \left(\frac{1}{3} + \frac{1}{3} \right)} = 2.586$$

$$\sigma_p^2 = \frac{(n_1 - 1)\sigma_1^2 + (n_2 - 1)\sigma_2^2}{n_1 + n_2 - 2} = \frac{(3 - 1)0.087 + (3 - 1)0.058}{3 + 3 - 2} = 0.005$$

$$g.l. = n_1 + n_2 - 2 = 3 + 3 - 2 = 4$$

$$t_4^{0.05} = 2.132$$

$t_{calculada} > t_{tablas} \therefore$ se rechaza la H_0 y se concluye que la *Hd* de las poblaciones históricas es mayor que la *Hd* de las poblaciones actuales.

Apéndice 6

Prueba *t-Student* de H_E entre las poblaciones históricas y actuales de *S. perotensis*

Hipótesis nula (H_0) = los estimados de H_E entre las dos muestras son estadísticamente iguales.

Hipótesis alternativa (H_a) = la H_E de las poblaciones históricas es mayor que la H_E de las poblaciones actuales.

	Muestra histórica (H_E)	Muestra actual (H_E)
Tepeyahualco	0.822	0.760
Totalco	0.628	0.389
Perote	0.685	–
Pizarro	–	0.550
Promedio \bar{X}	0.712	0.566
Varianza σ	0.010	0.035

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\sigma_p^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} = \frac{0.712 - 0.566}{0.0006 \left(\frac{1}{3} + \frac{1}{3} \right)} = 6.970$$

$$\sigma_p^2 = \frac{(n_1 - 1)\sigma_1^2 + (n_2 - 1)\sigma_2^2}{n_1 + n_2 - 2} = \frac{(3 - 1)0.010 + (3 - 1)0.035}{3 + 3 - 2} = 0.0006$$

$$g.l. = n_1 + n_2 - 2 = 3 + 3 - 2 = 4$$

$$t_4^{0.05} = 2.132$$

$t_{calculada} > t_{tablas} \therefore$ se rechaza la H_0 y se concluye que la H_E de las poblaciones históricas es mayor que la H_E de las poblaciones actuales.

Apéndice 7

Prueba *t-Student* de π entre las poblaciones históricas y actuales de *S. perotensis*

Hipótesis nula (Ho) = los estimados de π entre las dos muestras son estadísticamente iguales.

Hipótesis alternativa (Ha) = la π de las poblaciones históricas es mayor que la π de las poblaciones actuales.

	Muestra histórica (π)	Muestra actual (π)
Tepeyahualco	0.0021	0.0011
Totalco	0.0012	0.0003
Perote	0.0006	–
Pizarro	–	0.0023
Promedio \bar{X}	0.0013	0.0012
Varianza σ	5.82×10^{-7}	9.39×10^{-7}

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\sigma_p^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} = \frac{0.0013 - 0.0012}{6.09 \times 10^{-13} \left(\frac{1}{3} + \frac{1}{3} \right)} = 104.603$$

$$\sigma_p^2 = \frac{(n_1 - 1)\sigma_1^2 + (n_2 - 1)\sigma_2^2}{n_1 + n_2 - 2} = \frac{(3 - 1)5.82 \times 10^{-7} + (3 - 1)9.39 \times 10^{-7}}{3 + 3 - 2} = 6.09 \times 10^{-13}$$

$$g.l. = n_1 + n_2 - 2 = 3 + 3 - 2 = 4$$

$$t_4^{0.05} = 2.132$$

$t_{calculada} > t_{tablas} \therefore$ se rechaza la Ho y se concluye que la π de las poblaciones históricas es mayor que la π de las poblaciones actuales.

Apéndice 8

Valores de distancia genética y distancia geográfica de las poblaciones de *S. perotensis*

Tabla A1. Distancias genéticas de las poblaciones de *S. perotensis*

	Tepeyahualco (histórica)	Totalco (histórica)	Perote (histórica)	Tepeyahualco (actual)	Totalco (actual)	Pizarro (actual)
Tepeyahualco (histórica)		1.973	1.733	2.575	1.614	2.486
Totalco (histórica)	0.137		1.311	2.758	1.214	2.105
Perote (histórica)	0.172	0.016		2.958	0.548	2.000
Tepeyahualco (actual)	0.403	0.284	0.206		2.839	3.304
Totalco (actual)	0.215	0.040	0.0920	0.549		1.929
Pizarro (actual)	0.152	0.016	0.063	0.425	0.011	

Por debajo de la diagonal principal (sombreado) se muestra el número de diferencias pareadas (d_{xy}) de la región control mitocondrial. Por encima de la misma se muestran los valores de distancia genética (D_S) obtenidos con el microsatélite nuclear A8.

Tabla A2. Valores de distancia geográfica (km) entre las poblaciones de *S. perotensis*.

	Tepeyahualco	Totalco	Perote	Pizarro	Ciudad Serdán
Totalco	16.55				
Perote	26.93	10.70			
Pizarro	3.04	13.68	24.17		
Ciudad Serdán	68.95	71.43	77.79	68.20	
San Salvador El Seco	27.40	38.82	49.09	28.32	47.08

Apéndice 9

Prueba *t-Student* de θ_S entre las poblaciones históricas y actuales de *S. perotensis*

Hipótesis nula (H_0) = los estimados de θ_S entre las dos muestras son estadísticamente iguales.

