



Universidad Nacional Autónoma de México
Posgrado en Ciencias Biológicas
Instituto de Ecología
Biología Evolutiva

Filogeografía y genética de la conservación de dos especies de perros de las praderas de cola negra (*Cynomys ludovicianus* y *Cynomys mexicanus*) con distribución en México

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

GABRIELA CASTELLANOS MORALES

Tutor Principal de Tesis: Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns
Instituto de Ecología
Comité Tutor: Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau
Instituto de Ecología
Dra. Livia Socorro León Paniagua
Facultad de Ciencias

México, D. F. Septiembre, 2015



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.



Universidad Nacional Autónoma de México
Posgrado en Ciencias Biológicas
Instituto de Ecología
Biología Evolutiva

Filogeografía y genética de la conservación de dos especies de perros de las praderas de cola negra (*Cynomys ludovicianus* y *Cynomys mexicanus*) con distribución en México

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

GABRIELA CASTELLANOS MORALES

Tutor Principal de Tesis: Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns
Instituto de Ecología
Comité Tutor: Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau
Instituto de Ecología
Dra. Livia Socorro León Paniagua
Facultad de Ciencias

México, D. F. Septiembre, 2015

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

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática, en su sesión ordinaria del día 29 de junio de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS**, del Posgrado en Ciencias Biológicas de la alumna **CASTELLANOS MORALES GABRIELA** con número de cuenta **97553940** con la tesis titulada **"FILOGEOGRAFÍA Y GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN DE DOS ESPCIAS DE PERROS DE LAS PRADERAS DE COLA NEGRA (*Cynomys ludovicianus* y *Cynomys mexicanus*) CON DISTRIBUCIÓN EN MÉXICO"**, bajo la dirección del **DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS**:

Presidente:	DR. VÍCTOR MANUEL G. SÁNCHEZ CORDERO DÁVILA
Vocal:	DR. JORGE ORTEGA REYES
Secretario:	DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU
Suplente:	DR. JUAN PABLO JARAMILLO CORREA
Suplente	DR. JOAQUÍN ARROYO CABRALES

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 28 de agosto de 2015



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

Agradecimientos

Posgrado en Ciencias Biológicas.

Beca CONACyT (Becario No. 210544, CVU 225685).

Tutor Principal y miembros del Comité Tutor: Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns del Instituto de Ecología, Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau del Instituto de Ecología y la Dra. Livia Socorro León Paniagua de la Facultad de Ciencias.

Agradecimientos a Título Personal

La Dirección General de Vida Silvestre de la SEMARNAT por los permisos de colecta (SGPA/DGVS/09578/09, SGPA/DGVS/01073/11, SGPA/DGVS/00644/12 y SGPA/DGVS/00709/13).

Al Dr. Luis E. Eguiarte y la Dra. Valeria Souza por aceptarme en su laboratorio. Agradezco el apoyo técnico proporcionado por M. en I.B.B. Laura Espinosa Asuar, Dra. Erika Aguirre Planter y M. en C. Patricia Padilla. A los miembros del jurado Dr. Victor G. Sánchez Cordero, Dr. Juan Pablo Jaramillo, Dr. Jorge Ortega, Dr. Joaquín Arroyo Cabrales y Drl. Daniel Piñero.

Agradezco a Yocelyn Gutiérrez Guerrero, Silvia Barrientos, Gabriel Manuel Rosas Barrera, Niza Gámez, Enrique Scheinvar, Santiago Ramírez-Barahona, Alejandra Moreno-Letelier, Alejandra Vázquez Lobo y Jaime Gasca por su apoyo en el trabajo de laboratorio y de escritorio. Al Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología, UNAM, por todo su apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

A todas las personas que me apoyaron durante el trabajo de campo para el muestreo de *Cynomys mexicanus*. Lisette Leyequien de la CONANP encargada del ANP “La Mojonera”, SLP; a los comisariados de los ejidos donde se llevó a cabo el trabajo de campo: Sr. Rosalio ejido El Gallo, SLP; Sr. Salvador ejido El Salado, SLP; Sr. Armando del ejido Tanque de López, SLP; Sr. Plácido y su esposa Nelly del ejido La Soledad, NL; toda la gente del ejido Chapultepec Coahuila; ejido Artesillas, Coahuila; ejido La Trinidad, NL; ejido El Salero, NL; al Lic. Ricardo Vasques Aldape y la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por su apoyo y permiso para el muestreo en el Rancho Los Ángeles, Coahuila; Alejandra Carrera Maines por su interés y apoyo para el muestreo en Coahuila; Profauna, en especial a Javier Lombardo, por todo su apoyo durante el muestreo de las colonias de Coahuila.

A las personas e instituciones que me apoyaron durante el muestreo de *C. ludovicianus*: Dr. Jorge Ortega, Dr. Gerardo Ceballos, la estación biológica La Pradera, Ana Montiel, Rafael Ávila, Alejandra de Villa, Eduardo Ponce, Rodrigo Sierra, Juan Cruzado, Rodrigo Holguín, Rancho El Uno, Emmanuel Rivera, Paulina Núñez, los ejidos y ranchos de Janos y Nuevo Casas Grandes, Chihuahua; Naturalia, en especial a Gerardo Carreón y Daniel Toyos, rancho Los Fresnos, por su apoyo durante el muestreo de perritos en Sonora; Dra. Reyna Castillo Gámez de la Universidad de Sonora, por proporcionarme muestras de la Mesa y por su apoyo durante el muestreo de las colonias Las Palmitas y La Mesa en Sonora; a Rogelio Molina Frenaner y CEDES; a los propietarios de los rancho La Mesa y Las Palmitas en Sonora por permitirnos trabajar en sus predios. A Loren C. Sackett por su buena disposición para colaborar y enriquecer este trabajo permitiéndome utilizar sus datos mitocondriales de los perritos de Colorado.

M en C. Emanuel Rivera Tellez por haber puesto en mi mente la posibilidad de incluir en este trabajo a los perritos del Museo del Desierto, Coahuila. Al Museo del Desierto Coahuila, en especial a Fernando Toledo Director del área de fauna y a Gerardo Martínez.

A todos los voluntarios, que trabajaron, rieron y a veces lloraron y se frustraron conmigo durante las salidas al campo: Román Silva, Oswaldo Mendoza, Carolina Durán, Sandra Luz Gómez, Fernando, Darío Escudero, Manuel Rosas Barrera, Erika Mendoza Varela, Jaime Gasca Pineda, Diego Contreras, Yocelyn Gutiérrez Guerrero, Reyna Castillo, Erandi Bonilla y Carlos Manuel Valdez.

Mi familia por todo su apoyo. A mi madre por que siempre ha estado ahí, al pendiente, apoyándome en todo y dandome ánimos para seguir. A mi hermano, por apoyarme siempre, ayudarme con sus conocimientos de diseño y sus consejos. A mi sobrina, que me ha puesto la marca para intentar ser un mejor ejemplo y está siguiendo mis pasos. A mi tía Liliana Morales por ser uno de los pilares en los que me apoyo. A mi padre. A mis amigos de toda la vida y mis queridas bailarinas, que me han acompañado durante este viaje.

Gracias a mis profesores Dr. Luis Eguiarte, Dra. Valeria Souza, Dr. Juan Pablo Jaramillo Correa, Dra. Susana Magallón y Dra. Ella Vázquez, y a los miembros de mi comité tutorial Dr. Daniel Piñero y Dra. Livia León Paniagua por sus enseñanzas que enriquecieron mi desarrollo y me ayudaron a madurar este proyecto.

Dr. Rurik H. List Sánchez por haber visto potencial en mi y haberme impulsado a seguir este camino. Al Dr. Jorge Ortega Reyes por haberme introducido al mundo de la genética de poblaciones. Al Dr. Gerardo Ceballos, a Jesus Pacheco y a todo el laboratorio de Ecología y Conservación de Fauna Silvestre, por haberme llevado a Janos, Chihuahua y haberme presentado a los perritos de las praderas.

Dr. Luis E. Eguiarte Fruns por haber sido mi profesor de genética de poblaciones y haberme impulsado a interesarme cada vez más en la biología evolutiva. Gracias por sus enseñanzas y por haberme dado la oportunidad de desarrollar este proyecto en su laboratorio.

Yocelyn Gutiérrez Guerrero, por haber aceptado trabajar conmigo. Gracias por tu entusiasmo contagioso y por haber hecho un excelente equipo, ha sido un placer trabajar contigo.

Índice

Resumen	5
Abstract	7
Presentación	9
Introducción	12
<i>Biología de la conservación: la visión actual y el papel de la genética en la conservación.</i>	15
<i>Revisión del avance en el conocimiento de la genética de poblaciones de roedores en México.</i>	18
<i>Historia evolutiva de los perros llaneros</i>	21
<i>Estudios moleculares de perros llaneros</i>	24
Capítulo 1. Genetic variation and structure in contrasting geographic distributions: widespread versus restricted black-tailed prairie dogs (subgenus <i>Cynomys</i>).	27
Capítulo 2. Peripatric speciation of an endemic species driven by Pleistocene climate change: the case of the Mexican prairie dog (<i>Cynomys mexicanus</i>).	64
Capítulo 3. Conservación de <i>Cynomys mexicanus</i> : el papel de la conservación <i>ex situ</i> en la persistencia de especies en peligro de extinción.	122
Conclusiones Generales	148
<i>Perspectivas</i>	150
Literatura citada	151
Apéndice 1. Genetic variation in a peripheral and declining population of black-tailed prairie dogs (<i>Cynomys ludovicianus</i>) from Mexico.	162
Apéndice 2. Correspondencia geográfica de los principales linajes de ardillas (Sciuridae): revisión filogenética de las ardillas del mundo.	181
Material suplementario. Revisión del avance en el conocimiento de la genética de poblaciones de roedores en México.	203

Resumen

La filogeografía se refiere al análisis filogenético de datos genéticos puestos en un contexto geográfico, y su meta principal es la comprensión de los factores causales que contribuyen a la divergencia de las poblaciones y los mecanismos que llevan a la especiación. Además, los estudios filogeográficos permiten identificar poblaciones que se deben atender desde el punto de vista de la conservación. Un sistema interesante para el estudio filogeográfico es el de los perros llaneros de cola negra (subgénero *Cynomys*), ardillas de tierra que se distribuyen únicamente en Norteamérica. Este subgénero incluye dos especies *Cynomys ludovicianus* y *C. mexicanus* que son consideradas especie clave e ingenieros ecosistémicos de los pastizales, por lo que son fundamentales para la permanencia de estos ecosistemas en Norteamérica. Sin embargo, ambas especies se han visto fuertemente afectadas por las actividades humanas, de manera que su estado de conservación es alarmante y requieren de medidas inmediatas para su recuperación. En el presente estudio se utilizaron 12 marcadores moleculares (región control y citocromo *b* del ADN mitocondrial (mtADN) y diez microsatélites nucleares) para abordar preguntas relacionadas con: 1) los patrones de diversidad genética de dos especies cercanamente relacionadas (una de amplia distribución y otra endémica); y 2) la historia evolutiva de los perros llaneros de cola negra, incluyendo el tiempo de divergencia entre las dos especies hermanas, y la historia demográfica de ambas especies. Esta aproximación permitió identificar poblaciones relevantes para la conservación, considerando las poblaciones de *C. ludovicianus* localizadas en el límite sur de su área de distribución (en los estados de Nuevo México, Chihuahua y Sonora; $n = 223$), y seis poblaciones silvestres y una en cautiverio de *C. mexicanus* (78 individuos silvestres y 18 en cautiverio). Se encontró que las poblaciones silvestres de *C. mexicanus* presentan altos niveles de variación genética (mtADN: $H_d = 0.778$; y $\pi = 0.0016$; y microsatélites nucleares: $A = 7$; $H_o = 0.509$; y $H_E = 0.591$;) en comparación con los niveles reportados para la especie hermana, aún tratándose de una especie de distribución restringida. Los niveles de variación, diferenciación ($F_{ST} = 0.203$ mtADN; y $G'_{ST} = 0.362$ microsatélites) y estructura genética presentes en *C. mexicanus* son similares a los observados a nivel local en *C. ludovicianus* (mtADN: $H_d = 0 - 0.829$; $\pi = 0 - 0.0026$; y $F_{ST} = 0.259$; y microsatélites nucleares: $A = 3.5 - 9.3$; $H_o = 0.431 - 0.437$; $H_E = 0.492 - 0.633$; y $G'_{ST} = 0.289$). Esto se relaciona con la divergencia reciente de *C. mexicanus* (hace $\sim 230,000$ años) a partir de una población relicto de *C. ludovicianus* que quedó aislada debido a los cambios de distribución promovidos por el cambio climático del Pleistoceno. Este evento de especiación peripátrica fue seguido de una expansión poblacional en ambas especies, que mitigó la pérdida de diversidad genética relacionada con el evento fundador por el que atravesó *C. mexicanus*. Además, se detectó la presencia de sitios climáticamente estables al sur de la distribución actual de *C. ludovicianus*, estos sitios pueden

poseer altos niveles de variación genética y son de particular importancia para la conservación de la especie. Las colonias analizadas de *C. ludovicianus* indican que hay alta variación genética en Chihuahua y Nuevo México, por lo que es importante proteger estas poblaciones. Sonora se encuentra aislada por la Sierra Madre Occidental y debe ser considerada como una unidad de manejo independiente, y se recomienda promover medidas de protección *in situ*. Las poblaciones de *C. mexicanus* presentan alta conectividad por lo que los planes de manejo y conservación deben enfocarse en mantener dicha conectividad entre las colonias. Finalmente, la población de *C. mexicanus* cautiva en el Museo del Desierto, presenta una alta variación y puede ser considerada como una candidata para reintroducción a la vida silvestre.

Abstract

Phylogeography refers to the phylogenetic analysis of genetic data within a geographic context. Its main goal is to understand the causal factors that contribute to population divergence and speciation. In addition, phylogeographic studies allow identifying populations that are important for conservation. An interesting system for such studies are black-tailed prairie dogs (subgenus *Cynomys*), ground squirrels that are endemic to North America. This subgenus includes two species, *Cynomys ludovicianus* and *C. mexicanus*, which are considered key species and ecosystem engineers, as they are of major importance for the long-term survival of North American grasslands. Nevertheless, these species have been severely affected by human activity. Their conservation status is alarming and they require immediate management action for their recovery. In this study, we used 12 molecular markers (control region and cytochrome *b* sections of the mitochondrial DNA (mtDNA) and ten nuclear microsatellites) to answer questions related to: 1) the patterns of genetic diversity in two closely related species (a widespread and an endemic one); and 2) the evolutionary history of black-tailed prairie dogs, including the time of divergence between them and their respective demographic history. This approach allowed identifying populations that are relevant for conservation, such as those from the southernmost area of *C. ludovicianus*' range (New Mexico, Chihuahua and Sonora; $n = 223$), and six wild populations and a captive one of *C. mexicanus* (78 wild individuals, and 18 captive individuals). We found that *C. mexicanus*, compared to levels reported for its sister species, show high levels of genetic variation (mtDNA: $H_d = 0.778$; and $\pi = 0.0016$; and nuclear microsatellite loci: $A = 7$; $H_O = 0.509$; $y H_E = 0.591$), even though it is a species with a restricted distribution. Levels of genetic variation, genetic differentiation ($F_{ST} = 0.203$ mtDNA; and $G'_{ST} = 0.362$ microsatellite) and genetic structure in *C. mexicanus* were similar to those found in *C. ludovicianus* at the local scale (mtDNA: $H_d = 0 - 0.829$; $\pi = 0 - 0.0026$; and $F_{ST} = 0.259$; and nuclear microsatellite loci: $A = 3.5 - 9.3$; $H_O = 0.431 - 0.437$; $H_E = 0.492 - 0.633$; and $G'_{ST} = 0.289$). These results relate to the recent divergence of *C. mexicanus* (c.a. 230,000 years ago) from a relict population of *C. ludovicianus* that became isolated because of changes in the distribution range promoted by Pleistocene climate change. This event of peripatric speciation was followed by population expansion in both taxa, which mitigated the loss of genetic variation in *C. mexicanus* associated to the founder effects. Furthermore, we detected two climatically stable areas in the southern area of the current range of *C. ludovicianus*. These sites might possess high levels of genetic variation and are of importance for the conservation of this species. The analyses for *C. ludovicianus* showed high genetic variation in Chihuahua and New Mexico, implying a key role for the conservation of the species. The Sonora population is isolated by the Sierra Madre Occidental and should be considered as an independent management unit that should be conserved *in*

situ. For *C. mexicanus*, the analyses revealed a high connectivity among colonies, implying that management plans should focus in maintaining this connectivity. Finally, the captive population of *C. mexicanus* from the Museo del Desierto, Saltillo, showed high genetic variation and should be considered a candidate for wildlife reintroduction.

Presentación

El presente trabajo se centra en la filogeografía y genética de la conservación de dos especies de perros llaneros de cola negra (*Cynomys mexicanus* y *C. ludovicianus*) con distribución en México. El objetivo general fue evaluar la distribución de la variación y estructura genética de las poblaciones de estas especies, considerando su contexto histórico y geográfico, con la finalidad de proponer estrategias relevantes para su manejo y conservación, y la de los pastizales que habitan. Para este fin, la presente tesis está estructurada en varias secciones que incluyen: una introducción general, tres capítulos principales en formato de artículo científico, y una sección de conclusiones generales, junto con las perspectivas de estudios que se derivan del presente trabajo. Finalmente, se incluyen dos apéndices con información relevante para la comprensión de la presente tesis.

En la introducción se proporciona un panorama general sobre la filogeografía y la genética de poblaciones, su relación con la conservación de las especies y los perros llaneros (*Cynomys*) como modelo de estudio. Posteriormente se revisa el avance que ha habido en estudios de genética de poblaciones de roedores en México, y se finaliza con la información actualizada de la historia evolutiva de los perros llaneros (*Cynomys*) y los estudios moleculares realizados hasta el momento.

Los tres capítulos principales constan cada uno de una introducción, métodos, resultados y la discusión de los mismos, que se relaciona con los objetivos particulares del presente trabajo. Los objetivos particulares fueron: 1) cuantificar la variabilidad y estructura genética en las poblaciones de perros llaneros en México; 2) determinar la influencia de los procesos históricos en la estructura genética de las poblaciones de estas especies en el país; 3) estimar el tiempo de divergencia de las poblaciones de *C. mexicanus* utilizando diversos marcadores moleculares; 4) identificar las poblaciones más relevantes para la conservación en términos de variabilidad genética; y 5) proponer acciones de manejo y conservación, basadas en datos genéticos, para las poblaciones de ambas especies de perro llanero presentes en México.

En el capítulo 1 (*Genetic variation and structure in contrasting geographic distributions: widespread vs. restricted black-tailed prairie dogs (subgenus Cynomys)*) se realiza una descripción y comparación de la variación y la estructura genética de las dos especies de perros llaneros presentes en México. El objetivo de este capítulo fue evaluar los patrones de variación genética, diferenciación genética y estructura genética en una especie restringida (*C. mexicanus*) y una especie cercanamente relacionada de distribución amplia (*C. ludovicianus*). Se cuantificó y contrastó la variabilidad y la estructura genética, con marcadores de ADN mitocondrial y nuclear, para poner a prueba la hipótesis de que las especies de amplia distribución poseen niveles de variación y estructura genética mayores que las especies de distribución restringida. Además, se puso a prueba la predicción de que *C. mexicanus*

presentará niveles de diferenciación genética entre colonias similares a las reportadas entre colonias de *C. ludovicianus* dentro de cada región ya que ambas especies tienen características biológicas muy similares. Finalmente, con base en los datos de variación y estructura genética se identificaron poblaciones relevantes para la conservación de ambas especies.

El capítulo 2 (*Peripatric speciation of an endemic species driven by Pleistocene climate change: the case of the Mexican prairie dog (Cynomys mexicanus)*) tiene como objetivo inferir los procesos que influyeron en la divergencia de una especie endémica del Altiplano Mexicano (*C. mexicanus*) a partir de un ancestro de amplia distribución y, poner a prueba la hipótesis de que esta especie se originó por especiación peripátrica. Se analizó la influencia de los procesos históricos (particularmente los cambios climáticos del Pleistoceno) en la variación y estructura genética de ambas especies de perros llaneros a través de proyecciones de nicho al pasado. Se estimó el tiempo de divergencia de estas especies hermanas, y se plantearon y contrastaron ocho hipótesis respecto al origen de *C. mexicanus* a partir de una población relicto de *C. ludovicianus* por medio de análisis Bayesianos. Las hipótesis consideradas contrastan cuatro tiempos de divergencia y dos modelos demográficos (población constante o expansión poblacional).

El capítulo 3 (Conservación de *Cynomys mexicanus*: el papel de la conservación *ex situ* en la persistencia de especies en peligro de extinción) se enfoca en la genética para la conservación de la especie endémica y en peligro de extinción (*C. mexicanus*). Este capítulo tuvo como objetivo evaluar la variación genética presente en una población cautiva y determinar si ésta representa una población candidata para esfuerzos de reintroducción. Se comparó la variación genética de esta población y su diferenciación genética respecto a seis poblaciones silvestres (incluyendo la población fundadora). Este capítulo retoma información reportada en la tesis de licenciatura de la Bióloga Yocelyn Gutiérrez Guerrero, pero a diferencia de ésta se incluye en el análisis la región del citocromo *b* del ADN mitocondrial y un microsatélite nuclear adicional. Además se toman datos reportados de tamaño y conectividad de todas las poblaciones silvestres muestreadas con la finalidad de profundizar en el análisis de la genética de poblaciones de esta especie y proponer acciones para su manejo y conservación tanto *in situ* como *ex situ*.

A continuación se presenta una sección de conclusiones generales tomadas de los tres capítulos principales y relacionadas con los objetivos particulares del presente trabajo. Además, se incluye una sección de perspectivas en la que se realizan propuestas para estudios posteriores que permitan continuar avanzando en la comprensión de la distribución de la variación genética en estas especies y en el mejoramiento de los planes de manejo y conservación de estas especies clave y en peligro.

