



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

“El efecto de la fragmentación en la
variabilidad genética de los perros
llaneros (*Cynomys ludovicianus*) en
Janos – Nuevo Casas Grandes,
Chihuahua, México”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA AMBIENTAL**

P R E S E N T A

GABRIELA CASTELLANOS MORALES

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE ORTEGA REYES

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 17 de agosto de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** de la alumna **CASTELLANOS MORALES GABRIELA** con número de cuenta **97553940** con la tesis titulada **"EL EFECTO DE LA FRAGMENTACION EN LA VARIABILIDAD GENETICA DE LOS PERROS LLANEROS (CYNOMYS LUDOVICIANUS) EN JANOS - NUEVO CASAS GRANDES, CHIHUAHUA, MEXICO."**, realizada bajo la dirección del: **DR. JORGE ORTEGA REYES**

Presidente: DRA. LIVIA SOCORRO LEON PANIAGUA
Vocal: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU
Secretario: DR. JORGE ORTEGA REYES
Suplente: DR. GERARDO SUZAN AZPIRI
Suplente: DR. RURIK HERMANN LIST SANCHEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 09 de octubre de 2009.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

Agradecimientos

Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

CONACyT (número de beca: 10927), IPN (proyectos: CGPI 20082950 y CGPI 20090474), Fundación Kaplan (proyecto: ECO-IE 267 “Conservación del ecosistema de los perros de las praderas en Janos, Chihuahua, México) y PAEP por los apoyos recibidos.

Mi tutor Dr. Jorge Ortega Reyes y los miembros del comité tutorial: Dr. Gerardo Jorge Ceballos González y Dr. Rurik Hermann List Sánchez por sus valiosos comentarios durante el desarrollo del presente trabajo. A los miembros del jurado Dr. Daniel Piñero, Dra. Livia León, Dr. Gerardo Suzán, Dr. Jorge Ortega y Dr. Rurik List por sus valiosos comentarios sobre este manuscrito.

Laboratorio de Ecología y Conservación de Fauna Silvestre del Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México y Estación Biológica de la Pradera por apoyar y financiar el trabajo de campo. Por el apoyo y la mancuerna que hicimos para el trabajo de campo gracias al Dr. Rafael Ávila, M en C. Alejandra de Villa y a la Biól. Ana Montiel; sin su ayuda no habría sido posible obtener las muestras. A toda la gente de los ejidos y ranchos de los municipios de Janos y Casas Grandes por permitirnos trabajar en sus tierras.

Laboratorio de Genética y Evolución del Instituto de Ecología de la UNAM y al Dr. Daniel Piñero por permitirme realizar en sus instalaciones el trabajo de laboratorio (extracción de ADN, estandarización y amplificación de microsatélites) y de análisis de datos. La CDC Maryland, en especial a Lauren Teerweller por su apoyo en la genotipificación de los microsatélites.

Biól. Jaime Gasca, Biól. Lev Jardón, Dra. Alejandra Moreno, M en C. Enrique Scheinvar y Dr. Alejandra Vázquez-Lobo por su apoyo en el laboratorio, el uso de programas para análisis de datos y aportar ideas que enriquecieron este trabajo.

Agradecimientos personales

A mi mamá y mi tía (Leticia y Liliana) que son las columnas que me sostienen, gracias por el cariño y apoyo en todo momento, siempre han sido un ejemplo para mí. A mi hermano, León Felipe, gracias por ayudarme a ser autocrítica, por los consejos, las carcajadas y todos los buenos momentos (ah! y el apoyo en el diseño de póster para los congresos). A mi sobrina, María José, por impulsarme a ser un buen ejemplo, por ayudarme a desconectarme cuando estoy estresada y por exigirme ser mejor. A mi padre, aunque se encuentre tan lejos.

A Julio Pliego gracias por creer en mí y darme ánimos para seguir adelante, eres un gran ejemplo. Siempre te recordare.

Jorge Ortega, gracias por introducirme al mundo de la genética de la conservación, por el apoyo y la asesoría.

A Jaime Gasca por sus consejos y apoyo en la estandarización de microsatélites y demás asuntos relacionados con el trabajo de laboratorio; por ayudarme a correr el programa STRUCTURE y por tomarse el tiempo para revisar el manuscrito de la tesis y por sus acertados comentarios que me ayudaron a mejorar la estructura de este trabajo.

A mis familias adoptivas del Instituto de Ecología: Dr. Daniel Piñero y los miembros del Laboratorio de Genética y Evolución, y a los miembros del Laboratorio de Ecología y Conservación de Fauna Silvestre.

A todos los que me apoyaron en el campo e hicieron la labor y estancia en Janos mucho más amena e interesante: Rafael Ávila, Alejandra de Villa, Ana Montiel, Rodrigo Sierra, Juan Cruzado, Eduardo Ponce, Karina Tavera, Paulina Núñez, Emmanuel Rivera y los voluntarios Gerardo Guerra, Rodrigo González y Amanda Solís. Un agradecimiento especial a la familia

Solís por abrirnos la puerta de su hogar. A toda la gente de los ejidos y ranchos de los municipios de Janos y Casas Grandes por permitirnos trabajar en sus tierras.

Rurik, gracias por presionarme, sin tus acertados comentarios y constantes cuestionamientos me encontraría en un lugar muy distinto.

A mis amigos, Lev y Ale Moreno por estar siempre disponibles para contestar dudas y compartir buenos momentos. Al Animal crew (Jaime, Marco y Alexander) por permitirme entrar en su círculo de discusión de artículos, que ayudaron a enriquecer mi formación académica.

A Natalia y todas mis alumnas de danza, en especial a Paulina, Terpsícore y Vero por acompañarme en el descubrimiento y la exploración de esa otra parte que también soy yo.

A mis queridísimos cuates por acompañarme en el camino: Lev, Ale Moreno, Nat, Güilis, Pau, Verola, Terp (Ester), Thelma, Enrique, Niza, el Troll, Moni, Jaime, Marko, Alex, Paulina Arias, Emmo, Vero y Karla.

Finalmente, a la gente con la que compartí las aulas de la maestría por enriquecer las discusiones y a mis profesores por todo lo que me enseñaron.

Índice

Agradecimientos.....	3
Agradecimientos personales.....	4
Índice.....	6
Índice de Cuadros.....	10
Índice de Figuras.....	12
Resumen.....	14
Abstract.....	16
1. Introducción.....	18
2. Antecedentes.....	23
2.1 Marco Teórico.....	23
2.1.1 Microsatélites.....	23
2.1.2 Diversidad y estructura genética.....	25
Principio de Hardy-Weinberg.....	25
Variabilidad genética.....	27
Estructura genética.....	29
2.1.3 Procesos evolutivos en poblaciones fragmentadas.....	31
Deriva génica.....	32
Flujo génico.....	32
Mutación.....	34
Endogamia.....	34
2.1.4 Cuellos de botella.....	35

2.2	Sujeto de estudio: <i>Cynomys ludovicianus</i>	37
	Antecedentes genéticos de <i>Cynomys ludovicianus</i>	41
2.3	Sitio de estudio.....	45
	Complejo Janos - Casas Grandes.....	47
3.	Objetivos.....	49
	Objetivo general.....	49
	Objetivos particulares.....	49
4.	Hipótesis.....	50
5.	Métodos.....	51
	5.1 Obtención de muestras.....	51
	5.1.1 Extracción de ADN.....	53
	5.2 Amplificación y lectura de Microsatélites.....	54
	5.3 Análisis estadísticos.....	55
	5.3.1 Variabilidad genética.....	56
	5.3.2 Estructuración genética.....	57
	Coeficientes F.....	57
	Flujo génico.....	58
	Efecto de la distancia geográfica y el tamaño de la colonia.....	59
	Análisis de varianza molecular.....	60
	Estructura genética.....	61
	5.3.3 Relaciones de parentesco.....	62
	5.3.4 Cuellos de botella.....	63
6.	Resultados.....	64
	6.1 Obtención de muestras.....	64

6.2 Amplificación de microsatélites.....	65
6.3 Análisis estadísticos.....	68
6.3.1 Variabilidad genética.....	68
6.3.2 Estructuración genética.....	70
Índice de fijación F_{IS}	70
Índice de diferenciación genética (R_{ST}) y distancia genética de Nei (D_A). 70	
Flujo génico.....	72
Efecto de la distancia geográfica y el tamaño de la colonia.....	75
Análisis de varianza molecular.....	77
Estructura genética.....	81
6.3.3 Relaciones de parentesco.....	83
6.3.4 Cuellos de botella.....	84
7. Discusión.....	86
8. Conclusiones.....	104
Conservación.....	105
9. Perspectivas.....	108
10. Referencias.....	109
Anexos	
Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN de sangre (Bio-Rad modificado sin RNAsa).....	123
Anexo 2. Frecuencias alélicas por locus por colonia.....	124
Anexo 3. Análisis de alelos nulos.....	125
Anexo 4. Valores de probabilidad por colonia y total de desequilibrio de ligamiento calculados con GENEPOP	126

Anexo 5. Matriz con valores de distancia genética de Nei (D_A ; Nei <i>et al.</i> 1983).....	128
Anexo 6. Matrices de máxima verosimilitud de relación de parentesco entre individuos de cada colonia. * Medios hermanos; ** Hermanos completos; *** Padre-Hijo.....	129
Anexo 7. Valor de ΔK obtenido a partir del análisis de Evanno <i>et al.</i> (2005) para los valores del logaritmo de la verosimilitud posterior calculados por STRUCTURE.....	139

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Estudios sobre variabilidad genética de perros llaneros.....	44
Cuadro 2. Nombre, abreviación, tamaño (ha), densidad relativa (ind/ha) y densidad (ind/colonia) de las 13 colonias muestreadas en el complejo de perros llaneros (<i>Cynomys ludovicianus</i>) en Janos, Chihuahua.....	51
Cuadro 3. Condiciones para la reacción de PCR para cada microsatélite.....	55
Cuadro 4. Número de individuos muestreados clasificado en hembras y machos, en adultos y juveniles y número total por colonia.....	64
Cuadro 5. Resultados de prueba exacta de equilibrio de Hardy-Weinberg por locus.....	67
Cuadro 6. Medidas de variabilidad genética para 13 colonias de perros llaneros (<i>Cynomys ludovicianus</i>) de Janos, Chihuahua.	69
Cuadro 7. Valores del índice diferenciación genética entre colonias (R_{ST} pareadas) del complejo de perros llaneros (<i>Cynomys ludovicianus</i>) de Janos-Casas Grandes. Los asteriscos muestran los valores de R_{ST} pareadas que NO son significativos.	71
Cuadro 8. Matriz con valores de flujo génico ($Nm = 1-R_{ST}/4R_{ST}$).....	73
Cuadro 9. Valor de la mediana del número de migrantes por generación ($M = m/\mu$). Número de emigrantes (E) en las filas y número de inmigrantes (I) en las columnas; total de emigrantes (Total (E)) e inmigrantes (Total (I)) por colonia. PE y PI se refieren a la proporción de emigrantes e inmigrantes con respecto a la densidad calculada en el cuadro 2 para cada colonia ($PE = E/N$; $PI = I/N$).	74
Cuadro 10. Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) a partir de F_{ST} y R_{ST}	78
Cuadro 11. Resultados de análisis espacial de varianza molecular (SAMOVA) por diferencia de distancia cuadradas (R_{ST}).	79

Cuadro 12. Proporción de asignación de individuos total y de acuerdo a intervalos de confianza para $K = 2$ definidos por el programa STRUCTURE.....	82
Cuadro 13. Relaciones de parentesco significativas calculadas con ML-RELATE.....	84
Cuadro 14. Estimación de cuello de botella recientes de acuerdo al modelo de mutación en dos fases (TPM) y al modelo de mutación paso a paso (SMM).....	85
Cuadro 15. Antecedentes en estudios de genética de poblaciones realizados con microsatélites en algunas especies de la familia Sciuridae.	89

Índice de Figuras

Figura 1. Vórtice de extinción (Rocha y Gasca, 2007).....	19
Figura 2. Localización del sitio de estudio. Se resalta en el mapa la ubicación del estado de Chihuahua, México y los municipios de Janos y Casas Grandes. A la izquierda se observa la distribución del complejo (tomado de Ceballos <i>et al.</i> 2005).	45
Figura 3. Mapa de colonias muestreadas durante el trampeo. También se presentan los sitios de captura. Colonias AB: Agua Blanca, BA: Buenos Aires, CJ: Presa Casa de Janos, EA: El Águila, EC: El Cuervo, LB: La Báscula, LC: La Cal, MO: Mata Ortiz, MV: Monteverde, OS: Ojitos Sur, PP: Papalote San Pedro , PV: Pancho Villa y UN: El Uno Norte (Modificado de Pacheco <i>et al.</i> 2009).	52
Figura 4. Gel de agarosa al 1% para comprobación de extracción de ADN. Cada banda representa un individuo (EC22, PV4, EA6, LC9, PP6, LB1 y UN1); en el último pozo se observa una escalera molecular de 100 pb (esc).....	53
Figura 5. Frecuencias alélicas por locus para 10 microsatélites amplificados para 160 perros de las praderas (<i>Cynomys ludovicianus</i>) de 13 colonias de Janos, Chihuahua. Cada color representa un alelo.....	66
Figura 6. Dendograma calculado con el algoritmo del Vecino más cercano y construido a partir de los valores de distancia genética de Nei (D_A ; Anexo 5; Nei <i>et al.</i> 1983). AB: Agua Blanca, BA: Buenos Aires, CJ: Presa Casa de Janos, EA: El Águila, EC: El Cuervo, LB: La Báscula, LC: La Cal, MO: Mata Ortiz, MV: Monteverde, OS: Ojitos Sur, PP: Papalote San Pedro, PV: Pancho Villa; UN: El Uno Norte.....	72
Figura 7. Gráfica de correlación entre distancia genética y distancia geográfica.....	75

Figura 8. Gráfica de correlación entre a) valores de diversidad genética (H_E) y b) índice de endogamia (F_{IS}) contra el logaritmo del tamaño de la colonia (ha)..... 76

Figura 9. Barreras genéticas estimadas por SAMOVA. En rojo aquellas con más del 95% de confiabilidad. AB: Agua Blanca, BA: Buenos Aires, CJ: Presa Casa de Janos, EA: El Águila, EC: El Cuervo, LB: La Báscula, LC: La Cal, MO: Mata Ortiz, MV: Monteverde, OS: Ojitos Sur, PP: Papalote San Pedro, PV: Pancho Villa; UN: El Uno Norte..... 80

Figura 10. Resultados de asignación genética de los individuos a cada uno de los grupos determinados por STRUCTURE. Rosa, grupo 1. Verde, grupo 2. AB: Agua Blanca, BA: Buenos Aires, CJ: Presa Casa de Janos, EA: El Águila, EC: El Cuervo, LB: La Báscula, LC: La Cal, MO: Mata Ortiz, MV: Monteverde, OS: Ojitos Sur, PP: Papalote San Pedro, PV: Pancho Villa; UN: El Uno Norte..... 82

RESUMEN: La fragmentación del hábitat es la principal causa de pérdida de biodiversidad y, al reducir los tamaños efectivos poblacionales e interrumpir el flujo génico, se promueve la pérdida de la diversidad genética por efecto de la endogamia y la deriva génica, incrementando la probabilidad de extinción de poblaciones y especies. El objetivo de este estudio fue evaluar el posible efecto de la fragmentación de hábitat en la variabilidad genética de los perros llaneros (*Cynomys ludovicianus*) del complejo Janos - Casas Grandes, Chihuahua. Se capturaron 160 individuos en 13 colonias del complejo y se amplificaron 10 microsatélites específicos. En la mayoría de los loci se encontró al menos un alelo con frecuencia cerca a 0.1, lo cual sugiere que éstos se encuentran en proceso de fijación por deriva génica o transición. Además, el análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg reveló deficiencia de heterocigos en 3 de los 10 loci y en 8 de las 13 colonias estudiadas. No se encontraron alelos nulos ni desequilibrio de ligamiento. El valor de variabilidad genética obtenido ($H_E = 0.525$) fue menor a los reportados para otros sciúridos y mayor a los observados en algunas especies en peligro de extinción. Se encontró diferenciación significativa entre las colonias y alto número de migrantes. Este valor puede deberse a que los números son un promedio histórico y no reflejan el flujo génico actual y se relacionan con una población panmíctica que se ha visto afectada por la fragmentación del hábitat. Los coeficientes F ($F_{ST} = 0.103$; $F_{IS} = 0.18$ y $F_{IT} = 0.264$) y el análisis de AMOVA revelaron que la mayoría de la variabilidad se encuentra distribuida a nivel intra-individuos y en menor medida entre las colonias, situación que se puede deber a la alta diferenciación reportada entre grupos familiares. Asimismo, se observó efecto de la deriva génica y la endogamia en la distribución de la variación. El análisis de estructuración distribuyó a los individuos dentro de dos grupos; el 50% de los individuos estuvieron entremezclados, es decir que son inmigrantes o descendientes de inmigrantes. Los resultados coinciden con la historia de un complejo que se ha fragmentado a causa de las actividades antropogénicas; sin embargo, la fragmentación del hábitat es muy

reciente de manera que el efecto más importante en la variación genética se refleja en el bajo número de alelos observados. La variabilidad encontrada en cada colonia se relaciona con su historia individual. La colonia del complejo con mayor variabilidad fue El Cuervo que hasta hace algunos años era la más grande de Norteamérica, de manera que proponemos que esta colonia se proteja y funcione como población fuente en caso de realizar reubicación de individuos hacia las colonias con baja variabilidad genética como El Uno Norte; también es necesario manejar aquellas colonias con baja variabilidad, alta endogamia y aisladas como Agua Blanca, La Cal, El Uno Norte y Presa Casa de Janos, así como incrementar la conectividad entre colonias que permita el reestablecimiento de flujo génico entre ellas, para promover la permanencia, a largo plazo, de esta especie y el pastizal que habita.

ABSTRACT: Habitat fragmentation is one of the main causes of biodiversity loss, and when effective population size decreases and gene flow is interrupted, loss of genetic variability is promoted by the effect of inbreeding and genetic drift, which increases the extinction probability of populations and species. The objective of this study was to assess the possible effect of habitat fragmentation on the genetic variability of the black tailed prairie dogs (Cynomys ludovicianus) in the Janos - Casas Grandes complex in Chihuahua. 160 prairie dogs were captured in 13 colonies from this complex, and 10 specific microsatellite loci were amplified. In most loci, one allele with a frequency close to 0.1 was found, which suggests that these alleles are closed to fixation due to genetic drift or in transition. In addition, analysis of Hardy-Weinberg equilibria revealed heterozygote deficiency in three of the 10 amplified loci and in 8 of the 13 sampled colonies. There were no null alleles or linkage disequilibrium. Genetic variability ($H_E = 0.525$) was lower than those previously reported for other sciurids and higher than the reported for some endangered species. Genetic differentiation between colonies was statistically significant and gene flow was high. High gene flow estimates could be related to the fact that they represent historic values and not the actual gene flow, and they could also reflect a panmictic population that has been fragmented by human activities. F statistics ($F_{ST} = 0.103$; $F_{IS} = 0.18$ and $F_{IT} = 0.264$) and AMOVA analysis revealed that variability is distributed in a greater proportion within individuals and in a lesser proportion among colonies, which can be related to the high differentiation between coterries previously reported. There were signs of the effect of genetic drift and inbreeding on genetic variation distribution. Structure analysis assigned individuals to two clusters; 50% of individuals presented admixture, which could be interpreted as being immigrants or descendents of immigrants. Results were consistent with the history of a complex that has been fragmented by anthropogenic activities, nevertheless, habitat fragmentation is very recent and the most important effect of fragmentation on genetic variability is observed on the

low number of alleles found on the population. Genetic variability found on each colony is related to its history. The colony that presented the highest genetic variation was El Cuervo, which until recently, was the largest colony in North America. This colony must be protected and, it can work as a source for the translocation of individuals towards those colonies that have low genetic variability such as El Uno Norte; it is also necessary to manage those colonies that presented low genetic variability, high inbreeding and isolation such as Agua Blanca, La Cal, El Uno Norte and Presa Casa de Janos, as well as increasing population connectivity that will allow gene flow reestablishment in order to promote this species and grassland permanence in a long term.

1. Introducción

Nos encontramos en un período de extinción de especies a gran escala (Myers, 1997; Ceballos y Ehrlich, 2002; Frankham *et al.* 2005). A diferencia de los períodos de extinción pasados, el actual se debe principalmente al efecto directo o indirecto de las actividades antropogénicas y el principal problema radica en que las especies se están perdiendo a una tasa que sobrepasa el origen de especies nuevas (Frankham *et al.* 2005).

Como respuesta a esta crisis surge la biología de la conservación, un campo multidisciplinario que aplica principios de ecología, biogeografía, genética, economía, sociología, antropología, filosofía y otras disciplinas teóricas en el mantenimiento de la diversidad biológica (Meffe y Carrol, 1997). Con el avance de las técnicas moleculares, surge la genética de la conservación que se centra en la aplicación de la genética de poblaciones y la genética cuantitativa para preservar a las especies como entidades dinámicas capaces de acoplarse al cambio ambiental a partir del manejo genético de poblaciones pequeñas, de la resolución de ambigüedades taxonómicas, de la definición de unidades de manejo dentro de las especies y del uso de análisis genéticos moleculares en la ciencia forense y la comprensión de la biología de las especies (Frankham *et al.* 2005; Rocha y Gasca, 2007).

Por otra parte, diversos estudios han señalado la importancia de considerar datos tanto demográficos como genéticos en la toma de decisiones para la conservación de especies, ya que ambos aspectos se encuentran cercanamente relacionados. Esta relación ocurre porque en poblaciones pequeñas los factores estocásticos aceleran el declive de la población e inician un ciclo de alta deriva génica y depresión por endogamia que disminuyen la adecuación, e incrementan la variación demográfica promoviendo un declive mayor del tamaño efectivo poblacional, aumentando así, la probabilidad de extinción; a este modelo se le denomina “vórtice

de extinción” (Fig. 1; Rocha y Gasca, 2007). En consecuencia, la toma de decisiones de conservación y la implementación de planes de manejo de especies que se encuentran en riesgo, se apoyan cada vez más en el estudio de la variabilidad genética y la manera en la que ésta está estructurada dentro las poblaciones (Frankham, 1996; Frankham *et al.* 2005).

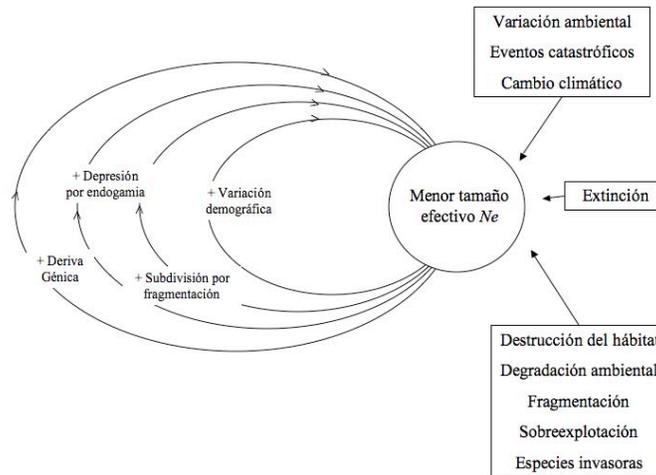


Figura 1. Vórtice de extinción (Rocha y Gasca, 2007).

En la actual crisis de extinción (Myers, 1997; Ceballos y Ehrlich, 2002; Frankham *et al.* 2005) se ha identificado a la fragmentación del hábitat como una de las causas principales de la pérdida de biodiversidad (Myers, 1997; Frankham *et al.* 2005), y el tipo de perturbación antropogénica con mayor impacto negativo en la variabilidad genética (DiBattista, 2008). La fragmentación del hábitat tiene consecuencias en el medio ambiente físico, al alterar los flujos físicos (radiación, viento, agua y nutrientes) y en el ámbito biogeográfico. El efecto de ésta sobre las poblaciones varía de acuerdo al tiempo de aislamiento y a la distancia entre parches, así como con el tamaño, la forma y la posición de los parches individuales, siendo los remanentes grandes los menos afectados por el proceso (Saunders *et al.* 1991).

De acuerdo con Frankham y colaboradores. (2005), la fragmentación del hábitat involucra dos procesos: 1) la reducción en el área total del hábitat; y 2) la generación de parches aislados a partir de una distribución continua. Estos procesos tienen como implicación la reducción general del tamaño poblacional de la mayoría de las especies y la reducción de la migración entre los parches de manera que afectan la composición genética de las especies, ya que al incrementarse la endogamia y la deriva génica se erosiona la variabilidad.

La UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza; www.iucn.org) señala que la variabilidad genética es uno de los aspectos de la biodiversidad que se debe preservar, ya que ésta es la materia prima para la evolución (McNeely *et al.* 1990). La variabilidad genética representa un balance entre la mutación, la deriva génica y la selección natural, y altos niveles de variación son considerados sanos ya que confieren a las poblaciones la habilidad de responder a presiones de selección (Amos y Harwood, 1998). Estudios experimentales y de campo han relacionado bajos niveles de variabilidad genética con alta probabilidad de extinción (Newman y Pilson, 1997; Saccheri *et al.* 1998; Madsen *et al.* 1999; Spielman *et al.* 2004). La variabilidad genética es importante para la persistencia de las poblaciones, especialmente, para aquellas que se han fragmentado, han atravesado cuellos de botella o presentan pérdida rápida de la variabilidad genética y se encuentran en peligro de desaparecer (Gaggiotti, 2003; Spielman *et al.* 2004; Frankham *et a.* 2005).

Para comprender la influencia de las fuerzas evolutivas en poblaciones perturbadas, primero debemos describir y cuantificar la cantidad de variación genética en una población y el patrón de variación entre poblaciones (Hedrick, 2005). Los estudios de variabilidad genética en poblaciones afectadas por actividades antropogénicas permiten evaluar y distinguir entre patrones actuales e históricos de variabilidad, así como el estado de conservación de las poblaciones y, en caso de ser necesario, realizar planes de manejo para su incremento, considerando la historia

biológica de la especie o población estudiada (Frankham *et al.* 2005). Además, es necesario realizar estudios comparativos entre sitios fragmentados y no fragmentados (Williams *et al.*, 2003), o con especies cercanas, lo cual permite identificar los resultados relacionados con la fragmentación del hábitat. Los estudios con este enfoque deben ser considerados prioritarios (DiBattista, 2008).

La fragmentación del hábitat incrementa la diferenciación genética entre poblaciones y disminuye los niveles de variación dentro de las poblaciones con relación a taxa emparentados (Williams *et al.* 2003; DiBattista, 2008). Al reducirse el tamaño efectivo poblacional se observa un incremento en el efecto de la endogamia y la deriva génica, lo cual implica una tendencia hacia la pérdida y fijación de alelos y una disminución en la heterocigosidad (Frankham, 1997; Frankham *et al.* 2005). Además, al restringirse el flujo génico se observa un incremento en la endogamia, y en consecuencia en la depresión por endogamia, y en la diferenciación genética entre los fragmentos; procesos que tienen como efecto la pérdida de variabilidad genética dentro de cada fragmento que compromete el potencial evolutivo e incrementa la probabilidad de extinción de las especies (Frankham, 1996; Maudet *et al.* 2002; Frankham *et al.* 2005).

Es importante realizar estudios de variabilidad genética en poblaciones amenazadas por la fragmentación del hábitat como es el caso del perro llanero de cola negra (*Cynomys ludovicianus*), una especie que en México se encuentra en la categoría de especie amenazada (NOM-ECOL-059-2001), que además es considerada especie clave e ingeniero del ecosistema de los pastizales del norte de México (Ceballos *et al.* 2005). Los pastizales de la región de Janos, Chihuahua, donde se llevó a cabo el estudio están considerados dentro de las regiones terrestres prioritarias para la conservación por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO; Arriaga *et al.* 2000). Además, el sistema de colonias de perros llaneros representa un modelo ideal para estudios de fragmentación del hábitat y conservación,

pues conforman una metapoblación con colonias de distintos tamaños, edades y densidades poblacionales, en las cuales el impacto antropogénico se ha dado de manera diferencial.

El objetivo del presente estudio es evaluar el posible efecto que ha tenido la fragmentación del hábitat causada por la expansión de la agricultura y la ganadería en la variabilidad genética de los perros llaneros del complejo Janos - Casas Grandes, Chihuahua, así como, proponer medidas de manejo, basadas en información genética, para la recuperación y persistencia de la especie que, además, puede influir directamente en la permanencia de este pastizal en el largo plazo. El presente trabajo representa el primer estudio genético de la especie en el extremo sur de su área de distribución.

2. Antecedentes

2.1 Marco Teórico

2.1.1 Microsatélites

Los marcadores genéticos se pueden utilizar para calcular muchos parámetros de interés para los ecólogos, como las tasas de migración, el tamaño poblacional y el parentesco (Selkoe y Toonen, 2006). Entre los marcadores moleculares, los microsatélites son ampliamente utilizados porque tienen el potencial para proveer estimaciones recientes de migración, también tienen un alto poder de resolución para distinguir tasas de migración relativamente altas, y pueden estimar el parentesco de los individuos (Selkoe y Toonen, 2006). Son marcadores neutrales altamente variables, ideales para el estudio de la variación intraespecífica (Harper *et al.* 2003).

Los microsatélites son repeticiones de secuencias de 1 a 6 nucleótidos colocadas una junto a otra y se encuentran en alta frecuencia en los genomas nucleares de la mayoría de los taxa. Las unidades de repetición encontradas comúnmente son dinucleótidos, trinucleótidos y tetranucleótidos. Un locus de microsatélite generalmente varía entre 5 y 40 unidades de repetición en cuanto a longitud, aunque se pueden encontrar cadenas más largas (Selkoe y Toonen, 2006).

Una característica importante de los microsatélites, es que mutan de manera frecuente por errores de acoplamiento durante el proceso de replicación del ADN, en el que cambian el número de unidades de repetición y por lo tanto la longitud de la cadena (Selkoe y Toonen, 2006). La tasa de mutación en microsatélites se ha calculado en el orden de 10^{-3} por locus, en contraste con las secuencias de ADN donde las mutaciones puntuales por nucleótido van de 10^{-8} a 10^{-9} (Väli *et al.* 2008). Estas altas tasas de mutación generan mayor diversidad alélica, condición necesaria para el estudio de procesos genéticos que actúan en escalas de tiempo ecológico, de manera que

permiten responder preguntas ecológicas en una escala fina y tienen poder para detectar patrones demográficos (Selkoe y Toonen, 2006).

Los microsatélites son marcadores moleculares altamente informativos, que tienen bajo costo, se aislan fácilmente y presentan alto polimorfismo, por lo que se consideran marcadores moleculares óptimos para el desarrollo de estudios genéticos a una escala ecológica, siempre y cuando el investigador esté conciente de sus limitaciones, pues al tratarse de sitios altamente polimórficos con tasas de mutación alta y un comportamiento mutacional complejo pueden producir una visión sesgada de los niveles generales de variabilidad genética. Además, son difíciles de automatizar y se presenta un sesgo en la publicación, ya que aquellos loci monomórficos o con variabilidad limitada no son reportados ni considerados al realizar los análisis (Schlötterer, 2004; Selkoe y Toonen, 2006; Väli *et al.* 2008). Algunos autores recomiendan el uso de los *single nucleotide polymorphisms* (polimorfismos en un sólo nucleótido; SNPs) en lugar de los microsatélites, ya que presentan tasas de mutación bajas, son abundantes en el genoma, son fáciles de tipificar y permiten la comparación entre estudios; sin embargo existe debate respecto a las ventajas del uso de estos marcadores sobre los microsatélites (Schlötterer, 2004; Väli *et al.* 2008; Vignal *et al.* 2002).