Hipótesis alternativa (H_a) = la θ_S de las poblaciones históricas es mayor que la θ_S de las poblaciones actuales.

	Muestra histórica (θ_S)	Muestra actual (θ_S)
Tepeyahualco	2.400	1.206
Totalco	1.538	0.315
Perote	1.325	–
Pizarro	–	2.101
Promedio \bar{X}	1.754	1.240
Varianza σ	0.087	0.058

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\sigma_p^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} = \frac{1.754 - 1.240}{0.449 \left(\frac{1}{3} + \frac{1}{3} \right)} = 0.939$$

$$\sigma_p^2 = \frac{(n_1 - 1)\sigma_1^2 + (n_2 - 1)\sigma_2^2}{n_1 + n_2 - 2} = \frac{(3 - 1)0.324 + (3 - 1)0.891}{3 + 3 - 2} = 0.939$$

$$g.l. = n_1 + n_2 - 2 = 3 + 3 - 2 = 4$$

$$t_4^{0.05} = 2.132$$

$t_{calculada} < t_{tablas} \therefore$ no se rechaza la H_0 y se concluye que los estimados de θ_S entre las dos muestras son estadísticamente iguales.

Apéndice 10

Prueba *t-Student* de θ_H entre las poblaciones históricas y actuales de *S. perotensis*

Hipótesis nula (Ho) = los estimados de θ_H entre las dos muestras son estadísticamente iguales.

Hipótesis alternativa (Ha) = la θ_H de las poblaciones históricas es mayor que la θ_H de las poblaciones actuales.

	Muestra histórica (θ_H)	Muestra actual (θ_H)
Tepeyahualco	3.713	2.468
Totalco	1.367	0.474
Perote	1.599	–
Pizarro	–	0.916
Promedio \bar{X}	2.226	1.286
Varianza σ	1.671	1.096

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\sigma_p^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} = \frac{2.226 - 1.286}{1.996 \left(\frac{1}{3} + \frac{1}{3} \right)} = 0.815$$

$$\sigma_p^2 = \frac{(n_1 - 1)\sigma_1^2 + (n_2 - 1)\sigma_2^2}{n_1 + n_2 - 2} = \frac{(3 - 1)1.671 + (3 - 1)1.096}{3 + 3 - 2} = 1.996$$

$$g.l. = n_1 + n_2 - 2 = 3 + 3 - 2 = 4$$

$$t_4^{0.05} = 2.132$$

$t_{calculada} < t_{tablas} \therefore$ no se rechaza la Ho y se concluye que los estimados de θ_H entre las dos muestras son estadísticamente iguales.

Apéndice 11

Estimación de N_{ef} y N_e de Tepeyahualco y Totalco

Población	Asumiendo $T_G = 3.83$ años	Asumiendo $T_G = 2.42$ años
Tepeyahualco	$N_{ef} = \frac{-t}{\ln \frac{H_t}{H_0}} = \frac{\frac{-17}{3.83}}{\ln \frac{0.325}{0.900}} = 4.36$	$N_{ef} = \frac{-t}{\ln \frac{H_t}{H_0}} = \frac{\frac{-17}{2.42}}{\ln \frac{0.325}{0.900}} = 6.90$
	$N_e = \frac{\frac{-t}{2}}{\ln \frac{H_t}{H_0}} = \frac{\frac{-17/3.83}{2}}{\ln \frac{0.760}{0.822}} = 28.26$	$N_e = \frac{\frac{-t}{2}}{\ln \frac{H_t}{H_0}} = \frac{\frac{-17/2.42}{2}}{\ln \frac{0.760}{0.822}} = 44.72$
Totalco	$N_{ef} = \frac{-t}{\ln \frac{H_t}{H_0}} = \frac{\frac{-17}{3.83}}{\ln \frac{0.363}{0.695}} = 6.82$	$N_{ef} = \frac{-t}{\ln \frac{H_t}{H_0}} = \frac{\frac{-17}{2.42}}{\ln \frac{0.363}{0.695}} = 10.80$
	$N_e = \frac{\frac{-t}{2}}{\ln \frac{H_t}{H_0}} = \frac{\frac{-17/3.83}{2}}{\ln \frac{0.389}{0.628}} = 4.64$	$N_e = \frac{\frac{-t}{2}}{\ln \frac{H_t}{H_0}} = \frac{\frac{-17/2.42}{2}}{\ln \frac{0.389}{0.628}} = 7.34$

Apéndice 12

Estimación del tamaño poblacional mínimo viable para *S. perotensis*

Asumiendo $T_G = 3.83$ años	Asumiendo $T_G = 2.42$ años
$N_e = \frac{\frac{-t}{2}}{\ln \frac{H_t}{H_0}} = \frac{\frac{-100/3.83}{2}}{\ln 0.9} \approx 124$	$N_e = \frac{\frac{-t}{2}}{\ln \frac{H_t}{H_0}} = \frac{\frac{-100/2.42}{2}}{\ln 0.9} \approx 196$