Dentro del marco del presente trabajo se presentan dos apéndices. El apéndice 1 (Castellanos-Morales et al. 2014. *Genetic variation in a peripheral and declining population of black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) from Mexico. Journal of Mammalogy, 95(3):467-479*) es el antecedente directo al presente trabajo. Es un estudio de genética de poblaciones de 13 colonias de *C. ludovicianus* localizadas en la Reserva de la Biósfera de Janos, Chihuahua. Este sitio constituye el límite sur del área de distribución de esta especie, además de considerarse como una población periférica, aislada y en declive. Sin embargo, contrario a lo esperado, se encontró alta variación genética que se atribuye a la estructura dada por la presencia de grupos familiares dentro de las colonias (efecto Wahlund), y también se relaciona con la historia de esta población.

Finalmente, el apéndice 2 (Correspondencia geográfica de los principales linajes de ardillas (Sciuridae): revisión filogenética de las ardillas del mundo) es un meta-análisis en el que se retoman datos del citocromo *b* del ADN mitocondrial de distintas especies de Sciuridos reportados en el GenBank. Se realizaron análisis filogenéticos (parsimonia y máxima verosimilitud) para determinar las relaciones entre las tribus que componen a esta familia de roedores, y se determinó la concordancia geográfica de cada uno de los clados que constituyen a estas tribus. Cabe resaltar que las ardillas terrestres (Marmotini), entre las que se encuentran los perros llaneros (*Cynomys*), es un clado que se distribuye principalmente en América, con unos cuantos representantes Euroasiáticos, y que dentro de esta tribu se encuentran varias especies endémicas de México, algunas de origen reciente.

Introducción

La filogeografía se refiere a los análisis filogenéticos puestos en un contexto geográfico, y su meta principal es la comprensión de los factores causales y los mecanismos que contribuyen a la divergencia de las poblaciones y llevan a la especiación (Avice 1987; Hickerson et al. 2010; Eckert 2011). La filogeografía se basa en la interpretación geográfica de datos genéticos intraespecíficos, que permiten inferir la estructura y demografía históricas y actuales de las poblaciones, de manera que constituye un puente entre el estudio de los procesos micro y macroevolutivos que contribuyen a la divergencia de los linajes (Eckert 2011).

En sus inicios, la filogeografía se basó en la inferencia de eventos históricos por medio de la comparación de la topología de árboles filogenéticos y la distribución geográfica de las especies. Sin embargo, en la actualidad la filogeografía estadística pretende evaluar la probabilidad de distintos escenarios tomando como base datos descriptivos obtenidos a partir de registro fósil y de estudios genéticos previos que permiten desarrollar y probar hipótesis alternativas (Eckert 2011).

Desde el punto de vista de la genética de la conservación, los estudios filogeográficos permiten comprender los procesos históricos que determinaron la manera en que se distribuye la variación genética, como los eventos demográficos que han afectado a las poblaciones a lo largo de su historia evolutiva. Al contrastar esta información con el estado actual de las poblaciones podemos ampliar nuestra comprensión del efecto de las actividades antropogénicas en la variación genética de poblaciones en riesgo. Asimismo, este enfoque permite identificar poblaciones que cuentan con una variación y estructura genética particular que las distingue del resto de las poblaciones que conforman a la especie, y pueden representar Unidades de Manejo (MUs) o Unidades Evolutivas Significativas (ESUs), que se deben atender desde el punto de vista de la conservación (Moritz 1994).

En la actualidad la noción de preservar los procesos biológicos, y no solo a las especies, ha tomado fuerza (Meffe et al. 1997). En este contexto, la conservación de especies clave, cuyo impacto en la comunidad o ecosistema es considerable y desproporcionado con respecto a su densidad, deben ser una de las prioridades para la conservación (Meffe et al. 1997).

Los perros llaneros de cola negra o perritos de la pradera (subgénero *Cynomys*) son un sistema de estudio relevante, tanto por su importancia ecológica como por su interés evolutivo. Estos son ardillas de tierra que se distribuyen únicamente en Norteamérica, son considerados especies clave e ingenieros ecosistémicos de los pastizales que habitan, y han sido fuertemente afectados por las actividades humanas (Miller et al. 2000). Sus hábitos fosoriales y de forrajeo promueven la productividad de la vegetación, proporcionan refugio para muchas especies y contrarrestan la pérdida del pastizal (Miller et al. 2000; Martínez-Estévez et al. 2013; Sierra-Corona et al. 2015). Además, son

presa importante para muchos depredadores como el águila real, los coyotes, los tlalcoyotes, las zorritas norteñas y las serpientes de cascabel (Hoogland 1996). Estas características hacen que los perros llaneros sean fundamentales para la permanencia de los pastizales de Norteamérica, quienes se encuentran en riesgo de desaparecer por el cambio en el uso de suelo, el sobrepastoreo, el avance del mezquite y la sequía (Ávila-Flores 2009; Slobodchikoff et al. 2009). Sin embargo, al considerarse competencia del ganado las poblaciones en gran parte de su área de distribución en Estados Unidos de América (EUA) han estado sujetas a control por medio de cacería y envenenamiento desde principios de los 1900s (Hoogland 1996; Sierra-Corona et al. 2015), mientras que en México estas campañas fueron limitadas y se prohibieron a finales de los 1980's (Ceballos et al. 1993). Las intensas campañas de erradicación aunadas a la introducción de *Yersinia pestis* en América alrededor de los 1920's (Hoogland 1996), han llevado a sus poblaciones a una considerable reducción y fragmentación, principalmente en EUA donde se ha reportado hasta un 90% de mortalidad relacionada con esta enfermedad (Ceballos et al. 2010; Scott-Morales et al. 2005; Slobodchikoff et al. 2009). En México no se ha reportado la presencia de *Y. pestis* en ninguna de las dos especies (Ceballos et al. 1993; Treviño-Villareal et al. 1998).

En la actualidad, *Cynomys ludovicianus* ocupa únicamente alrededor del 2% de su distribución histórica (Slobodchikoff et al. 2009) y se encuentra protegida por la ley sólo en algunas partes de su distribución (SEMARNAT 2010), mientras que su especie hermana *C. mexicanus*, endémica de México, ha perdido alrededor del 64% de su área de distribución histórica, de por sí restringida (Scott-Morales et al. 2005; Treviño-Villarreal y Grant 1998), y se encuentra en peligro de extinción (CITES 2010; IUCN 2010; SEMARNAT 2010). Cabe señalar que recientemente las poblaciones de *C. ludovicianus* de Sonora y Chihuahua han pasado por disminuciones drásticas de sus tamaños poblacionales, de causas desconocidas, quedando sólo una de las dos poblaciones registradas anteriormente en el estado de Sonora (G. Carreón 2013, *com. pers*; Amador-Alcalá et al. 2014) y habiendo perdido el 73 % de las colonias presentes en Chihuahua entre 1988 y 2013 (Pacheco et al. 2014). Por lo que su estado de conservación es alarmante y requieren de medidas inmediatas para su recuperación.

Tradicionalmente, en los estudios filogeográficos de mamíferos se ha utilizado la región control del ADN mitocondrial (Awise 2000). Ésta es una región hipervariable que presenta altas tasas de evolución molecular en comparación con otras regiones del ADN mitocondrial y permite explorar eventos históricos a nivel intraespecífico (Awise 1998, 2009; Arif y Khan 2009; Wang 2011). Por otra parte, la región del citocromo *b* del ADN mitocondrial es una región codificante que presenta tasas de evolución menores a las de la región control y se ha utilizado para abordar preguntas relacionadas con

filogenia y tiempos de divergencia entre las especies en mamíferos (Kocher et al. 1989; Avise et al. 1998; Harrison et al. 2003; Nabholz et al. 2008). Ambos marcadores mitocondriales se heredan por vía materna, de manera que ofrecen una visión parcial de los sucesos históricos que determinan la manera en que se distribuye la variación en las poblaciones (Avise et al. 1987, 1998; Sunnucks 2000; Nabholz et al. 2008; Arif y Khan 2009; Avise 2009).

Los microsatélites nucleares, por otra parte, son marcadores neutrales que presentan altas tasas de mutación y alta variación y, permiten explorar eventos que han afectado a las poblaciones en tiempo reciente. Éstos son de herencia biparental y su uso en combinación con marcadores de ADN mitocondrial permiten distinguir procesos que determinan la distribución de la variación relacionados con diferencias entre los linajes materno y paterno (Avise 1998; Sunnucks 2000; Selkoe y Toonen 2006; Arif y Khan 2009).

En este estudio, se utilizaron doce marcadores moleculares (región control, citocromo *b* y diez microsatélites nucleares) para abordar preguntas relacionadas con la historia evolutiva y actual de los perros llaneros de cola negra (subgénero *Cynomys*). Los resultados de este estudio enriquecen el conocimiento biológico sobre la especie endémica, *C. mexicanus*, que se ha estudiado desde el punto de vista ecológico (Pizzimenti y McClenaghan 1974; Ceballos et al. 1993; Mellink y Madrigal 1993; Treviño-Villarreal y Grant 1998; Treviño-Villarreal et al. 1998; Scott-Morales et al. 2004, 2005; Rioja-Paradela y Scott-Morales 2004; Mellado et al. 2005; Yeaton y Flores-Flores 2006; Rioja-Paradela et al. 2008; Estrada-Castillón et al. 2010; González et al. 2012; Hernández-Gómez et al. 2012; Pando-Moreno et al. 2013), pero ha sido poco estudiada desde el punto de vista genético (McCullough y Chesser 1987; Guevara-Chumacero et al. 2006). El presente trabajo es un aporte significativo para el conocimiento filogeográfico de los mamíferos de México que permite avanzar en la comprensión de los procesos evolutivos que han afectado a las biotas de las zonas áridas de Norteamérica.

Biología de la conservación: la visión actual y el papel de la genética en la conservación.

La biología de la conservación fue propuesta originalmente como una disciplina de crisis, en la que se debe actuar de manera informada y racional, pero a veces antes de conocer todos los hechos (Frankel y Soulé 1981). Soulé (1985, pp. 727) la definió como “una nueva etapa en la aplicación de la ciencia a los problemas de conservación, que aborda la biología de las especies, comunidades y ecosistemas que son perturbadas de manera directa o indirecta por las actividades humanas y otros agentes. Su meta es proveer de principios y herramientas para preservar la diversidad biológica”.

Desde su inicio, la biología de la conservación fue considerada un área multidisciplinaria que aborda temas tanto biológicos como sociales. El objetivo de esta disciplina fue planteado en el sentido de la protección y continuidad de las comunidades y ecosistemas completos (Soulé 1985). Se ha avanzado de manera considerable en las bases teóricas relacionadas con la biología de la conservación y la manera en que se abordan estos problemas ha evolucionado conforme se generan nuevos datos (Frankham 2010). Sin embargo, las preocupaciones que originalmente abordaba esta disciplina siguen vigentes 30 años después: el estudio de las consecuencias ecológicas y en la salud de la contaminación química, de la introducción de especies exóticas y de cepas producidas artificialmente, los sitios y tamaños de los parques nacionales, la definición de las condiciones mínimas para poblaciones viables de especies particulares, la frecuencia y el tipo de prácticas de manejo en refugios existentes y en áreas silvestres manejadas y el efecto ecológico del desarrollo (Frankham 2010).

En la visión propuesta por la biología de la conservación, el enfoque se centra en la integridad y continuidad de los procesos naturales, más que en la preservación de individuos o de especies aisladas (Soulé 1985). En este sentido, la diversidad genética es considerada uno de los niveles de biodiversidad que deben conservarse (IUCN 2014) y la genética para la conservación es una disciplina que involucra la aplicación de la genética evolutiva y molecular a la conservación de la biodiversidad (Frankham 2010).

De acuerdo con Ouborg (2010), el nacimiento de la genética para la conservación es atribuido a Frankel y Soulé (1981), quienes por primera vez abordaron en detalle que la conservación de las poblaciones y las especies tienen componentes evolutivos y genéticos claramente identificables. La premisa principal en la que se basa la genética para la conservación es que en poblaciones pequeñas la deriva génica y la endogamia afectan la variación alélica y genotípica dentro de las poblaciones en función de su tamaño efectivo (Ouborg 2010; Ouborg et al. 2010a). De esta manera, se espera que las especies amenazadas presenten niveles de diversidad genética menores que los observados en sus

contrapartes no amenazadas, así como niveles de endogamia mayores, que pueden llevar a una disminución en la adecuación, es decir depresión por endogamia. En general, en los estudios empíricos se ha observado una correlación positiva entre el nivel de variación y el tamaño de las poblaciones. Sin embargo, no todas las especies amenazadas responden de la misma manera a la disminución en el tamaño poblacional provocado por la actividad humana y, la respuesta depende de la historia evolutiva y demográfica de la especie de estudio (Kohn et al. 2006; Ouborg 2010).

La genética para la conservación ha sido fundamental para la resolución de incertidumbres taxonómicas, en la definición de unidades evolutivas divergentes para manejo de especies y en el manejo genético de poblaciones silvestres para minimizar el riesgo de extinción (Frankham et al. 2004; Frankham 2010), así como en el manejo genético de poblaciones en cautiverio para minimizar la endogamia y la pérdida de diversidad y, para maximizar el éxito de reintroducción (Frankham et al. 2004; Frankham 2010). También ha contribuido en el manejo de las especies invasoras y su impacto en las especies amenazadas y, en la obtención de información biológica importante para la conservación de las especies (p. e., tamaño poblacional, historia demográfica, sistema de apareamiento, estructura poblacional, flujo génico, paternidad, entre otras) (Frankham et al. 2004; Frankham 2010). Además, se ha integrado con variables demográficas y ambientales, junto con datos de catástrofes e impacto humano, para predecir el riesgo de extinción y comparar alternativas en los programas de recuperación de especies (Frankham 2010; Primmer 2009). Sin embargo, a pesar de existir literatura extensa referente a la genética para la conservación, Frankham (2010) y Ouborg (2010) concluyen que hasta el momento se ha fallado en considerar los temas genéticos en el manejo de especies silvestres. Por lo tanto, el reto más importante para la biología de la conservación es integrar la información genética en el diseño de programas de manejo de poblaciones fragmentadas de especies silvestres amenazadas.

Uno de los principales avances teóricos en el campo de la genética para la conservación es el desarrollo de una gran cantidad de modelos capaces de incorporar cada vez más atributos de historia de vida y mayor complejidad del paisaje. Esto con la finalidad de realizar predicciones más realistas sobre la dinámica de la variación genética en el tiempo y el espacio (Ouborg 2010). Sin embargo, hay poca información empírica referente al impacto a largo plazo que tiene la pérdida de variación genética sobre el riesgo de extinción de las especies (Frankham 2010). Por lo tanto, es necesario realizar planes que consideren el monitoreo ecológico y genético a largo plazo de las especies en riesgo. Se requiere conocimiento adicional en tópicos como la depresión por exogamia y el costo de la endogamia en poblaciones silvestres (Frankham 2010). Además, se debe evaluar la contribución relativa de la genética *vs.* otros factores al riesgo de extinción de las especies y, realizar estimaciones de la variación genética cuantitativa en especies amenazadas (Frankham 2010).

La tendencia actual en la genética de poblaciones y en la genética para la conservación será utilizar datos genómicos. Por esta razón, la genómica para la conservación se ha definido como el uso de técnicas genómicas para resolver problemas de conservación (Allendorf et al. 2010; Avise 2010). Una aproximación genómica en la genética para la conservación permitirá obtener datos más precisos del tamaño efectivo poblacional (N_e), la historia demográfica, los niveles de endogamia, las tasas de flujo génico, la diferenciación entre poblaciones y el estatus taxonómico. El reto más importante en esta área es desarrollar medios que permitan medir la diversidad genética adaptativa en un contexto genómico, ya que la genómica provee una oportunidad realista para detectar loci bajo selección e identificar loci involucrados en la especiación (Allendorf et al. 2010; Frankham 2010; Ouborg et al. 2010a; Primmer 2009; Steiner et al. 2013).

En el futuro se deberá utilizar información proporcionada tanto por herramientas genómicas como por herramientas moleculares tradicionales ya que son aproximaciones complementarias con objetivos distintos para la conservación de especies en riesgo (Allendorf et al. 2010; Avise 2010; Frankham 2010; Ouborg 2010; Ouborg et al. 2010a, 2010b; Primmer 2009; Steiner et al. 2013). La genética para la conservación reconstruye los procesos poblacionales genéticos y demográficos, mientras que la genómica para la conservación dilucida los mecanismos que subyacen a la reducción en la adecuación, a la llamada depresión por endogamia y mecanismos que subyacen a la adaptación local y la mal-adaptación en poblaciones reducidas y en especies amenazadas (Ouborg et al. 2010a).

En México la genética para la conservación es una disciplina de desarrollo relativamente reciente (Piñero y Eguiarte 1988; Eguiarte 1990; Eguiarte et al. 1992) y, aún es necesario generar información básica referente al estado genético de las poblaciones silvestres y en cautiverio de las especies amenazadas. Además, es necesario implementar el uso de la genómica para la conservación para la comprensión del papel de las adaptaciones locales en la divergencia de las poblaciones y especies. Finalmente, es imperativo crear vínculos entre investigadores dedicados a la genética para la conservación y las organizaciones, investigadores, grupos y agencias gubernamentales dedicados al planteamiento de planes de manejo para la recuperación de especies en riesgo, y que los usuarios comprendan la importancia de la genética en la conservación. Esto con la finalidad de implementar de manera rutinaria las medidas de manejo sugeridas a partir de análisis genéticos en el diseño de planes para la conservación de especies. Lo anterior debe realizarse tomando en cuenta que la genética es sólo una de las consideraciones que afectan la viabilidad de las poblaciones y es importante integrarla en un contexto general junto con las variables demográficas y ambientales (Frankham 2010; Ouborg et al. 2010a).

Revisión del avance en el conocimiento de la genética de poblaciones de roedores en México.

México es un país megadiverso que ocupa el 3er. lugar en cuanto a diversidad de mamíferos, que comprende el 11% de las especies del mundo (Ceballos y Oliva 2005; Sarukhán et al. 2009). De las 535 especies de mamíferos descritas hasta el momento, 161 son consideradas endémicas del país (Sarukán et al. 2009). Dentro de los mamíferos, Rodentia es el orden más diverso en cuanto a total de especies y a número de especies endémicas. Este orden está representado en México por 235 especies, de las cuales 113 son endémicas del país [74 mурidos (65.49%), 12 heterómidos (10.62%), 13 tuzas (11.5%), 13 ardillas (11.5%) y 1 agoutí (0.88%)]. Esta alta diversidad se ha asociado con el área, la latitud, la historia geológica, los patrones climáticos, la topografía y los diversos tipos de vegetación presentes en el país (Ceballos y Oliva 2005; Vázquez-Domínguez y Vega 2006; Sarukhán et al. 2009).

A pesar de la gran diversidad de mamíferos presentes en México, se han realizado pocos estudios de genética de poblaciones sobre ellos (Sarukhán et al. 2009). Desde 1995 y hasta el 26 de enero de 2015 se habían publicado 68 artículos de genética de poblaciones de mamíferos silvestres en México, con una producción de 1 a 13 publicaciones por año (Tabla 1 y Fig. 1, Material Suplementario) y un incremento significativo en el número de publicaciones producidas por año a partir de 2007 (Fig. 1 Material Suplementario). Esto contrasta con lo reportado por Vázquez-Domínguez y Vega (2006); hasta ese momento se habían publicado menos de 30 artículos científicos a cerca de la genética de poblaciones de mamíferos mexicanos y muchos de estos se realizaron en instituciones extranjeras.

Por otra parte, para dar a conocer los resultados de estos estudios, es importante que se realicen publicaciones en revistas científicas y, preferentemente, de circulación internacional (Vázquez-Domínguez y Vega 2006). Hasta el momento, la revista en que se ha realizado la mayoría de las publicaciones es el *Journal of Mammalogy*, seguida de el *Acta Chiropterologica* (Figs. 2 y 3 Material Suplementario), y la revista con mayor índice de impacto en la que se ha publicado es *Molecular Ecology Resources* con 5.626 (Hernandez-Davila et al. 2012) (Fig. 3 Material Suplementario).

En cuanto a composición de especies, los estudios consideran al 22.5% de los géneros y el 9% de las especies de mamífero presentes en México (de acuerdo con la diversidad de mamíferos de México reportada por Ceballos y Oliva 2005) (Tabla 1 Material Suplementario). Los roedores son el orden en el que se han realizado más estudios (24 estudios; Tabla 1 y Fig. 4 Material Suplementario), sin embargo, en éstos se representa únicamente el 39.1% de los géneros y el 8.5% de las especies mexicanas dentro del orden.

La familia de roedores mejor estudiada es Cricetidae con 11 estudios realizados en nueve géneros distintos, seguida por Heteromyidae y Sciuridae con cinco estudios cada uno. Finalmente, dentro de la familia Geomyidae se han realizado dos estudios con especies del género *Thomomys* (Tabla 2 Material Suplementario). Cabe señalar que 11 de estos estudios se han realizado con especies endémicas de México.

Al realizar un análisis más fino sobre los estudios de genética de poblaciones de roedores mexicanos, observamos que la mayoría han utilizado marcadores moleculares únicamente del ADN mitocondrial (mtADN) o del ADN nuclear (ncADN): 14 han utilizado alguna región del mtADN (13 con citocromo *b*; uno con ND2-ND4; uno con región control; dos con citocromo *b* y citocromo oxidasa III (COIII); y uno con citocromo *b* y D-Loop), y siete han utilizado únicamente marcadores de ncADN (uno con ISSRs, dos con aloenzimas y cuatro con microsatélites). A pesar de que el uso conjunto de marcadores de ncADN y mtADN permite llegar a conclusiones más robustas sobre la historia evolutiva y demográfica de los organismo, muy pocos estudios han combinado marcadores moleculares de ambas regiones del genoma (dos realizados con microsatélites y uno con intrones de genes nucleares) (Tabla 2 Material suplementario). Por lo tanto, es necesario implementar esta metodología de manera rutinaria en los estudios de genética poblacional, no sólo de roedores sino de todos los mamíferos mexicanos.

Los temas que abordan los estudios realizados con roedores son variados, e incluyen: variación y estructura genéticas (siete estudios), filogeografía y filogenia, sistemática (14 estudios) y genética del paisaje (un estudio). Del total de artículos, 11 abordan las implicaciones que tienen los resultados para la conservación de las especies de roedores de México (Tabla 2 Material suplementario). Además, los tamaños muestrales son muy variados y, dependen del objetivo de cada estudio y el área de distribución de las especies estudiadas. Estos van desde unos pocos individuos por especie para los análisis filogenéticos hasta muestras poblacionales provenientes de toda el área de distribución para estudios de filogeografía, particularmente de las especies endémicas de México.