2.1.2 Diversidad y estructura genética

Principio de Hardy-Weinberg

El principio de Hardy-Weinberg nos permite estimar las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas y es la base de la teoría de la genética de poblaciones. La relación entre las frecuencias alélicas y genotípicas de acuerdo con este principio, está dado por:

$$AA:p^2 \qquad Aa: 2pq \qquad aa:q^2$$

Donde p^2 , $2pq$ y q^2 son las frecuencias de los genotipos AA , Aa y aa en los cigotos de una generación dada, y p y q son las frecuencias de los alelos A y a en los gametos de la generación previa, de manera que $p + q = 1$ (Hartl y Clark, 2007). Las frecuencias genotípicas esperadas de acuerdo al modelo de Hardy-Weinberg para un locus dos alelos (p y q) se encuentran en la proporción (Hedrick, 2005):

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

Cuando se cumplen los supuestos de este principio: 1) organismos diploides; 2) reproducción sexual; 3) un gen con dos alelos; 4) frecuencias alélicas idénticas en machos y hembras; 5) apareamiento aleatorio; 6) población infinita; 7) no migración; 8) no mutación y; 9) la selección natural no afecta a los alelos; entonces, las frecuencias genotípicas son estables en el tiempo, es decir, se encuentran en las proporciones esperadas de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg (Hedrick, 2005; Hartl y Clark, 2007).

Al analizar cómo se comportan las frecuencias alélicas con respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg, podemos determinar si las fuerzas evolutivas están actuando en nuestra población (Hedrick, 2005). Este análisis no indica qué supuestos son los que se rompen y, por lo tanto, qué fuerzas evolutivas son las que actúan, de manera que es necesario realizar otros análisis que ayuden a identificarlas. Sin embargo, el que las frecuencias genotípicas se encuentren dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg no implica que se cumplan todos los supuestos de la teoría, ya

que las pruebas estadísticas convencionales no logran detectar el desequilibrio si las desviaciones de los supuestos no son lo suficientemente grandes (Hartl y Clark, 2007).

La presencia de alelos nulos y desequilibrio de ligamiento producen artefactos que se observan como una desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg. Los alelos nulos se producen cuando hay una mutación, provocando una falla en la amplificación del microsatélite que se puede expresar como un exceso de homocigotos (Van Oosterhout *et al.* 2004), mientras que el desequilibrio de ligamiento es la asociación no aleatoria de alelos en diferentes loci, y se relaciona con la frecuencia de recombinación entre genes (Hedrick, 2005; Hartl y Clark, 2007). El desequilibrio de ligamiento es resultado de la historia, ya que refleja la ancestría común entre los haplotipos presentes en cualquier población. Éste se presenta cuando dos o más alelos se encuentran en una posición muy cercana dentro de un cromosoma y la segregación no es independiente, provocando que sus frecuencias alélicas y genotípicas se comporten de la misma manera, es decir, estén asociados estadísticamente (Frankham *et al.* 2005; Hedrick, 2005). El desequilibrio de ligamiento también se puede presentar en genes que no se encuentran físicamente ligados; tal es el caso 1) cuando hay desequilibrio de ligamiento en la población ancestral y éste aún no se ha disipado debido a una tasa de recombinación baja; 2) cuando se presenta ventaja selectiva en cierto tipo gamético; 3) como artefacto de la entremezcla de subpoblaciones que difieren en cuanto a sus frecuencias alélicas; 4) cuando hay una inversión en un cromosoma que afecta la tasa de recombinación en un sitio, seguido de una conversión; y 5) cuando hay autofecundación (Hartl y Clark, 2007).

Variabilidad genética

La diversidad genética es la variedad de alelos y genotipos presentes en una población, una especie o un grupo de especies (Frankham *et al.* 2005). La teoría neutral (Kimura, 1968) asume que la mayor parte de la variación es selectivamente neutra, es decir que la selección juega un papel poco importante en la determinación de las variantes moleculares que se mantienen, y propone que los distintos genotipos tienen un efecto equivalente en la adecuación. De acuerdo con esta teoría, la variabilidad genética está influenciada principalmente por la mutación que la genera y la deriva génica que la elimina; y los procesos que influyen la cantidad y el patrón de la variación molecular son los mismos en cualquier tipo de variación genética (alelos o secuencias de nucleótidos), aunque sus efectos relativos puedan ser diferentes (Hedrick, 2005).

La variabilidad genética se requiere para que las poblaciones se adapten a los cambios ambientales, y se refleja en las diferencias entre individuos para diversos caracteres, entre ellos la tasa reproductiva, la sobrevivencia y el comportamiento. Al utilizar marcadores moleculares, la variabilidad genética se describe utilizando la proporción de loci polimórficos, la heterocigosidad esperada y la diversidad alélica (Hedrick, 2005).

El polimorfismo, se refiere a la presencia de más de un alelo por locus y, la proporción de loci polimórficos se mide de la siguiente manera:

$$P = x/m$$

donde x es el número de loci polimórficos en una muestra de m loci (Hedrick, 2005). Esta medida de variación es la más adecuada para loci de aloenzimas y en menor medida para loci altamente variables, en los cuales una alta proporción de loci son polimórficos en la mayoría de las poblaciones (Hedrick, 2005).

La heterocigosidad esperada es la cantidad de heterocigotos que está presente en una población suponiendo el modelo de Hardy-Weinberg (Nei, 1987); generalmente se reporta la heterocigosidad esperada como medida de variabilidad genética, ya que es menos sensible al tamaño de la muestra que la observada. La heterocigosidad esperada se calcula como:

$$H_E = (n/n-1)1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

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

Por otra parte, la diversidad alélica, riqueza alélica o promedio de alelos por locus se expresa:

$$A = \sum \text{número de alelos por locus} / \text{Número de loci muestreados}$$

En términos de conservación la riqueza alélica se considera más importante que la heterocigosidad, ya que el límite de respuesta a la selección durante varias generaciones está determinada por la composición alélica inicial, independientemente de las frecuencias (Petit *et al.* 1998). Esta medida de variabilidad está fuertemente influenciada por el tamaño de la muestra, de manera que comparaciones entre poblaciones con tamaños de muestra distintos deben ser interpretados con precaución (Hedrick, 2005). La relación entre el tamaño de la muestra (N) y el número promedio de alelos (A) es asintótica y se ha reportado que $N \geq 40$ es necesario para eliminar el sesgo (Leberg, 2002). El grado de polimorfismo también afecta la relación entre N y A . Los loci con bajo polimorfismo se verán menos afectados por el tamaño de la muestra que los loci altamente polimórficos (Leberg, 2002). Dada la importancia de la riqueza alélica en

términos de conservación, se deben realizar correcciones para el tamaño de la muestra como las curvas de rarefacción (Petit *et al.* 2002; Kalinowski, 2004).

La mayoría de las especies y poblaciones en peligro de extinción tienen menor diversidad genética que aquellas especies con tamaños poblacionales grandes. La diferencia en los niveles de variación genética entre poblaciones y especies se relacionan con los tamaños poblacionales históricos y actuales, la presencia de cuellos de botella, el sistema de apareamiento, la selección natural, la presencia de tasas de mutación diferenciales, la inmigración y emigración entre poblaciones y la interacción entre todos estos factores (Frankham *et al.* 2005).

Estructura genética

La mayoría de las poblaciones se encuentran agrupadas en subpoblaciones más pequeñas dentro de las cuales ocurre el apareamiento; a esta subdivisión se le llama estructura poblacional. Cuando hay subdivisión poblacional habrá diferenciación genética entre las poblaciones. La diferenciación genética se refiere a la diferencia en las frecuencias alélicas de las subpoblaciones, y puede ser resultado de la selección natural diferencial entre poblaciones y de la deriva génica (Hartl y Clark, 2007).

Wright (1969) desarrolló una aproximación a la repartición de la variabilidad genética en una población subdividida que se utiliza comúnmente y provee una descripción obvia de la diferenciación y consiste de tres coeficientes de correlación o coeficientes F que distribuyen la variabilidad genética a nivel de poblacional total (T), de subpoblación (S) y de individuo (I) (Hedrick, 2005; Hartl y Clark, 2007).

Los parámetros de los estadísticos F son: F_{ST} que es una medida de la diferenciación genética en las poblaciones. Este coeficiente se refiere al efecto de la subdivisión poblacional en la endogamia y es la probabilidad de que dos alelos obtenidos al azar de una población sean

idénticos por descendencia. El valor de F_{ST} siempre es positivo y puede variar entre 0 (sin diferenciación) y 1 (poblaciones completamente diferenciadas) (Frankham *et al.* 2005; Hedrick, 2005; Hartl y Clark, 2007). Se puede expresar en términos de la heterocigosidad, de manera que:

$$F_{ST} = 1 - (H_S/H_T)$$

donde H_S es la heterocigosidad promedio esperada a nivel subpoblacional y H_T es la heterocigosidad esperada a nivel total (Hedrick, 2005; Hartl y Clark, 2007).

Los índices de fijación F_{IS} y F_{IT} se utilizan como medidas de la endogamia, que se refiere al apareamiento no aleatorio en donde la probabilidad de que un individuo sea autóctigo (con alelos idénticos por descendencia) es mayor que para una población panmíctica (Moreno-Letelier, 2007). El índice F_{IS} es la correlación entre alelos homólogos en los individuos con referencia a la población local y mide la reducción de la heterocigosidad de un individuo debido al apareamiento no aleatorio dentro de una subpoblación. F_{IT} o coeficiente de endogamia total de un individuo es la correlación entre alelos homólogos en los individuos con referencia a la población total. Ambos pueden tener valores de -1 a 1, donde valores positivos indican deficiencia de heterócigos y negativos exceso de heterócigos (Hedrick, 2005; Abarca-García y López-Villalobos, 2007; Hartl y Clark, 2007). También se expresan en términos de la heterocigosidad:

$$F_{IS} = 1 - (H_I/H_S)$$

$$F_{IT} = 1 - (H_I/H_T)$$

donde H_I es la heterocigosidad promedio observada a nivel subpoblacional (Hedrick, 2005; Hartl y Clark, 2007).

Cuando dos o más subpoblaciones se fusionan o son consideradas como una sola población (por un error en el muestreo), se presenta un fenómeno conocido como rompimiento del aislamiento o efecto Wahlund. Éste establece que la fusión y apareamiento aleatorio de las subpoblaciones incrementará la frecuencia observada de homocigotos en comparación a la esperada en una población homogénea en una cantidad igual a la varianza, mientras que la frecuencia observada de heterocigotos disminuirá en una proporción igual al doble de la varianza. Si existen diferencias en las frecuencias alélicas de las subpoblaciones consideradas como una sola población habrá deficiencia de heterocigotos y un exceso de homocigotos aún cuando las frecuencias alélicas de cada subpoblación se encuentren en equilibrio de Hardy-Weinberg (Hedrick, 2005).

2.1.3 Procesos evolutivos en poblaciones fragmentadas

La cantidad de variación encontrada en una población depende de la relación entre la mutación, el flujo génico, la selección y la deriva génica. Sin embargo, se ha observado que en poblaciones pequeñas y fragmentadas el impacto de cada una de estos procesos cambia con respecto a lo registrado en poblaciones con tamaños efectivos poblacionales grandes; por ejemplo, la selección es menos efectiva y la deriva génica tiene un impacto mucho mayor, de manera que se compromete el potencial de respuesta a cambios ambientales de las poblaciones, lo cual puede llevarlas a la extinción (Frankham *et al.* 2005). A continuación se describe el efecto de cada uno de estos procesos en la variabilidad genética de poblaciones fragmentadas.

Deriva génica

La deriva génica o cambios al azar de las frecuencias alélicas resultantes del muestreo de los gametos de una generación a la siguiente en una población finita produce cambios erráticos y grandes en las frecuencias alélicas en períodos de tiempo relativamente pequeños (Hedrick, 2005). La probabilidad de fijación de un alelo se relaciona con el tamaño poblacional y su frecuencia inicial. Se ha observado que la deriva génica tiene el mismo efecto esperado en todos los loci del genoma (Hedrick, 2005).

Se ha propuesto que cuando el tamaño poblacional es pequeño, como en poblaciones fragmentadas, la deriva génica es significativa aún para loci con efectos selectivos considerables o cuando hay flujo génico. Así mismo, las fluctuaciones poblacionales pueden generar cuellos de botella o efecto fundador, donde las poblaciones descendientes pueden tener baja variabilidad genética o baja frecuencia de alelos particulares (Hedrick, 2005). La deriva génica en poblaciones fragmentadas provoca cambios aleatorios en las frecuencias alélicas de una generación a la siguiente, promueve la pérdida de variabilidad genética y la fijación de alelos en las poblaciones, e incrementa la diversificación entre poblaciones réplica provenientes de la misma población ancestral (Frankham *et al.* 2005).

Flujo génico

El flujo génico es el movimiento entre grupos o subpoblaciones que resulta en intercambio genético y es diferente a la migración y dispersión (Frankham *et al.* 2005). Es un componente importante en la estructura de las poblaciones, ya que actúa como una fuerza que mantiene integrada a la especie e influye en procesos ecológicos; puede determinar la persistencia y adaptación de poblaciones locales, las tasas de extinción de las especies y la evolución de los rangos de distribución de las especies (Aguirre-Planter, 2007).

Los métodos indirectos de estimación de flujo génico, desarrollados a partir de la genética de poblaciones, se basan en la observación de la distribución espacial de los alelos en las poblaciones y permite realizar inferencias de los niveles o patrones de flujo génico. En este sentido, la mayoría de los modelos de flujo génico se basan en los conceptos desarrollados por Sewall Wright, y suponen que los organismos forman poblaciones discretas que se diferencian por mutación y deriva génica (modelo de islas); o forman poblaciones con una distribución continua en donde la probabilidad de flujo génico disminuye conforme incrementa la distancia geográfica (modelo de aislamiento por distancia) (Aguirre-Planter, 2007).

El método de estimación de flujo génico más utilizado es el que se basa en F_{ST} , donde $Nm \approx 1/4 (1/F_{ST} - 1)$ para organismos diploides; el resultado de este método debe interpretarse con precaución, ya que por un lado representa un promedio histórico y por el otro, sus supuestos rara vez se cumplen. El modelo asume un número infinito de poblaciones, ausencia de selección o mutación, el flujo génico no es afectado por la distancia entre poblaciones y cada población se encuentra en equilibrio mutación-deriva (Whitlock y McCauley, 1999; Aguirre-Planter, 2007). Sin embargo, representa una aproximación sencilla y práctica al cálculo de flujo génico, que con el uso del marcador molecular adecuado, nos puede dar una idea general de lo que sucedió en el pasado reciente de nuestra población.

Cuando las poblaciones se han fragmentado, la conexión genética entre parches o subpoblaciones depende de la cantidad de flujo génico efectivo entre ellas, de manera que cuando el flujo es alto, homogeniza la variación entre los grupos, mientras que si es bajo la deriva génica, la selección y la mutación en grupos separados van a producir diferenciación genética.

Algunos autores consideran que las poblaciones fragmentadas se comportan como una metapoblación, es decir, una población que consiste de un número diferente de subdivisiones poblacionales en parches de hábitat adecuados, cuya ausencia está determinada por extinción y

cuya presencia está determinada por recolonización desde otras poblaciones (Frankham *et al.* 2005). En una metapoblación, cada subpoblación presenta una dinámica poblacional independiente (Antolin *et al.* 2006), y se ha observado que las dinámicas de extinción-recolonización hace a las metapoblaciones distintas ecológica y genéticamente del concepto tradicional de población subdividida (Frankham *et al.* 2005).

Mutación

La mutación es la principal fuerza responsable del incremento de la variabilidad genética, ya que es responsable de la aparición de nuevos alelos en la población (Hedrick, 2005). La teoría establece que en poblaciones grandes la acumulación de mutaciones se mantiene en bajas frecuencias debido al balance entre selección y mutación. Sin embargo, en poblaciones pequeñas la selección es menos efectiva y los alelos ligeramente deletéreos se vuelven selectivamente neutros, de manera que las fluctuaciones en sus frecuencias son determinadas por la deriva génica. En consecuencia, la frecuencia de algunos de estos alelos se incrementa, y se reduce la adecuación reproductiva; durante periodos de tiempo largos, algunos de estos alelos se pueden fijar en la población causando crecimiento poblacional negativo y un declive hacia la extinción (Frankham, 2005).

Endogamia

En las poblaciones fragmentadas, la disminución del tamaño poblacional y la pérdida de conectividad entre parches promueve un incremento en la endogamia, de manera que se reduce la heterocigosidad y el tamaño efectivo poblacional (Moreno-Letelier, 2007). El apareamiento entre individuos emparentados puede causar desviaciones de las proporciones de Hardy-Weinberg e influye en la adecuación promedio de la población, en la tasa de cambio de las frecuencias

alélicas y en las condiciones para un polimorfismo estable, produciendo depresión por endogamia (reducción de la adecuación reproductiva; Frankham, 1998; Hedrick, 2005). La endogamia tiene efectos deletéreos en todos los aspectos relacionados con la reproducción y la sobrevivencia, incluyendo los aspectos de éxito reproductivo como son: la producción de esperma, la habilidad para aparearse, la fecundidad femenina, la sobrevivencia de los jóvenes, la habilidad parental, la edad a la madurez sexual y la sobrevivencia de los adultos. Estos factores inciden en la probabilidad de extinción de las poblaciones (Frankham, 1998; Wayne y Morin, 2004; Frankham, 2005; Frankham *et al.* 2005; O'Grady *et al.* 2006).

2.1.4 Cuellos de botella

La fragmentación del hábitat puede provocar una disminución drástica del tamaño poblacional, al producir varias poblaciones pequeñas a partir de una grande. Cuando una población desciende de pocos individuos, ya sea por efecto fundador o un cuello de botella, puede haber cambios aleatorios en la variación genética, de manera que las frecuencias alélicas son diferentes de aquellas en la población ancestral, resultando en baja heterocigosidad y menor número de alelos (Hedrick, 2005).

El resultado de un cuello de botella está relacionado con su magnitud y duración, mientras más dramática sea la disminución poblacional mayor será el efecto en la variabilidad genética. Un cuello de botella produce baja diversidad alélica, ya que cuando se presenta una reducción drástica en el número de individuos se pierden los alelos raros. Además, puede generar distancia genética de manera rápida entre las poblaciones y cuando la heterocigosidad inicial es muy alta, como la esperada en microsatélites, el efecto puede ser muy grande. En loci altamente variables la pérdida de alelos ocurre de manera más rápida que la pérdida de heterocigosidad (Cornuet y Luikart, 1996; Hedrick, 2005).

Los cuellos de botella son de primordial importancia para la genética de la conservación, ya que se ha observado que la variabilidad genética disminuye en especies que pasan por una reducción drástica del tamaño efectivo de la población. Además, promueven la susceptibilidad de las especies al incremento de las tasas de endogamia, fijación de alelos deletéreos y reducen el potencial adaptativo de las especies aumentando el riesgo de extinción (Cornuet y Luikart, 1996).

2.2 Sujeto de estudio: *Cynomys ludovicianus*

Los perros llaneros, género *Cynomys*, son ardillas terrestres pertenecientes a la familia Sciuridae, que habitan planicies y pastizales extensos (Hoogland, 1995 y 1996; Pacheco y Ceballos, 2005). Se reconocen cinco especies dentro del género, de las cuales dos se distribuyen en México: *C. mexicanus*, que es endémica y se encuentra en los estados de Coahuila, Nuevo León, Zacatecas y San Luis Potosí, y *C. ludovicianus* que alcanza la parte más sureña de su distribución en los pastizales de los estados de Sonora y Chihuahua (Ceballos *et al.* 2003).

Los perros llaneros de cola negra presentan la distribución más amplia de todas las especies de este género. Hasta hace 150 años se distribuían desde el sur de Saskatchewan en Canadá y hasta el sur de Coahuila en México, limitaban al este en Nebraska y al oeste en Montana y el este de Nuevo México. Se cuenta con registros fósiles que establecen que los perros llaneros se encontraban en los estados de Chihuahua, Sonora, Jalisco y San Luis Potosí desde el Pleistoceno (Harris, 1977; Messing, 1986). Sin embargo, el registro histórico más antiguo con el que se cuenta es de 1819 (Escudero, 1834), y al no contarse con registro en petroglifos y sitios arqueológicos del área, se cree que esta especie pasó por una expansión poblacional a mediados del siglo XIX, que acompañó a la expansión ganadera y el sobrepastoreo (R. List com. pers. 2009).

Históricamente se piensa que la población de *C. ludovicianus* en Norteamérica llegó a los 5,000 millones de individuos en 32 millones de hectáreas (156.25ind/ha; Hoogland, 2005); sin embargo, las campañas de exterminio realizadas por medio de cacería y envenenamiento, junto con la destrucción del hábitat, produjeron una disminución precipitada en su número poblacional y se estima que, en la actualidad, ocupan alrededor del 2% de su distribución original (Ceballos *et al.* 1993; Slobodchikoff *et al.* 2009). Actualmente se pueden encontrar en colonias aisladas

ubicadas a todo lo largo de su área de distribución histórica y en algunos parques nacionales de Estados Unidos de América (Hoogland, 1996).

Su pelaje es café o café-rojizo en el lomo y con el vientre blanco. Los bigotes y uñas son negros y el iris es de color café oscuro. Las hembras tienen 8 mamas que son visibles únicamente durante la temporada de lactancia. La longitud total de los adultos es de 355 a 415 milímetros y los machos suelen ser entre el 10% y el 15% más grandes que las hembras. La masa corporal varía de acuerdo a la estación, siendo mayor en el otoño y menor en el invierno (Hoogland, 1996).

Son diurnos y gregarios (Pacheco y Ceballos, 2005) y, a diferencia de otras ardillas de la subfamilia Marmotinae, no hibernan (Dobson *et al.* 1998). Forman colonias que están subdivididas en grupos familiares, los cuales a su vez, están conformados por varias hembras emparentadas y uno o dos machos no emparentados.

Los perros llaneros presentan gran variedad de comportamientos sociales, como la defensa cooperativa de territorios familiares, los llamados anti-depredadores, el acicalamiento entre individuos, y las hembras comparten el cuidado parental una vez que las crías han emergido de la madriguera (Dobson *et al.* 1998). Se cree que una de las ventajas que proporciona la formación de colonias en esta especie es la detección y protección de depredadores, ya que los individuos toman turnos para alimentarse y vigilar, y al avistar un depredador los perros llaneros emiten un llamado de alarma (Hoogland, 1995). Sin embargo, la formación de colonias representa una desventaja al incrementar la tasa de contagio de enfermedades y parásitos entre individuos, y el aumento en la competencia por los recursos (Hoogland, 1995).

Las hembras son filopátricas y los machos de un año se dispersan entre familias dentro de la misma colonia o entre colonias. La dispersión entre colonias se caracteriza porque ocurre de manera solitaria, el pico de dispersión es entre junio y agosto y aunque presenta un sesgo hacia

los machos, también se ha registrado dispersión entre colonias por parte de las hembras. El movimiento a distancias mayores de 5 km es ocasional, y generalmente se da hacia colonias establecidas o inactivas (Antolin *et al.* 2006). La distancia de dispersión máxima reportada es de 10 km (Hoogland, 1996).

La mayoría de los individuos alcanza la madurez sexual alrededor de los 21 meses de edad, aunque una baja proporción se reproduce al alcanzar el año. Algunos individuos, generalmente los machos, retrasan la reproducción hasta el tercer año de vida (Hoogland, 1996). El período de celo de las hembras dura un día, y si no se produce la fecundación, éstas pueden entrar en un segundo período de celo 13 días después. Para evitar la competencia entre machos la cópula se realiza dentro de la madriguera. Generalmente, las hembras copulan sólo con el macho residente, aunque se han registrado cópulas múltiples en baja proporción (5 al 10%), así como solicitud de cópula por parte de las hembras a machos de los grupos familiares contiguos (Hoogland, 1995, 1996; Dobson *et al.* 1998). Un aspecto importante de la conducta reproductiva de esta especie es el infanticidio, perpetrado por las hembras dentro de su grupo familiar, que puede ser responsable de entre el 5% y el 26% de la mortalidad de las camadas (Dobson *et al.* 1998).

En México, la temporada reproductiva es de febrero a marzo, produciendo entre 4 y 5 crías por hembra reproductiva por año. El parto se produce bajo tierra y las crías emergen de la madriguera en mayo, cuando son destetadas. Los jóvenes son capaces de conseguir su propio alimento para mediados de verano (Hoogland, 1996; Pacheco y Ceballos, 2005) y los machos se dispersan al cumplir un año de vida.

Estos animales son herbívoros, se alimentan de pastos y hierbas aunque, ocasionalmente, pueden consumir saltamontes y otros insectos. Excavan su propias madrigueras, las cuales están conformadas por túneles de 100 a 130 mm de diámetro, de 4 a 34 m de largo y de 1 a 3 m de

profundidad (Pacheco y Ceballos, 2005). En México, la densidad promedio de madrigueras por unidad de área dentro de las colonias de perros llaneros es de 52.7 madrigueras por hectárea, con gran variación espacial (42.3 - 86.5 madrigueras/ha), de las cuales alrededor del 51% se encuentran activas (Ceballos *et al.* 1999).

Los perros llaneros de cola negra (*Cynomys ludovocianus*) son considerados especie clave por el impacto que tienen en el ecosistema que habitan. Al excavar sus madrigueras remueven los nutrientes de la tierra, provocando que la vegetación sea más productiva, además su conducta de forrajeo evita el avance del mezquite y mantiene el pastizal (List y MacDonald, 1998; Ceballos *et al.* 1999; Manzano *et al.* 2000; Miller *et al.* 2000; Pacheco y Ceballos, 2005). Las madrigueras construidas por los perros llaneros son utilizadas como refugio por muchas especies (Miller *et al.* 2000; Slobodchikoff *et al.* 2009).

Es presa importante de aves rapaces y mamíferos carnívoros como el coyote (*Canis latrans*), el gato montés (*Linx rufus*), la zorra del desierto (*Vulpes macrotis*), el tejón (*Taxidea taxus*), el hurón de patas negras (*Mustela nigripes*), aves rapaces y serpientes de cascabel (Hoogland, 1996; Pacheco y Ceballos, 2005).

A principios de los años 1900s, se condujeron campañas de exterminio que diezmaron a la población de perros llaneros y provocaron una disminución y fragmentación del hábitat importante en el área de distribución, además de la disminución en la densidad poblacional (Hoogland, 1996).

Uno de los complejos de colonias de perros llaneros más grande que existe en la actualidad es el que se encuentra en los municipios de Janos y Casa Grandes en el estado de Chihuahua en México. Este complejo se encuentra amenazado por el cambio en el uso de suelo, situación que ha provocado la fragmentación de las colonias que quedaban (Pacheco y Ceballos, 2005).

Antecedentes genéticos de *Cynomys ludovicianus*

La especie de perro llanero *Cynomys ludovicianus* es la que más se ha estudiado (Hoogland, 1996). Entre los estudios que se han realizado destacan los que se refieren a la variabilidad genética, en distintas partes de su distribución. Aunque la mayoría de ellos fueron realizados con aloenzimas y no son comparables con el presente estudio, permiten identificar ciertos patrones relacionados con los procesos que afectan el comportamiento de la variabilidad genética de esta especie. En el cuadro 1 se reportan los valores de variabilidad encontrados en estos estudios, así como los coeficientes de endogamia y estructuración.

Entre los resultados más relevantes de estos estudios se ha observado que los valores de variabilidad y estructura genética se relacionan con la presencia de peste bubónica (*Yersinia pestis*) en las colonias, que ocasiona una dinámica metapoblacional para la cual es importante la conectividad entre colonias, representada como la distancia entre colonias y el tiempo desde la recolonización (Roach *et al.* 2001; Trudeau *et al.* 2004; Antolin *et al.* 2006).

Por otra parte, la mayoría de estos estudios han reportado que los altos niveles de estructuración genética y endogamia, se deben a la conformación de grupos familiares dentro de las colonias, la filopatría de las hembras y al efecto Wahlund (Chesser, 1983; Dobson *et al.* 1997, 1998, 2004). Daley (1992) sugiere que la alta diferenciación genética entre grupos familiares, es un factor que influye en el mantenimiento de la variabilidad después de un cuello de botella y que la heterogeneidad genética en las poblaciones de perros llaneros se debe a la baja tasa de migración exitosa, al reclutamiento de juveniles dentro del grupo familiar natal y a que las hembras copulan casi exclusivamente con el macho residente.

Los análisis realizados considerando a los grupos familiares han encontrado alta estructuración genética entre ellos y variación temporal en la diversidad genética al interior de los grupos familiares (Dobson *et al.* 1998, 2004). Se ha observado que alelos alternativos se fijan en

diferentes grupos familiares, pero la variación genética a nivel de colonia se mantiene y la migración entre grupos familiares la redistribuye; de manera que la presencia de grupos familiares dentro de las colonias tiene un efecto de conservación en la diversidad genética, ya que diferentes alelos pueden predominar en diferentes grupos familiares y la dispersión de los machos disminuye la endogamia hacia el interior de cada grupo familiar (Dobson *et al.* 2004). Otro factor que influye en el valor de los índices de fijación es el infanticidio selectivo que puede promover un incremento en los valores de endogamia dentro de un grupo familiar, ya que las crías de las camadas sobrevivientes son hermanos (Dobson *et al.* 1998).

A partir de los análisis genéticos a nivel de grupo familiar, se ha observado que los perros llaneros tienden a incrementar la exogamia (Dobson *et al.* 1997); sin embargo, esto no descarta la posibilidad de que se produzcan apareamientos entre parientes lejanos como primos y tíos que, a través de las generaciones, pueden incrementar los niveles de endogamia (Hoogland, 1995). Los mecanismos por medio de los cuales se minimiza la endogamia son: a) la dispersión de los machos antes de alcanzar la madurez sexual, b) los machos reproductivos permanecen máximo dos años en un grupo familiar y después se dispersan, c) las hembras de un año retrasan la madurez sexual cuando su padre se encuentra dentro del grupo familiar, y d) cuando las hembras maduran sexualmente y su padre se encuentra dentro del grupo familiar evitan la cópula con éste y solicitan cópulas con los machos de los grupos vecinos (Foltz y Hoogland, 1983; Hoogland 1992, 1995, 1996; Dobson *et al.* 1998).

Dobson *et al.* (1997), también sugieren que, conforme aumenta la escala geográfica, el valor de los índices de fijación y de variabilidad genética incrementarán; lo cual se relaciona con la capacidad de dispersión de los perros llaneros y con que al incorporar nuevos grupos familiares, cambian las frecuencias alélicas e, incluso, se incorporan alelos nuevos.

Por otra parte, Roach *et al.* (2001) detectaron que la conectividad entre colonias es muy importante para mantener la variabilidad genética en ellas y disminuir la endogamia. Los aspectos importantes para la dispersión entre colonias son: la detección de las colonias por parte de los perros llaneros, la proximidad de una colonia a hábitat favorable y barreras posibles como el hábitat utilizable entre ellas. Sin embargo, en complejos donde está presente *Y. pestis* la conectividad entre colonias puede resultar contraproducente al incrementar el riesgo de infección de esta enfermedad que puede aniquilar al 100% de los individuos de una colonia (Roach *et al.* 2001; Trudeau *et al.* 2004; Antolin *et al.* 2006).