Un claro reflejo del avance que ha habido en el estudio genético de los mamíferos mexicanos es que en el XII Congreso Mexicano de Mastozoología, realizado en la ciudad de Puebla en 2014, se presentaron 28 exposiciones orales y una conferencia magistral sobre estudios genéticos. De estos, la mayoría fue realizado con roedores (11 resúmenes: 5 con especies de la familia Cricetidae, 3 con especies de la familia Heteromyidae y 4 con especies de la familia Sciuridae). La mayor parte de los análisis se realizaron con ADN mitocondrial y trataron sobre filogenética, filogeografía y sistemática, aunque también hubo trabajos sobre variación y estructura genética. Cabe señalar que se presentaron un trabajo de genómica de *Didelphis virginiana* (Nigenda et al. 2014), un trabajo de genética del paisaje de *Liomys pictus* (Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez 2014) y un trabajo de genética de la

conservación de una especie endémica en cautiverio (*Cynomys mexicanus*; Gutiérrez-Guerrero et al. 2014). Sin embargo, aunque ha habido un avance considerable en el estudio de los mamíferos mexicanos con respecto a lo reportado en 2006 por Vázquez-Domínguez y Vega, aún queda mucho camino por recorrer.

Es necesario continuar realizando investigación básica sobre filogenética, sistemática, filogeografía, variación genética y estructura genética que nos permitan describir los patrones de diversidad de mamíferos presentes en México. Sin embargo, también es importante comenzar a incursionar activamente en áreas como la genética del paisaje o los estudios de genómica que permitan abordar preguntas relacionadas con adaptaciones locales y especiación. Además, se requieren estudios evolutivos que sean menos descriptivos y prueben hipótesis específicas sobre la historia evolutiva de los mamíferos de México como los propuestos por la filogeografía estadística, y estudios de filogeografía comparada que permitan comprender mejor los procesos que han conformado las comunidades de mamíferos mexicanos y describir patrones que ayuden a comprender la alta diversidad presente en el país.

Finalmente, es necesario realizar estudios que no sólo indiquen cuales son las implicaciones de los resultados para la conservación de los mamíferos mexicanos, sino que tengan como objetivo específico proponer medidas de conservación y manejo de mamíferos mexicanos, como el realizado por Gasca-Pineda et al. (2013) en *Ovis canadensis*. Estos estudios deben enfocarse hacia el análisis de endogamia en poblaciones cautivas y silvestres, pedigrees, coeficientes de parentesco, propuestas para reintroducción y translocación a partir de datos genéticos, entre otros. Además, es necesario gestionar que estos lineamientos se apliquen en los programas de manejo y conservación de especies de mamíferos silvestres de México.

Historia evolutiva de los perros llaneros

El género *Cynomys* pertenece a la familia *Sciuridae* (ardillas, marmotas y perros llaneros) del orden de los roedores y, está constituido por cinco especies clasificadas en dos subgéneros. El subgénero *Cynomys* o perros llaneros de cola negra, se compone por dos especies: *C. ludovicianus* y *C. mexicanus*; mientras que el subgénero de los perros llaneros de cola blanca o *Leucocrossuromys* está conformado por tres especies: *C. gunnisoni*, *C. leucurus* y *C. parvidens* (Slobodchikoff et al. 2009).

La separación de los subgéneros no se basa únicamente en la coloración de la cola, ya que se han registrado diferencias conductuales y fisiológicas entre los representantes actuales de ambos subgéneros. Dentro del subgénero *Cynomys*, ambas especies son altamente coloniales y sociales, modifican su ambiente activamente, realizan una búsqueda aleatoria de alimento, no presentan hibernación obligada y maduran a los dos años de edad. Por otra parte, los representantes del subgénero *Leucocrossuromys*, son organismos moderadamente coloniales y sociales, no modifican su ambiente de manera tan activa, realizan una búsqueda dirigida de alimento, maduran al año de edad y presentan hibernación obligada (Goodwin 1995; Slobodchikoff et al. 2009).

Se han registrado diferencias en los ambientes que habita cada especie en la actualidad por ejemplo, dentro del subgénero *Cynomys*, *C. ludovicianus* se distribuye en praderas de pastos cortos y mixtos (Goodwin 1995) desde el sur de Canadá hasta el norte de México y en Arizona, Colorado y Montana al oeste, las Dakotas y Nebraska al este (Slobodchikoff et al. 2009), con altitudes que van de los 1,400 a los 1,700 msnm (Mead et al. 2010) (Fig 5). *C. mexicanus* es endémico de México y se considera una especie relictual del Pleistoceno tardío que habita pastizales pequeños (Goodwin 1995) localizados en los valles y cuencas intermontanas al norte y este de la Sierra Madre Oriental, en altitudes que van desde los 1,600 hasta 2,200 msnm en un área restringida de 500 km² ubicada en los estados de Coahuila, Nuevo León, Zacatecas y San Luis Potosí (Mead et al. 2010) (Fig 5). En el caso del subgénero *Leucocrossuromys*, *C. gunnisoni* habita los pastizales y la estepa arbustiva de las Rocallosas, al norte de Arizona y Nuevo México y al sudoeste de Colorado y sudeste de Utah. *C. leucurus* y *C. parvidens* habitan en estepas arbustivas de las Rocallosas centrales, la primera se distribuye en el oeste de Colorado, sudoeste de Wyoming y sur de Montana, mientras que la segunda se restringe a unas cuantas localidades del sur y centro de Utah (Slobodchikoff et al. 2009) (Fig 5).

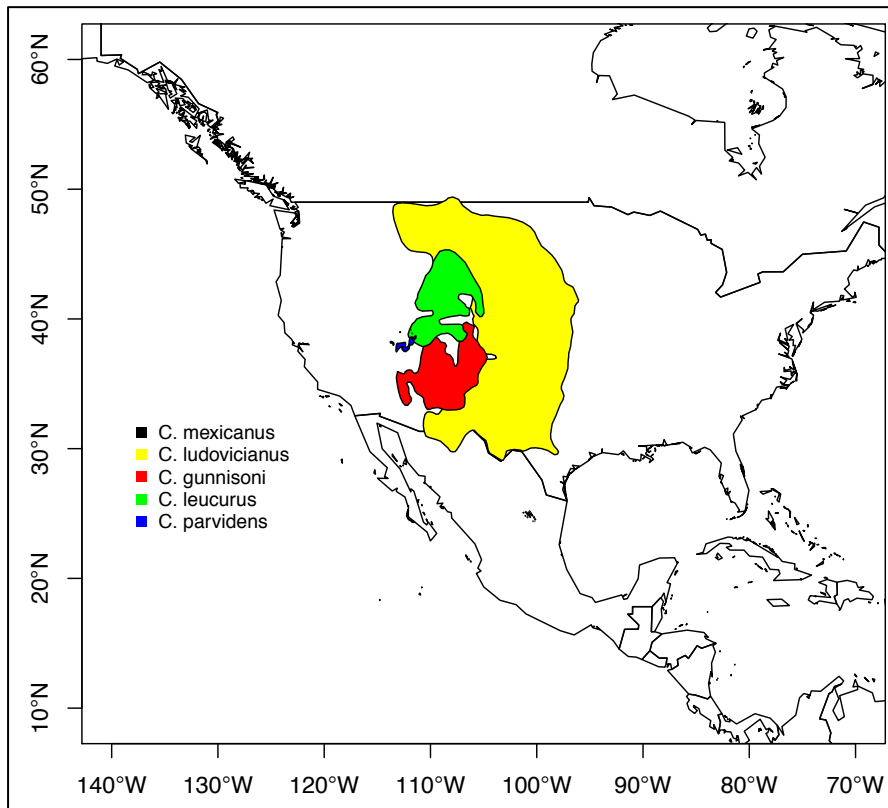


Figura 5. Distribución actual de las cinco especies del género *Cynomys*.

En la distribución actual existe sobreposición limitada entre subgéneros, con zonas de contacto entre *C. gunnisoni* y *C. ludovicianus* en Nuevo México. Entre las especies dentro del mismo subgénero (*Leucocrossuromys*) hay zonas de contacto entre *C. gunnisoni* y *C. leucurus* en Wyoming (Goodwin 1995) (Fig. 5).

Cynomys cuenta con un registro fósil relativamente bueno; en el pasado existieron tres especies adicionales de perros llanero de cola negra (subgénero *Cynomys*: *C. andersoni*, *C. sappensis* y *C. spenceri*) y una de perro llanero de cola blanca (subgénero *Leucocrossuromys*: *C. niobrarius*) (Goodwin 1995; Mead et al. 2010). Los fósiles más antiguos del género *Cynomys* pertenecen al periodo Blancano tardío del Plioceno tardío (hace 2.4 a 1.8 mda) (Mead et al. 2010), mientras que los primeros fósiles de ambos subgéneros pertenecen al Pleistoceno temprano y se encontraron en las Grandes Planicies (Goodwin 1995). Los perros llaneros de cola negra (subgénero *Cynomys*) aparecen por primera vez en el registro fósil en el sur de las Grandes Planicies en el Irvingtoniano temprano (entre 1.8 a 0.75 mda) y mantuvieron su presencia en la parte sur y central de las Grandes Planicies hacia el Irvingtoniano medio (0.75 a 0.5 mda). Durante este periodo, no se tiene registro de perros llaneros de cola blanca (subgénero *Leucocrossuromys*) en las Grandes Planicies, pero se tienen registros provenientes de la parte sur-central de Colorado (Goodwin 1995). Durante el Irvingtoniano tardío (hace 0.5 a 0.3 mda) la especie

extinta *C. niobrarius* estaba presente desde el sur de Canadá hasta el centro de Kansas y otra especie no identificada se encontraba del sur de Nebraska al norte de Texas. Para el periodo Sangamoniano (entre 125,000 y 75,000 años), los perros llaneros de cola negra y de cola blanca se encontraban en el sur de Nebraska y en Colorado (Goodwin 1995). Los cambios biogeográficos ocurridos durante el Pleistoceno tardío (0.12 – 0.01 mda) incluyen la expansión al norte de *C. niobrarius* durante el repliegue glacial del Sangamoniano (125,000 – 75,000 años) y Farmdaliano (40,000 – 22,000 años) y, la dispersión hacia el este de *C. ludovicianus* durante la expansión del pastizal en el Farmdaliano. Ambos linajes retuvieron sus distribuciones centrales a lo largo del Pleistoceno tardío (Goodwin 1995).

Más recientemente, durante el Wisconsiniano (75,000 – 10,000 años), *C. ludovicianus* se extendía desde el norte de México en Chihuahua hasta el centro de Nebraska y del oeste de Iowa al este de Kansas. *C. ludovicianus* y *C. gunnisoni* se encontraban en las partes altas del sur de Nuevo México, en ocasiones en las mismas localidades y es posible que *C. mexicanus* se encontrara hasta el sudeste de Nuevo México (40,000 – 22,000 años) (Goodwin 1995). Estos datos señalan que han existido diferencias en cuanto al área de distribución de cada especie con respecto a la actualidad; ésta pudo haberse formado después de la transición del Pleistoceno al Holoceno (Goodwin 1995). De hecho, Truett et al. (2006) han sugerido que la distribución de los perros llaneros era restringida y que la distribución actual, particularmente en el norte del Desierto Chihuahuense, está relacionada con una expansión del área de distribución promovida por la introducción del ganado en el siglo XVII.

La evidencia fósil indica, además, que los perros llaneros del subgénero *Cynomys* se distribuían en gran parte de México durante el Pleistoceno tardío, con 2 registros fósiles mucho más al sur de la distribución actual, en los estados de Jalisco e Hidalgo (Álvarez-Solorzano 1983), un registro en Sonora a 600 km de donde se encuentran actualmente (Mead et al. 2010) y un fósil de *C. mexicanus* localizado en Puebla (Cruz-Muñoz et al. 2009). Esta evidencia es consistente con la hipótesis propuesta del origen de *C. mexicanus* a partir de *C. ludovicianus* (Goodwin 1995), que ha sido corroborada con evidencia molecular proveniente de aloenzimas, que sitúa el momento de divergencia hace 42,180 años (McCullough y Chesser 1987), mientras que las estimaciones de tiempo de divergencia obtenidas a partir de secuencias de citocromo *b* son mucho más antiguas (~500,000 años; Harrison et al. 2003).

Por otra parte, los fósiles de perro llanero se han encontrado asociados con indicadores de bosque maduro en las localidades de las Grandes Planicies. Lo anterior indica la presencia de mosaicos locales con una diversidad estructural mayor a la que se presenta hoy en día (Goodwin 1995). Sin embargo, se ha propuesto que la mayor colonialidad de *C. ludovicianus* con respecto a los otros representantes del género se relaciona con la evolución de un sistema de alarma contra los depredadores presentes en los pastizales abiertos con baja cobertura vegetal (Goodwin 1995).

Estudios moleculares de perros llaneros

La especie de perro llanero más estudiada es *C. ludovicianus*. Los estudios moleculares realizados hasta el momento han tenido un enfoque de genética de poblaciones y genética del paisaje, y se han basado en el uso de isoenzimas, RAPDs y microsatélites nucleares (Cuadro 3). Existen pocos estudios que hayan tomado en cuenta los patrones históricos de distribución de la diversidad genética a partir del uso de marcadores del ADN mitocondrial (Castellanos-Morales et al. 2014 ver Apéndice 1; Gutiérrez Guerrero 2014; Sackett et al. 2014) (Tabla 3).

Entre las conclusiones más relevantes relacionadas con estos estudios están:

- Presencia de alta estructuración y endogamia relacionadas con la conformación de grupos familiares, filopatría de las hembras y efecto Wahlund (Chesser 1983; Dobson et al. 1997, 1998, 2004).
- La alta diferenciación genética influye en el mantenimiento de la variabilidad después de la presencia de un cuello de botella (Daley 1992).
- Presencia de alta estructuración entre grupos familiares y variación temporal de la diversidad genética al interior de los mismos (Dobson et al. 1998, 2004).
- La variabilidad y estructura genética se relacionan con la presencia de peste bubónica (*Yersinia pestis*) en las colonias (Antolin et al. 2006; Roach et al. 2001; Trudeau et al. 2004; Jones y Britten 2010; Jones et al. 2012; Sackett et al. 2012, 2013).
- La conectividad entre colonias en términos de la distancia entre ellas y el tiempo transcurrido desde la recolonización son importantes en la determinación de la distribución de la variación (Antolin et al. 2006; Roach et al. 2001; Trudeau et al. 2004; Jones y Britten 2010; Jones et al. 2012; Sackett et al. 2012, 2013).
- El tamaño de la colonia, en términos de área y tamaño poblacional, es importante en la determinación de la cantidad de variación dentro de cada una de ellas y de la diferenciación genética entre colonias (Castellanos-Morales et al. 2014 ver Apéndice 1).

Al comparar los valores de variación genética reportados para microsatélites en *C. ludovicianus* (Tabla 3), se observa que en la mayoría de las poblaciones estudiadas hasta el momento se han descrito niveles de diversidad genética similares ($H_E = 0.4 - 0.7$). Los valores de estructuración genética (F_{ST}) tienen un intervalo de 0.10 a 0.24 e indican alta estructuración entre las colonias estudiadas. Sin embargo, los valores del coeficiente de endogamia reportados son muy variables ($F_{IS} = 0.007 - 0.18$ y $F_{IT} = 0.018 - 0.264$), sugiriendo una acción diferencial de la endogamia y la deriva génica en cada

población, así como un efecto Wahlund relacionado con la presencia de grupos familiares dentro de las colonias.

En contraste, sólo existe un trabajo acerca de la genética de *C. mexicanus* (Tabla 3), realizado con isoenzimas (McCullough y Chesser 1987) y otro que compara la variación presente en una población en cautiverio y la población fuente por medio de microsatélites nucleares y región control del ADN mitocondrial (Gutiérrez Guerrero 2014). Las conclusiones más relevantes del estudio realizado por McCullough y Chesser (1987) indican la presencia de poca diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas, una alta variación dentro de las poblaciones y una endogamia significativa en las mismas, lo cual coincide con lo reportado posteriormente por Gutiérrez Guerrero (2014). Al comparar los resultados de ambas especies hermanas (Tabla 3), se observa que ambas poseen valores de variación (A y H_E) similares. Sin embargo, el valor del coeficiente de endogamia (F_{IS}) de *C. mexicanus* es mayor que el de *C. ludovicianus* y, el valor de estructura genética (F_{ST} y análogos) de *C. mexicanus* es menor. McCullough y Chesser (1987) atribuyen las diferencias entre las especies a la presencia de un cuello de botella de corta duración en *C. mexicanus*, lo cual es congruente con la hipótesis de divergencia de *C. mexicanus* a partir del aislamiento de una población de *C. ludovicianus* y su posterior expansión poblacional hace aproximadamente 40,000 años.

Recientemente se publicó el mitogenoma completo de *C. ludovicianus* y *C. leucurus* (Li et al. 2015) mostrando una diferencia global del 4%. El estudio describe el mitogenoma de estas especies y sugiere que esta información es útil para la identificación de las especies, los estudios filogenéticos de Sciuridae y en análisis de diferencia de expresión de genes en dos especies con dos estilos de hibernación distintos.

Tabla 3. Estudios realizados en las cinco especies de perro llanero (género *Cynomys*) con distintos marcadores moleculares, organizados por especie y tipo de marcador molecular. Referencias, sitio de estudio, marcador, medidas de diversidad genética (A y H_E) y coeficientes de fijación (F_{IS} , F_{IT} y F_{ST}).

Subgénero <i>Cynomys</i>							
<i>Cynomys ludovicianus</i>							
Referencia	Sitio	Marcador	A	H_E	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
Chesser 1983	Nuevo México	Isoenzimas	1-3	0.11-0.44	0.40	0.33	0.10
Daley 1992	Dakota del Sur	Isoenzimas	2-4	0.04	-0.02	0.09	0.12
Dobson et al. 1997	Dakota del Sur	Isoenzimas	---	---	-0.21	-0.01	0.16
Dobson et al. 1998	Dakota del Sur	Isoenzimas	---	---	-0.21	-0.01	0.16
Dobson et al. 2004	Dakota del Sur	Isoenzimas	---	---	-0.18	0	0.16
Foltz y Hoogland 1983	Dakota del Sur	Isoenzimas	1.24	0.066	-0.06	---	0.03
Trudeau et al. 2004	Montana*	RAPDs	1.44 1.62	0.27 0.36	---	---	0.23
Biggs 2007	Texas	Microsatélites	2.8-5.5	0.39-0.72	0.025	0.185	0.164
Castellanos-Morales et al. 2014 (Apéndice 1)	Chihuahua, Mexico	Microsatélites	3.4	0.53	0.18	0.264	0.10
Jones y Britten 2010	Montana*	Microsatélites	3.4	0.54	0.17	---	0.12-0.19
Magle et al. 2010	Colorado*	Microsatélites	3.1	0.524	0.007	---	0.24
Roach et al. 2001	Colorado*	Microsatélites	3.0-5.1	0.4-0.7	0.02	0.13	0.12
Sackett et al. 2012, 2013	Colorado*	Microsatélites	9.3	0.663	---	---	0.109
Castellanos-Morales et al. 2014 (Apéndice 1)	Chihuahua, Mexico	Cit- <i>b</i>	*0.0016	†0.704	---	---	0.233
<i>Cynomys mexicanus</i>							
McCullough y Chesser 1987	Nuevo León y Coahuila	Isoenzimas	1 - 4	0-0.45	0.5	0.47	0.07
Gutiérrez-Guerrero 2014	Coahuila	Microsatélites Región control	4.67 *0.005	0.49 - 0.56 †0.63	0.12-0.14 ---	--- ---	0.17-0.29 ---
Subgénero <i>Leucocrossuromys</i>							
<i>Cynomys gunnisoni</i>							
Travis et al. 1997	Arizona	DNA fingerprint	---	---	---	---	0.11
Haynie et al. 2003	Arizona	Microsatélites	4.29	0.49	---	---	---
Sackett et al. 2014	Nuevo México, Colorado, Arizona y Utah	Microsatélites	10.1 8.7	0.543 0.527	---	---	0.292
		Cit- <i>b</i> + región control	---	---	---	---	0.692
<i>Cynomys parvidens</i>							
Haynie et al. 2003	Utah	Microsatélites	3	0.33-0.34	---	---	---

*Poblaciones con presencia de *Yersinia pestis*.

* Diversidad nucleotídica estimada para secuencias de ADN mitocondrial (π).

† Diversidad haplotípica estimada para secuencias de ADN mitocondrial (Hd).

Capítulo 1. Genetic variation and structure in contrasting geographic distributions: widespread versus restricted black-tailed prairie dogs (subgenus *Cynomys*).

Gabriela Castellanos-Morales, Jorge Ortega, Reyna A. Castillo-Gómez, Loren C. Sackett y Luis E. Eguiarte.

Journal of Heredity 106 (S1): 478 - 490; doi:10.1093/jhered/esv021

Sometido: 29 de julio 2014; Aceptado: 22 de marzo 2015; Publicado: 05 de agosto 2015.

Factor de Impacto: 1.969

Resumen

Las especies de distribución restringida pueden ser consideradas más vulnerables a la extinción debido a la presencia de niveles bajos de variación genética, en contraste con los niveles de variación presentes en especies de amplia distribución. Las especies del subgénero *Cynomys* son un sistema excelente para comparar la variación genética y el grado de estructura genética en distribuciones geográficas contrastantes. Evaluamos los niveles de variación genética, de estructura genética y de diferenciación genética en una especie de distribución amplia *Cynomys ludovicianus* y una especie de distribución restringida *C. mexicanus* utilizando 1,997 pb del citocromo *b* y la región control ($n = 223$ *C. ludovicianus*; 77 *C. mexicanus*) y diez loci de microsatélites nucleares ($n = 207$ y 78, respectivamente). La variación genética en ambas especies fue alta y la estructura genética en *C. ludovicianus* fue mayor que la de la especie de distribución restringida. *C. mexicanus* presentó valores de variación genética, estructura genética y diferenciación genética similares a los que se han observado en *C. ludovicianus* a escala geográfica local. Los resultados sugieren la presencia de al menos dos refugios históricos para *C. ludovicianus* con la Sierra Madre Occidental como una barrera al flujo génico. Las poblaciones de Chihuahua y Nuevo México presentaron altos niveles de diversidad genética y deben protegerse, mientras que la población de Sonora debe ser tratada como una unidad de manejo independiente. Para *C. mexicanus* la conectividad entre colonias es muy importante y la fragmentación y pérdida de hábitat deben ser mitigadas para mantener el flujo génico entre colonias.

Genetic variation and structure in contrasting geographic distributions: widespread versus restricted black-tailed prairie dogs (subgenus *Cynomys*).

Gabriela Castellanos-Morales, Jorge Ortega, Reyna A. Castillo-Gómez, Loren C. Sackett and Luis E. Eguiarte.

From Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior s/n Anexo al Jardín Botánico, Ciudad Universitaria, México Distrito Federal, 04510, México (Castellanos-Morales and Eguiarte); Laboratorio de Bioconservación y Manejo, Departamento de Zoología, Posgrado en Ciencias Químico-biológicas, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n Col. Sto. Tomas, México Distrito Federal, 11340, México (Ortega); DICTUS, Universidad de Sonora, Luis Donaldo Colosio s/n, Hermosillo, Sonora, 83100, México (Castillo-Gómez); Center for Conservation and Evolutionary Genetics, Smithsonian Institution, P.O. Box 37012, MRC 5503, Washington, DC 20013-7012 (Sackett).

Address correspondence to Luis E. Eguiarte at the address above, or e-mail: fruns@unam.mx

Abstract

Species of restricted distribution are considered more vulnerable to extinction because of low levels of genetic variation relative to widespread taxa. Species of the subgenus *Cynomys* are an excellent system to compare genetic variation and degree of genetic structure in contrasting geographic distributions. We assessed levels of genetic variation, genetic structure and genetic differentiation in widespread *Cynomys ludovicianus* and restricted *C. mexicanus* using 1,997 bp from the cytochrome *b* and control region ($n = 223$ *C. ludovicianus*; 77 *C. mexicanus*), and ten nuclear microsatellite loci ($n = 207$ and 78 , respectively). Genetic variation for both species was high, and genetic structure in the widespread species was higher than in the restricted species. *C. mexicanus* showed values of genetic variation, genetic structure and genetic differentiation similar to *C. ludovicianus* at smaller geographic scales. Results suggest the presence of at least two historical refuges for *C. ludovicianus* and that the Sierra Madre Occidental represents a barrier to gene flow. Chihuahua and New Mexico possess high levels of genetic diversity and should be protected, while Sonora should be treated as an independent management unit. For *C. mexicanus* connectivity among colonies is very important and habitat fragmentation and habitat loss should be mitigated to maintain gene flow.

Key words: Conservation genetics; *Cynomys ludovicianus*; *Cynomys mexicanus*; microsatellites; mitochondria; phylogeography

Running title: *Cynomys* conservation genetics and phylogeography

Patterns of genetic variation and structure between widespread and endemic taxa have been the main focus of many population and conservation genetics studies (Hamrick and Godt 1996; Gitzendanner and Soltis 2000; Broadhurst and Coates 2002; Coates et al. 2003; Eguiarte et al. 2013; Hobbs et al. 2013; Blair et al. 2014). Nevertheless, this approach has been seldom used in the study of mammals (Moraes-Barros et al. 2006; Campbell et al. 2007; Blair et al. 2014). Evolutionary trajectories of species with restricted geographic ranges resemble those of small populations. In this regard, species with restricted ranges are often found in small and isolated populations that possess low levels of genetic variation due to the ongoing effects of genetic drift and inbreeding. This in turn could increase their risk of extinction (Broadhurst and Coates 2002; Coates et al. 2003; Frankham et al. 2004).

Previous empirical studies in plants and animals have not reached a consensus on whether restricted species possess lower levels of genetic variation than widespread taxa (Gitzendanner and Soltis 2000; Coates et al. 2003; Hobbs et al. 2013; Blair et al. 2014). This relates to the heterogeneity of their life histories, since levels of genetic variation depend not only on the actual population size, but also on the complex demographic historical patterns, adaptation, natural selection and reproductive ecology (Hamrick and Godt 1996; Gitzendanner and Soltis 2000; Kelley et al. 2000; Broadhurst and Coates 2002; Hinten et al. 2003; Boessenkool et al. 2007; Raduski et al. 2010; Bock et al. 2012; Hobbs et al. 2013).

In general terms, species with restricted distributions are expected to show lower levels of genetic structure under an isolation-by-distance model, as the different populations would be seldom or never far away (Coates et al. 2003). Genetic structure is associated with the breeding system, dispersal capacity, and historical isolation, among other factors (Broadhurst and Coates 2002; Moraes-Barros et al. 2006; Campbell et al. 2007; Hedrick 2011). Consequently, the degree of historical isolation and gene flow between populations of widespread taxa varies considerably, and even restricted species, depending on their evolutionary history, can show deep phylogeographic divergence (especially if they are habitat specialists – Moritz 1999).

In this context, restricted species face a higher extinction risk than their widespread congeners, and conservation action should focus on the maintenance and restoration of microevolutionary processes that determine the distribution of genetic variation (Moritz 1999; Frankham et al. 2004). Phylogeography is crucial to understanding the dynamics of species distributions, their genetic variation and structure, and

the factors that influence them (Rodríguez-Sánchez et al. 2010). Therefore, phylogeography is of major importance for conservation and management of endangered species.

Black-tailed prairie dogs (Subgenus *Cynomys*) are an illustrative system for the study of genetic variation and genetic structure in both widespread and restricted species. Black-tailed (*Cynomys ludovicianus*) and Mexican (*C. mexicanus*) prairie dogs are associated with the arid grasslands of North America because they are keystone species and “ecosystem engineers” that depend on open grasslands for their survival (Slobodchikoff et al. 2009; Martínez-Estévez et al. 2013). Currently, *C. ludovicianus* is the species with the widest range and can be found in the Great Plains of North America, from southern Canada to northern Mexico. On the other hand, *C. mexicanus* is endemic to Mexico and inhabits valleys within a 477 km² region in central Mexico (Scott-Morales et al. 2005; Slobodchikoff et al. 2009). McCullough and Chesser (1987) assessed allozyme diversity in both species and determined low genetic differentiation among populations of *C. mexicanus*. Genetic variation levels in *C. mexicanus* were high and similar to those reported by Chesser (1983) for populations of *C. ludovicianus* separated by long geographic distances in New Mexico. Gene flow between populations of *C. mexicanus* was high and similar to that reported by Chesser (1983) for colonies of *C. ludovicianus* located in close proximity. Nevertheless, the results from these analyses were based on a single type of low-resolution molecular marker (14 allozyme loci) and on a limited sample size for both species (29 samples from *C. mexicanus*, and 15 samples from *C. ludovicianus* from 3 colonies each).

Despite their importance for grassland conservation, prairie dog populations have faced a severe reduction and fragmentation of their distribution. *C. ludovicianus* currently occupies only approximately 2% of its historical distribution, while *C. mexicanus* is found in 26% of its smaller historical distribution (Scott-Morales et al. 2005; Slobodchikoff et al. 2009). Although the IUCN lists *C. ludovicianus* as a species of least concern for conservation, it is regarded as threatened within Mexico. *C. mexicanus* is considered as an endangered species by Mexican law, CITES (Appendix I) and the IUCN (SEMARNAT 2010; CITES 2013; IUCN 2014).

Phylogenetically, *Cynomys ludovicianus* and *C. mexicanus* are sister species, and evidence from the fossil record and molecular analyses is consistent with the hypothesis of the origin of *C. mexicanus* from a relict population of *C. ludovicianus*, diverging 20,000 to 40,000 years ago (McCullough and Chesser 1987; Goodwin 1995; Harrison et al. 2003). Both species are highly social and live in associations called colonies that are composed of social groups called coterie. Each coterie consists of several related adult females, one or two unrelated adult males, and their progeny. Females are philopatric and dispersal is male-biased (Ceballos and Wilson 1985; Hoogland 1996, 2013; Slobodchikoff et al. 2009).

The aim of this study is to assess patterns of genetic variation, genetic differentiation, and genetic structure in a restricted species (*C. mexicanus*) and a closely-related widespread species (*C. ludovicianus*). For this analysis, we use concatenated sequences of the control region (CR) and cytochrome *b* (*cyt-b*) of the mitochondrial DNA (mtDNA), and ten nuclear microsatellite loci. We predict that, at the species level, widespread *C. ludovicianus* will show higher levels of genetic variation, higher genetic differentiation among sites and higher genetic structure than restricted *C. mexicanus*. Furthermore, we also predict that given the biological similarities between these species, *C. mexicanus* will show overall values of genetic differentiation among colonies similar to those reported between colonies of *C. ludovicianus* within regions (i.e. between colonies from Janos, Chihuahua – Castellanos-Morales et al. 2014). Finally, we discuss the implications of our results for the conservation of each species.

Materials and Methods

Sample Collection

Given the broad distribution of *C. ludovicianus*, and to exclude possible influences on genetic variation such as strong differences in climates, soils and seasonality that are faced by populations from outside Mexico, we analyzed populations of *C. ludovicianus* from the southern part of their range. These populations inhabit arid short-grass prairies that are ecologically similar to the area occupied by *C. mexicanus*. Castellanos-Morales et al. (2014) obtained samples from 161 black-tailed prairie dogs (*C. ludovicianus*) from 13 colonies located in Janos, Chihuahua (Chi), Mexico in 2007. Between 2009 and 2013, we obtained additional samples from 152 prairie dogs of both species: 74 samples from *C. ludovicianus* from Sonora (Son), Colorado (CO) and New Mexico (NM), and 78 samples from *C. mexicanus* from 6 colonies throughout its distribution (Fig. 1). Several family groups within each colony were identified and 1 or 2 members from each family group were captured following the method described in Castellanos-Morales et al. (2014) and Sackett et al. (2012). Capture and non-lethal sampling was performed following the American Society of Mammalogists (Sikes et al. 2011) and Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales guidelines for ethical animal experimentation.

Samples consisted of 1 mm of fresh tissue from the tip of the tail, and 2 mm ear punches (Braintree Scientific) for the prairie dogs from Colorado. Tissue was obtained from the tip of the tail by making a clear cut using sterile surgical scissors. The injury was treated to prevent infection and the prairie dog was released at capture site. Tissue was deposited in a 2 ml Eppendorf tube containing 90% ethanol. All samples were maintained at – 80 °C until DNA extraction.

DNA Extraction/ PCR Amplification

Total genomic DNA was extracted from tissue samples with a Qiagen Blood and Tissue Kit (QIAGEN Sample & Assay Technologies, Hilden, Germany). mtDNA *cyt-b* sequences were obtained using primers L14725 (5'-TGAAAAAYCATCGTTGT-3') and H15915 (5'-TCTTCATTTYWGGTTTACAAGAC-3') (Harrison et al. 2003), following the conditions reported by Castellanos-Morales et al. (2014). PCR products were sequenced with an ABI 3730xl sequencer (Applied Biosystems) at the High Throughput Genomics Center (UWHTSeq FinchLab; www.htseq.org) using primers L14725, L14935 and L15955 to cover the 1140 bp of the *cyt-b* gen (Harrison et al. 2003). *CR* sequences were obtained for all samples using primers L15933 (5'-CTCTGGTCTTGTAACCAAAAATG-3') and H637 (5'-AGGACCAAACCTTTGTGTTTATG-3') (Oshida et al. 2001), following the conditions reported by Ochoa et al. (2012). The *CR* was sequenced using primers L15933 (Oshida et al. 2001) and CR1F (Ochoa et al. 2012) to increase the quality of the reads and to cover 857 bp. In addition, we amplified and sequenced nuclear introns BGN (Chen et al. 1999) and CHRNA (Lyons et al. 1997) for 5 individuals of each species. However, sequences for these nuclear markers were monomorphic, and were discarded from the analysis.

We assembled the sequences with *Consed* 6.0 (Ewing et al. 1998; Gordon et al. 1998), and polymorphism was checked manually. We performed a BLAST search in GenBank to corroborate correspondence of our sequences with previously posted *cyt-b* and *CR* data. Records from 8 haplotypes (JQ885584 - JQ885591) obtained from 157 *cyt-b* sequences of *C. ludovicianus* from Chihuahua were taken from Castellanos-Morales et al. (2014) and 149 of these samples were amplified for the *CR*. In addition, we downloaded from GenBank sequences for the sister genus *Xerospermophilus* [*X. pilosoma* (*CR*: DQ106857, DQ106858; *cyt-b*: AF157885, AF157911) and *X. perotensis* (*CR*: JQ326958, JQ326959; *cyt-b*: AF157840, AF157948)] and the sister subgenus *Leucocrossuromys* [*Cynomys gunnisoni* (*CR*: GU453240, GU453337; *cyt-b*: AF157923, AF157930)] to be used as outgroups. We aligned all sequences by hand using BioEdit v. 7.1.3 (Hall 1999) and concatenated both regions of the mtDNA genome with DnaSP v5 (Librado and Rozas 2009).

We amplified by PCR ten nuclear microsatellite loci (A2, A8, A101, A104, A119, C116, D1, D2, D115 and D120; Jones et al. 2005), using the conditions reported by Castellanos-Morales et al. (2014) in 10 µl reaction volumes. We sent PCR products for genotyping with an ABI 3730xl sequencer (Applied Biosystems) to UIUC Core Sequencing Facility at the University of Illinois (unicorn.biotec.illinois.edu). We obtained genotypes for 160 *C. ludovicianus* individuals from Chihuahua from Castellanos-Morales et al. (2014), and re-amplified 10% of these samples to standardize allele reads. In addition, we re-amplified all microsatellite loci for 20% of the samples to

control for genotyping error. We visualized the fragments in Peak Scanner software v1.0 (Applied Biosystems). We performed null allele analyses with MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004) and FreeNA (Chapuis and Estoup 2007). We tested Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium with Arlequin v3.5 (Excoffier and Lischer 2010).

Data Archiving

In fulfillment of data archiving guidelines (Baker 2013), we have deposited the primary data underlying these analyses in Dryad (doi: 10.5061/dryad.pk944) and GenBank (accession numbers KP217107 – KP217141).

Genetic Diversity

We estimated standard measures of genetic variation for mtDNA sequences for each population and species [number of segregating sites (S), haplotype number (h), haplotype diversity (Hd) and nucleotide diversity (π)] with DnaSP v5 (Librado and Rozas 2009). For microsatellite loci, we obtained measures of genetic variation for each population and species [allelic richness (A), observed heterozygosity (H_o) and genetic diversity (H_E)] with Arlequin v3.5 and GENODIVE 2.0b21 (Meirmans and Van Tienderen 2004). As suggested by Gitzendanner and Soltis (2000), we compared measures of genetic diversity obtained for both species using a Wilcoxon signed-rank test, which is a non-parametric test, using the R Stats package for R v 3.0.2 (R Development Core Team 2013).

Species Evolutionary Relationships

We constructed a gene genealogy (Posada and Crandall 2001) for the mtDNA sequences using the Maximum Likelihood method with the approximate likelihood ratio test and 1,000 bootstrap (BS) replicates implemented in PhyML 3.0 (Guindon and Gascuel 2003; Guindon et al. 2010), and using the substitution model (HKY+ Γ +I) determined by jModelTest 0.1.1 (Posada 2008). To explore the relationships between haplotypes within each species, we constructed a median joining network with Network 4.6.1.1 (Fluxus-engineering 2014) using the least cost criterion and the default parameters. We only included variable sites in the analysis. We used the MP option to clean up the network and used the shortest tree.

Genetic Structure

To determine the presence of overall genetic differentiation within species, we estimated F_{ST} for mtDNA and R_{ST} for nuclear microsatellites (Weir and Cockerham 1984; Holsinger and Weir 2009) for

each species with Arlequin v3.5 for comparison with previous reports. Nevertheless, genetic differentiation measures have shown a dependency on the amount of within population variation, especially for microsatellite data. Therefore, we also estimated Hedrick's standardized G_{ST} (G'_{ST} - Meirmans and Hedrick 2011) for nuclear microsatellite loci using GENODIVE 2.0b21. This measure is corrected by the maximum heterozygosity and provides an unbiased estimate (Meirmans and Hedrick 2011).

To determine the presence of genetic clusters within each species for mtDNA, we performed two independent runs on BAPS v5.3 (Corander et al. 2004, 2008) with $K = 10$ and 20 repetitions using the method of "clustering for linked loci". To account for genetic structure and gene flow between populations for microsatellite loci we used Structure 2.2 (Pritchard et al. 2000) implementing the model with admixture and uncorrelated allele frequencies without using the sampling locations as a prior. We used the uncorrelated allele frequencies prior, which is appropriate for populations that are not extremely closely related, and populations with different allele frequencies (Pritchard et al. 2000). We expect the allele frequencies among species to depart considerably because these species have allopatric distributions, and diverged 40,000 to 20,000 years ago (McCullough and Chesser 1987; Goodwin 1995; Harrison et al. 2003). We performed an initial run with Markov chain Monte Carlo (MCMC) resampling using 250,000 steps after a burn-in of 50,000 steps and with 5 repetitions for each K (number of clusters), where $K = 1$ to 20 to determine the necessary run length for the $\ln(P)$ to converge across repetitions. Accordingly, we performed two independent runs with MCMC resampling using 500,000 steps after a burn-in of 100,000 steps and, 15 repetitions for each K , and $K = 1$ to 20. We determined the most appropriate value of K following the value of $\ln(P)$. We selected the value with the best posterior probability and the smallest variance between repetitions (Pritchard et al. 2000). Microsatellite amplification for the individuals from New Mexico was not successful and reported data from Colorado was obtained using a partially overlapping set of microsatellite loci. Therefore, in this analysis we included only allelic data from individuals from Chihuahua and Sonora from *C. ludovicianus* and all individuals from *C. mexicanus*.

To analyze how genetic variation is distributed within each species we used Arlequin v3.5 to conduct a hierarchical AMOVA (Excoffier et al. 1992), which considered the genetic clusters defined by BAPS v5.3 for mtDNA and Structure 2.2 for nuclear microsatellite data. To determine the genetic relationship between colonies within each species, we also estimated pairwise F_{ST} for mtDNA and pairwise R_{ST} and G'_{ST} (Weir and Cockerham 1984; Holsinger and Weir 2009; Meirmans and Hedrick 2011) for nuclear microsatellite loci using Arlequin v3.5 and GENODIVE 2.0b21. We used the Geographic Distance Matrix Generator version 1.2.3 (Ersts 2011) to obtain a matrix of linear

geographic distances between colonies for each species. Finally, we tested isolation by distance through a Mantel test, using 9,999 permutations with the R *ade4* library (Dray and Dufour 2007), using the linearized F_{ST} for mitochondrial sequences, and linearized R_{ST} and G'_{ST} for nuclear microsatellites.

Results

Genetic Diversity of Mitochondrial Data

We obtained a total of 300 concatenated sequences, including the *cyt-b* and the control (*CR*) regions (Table 1). Sequences were 1,997 bp long and showed a total of 55 variable sites (48 parsimony informative). For *C. ludovicianus*, we obtained 223 sequences with 37 segregating sites (including 149 *cyt-b* sequences taken from Castellanos-Morales et al. (2014) that were amplified for the *CR*). For *C. mexicanus*, we obtained 77 sequences with 18 segregating sites.

We found a total of 19 mitochondrial haplotypes in *C. ludovicianus* (CL1 – CL19). Only one of these haplotypes (CL12) was shared between Chihuahua and New Mexico (NM), while the rest were private to each site within the distribution area of *C. ludovicianus* (Supplementary Table S1). For *C. mexicanus*, we found a total of 16 haplotypes (CM1 - CM16). One haplotype was widespread throughout the species distribution. Two haplotypes were shared between colonies and 13 were private to each colony within the distribution of this species.

Mitochondrial genetic variation was higher for widespread *C. ludovicianus* than for restricted *C. mexicanus*, but the difference was not significant ($P = 0.831$ for H_d , and $P = 0.522$ for π). Within *C. ludovicianus*, levels of nucleotide diversity per site varied from 0 in Sonora to 0.0084 in NM (Table 1), while levels of nucleotide diversity per colony within each site varied from 0.0002 to 0.0065 in Chihuahua, and from 0 to 0.0011 in Colorado (Table 1; Supplementary Table S2). Within *C. mexicanus*, nucleotide diversity per colony ranged from 0.0003 to 0.0018 (Table 1).

Genetic Diversity of Nuclear Data

We obtained genotypes for 10 nuclear microsatellite loci for 285 samples, 207 from *C. ludovicianus* (including 160 genotypes taken from Castellanos-Morales et al. 2014), and 78 samples from *C. mexicanus* (Table 1). All microsatellite loci were polymorphic and within Hardy-Weinberg equilibrium. No signals of linkage disequilibrium among them or null alleles were detected. We found a total of 80 alleles (4 to 10 alleles per locus). 54 alleles were shared between species; 11 alleles were private to *C. ludovicianus* and 15 alleles were private to *C. mexicanus* (Supplementary Table S3).

Nuclear genetic diversity was higher for restricted *C. mexicanus* than for widespread *C. ludovicianus* but the difference was not significant ($P = 0.197$ for H_E) (Table 1). For *C. ludovicianus*,

expected heterozygosity was higher in Chihuahua (0.53) than Sonora (0.49). Expected heterozygosity for the colonies within each site ranged from 0.45 to 0.62 in Chihuahua and 0.5 to 0.56 in Sonora. For *C. mexicanus*, expected heterozygosity ranged from 0.52 to 0.66 (Table 1; Supplementary Table S2).

Species Evolutionary Relationships

According to the mitochondrial gene genealogy, each species forms a well-defined clade (Fig. 2). Within *C. ludovicianus*, two distinct maternal lineages can be distinguished. One clade (the southern clade) is found in Chihuahua, Sonora and NM, while the other clade (the south-central clade) is distributed in Chihuahua, NM and Colorado. Haplotypes found in *C. mexicanus* form a single maternal lineage.