Trudeau *et al.* (2004) encontraron baja variabilidad y alta estructuración en colonias que han pasado por epidemias de peste (*Y. pestis*) y sugieren que en estos casos las colonias periféricas y aisladas son reservorios de diversidad genética ya que contienen mayor variabilidad. Además, se ha observado que existe correspondencia entre los valores de exogamia y estructuración cuando esta enfermedad está presente (Antolin *et al.* 2006).

Finalmente, en lo que se refiere a cuellos de botella, Daley (1992) reporta que los perros llaneros presentan una rápida recuperación (3 a 5 años), razón por la cual no se pierde tanta variabilidad genética, aunque hay pérdida de alelos por efecto de la deriva génica, principalmente, en las colonias más pequeñas. Los alelos que se retienen en las colonias son redistribuidos por medio de la dispersión, cuyo éxito está influenciado por la distancia entre colonias y las fluctuaciones temporales en la densidad poblacional.

Cuadro 1. Estudios sobre variabilidad genética de perros llaneros.

<i>Cynomys ludovicianus</i>							
Referencia	Sitio	Marcador	A	H_E	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
Chesser, 1983	Nuevo México	Aloenzimas	1-3	0.11-0.44	0.40	0.33	0.10
Foltz y Hoogland, 1983	Dakota del Sur	Aloenzimas	1.24	0.066	-0.06	-	0.03
Daley, 1992	Dakota del Sur	Aloenzimas	2-4	0.04	-0.02	0.09	0.12
Dobson <i>et al.</i> 1997	Dakota del Sur	Aloenzimas	---	---	-0.21	-0.01	0.16
Dobson <i>et al.</i> 1998	Dakota del Sur	Aloenzimas	---	---	-0.21	-0.01	0.16
Dobson <i>et al.</i> 2004	Dakota del Sur	Aloenzimas	---	---	-0.18	0	0.16
Roach <i>et al.</i> 2001	Colorado	Microsatélite/s	*3.0-5.1	*0.4-0.7	0.02	0.13	0.12
Trudeau <i>et al.</i> 2004	Montana	RAPD	*1.44 1.62	*0.27 0.36	---	---	0.23
<i>Cynomys gunnisoni</i>							
Travis <i>et al.</i> 1997	Arizona	DNA fingerprint	---	---	---	---	0.11
Hayne <i>et al.</i> 2003	Arizona	Microsatélite/s	4.29	0.49	---	---	---
<i>Cynomys parvidens</i>							
Hayne <i>et al.</i> 2003	Utah	Microsatélite/s	3	0.33-0.34	---	---	---
<i>Cynomys mexicanus</i>							
McCullough y Chesser, 1987	Nuevo León y Coahuila	Aloenzimas	1-4	0-0.45	0.5	0.47	0.06

* Sitios con registro de *Yersinia pestis*. A = Alelos por locus; H_E = Heterocigosidad esperada; y coeficientes F (F_{IS} , F_{IT} y F_{ST}).

El área de estudio se encuentra en un gran valle; limita al sur y al oeste con la Sierra Madre Occidental y al norte y al este con las tierras áridas del norte de México (List *et al.* 2003). El clima es árido y templado con veranos calientes, la temperatura media anual es de 15.7°C (6°C en enero, 26.1°C en junio; García, 1973; Ceballos *et al.* 1999). La temporada de lluvias se presenta en julio, agosto y durante el invierno, con una precipitación media anual de 381 mm (García, 1973; Ceballos *et al.* 1999). Así mismo, se han registrado períodos de sequía como los que se presentaron entre 1994 y 1996 (List *et al.* 2003) y en 2005 (Rivera-Tellez, 2009).

La vegetación consiste en un mosaico de diferentes tipos de pastizal, de zonas de arbustos y plantas leñosas, principalmente arbustos espinosos y desérticos, y de algunas zonas de bosque ripario (Ceballos *et al.* 1999). Los perros llaneros se encuentran en zonas de pastizal corto y de pastizales anuales; el primero se caracteriza por la presencia de especies como *Bouteloa gracilis* y *Bouteloa eriopoda*, mientras que en el segundo las especies predominantes son *Aristida adscensionis* y *Bouteloa barbata* (Ceballos *et al.* 2005). Dentro del pastizal se encuentran parches aislados de cholla (*Opuntia* spp.), yuca (*Yucca* spp.), efedra (*Ephedra trifurca*) y mezquite (*Prosopis* spp.; Ceballos *et al.* 1999). En distintas áreas la vegetación natural se mezcla con zonas cultivadas, de manera que el pastizal ocupa el 34% del área, mientras que la zona arbustiva el 16% (Ceballos *et al.* 2005).

Existen 333 especies de vertebrados terrestres registradas en la zona: 218 aves, 77 mamíferos, 31 reptiles y 7 anfibios (Ceballos *et al.* 2005). Además, se han observado diferencias importantes en la composición, riqueza y diversidad de especies de flora y fauna dentro y fuera de las colonias de perros llaneros (Ceballos *et al.* 1999).

Complejo Janos - Casas Grandes

El complejo de perros llaneros de Janos - Casas Grandes era el más grande registrado para 1987 con más de 55,000 ha (Ceballos *et al.* 1993) y es uno de los pocos que no ha sido afectado por la peste (*Yersinia pestis*). Este complejo fue clasificado en tres regiones (I, II y III) por Ceballos *et al.* (1993), de acuerdo con la localización geográfica de las colonias. La primera comprende todas las colonias ubicadas al norte de la Sierra de El Medio, y es el sitio que se ha visto más afectado por la fragmentación y pérdida del hábitat; la segunda comprende todas las colonias localizadas entre la Sierra de El Medio y Casas Grandes, es donde se encuentra la mayor concentración de colonias del complejo y donde se realizó la parte principal del muestreo de este trabajo; la tercera comprende todas las colonias ubicadas entre Nuevo Casas Grandes y Mata Ortiz donde se muestreo una sola colonia.

En décadas recientes, el impacto masivo de las actividades humanas se ha intensificado ya que lo que antes eran ranchos aislados se han transformado en grandes poblados (Ceballos *et al.* 2005), cuyas principales actividades productivas son la ganadería y la agricultura (List y Macdonald, 2003); mismas que se han convertido en amenazas por la pérdida y degradación del hábitat, el sobrepastoreo, la caza y otras actividades antropogénicas.

El reporte del efecto del sobrepastoreo como problema para la conservación del área data de 1955, y las sequías han incrementado su efecto hasta el punto en el que se observan áreas completamente desnudas y cárcavas formadas por la erosión (Ceballos *et al.* 2005). Además, también relacionado con las actividades ganaderas, muchas colonias fueron envenenadas hasta 1996. El impacto ha sido dramático, para el año 2000 se había perdido alrededor del 64% de las 55,178 ha ocupadas por 39 colonias dispersas en 1988 (para las cuales se calculó una densidad total de 1,155,080 a 1,696,390 perros llaneros basado en una densidad relativa de 20.9 a 30.7 ind/ha; Ceballos *et al.* 1993). La colonia más grande del complejo y de Norteamérica, conocida

2.3 Sitio de Estudio

El estudio se realizó en el complejo de colonias de perros llaneros, que se localiza en la parte noroeste del estado de Chihuahua de la República Mexicana ($30^{\circ}50'N$. $108^{\circ}25'W$), en el desierto Chihuahuense, a 50 km de la frontera entre México y Estados Unidos (Fig. 2; Ceballos *et al.* 1999). El complejo está ubicado dentro de los municipios de Janos y Casas Grandes (Fig. 2), por lo que se ha denominado complejo Janos- Casas Grandes y es el complejo de colonias remanente más grande de Norteamérica (Ceballos *et al.* 1993). Es un sitio relevante porque en él se encuentran gran cantidad de especies amenazadas y la fauna de vertebrados de la región es considerada una de las más importantes en el noroeste de México (List *et al.* 1998), de manera que es considerada región terrestre prioritaria por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO; Arriaga *et al.* 2000).

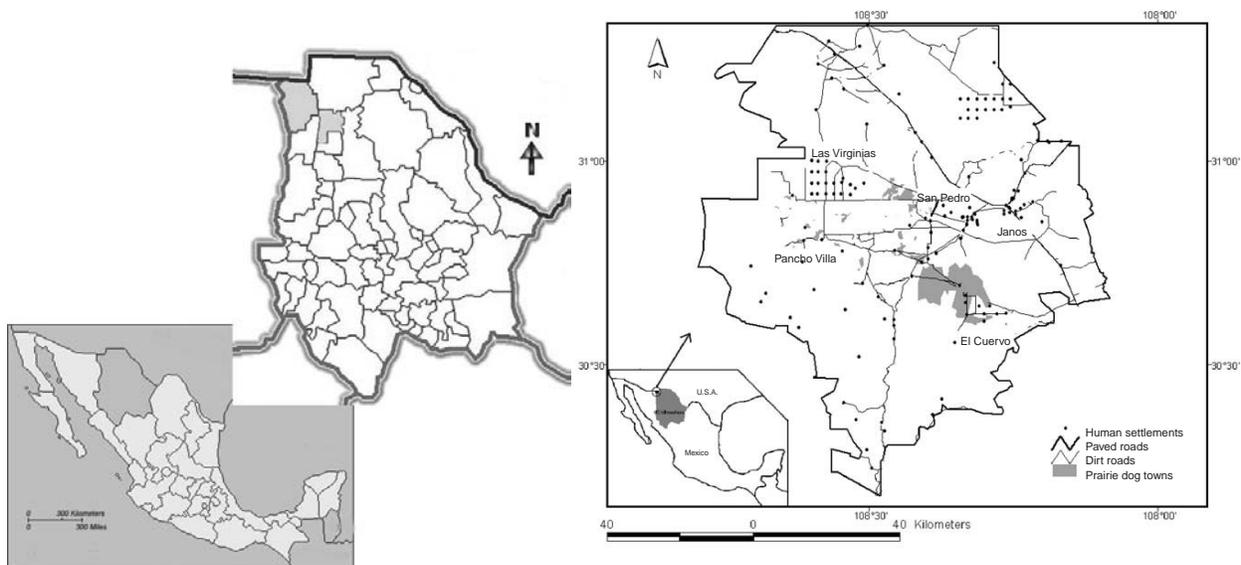


Figura 2. Localización del sitio de estudio. Se resalta en el mapa la ubicación del estado de Chihuahua, México y los municipios de Janos y Casas Grandes. A la izquierda se observa la distribución del complejo (tomado de Ceballos *et al.* 2005).

como “El Cuervo”, disminuyó de 35,000 ha a 15,000 ha (Marcé, 2001; Ceballos *et al.* 2005). Las colonias de la parte central del complejo fueron las más afectadas, aunque las que se localizan al norte quedaron completamente aisladas, lo que las hace más susceptibles a la extinción (Ceballos *et al.* 2005). En años recientes se han expandido las áreas agrícolas en diversas partes del complejo, provocando que entre 1996 y 2000 se perdieran 1,169 ha de colonias debido a la agricultura, lo que resultó en la desaparición de al menos cuatro colonias y la fragmentación del resto (Marcé, 2001). Otra problemática a la que se enfrenta el sitio, es el avance del mezquite que provoca cambios en la composición de las comunidades de especies animales y vegetales (Ceballos *et al.* 1999), transformando el hábitat hasta el punto en que la recolonización de estas áreas por perros llaneros y la recuperación del pastizal se vuelven virtualmente imposibles.

La presencia de los perros llaneros es vital para la persistencia del pastizal ya que son especie clave e ingenieros del ecosistema que con sus actividades afectan la estructura vegetal, la productividad y los procesos del ecosistema, así mismo proveen refugio para al menos 21 especies de vertebrados en el área (List, 1997 y Ceballos *et al.* 1999), suprimen el avance del mezquite hacia el pastizal y son presa importante de muchos carnívoros y rapaces (Ceballos *et al.* 2005).

Desde 1940 los municipios de Ascensión y Janos fueron decretados refugios de vida silvestre y en la actualidad se están realizando esfuerzos para convertir la zona en una Reserva de la Biosfera (Ceballos *et al.* 2005).

3. Objetivos

Objetivo general

Determinar el posible efecto de la fragmentación del hábitat, provocado por la expansión de la agricultura y la sobre-explotación ganadera, en la variabilidad genética de los perros llaneros (*Cynomys ludovicianus*) de Janos, Chihuahua.

Objetivos particulares

- Describir la variación genética de los perros llaneros del complejo de Janos- Casas Grandes.
- Conocer los niveles de estructuración genética entre colonias del complejo de Janos- Casas Grandes.
- Determinar el posible efecto del tamaño de la colonia y la distancia geográfica entre colonias en la variabilidad genética de los perros llaneros de Janos, Chihuahua.
- Proponer medidas para la conservación de los perros llaneros del complejo de Janos- Casas Grandes basadas en la variabilidad y estructuración genética.

4. Hipótesis

- Se encontrará menor variabilidad genética en las colonias pequeñas y aisladas, debido a la reducción en el tamaño poblacional y del flujo génico.
- Los valores de estructuración genética aumentarán con respecto a la distancia geográfica entre las colonias, debido a la fragmentación del hábitat y al aislamiento.
- Habrá mayor variación genética hacia el interior de las colonias que entre ellas, ya que la organización social de los perros llaneros promueve mayor estructuración hacia el interior de las colonias.
- Los valores de F_{IS} no serán significativamente diferentes de cero a menos que se haya presentado un cuello de botella reciente, haya habido una interrupción del flujo génico, o un incremento del efecto de la deriva génica debido a la fragmentación del hábitat.

5. Métodos

5.1 Obtención de muestras

Se capturaron perros llaneros en 13 colonias del complejo Janos - Casas Grandes, Chihuahua (Fig. 3) entre el 16 de mayo y el 22 de julio de 2007. Se colocaron entre 1 y 6 cuadrantes por colonia (3x4, 4x4 y 5x5 trampas por cuadrante con una distancia de 20 a 25 metros entre trampas). El número de cuadrantes por colonia y su tamaño varió dependiendo del tamaño de la colonia (Cuadro 2) y la disponibilidad de trampas. La separación mínima entre cuadrantes fue de 150 metros, correspondientes con el área de actividad promedio reportada para un grupo familiar (Hoogland, 1986). Se utilizó alimento para caballo como cebo para el trampeo, con un día de precebamiento para permitir que los animales se acostumbraran a la presencia de las trampas; los cuadrantes permanecieron activos en cada sitio entre 3 y 5 días.

Cuadro 2. Nombre, abreviación, tamaño (ha), densidad relativa (ind/ha) y densidad (ind/colonia) de las 13 colonias muestreadas en el complejo de perros llaneros (*Cynomys ludovicianus*) en Janos, Chihuahua.

Colonia	Clave	Tamaño (ha)	*Densidad relativa (ind/ha)	*Densidad total (ind/colonia)
Agua Blanca	AB	4.14	39	161.5
Buenos Aires	BA	400.68	1.4	561
Presa Casa de Janos	CJ	6.52	8.8	57.4
El Águila	EA	303.39	5.7	1,729.3
El Cuervo	EC	6,076.71	***5	30,383.6
La Báscula	LB	2,405.67	6	14,434
La Cal	LC	29.75	**8.6	255.9
Mata Ortiz	MO	71.26	2.6	185.3
Monteverde	MV	3,258.89	6	19,553.3
Ojitos Sur	OS	246.67	1.4	345.3
Papalote San Pedro	PP	8.05	20.9	168.2
Pancho Villa	PV	309.86	4.9	1,518.3
El Uno Norte	UN	36.10	3.8	137.2
Total		13,121.60	8.5	111,533.6

*Datos de densidad relativa y densidad por colonia calculadas a partir de datos para los años 2006 y 2007 publicados por Ávila-Flores (2009); **Dato calculado a partir de Rivera-Tellez (2009); ***Dato proporcionado por R. List (muestreo diciembre-marzo 2007)

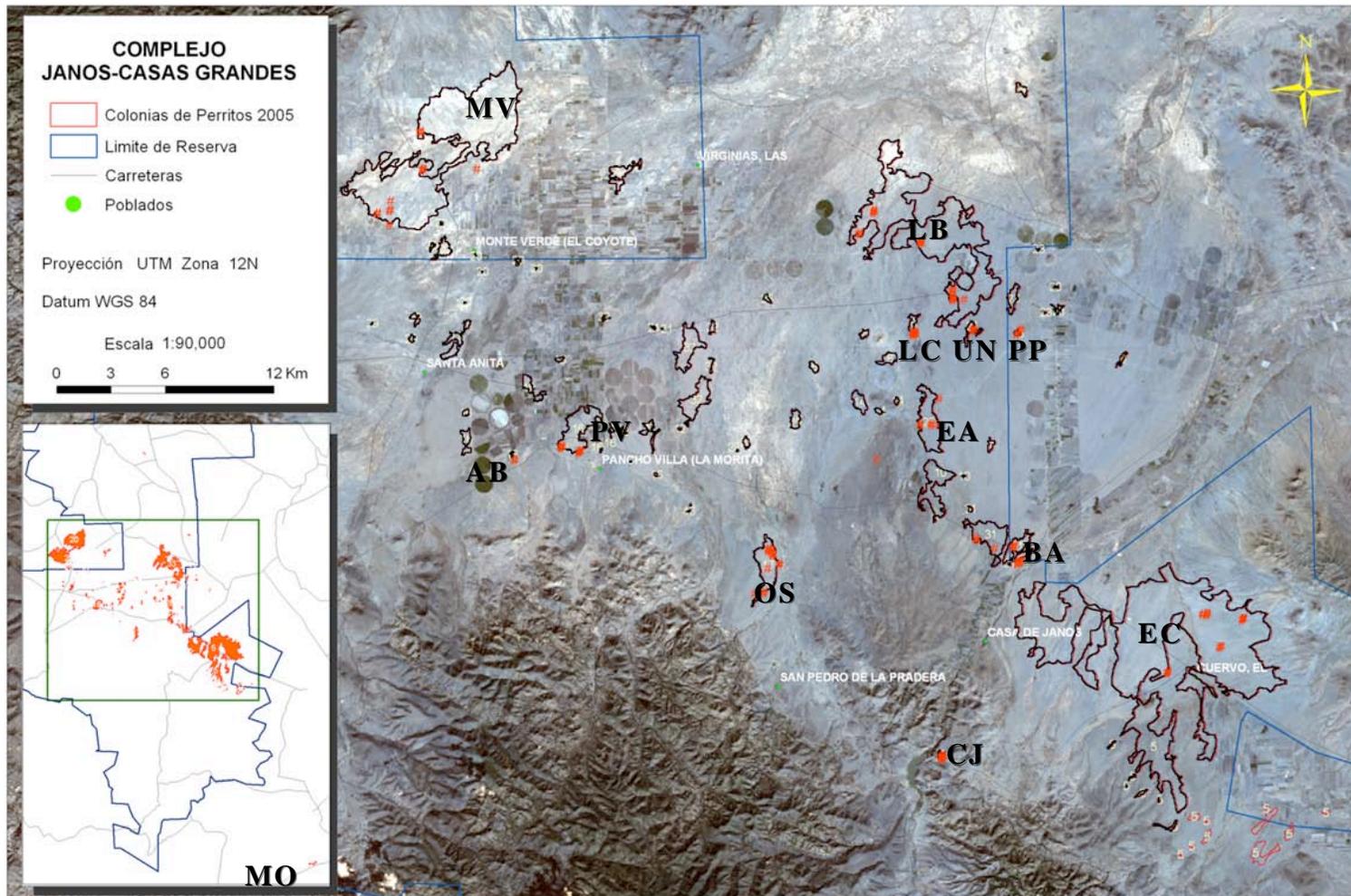


Figura 3. Mapa de colonias muestreadas durante el trampeo. También se presentan los sitios de captura. Colonias AB: Agua Blanca, BA: Buenos Aires, CJ: Presa Casa de Janos, EA: El Águila, EC: El Cuervo, LB: La Báscula, LC: La Cal, MO: Mata Ortiz, MV: Monteverde, OS: Ojitos Sur, PP: Papalote San Pedro, PV: Pancho Villa y UN: El Uno Norte (Modificado de Pacheco *et al.* 2009).

Los individuos capturados fueron pesados, sexados y marcados con un arete metálico numerado en cada oreja. Se extrajo 1 ml de sangre de la artería femoral, con una jeringa pediátrica de 3 ml. La sangre se colocó inmediatamente en un tubo screw tap de 1.5 ml con 20 μ l de EDTA 10 mM (Higuchi, 1989) y se agitó manualmente para evitar la formación de coágulos. El tubo fue puesto en una hielera hasta el momento de refrigerar. Las muestras se mantuvieron congeladas a -20 °C hasta el momento de extracción de ADN.

5.1.1 Extracción de ADN

El ADN de todas las muestras colectadas fue extraído con el kit de extracción de ADN de sangre de Bio-Rad (BioRad Blood Kit), siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo 1). La integridad del ADN se observó por medio de geles de agarosa al 1%, (Fig. 4) teñidos con 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio. Los geles se corrieron durante 40 minutos y fueron visualizados con luz ultravioleta.

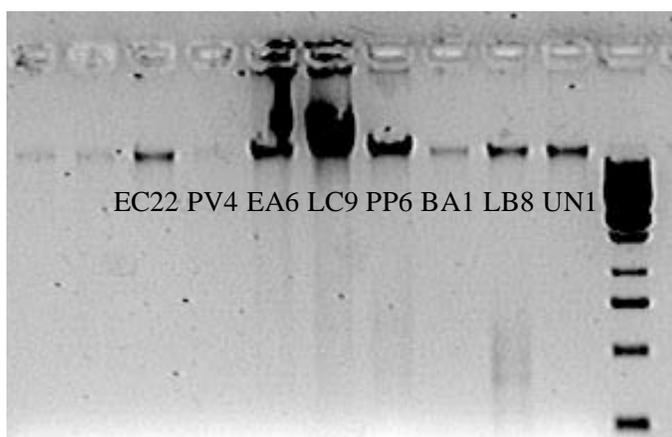


Figura 4. Gel de agarosa al 1% para comprobación de extracción de ADN. Cada banda representa un individuo (EC22, PV4, EA6, LC9, PP6, LB1 y UN1); en el último pozo se observa una escalera molecular de 100 pb

5.2 Amplificación y lectura de microsatélites

Se estandarizaron 10 (Cuadro 3) de los 14 microsatélites específicos para *Cynomys ludovicianus* reportados por Jones *et al.* (2005; Cuadro 3). La amplificación se realizó por medio de reacciones de PCR con un volumen final de 20 μ l que contenían las siguientes concentraciones: Buffer 1X, dNTP 0.4 mM, Primer Forward 0.8 μ M con fluorescencia HEX, Primer Reverse 0.8 μ M, Taq Polimerasa 1u/ μ l (Pro - Omega). Se realizaron curvas de MgCl₂ con tres concentraciones distintas (la concentración reportada, + 0.05 mM y - 0.05 mM) para estandarizar el óptimo a utilizar en la reacción de PCR para cada microsatélite; además, las concentraciones de ADN y MgCl₂ variaron para cada microsatélite (Cuadro 3). El PCR se realizó en un termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler con el siguiente programa: 3 min 94 °C, seguidos de 35 ciclos de 1 min 94 °C, 30 s de temperatura de anillamiento (T_a °C), 30 s a 72 °C, y 4 min a 72 °C, al final se utilizó una temperatura de 4 °C para mantener el producto en buen estado (Cuadro 3). Cabe señalar que en todas las amplificaciones se utilizó un control negativo a base de agua bi-destilada para confirmar que no hubiese contaminación.

El producto de PCR se comprobó por medio de geles de agarosa al 1.5% teñidos con 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio, utilizando una escalera de 100pb para hacer la lectura. Los geles se corrieron en cámara de electroforesis durante 30 minutos y se observaron con luz ultravioleta; si el producto resultante de la reacción de PCR coincidía con el rango de tamaño reportado para cada microsatélite (Cuadro 3), el producto era secado en una centrifuga de vacío (SpeedVac REC10.10.-RCT0; Jouan) a 55 °C durante 3 horas. Los tubos fueron sellados con parafilm y se enviaron al laboratorio de la CDC de Maryland en donde fueron genotipificados en un secuenciador ABI Prism 3100.

Cuadro 3. Condiciones para la reacción de PCR para cada microsatélite.

No. de acceso GeneBank	Locus	T _a °C	MgCl ₂ (mM)	ADN (μl)	Motivo	Rango de alelos
AY665790	A2	53	3.5	2	(AC) ₁₅	208-220
AY665792	A8	57	3	2	(GT) ₁₃	254-268
AY665791	A101	61	3	3	(GT) ₁₈	129-141
AY665793	A104	57	3.75	2	(AC) ₇ AA(AC) ₁₀	170-186
AY665796	A119	54	2.5	2	(AC) ₁₃ AT(AC) ₇	97-115
AY665797	C116	54	2	2	(AAGG) ₇	185-207
AY665798	D1	52	3	3	(TATC) ₉	178-202
AY665799	D2	57	2.5	2	(TCTA) ₈	286-310
AY665802	D115	52	2.5	2	(TAGA) ₁₁	188-208
AY665803	D120	52	2.5	4	(GT) ₁₇ (GA) ₁₈	202-216

T_a°C = Temperatura de anillamiento

5.3 Análisis estadísticos

La desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg de cada locus se evaluó con una prueba exacta por medio del método de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), con 10,000 desmemorizaciones, 20 batches (tratamientos por lote) y 5,000 iteraciones por batch, con el programa GENEPOP v.4.0 (Raymond y Rousset, 1995). También las frecuencias alélicas fueron calculadas con este programa.

Los alelos nulos se producen cuando hay una mutación, provocando una falla en la amplificación del microsatélite que se puede expresar como un exceso de homócigos; además, se pueden observar alelos nulos cuando algunas muestras no amplifican o cuando hay tartamudeo que dificulta la lectura del tamaño del alelo. La presencia de alelos nulos pueden modificar de manera sustancial los resultados de los análisis, por la cual se analizó la presencia de éstos mediante el software MICROCHECKER v.2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004) por medio del método de Brookfield (1996). Éste programa, además, puede identificar si una deficiencia de heterócigos se debe a endogamia, efecto Wahlund o alelos nulos (Van Oosterhout *et al.* 2004).

Se calculó la F_{ST} y los intervalos de confianza sin y con corrección ENA (estimación de alelos nulos), por medio del programa FREENA (Chapuis y Estoup, 2007), para observar si la diferencia entre los valores de F_{ST} obtenidos era significativa y establecer si era necesario desechar algún locus en caso de observar la presencia de alelos nulos en la muestra.

Por otra parte, se realizó una prueba de desequilibrio de ligamiento con el programa GENEPOP v.4.0 (Raymond y Rousset, 1995) que utiliza el algoritmo EM (Expectation-Maximization) con condiciones iniciales de 10 y 10,000 permutaciones y permite determinar la presencia de dicho ligamiento.

5.3.1 Variabilidad genética

Las medidas de variabilidad genética generalmente utilizadas son el número promedio de alelos por locus o riqueza alélica (A), la proporción de loci polimórficos (P) y la heterocigosis esperada (H_E). La heterocigosis esperada (H_E), cuando hay equilibrio de Hardy-Weinberg, es la medida de variación más utilizada. Esta medida de variabilidad es equivalente a la diversidad genética de Nei (1978) y considera un factor de corrección para el tamaño de la muestra y la posible presencia de alelos nulos al realizar el cálculo (Hedrick, 2005); ésta es considerada como la medida de variabilidad genética más adecuada. Las medidas de variabilidad genética fueron obtenidas con los programas ARLEQUIN v 3.0 (Excoffier *et al.* 2005) y GENEPOP v.4.0 (Raymond y Rousset, 1995). Se obtuvo la riqueza alélica (A_r) corregida para el tamaño de la muestra por medio del método de rarefacción con el programa HP-RARE 1.0 (Kalinowski, 2005).

5.3.2 Estructuración genética

Coefficientes F

Los estadísticos F de Wright son los parámetros más utilizados para describir la estructuración genética de una población (Weir y Cockerham, 1984; Hedrick, 2005). Se calculó la estructuración por población y total con el programa GENEPOP v.4.0 (Raymond y Rousset, 1995) que utiliza el método propuesto por Weir y Cockerham (1984). El método de Weir y Cockerham (1984) no tiene supuestos respecto al número de poblaciones, tamaño de la muestra o frecuencia de heterocigos, y es un estimador general que permite hacer comparaciones entre estudios con diferente estructura alélica. Los parámetros definidos por Weir y Cockerham son equivalentes a los estadísticos F de Wright de la siguiente manera: 1) $\theta = F_{ST}$, es la correlación entre gametos, elegidos al azar, de una subpoblación con relación a la población total (co-ancestría), se relaciona con la varianza en las frecuencias alélicas y equivale a la proporción de diversidad genética debida a las diferencias en las frecuencias alélicas entre poblaciones; 2) $f = F_{IS}$, es la correlación entre gametos dentro de los individuos con relación a la subpoblación a la cual pertenecen y es equivalente al coeficiente de endogamia y a la desviación promedio de las frecuencias genotípicas con respecto a lo esperado de acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg; 3) $F = F_{IT}$, es la correlación entre gametos dentro de los individuos con relación a la población total (endogamia) y equivale a la desviación de las frecuencias genotípicas con respecto a lo esperado de acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg con relación a la población total (Weir y Cockerham, 1984; Holsinger y Weir, 2009). Dada la equivalencia, en adelante nos referiremos a los parámetros θ , f y F como F_{ST} , F_{IS} y F_{IT} respectivamente.

La R_{ST} es otra medida de estructuración, equivalente a F_{ST} , que es más recomendada para estimar la estructuración cuando se utilizan microsatélites (Hedrick, 2005) ya que considera un

modelo de mutación de pasos y el tamaño de los alelos al hacer el cálculo de la varianza y no el valor de H_E como en el caso de la F_{ST} . Se obtuvieron los valores de R_{ST} pareadas con el programa ARLEQUIN v 3.0 (Excoffier *et al.* 2005), utilizando los valores predeterminados por el programa (100 iteraciones para obtener el grado de significancia). Las R_{ST} pareadas miden el nivel de estructuración al comparar pares de poblaciones.

Por otra parte, se utilizó el programa POPULATIONS 1.2.30 (Langella, 1999), que permite el cálculo de los valores de soporte estadístico de cada nodo, utilizando 10,000 repeticiones, para construir un dendograma partiendo del valor de distancia genética de Nei (D_A ; Nei *et al.* 1983). Takezaki y Nei (2008) determinaron que esta medida proporciona valores de distancia genética y de soporte a las ramas más adecuados para microsatélites.

Flujo génico

Con el programa ARLEQUIN v 3.0 (Excoffier *et al.* 2005) se calculó el número de migrantes (Nm) por generación a partir de los valores de R_{ST} pareadas, dado por la expresión de Wright: $F_{ST} \approx 1/(4Nm + 1)$. Este modelo es muy sensible al cumplimiento de los supuestos de los cuales parte (organismos diploides, apareamiento aleatorio, y tamaño poblacional, tasa de mutación y tasa de intercambio de migrantes constantes; Beerli, 1998; Beerli y Felsenstein, 1999). Por esta razón también se utilizó el programa MIGRATE-N (Beerli y Felsenstein, 1999) que calcula el número de migrantes ($M_i = m_i/\mu$) entre poblaciones a partir del parámetro Θ ($4N_e\mu$) que permite incorporar una tasa de mutación y una tasa de intercambio de migrantes variables por medio de la teoría de coalescencia y el método Bayesiano (Beerli y Felsenstein, 1999).