Results from the median joining network were consistent with the gene genealogy. Within *C. ludovicianus*, the haplotype network showed a clear geographic structure, with the presence of closely related haplotypes in Colorado (Fig. 3a). The haplotype found in Sonora was related to haplotype from NM and Chihuahua. For *C. mexicanus*, there was no clear geographic structure. The most frequent haplotype (CM3) represented the center of the network, with many derived haplotypes that were private to different populations (Fig. 3b).

Genetic Structure

Both species showed significant ($P < 0.05$) levels of genetic differentiation, and genetic differentiation across the sampled range was higher for *C. ludovicianus* ($F_{ST} = 0.448$ for mtDNA; $R_{ST} = 0.228$, $G''_{ST} = 0.504$ for nuclear microsatellites) than for *C. mexicanus* ($F_{ST} = 0.203$ for mtDNA; $R_{ST} = 0.127$, $G''_{ST} = 0.362$ for nuclear microsatellites). Furthermore, the genetic differentiation found throughout the range of *C. mexicanus* was similar to the genetic differentiation estimated for colonies in the region of Chihuahua for *C. ludovicianus* ($F_{ST} = 0.259$ for mtDNA; $R_{ST} = 0.128$, $G''_{ST} = 0.289$ for nuclear microsatellites) (Table 1).

The analysis performed with BAPS v5.3 for mtDNA separated the two species with $K = 5$ ($\ln(P) = -1961.2125$). The analysis assigned individuals from *C. ludovicianus* to four genetic clusters, and *C. mexicanus* to only one cluster. Within *C. ludovicianus*, individuals from Colorado and Sonora were assigned to their own clusters. Individuals from Chihuahua and NM were assigned to two co-distributed clusters (Fig. 4a).

To detect substructure within *C. mexicanus*, we performed two additional independent runs with BAPS v5.3 following the same strategy as before, but including only mitochondrial sequences from this species. The best K was 3 ($\ln(P) = -344.1436$). From the 77 *C. mexicanus* mitochondrial sequences

included in the analysis, 66.3% were assigned to one cluster, while 24.1% were assigned to another cluster with presence in two colonies (LA and LS) and 9.6% (all from LT) were assigned to a third cluster (Fig. 4b).

To determine if genetic substructure within *C. mexicanus* is comparable to substructure in *C. ludovicianus* at a local scale, we also performed an additional BAPS analysis including sequences obtained from 13 colonies sampled in Chihuahua. The best K was $K = 5$ ($\ln(P) = -558.8862$). From the 149 sequences included in the analysis, 39.2% were assigned to cluster 1, 25.2% to cluster 2, 29.5% to cluster 3, 0.7% to cluster 4 and 5.4% to cluster 5, with individuals from mixed colonies assigned to each cluster (Supplementary Figure S4).

Genetic structure analysis performed with Structure 2.2 for nuclear microsatellite data also separated the two species. This analysis also defined five clusters (Fig. 4c), but the clusters were different from those recovered by mtDNA. Within *C. ludovicianus*, Sonora and Chihuahua were separated while Chihuahua consisted of two genetic clusters, as previously reported by Castellanos-Morales et al. (2014). Within *C. mexicanus* we observed two clusters that separated individuals from one colony (LA) and detected admixture in two individuals from distinct colonies: LS and ESA.

AMOVA results for *C. ludovicianus* mtDNA population structure given by BAPS v5.3, apportioned a high proportion of genetic variation among clusters, followed by within-colony variation (Table 2). Population structure obtained with Structure 2.2 using nuclear microsatellite loci allocated similar percentages of variation among clusters and within colonies. For *C. mexicanus*, the results for AMOVA analyses based on the clustering given by BAPS v5.3 for mtDNA sequences and Structure 2.2 for nuclear microsatellite were consistent. Both apportioned the highest percentage of variation within colonies. The AMOVA performed for mtDNA sequences and nuclear microsatellites defining each species as a group determined that the highest percentage of variation was found between species (Table 2).

Finally, Mantel tests indicated no isolation by distance (IBD) for *C. mexicanus* for mtDNA ($r = 0.170$, $P = 0.274$ using F_{ST}) or nuclear microsatellites ($r = -0.05$, $P = 0.548$ with R_{ST} and $r = -0.061$, $P = 0.538$ using G''_{ST}). For *C. ludovicianus*, results were non-significant for mtDNA ($r = 0.388$, $P = 0.067$ using F_{ST}), but there was strong IBD for nuclear microsatellite loci ($r = 0.839$, $P = 0.006$ for R_{ST} and $r = 0.819$, $P = 0.002$ using G''_{ST}) (Supplementary Table S5).

Discussion

The aim of this study was to examine patterns of genetic variation, genetic structure and genetic differentiation in a widespread (*C. ludovicianus*) and a restricted species (*C. mexicanus*). High levels of

genetic variation ($Hd = 0.77$ for mtDNA; $H_E = 0.591$ for nuclear loci) in *C. mexicanus* departed from our expectations. This can be explained by: 1) the maintenance of genetic variation associated with substructure within colonies and differential allele fixation within family groups promoted by female philopatry; 2) high levels of male-mediated gene flow between colonies within its distribution; 3) large population sizes; and 4) that *C. mexicanus* originated recently (20,000 to 40,000 years ago according to Goodwin 1995) from a widespread ancestor with high genetic variation.

In contrast, our results supported our prediction of higher genetic structure and higher genetic differentiation in the widespread *C. ludovicianus* because of its large range and the presence of large barriers to dispersal between regions within this range. Genetic variation, genetic structure and genetic differentiation in *C. mexicanus* agreed with results reported by McCullough and Chesser (1987) based on allozymes. These authors found low genetic differentiation among populations, and levels of genetic variation similar to those reported for populations of *C. ludovicianus* separated by long geographic distances.

Furthermore, our results supported the prediction that *C. mexicanus* would show patterns of genetic structure similar to results reported among colonies of *C. ludovicianus* within regions (McCullough and Chesser 1987; Roach et al. 2001; Jones and Britten 2010; Magle et al. 2010; Sackett et al. 2012, 2013; Castellanos-Morales et al. 2014). Genetic structure and differentiation for both of these sister species are influenced by their complex social behavior (association into family groups where females are philopatric and dispersal is male-biased), limited dispersal capacity and their evolutionary history (a late Pleistocene origin from a relict population of *C. ludovicianus*) (McCullough and Chesser 1987).

Genetic Variation

Levels of genetic variation for both molecular markers in *C. ludovicianus* and *C. mexicanus*, at the species level, were within the range reported for other sciurids (for mtDNA, $Hd = 0.288- 0.953$; Hoisington-Lopez et al. 2012; Liu et al. 2014; for nuclear microsatellite loci, $H_E = 0.33 - 0.75$; Haynie et al. 2003; Říčanová et al. 2011; Reid et al. 2012; Fitak et al. 2013). Furthermore, levels of genetic variation in *C. mexicanus* were inside the range reported for colonies of *C. ludovicianus* within different areas ($Hd = 0 - 0.9$ for mtDNA, and $H_E = 0.53 - 0.63$ for nuclear microsatellite loci; Roach et al. 2001; Jones and Britten 2010; Magle et al. 2010; Sackett et al. 2012, 2013; Castellanos-Morales et al. 2014). High levels of genetic variation in both species have been linked to their complex social system (female philopatry and male-biased gene flow), subdivided populations (McCullough and Chesser 1987;

Slobodchikoff et al. 2009; Castellanos-Morales et al. 2014), and metapopulation structure (Roach et al. 2001; Sackett et al. 2013).

Contrary to our prediction, the restricted species (*C. mexicanus*) showed high levels of genetic variation. High genetic variation in species with restricted distributions has been attributed to a recent origin from a widespread ancestor (Coates et al. 2003), such as the suggested origin of *C. mexicanus* from a relict population of *C. ludovicianus* 20,000 to 40,000 years ago, followed by demographic expansion (McCullough and Chesser 1987; Goodwin 1995). In this regard, the presence of moderate genetic variation and closely related haplotypes in mtDNA may suggest the occurrence of a recent founder event or a bottleneck. Conversely, high genetic variation for nuclear microsatellite loci may indicate that the bottleneck associated with the speciation event was short and/or followed by demographic expansion.

Evolutionary Relationships

The gene genealogy depicted each species as monophyletic. The presence of two maternal lineages (south-central and southern clades) in *C. ludovicianus* may be evidence for at least two refugia or biogeographic barriers. Nevertheless, further sampling across the entire range will be needed to ascertain this. In addition, high levels of genetic variation in the southern area of the species distribution (Chihuahua and New Mexico) suggests that this is an area of older occupation and/or larger effective population size, and that *C. ludovicianus* underwent a south-north colonization process.

In *C. mexicanus*, the star shape of the haplotype network and the lack of a clear geographic structure support the idea of recent demographic expansion (Allendorf and Luikart 2007). In addition, the lack of geographic structure depicted for *C. mexicanus* was previously reported for the distribution of *cyt-b* haplotypes between colonies from *C. ludovicianus* in Chihuahua (Castellanos-Morales et al. 2014). These data support our prediction that *C. mexicanus* would show similar patterns of genetic structure as those reported between colonies of *C. ludovicianus* at local scales.

Genetic Structure in *C. ludovicianus*

That *C. ludovicianus* has higher genetic differentiation than *C. mexicanus* in part is the obvious consequence of the contrasting distribution area of each species (widespread vs. restricted). The distance between sampled sites (1.3 km to 638.5 km) and the actual gaps in the distribution of *C. ludovicianus* promote genetic differentiation between areas. This pattern of genetic variation is consistent with demographic autonomy between populations (Avice 1995), which is further supported

by the presence of IBD for microsatellite loci. Nevertheless, sampling across the entire range is needed to confirm this idea.

The assignment tests for mtDNA (BAPS v5.3) indicate a close genetic relationship between Chihuahua and NM and support the presence of contact between the south-central and southern clades or incomplete lineage sorting in this area. In contrast, the analyses performed with each molecular marker (BAPS v5.3 and Structure 2.2) separated Sonora, suggesting that the Sierra Madre Occidental represents an effective barrier to gene flow. At the local level, the 13 colonies from Chihuahua showed strong substructure (presence of several genetic clusters in this site) and high admixture between colonies (clusters did not show a geographic pattern). This pattern of genetic substructure within Chihuahua may relate to a large effective population size and high historical connectivity between colonies (Ceballos et al. 2010; Castellanos-Morales et al. 2014).

The distribution of variance resolved by the AMOVA for mtDNA is congruent with female philopatry, and matches our expectations because a widespread distribution will promote structuring between distant populations (Broadhurst and Coates 2002; Campbell et al. 2007). In contrast, nuclear microsatellite loci results are consistent with geographic isolation because of male-biased gene flow (10 km maximum dispersal; Hoogland 1996), and differential allele fixation within colonies (Dobson et al. 2004; Castellanos-Morales et al. 2014). Among-colony variation suggests high gene flow among colonies within each site, which is coherent with the metapopulation dynamic reported for colonies within an area (Roach et al. 2001; Antolin et al. 2006; Sackett et al. 2013).

Genetic Structure in *C. mexicanus*

Genetic structure found in *C. mexicanus* was consistent with values estimated between colonies of *C. ludovicianus* at different regions ($F_{ST} = 0.259$ in Chihuahua for mtDNA and $R_{ST} = 0.112$ in Sonora and 0.128 in Chihuahua for nuclear microsatellites), and agree with previous reports based on nuclear markers (McCullough and Chesser 1987). Assignment analyses for both mtDNA and nuclear microsatellite loci for *C. mexicanus* separated colony LA, suggesting that this colony located in the northwestern area of the species distribution range might be isolated. In addition, our results suggest high connectivity between colonies via male-biased dispersal, similar to what has been reported locally for *C. ludovicianus* (Roach et al. 2001; Jones and Britten 2010; Magle et al. 2010; Sackett et al. 2012; Castellanos-Morales et al. 2014).

The distribution of variance resolved by AMOVA at both markers is congruent with the recent origin of *C. mexicanus*, its restricted distribution and high gene flow between colonies. For mtDNA, population structure estimated by BAPS v5.3 partially explained diversity allocation between clusters.

Assuming female philopatry, our results may indicate that time since the divergence of this species has not been enough to promote higher differentiation between intra-specific clusters through genetic drift. For nuclear loci, within-colony variation relate to differential allele fixation within coterries (Dobson et al. 2004; Castellanos-Morales et al. 2014). The variation apportioned between colonies suggests high gene flow, which is consistent with the restricted distribution of this species (McCullough and Chesser 1987).

Finally, the lack of IBD in *C. mexicanus* is coherent with the recent origin of this species and current gene flow because of a small distance between colonies (6.7 km to 80.8 km). This result is consistent with what has been reported locally for *C. ludovicianus* and has been associated with the effect of genetic drift, founder events and mutation (Chesser 1983; Castellanos-Morales et al. 2014).

Implications for Conservation

Previous studies have highlighted the importance of connectivity between colonies within geographically restricted areas of the widespread species (*C. ludovicianus* – Roach et al. 2001; Castellanos-Morales et al. 2014). However, high genetic structure between regions may indicate isolation between populations, and conservation management should be planned as to consider the microevolutionary processes that have driven this differentiation. In this sense, our data suggest that Chihuahua and NM might be important areas for conservation. These sites showed high levels of genetic variation (for both nuclear and mitochondrial markers), and the presence of two maternal lineages in this area. Nevertheless, a sampling scheme that includes the entire distribution of this species is needed to corroborate whether there is high genetic differentiation among regions and to assess levels of genetic diversity, especially for mtDNA, in other sites of the species range. In addition, colonies from Sonora should be considered as an independent management unit that should be conserved carefully (Moritz 1994). This conclusion relies on the uniqueness and the divergence of the haplotype present in Sonora, the presence of private alleles in the colonies located in this site, their high genetic variation for microsatellite loci, and their level of genetic differentiation.

Within *C. mexicanus*, colonies with high genetic variation (e.g., LS, AT, LA and LT) should receive long-term protection as reservoirs for genetic diversity. Furthermore, connectivity among colonies is important for the conservation of genetic diversity in this endemic species. Therefore, conservation management should mitigate habitat fragmentation and habitat loss that, together with long periods of drought, have reduced the populations of this key species of the arid grasslands of Mexico.

Supplementary Material

Supplementary Table S1.- Number of individuals; haplotype per site for *Cynomys ludovicianus* and haplotype per colony in *C. mexicanus*.

Supplementary Table S2.- Detailed values of genetic variation for mitochondrial sequences and ten microsatellite loci per colony per state for two black-tailed prairie dog species: *Cynomys ludovicianus* and *Cynomys mexicanus*.

Supplementary Table S3.- Allele frequencies for ten microsatellite loci for two black-tailed prairie dog species: *C. ludovicianus* and *C. mexicanus*.

Supplementary Figure S4.- Bayesian clustering analysis of 149 mtDNA sequences from black-tailed prairie dogs (*C. ludovicianus*) from 13 colonies located in Chihuahua as determined by BAPS v 5.3. resulted in $K = 5$.

Supplementary Table S5.- Pairwise differences between colonies for a) mtDNA pairwise F_{ST} and b) nuclear microsatellite loci pairwise R_{ST} and G'_{ST} .

Funding

G. C. had a doctoral scholarship granted by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. Becario 210544). This work was supported in part by Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México (operative funding to L. E. E.); Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (ECO-IE355 to L. E. E.); and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (156725 to J. O.).

Acknowledgements

This manuscript was presented in partial fulfillment of the requirements to obtain a Ph.D. degree by G. Castellanos in the Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Special thanks to two anonymous reviewers that helped us improve this manuscript. J. Gasca-Pineda, S. Ramírez-Barahona, A. Moreno-Letelier, E. Scheinvar and A. Ochoa reviewed an early draft of this manuscript. L. F. Castellanos-Morales improved artwork. Special thanks to ReGeneC for organizing the I Congreso Latinoamericano de Genética para la Conservación. Our special thanks to Y. Gutierrez Guerrero, E. Aguirre Planter, L. Espinosa Asuar, S. Barrientos, P. Padilla, G. Roza (RIP) and to the Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Instituto de Ecología, UNAM for their help in lab work. Dirección General de Vida Silvestre from the Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales for capture and sampling permits: SGPA/DGVS/09578/09, SGPA/DGVS/01073/11, SGPA/DGVS/00644/12 and SGPA/DGVS/00709/13. Also for their permission and support for sample collection, from Chihuahua: G. Ceballos and the Laboratorio de Ecología y Conservación de Fauna Silvestre from the Instituto de Ecología, UNAM, R. Ávila, Ranches and Ejidos from Janos and Casas

Grandes, the Estación Biológica de La Pradera and Rancho El Uno; from Sonora: F. Molina from the Instituto de Ecología, UNAM, G. Carreón and D. Toyos from Naturalia A. C., to Rancho Los Fresnos, and The Nature Conservancy (TNC), CEDES, Rancho La Mesa, and Rancho Las Palmitas; from San Luis Potosí: to L. Leyequien from CONANP, authorities of the ejidos El Salado, El Gallo and Tanque de López; from Coahuila: to E. Canales and A. Carrera from the Secretaría del Medio Ambiente del Estado de Coahuila, J. Lombardo and ProFauna, to R. Vasques, Rancho Los Ángeles, and Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), to the authorities of the ejidos Chapultepec and Artesillas; from Nuevo León: to the authorities of the ejidos La Hediondilla, La Trinidad and El Salero. D. Piñero and L. León-Paniagua provided advice during the development of the project. M. Rosas Barrera, D. Escudero, E. Mendoza, J. Gasca-Pineda, D. A. Contreras, E. Bonilla, C. M. Valdez, R. Silva, O. Mendoza, S. L. Gómez, and C. Duran provided assistance during fieldwork.

References

- Allendorf FW, Luikart G. 2007. Conservation and the genetics of populations. Oxford(OX): Blackwell publishing.
- Antolin MF, Savage LT, Eisen RJ. 2006. Landscape features influences genetics structure of black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*). *Landscape Ecol.* 21:867-875
- Avise JC. 1995. Mitochondrial DNA polymorphism and a connection between genetics and demography of relevance to conservation. *Conserv Biol.* 9:686-690.
- Baker CS. 2013. Journal of heredity adopts joint data archiving policy. *J Hered.* 104:1. Doi. 10.1093/jhered/ess137.
- Blair C, Heckman KL, Russell AL, Yoder AD. 2014. Multilocus coalescent analyses reveal the demographic history and speciation patterns of mouse lemur sister species. *BMC Evol Biol.* 14:57.
- Bock DA, MacIsaac HJ, Cristescu ME. 2012. Multilocus genetic analyses differentiate between widespread and spatially restricted cryptic species in a model ascidian. *Proc R Soc B.* 279:2377-2385.
- Boessenkool S, Taylor SS, Tepolt CK, Komendur J, Jamieson IG. 2007. Large mainland populations of South Island robins retain greater genetic diversity than offshore island refuges. *Conserv Genet* 8:705:714.
- Broadhurst L, Coates D. 2002. Genetic diversity within and divergence between rare and geographically widespread taxa of the *Acacia acuminata* Benth. (Mimosaceae) complex. *Heredity* 88:250-257

- Campbell P, Putnam AS, Bonney C, Bilgin R, Morales JC, Kunz TH, Ruedas LA. 2007. Contrasting patterns of genetic differentiation between endemic and widespread species of fruit bats (Chiroptera: Pteropodidae) in Sulawesi, Indonesia. *Mol Phyl Evol.* 44:474-482.
- Castellanos-Morales G, Gasca-Pineda J, Ceballos G, Ortega J. 2014. Genetic variation in a peripheral and declining population of black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) from Mexico. *J Mammal.* 95:467-479.
- Ceballos G, Wilson DE. 1985. *Cynomys mexicanus*. *Mammal Species.* 248:1-3.
- Ceballos G, Davidson A, List R, Pacheco J, Manzano-Fischer P, Santos-Barrera G, Cruzado J. 2010. Rapid decline of a grassland system and its ecological and conservation implications. *PLoS ONE* 5:e8562.
- Chapuis MP, Estoup A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol Biol Evol.* 24:621–631.
- Chen Z-Q, Lautenberger JA, Lyons LA, McKenzie L, O'Brien SJ. 1999. A human genome map of comparative anchor tagged sequences. *J Hered* 90:477-484.
- Chesser RK. 1983. Genetic variability within and among populations of the black-tailed prairie dog. *Evolution.* 37:320–331.
- CITES 2013. Convention on International trade in endangered species of wild fauna and flora. [cited: 04 june 2014]. Available from: <http://www.cites.org>.
- Coates DJ, Carstairs S, Hamley VL. 2003. Evolutionary patterns and genetic structure in localized and widespread species in the *Stylidium caricifolium* complex (Stylidiaceae). *Am J Bot.* 90:997-1008.
- Corander J, Waldmann P, Marttinen P, Sillanpää M. 2004. BAPS 2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. *Bioinformatics.* 20:2363-2369.
- Corander J, Sirén J, Arjas E. 2008. Bayesian spatial modeling of genetic population structure. *Computation Statistics.* 23:111-129.
- Dobson FS, Chesser RK, Hoogland JL, Sugg DW, Foltz DW. 2004. The influence of social breeding groups on effective population size in black-tailed prairie dogs. *J Mammal.* 85:58–66.
- Dray S, Dufour AB. 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *J Stat Software.* 22:1-20.
- Eguiarte LE, Aguirre-Planter E, Aguirre X, Colín R, González A, Rocha M, Scheinvar E, Trejo L, Souza V. 2013. From isozymes to genomics: population genetics and conservation of agave in Mexico. *Bot Rev.* 79:483–506.

Ersts PJ. 2011. Geographic Distance Matrix Generator (version 1.2.3) Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation. [cited: 09 June 2014]. Available from: http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg.

Ewing B, Hillier L, Wendl M, Green P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome Resour.* 8:175–185.

Excoffier L, Lischer HE. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 10:564-567.

Excoffier L, Smouse P, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics.* 131:479–491.

Fitak RR, Koprowski JL, Culver M. 2013. Severe reduction in genetic variation in a montane isolate: the endangered Mount Graham red squirrel. *Conserv Genet.* 14:1233-1241.

Fluxus-engineering. 2014. Network 4.6.1.1. [cited: 04 July 2014]. Available from: http://www.fluxus-engineering.com/sharenet_rn.htm.