Los valores iniciales de Θ y M fueron generados a partir del cálculo de F_{ST} , y se permitió variación en el valor inicial de Θ de cada subpoblación. Además, se calculó el valor de la tasa de mutación (μ) a partir de los datos obtenidos previamente, y al tratarse de microsatélites, se consideró que μ puede ser diferente para cada loci.

Por otra parte, para reducir la varianza y lograr un análisis más robusto, se utilizó una cadena larga con 50,000 pasos registrados cada 20 pasos con una réplica y 1,000,000 burn-in chains (árboles descartados por cadena). Además, de acuerdo con lo sugerido por Beerli (1998), en el presente estudio se reporta el valor de la mediana, ya que de esta manera se reduce el efecto del error producido por “outliers” o puntos que incrementan la varianza.

Por medio de una sumatoria se calculó el número total de emigrantes (E) e inmigrantes (I) por colonia y con datos de densidad por colonia (Cuadro 2; Ávila-Flores, 2009; List, com. pers; Rivera-Tellez, 2009) se obtuvo la proporción de emigrantes ($PE = E/N$) e inmigrantes ($PI = I/N$) con respecto a la población actual de cada colonia.

Efecto de la distancia geográfica y el tamaño de la colonia

El aislamiento por distancia se determinó con una prueba de Mantel, con 10,000 permutaciones, realizada con XLSTAT PLUS para EXCEL (Microsoft), que prueba la correlación existente entre una matriz de R_{ST} pareadas y una matriz de distancia geográfica al distribuir los datos de manera aleatoria y evalúa la probabilidad de que la correlación entre las dos matrices sea mayor que la encontrada por azar. Primero se calculó la matriz de distancia geográfica a partir de la coordenada de captura promedio por colonia con el programa GEOGRAPHIC DISTANCE MATRIX GENERATOR VER. 1.2.2 (Ersts, 2006), por lo que el valor obtenido representa una aproximación lineal y no considera la distancia desde el borde de la

colonia a la colonia más próxima, lo cual puede provocar un sesgo en el cálculo; aunque consideramos que este sesgo no es importante. Otro aspecto que tampoco se considera en este análisis es, como se observa en la figura 2, la presencia de colonias intermedias que no fueron muestreadas y pueden funcionar como corredores para el flujo génico, que alteran la conectividad entre colonias muestreadas.

Se realizó un análisis de correlación entre el tamaño de la colonia y la diversidad genética (H_E) y el índice de endogamia (F_{IS}) con el programa XLSTAT PLUS para EXCEL (Microsoft) para determinar si existe una relación entre estas variables y por lo tanto un efecto del tamaño de la colonia en ellas.

Análisis de varianza molecular

Para determinar la fuente de variación se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA; Excoffier *et al.* 1992) con el programa ARLEQUIN v 3.0 (Excoffier *et al.* 2005), que utiliza la suma de diferencias cuadradas entre pares de observaciones, y los componentes de diversidad en un modelo jerárquico (p. e. regiones, poblaciones y subpoblaciones). Se realizó el AMOVA incluyendo a todas las poblaciones dentro de un sólo grupo para obtener los valores totales de estructuración y partición de la diversidad. Además, se calculó AMOVA por medio de F_{ST} para obtener valores comparables con lo reportado en la literatura y R_{ST} que se considera más adecuada para análisis de datos obtenidos con microsatélites. El programa realizó 1,000 repeticiones para probar la significancia estadística de los datos y calculó los intervalos de confianza basados en 20,000 repeticiones.

Además, se realizó un análisis espacial de varianza molecular (SAMOVA ver. 1.0; Dupanloup *et al.* 2002) que integra las coordenadas geográficas para determinar la organización jerárquica que explica mejor la variación y la estructuración de la población a partir de la

estructura geográfica. Consideramos que la estructuración más probable es aquella en que se maximiza el valor de F_{CT} (variación entre grupos). Se utilizaron las condiciones predeterminadas por el programa partiendo de valores de $K = 1$ a $K = 13$. Un componente interesante de SAMOVA es que puede determinar barreras genéticas de acuerdo a la estructura y calcular su grado de confianza, generando un mapa de dichas barreras.

Estructura genética

Se utilizó el programa STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.* 2000) que calcula la probabilidad de que un genotipo se origine en cada población, utilizando las frecuencias alélicas. Este programa permite identificar subpoblaciones y asignar a los individuos, de manera probabilística, a cada una de ellas. Así mismo, permite identificar individuos entremezclados, es decir que pueden provenir de más de una subpoblación y que se pueden asumir como descendientes de migrantes (Pritchard *et al.* 2000). El modelo supone que no hay desequilibrio de ligamiento y las frecuencias se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg. La aproximación utilizada por este programa es el método Bayesiano que permite incorporar la incertidumbre inherente a la estimación de parámetros en el proceso de inferencia y evaluar el poder de la evidencia para las agrupaciones inferidas (Pritchard *et al.* 2000). Los resultados obtenidos permiten determinar si los individuos son asignados por su genotipo a la colonia de captura e identificar posibles vías de flujo génico entre las colonias.

De acuerdo con lo sugerido con Pritchard *et al.* (2000), se analizaron corridas previas para determinar la cantidad de burn-in chains (valores desechados que permiten disminuir la varianza de los datos) y cadenas de Markov Monte Carlo que permiten que la probabilidad se estabilice antes de iniciar el análisis y maximizan la verosimilitud de los resultados (Pritchard *et al.* 2000). Los parámetros se determinaron de la siguiente manera: 50,000 burn-in chains (cadenas previas

desechadas) y 50,000 cadenas de Markov Monte Carlo (posteriores al periodo burn-in chains y que aleatorizan los datos), además se realizaron 30 repeticiones para cada K , donde este valor es el número de grupos o subpoblaciones que se desea analizar. Para este análisis se utilizó una $K = 15$. Los *a priori* considerados para el modelo fueron: 1) ancestría entremezclada (admixture), por el supuesto de que todas las colonias provienen de una población ancestral común; 2) poblaciones correlacionadas, por el supuesto de que hay flujo génico entre ellas; y 3) se permitió que el programa infiriera el valor de α . Para determinar el valor real de K se aplicó la prueba propuesta por Evanno *et al* (2005) que parte de los valores del logaritmo de la verosimilitud obtenidos para cada K . Cabe señalar que esta prueba es más adecuada para definir el valor real de K que el teorema Bayesiano propuesto por Pritchard *et al.* (2000; Evanno, 2005).

5.3.3 Relaciones de parentesco

El programa ML-RELATE (Kalinowski *et al.* 2006), utiliza un análisis de máxima verosimilitud para determinar el coeficiente de relación (r) entre pares de individuos que comparten un genotipo similar. Este programa determina el nivel de significancia para cuatro posibles relaciones: 1) no relacionados, 2) medio hermanos, 3) hermanos y 4) padre/cría, a partir de los supuestos de que no hay endogamia y la población es cerrada (Kalinowski *et al.* 2006). El programa puede comparar la verosimilitud de una relación dada contra una hipótesis alternativa (sin relación) y la verosimilitud de que exista una relación plausible contra el valor del coeficiente K ($r = \frac{1}{2} k_1 + k_2$) de los individuos. Además, el programa establece la significancia entre cada relación, por lo que puede haber valores de r parecidos con diferentes grados de significancia. Este programa, especialmente diseñado para microsatélites, incorpora el cálculo de alelos nulos para reducir el error posible (Kalinowski *et al.* 2006). Los resultados de este

análisis permiten observar con mayor detalle las relaciones de endogamia que pueden existir en las colonias.

5.3.4 Cuellos de botella

Se utilizó el programa BOTTLENECK (Piry *et al.* 1999) que detecta los cuellos de botella por los que pudo pasar una población a través de desviaciones significativas del equilibrio mutación-deriva, por medio de coalescencia y comparando la heterocigosidad esperada con la heterocigosidad en equilibrio. El programa utiliza los dos modelos básicos de mutación: de alelos infinitos (IAM), que considera que cada mutación es nueva, es decir surge en un lugar distinto en cada evento; y el de mutación de un paso (single-step o step-wise mutation; SMM; Chakraborty y Nei, 1977), que considera que las mutaciones sólo pueden ocurrir en lugares adyacentes y se pueden presentar alelos iguales a los que ya están presentes en la población. Aunque el modelo SMM se ajusta mejor a microsatélites, en ocasiones se puede presentar un continuo entre ambos modelos de mutación; por esta razón Piry *et al.* (1999) implementaron la prueba del modelo de mutación dos pasos (TPM), que establece que las mutaciones pueden dar saltos más grandes que los predichos por el modelo SMM. El análisis incluye tres pruebas estadísticas: de significancia, de diferencia estandarizada y de Wilcoxon (Luikart *et al.* 1998).

Se calculó la presencia de cuellos de botella recientes utilizando los modelos de mutación SMM y TPM (95% mutaciones de un paso y 5% mutaciones multipaso) considerando al complejo como unidad, ya que se requieren al menos 30 individuos y 10 microsatélites para que la prueba sea robusta estadísticamente (Piry *et al.* 1999); el programa realizó 1,000 repeticiones para calcular el nivel de significancia.

6. Resultados

6.1 Obtención de muestras

Se capturó un total de 160 perros llaneros, de los cuales se extrajo sangre para la obtención de ADN. Como se observa en el Cuadro 4, la conformación de individuos muestreados fue: 63 hembras adultas, 30 hembras jóvenes, 31 machos adultos y 36 machos jóvenes. Al analizar el número de muestras obtenidas por colonia se obtuvo un promedio de 12.3 (± 2.3 s.d.) muestras por colonia. Los sitios donde se obtuvieron mayor y menor número de capturas fueron El Cuervo (EC) y El Uno Norte (UN), con 6 y 22 individuos respectivamente. Además, se observó que en la colonia Presa Casa de Janos (CJ) sólo se capturaron individuos jóvenes, mientras que en el Uno Norte sólo se capturaron adultos.

Cuadro 4. Número de individuos muestreados clasificado en hembras y machos, en adultos y juveniles y número total por colonia.

Colonia	Clave	Hembras		Machos		N
		Adultos	Juveniles	Adultos	Juveniles	
Agua Blanca	AB	3	1	4	3	11
Buenos Aires	BA	6	3	2	4	15
Presa Casa de Janos	CJ	0	6	0	2	8
El Águila	EA	5	3	2	1	11
El Cuervo	EC	8	1	2	11	22
La Báscula	LB	6	4	4	2	16
La Cal	LC	5	1	4	0	10
Mata Ortiz	MO	6	1	2	0	9
Monteverde	MV	6	1	4	3	14
Ojitos Sur	OS	6	3	2	3	14
Papalote San Pedro	PP	4	5	1	5	15
Pancho Villa	PV	3	1	3	2	9
El Uno Norte	UN	5	0	1	0	6
TOTAL		63	30	31	36	160

Las hembras adultas pesaron entre 625g y 1190g, mientras que los machos presentaron un rango de entre 745g y 1310g. El peso promedio de las hembras adultas (886 ± 103 g s.d.) fue

menor al de los machos adultos (1061 ± 129 g s.d.), y el peso promedio considerando sólo a los individuos adultos capturados fue de 944 g (± 139 s.d.).

6.2 Amplificación de microsátélites

Los 10 loci amplificados fueron polimórficos (Cuadro 5), aunque la colonia El Uno Norte (UN) resultó monomórfica para cuatro loci (A2, A104, C116 y D1). Se encontró un total de 34 alelos, que corresponden a entre 2 y 4 alelos por locus. Cabe señalar que para los loci A2, A101 y D2 no se encontró un alelo intermedio (Anexo 2), de acuerdo a lo esperado por el modelo de mutación de piedra de paso (SMM), que indica que cada vez que hay una mutación puede haber ganancia o pérdida de una unidad de repetición.

Al analizar las frecuencias alélicas por locus (Fig. 5, Anexo 2), se observó que en todos los loci hay un alelo predominante con frecuencias entre 0.4 y 0.55 y se encontraron cinco alelos con frecuencias menores de 0.1 (A2-218 = 0.04; A8-264 = 0.06; A104-182 = 0.02; C116-201 = 0.04 y D115-200 = 0.04); sin embargo, todos los alelos estuvieron presentes en más de una población, de manera que no se encontraron alelos privados.

Al examinar con detalle los alelos presentes por locus en cada población (Anexo 2), se observó, en primer lugar, que la colonia El Cuervo (EC) fue la única en la que están presentes 33 de los 34 alelos encontrados; y que algunos alelos estuvieron presentes únicamente en dos o tres colonias muestreadas; tal fue el caso de los alelos 218 del locus A2, 182 del locus A104 y 201 del locus C116 que estuvieron presentes en tres (EC, LB y MV), dos (CJ y EC) y tres (AB, LB y LC) colonias, respectivamente. Asimismo, se observó que el alelo 264 del locus A8, que fue encontrado en cinco colonias del complejo, sólo se presentó en alta frecuencia en la colonia El Águila (EA; Anexo 2).

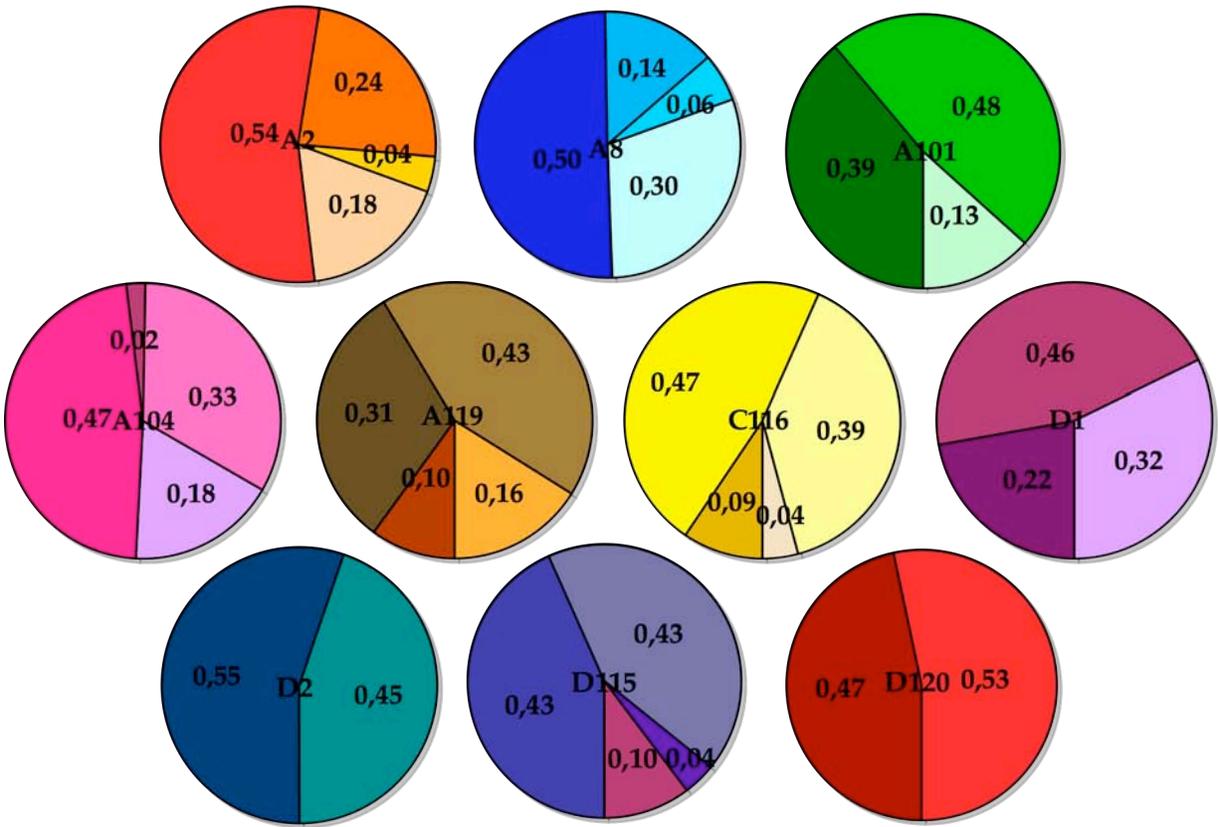


Figura 5. Frecuencias alélicas por locus para 10 microsatélites amplificados para 160 perros de las praderas (*Cynomys ludovicianus*) de 13 colonias de Janos, Chihuahua. Cada color representa un alelo.

Por otra parte, el análisis de Hardy-Weinberg determinó que los loci A101, A104 y C116 presentan una desviación significativa del equilibrio cuando se juntan los datos de todas las poblaciones ($p = 0.03$, $p = 0$ y $p = 0.0003$, respectivamente; Cuadro 5). Los valores positivos de F_{IS} indican que la desviación se debe a una deficiencia de heterocigos, donde sólo los loci D1 y D115 presentan valores menores a 0.1 (Cuadro 5). Además, se observaron valores de F_{ST} mayores a 0.1 en cuatro de los diez loci analizados, así como valores altos de F_{IT} en nueve de los diez loci; esto sugiere la presencia de endogamia y deriva génica en la población.

Cuadro 5. Resultados de prueba exacta de equilibrio de Hardy-Weinberg por locus.

Locus	H_O	H_E	χ^2	g. l.	p	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
A2	0.469	0.616	22.89	24	0.526	0.131	0.134	0.248
A8	0.506	0.636	28.42	26	0.338	0.164	0.053	0.208
A101	0.413	0.605	40.14	26	0.037*	0.139	0.223	0.331
A104	0.256	0.639	113.07	24	0**	0.505	0.203	0.606
A119	0.581	0.688	30.94	26	0.231	0.125	0.037	0.157
C116	0.350	0.614	54.59	24	0.0003**	0.359	0.119	0.436
D1	0.538	0.641	23.11	24	0.513	0.0102	0.164	0.173
D2	0.406	0.496	22.66	26	0.651	0.2	-0.026	0.179
D115	0.594	0.621	26.62	26	0.429	0.015	0.032	0.046
D120	0.381	0.499	24.78	24	0.417	0.196	0.055	0.240
						0.18	0.103	0.264

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

Al realizar el análisis de Hardy-Weinberg por colonia se observó que 8 de las 13 colonias presentaron desviaciones significativas del equilibrio (Cuadro 6). Las colonias Agua Blanca (AB; $F_{IS} = 0.321$), Buenos Aires (BA; $F_{IS} = 0.225$), Presa Casa de Janos (CJ; $F_{IS} = 0.262$), El Águila (EA; ; $F_{IS} = 0.167$), El Cuervo (EC; $F_{IS} = 0.172$), La Cal (LC; $F_{IS} = 0.291$), Monteverde (MV; $F_{IS} = 0.197$) y Ojitos Sur (OS; $F_{IS} = 0.181$) presentaron desviaciones de las proporciones esperadas (Cuadro 6). Además, al considerar todas las colonias y todos los loci también se observó una desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2_{(250)} = 385.1$; $p = 0$). El tamaño de la muestra no aparenta ser un factor que afecte los resultados, ya que la riqueza alélica estimada por medio del método de rarefacción siguió la misma tendencia que los datos no corregidos y en cinco de las 13 colonias (CJ, LC, OS, PP y PV) la riqueza alélica obtenida fue igual a la esperada, mientras que en 7 colonias (AB, BA, EA, EC, LB, MO y MV) se obtuvo una riqueza alélica mayor a la esperada de acuerdo al tamaño de la muestra (Cuadro 6). La única colonia en la que se encontró un número menor de alelos al esperado de acuerdo al tamaño de la muestra fue El Uno Norte (UN) donde sólo se capturaron 6 individuos.

Una de las causas por las que es posible encontrar desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg es la presencia de alelos nulos. Se observó presencia de alelos nulos, debido a un exceso de homocigotos, en 10 de las 13 colonias muestreadas y en 6 de los 10 loci amplificados (Anexo 3). Sin embargo, el análisis de F_{ST} estimada considerando (ENA) y sin considerar (s/ENA) la presencia de alelos nulos indicó que no hay una diferencia significativa entre ambas (F_{ST} s/ENA = 0.103 y F_{ST} ENA = 0.097; Anexo 3) ya que los valores medios de cada una se ubicaron dentro de los intervalos de confianza del otro estimado (Intervalos de confianza de F_{ST} s/ENA 0.059 – 0.148 y F_{ST} ENA 0.059 – 0.133; Anexo 3), de manera que al no encontrar un patrón claro y no haber diferencias significativas entre los valores de F_{ST} s/ENA y ENA podemos decir que no es necesario preocuparse por la presencia de alelos nulos en la muestra.

Por otra parte, se realizó un análisis de desequilibrio de ligamiento que detectó ligamiento entre algunos loci en algunas colonias (21 casos; Anexo 4), mientras que el análisis de cada par de loci, considerando todas las colonias, detectó ligamiento únicamente entre los loci A104 y D120 ($\chi^2_{(24)} = 37.4$; $p = 0.04$). Sin embargo, los loci A104 y D120 presentaron comportamientos distintos en cuanto a la desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg (Cuadro 5), y el análisis por colonia sólo detectó ligamiento entre estos loci en las colonias La Cal (LC) y Pancho Villa (PV), lo que sugiere que el desequilibrio es un artefacto del análisis, de manera que podemos considerar que los loci no están ligados.

6.3 Análisis estadísticos

6.3.1 Variabilidad genética

Se midió la variabilidad genética con el promedio total de alelos encontrados que fue de 3.4 (± 0.8 s.d.) y, dado que los microsatélites son marcadores nucleares hipervariables, se puede considerar bajo para una muestra de 10 loci (Cuadro 6).

Por otra parte, se calculó la variabilidad genética por medio de la heterocigosidad esperada (H_E), que resultó mayor que la heterocigosidad observada (H_O) en todas las colonias (Cuadro 6). La variabilidad genética promedio para todas las colonias y todos los loci fue de $0.525 (\pm 0.11 \text{ s.d.})$; siendo El Cuervo ($EC = 0.618 \pm 0.09 \text{ s.d.}$) la colonia con mayor variabilidad, seguida por El Águila ($EA = 0.606 \pm 0.07 \text{ s.d.}$) y el Papalote San Pedro ($PP = 0.574 \pm 0.07 \text{ s.d.}$); El Uno Norte fue el sitio con el valor más pequeño ($UN = 0.276 \pm 0.25 \text{ s.d.}$), seguido por Agua Blanca ($AB = 0.448 \pm 0.15 \text{ s.d.}$).

Cuadro 6. Medidas de variabilidad genética para 13 colonias de perros llaneros (*Cynomys ludovicianus*) de Janos, Chihuahua.

Colonia	N	P	A (s.d.)	A_r	H_O (s.d.)	H_E (s.d.)	F_{IS}
AB	11	10	2.5 (0.53)	2.4	0.309 (0.16)	0.448 (0.15)	0.321*
BA	15	10	2.8 (0.63)	2.6	0.447 (0.20)	0.572 (0.12)	0.225*
CJ	8	10	2.2 (0.42)	2.2	0.375 (0.17)	0.499 (0.10)	0.262*
EA	11	10	2.9 (0.57)	2.8	0.509 (0.13)	0.606 (0.07)	0.167*
EC	22	10	3.3 (0.82)	3.0	0.514 (0.14)	0.618 (0.09)	0.172*
LB	16	10	2.7 (0.48)	2.5	0.475 (0.20)	0.543 (0.07)	0.128
LC	10	10	2.4 (0.52)	2.4	0.380 (0.27)	0.527 (0.05)	0.291*
MO	9	10	2.5 (0.71)	2.4	0.433 (0.20)	0.510 (0.13)	0.158
MV	14	10	2.7 (0.68)	2.6	0.464 (0.16)	0.565 (0.07)	0.197*
OS	14	10	2.3 (0.48)	2.3	0.436 (0.17)	0.528 (0.09)	0.181*
PP	15	10	2.6 (0.52)	2.6	0.547 (0.15)	0.574 (0.07)	0.049
PV	9	10	2.4 (0.52)	2.4	0.500 (0.26)	0.556 (0.11)	0.107
UN	6	6	1.2 (1.03)	1.6	0.233 (0.29)	0.276 (0.25)	0.167
TOTAL	160	10	3.4 (0.8)		0.449 (0.11)	0.525 (0.11)	0.180*

N = Número de individuos por colonia; p = loci polimórficos; A = número promedio de alelos por locus; A_r = número promedio por locus calculado por medio de rarefacción; H_O = Heterocigosidad observada y H_E = Heterocigosidad esperada. * $p < 0.05$. AB: Agua Blanca, BA: Buenos Aires, CJ: Presa Casa de Janos, EA: El Águila, EC: El Cuervo, LB: La Báscula, LC: La Cal, MO: Mata Ortiz, MV: Monteverde, OS: Ojitos Sur, PP: Papalote San Pedro, PV: Pancho Villa; UN: El Uno Norte.

6.3.2 Estructuración genética

Índice de fijación F_{IS}

En el Cuadro 6 se puede observar que los valores del coeficiente de endogamia (F_{IS}) sugieren que 8 de las 13 colonias presentaron deficiencia de heterocigos significativa, con valores de 0.167 a 0.321, con respecto a la esperada de acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg. Las colonias que no presentaron esta deficiencia fueron La Báscula (LB), Mata Ortiz (MO), Papalote San Pedro (PP), Pancho Villa (PV) y El Uno Norte (UN), aunque de éstas sólo Papalote San Pedro tuvo un valor de F_{IS} menor a 0.1. Así mismo, El Uno Norte (UN) presentó un valor igual al de El Águila (EA; 0.167), que sí fue significativo, lo cual sugiere que en esta colonia se observa un efecto del tamaño de la muestra ($n = 6$) y del número de loci polimórficos ($p = 6$). El valor total de F_{IS} o coeficiente de endogamia fue de 0.18 y fue significativamente diferente de 0 ($p < 0.05$), es decir que hay endogamia en nuestra población o estructuración en las colonias debido a efecto Wahlund.

Índice de diferenciación genética (R_{ST}) y distancia genética de Nei (D_A)

El 87% de las comparaciones entre colonias presentaron diferenciación genética significativa ($R_{ST} > 0$; $p < 0.05$; Cuadro 7). El mayor y menor índice significativo se presentó en PV-LC (0.458) y en PP-EA (0.059); y de los índices no significativos, únicamente EC-LB tuvo un valor igual a cero.

Por otra parte, se observó que Agua Blanca (AB), Pancho Villa (PV) y El Uno Norte (UN) presentaron índices de diferenciación altos y significativos con respecto a todas las colonias (0.086-0.241, 0.094-0.458 y 0.199-0.365, respectivamente; Cuadro 7); mientras que para la colonia El Cuervo (EC) el índice no fue significativo en cuatro ocasiones (EC-EA, EC-LB, EC-MV y EC-OS).

Cuadro 7. Valores del índice diferenciación genética entre colonias (R_{ST} pareadas) del complejo de perros llaneros (*Cynomys ludivicianus*) de Janos-Casas Grandes. Los asteriscos muestran los valores de R_{ST} pareadas que NO son significativos.

	AB	BA	CJ	EA	EC	LB	LC	MO	MV	OS	PP	PV	UN
AB	0												
BA	0.165	0											
CJ	0.206	0.273	0										
EA	0.087	0.072*	0.214	0									
EC	0.086	0.061	0.230	0.020*	0								
LB	0.108	0.149	0.280	0.068	0*	0							
LC	0.232	0.358	0.089*	0.255	0.264	0.280	0						
MO	0.093	0.149	0.217	0.035*	0.070	0.092	0.278	0					
MV	0.165	0.185	0.361	0.092	0.043*	0.031*	0.356	0.131	0				
OS	0.218	0.151	0.359	0.105	0.024*	0.033*	0.361	0.152	0.047	0			
PP	0.153	0.140	0.162	0.059	0.072	0.109	0.220	0.042*	0.139	0.079	0		
PV	0.241	0.250	0.443	0.136	0.138	0.186	0.458	0.132	0.094	0.145	0.142	0	
UN	0.239	0.363	0.231	0.284	0.245	0.236	0.214	0.199	0.365	0.364	0.244	0.470	0

* $p > 0.05$. AB: Agua Blanca, BA: Buenos Aires, CJ: Presa Casa de Janos, EA: El Águila, EC: El Cuervo, LB: La Báscula, LC: La Cal, MO: Mata Ortiz, MV: Monteverde, OS: Ojitos Sur, PP: Papalote San Pedro, PV: Pancho Villa; UN: El Uno Norte.

Además, se estimaron los valores de distancia genética de Nei (Nei *et al.* 1983), que presentaron un gradiente que va desde 0.042 hasta 0.309 (Anexo 5). En el dendograma obtenido con el algoritmo del Vecino más cercano (Neighbor-joining) a partir de las distancias genéticas de Nei (D_A ; Fig. 6) se observan 3 grupos de colonias; sin embargo, los valores de soporte de las ramas fueron menores a 50% en casi todos los casos, de manera que el resultado no es confiable. Los únicos nodos que tuvieron soporte estadísticos son los que unen a las colonias La Cal (LC) y Presa Casa de Janos (CJ); las colonias Buenos Aires (BA) y El Águila (EA); y las colonias La Báscula (LB) y Ojitos Sur (OS) con 63%, 60% y 58%, respectivamente. Los resultados sugieren que Presa Casa de Janos (CJ), La Cal (LC) y El Uno Norte (UN) fueron las colonias que más se diferencian del resto.

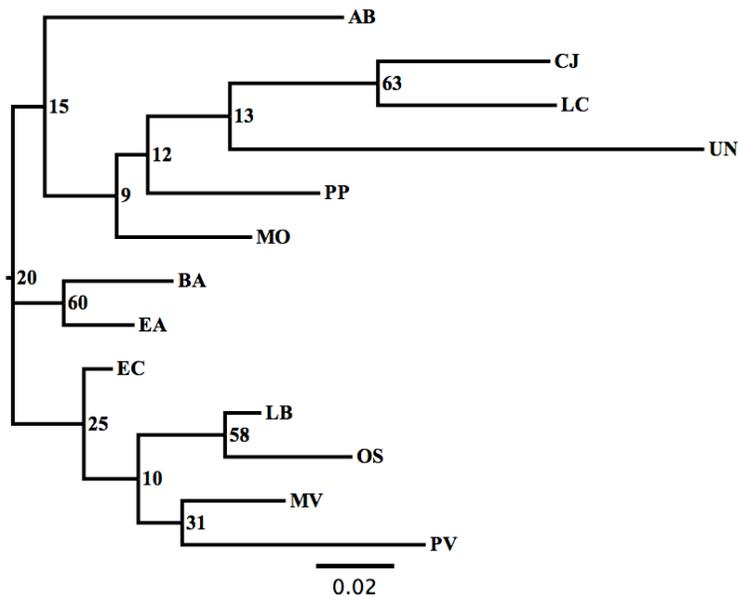


Figura 6. Dendrograma calculado con el algoritmo del Vecino más cercano y construido a partir de los valores de distancia genética de Nei (D_A ; Anexo 5; Nei *et al.* 1983). AB: Agua Blanca, BA: Buenos Aires, CJ: Presa Casa de Janos, EA: El Águila, EC: El Cuervo, LB: La Báscula, LC: La Cal, MO: Mata Ortiz, MV: Monteverde, OS: Ojitos Sur, PP: Papalote San Pedro, PV: Pancho Villa; UN: El Uno Norte.