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2004. A primer of conservation genetics. Cambridge (MA): Cambridge University Press.

Gitzendanner MA, Soltis PS. 2000. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *Am J Bot.* 87:783:792.

Goodwin HT. 1995. Pliocene-Pleistocene biogeographic history of prairie dogs, genus *Cynomys* (Sciuridae). *J Mammal.* 76:100-122.

Gordon D, Abajian C, Green P. 1998. *Consed*: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* 8:195–202.

Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New algorithms and method to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 59:307-321.

Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol.* 52:696–704.

Hall TA. 1999 BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Sym Se.* 41:95–98.

Hamrick JL, Godt MJW. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Phil Trans R Soc Lond.* 351:1291-1298.

- Harrison RG, Bogdanowicz SM, Hoffmann RS, Yensen E, Sherman PW. 2003. Phylogeny and evolutionary history of the ground squirrels (Rodentia: Marmotinae). *J Mamm Evol.* 10:249–276.
- Haynie ML, Van Den Bussche A, Hoogland JL, Gilbert DA. 2003. Parentage, multiple paternity, and breeding success in Gunnison's and Utah prairie dogs. *J Mammal.* 84:1244-1253.
- Hedrick P. 2011. *Genetics of populations*. Boston (MA): Jones & Bartlett Learning.
- Hinten G, Harriss F, Rossetto M, Braverstock PR. 2003. Genetic variation and island biogeography: Microsatellite and mitochondrial DNA variation in island populations of the Australian bush rat, *Rattus fuscipes greyii*. *Conserv Genet* 4:759-778.
- Hobbs JP, van Herwerden L, Jerry DR, Jones GP, Munday PL. 2013. High genetic diversity in geographically remote populations of endemic and widespread coral reef angelfishes (genus: *Centropyge*). *Diversity.* 5:39-50.
- Hoisington-Lopez JL, Waits LP, Sullivan J. 2012. Species limits and integrated taxonomy of the Idaho ground squirrel (*Uroditellus brunneus*): genetic and ecological differentiation. *J Mammal.* 93:589-604.
- Holsinger KE, Weir BS. 2009. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . *Nature Reviews.* 10:639-550.
- Hoogland JL. 1996. *Cynomys ludovicianus*. *Mamm Species.* 535:1-10.
- Hoogland JL. 2013. Prairie dogs disperse when all close kin have disappeared. *Science.* 339:1205-1207.
- IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. [cited: 04 June 2014]. Available from: <http://www.iucnredlist.org>.
- Jones RT, Britten H. 2010. The absence of concordant population structure in the black-tailed prairie dog and the flea, *Oropsylla hirsuta*, with implications for the spread of *Yersinia pestis*. *Mol Ecol.* 19:2038-2049.
- Jones RT, Martin AP, Mitchell AJ, Collinge SK, Ray C. 2005. Characterization of 14 polymorphic microsatellite markers for the black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*). *Mol Ecol Notes.* 5:71–73.
- Kelley ST, Farrell BD, Mitton JB. 2000. Effects of specialization on genetic differentiation in sister species of bark beetles. *Heredity.* 84:218-227.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 25:1451–1452.
- Liu Z, Li B, Ma J, Zheng D, Xu Y. 2014. Phylogeography and genetic diversity of the red squirrel (*Sciurus vulgaris*) in China: implications for the species' postglacial expansion history. *Mammal Biol.* 79:247-253.

Lyons LA, Laughlin TF, Copeland NG, Jenkins NA, Womack JE, O'Brien SJ. 1997. Comparative anchor tagged sequences (CATS) for integrative mapping of mammalian genomes. *Nat Genet* 15:47-56.

Magle SB, Ruell EW, Antolin MF, Crooks KR. 2010. Population genetic structure of black-tailed prairie dogs, a highly interactive species in fragmented urban habitat. *J Mammal*. 91:326-335.

Martínez-Estévez L, Balvanera P, Pacheco J, Ceballos G. 2013. Prairie dog decline reduces the supply of ecosystem services and leads to desertification of semiarid grasslands. *PLoS ONE*. 8:e75229.

McCullough DA, Chesser RK. 1987. Genetic variation among populations of the Mexican prairie dog. *J Mammal*. 68:555-560.

Meirmans PG, Hedrick PW. 2011. Assessing population structure: F_{ST} and related measures. *Mol Ecol Resour*. 11:5-18.

Meirmans PG, Van Tienderend PH. 2004. GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity for asexual organisms. *Mol Ecol Notes*. 4:792-794.

Moraes-Barros N, Silva JAB, Miyali CY, Morgante JS. 2006. Comparative phylogeography of the Atlantic forest endemic sloth (*Bradypus torquatus*) and the widespread three-toed sloth (*Bradypus variegatus*) (Bradypodidae, Xernathra). *Genetica*. 126:189-198.

Moritz C. 1994. Defining "Evolutionary Significant Units" for conservation. *Trends Ecol Evol*. 9:373-375.

Moritz C. 1999. Conservation units and translocations: strategies for conserving evolutionary processes. *Hereditas*. 130:217-228.

Ochoa A, Gasca J, Ceballos GJ, Eguiarte LE. 2012. Spatiotemporal population genetics of the endangered Perote ground squirrel (*Xerospermophilus perotensis*) in a fragmented landscape. *J Mammal*. 93:1061-1074.

Oshida T, Ikeda K, Yamada K, Masuda R. 2001. Phylogeography of the Japanese giant flying squirrel, *Petaurista leucogenys*, based on mitochondrial DNA control region sequences. *Zool Sci Tokio*. 18:107-114.

Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol*. 25:1253-1256.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly D. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155:945-959.

Posada D, Crandall KA. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *TREE*. 16:37-45.

R Development Core Team. 2013. R: a language for environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. [cited: 09 June 2014]. Available from: <http://www.R-project.org>.

- Raduski AR, Riesberg LH, Starsburg JL. 2010. Effective population size, gene flow, and species status in a narrow endemic sunflower, *Helianthus neglectus*, compared to its widespread sister species, *H. Petiolaris*. *Int J Mol Sci*. 11:492-506.
- Reid N, Hird S, Schulte-Hostedde A, Sullivan J. 2010. Examination of nuclear loci across a zone of mitochondrial introgression between *Tamias ruficaudus* and *T. amoenus*. *J Mammal*. 91:1389-1400.
- Řičanová S, Bryja J, Cosson JF, Gedeon C, Choleva L, Ambros M, Sedláček F. 2011. Depleted genetic variation of the European ground squirrel in Central Europe in both microsatellites and the major histocompatibility complex gene: implications for conservation. *Conserv Genet*. 12:1115-1129.
- Roach JL, Stapp P, Van Horne B, Antolin MF. 2001. Genetic structure of a metapopulation of black-tailed prairie dogs. *J Mammal*. 82:946-959.
- Rodríguez-Sánchez F, Hampe A, Jordano P and Arrollo J. 2010. Past tree range dynamics in the Iberian Peninsula inferred through phyleogeography and paleodistribution modeling: a review. *Rev Paleobot Palyno*. 162:507-521.
- Sackett LC, Collinge SK, Martin AP. 2013. Do pathogens reduce genetic diversity of their hosts? Variable effects of sylvatic plague in black-tailed prairie dogs. *Mol Ecol*. 22:2441-2455.
- Sackett LC, Cross TB, Jones RT, Johnson WC, Ballare K, Ray C, Collinge SK, Martin AP. 2012. Connectivity of prairie dog colonies in an altered landscape: inferences from analysis of microsatellite DNA variation. *Conserv Genet*. 13:407–418.
- Scott-Morales LM, Gottschalk E, Mühlenberg M. 2005. Decline in the endemic Mexican prairie dog *Cynomys mexicanus*: what do we know about extinction risk. *Orix*. 39:389-397.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010, 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 30 de diciembre de 2010.
- Sikes RS, Gannon WL, The animal care and use committee of the American Society of Mammalogists. 2011. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *J Mammal*. 91:235-253.
- Slobodchikoff CN, Perla BS, Verdolin JL. 2009. *Prairie dogs: communication and community in an animal society*. Cambridge (MA): Harvard University Press.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. 2004. MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes*. 4:535-538.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38:1358-1370.

Table and Figure Legends

Table 1.- Genetic diversity data obtained from mtDNA sequence data and 10 nuclear microsatellite loci for black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) and Mexican prairie dogs (*C. mexicanus*). Site, number of sampled colonies (No. Colonies), number of sequences per site (N), number of segregating sites (S), number of haplotypes (h), haplotype diversity (Hd), and nucleotide diversity (π) for mtDNA. Number of individuals genotyped (N), allelic richness (A), observed heterozygosity (H_O), expected heterozygosity (H_E), genetic structure (R_{ST}), and Hedrick's standardized genetic structure (G'_{ST}) for microsatellite data. Range values for individual colonies are shown in parentheses when available, detailed data is available in Supplementary Table S2.

Table 2.- Components of an analysis of molecular variance (AMOVA – Excoffier et al. 1992) of mtDNA and nuclear microsatellite loci for *C. ludovicianus* and *C. mexicanus* considering the genetic clusters obtained with BAPS v5.3 and Structure 2.2 within each species and considering each species as a genetic group.

Figure 1.- Spatial location of the sampled areas within the distribution of *C. ludovicianus* (gray dots) and *C. mexicanus* (gray squares). The figure shows the distribution of black-tailed prairie dogs (*C. ludovicianus*) as a light gray polygon demarcated by a dashed line, and the distribution of Mexican prairie dogs (*C. mexicanus*) is depicted as hatched polygons. Location of the Sierra Madre Occidental (SMO) is shown as a barrier separating colonies from Sonora and the rest of *C. ludovicianus* distribution.

Figure 2.- Maximum-likelihood gene genealogy for concatenated Control Region and Cytochrome *b* sequences from *Cynomys ludovicianus* and *C. mexicanus* showing bootstrap values higher than 60%. Color codes on the right side of the gene genealogy represent sampling site as depicted in the internal legend. Haplotypes CL1 to CL19 represent the 19 haplotypes found in *C. ludovicianus* from Chihuahua (CL1 to CL12), Sonora (CL13), New Mexico (CL14 to CL16) and Colorado (CL17 to CL19). Haplotypes CM1 to CM16 represent the haplotypes found in *C. mexicanus* from 6 colonies. Sequences from representatives of the sister subgenus *Leucocrossuromys* (*C. gunnisoni*), and from the sister genus *Xerospermophilus* (*X. pilosoma* and *X. perotensis*; 100% bootstrap value not shown in the figure) obtained from GenBank were used as outgroups to root the gene genealogy.

Figure 3.- Median joining networks constructed for a) *C. ludovicianus* and b) *C. mexicanus* mtDNA haplotypes, estimated with Network 4.6.1.1 considering only variable sites. The size of each pie represents the frequency of each haplotype; color represents sampling site as depicted in the gene genealogy.

Figure 4.- a) Bayesian clustering analysis of mtDNA sequences from black-tailed (*C. ludovicianus*) and Mexican prairie dogs (*C. mexicanus*) as determined by BAPS v 5.3. resulting in $K = 5$. We detected 4 clusters within *C. ludovicianus* (cluster 1 = Chihuahua and NM; cluster 2 = Chihuahua and NM; cluster 3 = Sonora; and cluster 4 = Colorado), and one cluster for *C. mexicanus*. **b)** BAPS analysis of mtDNA sequences for *C. mexicanus* resulted in 3 clusters (cluster 1 = all colonies; cluster 2 = LA and LS; and cluster 3 = LT). **c)** Bayesian clustering analysis for nuclear microsatellite loci from both species as determined by Structure 2.2. ($K = 5$). Within *C. ludovicianus*, Sonora and Chihuahua were differentiated with substructure within Chihuahua ($K = 2$ as reported by Castellanos-Morales et al. 2014), and *C. mexicanus* individuals were assigned to two clusters (cluster 1 = all colonies but LA; and cluster 2 = LA and ESA). New Mexico and Colorado were not included in the microsatellites analysis.

Table 1.- Genetic diversity data obtained from mtDNA sequence data and 10 nuclear microsatellite loci for black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) and Mexican prairie dogs (*C. mexicanus*). Site, number of sampled colonies (No. Colonies), number of sequences per site (N), number of segregating sites (S), number of haplotypes (h), haplotype diversity (Hd), and nucleotide diversity (π) for mtDNA. Number of individuals genotyped (N), allelic richness (A), observed heterozygosity (H_O), expected heterozygosity (H_E), genetic structure (R_{ST}), and Hedrick's standardized genetic structure (G''_{ST}) for microsatellite data. Range values for individual colonies are shown in parentheses when available, detailed data is available in Supplementary Table S2.

Site	No. Colonies	mtDNA sequences						Nuclear microsatellites					
		N	S	h	Hd	π	dF_{ST}	N	A	H_O	H_E	dR_{ST}	dG''_{ST}
Chihuahua ^a	13	149	28	12	0.829 (0.44 – 0.82)	0.0026 (0.0002 – 0.006)	0.259	161	3.5 (1.6 – 3.3)	0.431 (0.31 – 0.55)	0.532 (0.45 – 0.62)	0.128	0.289
New Mexico ^b	1	5	21	4	0.900	0.0084	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Sonora	2	59	0	1	0.000	0.0000	0	42	5.5 (4 – 4.6)	0.437 (0.44 – 0.47)	0.492 (0.50 – 0.56)	0.112	0.302
Colorado ^c	3	10	4	3	0.511 (0 – 1)	0.0009 (0 – 0.0011)	NA	510	9.3	NA	0.633	NA	NA
<i>C. ludovicianus</i>	19	223	37	19	0.854	0.0054	0.448	207	6.5	0.432	0.524	0.228	0.504
Artesillas	1	16	3	4	0.691	0.0006	NA	16	4.2	0.528	0.539	NA	NA
El Gallo	1	5	5	2	0.400	0.0014	NA	5	2.8	0.365	0.522	NA	NA
El Salero	1	5	1	2	0.400	0.0003	NA	5	3.2	0.465	0.639	NA	NA
Los Angeles	1	23	4	3	0.695	0.0013	NA	24	4.3	0.48	0.566	NA	NA
La Soledad	1	18	5	5	0.556	0.0008	NA	18	5.2	0.637	0.656	NA	NA
La Trinidad	1	10	7	5	0.844	0.0018	NA	10	3.8	0.581	0.634	NA	NA
<i>C. mexicanus</i>	6	77	18	16	0.778	0.0016	0.203	78	7	0.509	0.591	0.127	0.362

^a *Cyt-b* sequences for 157 individuals were taken from Castellanos-Morales et al. (2014), and 149 of these samples were amplified for the *CR* for the current analysis. Microsatellite genotypes for 160 individuals were obtained from Castellanos-Morales et al. (2014), and one additional sample was genotyped for the current analysis.

^b Samples from New Mexico could not be amplified for microsatellite loci because of low DNA quality.

^c Data for 11 nuclear microsatellite loci from 510 prairie dogs from 9 colonies located in Boulder, Colorado were reported in Sackett et al. (2012).

^d F_{ST} and G''_{ST} values for Chihuahua and Sonora were obtained considering the genetic structure between colonies within each site.

Table 2.- Components of an analysis of molecular variance (AMOVA – Excoffier et al. 1992) of mtDNA and nuclear microsatellite loci for *C. ludovicianus* and *C. mexicanus* considering the genetic clusters obtained with BAPS v5.3 and Structure 2.2 within each species and considering each species as a genetic group.

Source of variation	mtDNA AMOVA			Nuclear microsatellite loci AMOVA			
	^a <i>C. ludovicianus</i>	^b <i>C. mexicanus</i>	^c Species	^d <i>C. ludovicianus</i>	<i>C. mexicanus</i>	^e Species	
	Percentage of the variation	Percentage of the variation	Percentage of the variation	Percentage of the variation	Percentage of the variation	Percentage of the variation	
Among clusters	68.9	32.3	55.7	50.0	-2.2 ^e	----- ^f	40.5
Among colonies within clusters	9.2	8.0	31.1	4.1	19.4 ^e	18.0 ^f	20.5
Within colonies	21.9	59.8	13.3	45.9	82.8 ^e	82.0 ^f	39.0
F_{SC}	0.294	0.117	0.700	0.082	0.189 ^e	----- ^f	0.345
F_{ST}	0.781	0.402	0.867	0.541	0.172 ^e	0.180 ^f	0.610
F_{CT}	0.689	0.323	0.557	0.500	-0.022 ^e	----- ^f	0.405

^a According to BAPS v5.3 genotypic assignment for mtDNA sequences within *C. ludovicianus*. Group 1: Chihuahua + New Mexico; group 2: Sonora; Group 3: Colorado.

^b According to BAPS v5.3 genotypic assignment for mtDNA sequences within *C. mexicanus*. Group 1: LS, ESA, EGI and AT; group 2: LA; Group 3: LS.

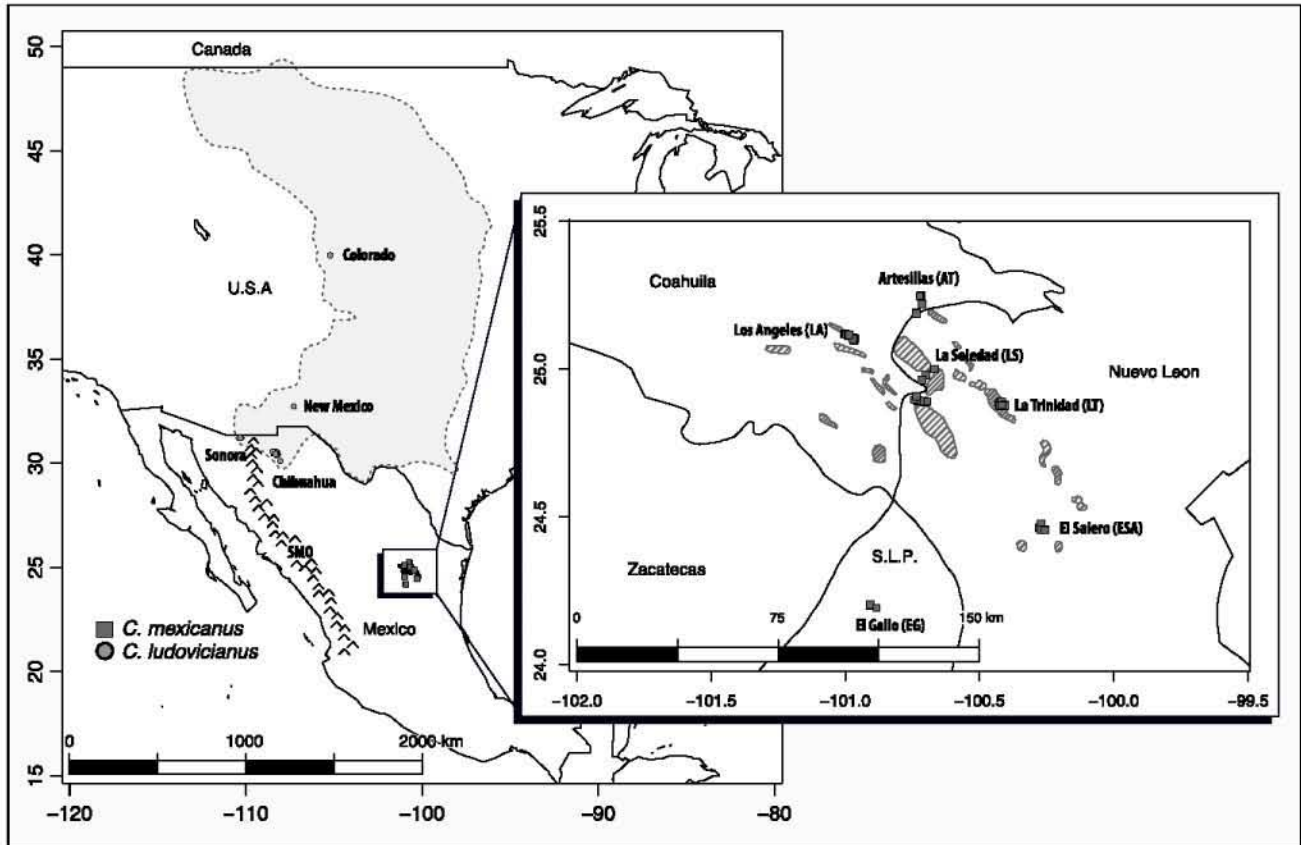
^c For mtDNA, determining each species as a group. Group 1 (*C. ludovicianus*): Chihuahua, Colorado, New Mexico and Sonora; Group 2 (*C. mexicanus*): AT, EGI, ESA, LA, LS and LT.