Flujo génico

Se calculó el número de migrantes (Nm) con respecto a los valores de R_{ST} y se observó un rango que va desde 0.6 hasta infinito (Cuadro 8). El flujo génico entre colonias resultó alto, con sólo 11 casos en los que el número de migrantes fue menor a 1, mínimo sugerido por la regla del equilibrio mutación-deriva que establece que un migrante por generación es suficiente para mantener una estructura homogénea, es decir, para que las poblaciones se mantengan cohesivas como una población (Wright, 1931). Sin embargo, los supuestos del modelo de Wright rara vez se cumplen en la naturaleza, de manera que Lacy (1987) sugirió que alrededor de 5 migrantes por generación son necesarios para prevenir la diferenciación y, como se observa en el Cuadro 8, sólo en 18 de las 78 comparaciones (el 23%) se rebasó esta cantidad.

Cuadro 8. Matriz con valores de flujo génico ($Nm = 1 - R_{ST}/4R_{ST}$).

	AB	BA	CJ	EA	EC	LB	LC	MO	MV	OS	PP	PV	UN
AB	0												
BA	2.5	0											
CJ	1.9	1.3	0										
EA	5.3	6.5	1.8	0									
EC	5.3	7.7	1.7	24.0	0								
LB	4.1	2.9	1.3	6.9	∞	0							
LC	1.7	0.9*	5.1	1.5	1.4	1.3	0						
MO	4.9	2.9	1.8	13.8	6.7	5.0	1.3	0					
MV	2.5	2.2	0.9*	4.9	11.1	15.4	0.9*	3.3	0				
OS	1.8	2.8	0.9*	4.3	20.7	14.4	0.9*	2.8	10.1	0			
PP	2.8	3.1	2.6	7.9	6.5	4.1	1.8	11.3	3.1	5.8	0		
PV	1.6	1.5	0.6*	3.2	3.1	2.2	0.6*	3.3	4.8	2.9	3.0	0	
UN	1.6	0.9*	1.7	1.3	1.5	1.6	1.8	2.0	0.9*	0.9*	1.6	0.6*	0

* = < 1 migrante por generación. AB: Agua Blanca, BA: Buenos Aires, CJ: Presa Casa de Janos, EA: El Águila, EC: El Cuervo, LB: La Báscula, LC: La Cal, MO: Mata Ortiz, MV: Monteverde, OS: Ojitos Sur, PP: Papalote San Pedro, PV: Pancho Villa; UN: El Uno Norte.

Por otra parte, se calculó el número de migrantes entre colonias por medio del método Bayesiano y la teoría de coalescencia. En el Cuadro 9 se observa que el flujo génico por generación fue considerable, ya que el número de migrantes presentó un rango que va desde 33 de PV a EC, hasta 848 migrantes de LB a MO. Además, se observó menor flujo génico hacia las colonias El Cuervo (EC; 33 – 208; 1370 inmigrantes) y La Báscula (LB; 53 – 313; 1775 inmigrantes) que hacia el resto de las colonias, mientras que Papalote San Pedro (PP) y Pancho Villa (PV) son los sitios que recibían mayor flujo génico (233 – 753; 5855 inmigrantes y 233 – 598; 5085 inmigrantes). Así mismo, se puede ver que el flujo fue mayor desde Monteverde (MV; 4530 emigrantes) y menor desde El Uno Norte (UN; 2870 emigrantes).

Se observaron seis casos en los que el número de migrantes fue menor de 100: en cinco de estos El Cuervo (EC) fue la colonia receptora, mientras que las colonias de origen eran El Águila

(EA), Mata Ortiz (MO), Monteverde (MV), Ojitos Sur (OS) y Pancho Villa (PV); otro caso involucra el flujo génico entre El Uno Norte (UN) y La Báscula (LB).

Las colonias Agua Blanca (AB), Mata Ortiz (MO), Monteverde (MV) y Ojitos Sur (OS) presentaron emigración e inmigración muy similares, mientras que en Presa Casa de Janos (CJ), Papalote San Pedro (PP), Pancho Villa (PV) y El Uno Norte (UN) hubo mayor emigración que inmigración y en Buenos Aires (BA), El Cuervo (EC), la Báscula (LB) y La Cal (LC) la inmigración fue mayor a la emigración (Cuadro 9).

Cuadro 9. Valor de la mediana del número de migrantes por generación ($M = m/\mu$). Número de emigrantes (E) en las filas y número de inmigrantes (I) en las columnas; total de emigrantes (Total (E)) e inmigrantes (Total (I)) por colonia. PE y PI se refieren a la proporción de emigrantes e inmigrantes con respecto a la densidad calculada en el cuadro 2 para cada colonia ($PE = E/N$; $PI = I/N$).

Colonia	AB	BA	CJ	EA	EC	LB	LC	MO	MV	OS	PP	PV	UN	Total (E)	PE
AB	-	213	788	113	108	113	433	378	213	133	313	273	418	3490	21.6
BA	363	-	253	573	158	178	178	228	218	408	533	493	453	4030	7.2
CJ	178	343	-	233	208	148	238	463	193	318	478	438	278	3510	61.2
EA	293	663	228	-	63	103	143	418	318	388	338	458	583	3990	2.3
EC	273	163	168	498	-	143	488	178	138	203	488	433	383	3550	0.1
LB	263	338	378	233	108	-	218	848	278	328	498	513	433	4430	0.3
LC	533	248	353	248	208	103	-	398	198	153	708	293	463	3900	15.2
MO	293	343	283	568	58	188	403	-	283	403	753	463	223	4255	23.0
MV	478	333	568	483	73	188	278	303	-	628	423	308	473	4530	0.2
OS	313	228	483	313	93	313	173	243	148	-	358	588	443	3690	10.7
PP	113	373	398	208	153	128	253	463	258	293	-	598	308	3540	21.0
PV	193	283	468	248	33	123	498	218	493	423	738	-	473	4185	2.8
UN	173	213	498	543	113	53	208	208	263	138	233	233	-	2870	20.9
Total (I)	3460	3735	4860	4255	1370	1775	3505	4340	2995	3810	5855	5085	4925	99970	
PI	21.4	6.7	84.7	2.5	0.05	0.1	13.7	23.4	0.2	11.0	34.8	3.3	35.9		0.9

AB: Agua Blanca, BA: Buenos Aires, CJ: Presa Casa de Janos, EA: El Águila, EC: El Cuervo, LB: La Báscula, LC: La Cal, MO: Mata Ortiz, MV: Monteverde, OS: Ojitos Sur, PP: Papalote San Pedro, PV: Pancho Villa; UN: El Uno Norte. Total inmigración (I); Total emigración (E); PI: proporción de inmigrantes; PE: Proporción de emigrantes.

Al calcular la proporción de emigrantes (PE) e inmigrantes (PI) con respecto a la densidad total actual de cada colonia (Cuadro 9), se observó que sólo en las colonias La Báscula (LB; $PE_{LB} = 0.4$; $PI_{LB} = 0.2$), El Cuervo (EC; $PE_{EC} = 0.1$; $PI_{EC} = 0.05$) y Monteverde (MV; $PE_{MV} = 0.2$; $PI_{MV} = 0.2$) el número de migrantes fue menor a la densidad por colonia. Además, se observó que El Cuervo (EC) fue la colonia que presentó menor proporción de migrantes. La proporción de emigrantes fue mayor a la proporción de inmigrantes en La Báscula (LB) y El Cuervo (EC), mientras que en Monteverde (MV) se encuentran en equilibrio. La proporción total de migrantes (E+I) con respecto a la densidad total de las 13 colonias del complejo representó el 90% de la población total actual del complejo.

Efecto de la distancia geográfica y el tamaño de la colonia

Se realizó una prueba de Mantel para determinar si existe aislamiento por distancia (Fig. 7). Aunque se observó una tendencia negativa, el resultado no fue significativo ($r = -0.189$; $p = 0.096$), de manera que la estructuración no se ajustó a un patrón geográfico y no hubo aislamiento por distancia.

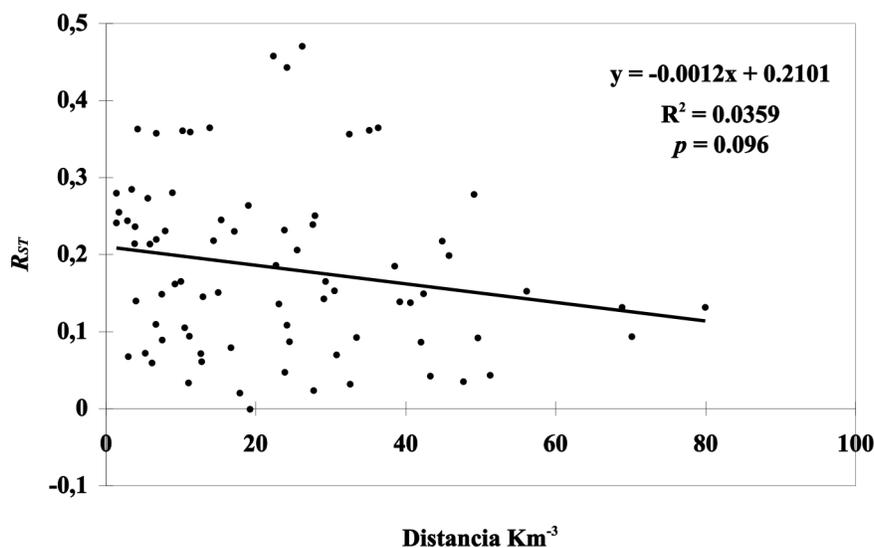


Figura 7. Gráfica de correlación entre distancia genética y distancia geográfica.

Por otra parte, se probó la correlación entre los valores de la diversidad genética (H_E) y el índice de endogamia (F_{IS}) con el logaritmo (log) del tamaño de la colonia, y ninguna de las correlaciones fueron significativas ($r = 0.48$, $p = 0.094$, Fig. 8a y $r = 0.302$, $p = 0.31$, Fig. 8b). Sin embargo, se observó una tendencia positiva con respecto a la diversidad genética y negativa con respecto a la endogamia, lo cual fue consistente con lo esperado según la teoría.

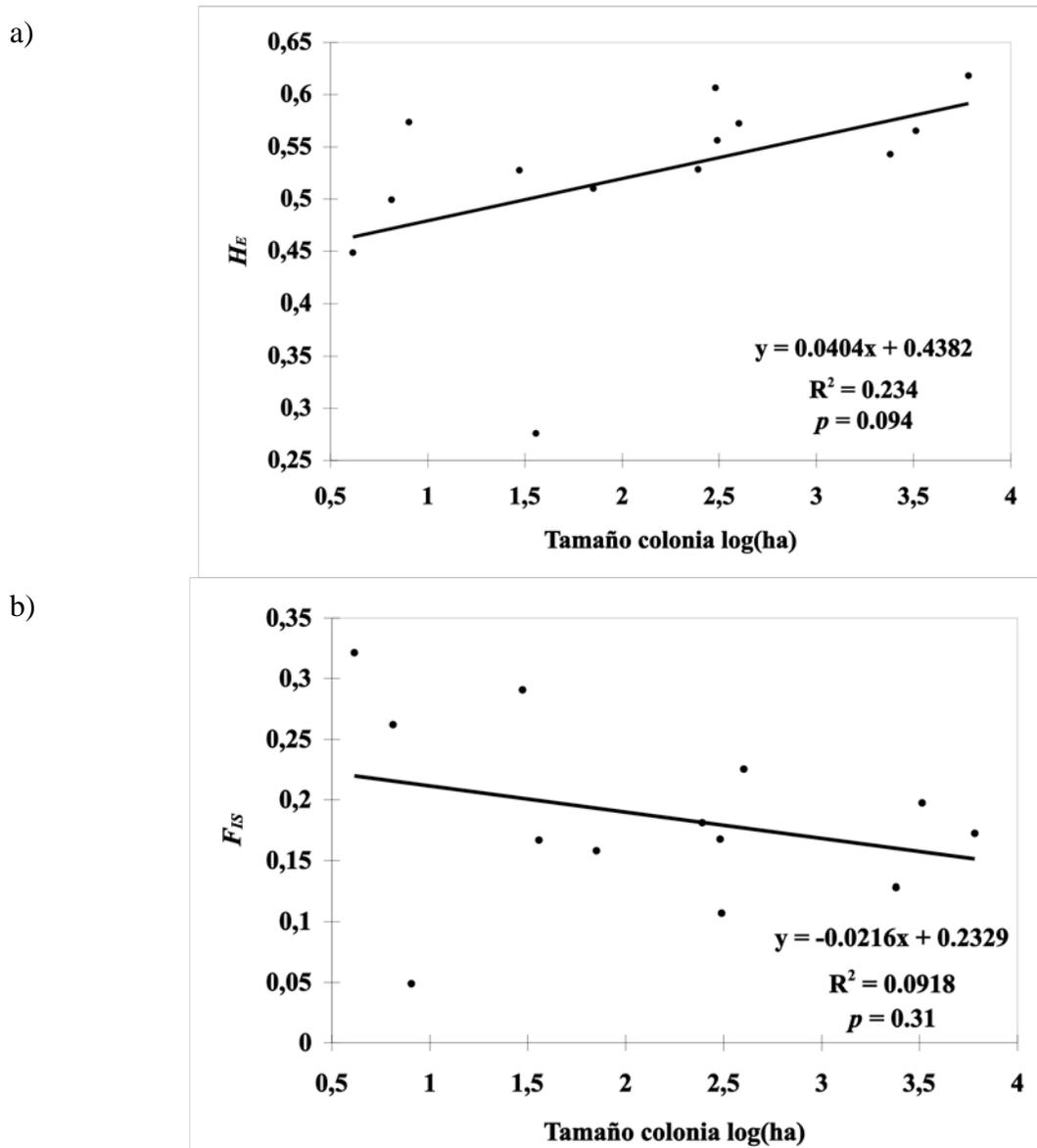


Figura 8. Gráfica de correlación entre a) valores de diversidad genética (H_E) y b) índice de endogamia (F_{IS}) contra el logaritmo del tamaño de la colonia (ha).

Análisis de varianza molecular

Se realizaron dos análisis de AMOVA (F_{ST} y R_{ST} ; Cuadro 10). En ambos análisis se observó la misma distribución: la mayor parte de la variación se encontró entre individuos dentro de las colonias (F_{IT} : 73.6%; R_{IT} : 65.8%), seguida por la variación intracolonia (F_{IS} : 16.1%; R_{IS} : 18.7%) y en menor medida entre las poblaciones (F_{ST} : 10.3%; R_{ST} : 15.5%). A detalle, se observó que aunque la tendencia en la distribución de la varianza fue igual en ambos análisis hubo diferencias en la manera en que se reparten los porcentajes de variación, ya que para R_{ST} incrementó la varianza atribuida a las diferencias intracolonia y entre las colonias y disminuyó la varianza atribuible a las diferencias entre individuos con respecto a la población total o entre todos los individuos sin considerar a las colonias. Ambos análisis indican que la variabilidad está distribuida de manera aleatoria entre las colonias.

También en el Cuadro 10 se observa que los valores de F_{ST} (intervalos de confianza 95%) y R_{ST} (intervalos de confianza 95%) fueron de 0.103 (0.043-0.149) y de 0.155 (0.034 - 0.263) respectivamente y ambos fueron significativamente diferentes de cero ($p < 0.05$), aunque la diferencia entre ellos no fue significativa. Los valores de diferenciación genética y su significancia sugieren estructuración genética entre las colonias. Además, los valores de endogamia (F_{IS} : 0.18 (0.081 – 0.258); R_{IS} : 0.221 (0.099 – 0.342); F_{IT} : 0.264 (0.155 – 0.350); R_{IT} : 0.342 (0.202 – 0.498)) fueron estadísticamente diferentes de 0 ($p < 0.05$) y señalan la presencia de esta fuerza evolutiva en el complejo. En general, los tres coeficientes estimados con R_{ST} fueron mayores que los obtenidos con F_{ST} , aunque las diferencias entre ambos estimados no fueron significativas, ya que los intervalos de confianza se superpusieron. Ambos estimadores indican la presencia de endogamia y de deriva génica, siendo la endogamia la fuerza evolutiva que actúa con mayor fuerza en esta población.

Cuadro 10. Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) a partir de F_{ST} y R_{ST} .

F_{ST}			
Fuente de Variación	Porcentaje de variación	Coeficientes	
Entre colonias	10.3	F_{ST}	0.103
Intracolonia	16.1	F_{IS}	0.180
Entre individuos dentro de las colonias	73.6	F_{IT}	0.264
R_{ST}			
Fuente de Variación	Porcentaje de variación	Coeficientes	
Entre colonias	15.5	R_{ST}	0.155
Intracolonia	18.7	R_{IS}	0.221
Entre individuos dentro de las colonias	65.8	R_{IT}	0.342

Por otra parte, al realizar el análisis espacial de varianza molecular (SAMOVA) se observó que la mejor explicación de la distribución de la variación se obtuvo cuando se conformaron 3 grupos de colonias: el primero contuvo a las colonias Presa Casa de Janos y La Cal (CJ y LC), el segundo a la colonia el Uno Norte (UN) y el tercero a las diez colonias restantes. En el Cuadro 11 se observa que el mayor porcentaje de variación se encontró a nivel intrapoblacional (71.9%), seguido por el porcentaje de variación que se encontró entre grupos (19.8%) y en tercer lugar estuvo el porcentaje de la varianza que se encontró entre poblaciones dentro de los grupos (8.3%), de manera que la variación se encuentra distribuida de manera aleatoria entre las poblaciones. Además, los índices de fijación ($R_{CT} = 0.198$; $R_{SC} = 0.104$; y $R_{ST} = 0.282$) fueron estadísticamente diferentes de 0 ($p < 0.05$); incrementó la diferenciación genética y disminuyó la endogamia con respecto a lo obtenido con AMOVA. De acuerdo con lo anterior, se observó que, con este agrupamiento de colonias, disminuyó la importancia de la endogamia e incrementó el papel de la deriva génica.

Cuadro 11. Resultados de análisis espacial de varianza molecular (SAMOVA) por diferencia de distancia cuadradas (R_{ST}).

R_{ST}			
Fuente de Variación	Porcentaje de variación	Coeficientes	
Entre Grupos	19.8	R_{CT}	0.198
Entre colonias dentro de los grupos	8.4	R_{CS}	0.104
Intracolonia	71.8	R_{ST}	0.282

Otra característica de SAMOVA es que identifica barreras genéticas entre los grupos, y les asigna valores de confianza. En la figura 9 podemos observar que las colonias El Uno Norte (UN) y La Cal (LC) se encontraron completamente aisladas del resto de las colonias del complejo, y en segundo lugar que las colonias Presa Casa de Janos (CJ) y Mata Ortiz (MO) estuvieron aisladas del resto del complejo por barreras genéticas con 95% de confiabilidad. La barrera que separó CJ y MO fue consistente con la presencia de las faldas de la Sierra Madre Occidental, mientras que las barreras que aislaron UN y LC del resto de las colonias no tuvieron relación con barreras geográficas aunque pudieran tenerla con la vegetación que rodea a los sitios. Además, el análisis estableció otras barreras con menor grado de confiabilidad y que aparentemente no interrumpieron el flujo génico entre las colonias. Sin embargo, es necesario señalar que los análisis de flujo génico (Cuadros 8 y 9) establecieron que existe intercambio de individuos entre todas las colonias.

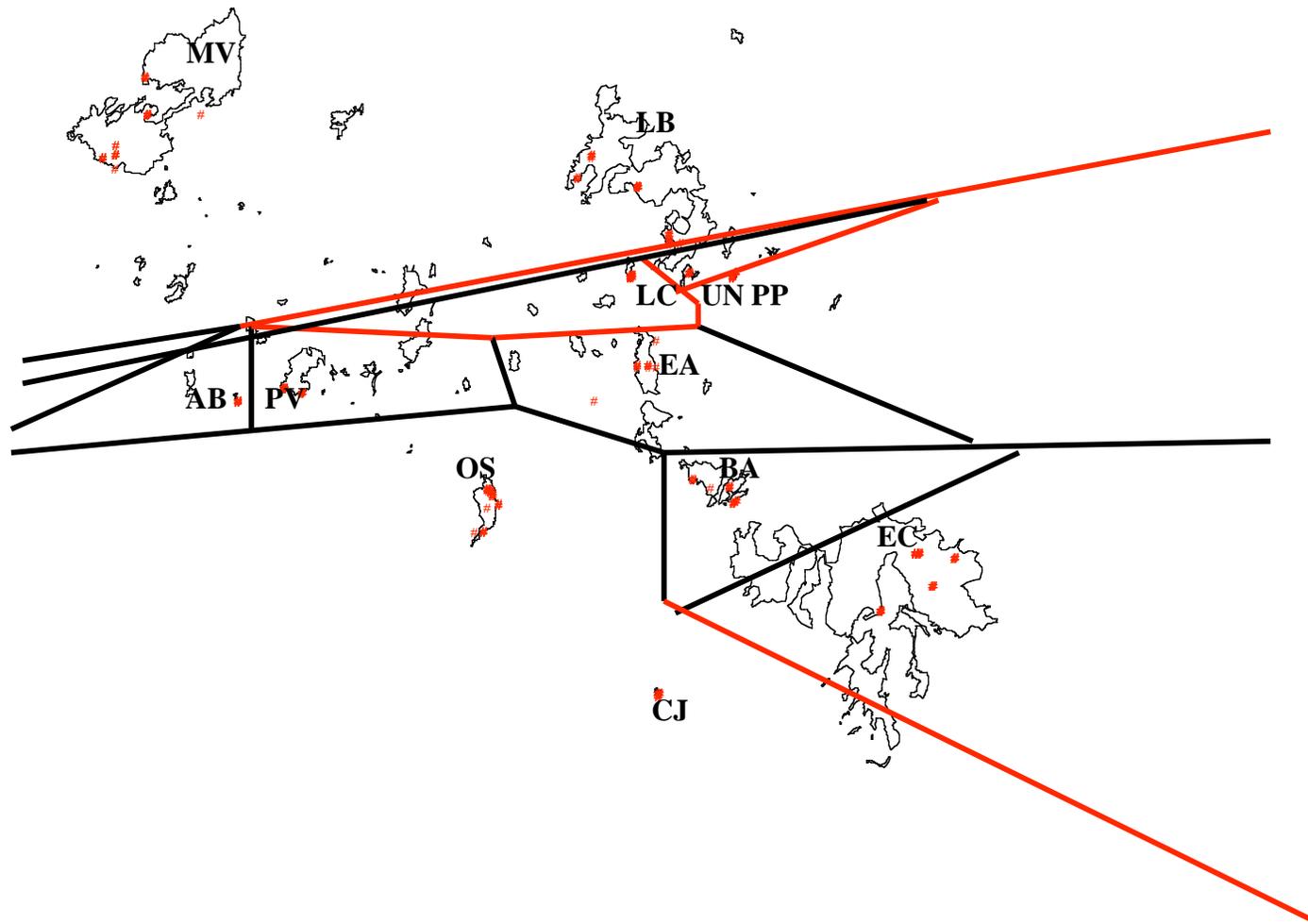


Figura 9. Barreras genéticas estimadas por SAMOVA. En rojo aquellas con más del 95% de confiabilidad. AB: Agua Blanca, BA: Buenos Aires, CJ: Presa Casa de Janos, EA: El Águila, EC: El Cuervo, LB: La Báscula, LC: La Cal, MO: Mata Ortiz, MV: Monteverde, OS: Ojitos Sur, PP: Papalote San Pedro, PV: Pancho Villa; UN: El Uno Norte.

Estructura genética

En cuanto a los resultados arrojados por el programa STRUCTURE, la prueba propuesta por Evanno y colaboradores (2005) sugirió que la población se separa en dos grupos bien definidos ($K = 2$; Anexo 7). La asignación de individuos a estos grupos no fue consistente con las 13 colonias muestreadas; sin embargo, fue consistente con los resultados arrojados por los análisis de SAMOVA que separa a las colonias El Uno Norte (UN), La Cal (LC) y Presa Casa de Janos (CJ) del resto de las colonias del complejo (Cuadro 12).

Al considerar la probabilidad de asignación de los individuos a cada uno de los grupos se observa, en el Cuadro 12, que en cinco de las trece colonias (AB, CJ, LC, PP y UN) la probabilidad de asignación al grupo 1 fue mayor a 0.5, y en las colonias restantes la probabilidad de asignación al grupo 2 también fue mayor a 0.5. Del total de la muestra, el 41% fue asignado al grupo 1 y el 59% al 2. Sin embargo, al considerar únicamente aquellos casos en los que la asignación se realizó con una confiabilidad mayor al 90% se observó un cambio en las proporciones: el 50% de los individuos estuvieron entremezclados, mientras que el 19% fue asignado al grupo 1 y el 31% al 2 (Fig. 10). Cabe resaltar que, como se observa en el Cuadro 12 y en la Figura 10, dentro del grupo 1 se encontró el 100% de los individuos de las poblaciones Presa Casa de Janos (CJ) y La Cal (LC), y el 90% de los individuos de la colonia El Uno Norte (UN); y dentro del grupo 2 se encontró el 71% de los individuos de la colonia Monteverde (MV) y el 67% de la colonia Pancho Villa (PV). La falta de resolución en la asignación de los individuos corresponde con el alto flujo génico detectado entre las colonias (Cuadros 8 y 9), ya que los individuos entremezclados podrían corresponder a migrantes o sus descendientes.

Cuadro 12. Proporción de asignación de individuos total y de acuerdo a intervalos de confianza para $K = 2$ definidos por el programa STRUCTURE.

Colonia	TOTAL		CONFIANZA 95%		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	Entremezclados
AB	0.589	0.411	0.273	-	0.727
BA	0.38	0.62	-	0.4	0.6
CJ	0.966	0.034	1	-	-
EA	0.381	0.619	-	0.182	0.818
EC	0.217	0.783	-	0.409	0.591
LB	0.189	0.811	-	0.5	0.5
LC	0.966	0.034	1	-	-
MO	0.482	0.518	-	0.111	0.889
MV	0.142	0.858	-	0.714	0.286
OS	0.109	0.891	-	0.429	0.571
PP	0.649	0.351	0.333	0.067	0.6
PV	0.112	0.888	-	0.667	0.333
UN	0.9	0.1	0.833	-	0.167
TOTAL	0.41	0.59	0.19	0.31	0.5

AB: Agua Blanca, BA: Buenos Aires, CJ: Presa Casa de Janos, EA: El Águila, EC: El Cuervo, LB: La Báscula, LC: La Cal, MO: Mata Ortiz, MV: Monteverde, OS: Ojitos Sur, PP: Papalote San Pedro, PV: Pancho Villa; UN: El Uno Norte.

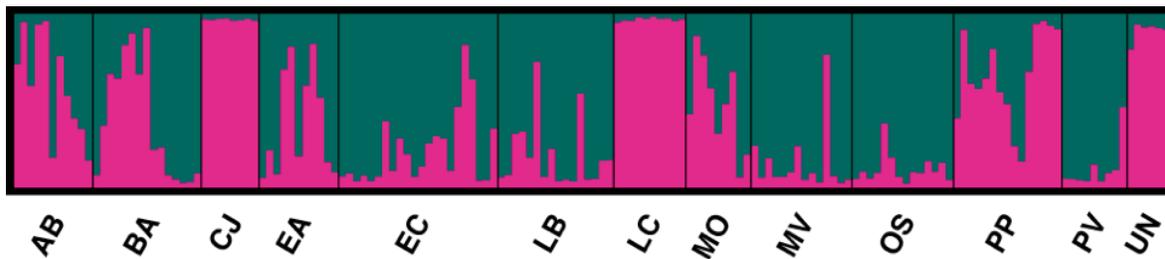


Figura 10. Resultados de asignación genética de los individuos a cada uno de los grupos determinados por STRUCTURE. Rosa, grupo 1. Verde, grupo 2. AB: Agua Blanca, BA: Buenos Aires, CJ: Presa Casa de Janos, EA: El Águila, EC: El Cuervo, LB: La Báscula, LC: La Cal, MO: Mata Ortiz, MV: Monteverde, OS: Ojitos Sur, PP: Papalote San Pedro, PV: Pancho Villa; UN: El Uno Norte.

Por otra parte, el programa calculó los valores de F_{ST} para cada grupo, que son análogos al coeficiente F de Wright. El grupo 1 presentó un valor de estructuración alto ($F_{ST1} = 0.15$) y mayor al valor de F_{ST} calculado por medio de AMOVA. La estructuración encontrada en el grupo 2 fue baja ($F_{ST2} = 0.061$), resultado consistente con que la mayoría de los individuos que se encuentran dentro de este grupo estuvieron entremezclados. De manera que sólo el grupo compuesto, en su mayoría, por los individuos de las colonias Presa Casa de Janos, La Cal y El Uno Norte presentó diferenciación genética, mientras que el resto de las colonias pueden considerarse como una sola población.

6.3.3 Relaciones de parentesco

El programa ML-RELATE asignó con significancia estadística ($p < 0.05$) diversas relaciones de parentesco entre los individuos de cada colonia (Anexo 6). Se obtuvo un total de 214 relaciones de parentesco (de 1013 posibles combinaciones; Anexo 6), de las cuales 109 correspondieron a medios hermanos, 36 a hermanos y 59 a padre-cría (Cuadro 13).

En la colonia Presa Casa de Janos (CJ) no se encontraron relaciones de parentesco padre-cría (Cuadro 13), lo cual fue consistente con que en este sitio sólo se capturaron individuos jóvenes (Cuadro 4). Además, es interesante que en la colonia El Uno Norte (UN) donde sólo se capturaron individuos adultos, no se detectaron relaciones de medios hermanos y la relación que se encontró con mayor frecuencia fue de padre-cría (Cuadro 13); los valores de parentesco encontrados en UN sugieren que la endogamia es muy alta en esta colonia.

Cuadro 13. Relaciones de parentesco significativas calculadas con ML-RELATE.

Colonia	Relación de parentesco			
	Medios hermanos	Hermanos	Padre-cría	Total
AB	5	1	3	9
BA	18	2	4	24
CJ	2	2	-	4
EA	3	2	2	7
EC	26	5	6	37
LB	7	7	11	35
LC	5	2	3	10
MO	1	2	2	5
MV	10	2	4	16
OS	10	5	8	23
PP	18	2	8	28
PV	4	3	4	11
UN	-	1	4	5
Total	109	36	59	214

AB: Agua Blanca, BA: Buenos Aires, CJ: Presa Casa de Janos, EA: El Águila, EC: El Cuervo, LB: La Báscula, LC: La Cal, MO: Mata Ortiz, MV: Monteverde, OS: Ojitos Sur, PP: Papalote San Pedro, PV: Pancho Villa; UN: El Uno Norte.

6.3.4 Cuellos de botella

Se realizó una prueba con BOTTLENECK considerando a todos los individuos en una población, con el fin de incrementar el poder estadístico de análisis. De manera global, el análisis detectó un cuello de botella reciente (Cuadro 14) bajo ambos modelos de mutación (TPM y SMM) con la prueba de significancia, la prueba de diferencias estandarizada y las pruebas de Wilcoxon con una cola y dos colas ($p_{TPM} = 0.0019$ y $p_{SMM} = 0.0026$; $p_{TPM} = 0.00001$ y $p_{SMM} = 0.0007$; $p_{TPM} = 0.0005$ y $p_{SMM} = 0.00098$, respectivamente). Los resultados sugieren que hay desviación del equilibrio mutación-deriva.

Por otra parte, al observar los niveles de significancia por locus se observaron diferencias entre modelos; bajo el modelo TPM los loci A101, A119, D1, D2 y D120 presentaron diferencias significativas entre la heterocigosidad esperada y la heterocigosidad en equilibrio, mientras que

bajo el modelo SMM fueron los loci D1, D2 y D120 en los que se observó esta diferencia (Cuadro 14). Los loci con diferencias consistentes bajo ambos modelos fueron el D1, el D2 y el D120, que a su vez tuvieron número de alelos bajo (2 y 3) y fueron los más afectados por el cuello de botella.

Cuadro 14. Estimación de cuello de botella recientes de acuerdo al modelo de mutación en dos fases (TPM) y al modelo de mutación paso a paso (SMM).

Locus	Observado			TPM				SMM			
	n	k_o	H_E	H_{eq}	d. e.	DH/sd	p	H_{eq}	d. e.	DH/sd	p
A2	320	4	0.616	0.460	0.168	0.932	0.186	0.563	0.115	0.465	0.387
A8	320	4	0.636	0.447	0.164	1.150	0.111	0.562	0.109	0.679	0.274
A101	320	3	0.605	0.330	0.183	1.500	0.037*	0.432	0.142	1.217	0.077
A104	320	4	0.638	0.455	0.166	1.107	0.118	0.561	0.115	0.672	0.275
A119	320	4	0.687	0.454	0.166	1.407	0.024*	0.559	0.116	1.104	0.082
C116	320	4	0.614	0.453	0.161	0.997	0.148	0.559	0.111	0.492	0.384
D1	320	3	0.641	0.341	0.185	1.621	0.025*	0.426	0.147	1.462	0.036*
D2	320	2	0.496	0.176	0.168	1.902	0.042*	0.195	0.17	1.775	0.04*
D115	320	4	0.621	0.459	0.167	0.965	0.166	0.556	0.116	0.554	0.349
D120	320	2	0.499	0.175	0.169	1.923	0.032*	0.191	0.172	1.787	0.044*

* $p < 0.05$; $n = 2N$, k_o = Número de alelos, H_E = Heterocigosidad esperada, H_{eq} = Heterocigosidad en equilibrio mutación-deriva, d. e. = desviación estándar, p = probabilidad de significancia.

7. Discusión.

Se han realizado gran cantidad de trabajos sobre la variabilidad genética de los perros de las praderas en colonias de Estados Unidos, (Cuadro 15). En México no se han realizado trabajos de genética poblacional con *Cynomys ludovicianus*, de manera que este es el primer trabajo que se realiza en su tipo. La finalidad de este estudio fue medir la variabilidad y estructuración genética de las colonias de perros llaneros de Janos y determinar el posible impacto que han tenido la fragmentación y pérdida de hábitat en éstas.

De los trabajos previos realizados con genética de perros llaneros, sólo uno utilizó microsatélites que fueron diseñados para un grupo hermano *Spermophilus* (Roach *et al.* 2001) y puede ser, hasta cierto punto, comparable con los resultados aquí obtenidos. Por otra parte, existe gran cantidad de trabajos realizados con otras especies de sciúridos en distintas partes del mundo (Cuadro 15), cuyos resultados también se pueden comparar con los actuales.

Con respecto a la variabilidad genética, se observó que el número de alelos registrados en Janos fue bajo. La evidencia en que se basa este hallazgo es que Jones *et al.* (2005), quienes elaboraron la caracterización de los microsatélites, reportan un número de alelos mayor. Asimismo, Roach y colaboradores (2001), quienes utilizaron microsatélites de *Spermophilus* en *C. ludovicianus*, encontraron mayor número de alelos y Ochoa-Hein (2008), obtuvo el mismo resultado, utilizando el microsatélite A8 diseñado por Jones *et al.* (2005) en el género hermano *Spermophilus*. Otro estudio que también encontró mayor número de alelos que el presente fue el realizado por Goossens *et al.* (2001) con marmotas en Francia.

Cabe señalar que al utilizar microsatélites no específicos, como en los trabajos de Roach *et al.* (2001) y Ochoa-Hein (2008), se espera encontrar menor número de alelos que cuando se utilizan para la especie que fueron diseñados (Selkoe y Toonen, 2006). Por lo anterior podemos

concluir que el número de alelos encontrados en nuestro sitio de estudio es bajo, aunque no tanto como el presente en poblaciones altamente fragmentadas y en peligro de extinción de la ardilla europea (*S. citellus*) en la República Checa (Hulová y Sedlacék, 2008). Aunque el bajo número de alelos puede ser señal de una reducción en la variabilidad genética por efecto de la fragmentación del hábitat, no se puede descartar que éste se deba a que el complejo de Janos - Casas Grandes representa la parte más sureña de la distribución de la especie, ya que se ha observado que en algunas especies las poblaciones periféricas presentan menor variabilidad genética (Eckert *et al.* 2008), por lo que alelos presentes en otros complejos no necesariamente se encontrarán aquí.

Evaluar el tamaño de la muestra es importante ya que algunos estimadores de la variabilidad genética, como la riqueza alélica, pueden presentar un sesgo que limita su utilidad para la genética de la conservación (Kalinowski, 2004). El análisis de rarefacción para la riqueza alélica indica que el tamaño de la muestra fue adecuado, ya que se encontró la misma tendencia respecto a la muestra y la riqueza alélica observada y esperada en cada colonia excepto El Uno Norte (UN), donde el número de alelos encontrados fue menor al esperado (Cuadro 6). Los resultados obtenidos para la colonia El Uno Norte (UN) pueden presentar un sesgo debido al bajo tamaño de muestra obtenido en esta población.

El modelo de mutación de piedra de paso, establece que cada vez que hay una mutación se pierde o gana una unidad de repetición del microsatélite (Hedrick, 2005); al no encontrar 3 alelos intermedios, podemos suponer que: a) hubo un error de amplificación; b) que los alelos se encuentran en muy baja frecuencia en la población y por esta razón no se encontraron en los individuos muestreados o; c) que estos alelos se perdieron por deriva génica o endogamia. La primera opción se puede descartar, ya que el análisis de alelos nulos no los encontró en estos loci, siendo más factibles las opciones b y c, que se ven reforzadas al confirmar que hay alelos con

frecuencias muy bajas en la población, situación que sugiere que éstos están en vías de fijación por efecto de la deriva génica. Las bajas frecuencias de estos alelos también se podrían relacionar con que alelos que han surgido recientemente por mutación se encontraran en frecuencias bajas en las poblaciones (Hedrick, 2005).

Las colonias de Janos se encontraron fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg debido a una deficiencia de heterócigos. Una desviación significativa del equilibrio sugiere que no se cumplen los supuestos de este modelo y que tanto la deriva génica como la endogamia están actuando en nuestra población. Los supuestos que se podrían romper en esta población es que al formar grupos familiares de varias hembras emparentadas y uno o dos machos no relacionados, el apareamiento no es aleatorio y la fragmentación del hábitat interrumpe el flujo génico e incrementa el aislamiento, aumentando el efecto de la endogamia y de la deriva génica en la población, produciendo así un exceso de homocigotos. Es necesario realizar análisis a nivel intracolonia para determinar si esto es lo que está sucediendo. Por otra parte, al conformar secciones dentro de las colonias y grupos familiares dentro de las secciones, es probable que la deficiencia de heterócigos observada se deba a efecto Wahlund producido por un error en el muestreo al no considerar la subestructura de las colonias en los análisis; sin embargo, el programa MICROCHECKER no detectó la presencia de éste en nuestras colonias. Para realizar un análisis que considere a los grupos familiares y que podría ayudarnos a determinar con mayor certeza la presencia de este efecto es necesario contar con información conductual referente a la conformación de los grupos familiares dentro de cada colonia.

Cuadro 15. Antecedentes en estudios de genética de poblaciones realizados con microsatélites en algunas especies de la familia Sciuridae.

Referencia	Especie	No. microsatélites	A	H_E	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
Goossens <i>et al.</i> 2001	<i>M. marmota</i>	5	4.2-6.3	0.6-0.8	0.05	0.19	0.14
Roach <i>et al.</i> 2001*	<i>C.</i> <i>ludovicianus</i>	7 [†]	3.0-5.1	0.4-0.7	0.02	0.13	0.12
*Jones <i>et al.</i> 2005	<i>C.</i> <i>ludovicianus</i>	14	3-11	0.4-1	---	---	---
Ochoa Hein, 2008	<i>S. perotensis</i>	1 [†]	5	0.6	0.34	0.43	0.14
Hulová y Sedláček, 2008	<i>S. citellus</i>	5	2.2 - 2.8	0.3	0.55-0.9	---	0.16
Presente estudio	<i>C.</i> <i>ludovicianus</i>	10	2-4	0.5	0.18	0.26	0.10

* Sitios con registro de *Yersinia pestis*. [†] Microsatélites inespecíficos. A = Alelos por locus; H_E = Heterocigosidad esperada; y coeficientes F (F_{IS} , F_{IT} y F_{ST}). * Caracterización de microsatélites de *C. ludovicianus*; H_0 en lugar de H_E .

Al comparar nuestros resultados con los publicados por otros autores, observamos que la heterocigosidad esperada o diversidad genética es menor en los perros llaneros en Janos que en Colorado (Roach *et al.*, 2001; Cuadro 15) y que la observada en otras especies de sciúridos como las marmotas de los Alpes Franceses (*M. marmota*, Goossens *et al.* 2001) y ardillas del Perote, México (*S. perotensis*, Ochoa-Hein, 2008). Estos resultados sugieren que la variabilidad genética es baja en el complejo en estudio; situación reforzada por el hecho de que la heterocigosidad esperada es menor que la máxima esperable de acuerdo al número de alelos encontrados ($H_{MAX} = 0.97$; Cuadro 6).

Por otra parte, la diversidad genética encontrada en este estudio ($H_E = 0.5$) es mayor a la reportada para especies de mamíferos en grave peligro de extinción y que han atravesado cuellos de botella severos como la ardilla de tierra europea (*S. citellus*, $H_E = 0.33$; Hulová y Sedláček, 2008), el guepardo (*A. jubatus*, $H_E = 0.39$; Maudet *et al.* 2002), el lobo mexicano (*C. lupus baileyi*, $H_E = 0.13$; Maudet *et al.* 2002) y el león asiático (*P. leo persica*, $H_E = 0.15$; Maudet *et al.* 2002). Los resultados sugieren que aunque hay una disminución en la variabilidad genética, la

situación no es tan grave como la de otras especies importantes en términos de conservación. Al tomar medidas de manejo como la reubicación de individuos, podremos aumentar la variabilidad en pocas generaciones (Frankham, 2005), aunque es necesario realizar simulaciones que permitan determinar el número de individuos a introducir a la población para alcanzar los niveles de variabilidad deseados y evitar la depresión por exogamia. Además, se debe considerar que la introducción de hembras dentro de una colonia puede resultar en la pérdida rápida de la diversidad genética al romper la influencia de la estructura genética de los grupos familiares sobre la distribución de los alelos en la colonia (Dobson *et al.* 2004).

Los resultados sugieren que la variabilidad genética se ha visto afectada por un cuello de botella. La teoría señala que una reducción drástica del tamaño poblacional ocasiona la pérdida de los alelos raros y modifica la manera que éstos se distribuyen entre las poblaciones. La deriva génica, cuando hay un cuello de botella, provoca cambios aleatorios en las frecuencias alélicas de una generación a la siguiente, promueve la pérdida de variabilidad genética y la fijación de alelos en las poblaciones, e incrementa la diversificación entre poblaciones réplica provenientes de la misma población ancestral. El efecto de la endogamia produce una reducción de la heterocigosidad, una disminución en el éxito reproductivo y la sobrevivencia, y un incremento en el riesgo de extinción (Frankham *et al.* 2005).

Al analizar los resultados considerando a las colonias de manera independiente, se observaron diferencias en cuanto a la pérdida de variabilidad genética y el efecto de la fragmentación del hábitat en ellas. La colonia de este complejo con menor diversidad genética (H_E ; Cuadro 5) fue El Uno Norte (UN), y es, probablemente, la que tiene mayor riesgo de extinción. Las colonias Agua Blanca (AB), Presa Casa de Janos (CJ) y La Cal (LC) también presentaron baja variabilidad genética e índices de endogamia significativos, por lo cual también pueden presentar riesgo de extinción. La colonia El Cuervo (EC), que era la más grande

conocida hasta 1988 y es la más grande del complejo en la actualidad, contuvo mayor variabilidad genética que el resto de las colonias estudiadas; situación que sugiere que ésta se ha mantenido sana a pesar de la disminución poblacional ocasionada por los efectos combinados de la sequía de los últimos años, la expansión de la agricultura y el manejo ganadero. El Cuervo representa un reservorio de la variabilidad del complejo y como tal se deben tomar medidas para su protección. Otras colonias con alta variabilidad genética son el Papalote San Pedro (PP), que fue una de las colonias más pequeñas muestreadas, y El Águila (EA), que se encuentra en riesgo de desaparecer debido al establecimiento de nuevas zonas de cultivo en el área.

Los valores del coeficiente de endogamia (F_{IS}) indicaron su presencia en la mayoría de las colonias del complejo, aunque ésta es menor a la reportada para dos especies de *Spermophilus* (Goossens *et al.* 2001; Ochoa-Hein, 2008). Al respecto, Chesser (1983) sugiere que los altos niveles de F_{IS} indican niveles altos de endogamia entre las secciones de la colonia, sin embargo, la organización social de los perros llaneros tiene efectos dramáticos en la distribución de los genotipos dentro de una población, ya que al conformar grupos familiares hay estructuración hacia el interior de la colonia, y los altos valores de F_{IS} pueden ser reflejo de las relaciones de parentesco entre los miembros de los grupos familiares y no del apareamiento entre parientes cercanos (Chesser, 1983; Goossens *et al.*, 2001). No se puede descartar que los altos valores de endogamia en la población sean reflejo directo del resultado de la fragmentación del hábitat, y la consecuente disminución del tamaño poblacional en las colonias, así como de algún cuello de botella, ya que Roach *et al.* (2001) encontraron niveles de endogamia mucho menores que los registrados en Janos.

Los niveles altos de endogamia se han relacionado con disminución en la variabilidad genética, factor que incrementa el riesgo de extinción (Frankham *et al.* 2005; Hulová y Sedláček, 2008). Así mismo, los valores altos de F_{IS} se relacionan con depresión por endogamia que

disminuye la fecundidad y sobrevivencia de individuos adultos, que afecta la tasa de crecimiento poblacional e incrementa la probabilidad de extinción por eventos estocásticos (Goodman, 1987; Saccheri *et al.* 1998; Madsen *et al.* 1998; O'Grady *et al.* 2006; Hulová y Sedláček, 2008).

El análisis de diferenciación genética obtenida a partir de R_{ST} pareadas obtuvo un rango que va de baja a alta diferenciación genética entre colonias (Cuadro 7), con valores significativos en la mayoría de las comparaciones, siendo El Cuervo (EC) la colonia que presentó el mayor número de relaciones no significativas y Pancho Villa (PV) y El Uno Norte (UN) las que presentaron los valores más altos de diferenciación genética. Se ha observado que la deriva génica en poblaciones pequeñas tiene el efecto de promover una rápida diferenciación entre poblaciones (Frankham *et al.* 2005; Hedrick, 2005); sin embargo, al analizar estos resultados, no se puede descartar una posible sobreestimación debida a las diferencias en el tamaño de la muestra de cada colonia, que va de 6 a 22 individuos. Hulová y Sedláček (2008) reportaron que se pueden observar altos niveles de diferenciación en sitios donde el hábitat nunca ha sido continuo y las poblaciones son reminiscencias de eventos discretos de colonización en el pasado; bajo este supuesto, se observaría una fuerte relación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas. Como se discute más adelante, en Janos no se encontró relación entre las distancias genéticas y las distancia geográfica, lo cual se puede relacionar con que ésta era una población panmíctica que se ha fragmentado debido a las actividades humanas, de manera que la diferenciación genética se debe a la distribución aleatoria de los alelos en los fragmentos y al efecto de la deriva génica que causa rápida diferenciación.

Por otra parte, en el dendograma realizado con la distancia genética de Nei se observó que los soportes de las ramas no fueron robustos (Fig. 6), por lo que se puede concluir que el patrón que sigue la estructuración no es claro. Al presentarse fragmentación del hábitat reciente no será posible identificar un patrón de diferenciación genética, ya que, aunque la diferenciación genética

es rápida, los alelos quedan distribuidos al azar en las poblaciones (Frankham *et al.* 2005; Hedrick, 2005).

En este estudio se encontraron niveles de diferenciación genética significativos, así como, alto flujo génico entre colonias obtenido por medio de dos métodos distintos. El flujo génico se considera un factor primordial en el mantenimiento de la variabilidad genética, porque tiene el potencial de homogenizar las poblaciones y minimizar los efectos de la deriva génica y la endogamia, es decir, reduce el impacto de la fragmentación del hábitat (Frankham *et al.* 2005; Hedrick, 2005). Los altos niveles de flujo génico deberían disminuir los valores del coeficiente de diferenciación; al respecto, se observa que la regla de Wright de que un migrante por generación es el mínimo sugerido para mantener una estructura homogénea, así como, los supuestos de este modelo (poblaciones del mismo tamaño y tasa de migración constante entre subpoblaciones) rara vez se cumplen en la naturaleza (Whitlock y McCauley, 1999), de manera que otros autores han sugerido que se requieren entre alrededor de 5 y más de 10 migrantes por generación para evitar la diferenciación (Frankham *et al.* 2005).

Es importante considerar que puede haber un sesgo en los resultados ya que los análisis de flujo génico realizados no consideran modelos como el de metapoblaciones, en el que éste no es unidireccional (Whitlock y McCauley, 1999; Frankham *et al.* 2005), como se ha reportado en colonias de perros llaneros que están aisladas espacialmente y genéticamente diferenciadas, en las que la dispersión continúa después de la colonización inicial sin que se pierda la diferenciación y presentan una dinámica de metapoblación – extinción y recolonización continua (Roach *et al.* 2001). Se puede considerar la posibilidad del sesgo, ya que las colonias que no se muestrearon pueden funcionar como piedras de paso, pues se encuentran a una distancia intermedia entre dos colonias lejanas y mantienen el flujo génico entre ellas. En el caso de las colonias que aparecen aisladas geográficamente en el mapa (Fig. 3): pueden existir pequeñas colonias que no fueron

detectadas durante el mapeo del sitio y mantienen un flujo génico continuo hacia ellas, pueden presentar tamaños efectivos grandes o el tiempo de aislamiento no ha sido suficiente para que nuestro análisis lo detecte.

Por otra parte, se debe recordar que los estimados de flujo génico representan un promedio a través de un periodo de tiempo, y los valores reflejan tasas evolutivas históricas (Beerli y Felsenstein, 1999; Frankham *et al.* 2005), de manera que es probable que el alto número de migrantes arrojados por el programa MIGRATE-N se refiera a los patrones históricos de flujo génico en lugar de la situación actual de las colonias. También es importante señalar que algunos factores que pueden ocasionar un incremento en la varianza y la sobreestimación de los valores (Beerli y Felsenstein, 1999), son la presencia de poblaciones fantasma (Slatkin, 2005), las diferencias en el tamaño de la muestra entre colonias, y que el cálculo está basado en la tasa de mutación ($\Theta = 4Ne\mu$), que para microsatélites es muy alta (10^{-3}) y varía entre loci (Väli *et al.* 2008). Para resolver esta incógnita es necesario realizar análisis con otros marcadores moleculares, como la región control del ADN mitocondrial que permite rastrear linajes femeninos, identificar patrones de migración históricos, así como diferencias entre la dispersión de machos y hembras, detectar señales de expansión poblacional histórica y el número efectivo de hembras (Frankham *et al.* 2005).

La alta proporción de número de migrantes puede relacionarse con que se están comparando tasas de migración históricas con tamaños poblacionales actuales. Si se considera que algunas colonias, que antes constituían una unidad, son producto de la fragmentación del hábitat y que los tamaños poblacionales históricos eran de miles o cientos de miles se puede concluir que los resultados reflejan que el complejo era una población panmíctica constituida por colonias de gran tamaño conectadas por medio de flujo génico continuo.

Por otra parte, se realizó una prueba de aislamiento por distancia y no se encontró correlación entre la diferenciación genética y la distancia geográfica entre las colonias ($r = -0.189$; $p = 0.096$; Fig. 7). Chesser (1983) tampoco encontró esta correlación en un complejo de perros llaneros de Nuevo México, así como Hulová y Sedláček (2008) no la encontraron en ardillas de tierra europeas. Estos autores señalan que la falta de correlación se debe a que la deriva génica actúa de manera independiente en cada subpoblación debido a la fragmentación y pérdida de hábitat, acompañadas de falta de flujo génico (Chesser, 1983; Hulová y Sedláček, 2008), es decir, al impacto de la deriva génica en poblaciones finitas (Frankham *et al.* 2005).

El cálculo de flujo génico se basa en el modelo de islas (Wright, 1969), en el que se espera que las islas o parches de hábitat distantes reciban menor número de migrantes que las islas o parches cercanos, de manera que la variabilidad decrecerá con respecto a la distancia del continente, y el efecto dependerá de la naturaleza de la matriz circundante y su influencia en las tasas de dispersión (Frankham *et al.* 2005); sin embargo, en metapoblaciones el efecto en la endogamia y la variabilidad genética difiere del modelo de islas, ya que en éstas la pérdida de variabilidad depende de las tasas de extinción y recolonización, así como de la estructura poblacional (Frankham *et al.* 2005). Algunos autores sugieren que los complejos de perros llaneros tienen una dinámica metapoblacional (Roach *et al.* 2001; Antolin *et al.* 2006; Slobodchikoff *et al.* 2009).

Por otro lado, Wlasiuk *et al.* (2003) sugieren que para especies con dispersión restringida, la falta de aislamiento por distancia puede ser señal de falta de equilibrio e indica una expansión poblacional reciente. La historia reciente de este complejo sugiere que la falta de aislamiento por distancia es consecuencia de la fragmentación del hábitat y por lo tanto de efecto fundador y cuellos de botella, y aparentemente no de una expansión poblacional.

En este sitio, donde el tamaño de las colonias varía en más de un orden de magnitud, no se encontró correlación entre los valores de heterocigosidad esperada y el coeficiente de endogamia con el tamaño de la colonia ($r = 0.48$, $p = 0.094$, Fig. 8a y $r = 0.302$, $p = 0.31$, Fig. 8b), pero observamos una tendencia en ambas correlaciones, que se ajusta a lo establecido por la teoría que predice que los fragmentos más pequeños son más propensos a la extinción por efecto de la depresión por endogamia y la deriva génica (Frankham, 1997; Frankham *et al.* 2005; O'Grady *et al.* 2006). Sin embargo, en Janos la fragmentación del hábitat es reciente, ya que el registro del efecto de las actividades antropogénicas de 1988 a 2000 (Marcé, 2001) señala que hubo cambios importantes en la presencia, el tamaño, la conectividad y la composición de las colonias del complejo durante ese período; lo cual sugiere que estas fuerzas evolutivas no han tenido tiempo suficiente para que se muestre una tendencia significativa.

Los análisis AMOVA y SAMOVA (Cuadro 10 y 11), que establecen como se encuentra distribuida la variación en diferentes niveles jerárquicos y nos dan una idea de cómo actúan la deriva génica y la endogamia en la conformación de ésta, determinaron que la variación se encuentra repartida en mayor medida entre los individuos con respecto a la población total; resultados que sugieren que la variabilidad genética que queda en la población se encuentra repartida de manera aleatoria en las colonias. Al respecto, Chesser (1983) reportó la misma distribución de la varianza genética en perros llaneros de Nuevo México, y concluyó que ésta se puede atribuir a que la organización social de los perros llaneros en unidades familiares dentro de secciones en las colonias permite que se minimice la endogamia y favorezca la exogamia (Foltz y Hoogland, 1983; Dobson *et al.* 1997) dentro de los grupos familiares, aunque en apariencia la endogamia sea alta debido al efecto Wahlund. Para que se maximice la exogamia es necesario que haya conectividad entre las colonias y las secciones que las componen, algo que se ha perdido en algunas colonias del complejo de Janos – Casas Grandes debido a la fragmentación y

pérdida del hábitat, y que se ve reflejado en el papel que juegan la endogamia y deriva génica en él; podemos promover este proceso e incrementar la variabilidad en las colonias al incrementar la conectividad entre ellas, permitiendo así el intercambio de alelos. También se observó estructuración significativa en la población, aunque ésta es menor que la hallada en otras ardillas (Cuadro 15) y al promedio reportado para mamíferos (0.24; Frankham *et al.* 2005). El valor de F_{ST} mide el impacto de la división en subpoblaciones y, por lo tanto, la reducción en la heterocigosidad causada por la deriva génica (Hulová y Sedláček, 2008), de manera que se puede ver que tanto endogamia como deriva génica tienen un papel importante en la distribución de la variabilidad genética de los perros llaneros. Estos resultados se relacionan con la historia reciente de fragmentación del hábitat resultante de las actividades antropogénicas, ya que se ha observado que en poblaciones fragmentadas las subpoblaciones están altamente estructuradas y el efecto de la deriva génica y la endogamia es más dramático (Goossens *et al.* 2001; Frankham *et al.* 2005; Hedrick, 2005; Hulová y Sedláček, 2008).

Por otra parte, al considerar la distribución espacial, y separar 3 colonias del resto del complejo (CJ, LC y UN), se observó un incremento en el valor de la estructuración genética, es decir que el papel de la deriva génica se volvió más fuerte con respecto a la endogamia. Estas colonias tienen en común un alto índice de endogamia y baja diversidad genética. Relacionado con esto, se sabe que al menos La Cal (LC) y El Uno Norte (UN) comparten una historia de fragmentación por envenenamiento y sequía (Marcé, 2001; List *et al.* 2003), y que Presa Casa de Janos (CJ) es una colonia que se encuentra aislada geográficamente y pudo crecer a partir de pocos individuos (Fig. 3); factores que, como predice la teoría respecto a poblaciones pequeñas (Frankham *et al.* 2005), inciden en un mayor efecto de las fuerzas evolutivas en estas tres colonias que en el resto del complejo.

Las barreras genéticas determinadas por SAMOVA, y que separan estas tres colonias, se pueden explicar, por una parte, porque el mezquite (*Prosopis sp.*) y el popotillo (*Ephedra sp.*) que rodean a las colonias pueden representar una barrera al flujo génico en estas poblaciones, ya que se ha observado que la dispersión ocurre principalmente entre grupos familiares dentro de una colonia y que los perros llaneros requieren de un ecosistema abierto para protegerse de sus depredadores y dispersarse entre colonias (Hoogland, 1996; Roach *et al.* 2001). Además, en caso de ocurrir la dispersión entre colonias, la densidad de depredadores como el coyote es mayor en áreas con mezquite (List, 1997) y la probabilidad de establecerse en un nuevo grupo familiar al alcanzar otra colonia es baja. Se ha registrado que el porcentaje de individuos que se dispersan de manera exitosa es de sólo entre el 1% y el 3% (Hoogland, 1996). Sin embargo, es necesario resaltar que existen otras colonias rodeadas de mezquite que no están genéticamente diferenciadas y que los análisis de flujo génico no coinciden con esta historia.

Por otra parte, es más probable que la diferenciación de estas colonias se deba a efecto fundador o a un cuello de botella, pues como se mencionó con anterioridad, al menos La Cal (LC) y El Uno Norte (UN) son colonias que estuvieron sujetas a envenenamiento constante durante el periodo de 1988 a 1996 (Marcé, 2001); además se tiene registro de que La Cal es una colonia resultante de la fragmentación del hábitat, y por tanto atravesó un cuello de botella, mientras que El Uno Norte es una recolonización que presenta efecto fundador (Marcé, 2001). Como se aprecia en la figura 3, estas colonias se encuentran muy cercanas geográficamente lo que sugiere que pueden provenir de la misma población fuente ancestral, y que la alta diferenciación entre ellas con respecto al resto de las colonias, se debe al efecto fundador y cuello de botella ocurrido en ellas, lo cual también explicaría la baja variabilidad genética encontrada en El Uno Norte (UN). Desafortunadamente, no se cuenta con información referente a la historia de la colonia Presa Casa de Janos (CJ), aunque, como se observa en el mapa de las colonias (Fig. 3),

ésta se encuentra aislada geográficamente al estar ubicada en un valle localizado en las faldas de la Sierra Madre Occidental y podemos atrevernos a sugerir que esta colonia también pudo verse afectada por efecto fundador.

Existe la posibilidad de que la diferenciación de estas colonias del resto del complejo se deba a que éste representaba una distribución continua que se fragmentó como consecuencia de las actividades antropogénicas. Al extinguirse las colonias que las conectaban, éstas quedaron aisladas. Marcé (2001) reporta que las colonias más afectadas por la fragmentación del hábitat en el periodo 1987 - 1996 fueron aquellas localizadas en la parte central del complejo, sitio en el que se encuentran La Cal (LC) y El Uno Norte (UN).

Al comparar nuestros resultados con otros estudios realizados con perros llaneros, se observa que el valor de estructuración calculado por Roach *et al.* (2001) no es estadísticamente distinto al encontrado en Chihuahua ($t_{\text{obs}} = 0.033$; $t_{(1; 0.05)} = 12.7$), mientras que el reportado por Chesser (1983), calculado a partir de aloenzimas, es igual al del presente estudio ($F_{ST} = 0.103$). La similitud entre los valores de estructuración genética entre sitios puede relacionarse con el comportamiento filopátrico de las hembras y de dispersión de los machos, así como con la escala del estudio y con la distancia entre las colonias de cada complejo (Antolin *et al.* 2006).

Los valores de los coeficientes de endogamia (F_{IS} y F_{IT}) son menores en Colorado (0.02 y 0.13; Roach *et al.* 2001) y mayores en Nuevo México ($F_{IS} = 0.32$ y $F_{IT} = 0.4$; Chesser, 1983) con respecto a los calculados para Chihuahua (0.18 y 0.24; Cuadro 15). Estas diferencias pueden relacionarse con la conectividad entre las colonias, el período que ha pasado desde la fragmentación y la dinámica de la metapoblación (Antolin *et al.* 2006), ya que en Colorado, a pesar de que las colonias son más pequeñas, la endogamia es baja debido a la alta conectividad entre ellas; así mismo, el complejo de Colorado se encuentra en la parte central de la distribución histórica por lo que es posible que la variabilidad genética inicial en este sitio fuese mayor que la

de Nuevo México y Chihuahua. Además, la presencia de peste en el complejo de Colorado puede ser responsable de una dinámica de metapoblación - extinción y recolonización constante – más pronunciada, que afecta a la distribución de la variación y la estructura genética de la población, así como el efecto de la endogamia en ella (Hedrick, 2005). Las colonias de perros llaneros pequeñas y aisladas tienen menor probabilidad de persistir que las colonias grandes cuando no hay peste; sin embargo, cuando *Yersinia pestis* está presente se reduce la persistencia de colonias grandes y pequeñas de igual manera (Lomolino y Smith, 2001). En contraste, las colonias encontradas en Janos y Nuevo México (Chesser, 1983) tienen una dinámica que depende de la disponibilidad de recursos más que de la presencia de enfermedades, en donde las colonias se han extinguido por acción antropogénica, y la transformación del hábitat ha sido tal que la recolonización de algunos sitios es prácticamente imposible (Marcé, 2001); situación que produce una estructura genética distinta a la observada en sitios donde está presente *Y. pestis*, como Colorado y Montana, y la presión antropogénica es menor. El comportamiento de la variabilidad genética en metapoblaciones depende de aspectos que se ven afectados por la fragmentación del hábitat como el número de individuos fundadores, la capacidad de dispersión de la especie, la conectividad entre poblaciones y la tasa de recambio de poblaciones (Harrison y Hastings, 1996), que en perros llaneros se ve gravemente afectada por la presencia de epidemias (Lomolino y Smith, 2001; Antolin *et al.* 2006).