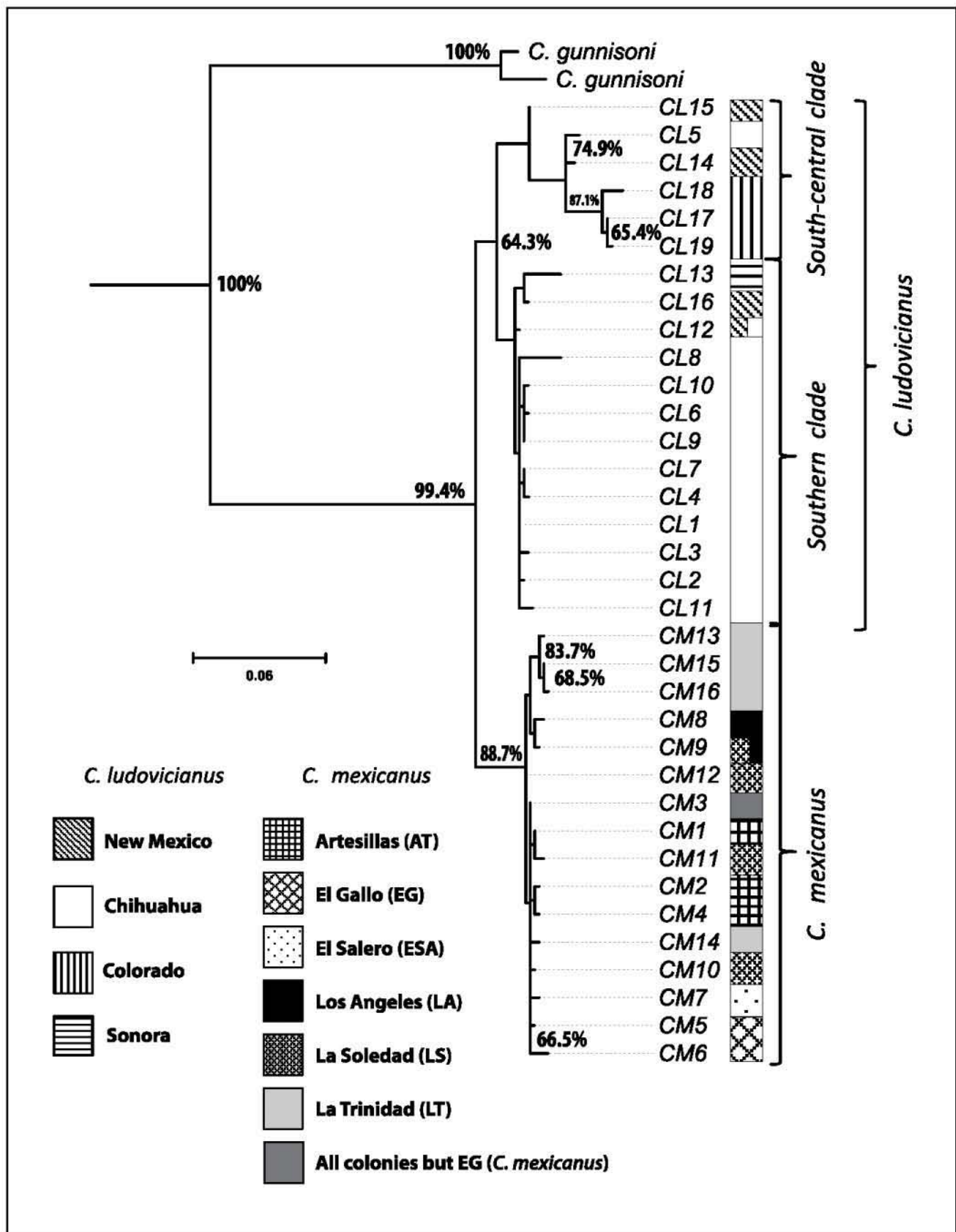
^d According to Structure 2.2 genotypic assignment for 10 nuclear microsatellite loci within *C. ludovicianus*. Group 1: 10 colonies from Chihuahua (AB, BA, EA, EC, LB, MO, MV, OS, PP and PV); Group 2: 3 colonies from Chihuahua (CJ, LC and UN); Group 3: Sonora.

^e According to Structure 2.2 genotypic assignment for 10 nuclear microsatellite loci within *C. mexicanus*. Group 1: AT, EGI, ESA, LS and LT; Group 2: LA.

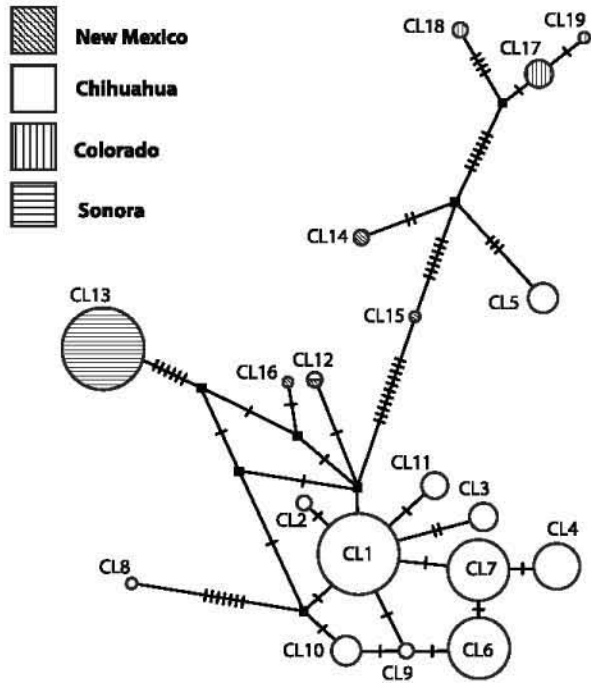
^f For 10 nuclear microsatellite loci, considering all colonies for *C. mexicanus* as a single group. Group 1: AT, EGI, ESA, LA, LS and LT.

^g For 10 nuclear microsatellite loci, determining each species as a group. Group 1 (*C. ludovicianus*): Chihuahua and Sonora; Group 2 (*C. mexicanus*): AT, EGI, ESA, LA, LS and LT.

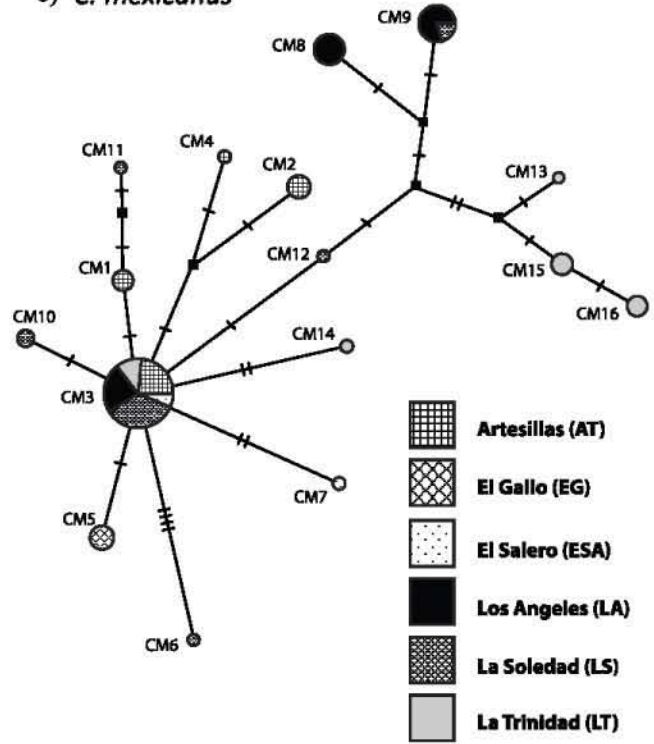


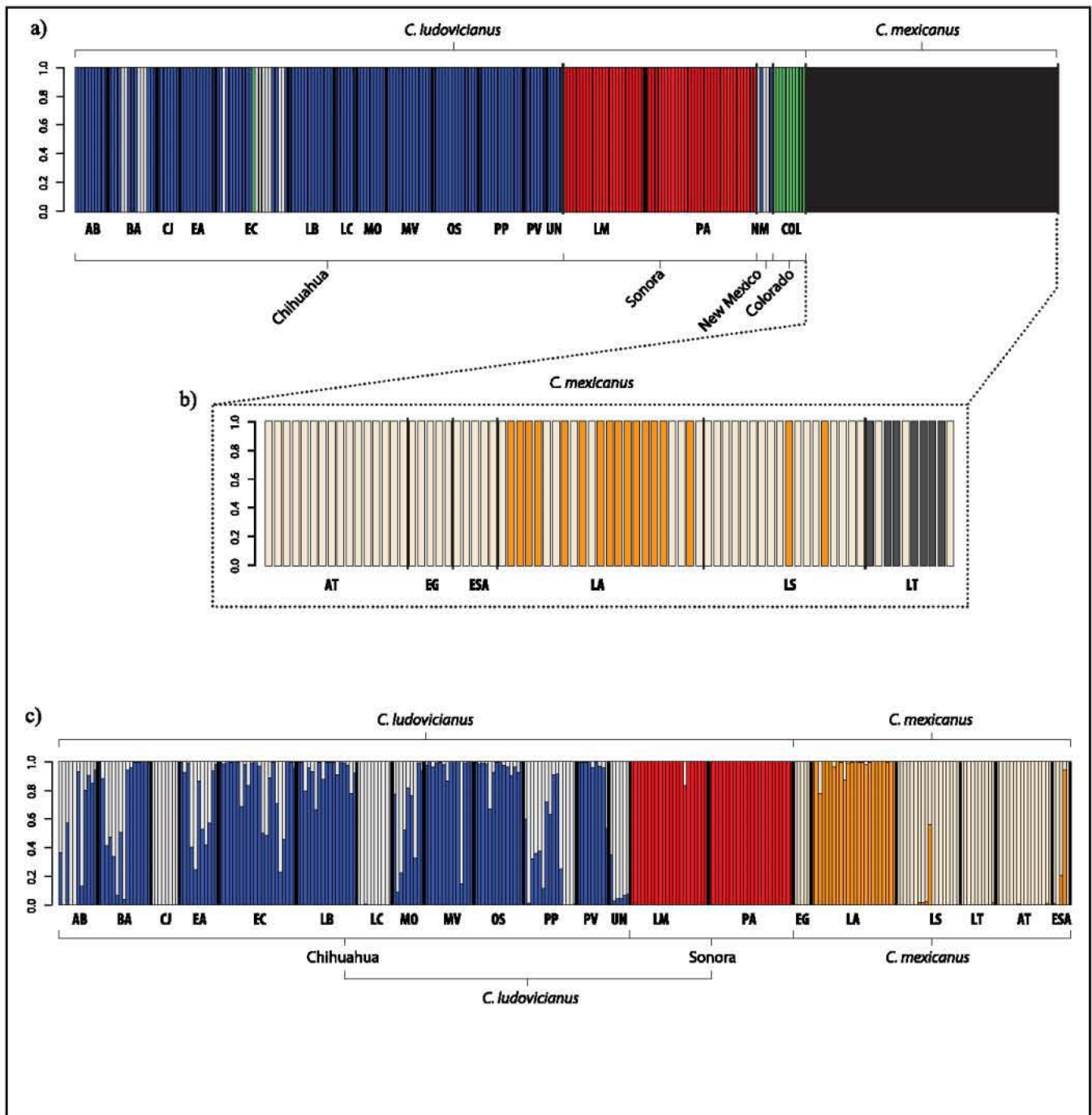


a) *C. ludovicianus*



b) *C. mexicanus*





Supplementary Material Table S1.- Number of individuals; haplotype per site for *Cynomys ludovicianus* and haplotype per colony in *C. mexicanus*.

Haplotype	<i>Cynomys ludovicianus</i> (CL)																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Chihuahua	43	2	7	19	8	34	18	1	2	8	6	1	--	--	--	--	--	--	--
Sonora	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	59	--	--	--	--	--	--
New Mexico	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1	--	2	1	1	--	--	--
Colorado	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	7	2	1
Total	43	2	7	19	8	34	18	1	2	8	6	2	59	2	1	1	7	2	1

Haplotype	<i>Cynomys mexicanus</i> (CM)															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Artesillas	3	4	8	1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
El Gallo	--	--	--	--	4	1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
El Salero	--	--	4	--	--	--	1	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Los Angeles	--	--	8	--	--	--	--	8	7	--	--	--	--	--	--	--
La Soledad	--	--	12	--	--	--	--	2	--	2	1	1	--	--	--	--
La Trinidad	--	--	2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1	1	3	3
Total	3	4	34	1	4	1	1	10	7	2	1	1	1	1	3	3

Supplementary Material Table S2.- Detailed values of genetic variation for mitochondrial sequences and ten microsatellite loci per colony per state for two black-tailed prairie dog species: *Cynomys ludovicianus* and *Cynomys mexicanus*.

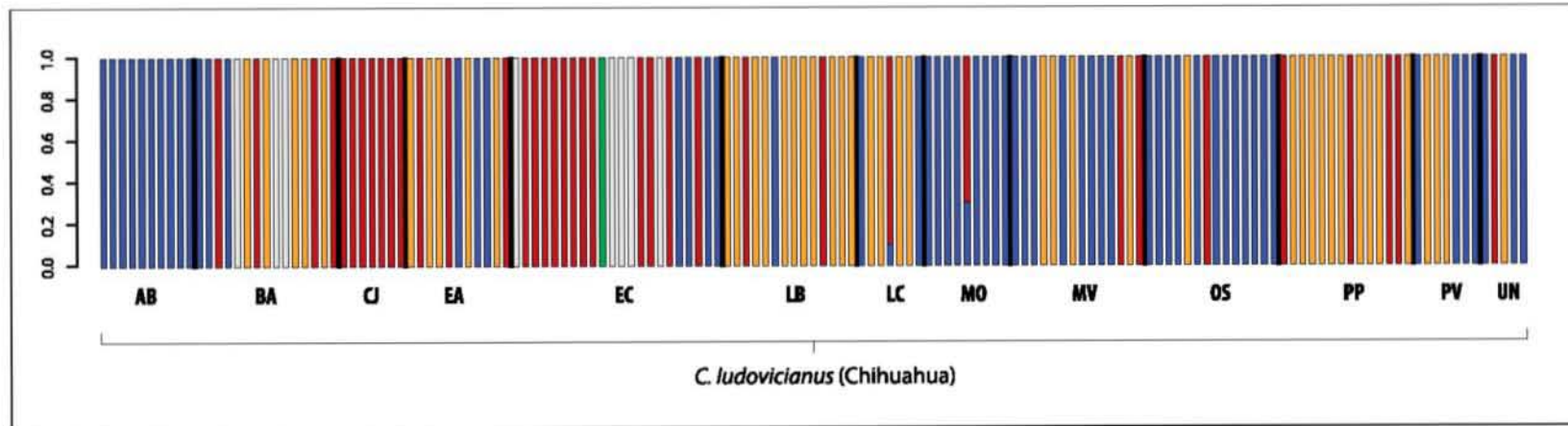
Species	State	Colony	mtDNA				Nuclear microsatellite loci				
			N	S	h	H_d	π	N	A	H_O	H_E
<i>Cynomys ludovicianus</i>	Chihuahua	AB	10	2	3	0.511	0.00037	11	2.5	0.309	0.448
		BA	15	25	5	0.819	0.00589	15	2.8	0.440	0.573
		CJ	7	1	2	0.285	0.00019	8	2.2	0.375	0.499
		EA	11	2	3	0.709	0.00066	11	2.9	0.509	0.606
		EC	22	24	5	0.693	0.00647	22	3.3	0.514	0.618
		LB	14	4	6	0.681	0.00081	17	2.9	0.465	0.553
		LC	7	2	4	0.809	0.00077	10	2.4	0.380	0.527
		MO	9	2	3	0.556	0.00049	9	2.5	0.433	0.509
		MV	14	4	5	0.780	0.00114	14	2.7	0.457	0.565
		OS	14	2	3	0.275	0.00027	14	2.3	0.436	0.528
		PP	14	1	2	0.439	0.00030	15	2.6	0.547	0.573
		PV	7	2	2	0.571	0.00077	9	2.4	0.500	0.556
		UN	5	2	3	0.700	0.00067	6	1.6	0.389	0.459
	Sonora	LM	36	0	1	0	0	29	4	0.439	0.503
		PA	23	0	1	0	0	24	4.6	0.469	0.563
	New Mexico	NM	5	21	4	0.900	0.00841	NA	NA	NA	NA
	Colorado	COL17	6	3	2	0.533	0.00108				
COL19		2	1	2	1	0.00067	NA	NA	NA	NA	
COL30		2	0	1	0	0					
<i>Cynomys mexicanus</i>	Coahuila	AT	16	3	4	0.691	0.00057	16	4.2	0.528	0.539
		LA	23	4	3	0.695	0.00126	24	4.3	0.48	0.566
	SLP	EG	5	5	2	0.400	0.00135	5	2.8	0.365	0.522
	Nuevo Leon	ESA	5	1	2	0.400	0.00027	5	3.2	0.465	0.639
		LS	18	5	5	0.556	0.00126	18	5.2	0.637	0.656
		LT	10	7	5	0.844	0.00184	10	3.8	0.581	0.634

Supplementary Material Table S3.- Allelic frequencies for ten microsatellite loci for two black-tailed prairie dog species: *C. ludovicianus* and *C. mexicanus*.

Locus	Alleles	<i>C. ludovicianus</i>				<i>C. mexicanus</i>					
		Chihuahua	Sonora LM PA	Overall	SLP EG	Coahuila AT LA	Nuevo Leon ESA LS LT	Overall			
A2	Population % missing	0	0.136 0	0.014	0.2	0 0	0 0 0	0 0 0	0.013		
	202	0	0 0.042	0.005	0	0 0	0 0 0	0 0 0	0		
	206	0.003	0.763 0.875	0.176	0.125	0 0	0.2 0.556 0.55		0.221		
	208	0	0.132 0.042	0.017	0	0 0	0 0 0	0 0 0	0		
	210	0.174	0 0	0.137	0	0 0	0 0.028 0		0.006		
	212	0.543	0 0	0.429	0	0 0.167	0.2 0.056 0		0.078		
	214	0.239	0.053 0.042	0.199	0	0.281 0.417	0.3 0.028 0.15		0.234		
	216	0	0 0	0	0.875	0.719 0.417	0.2 0.306 0.3		0.448		
	218	0.04	0.053 0	0.037	0	0 0	0.1 0 0		0.006		
	220	0	0 0	0	0	0 0	0 0.028 0		0.006		
A8	Population % missing	0	0.045 0.042	0.01	0	0 0	0.2 0 0	0 0 0	0.013		
	246	0	0 0	0	0.1	0 0.021	0 0.028 0		0.019		
	248	0	0.071 0	0.007	0.5	0.188 0.25	0.125 0.361 0.25		0.273		
	250	0	0.071 0	0.007	0.1	0 0.083	0.25 0.111 0.4		0.123		
	252	0	0.262 0.413	0.073	0	0.125 0.292	0.625 0.139 0		0.182		
	254	0	0 0	0	0	0.094 0.292	0 0.167 0.25		0.182		
	256	0	0 0.065	0.007	0	0.031 0.021	0 0.111 0		0.039		
	258	0.298	0.095 0.022	0.246	0.1	0.219 0	0 0.083 0.1		0.084		
	260	0.506	0.5 0.435	0.498	0.2	0.312 0	0 0 0		0.078		
	262	0.137	0 0	0.107	0	0.031 0.042	0 0 0		0.019		
264	0.059	0 0.065	0.054	0	0 0	0 0 0		0			
A101	Population % missing	0	0.182 0	0.019	0	0 0	0 0 0	0 0 0	0		
	125	0	0 0.125	0.015	0	0 0	0 0 0	0 0 0	0		
	127	0	0 0.083	0.01	0	0.094 0	0 0.139 0.15		0.071		
	129	0	0.139 0	0.012	0	0.094 0.583	0.4 0.194 0.25		0.301		
	131	0.388	0.75 0.312	0.411	0	0.531 0.417	0.4 0.5 0.25		0.41		
	133	0.478	0.111 0.479	0.446	1	0.281 0	0.2 0.167 0.35		0.218		
	137	0.134	0 0	0.106	0	0 0	0 0 0		0		
A104	Population % missing	0	0 0.042	0.005	0	0 0	0 0 0	0 0.2	0.026		
	168	0.174	0.75 0.522	0.274	0	0.062 0	0 0 0	0 0	0.013		
	170	0.469	0.023 0.065	0.376	0.1	0 0	0 0 0	0 0	0.007		
	172	0.022	0 0	0.017	0	0 0	0.2 0 0	0 0	0.013		
	174	0.335	0 0	0.262	0.2	0.844 0.375	0.7 0.639 0.812		0.592		
	176	0	0 0	0	0	0.062 0.479	0 0.25 0		0.224		
	178	0	0 0	0	0.5	0.031 0.125	0 0.056 0.188		0.112		
	180	0	0.068 0	0.007	0.2	0 0.021	0 0 0		0.02		
	182	0	0.159 0.217	0.041	0	0 0	0.1 0.056 0		0.02		
	184	0	0 0.022	0.002	0	0 0	0 0 0		0		
186	0	0 0.174	0.019	0	0 0	0 0 0		0			
A119	Population % missing	0	0.136 0.042	0.019	0	0 0	0 0 0	0 0 0	0		
	91	0	0 0.043	0.005	0	0 0	0 0.056 0		0.013		
	93	0	0.026 0	0.002	0	0 0	0 0 0		0		
	97	0	0.579 0.696	0.133	0	0.062 0	0 0 0		0.013		
	99	0	0 0	0	0.6	0.656 0.062	0.1 0.222 0.65		0.333		

Locus	Alleles	<i>C. ludovicianus</i>				<i>C. mexicanus</i>						
		Chihuahua	Sonora		Overall	SLP EG	Coahuila		Nuevo Leon			Overall
			LM	PA			AT	LA	ESA	LS	LT	
	101	0	0	0	0	0	0	0.062	0	0	0	0.019
	103	0	0	0	0	0	0.031	0.062	0.1	0.278	0	0.096
	105	0.099	0	0	0.079	0	0	0.146	0	0.028	0	0.051
	107	0.311	0	0	0.246	0	0.062	0.271	0.5	0.333	0.25	0.237
	109	0.429	0.395	0.261	0.406	0.2	0.188	0.396	0	0.083	0.1	0.205
	111	0.161	0	0	0.128	0.2	0	0	0.3	0	0	0.032
	Population % missing	0	0.182	0	0.019	0.2	0	0	0.2	0	0	0.026
C116	173	0.093	0.806	0.312	0.182	0	0.156	0	0	0.056	0.1	0.059
	177	0.472	0.083	0.083	0.392	0.5	0.844	0.833	0.75	0.806	0.6	0.776
	181	0.394	0.111	0.604	0.394	0.5	0	0.104	0.25	0.083	0.25	0.125
	185	0.04	0	0	0.032	0	0	0.062	0	0.056	0.05	0.039
	Population % missing	0	0.136	0	0.014	0	0	0	0	0	0	0
D1	174	0	0.026	0	0.002	0	0	0	0.1	0.028	0.1	0.026
	178	0	0	0	0	0.1	0.406	0.667	0	0.278	0.55	0.429
	182	0	0.842	0.75	0.167	0.7	0.469	0.312	0.7	0.333	0.15	0.378
	186	0.227	0.026	0.021	0.184	0.1	0.094	0	0.1	0.306	0.2	0.128
	190	0.453	0.079	0.208	0.39	0	0.031	0.021	0.1	0.056	0	0.032
	194	0.32	0.026	0.021	0.257	0.1	0	0	0	0	0	0.006
	Population % missing	0	0	0	0	0	0.062	0.042	0	0	0	0.026
D2	282	0	0.045	0	0.005	0	0.2	0.304	0.4	0.139	0.15	0.211
	286	0	0	0.021	0.002	0	0.333	0.022	0.2	0.111	0.15	0.132
	290	0	0.5	0.583	0.121	0.6	0.433	0.109	0.3	0.194	0.35	0.27
	294	0.55	0.182	0.062	0.454	0.2	0	0.326	0.1	0.361	0.35	0.25
	298	0	0.273	0.312	0.065	0.2	0.033	0.239	0	0.083	0	0.112
	302	0.45	0	0.021	0.353	0	0	0	0	0.111	0	0.026
	Population % missing	0	0.182	0	0.019	0.2	0	0.042	0	0.056	0.1	0.051
D115	176	0	0	0	0	0	0.031	0	0	0.059	0	0.02
	180	0	0	0	0	0.75	0	0	0	0.088	0.056	0.068
	184	0	0.083	0.042	0.012	0	0	0	0.3	0.029	0	0.027
	188	0.432	0.028	0.083	0.355	0	0.594	0.957	0.7	0.559	0.611	0.676
	192	0.422	0	0.021	0.337	0.25	0.344	0.043	0	0.235	0.278	0.189
	196	0.043	0.222	0.021	0.057	0	0	0	0	0.029	0.056	0.014
	200	0.102	0.556	0.458	0.185	0	0.031	0	0	0	0	0.007
	204	0	0.056	0.375	0.049	0	0	0	0	0	0	0
	208	0	0.056	0	0.005	0	0	0	0	0	0	0
	Population % missing	0	0.318	0	0.034	0	0	0.042	0.4	0	0.1	0.051
D120	194	0	0	0	0	0	0.062	0	0.333	0.111	0.056	0.061
	196	0	0	0	0	0	0.031	0.022	0	0	0.056	0.02
	198	0	0	0	0	0	0.062	0	0	0	0	0.014
	200	0	0	0.021	0.003	0	0	0.022	0	0	0.111	0.02
	202	0.46	0	0.229	0.398	0.6	0.656	0.37	0.667	0.528	0.333	0.493
	204	0.54	0	0.312	0.472	0.4	0.156	0.304	0	0.333	0.389	0.284
	206	0	0.2	0.021	0.018	0	0	0.152	0	0	0.056	0.054
	208	0	0.467	0.104	0.048	0	0	0.022	0	0.028	0	0.014
	210	0	0.333	0.125	0.04	0	0.031	0.087	0	0	0	0.034
	212	0	0	0.188	0.022	0	0	0.022	0	0	0	0.007

Supplementary Material Figure S4.- Bayesian clustering analysis of 149 mtDNA sequences from black-tailed (*C. ludovicianus*) from 13 colonies located in Chihuahua as determined by BAPS v 5.3. resulted in $K = 5$.