Por otra parte, el análisis de asignación de individuos realizado con STRUCTURE, distribuyó a los individuos en dos grupos. El grupo 1 estuvo conformado, en su mayoría, por los individuos pertenecientes a Presa Casa de Janos (CJ), La Cal (LC) y El Uno Norte (UN), mientras que el grupo 2 estuvo configurado, en mayor medida, por individuos entremezclados; esto sugiere que el complejo funciona como una unidad genética y que la diferenciación observada entre colonias puede descartarse al realizar planes de manejo, de manera que las

colonias grandes puedan funcionar como poblaciones fuente para la reubicación de individuos hacia las pequeñas, aunque es importante considerar que si no se realizan simulaciones que consideren la estructura social de la especie, la suplementación de individuos puede causar depresión por exogamia (Dobson *et al.* 2004; Frankham *et al.* 2005). Los valores de estructuración entre los dos grupos fueron muy distintos; por un lado, la baja estructuración en el grupo 2 puede ser resultado de flujo génico entre las colonias y la conectividad previa a la fragmentación del hábitat, mientras que la moderada estructuración observada en el grupo 1 se puede explicar porque la presión de la deriva génica y la endogamia ha deteriorado la variabilidad genética en estas 3 colonias debido a sus historias individuales.

Los análisis de estructura genética señalan la presencia de endogamia y deriva génica en el complejo, que puede deberse a la fragmentación y pérdida del hábitat; sin embargo, se debe considerar que los patrones de estructuración histórica en las poblaciones, también, pueden tener un marcado efecto en la distribución de la variabilidad genética actual de manera que la diferenciación observada puede ser resultado de aislamiento a largo plazo, en lugar de fragmentación del hábitat reciente (Cunningham y Moritz, 1998) o de la combinación de procesos actuales e históricos, como la estructuración inherente a la organización social de los perros llaneros, la presencia de un cuello de botella y la fragmentación del hábitat ocasionada por las actividades antropogénicas. Para discernir entre los patrones actuales e históricos de colonización y flujo génico que pueden explicar la estructura genética del complejo, es necesario realizar análisis con otros marcadores moleculares, como la región control de ADN mitocondrial que permite rastrear linajes femeninos e identificar patrones de migración y dispersión históricos (Frankham *et al.* 2005), así como otros marcadores nucleares como los SNP (Single Nucleotide Polymorphism) que permiten una estimación más fina de la diversidad genética (Väli *et al.* 2008).

El análisis de parentesco detectó que sólo el 21% de las relaciones de parentesco posibles son significativas (Anexo 6) y que la relación de parentesco que se presentó con mayor frecuencia fue la de medios-hermanos (Cuadro 13). La alta proporción de medios hermanos es consistente con el sistema de apareamiento de los perros llaneros (Hoogland, 1996), mientras que la baja frecuencia de la relación de hermanos se puede deber a que no se capturó a todas las crías de cada cuadrante. En la colonia con menor variabilidad genética (El Uno Norte) sólo se detectaron relaciones de padre-cría lo que sugiere que en ella la endogamia es alta; idea reforzada por el alto índice de endogamia presente en esta colonia; o bien, los seis individuos capturados pertenecían a un solo grupo familiar.

El bajo número de alelos y su distribución en las colonias, los valores de heterocigosidad esperada y los valores de varianza molecular sugieren que aunque hay pocos alelos en la población, éstos se encuentran distribuidos al azar en los individuos. Estos resultados son consistentes con la presencia de un cuello de botella reciente, que además se comprobó por medio del análisis BOTTLENECK (Cuadro 14). El resultado arrojado por este programa puede relacionarse, también, con evento fundador, el cual tiene un efecto en la variabilidad genética igual al de los cuellos de botella; lo que apoya la idea de un origen relativamente reciente del complejo de perros llaneros de Janos - Casas Grandes producto de una expansión poblacional ocurrida como consecuencia de la expansión ganadera y acompañante sobrepastoreo que a fines del siglo XIX permitió a la especie colonizar nuevas áreas (Truett *et al.* en prensa).

Es necesario realizar acciones de manejo que permitan recuperar a las especies que han pasado por cuellos de botella, como es el caso de los perros llaneros, ya que éstos generan una reducción en la diversidad genética, altos niveles de endogamia y baja adecuación reproductiva, que comprometen la habilidad de las poblaciones para enfrentar los cambios ambientales y reducen su probabilidad de persistencia a largo plazo (Frankham *et al.* 2005), es decir,

incrementan su riesgo de extinción por eventos estocásticos (Newman y Pilson, 1997). El efecto de los cuellos de botella se relaciona con su magnitud y la historia evolutiva y demográfica de la especie (Busch *et al.* 2007).

Los resultados coinciden con la historia de este complejo, una población continua que se ha fragmentado recientemente debido al manejo ganadero, el sobrepastoreo, la expansión de la frontera agrícola y el crecimiento de la población local (Marcé, 2001), actividades que fomentan el avance del mezquite y la pérdida del pastizal. Además, las colonias han sido afectadas por la limitación de recursos a causa de la sequía, que en 2006 fue tan fuerte que no se produjeron crías (Rivera Téllez, 2009) y por cuellos de botella recientes que inciden directamente en la variabilidad genética de las poblaciones, particularmente en su riqueza alélica (Williams *et al.* 2003). El efecto de estos factores ha actuado de manera distinta en cada colonia del complejo dependiendo de su grado de perturbación y aislamiento.

La fragmentación del hábitat es reciente y las señales de pérdida de variabilidad genética que se observan son, todavía, débiles; por lo que es necesario realizar acciones de manejo, como mantener la conexión entre colonias por medio de corredores de dispersión, promover la recolonización de áreas en las que antes había perros llaneros y suplementar las colonias existentes, de manera que disminuya y se remedie la pérdida de variabilidad genética observada hasta el momento.

Aunque la conservación del complejo como conjunto es muy importante, debemos resaltar que la colonia El Cuervo representa un reservorio importante de variabilidad genética y puede funcionar como población fuente para la reubicación de individuos, por lo que se deben destinar recursos y esfuerzo a su protección. La reubicación de individuos provenientes de El Cuervo a aquellas colonias con altos índices de endogamia y baja heterocigosidad, como El Uno Norte, Agua Blanca, Presa Casa de Janos y La Cal, podría ser una medida a considerar para

incrementar la variabilidad genética de estas colonias y asegurar su persistencia; sin embargo, se deben realizar análisis por medio de simulaciones que consideren la estructura familiar de los perros llaneros y permitan determinar la cantidad de individuos que es necesario reubicar, así como, en qué proporción sexual y cada cuantas generaciones, para incrementar así la variabilidad genética en las colonias en las que se ha perdido.

Este trabajo provee valiosa información complementaria para los esfuerzos de conservación y manejo de los perros llaneros y su ecosistema, que se están llevando a cabo en la región.

8. Conclusiones

La fragmentación y pérdida de hábitat se han identificado como las causas principales de la crisis de extinción actual (Myers, 1997; Frankham *et al.* 2005). La pérdida de variabilidad genética es uno de los resultados negativos de estos procesos que disminuye el potencial evolutivo de las poblaciones e incrementa su probabilidad de extinción. Al respecto, sabemos que una de las especies que se ha visto afectada por la fragmentación del hábitat es el perro de las praderas (*Cynomys ludovicianus*), que además de ser especie clave e ingeniero del ecosistema, son pilares para la permanencia de los pastizales de Norteamérica. Por lo anterior, evaluar el posible efecto que ha tenido la fragmentación del hábitat sobre las colonias que habitan, en cuanto a tamaño y distancia entre ellas es importante para la conservación y el objetivo del presente estudio. Una aproximación a la evaluación del efecto de la fragmentación del hábitat es la descripción de los niveles de variabilidad genética y estructuración en las poblaciones, al respecto encontramos que:

- La variabilidad genética de los perros llaneros del complejo Janos - Casas Grandes es baja con respecto a lo observado en otras especies de sciúridos, aunque mayor al encontrado en especies que han atravesado cuellos de botella severos.
- El período en el que ha actuado la deriva génica en cada una de las colonias no ha sido suficiente para que se fijen alelos de forma diferencial entre ellas, por lo que la variabilidad genética se encuentra distribuida de manera aleatoria en el complejo, aunque la distribución de la varianza genética evidencia la pérdida de variación como consecuencia de la acción de la deriva génica.
- La reducción de la conectividad entre colonias, la pérdida y fragmentación del hábitat y la presencia de un cuello de botella han promovido la pérdida de variabilidad genética debido al

apareamiento entre individuos emparentados, como lo evidencian los coeficientes de endogamia significativos en la mayoría de las colonias.

- Ni la distancia entre colonias, ni su tamaño permiten predecir los niveles de variabilidad genética que se encontrarán en ellas, ni el impacto de las actividades antropogénicas, ya que factores como la conectividad, la edad y la historia particular de cada sitio también son importantes en la distribución de la variabilidad.
- En términos de manejo y conservación se debe considerar que el complejo constituye una unidad genética y la fragmentación del hábitat es relativamente reciente.

Los resultados coinciden con que la fragmentación del complejo Janos - Casas Grandes es muy reciente, de manera que su efecto en la pérdida de la variabilidad genética de los perros llaneros es todavía débil. Sin embargo, detectamos una tendencia hacia la disminución de la variabilidad, así como presencia de endogamia y estructuración entre colonias, por lo que es necesario proteger y manejar a las colonias que conforman el complejo para mantener una población genéticamente sana que pueda permanecer en nuestros pastizales a largo plazo.

Conservación

La protección de los perros llaneros (*Cynomys* sp.), al tratarse de una especie clave e ingenieros de ecosistemas, es una estrategia necesaria para la permanencia y recuperación de los pastizales de Norteamérica y de las especies amenazadas y en peligro de extinción asociadas a ellos. Por lo tanto, es necesario elaborar programas de manejo que incrementen la variabilidad genética de las colonias y la conectividad entre ellas.

Por un lado, la colonia El Cuervo, al ser la colonia con mayor número de alelos y mayor variabilidad genética, representa un reservorio de diversidad, de manera que si queremos

mantener la variabilidad en el complejo es necesario protegerla. Además, para preservar el único alelo que no se encontró en El Cuervo es necesario manejar La Báscula y La Cal, de manera que éste permanezca en la población. Así mismo, algunos alelos se encuentran en baja frecuencia en El Cuervo, y para asegurar su permanencia se deben destinar esfuerzos para la conservación de las colonias Presa Casa de Janos, Monteverde y El Águila. El presente trabajo sugiere que debido a la acelerada conversión agrícola sobre las colonias de perros llaneros en Janos, es necesario llevar a cabo reubicaciones en breve, especialmente, entre las colonias en los que se encuentran aquellos alelos que se presentan en baja frecuencia para evitar su desaparición. Asimismo, es necesario resaltar la importancia de llevar a cabo acciones inmediatas en la colonia El Águila, que está en grave riesgo de desaparecer debido a su tamaño y a los intentos constantes para establecer áreas de cultivo en el área.

Por otra parte, el re-establecimiento de la variabilidad genética en aquellas colonias que se han visto más afectadas por la fragmentación del hábitat puede realizarse por medio de manejo, como la reubicación de individuos y el incremento de la conectividad de las colonias. La reubicación de individuos se puede realizar llevando individuos de las colonias que presentan mayor número de alelos y mayor heterocigosidad, como El Cuervo, a aquellas colonias que son más susceptibles a la extinción ya que presentan valores de variación bajos, fijación de alelos e índices de endogamia altos, como El Uno Norte, La Cal, Agua Blanca y Presa Casa de Janos.

Es necesario el re-establecimiento de la conectividad de las colonias al promover la recolonización de aquellas áreas que han sido transformadas, y así, impulsar el flujo génico entre ellas. Las colonias El Uno Norte y La Cal podrían beneficiarse con esta medida de manejo al incrementar el flujo génico con colonias cercanas como La Báscula y el Papalote San Pedro que tienen buenos valores de variabilidad genética. Un impacto adicional que tendría esta medida es

la recuperación del pastizal que se ha perdido debido al cambio en el uso de suelo y el avance del mezquite.

Finalmente, antes de realizar medidas de manejo como la reubicación de individuos, es necesario realizar simulaciones que consideren la estructura social de los perros llaneros y permitan conocer cuántos, en qué proporción sexual y cada cuándo es necesario realizar la reubicación para elevar los niveles de variabilidad genética en aquellas colonias en las que se encuentra disminuida y evitar la depresión por exogamia que puede ocurrir si las colonias se vuelven demasiado homogéneas. También se debe incorporar la evaluación del impacto de las medidas de manejo tomadas para determinar si son exitosas y en caso necesario realizar las modificaciones pertinentes para mejorarlas.

9. Perspectivas

Esta sección tiene como finalidad proponer líneas de investigación que se pueden seguir para responder las incógnitas que nos deja el presente trabajo.

- 1) Es relevante realizar un estudio que integre a todos los complejos de Norteamérica, utilizando el mismo marcador molecular para evaluar la distribución de la variabilidad genética a lo largo de la distribución de la especie.
- 2) Es necesario realizar un estudio comparativo entre muestras de museo y actuales que proporcione información respecto a la magnitud del cuello botella causado por la devastación de los pastizales de Norteamérica y la capacidad de recuperación de esta especie.
- 3) Se deben realizar análisis de ADN mitocondrial que permitiría determinar los procesos históricos que han afectado la conformación actual de la variabilidad en ésta y otras poblaciones de perros llaneros.
- 4) Es importante establecer una relación entre datos demográficos y de variabilidad genética para determinar el efecto de la pérdida de variabilidad genética en la adecuación de nuestra población y evaluar la probabilidad de permanencia de cada colonia en corto, mediano y largo plazo.
- 5) Es relevante realizar estudios de adecuación que permitirán identificar, con mayor confianza, aquellas colonias más susceptibles a la extinción por efecto de depresión por endogamia y desarrollar estrategias de manejo adecuadas para su recuperación.
- 6) Finalmente, es necesario relacionar los datos de variabilidad genética y demografía con aspectos como la conformación de la comunidad vegetal en cada colonia, su productividad primaria y el tipo de suelo, así como con el impacto del sobrepastoreo y la agricultura, que permitan comprender con mayor profundidad la interrelación entre los perros y su entorno.

10. Referencias

- Abarca-García, CA y A López-Villalobos. 2007. La estimación de la endogamia y la relación entre la tasa de fecundación cruzada y los sistemas reproductivos en plantas con flores: Una interpretación de su significado evolutivo. Pp: 183- 213 en Eguiarte, LE, V Souza y X Aguirre (comp) *Ecología molecular*. SEMARNAT, INE, UNAM y CONABIO, México D.F., México
- Aguirre-Planter, E. 2007. Flujo Génico: Métodos para estimarlo y marcadores moleculares. Pp: 49- 61 en Eguiarte, LE, V Souza y X Aguirre (comp) *Ecología molecular*. SEMARNAT, INE, UNAM y CONABIO, México D.F., México
- Amos, W y J Harwood. 1998. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 353:177-186
- Antolin, MF, LT Savage y RJ Eisen. 2006. Landscape features influence genetic structure of black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*). *Landscape Ecology* 21:867-875
- Arriaga, L, JM Espinoza, C Aguilar, E Martínez, L Gómez y E Loa (coord). 2000. *Regiones terrestres prioritarias de México*. Escala de trabajo 1:1 000 000. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. México
- Ávila-Flores, R. 2009. Black-tailed prairie dog declines in northwestern Mexico: species-habitat relationships in a changing landscape. Ph.D. Thesis, University of Alberta, Alberta, Canada
- Berli, P. 1998. Estimation of migration rates and population sizes in geographically structured populations. Pp: 39-54 en Carvalho GR (ed) *Advances in Molecular Ecology*. IOS Press, Amsterdam

- Beerli, P. 2006. Comparison of Bayesian and maximum likelihood inference of population genetic parameters. *Bioinformatics* 22(3):341-345
- Beerli, P y J Felsenstein. 1999. Maximum-Likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics* 152:763-773
- Biggins D, BJ Miller, L Hanebury, B Oakleaf, A Farmer, R Crete, y A Dood. 1993. A system for evaluating black-footed ferret habitat. Pp 73–92 en JL Oldemeyer, DE Biggins, BJ Miller y R Crete (eds.) *Management of Prairie Dog Complexes for Black-footed Ferret Reintroduction Sites*. Denver (CO): US Fish and Wildlife Service. Biological Report no.13
- Brookfield, JFY. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* 5:453-455
- Busch, JD, PM Waser y A Dewoody. 2007. Recent demographic bottlenecks are not accompanied by a genetic signature in banner-tailed kangaroo rats (*Dipodomys spectabilis*). *Molecular Ecology* 16:2450-2462
- Ceballos, G, E Mellink y LR Hanebury. 1993. Distribution and conservation status of prairie dogs *Cynomys mexicanus* and *Cynomys ludovicianus* in Mexico. *Biological Conservation* 63:105-112
- Ceballos, G, J Pacheco y R List. 1999. Influence of prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) on habitat heterogeneity and mammalian diversity in Mexico. *Journal of Arid Environments* 41:161-172
- Ceballos, G, R List, J Pacheco, P Manzano-Fischer, G Santos y M Royo. 2005. Prairie dogs, cattle, and crops: Diversity and conservation of the grassland-shrubland habitat mosaic in Northwester Chihuahua. Pp: 425- 438 en: J Cartron, G Ceballos y R. Felger (eds).

Biodiversity, ecosystems and conservation in Northern Mexico. Oxford University Press,
US

Ceballos, G, R List, S Najera, P Manzano, J Pacheco, O Moctezuma, M Royo y MA Cruz. 2005.
“Estudio Previo Justificativo para el establecimiento de la *Reserva de la Biosfera Janos*”.
Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. 71 pp. México, D.F., México

Ceballos, G y Ehrlich PR. 2002. Mammal population losses and the extinction crisis. *Science*
296:904-907

Chakraborty, R y M Nei. 1977. Bottleneck effects on average heterocigosity and genetic
distance with the stepwise mutation model. *Evolution* 31:347-356

Chapuis, MP y A Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population
differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24(3): 621-631

Chesser, RK. 1983. Genetic variability within and among populations of the black-tailed prairie
dog. *Evolution* 37(2):320-331

Cornuet, JM y G Luikart. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent
population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001-2014

Cunningham, M y C Moritz. 1998. Genetic effects of forest fragmentation on a rainforest
restricted lizard (Scincidae: *Gnypetoscincus queenslandiae*). *Biological Conservation*
83:19-30

Daley, JG. 1992. Population reductions and genetic variability in black-tailed prairie dogs.
Journal of Wildlife Management 56(2):212-220

DiBattista, J. 2008. Patterns of genetic variation in anthropogenically impacted populations.
Conservation Genetics 9:141:156

Dobson, FS, RK Chesser, JL Hoogland, DW Sugg y DW Foltz. 1997. Do black-tailed prairie
dogs minimize inbreeding? *Evolution* 51(3):970-978

- Dobson, FS, RK Chesser, JL Hoogland, DW Sugg y DW Foltz. 1998. Breeding groups and gene dynamics in a socially structured population of prairie dogs. *Journal of Mammalogy* 79(3):671-680
- Dobson, FS, RK Chesser, JL Hoogland, DW Sugg y DW Foltz. 2004. The influence of social breeding groups on effective population size in black-tailed prairie dogs. *Journal of Mammalogy* 85(1):58-66
- Dupanloup, I, S Schneider, y L Excoffier. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11(12):2571-81
- Eckert, CG, KE Samis y C Loughheed. 2008. Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology* 17:1170-1188
- Ersts, PJ. 2006. Geographic Distance Matrix Generator. Museum of Natural History. Center for Biodiversity and Conservation
- Excoffier, L, P Smouse y JM 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. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50
- Evanno, G, S Regnaut y J Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611-2620
- Forrest, SC, TW Clark, L Richardson y TM Campbell. 1985. Black-footed ferret habitat: some management and reintroduction considerations. Wyoming Bureau of Land Management. *Wildlife Technical Bulletin* 2:1-49
- Foltz DW y JL Hoogland. 1983. Genetic evidence of outbreeding in the black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*). *Evolution* 37(2):273-281

- Frankham, R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology* 10(6):1500-1508
- Frankham, R. 1998. Inbreeding and extinction: Island populations. *Conservation Biology* 13(3):665-675
- Frankham, R. 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation* 126:131-140
- Frankham, R, JD Ballou y DA Briscoe. 2005. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra. Segunda edición
- Futuyma, DJ. 2005. *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts, EUA
- Gaggiotti, OE. 2003. Genetic threats to population persistence. *Annales Zoologici Fennici* 40:155-168
- Goodman, D. 1987. The demography of chance extinction. Pp 11-34 en Soulé ME (ed). *Viable populations for conservation*. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra
- Goossens, B, L Chikhi, P Taberlet, LP Watts y D Allainé. 2001. Microsatellite analysis of genetic variation among and within Alpine marmot populations in the French Alps. *Molecular Ecology* 10:41-52
- Harris, AH. 1977. Wisconsin age environments in the northern Chihuahuan desert: Evidence from higher vertebrates. Pp 23-52 in (RH Wauer and DH Riskind, eds.) *Transactions of the Symposium on the Biological Resources of the Chihuahuan Desert Region United States and Mexico*. Department of the Interior National Park Service Transactions and Proceedings Series No. 3. EUA.
- Harrison, S y A Hastings. 1996. Genetic and evolutionary consequences of metapopulation structure. *Trends in Ecology and Evolution* 11(4):180-183

- Hartl, DL y AG Clark. 2007. *Principles in population genetics*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, EUA
- Hayne, ML, RA Van Den Bussche, JL Hoogland y DA Gilbert. 2003. Parentage, multiple paternity, and breeding success in Gunnison's and Utah prairie dogs. *Journal of Mammalogy* 84(4):1244-1253
- Hedrick, PW. 2005. *Population Genetics*. Jones and Bartlett Publishers, Massachusetts, EUA
- Higuchi, R. 1989. Rapid efficient DNA extraction for PCR from cells or blood. *Amplifications Perkin-Elmer Corporation* 2:1-4
- Hilton-Taylor, C. 2000. 2000 IUCN Red List of Threatened Species. World Conservation Union, Gland, Suiza
- Holsinger, KE y BS Weir. 2009. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . *Nature Reviews Genetics* 10:639-650
- Hoogland, JL. 1992. Levels of inbreeding among prairie dogs. *The American Naturalist* 139(3):591-602
- Hoogland, JL. 1995. *The black-tailed prairie dog, social life of a burrowing mammal*. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois, EUA
- Hoogland, JL. 1996. *Cynomys ludovicianus*. *Mammalian Species* 535:1-10
- Hoogland, JL. 2005. *Conservation of the black-tailed prairie dog: Saving North America's Western Grasslands*. Island Press, Washington, D.C., EUA.
- Hulová S y F Sedláček. 2008. Population genetic structure of the European ground squirrel in the Czech Republic. *Conservation Genetics* 9:615-625
- Jones, RT, AP Martin, AJ Mithell, SK Collinge y C Ray. 2005. Characterization of 14 polymorphic microsatellite markers for the black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*). *Molecular Ecology Notes* 5:71-73

- Kalinowski, ST. 2004. Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. *Conservation Genetics* 5: 539-543
- Kalinowski, ST. 2005. HP-RARE 1.0: A computer program for performing rarefaction measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes* 5:187-189
- Kalinowski, ST, AP Wagner y ML Taper. 2006. ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* 6:576-579
- Kimura, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217-626
- Kimura, M y J Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49:725-738
- Lacy, RC. 1987. Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. *Conservation Biology* 1:143-158
- Langella, O. 1999. Populations 1.2.30. *Bioinformatics organization; GNU General Public License* (<http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>)
- Leberg, PL. 2002. Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. *Molecular Ecology* 11:2445-2449
- List, R. 1997. Ecology of the kit fox (*Vulpes macrotis*) and coyote (*Canis latrans*) and the conservation of the prairie dog system in northern Mexico. Ph.D. Thesis, Oxford University, Oxford, Inglaterra
- List, R, O Moctezuma y M Miller. 1998. What to protect in Chihuahua and Sonora. pp 82-89 en *Proceedings of the 9th US/Mexico Border States Conference on Recreation, Parks and Wildlife*, Tucson, June 3-6, 1998. Rocky Mountain Research Station, USDA Forest Service, Fort Collins, Colorado, EUA

- List, R, P Manzano-Fischer y DW Macdonald. 2003. Coyote and kit fox diets in a prairie dog complex in Mexico. Pp. 183-188 En: M Sovada y L Carbyn (eds.). *The swift fox: Ecology and conservation of swift foxes in a changing world*. Canadian Plains Research Center, University of Regina
- List, R y D Macdonald. 1998. Carnivora and their larger mammalian prey: species inventory and abundance in Janos-Nuevo Casas Grandes prairie dog complex. *Revista Mexicana de Mastozoología* 3:95-112
- List, R y D Macdonald. 2003. Home range habitat use of the kit fox (*Vulpes macrotis*) in a prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) complex. *Journal of the Zoological Society of London* 259:1-5
- Lomolino, MV y GA Smith. 2001. Dynamic biogeography of prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) towns near the edge of their range. *Journal of Mammalogy* 82(4):937-945
- Luikart, G, FW Allendorf, JM Cornuet y WB Sherwin. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity* 89(3):238-247
- Madsen, T, R Shine, M Olsson y H Wittzell. 1999. Restoration of an inbred adder population. *Nature* 402:34-35
- Manzano-Fischer, P, G Ceballos, R List, O Moctezuma y J Pacheco. 2000. Janos-Nuevo Casas Grandes. Pp. 171-172 en C. Arizmendi y L. Marquez Valdemar (eds.), *Áreas de Importancia para la conservación de las aves en México*. CONABIO, México
- Marcé, E. 2001. Distribución y fragmentación de las colonias de perros llaneros de cola negra (*Cynomys ludovicianus*) en el noroeste de Chihuahua, México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

- Maudet C, C Miller, B Bassano, C Breitenmoser-Würsten, D Gauthier, G Obexer-Ruff, J Michallet, P Taberlet y G Liukart. 2002. Microsatellite DNA and recent statistical method in wildlife conservation management: applications in Alpine Ibex [*Capra ibex (ibex)*]. *Molecular Ecology* 11:421-436
- McCullough DA y RK Chesser. 1987. Genetic variation among populations of the Mexican prairie dog. *Journal of Mammalogy* 68(3):555-560
- McNeely, JA, KR Miller, WV Reid, RA Mittermeier y TB Werner. 1990. *Conserving the World's Biological Diversity*. IUCN, World Resources Institute, Conservation International, WWF-US and the World Bank, Washington D. C. EUA
- Meffe, GK y CR Carroll (eds.). 1997. *Principles of conservation biology*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, EUA
- Messing, JH. 1986. A late Pleistocene-Holocene fauna from Chihuahua, Mexico. *Southwestern Naturalist* 31: 277-288.
- Miller, B, R Reading, J Hoogland, T Clark, G Ceballos, R List, S Forrest, L Hanebury, P Manzano, J Pacheco y D Uresk. 2000. The role of prairie dog as a keystone species: a response to Stapp. *Conservation Biology* 14:318-321
- Moreno-Letelier, A. 2007. Tamaño efectivo de la población. Pp: 62 - 86 en Eguiarte, LE, Souza V y Aguirre X (comp) *Ecología molecular*. SEMARNAT, INE, UNAM y CONABIO, México D.F., México
- Myers, N. 1997. Mass extinction and evolution. *Science* 278:597-598
- Nei, M. 1978. Estimation of Average Heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-190
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, Nueva York, EUA

- Nei, M, F Tajima y Y Tatenó. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *Journal of Molecular Evolution* 19:153-170
- Newman, D y D Pilson. 1997. Increased probability of extinction due to decreased genetic effective population size: experimental populations of *Clarkia pulchella*. *Evolution* 51(2):354-362
- Ochoa Hein, A. 2008. Diversidad y estructura genética espacio-temporal de la ardilla terrestre del Perote (*Spermophilus perotensis*): Implicaciones para su conservación. *Tesis de Licenciatura*. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- O'Grady, JJ, BW Brook, DH Reed, JD Ballou, DW Tonkyn y R Frankham. 2006. Realistic levels of inbreeding depression strongly affect extinction risk in wild populations. *Biological Conservation* 133:42-51
- Pacheco, J. 2005. *Cynomys mexicanus* Merriam, 1892, perro llanero mexicano. Pp: 540-542 en Ceballos, G y G Oliva (coord) *Los mamíferos silvestres de México*. Fondo de Cultura Económica y CONABIO, México D.F., México
- Pacheco, J y G Ceballos. 2005. *Cynomys ludovicianus* (Ord. 1815), perro llanero. Pp: 538-540 en Ceballos, G y G Oliva (coord) *Los mamíferos silvestres de México*. Fondo de Cultura Económica y CONABIO, México D.F., México
- Pacheco, J, R List, R Sierra, E Ponce, E Marcé, L Martínez, H Zarza y G Ceballos. 2009. *Decline in demographic distribution of the black-tailed prairie dog (Cynomys ludovicianus) in Mexico*. IMC10, 10th International Mammalogical Congress, Mendoza, Argentina
- Petit, RJ, A El Mousadik y O Pons. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* 12(4):844-855

- Piry, S, G Luikart y JM Cornuet. 1999. BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity* 90(4):502-503
- Pritchard, JK, M Stephens y P Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959
- Raymond M y F Rousset. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248-249
- Rivera Tellez, E. 2009. Patrones de actividad y dinámica poblacional de los perros llaneros (*Cynomys ludovicianus*) en Janos, Chihuahua. Tesis de Maestría, Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Ambiental), Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F.
- Roach, JL, P Stapp, B Van Horne y MF Antolin. 2001. Genetic structure of a metapopulation of black-tailed prairie dogs. *Journal of Mammalogy* 82(4):946-959
- Rocha, M y J Gasca. 2007. Ecología molecular de la conservación. Pp: 251- 278 en Eguiarte, LE, V Souza y X Aguirre (comp) *Ecología molecular*. SEMARNAT, INE, UNAM y CONABIO, México D.F., México
- Saccheri, I, M Kuussaari, M Kannare, P Vikman, W Fortelius e I Hanski. 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* 392:491-494
- Saunders, DA, RJ Hobbs y CR Margules. 1991. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conservation Biology* 5(1):18-32
- Selkoe KA y RJ Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9:615-629
- SEMARNAT. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental – Especies de flora y fauna silvestres – Categorías de riesgo y especificaciones para su

- inclusión, exclusión o cambio – Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación* 582:1-80
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139:457-462
- Slatkin, M. 2005. Seeing ghosts: the effect of unsampled populations on migration rates estimated for sampled populations. *Molecular Ecology* 14:67-73
- Schlötterer, C. 2004. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* 5:63-69
- Slobodchikoff, CN, BS Perla y JL Verdolin. 2009. *Prairie dogs: communication and community in an animal society*. Harvard University Press, Massachussets, EUA
- Spencer, CC, JE Neigel, y PL Leberg. 2000. Experimental evaluation of the usefulness of microsatellite DNA for detecting demographic bottlenecks. *Molecular Ecology* 9:1517-1528
- Spielman, D, BW Brook y R Frankham. 2004. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proceeding of the National Academy of Science* 101(42):15261-15264
- Takezaki, N y M Nei. 2008. Empirical tests of reliability of phylogenetic trees constructed with microsatellite DNA. *Genetics* 178:385-392
- Travis, SE, CN Slobodchikoff y P Kleim. 1997. DNA fingerprinting reveals low genetic diversity in Gunnison's prairie dogs (*Cynomys gunnisoni*). *Journal of Mammalogy* 78(3):725-732
- Trudeau, KM, HB Britten y M Restani. 2004. Sylvatique plague reduces genetic variability in black-tailed prairie dogs. *Journal of Wildlife Diseases* 40(2):205-211

- Truett, J.C., D. P. Gober, A. W. Ernst, R. List, H. Whitlaw, C. L. Hayes, G. Schmitt y W.E. Van Pelt. En prensa. *Prairie dpgs in the Chihuahuan Desert: hostory, ecology, conservation*.
Memorias del V Simposyum on Resources of the Chihuahuan Desert region: U.S. and Mexico. The Chihuahuan Desert Institute
- Väli, U, A Einarsson, L Waits y H Ellegren. 2008. To what extent don microsatellite markers reflect genome-wide genetic diversity in natural populations? *Molecular Ecology* 17:3808-3817
- Van Oosterhout, C, WF Hutchinson, DPM Wills y P Shipley. 2004. MICROCHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535-538
- Vignal A, D Milan, M SanCristobal y A Eggen. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution* 34:275-305
- Wayne, RK y PA Morin. 2004. Conservation genetics in the new molecular age. *Frontiers in Ecology and the Environment* 2(2):89-97
- Weir, BS y CC Cockerham. 1984. Estimating F -statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38(6):1358-1370
- Whitlock, MC y DE McCauley. 1999. Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \approx 1/(4Nm + 1)$. *Heredity* 82:117-125
- Williams, BL, JD Brown y KN Paige. 2003. Landscape scale genetic effects of habitat fragmentation on a high gene flow species: *Speyeria idalia* (Nymphalidae). *Molecular Ecology* 12:11-20

Wlasiuk, G, JC Garza y EP Lessa. 2003. Genetic and geographic differentiation in the Rio Negro tuco-tuco (*Ctenomys rionegrensis*): Inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. *Evolution* 57(4):913-926

Wright, S. 1969. *Evolution and the genetics of populations, vol. 2: The theory of gene frequencies*. University of Chicago Press, Chicago Illinois, EUA

Anexo 1.

Protocolo de extracción de ADN de sangre (Bio-Rad modificado sin RNAsa)

1. Agregar 300µl de sangre a un tubo para microcentrífuga de 1.5 que contenga 900 µl de Solución de lisis RBC. Invertir e incubar durante 10 min a temperatura ambiente.
2. Centrifugar 1 min a 12,000 rpm. Remover sobrenadante dejando 20 µl y mezclar vigorosamente hasta que se resuspendan las células.
3. Agregar 300 µl de solución de lisis genómico. Pipetear varias veces e incubar entre 15 y 30 min a 37°C.
4. Agregar 100 µl de solución de precipitación de proteínas y mezclar 20 seg. Centrifugar 3 min a 13,000 rpm.
5. Verter sobrenadante en un tubo nuevo y desechar el pellet.
6. Agregar 300 µl de Isopropanol. Invertir varias veces.
7. Dejar precipitar toda la noche a temperatura ambiente.
8. Centrifugar 10 min a 14,000 rpm a 4°C.
9. Eliminar sobrenadante dejando sólo el pellet.
10. Añadir 300 µl de Etanol al 70%. Mezclar por inversión.
11. Centrifugar 10 min a 14,000 rpm.
12. Eliminar sobrenadante y dejar secar el pellet en campana de flujo laminar por 15 min.
13. Rehidratar con 100 µl de solución hidratante.
14. Poner a baño maría a 60 °C durante 30 min.
15. Resuspender 24 hrs a 4 °C.

Anexo 2.

Frecuencias alélicas por locus y por colonia. En negritas observamos los alelos que presentan una frecuencia menor a 0.1 y subrayados los alelos intermedios no encontrados en la población

Locus\Colonia		AB	BA	CJ	EA	EC	LB	LC	MO	MV	OS	PP	PV	UN	Total
A2	210	0.23	0.23	0.19	0.14	0.11	-	0.50	0.17	-	-	0.47	0.33	-	0.18
	212	0.77	0.50	0.81	0.59	0.45	0.44	0.50	0.83	0.32	0.54	0.53	0.28	1	0.54
	214	-	0.27	-	0.27	0.34	0.44	-	-	0.50	0.46	-	0.39	-	0.24
	<u>216</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	218	-	-	-	-	0.09	0.13	-	-	0.18	-	-	-	-	0.04
A8	258	0.45	0.37	0.69	0.09	0.18	0.19	0.40	0.17	0.46	0.29	0.27	0.22	0.33	0.30
	260	0.45	0.60	0.31	0.41	0.57	0.53	0.60	0.44	0.36	0.50	0.53	0.50	0.67	0.50
	262	-	-	-	-	0.20	0.28	-	0.33	0.11	0.21	0.20	0.28	-	0.14
	264	0.09	0.03	-	0.50	0.05	-	-	0.06	0.07	-	-	-	-	0.06
A101	133	0.73	0.47	-	0.32	0.45	0.53	0.10	0.44	0.64	0.21	-	0.78	0.17	0.39
	135	0.18	0.50	0.25	0.55	0.52	0.47	0.20	0.56	0.36	0.79	0.67	0.22	0.83	0.48
	<u>137</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	139	0.09	0.03	0.75	0.14	0.02	-	0.70	-	-	-	0.33	-	-	0.13
A104	178	-	-	-	0.09	0.11	0.06	0.20	0.11	0.21	0.36	0.50	0.56	-	0.18
	180	0.32	0.27	0.25	0.36	0.43	0.75	0.10	0.78	0.64	0.64	0.30	0.44	1	0.47
	182	-	-	0.25	-	0.07	-	-	-	-	-	-	-	-	0.02
	184	0.68	0.73	0.50	0.55	0.39	0.19	0.70	0.11	0.14	-	0.20	-	-	0.33
A119	109	0.14	0.30	-	0.05	0.20	0.16	-	-	-	0.18	-	-	-	0.10
	111	0.45	0.23	0.38	0.36	0.30	0.41	0.25	0.22	0.29	0.29	0.30	0.11	0.58	0.31
	113	0.41	0.33	0.50	0.27	0.32	0.44	0.55	0.50	0.54	0.54	0.50	0.28	0.42	0.43
	115	-	0.13	0.13	0.32	0.18	-	0.20	0.28	0.18	-	0.20	0.61	-	0.16
C116	189	-	0.33	-	0.18	0.11	-	-	-	-	-	0.17	0.33	-	0.09
	193	0.68	0.57	0.44	0.45	0.48	0.44	-	0.78	0.54	0.64	0.43	0.39	-	0.47
	197	0.14	0.10	0.56	0.36	0.41	0.53	0.60	0.22	0.46	0.36	0.40	0.28	1	0.39
	201	0.18	-	-	-	-	0.03	0.40	-	-	-	-	-	-	0.04
D1	196	0.09	0.27	0.63	0.18	0.14	0.09	0.45	0.56	0.04	-	0.20	-	1	0.22
	200	0.77	0.37	0.38	0.41	0.52	0.69	0.45	0.11	0.36	0.54	0.53	0.33	-	0.46
	204	0.14	0.37	-	0.41	0.34	0.22	0.10	0.33	0.61	0.46	0.27	0.67	-	0.32
D2	290	0.50	0.73	0.56	0.64	0.50	0.50	0.55	0.61	0.57	0.50	0.57	0.44	0.50	0.55
	<u>294</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	298	0.50	0.27	0.44	0.36	0.50	0.50	0.45	0.39	0.43	0.50	0.43	0.56	0.50	0.45
D115	192	0.68	0.33	0.63	0.50	0.39	0.31	0.50	0.50	0.43	0.25	0.33	0.56	0.67	0.43
	196	0.32	0.37	0.38	0.36	0.30	0.56	0.50	0.50	0.39	0.50	0.57	0.44	0.33	0.43
	200	-	-	-	-	0.16	-	-	-	0.18	-	-	-	-	0.04
	204	-	0.30	-	0.14	0.16	0.13	-	-	-	0.25	0.10	-	-	0.10
D120	200	0.05	0.60	0.69	0.50	0.41	0.38	0.65	0.50	0.46	0.46	0.60	0.50	0.25	0.47
	202	0.95	0.40	0.31	0.50	0.59	0.63	0.35	0.50	0.54	0.54	0.40	0.50	0.75	0.53

Anexo 3. Análisis de alelos nulos

Análisis de alelos nulos por colonia y por locus. ✓ presencia de alelos nulos; ✗ ausencia de alelos nulos.

	A2	A8	A101	A104	A119	C116	D1	D2	D115	D120
AB	✗	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
BA	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗
CJ	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗
EA	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
EC	✗	✗	✗	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✗
LB	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗
LC	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓
MO	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗
MV	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗
OS	✗	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗
PP	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
PV	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✓
UN	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗

AB: Agua Blanca, BA: Buenos Aires, CJ: Presa Casa de Janos, EA: El Águila, EC: El Cuervo, LB: La Báscula, LC: La Cal, MO: Mata Ortiz, MV: Monteverde, OS: Ojitos Sur, PP: Papalote San Pedro, PV: Pancho Villa; UN: El Uno Norte.

F_{ST} por locus y global calculada sin corrección para alelos nulos (s/ENA) y con corrección para alelos nulos (ENA).

Locus	F_{ST} s/ENA	F_{ST} ENA
A2	0.134	0.131
A8	0.049	0.052
A101	0.223	0.198
A104	0.203	0.172
A119	0.037	0.043
C116	0.119	0.114
D1	0.166	0.165
D2	- 0.026	- 0.018
D115	0.032	0.031
D120	0.055	0.064
Total	0.103	0.097
Intervalos de 95% confianza	0.059 – 0.148	0.059 – 0.133

Anexo 4.

Valores de probabilidad por colonia y total de desequilibrio de ligamiento calculados con GENEPOP.

Locus 1	Locus 2	Colonia													Todas
		AB	BA	CJ	EA	EC	LB	LC	MO	MV	OS	PP	PV	UN	
A2	A8	0.025*	0.465	1	0.560	0.891	0.186	1	0.128	0.690	0.368	1	0.885	-	0.651
A2	A101	0.451	0.860	0.643	0.389	0.367	0.625	1	1	0.946	1	1	1	-	0.999
A8	A101	0.582	0.611	1	0.242	0.534	0.570	0.736	0.203	0.502	0.390	0.302	0.189	1	0.788
A2	A104	0.313	0.591	0.715	0.936	0.791	0.936	0.825	0.587	0.504	0.174	0.689	1	-	0.982
A8	A104	0.012*	0.342	0.372	0.405	0.733	0.393	1	1	0.938	0.324	0.671	0.194	-	0.476
A101	A104	0.244	1	0.426	0.041*	0.267	0.278	0.674	1	0.202	0.228	0.437	0.008*	-	0.077
A2	A119	0.569	0.232	0.566	0.679	0.017*	0.753	0.827	0.763	0.972	0.339	0.948	0.237	-	0.647
A8	A119	0.961	0.263	0.870	0.256	0.194	0.907	0.305	0.745	0.422	0.143	0.921	0.943	0.798	0.855
A101	A119	0.684	0.949	0.176	0.235	0.824	0.562	1	0.590	0.490	0.385	0.735	0.578	0.499	0.929
A104	A119	0.650	0.453	0.808	0.666	0.264	0.513	0.575	1	1	0.320	0.683	0.573	-	0.967
A2	C116	0.568	0.970	0.678	0.826	0.841	0.255	1	1	0.097	0.134	0.422	0.735	-	0.871
A8	C116	1	0.023*	0.753	0.265	0.331	0.016*	0.814	0.437	1	0.975	0.607	1	-	0.439
A101	C116	0.746	0.940	1	0.858	0.187	0.910	1	0.714	0.504	0.058	0.069	0.710	-	0.786
A104	C116	0.961	0.532	0.261	0.823	0.285	0.946	0.885	0.168	0.039	0.170	0.238	0.714	-	0.437
A119	C116	0.289	0.312	0.737	1	0.194	0.544	0.310	0.046*	0.688	0.623	0.652	0.319	-	0.506
A2	D1	0.002*	0.894	0.680	0.582	0.611	0.270	0.364	0.810	0.621	0.726	0.051	0.355	-	0.166
A8	D1	0.064	0.601	1	0.958	0.252	0.818	0.338	0.542	0.116	0.934	0.294	1	-	0.696
A101	D1	0.907	0.776	0.540	0.256	0.998	0.149	1	1	0.411	0.534	0.229	0.527	-	0.897
A104	D1	0.128	0.707	1	0.206	1	0.105	1	0.828	0.309	0.626	0.980	0.526	-	0.828
A119	D1	0.324	1	0.293	0.476	0.023*	0.950	1	0.876	0.470	0.531	1	0.782	-	0.831
C116	D1	0.249	0.685	0.742	0.861	0.729	0.841	0.733	1	0.754	0.357	0.488	0.854	-	0.993
A2	D2	0.384	0.206	0.678	0.554	0.490	0.054	0.895	0.502	0.925	0.143	0.832	0.664	-	0.632
A8	D2	0.261	0.382	0.748	0.679	0.299	0.586	0.224	0.187	0.230	0.021*	0.888	0.084	0.391	0.147
A101	D2	0.177	0.512	1	0.348	0.408	0.204	1	0.280	0.022*	0.791	0.256	1	1	0.505
A104	D2	0.690	0.307	1	0.871	0.048*	1	0.375	1	0.750	0.147	0.393	1	-	0.819
A119	D2	0.391	1	0.206	0.755	0.382	0.143	0.467	0.399	1	0.340	1	0.117	1	0.731
C116	D2	0.815	0.479	0.615	0.684	0.402	0.280	1	0.078	0.857	1	0.904	1	-	0.955
D1	D2	0.140	0.487	1	0.978	0.794	0.822	0.167	1	0.138	0.920	1	1	-	0.947

Continúa...

Locus 1	Locus 2	Colonia													
		AB	BA	CJ	EA	EC	LB	LC	MO	MV	OS	PP	PV	UN	Todas
A2	D115	0.705	0.507	0.019*	0.766	0.153	0.168	0.691	0.682	0.147	0.408	0.237	0.579	-	0.222
A8	D115	0.788	0.677	1	0.797	0.770	0.294	0.362	0.176	0.433	0.108	0.528	0.942	1	0.886
A101	D115	0.393	0.466	0.107	0.184	0.941	0.169	1	0.483	0.872	0.174	0.853	1	1	0.768
A104	D115	1	0.192	0.829	0.018*	0.853	0.015*	0.834	1	1	0.806	0.162	1	-	0.411
A119	D115	0.214	0.850	0.861	0.162	0.963	0.317	0.832	0.573	0.503	0.894	1	1	0.598	0.975
C116	D115	1	0.859	0.739	0.645	0.709	0.890	0.223	1	0.970	0.264	0.632	0.391	-	0.987
D1	D115	1	0.794	1	0.817	0.248	0.566	1	0.270	0.282	0.661	0.968	0.148	-	0.930
D2	D115	0.615	0.084	0.740	0.625	0.053	0.939	0.188	0.165	0.563	0.922	0.847	0.382	0.595	0.517
A2	D120	1	0.334	1	0.938	0.261	0.213	0.872	0.760	0.483	0.716	0.411	1	-	0.969
A8	D120	1	0.886	0.479	0.013*	0.789	0.018	0.774	0.755	0.146	0.434	0.742	0.057	1	0.198
A101	D120	1	0.868	0.538	0.245	0.889	1	0.757	0.391	0.379	0.533	0.603	0.015*	1	0.809
A104	D120	0.179	0.794	0.202	0.313	0.809	0.690	0.004*	1	0.081	0.840	0.319	0.016*	-	0.040*
A119	D120	0.634	0.331	0.870	0.560	0.930	0.611	0.612	0.789	0.977	0.238	0.544	1	1	0.995
C116	D120	1	0.883	0.282	0.197	0.462	0.044*	0.603	1	0.440	0.364	0.740	0.500	-	0.668
D1	D120	1	0.501	0.258	1	0.122	0.648	0.340	0.103	0.059	0.679	0.150	1	-	0.347
D2	D120	1	0.661	1	0.213	0.329	0.486	0.564	0.180	0.280	0.362	0.873	0.425	0.606	0.804
D115	D120	1	0.727	1	0.678	0.264	0.304	0.566	0.207	0.659	0.667	0.501	1	0.594	0.961

Anexo 5.

Matriz con valores de distancia genética de Nei (D_A ; Nei *et al.* 1983).

D_A	AB	BA	CJ	EA	EC	LB	LC	MO	MV	OS	PP	PV	UN
AB	0												
BA	0.111	0											
CJ	0.154	0.169	0										
EA	0.116	0.046	0.155	0									
EC	0.120	0.056	0.174	0.052	0								
LB	0.120	0.107	0.211	0.110	0.048	0							
LC	0.150	0.177	0.090	0.151	0.180	0.213	0						
MO	0.133	0.123	0.156	0.097	0.091	0.106	0.179	0					
MV	0.155	0.134	0.224	0.098	0.055	0.058	0.222	0.093	0				
OS	0.186	0.139	0.259	0.133	0.081	0.042	0.272	0.126	0.079	0			
PP	0.174	0.123	0.109	0.096	0.100	0.145	0.102	0.094	0.155	0.131	0		
PV	0.223	0.156	0.293	0.129	0.100	0.139	0.240	0.115	0.089	0.119	0.130	0	
UN	0.233	0.257	0.185	0.232	0.228	0.188	0.224	0.149	0.226	0.231	0.229	0.309	0

AB: Agua Blanca, BA: Buenos Aires, CJ: Presa Casa de Janos, EA: El Águila, EC: El Cuervo, LB: La Báscula, LC: La Cal, MO: Mata Ortiz, MV: Monteverde, OS: Ojitos Sur, PP: Papalote San Pedro, PV: Pancho Villa; UN: El Uno Norte.

Anexo 6.

Matrices de máxima verosimilitud de relación de parentesco entre individuos de cada colonia. * Medios hermanos; ** Hermanos completos; *** Padre-Hijo.

a) Agua Blanca

	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	AB11
AB1	1										
AB2	0.28*	1									
AB3	0.33*	0	1								
AB4	0.18	0.29 *	0.35*	1							
AB5	0.22	0.25	0.03	0	1						
AB6	0.19	0.05	0	0.2	0	1					
AB7	0	0.1	0	0	0.07	0.12	1				
AB8	0	0	0.45**	0.14	0	0	0	1			
AB9	0	0	0	0	0	0.09	0.11	0.4***	1		
AB10	0	0	0	0	0	0	0.05	0	0.02	1	
AB11	0.27	0	0	0	0	0.36*	0.5***	0	0.5***	0	1

b) Buenos Aires

	BA1	BA2	BA3	BA4	BA5	BA6	BA7	BA8	BA9	BA10	BA11	BA12	BA13	BA14	BA15
BA1	1														
BA2	0.34*	1													
BA3	0	0.35*	1												
BA4	0	0.19*	0.5***	1											
BA5	0	0	0.01	0.22	1										
BA6	0	0	0	0.27*	0.32*	1									
BA7	0	0.19	0.16	0.5***	0.2*	0.21*	1								
BA8	0.05	0.21*	0.42**	0	0.09	0	0.15*	1							
BA9	0	0	0	0	0	0	0.03	0.11	1						
BA10	0.23*	0	0.17*	0.12	0.12	0.05	0.13	0	0.1	1					
BA11	0.22*	0.02	0.29	0	0	0	0.52**	0	0.18*	0.13	1				
BA12	0	0	0	0	0.25*	0	0	0.11	0.2*	0	0.09	1			
BA13	0	0	0	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0.24*	1		
BA14	0	0	0	0	0	0.09	0	0.08	0.09	0	0.02	0.32*	0.5***	1	
BA15	0.42	0.06	0	0.08	0	0	0.02	0	0.02	0	0.04	0.03	0.45***	0.32*	1

c) Presa Casa de Janos

	CJ1	CJ2	CJ3	CJ4	CJ5	CJ6	CJ7	CJ8
CJ1	1							
CJ2	0.59**	1						
CJ3	0	0	1					
CJ4	0.01	0	0.34**	1				
CJ5	0	0	0.22*	0	1			
CJ6	0	0.06	0	0	0	1		
CJ7	0	0.01	0	0	0.05	0.22*	1	
CJ8	0.16	0	0.01	0	0.22	0	0	1

d) El Águila

	EA1	EA2	EA3	EA4	EA5	EA6	EA7	EA8	EA9	EA10	EA11
EA1	1										
EA2	0.11	1									
EA3	0	0.18*	1								
EA4	0.03	0.06	0.17	1							
EA5	0	0.28*	0.34**	0.44**	1						
EA6	0	0	0.03	0	0	1					
EA7	0.06	0	0	0	0	0.1	1				
EA8	0.07	0	0	0	0	0	0.5***	1			
EA9	0.16	0.04	0.08	0	0	0	0.21	0.55***	1		
EA10	0.04	0	0	0	0	0.23*	0.05	0	0.13	1	
EA11	0	0	0	0.47	0	0.11	0	0	0	0.07	1

e) El Cuervo

	EC1	EC2	EC3	EC4	EC5	EC6	EC7	EC8	EC9	EC10	EC11	EC12	EC13	EC14	EC15	EC16	EC17	EC18	EC19	EC20	EC21	EC22
EC1	1																					
EC2	0.02	1																				
EC3	0.11	0.22*	1																			
EC4	0	0	0	1																		
EC5	0	0.14*	0.09	0.32*	1																	
EC6	0	0.08	0.32*	0.05	0.22*	1																
EC7	0	0.22*	0	0	0	0	1															
EC8	0.5***	0	0	0.07	0.23	0.11	0.21	1														
EC9	0.41**	0.12	0	0.32*	0	0	0	0.26*	1													
EC10	0.14	0.23	0.15	0.32*	0	0.23	0	0	0.28*	1												
EC11	0.13	0	0.24	0.24*	0	0	0	0	0	0.33*	1											
EC12	0.53***	0.11	0	0	0	0	0	0.05	0	0.09	0.25*	1										
EC13	0.28*	0	0	0	0	0	0	0	0.3	0.08	0	0.35**	1									
EC14	0	0.03	0	0.05	0.03	0	0.12	0.14	0.14*	0	0	0	0.2*	1								
EC15	0	0.51**	0.08	0	0.16	0.07	0.53**	0	0.14*	0.05	0	0.08	0	0.09	1							
EC16	0	0	0.28*	0.2	0	0	0.21	0.22*	0	0	0.5***	0	0	0	0.04	1						
EC17	0.01	0	0.03	0.04	0	0.06	0	0.23*	0	0	0	0	0	0	0	0.33*	1					
EC18	0.12	0.12	0.21	0.02	0.04	0.03	0	0.11	0	0.06	0	0.21	0	0.02	0	0.12	0.21*	1				
EC19	0	0.04	0	0.49***	0.04	0	0.03	0	0.66**	0.2	0.2	0.02	0.08	0.2*	0.5***	0	0	0	1			
EC20	0	0	0.16	0	0	0.17*	0	0	0	0.05	0	0	0	0.13	0	0	0.25*	0	0	1		
EC21	0.07	0.02	0	0	0	0.05	0.2*	0	0	0	0	0.18	0.16	0.03	0.02	0	0.22*	0	0	0.5***	1	
EC22	0	0	0	0.04	0	0	0.08	0	0	0	0.15*	0.13	0.13*	0	0.08	0.1	0.11	0.39**	0	0.02	0.03	1

f) La Báscula

	LB1	LB2	LB3	LB4	LB5	LB6	LB7	LB8	LB9	LB10	LB11	LB12	LB13	LB14	LB15	LB16
LB1	1															
LB2	0.28*	1														
LB3	0.5***	0.14	1													
LB4	0	0.09	0.18	1												
LB5	0.55***	0	0.24	0.32**	1											
LB6	0.01	0.13	0	0.07	0	1										
LB7	0.12	0	0	0	0.13	0.08	1									
LB8	0	0	0.19	0	0.5***	0.02	0.5***	1								
LB9	0.05	0.04	0.07	0	0.5***	0	0	0.13	1							
LB10	0.11	0.48**	0.26	0.27	0	0	0	0.08	0.25	1						
LB11	0	0.15	0.16*	0	0	0	0	0	0.15	0.36*	1					
LB12	0	0.18	0	0.11	0	0.6***	0	0.25*	0	0	0	1				
LB13	0	0	0	0.03	0	0	0.5***	0.55**	0.18	0.01	0.03	0.47**	1			
LB14	0	0	0	0	0	0	0.33**	0.5***	0.18*	0	0.17*	0	0.45***	1		
LB15	0.52***	0	0.04	0	0.47***	0.31*	0.27*	0.12	0	0	0	0	0.08	0.18	1	
LB16	0	0.04	0.2	0	0	0	0	0	0.6**	0.39**	0.17*	0	0	0.19*	0	1

g) La Cal

	LC1	LC2	LC3	LC4	LC5	LC6	LC7	LC8	LC9	LC10
LC1	1									
LC2	0.19	1								
LC3	0	0.13*	1							
LC4	0	0	0.5**	1						
LC5	0	0	0	0	1					
LC6	0.41**	0	0	0.14*	0	1				
LC7	0.15*	0	0.1	0	0	0.47***	1			
LC8	0.05	0.2	0.2	0.47***	0.1	0.14*	0	1		
LC9	0	0.01	0	0	0.26	0	0	0	1	
LC10	0	0.24	0	0.14	0.23*	0	0	0	0.59***	1

h) Mata Ortiz

	MO1	MO2	MO3	MO4	MO5	MO6	MO7	MO8	MO9
MO1	1								
MO2	0	1							
MO3	0.32	0.4**	1						
MO4	0	0	0	1					
MO5	0	0.09	0	0.39***	1				
MO6	0.15	0	0.27	0	0	1			
MO7	0	0	0	0.41**	0	0	1		
MO8	0	0	0	0.12	0.15	0	0.04	1	
MO9	0.5***	0	0	0	0.19	0.04	0	0.27*	1

i) Monteverde

	MV1	MV2	MV3	MV4	MV5	MV6	MV7	MV8	MV9	MV10	MV11	MV12	MV13	MV14
MV1	1													
MV2	0.57**	1												
MV3	0.29*	0.5***	1											
MV4	0	0	0.18*	1										
MV5	0.09	0	0	0.2*	1									
MV6	0.08	0.5***	0.14	0	0.34	1								
MV7	0.18*	0	0	0.1	0	0.27*	1							
MV8	0.07	0.29**	0	0	0	0.05	0.15	1						
MV9	0.04	0.1	0	0	0.09	0	0	0.3*	1					
MV10	0	0	0	0	0	0	0.09	0.02	0.08	1				
MV11	0	0	0	0.21*	0.09	0	0.08	0.08	0	0.03	1			
MV12	0.17*	0	0	0.34	0.5***	0.1	0	0	0	0	0	1		
MV13	0	0.03	0	0.35*	0.1	0	0	0	0.13	0.1	0.02	0.02	1	
MV14	0	0	0	0	0	0	0.5***	0	0	0.06	0	0	0.25*	1

j) Ojitos Sur

	OS1	OS2	OS3	OS4	OS5	OS6	OS7	OS8	OS9	OS10	OS11	OS12	OS13	OS14
OS1	1													
OS2	0.52**	1												
OS3	0.15*	0.5***	1											
OS4	0	0	0.43	1										
OS5	0.11	0	0	0.2*	1									
OS6	0	0	0.13	0.5***	0.69**	1								
OS7	0	0	0	0.5***	0	0.5***	1							
OS8	0.34*	0.03	0.16*	0	0.04	0	0.19	1						
OS9	0.5***	0	0	0	0	0	0.18	0.05	1					
OS10	0	0	0.01	0.11	0	0.07	0.5***	0	0.52**	1				
OS11	0	0.13*	0.06	0.22	0.14	0	0	0	0	0	1			
OS12	0	0.49***	0.14*	0	0	0	0.03	0	0.04	0	0.65**	1		
OS13	0	0	0	0.03	0	0	0.31*	0.08	0.21*	0.21*	0	0	1	
OS14	0.09	0.03	0	0	0	0	0.12	0	0.07	0.31**	0.13	0.27*	0.5***	1

k) Papalote San Pedro

	PP1	PP2	PP3	PP4	PP5	PP6	PP7	PP8	PP9	PP10	PP11	PP12	PP13	PP14	PP15
PP1	1														
PP2	0	1													
PP3	0.06	0	1												
PP4	0	0.02	0	1											
PP5	0.07	0.06	0.14*	0.5***	1										
PP6	0	0.14	0	0.1	0.24*	1									
PP7	0	0.02	0	0	0.07	0.5***	1								
PP8	0	0.21*	0	0	0.11	0.26*	0.22*	1							
PP9	0.19	0	0.1	0	0	0.48***	0.57**	0.19	1						
PP10	0	0.15	0.17*	0.36	0	0	0.5***	0.34*	0.14*	1					
PP11	0.5***	0	0.39*	0.22	0.03	0	0.08	0	0	0.5***	1				
PP12	0	0.09	0.19*	0.13	0	0.07	0	0	0	0	0.23*	1			
PP13	0	0.28*	0	0.28*	0	0	0	0	0	0	0	0.39**	1		
PP14	0.02	0.5***	0.13*	0	0.17	0.04	0	0	0.17	0	0	0.03	0.18*	1	
PP15	0.24*	0	0.01	0	0	0	0	0	0.13*	0	0	0.21*	0.08	0.57***	1

l) Pancho Villa

	PV1	PV2	PV3	PV4	PV5	PV6	PV7	PV8	PV9
PV1	1								
PV2	0	1							
PV3	0.05	0.57**	1						
PV4	0.12	0.53***	0.54***	1					
PV5	0	0.24*	0.19	0.26*	1				
PV6	0.22*	0	0	0	0	1			
PV7	0	0	0	0	0	0.3**	1		
PV8	0.21	0	0.07	0	0	0.56**	0.54***	1	
PV9	0	0	0	0	0	0.08	0.23*	0.59***	1

m) El Uno Norte

	UN1	UN2	UN3	UN4	UN5	UN6
UN1	1					
UN2	0	1				
UN3	0	0.5***	1			
UN4	0	0.5***	0.56***	1		
UN5	0	0	0.16*	0	1	
UN6	0.42	0	0	0	0.5***	1

Anexo 7.

Valor de ΔK obtenido a partir del análisis de Evanno *et al.* (2005) para los valores del logaritmo de la verosimilitud posterior calculados por STRUCTURE.

K	L(K)	s.d.	[L'(K)]	L''(K)	ΔK
1	-3281.85	0.205			
2	-3165.927	1.660	115.923	70.570	42.510
3	-3120.573	11.896	45.353	11.657	0.980
4	-3086.877	7.108	33.697	22.953	3.229
5	-3097.62	19.540	10.743	8.837	0.452
6	-3099.527	28.235	1.907	3.743	0.133
7	-3105.177	27.061	5.650	47.843	1.768
8	-3158.67	43.914	53.493	16.083	0.366
9	-3196.08	51.109	37.410	1.640	0.032
10	-3235.13	75.080	39.050	30.087	0.401
11	-3304.267	62.803	69.137	4.677	0.074
12	-3368.727	81.621	64.460	47.173	0.578
13	-3386.013	84.391	17.287	34.467	0.408
14	-3437.767	102.018	51.753	31.263	0.306
15	-3417.277	77.829	20.490		