Supplementary Material Table S5.- Pairwise differences between colonies for a) mtDNA and b) nuclear microsatellite loci.

a) mtDNA: Below diagonal pairwise F_{ST} .

<i>C. ludovicianus</i>	Chihuahua													Sonora		
	AB	BA	CJ	EA	EC	LB	LC	MO	MV	OS	PP	PV	UN	LM	PA	
AB	---															
BA	0.102	---														
CJ	0.181	0.127	---													
EA	0.099	0.016	0.103	---												
EC	0.078	0.023	0.126	0.005	---											
LB	0.104	0.084	0.167	0.056	0	---										
LC	0.189	0.125	0.023	0.105	0.124	0.167	---									
MO	0.156	0.087	0.136	0.057	0.055	0.072	0.188	---								
MV	0.136	0.084	0.172	0.052	0.019	0.023	0.183	0.07	---							
OS	0.179	0.095	0.195	0.069	0.025	0.019	0.213	0.072	0.033	---						
PP	0.175	0.084	0.089	0.054	0.054	0.089	0.07	0.08	0.105	0.057	---					
PV	0.196	0.117	0.239	0.083	0.056	0.102	0.2	0.111	0.036	0.105	0.106	---				
UN	0.335	0.273	0.233	0.216	0.189	0.188	0.276	0.171	0.245	0.242	0.23	0.342	---			
LM	0.45	0.36	0.457	0.374	0.344	0.386	0.424	0.424	0.374	0.397	0.376	0.348	0.524	---		
PA	0.398	0.324	0.381	0.306	0.286	0.317	0.353	0.362	0.322	0.32	0.304	0.319	0.422	0.113	---	

<i>C. mexicanus</i>	AT	EGI	ESA	LA	LS	LT
AT	---					
EGI	0.407	---				
ESA	0.050	0.600	---			
LA	0.160	0.397	0.187	---		
LS	0.066	0.493	0	0.140	---	
LT	0.153	0.333	0.215	0.182	0.209	---

b) Nuclear microsatellite loci: Below diagonal pairwise R_{ST} ; above diagonal pairwise G''_{ST} .

<i>C. ludovicianus</i>	Chihuahua											Sonora			
	AB	BA	CJ	EA	EC	LB	LC	MO	MV	OS	PP	PV	UN	LM	PA
AB	---	0.217	0.346	0.213	0.179	0.215	0.374	0.301	0.283	0.357	0.366	0.394	0.561	0.868	0.834
BA	0.152	---	0.285	0.039	0.059	0.193	0.285	0.198	0.198	0.215	0.198	0.274	0.542	0.78	0.753
CJ	0.255	0.189	---	0.237	0.303	0.362	0.049	0.277	0.378	0.408	0.196	0.514	0.402	0.921	0.835
EA	0.152	0.026	0.16	---	0.014	0.133	0.246	0.132	0.125	0.159	0.13	0.203	0.434	0.83	0.735
EC	0.122	0.038	0.194	0.009	---	0	0.301	0.135	0.049	0.061	0.137	0.144	0.418	0.791	0.7
LB	0.16	0.132	0.251	0.093	0	---	0.368	0.157	0.051	0.042	0.205	0.231	0.375	0.821	0.721
LC	0.263	0.185	0.035	0.16	0.19	0.249	---	0.396	0.411	0.455	0.157	0.442	0.501	0.875	0.789
MO	0.229	0.137	0.206	0.094	0.09	0.117	0.273	---	0.156	0.151	0.178	0.239	0.303	0.861	0.8
MV	0.202	0.131	0.253	0.084	0.032	0.038	0.267	0.113	---	0.074	0.246	0.084	0.48	0.801	0.744
OS	0.261	0.148	0.286	0.112	0.042	0.032	0.306	0.116	0.054	---	0.127	0.229	0.455	0.821	0.714
PP	0.269	0.138	0.149	0.093	0.093	0.15	0.117	0.138	0.174	0.098	---	0.244	0.456	0.812	0.707
PV	0.286	0.182	0.348	0.138	0.094	0.165	0.294	0.18	0.061	0.169	0.181	---	0.62	0.732	0.73
UN	0.439	0.379	0.33	0.32	0.283	0.283	0.376	0.261	0.351	0.351	0.358	0.48	---	0.926	0.819
LM	0.538	0.447	0.547	0.466	0.433	0.482	0.509	0.52	0.464	0.489	0.476	0.439	0.62	---	0.244
PA	0.519	0.441	0.504	0.426	0.402	0.439	0.472	0.49	0.443	0.442	0.435	0.445	0.55	0.144	---

<i>C. mexicanus</i>	AT	EGI	ESA	LA	LS	LT
AT	---	0.446	0.266	0.361	0.235	0.211
EGI	0.316	---	0.572	0.694	0.514	0.444
ESA	0.230	0.217	---	0.277	0.152	0.284
LA	0.263	0.232	0.174	---	0.259	0.334
LS	0.221	0.079	0.119	0.147	---	0.087
LT	0.191	0.183	0.154	0.177	0.014	---

Capítulo 2. Peripatric speciation of an endemic species driven by Pleistocene climate change: the case of the Mexican prairie dog (*Cynomys mexicanus*).

Gabriela Castellanos-Morales, Niza Gámez, Reyna A. Castillo-Gámez y Luis E. Eguiarte.

Molecular Phylogenetics and Evolution

Sometido: 2 de junio 2015; Aceptado: 31 de agosto 2015.

Factor de Impacto: 4.018

Resumen

La hipótesis de que las especies endémicas pudieron originarse a partir del aislamiento y divergencia de poblaciones periféricas de especies de amplia distribución puede ser puesta a prueba por medio del uso de modelos de nicho ecológico (ENMs) y filogeografía estadística. Su uso conjunto provee perspectivas complementarias de las dinámicas históricas y permite poner a prueba hipótesis referentes al origen de taxa paleoendémicos. Se utilizó esta aproximación para plantear hipótesis respecto a los procesos históricos que han influenciado el origen de una especie endémica del Altiplano mexicano (*Cynomys mexicanus*) y su divergencia a partir de un ancestro de amplia distribución (*Cynomys ludovicianus*). Obtuvimos datos de 295 individuos de estas dos especies de perros de las praderas de cola negra. Los datos genéticos consistieron de secuencias mitocondriales (citocromo *b* y región control) y 10 loci de microsatélites nucleares. Se estimaron los tiempos de divergencia entre linajes dentro de cada especie y se realizaron modelos de nicho ecológico (Presente, Último Máximo Glacial y Último Interglacial) para determinar los cambios en el área de distribución de ambas especies durante el Pleistoceno. Finalmente, se utilizaron métodos de inferencia Bayesiana (DIYABC) para poner a prueba distintas hipótesis referentes a la divergencia y la historia demográfica de estas especies. Los datos apoyan la hipótesis del origen de *C. mexicanus* a partir de una población periférica aislada durante el Pleistoceno (hace ~230,000 años), y expansión poblacional (incremento 10 veces el tamaño efectivo poblacional) en el Pleistoceno-Holoceno (hace ~9,000 – 11,000 años). Se identificó la presencia de dos posibles refugios, uno en el área sur del rango de distribución de *C. ludovicianus* y otro consistente con el área de distribución de *C. mexicanus*. Los análisis sugieren que los cambios climáticos del Pleistoceno tuvieron un fuerte impacto en la distribución de estas especies, promoviendo el origen de *C. mexicanus* mediante un proceso de especiación peripátrica y la divergencia de linajes dentro de *C. ludovicianus*.

Research Paper

Peripatric speciation of an endemic species driven by Pleistocene climate change: the case of the Mexican prairie dog (*Cynomys mexicanus*).

Gabriela Castellanos-Morales^a, Niza Gámez^a, Reyna A. Castillo-Gómez^b and Luis E. Eguiarte^{a*}.

^aLaboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior s/n Anexo al Jardín Botánico. Ciudad Universitaria, México Distrito Federal, 04510, México.

^bDICTUS, Universidad de Sonora, Luis Donaldo Colosio s/n, Hermosillo, Sonora, 83100, México.

*Correspondence: Luis E. Eguiarte, Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior s/n Anexo al Jardín Botánico. Ciudad Universitaria, México Distrito Federal, 04510, México.

E-mail: fruns@unam.mx

ABSTRACT

The hypothesis that endemic species could have originated by the isolation and divergence of peripheral populations of widespread species can be tested through the use of ecological niche models (ENMs) and statistical phylogeography. The joint use of these tools provides complementary perspectives on historical dynamics and allows testing hypotheses regarding the origin of endemic taxa. We used this approach to infer the historical processes that have influenced the origin of a species endemic to the Mexican Plateau (*Cynomys mexicanus*) and

its divergence from a widespread ancestor (*Cynomys ludovicianus*), and to test whether this endemic species originated through peripatric speciation. We obtained genetic data for 295 individuals for two species of black-tailed prairie dogs (*C. ludovicianus* and *C. mexicanus*). Genetic data consisted of mitochondrial DNA sequences (cytochrome *b* and control region), and 10 nuclear microsatellite loci. We estimated dates of divergence between species and between lineages within each species and performed ecological niche modelling (Present, Last Glacial Maximum and Last Interglacial) to determine changes in the distribution range of both species during the Pleistocene. Finally, we used Bayesian inference methods (DIYABC) to test different hypotheses regarding the divergence and demographic history of these species. Data supported the hypothesis of the origin of *C. mexicanus* from a peripheral population isolated during the Pleistocene [$\sim 230,000$ years ago (0.1 – 0.43 Ma 95% HPD)], with a Pleistocene-Holocene ($\sim 9,000$ – 11,000 years ago) population expansion (~ 10 -fold increase in population size). We identified the presence of two possible refugia in the southern area of the distribution range of *C. ludovicianus* and another, consistent with the distribution range of *C. mexicanus*. Our analyses suggest that Pleistocene climate change had a strong impact in the distribution of these species, promoting peripatric speciation for the origin of *C. mexicanus* and lineage divergence within *C. ludovicianus*.

Keywords

Bayesian inference; *Cynomys*; ecological niche modelling; Chihuahuan Desert; speciation.

1. INTRODUCTION

A complex set of geologic, climatic, genetic and stochastic events may act alone or in combination to promote divergence among populations and species (Ayoub and Riechert, 2004; Hope et al., 2012; Loera et al., 2012; Blair et al., 2014). Barriers to gene flow and

reproductive isolation may develop in allopatry, parapatry or sympatry (Schluter, 2001; Losos and Glor, 2003). In addition, species ranges can move over short timescales and current distributions may not preserve a record on the mode of speciation. Therefore, when studying speciation we should consider that the distribution of species might be very dynamic, and we should not assume that allopatric species were allopatric in the past (Barraclough and Nee, 2001; Losos and Glor, 2003).

It is important to discriminate among sympatric, parapatric, and allopatric speciation (Mayr, 1963), and within allopatric speciation, we may discriminate between peripatric and vicariant speciation (Losos and Glor, 2003). When considering peripatric speciation we should expect to find smaller effective population sizes of endemics than those of their sister species, a lack of migration after speciation, and significant asymmetry in range size between sister species (Barraclough and Vogler, 2000; Ikeda et al., 2012; Blair et al., 2014). In contrast, in a scenario of vicariant speciation, we should expect to find similar effective population sizes of endemics and their sister species, and similar range sizes (Losos and Glor, 2003).

Endemic species could have originated through peripatric speciation by the isolation and divergence of peripheral populations originating from range contraction of widespread species (Barraclough and Vogler, 2000; Ikeda et al., 2012). Therefore, endemic species are an interesting system to test hypotheses regarding peripatric and vicariant speciation. In this sense, speciation may have a strong ecological component, and identifying how demographic events coincide with changes in environmental histories can reveal the geographical, ecological and evolutionary mechanisms that may underlie population differentiation and speciation (Knowles et al., 2007; Richards et al., 2007; Knowles and Alvarado-Serrano, 2010; Chan et al., 2011; Loera et al., 2012).

Ecological niche models (ENM) allow the assessment of past changes in the distribution of species and demographic dynamics, understanding their relationship with environmental

changes, and deriving alternative hypotheses testable with statistical phylogeography (Knowles et al., 2007; Richards et al., 2007; Knowles and Alvarado-Serrano, 2010; Chan et al., 2011; Blair et al., 2014). Statistical phylogeography, through coalescence, allows dating divergence between species, and testing the probability of different scenarios by using descriptive data obtained through genetic studies. This approach provides complementary perspectives on historical dynamics (Knowles et al., 2007; Richards et al., 2007; Riddle et al., 2008; Knowles and Alvarado-Serrano, 2010; Chan et al., 2011; Eckert, 2011; Loera et al., 2012; Wilson and Pitts, 2012; Blair et al., 2014; Ramírez-Barahona and Eguiarte, 2014). Endemic species restricted to the Mexican Plateau and the Oriental Basin, within the Chihuahuan Desert, are relatively common (McCullough and Chesser, 1987; Fernández, 2011, 2012a, 2012b; Andersen and Light, 2012; Wilson and Pitts, 2012; Aguirre-Liguori et al., 2014; Gándara and Sosa, 2014; Williford et al., 2014), and it has been suggested that many of the lineages that occur in the Mexican Plateau, such as the Mexican prairie dog (*Cynomys mexicanus*), may represent palaeoendemics (Hoffman and Jones, 1970; Neiswenter and Riddle, 2010).

Two of the five prairie dog species that comprise the genus *Cynomys* (*C. mexicanus* and *C. ludovicianus*) occur in Mexico. These sister species constitute the subgenus *Cynomys* (black-tailed prairie dogs) (McCullough and Chesser, 1987; McCullough, 1991; Harrison et al., 2003). Their morphology is very similar, with *C. mexicanus* being slightly smaller than *C. ludovicianus*. The tail is longer and the black colour from the tip of the tail covers most of the distal half in *C. mexicanus*; in *C. ludovicianus* the distal third of the tail is black (Ceballos and Wilson, 1985; Hoogland, 1996). In addition, the auditory bullae in *C. mexicanus* is more inflated, its cheek-teeth triangular and the nasal bones are broad and posteriorly truncate (Ceballos and Wilson, 1985).

Black-tailed prairie dogs (subgenus *Cynomys*) depend on grassland ecosystems for their survival, and are restricted to the grasslands located in the Great Plains and intermountain regions of Western North America (Harrison et al., 2003; Slobodchikoff et al., 2009). In the current distribution these species are allopatric. *C. ludovicianus* is the species with the widest distribution, and can be found in grasslands throughout the Great Plains of North America, from southern Canada to northern Mexico, including the northern area of the Chihuahuan Desert. *C. mexicanus* is endemic to Mexico and inhabits the gypsum grasslands located in the valleys of a 497 km² region in the states of Coahuila, Nuevo Leon and San Luis Potosi, Mexico (Slobodchikoff et al., 2009) (Fig. 1).

The species of the genus *Cynomys* are of recent origin. Based on the fossil record, Goodwin (1995) suggested an early Pleistocene origin of the genus *Cynomys* (2.5 to 1.8 Ma), with divergence of the two subgenera [black-tailed (*Cynomys*) and white-tailed (*Leucocrossuromys*) prairie dogs] between 1.8 and 0.75 Ma, and a very recent (40,000 to 22,000 years ago) divergence of sister species within the subgenus *Cynomys* (*C. ludovicianus* and *C. mexicanus*). The geographical range of prairie dogs has been very dynamic, undergoing several contraction and expansion events, but with constant presence in the central area of the Great Plains (Goodwin, 1995; Truett et al., 2006).

Genetic analyses of *C. ludovicianus* have found two distinct mtDNA lineages that suggest the presence of two refugia for this species, followed by population expansion that led to secondary contact between lineages (Castellanos-Morales et al., 2014, 2015). Current evidence from the fossil record and molecular analyses is consistent with the hypothesis of the origin of *C. mexicanus* from a relict population of *C. ludovicianus* (McCullough and Chesser, 1987; Goodwin, 1995; Harrison et al., 2003), but a formal analysis testing this hypothesis is still missing. Furthermore, Goodwin (1995) mentioned that the presence of a possible *C.*

mexicanus fossil in South-eastern New Mexico suggests that this species has a more ancient origin and had a wider distribution 40,000 to 22,000 years ago (Goodwin, 1995).

In this study we used ENM and statistical phylogeography to infer the historical processes that have influenced the divergence from a widespread ancestor of a species that is endemic to the Mexican Plateau (*C. mexicanus*), and to test whether this species originated through peripatric speciation. This was achieved by the use of sequences of the Control Region (*CR*) and Cytochrome *b* (*cyt-b*) regions of the mitochondrial DNA to date diversification events between sister species (*C. ludovicianus* and *C. mexicanus*), and between maternal lineages within them. In addition, changes in species distribution were modelled through ENM and then projected to the Last Glacial Maximum (LGM; ~21,000 years ago) and the Interglacial periods (LIG; ~120,000 – 140,000 years ago) of the Pleistocene. Finally, we performed Bayesian analyses (ABC), with mitochondrial sequences and nuclear microsatellite loci, to test different hypotheses regarding diversification dates and demographic models for the divergence of these sister species.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Data collection

We obtained data from the control region (854 bp) and cytochrome *b* (1140 bp) (GenBank: Bankit 1779750), from 295 individuals that belong to several populations of black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) and Mexican prairie dogs (*C. mexicanus*), and from 10 nuclear microsatellite loci (Dryad: doi:10.5061/dryad.pk944), reported in Castellanos-Morales et al. (2014, 2015) (Fig. 1). These sequences comprise 19 haplotypes for *C. ludovicianus* (KP217107 – KP217125) and 16 haplotypes for *C. mexicanus* (KP217126 – KP217141) (Supporting Information, Table S1 and Fig. S1). In addition, we downloaded from GenBank sequences for *C. gunnisoni*, a species of white-tailed prairie dog [(*CR*: GU453240,

GU453337; *cyt-b*: AF157923, AF157930) (Harrison et al., 2003; Jezkova et al., unpublished)], and for two species of *Xerospermophilus*, the sister genus of *Cynomys* [*X. pilosoma* (CR: DQ106857, DQ106858; *cyt-b*: AF157885, AF157911) (Harrison et al., 2003; Guevara-Chumacero et al., 2006), and *X. perotensis* (CR: JQ326958, JQ326959; *cyt-b*: AF157840, AF157948) (Harrison et al., 2003; Ochoa et al., 2012)] to be used as outgroups. All sequences were aligned manually using BioEdit v. 7.1.3 (Hall, 1999).

2.2 Gene genealogy and divergence time

Haplotypes (KP217107 – KP217141) were used to obtain a gene genealogy and to estimate times of divergence. First, we used jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008) to estimate the substitution model for each region of the mitochondrial DNA, using the Akaike Information Criterion (AIC) and default search values for every region. The best-fit models obtained were: GTR+I+ Γ for the cytochrome *b* and TM3+I+ Γ for the control region. We used the partitioned by gene mtDNA dataset to obtain a gene genealogy using MrBayes v 3.2.4 (Ronquist et al., 2012) considering random starting trees, unlinked parameters and allowing rate variation. Analyses consisted of two independent runs, conducted each with three heated and one cold Markov chain sampling every 2,000 generations for 20,000,000 generations. The analyses were run until the average standard deviation of split frequencies approached zero. Trees sampled before achieving stability were discarded. Therefore, samples obtained during the first 5,000,000 generations (25 %; Ronquist et al. 2012) were discarded as burn-in. We included the sequences from *C. gunnisoni*, *X. pilosoma* and *X. perotensis* as outgroups. To obtain divergence dates between species and between lineages within species, we performed two independent runs in BEAST v1.7.5 (Drummond and Rambaut, 2007; Drummond et al., 2012). For this analysis, we also partitioned the control region and cytochrome *b*, and included the outgroup sequences. Each run consisted of 20,000,000

generations implementing the uncorrelated relaxed clock model with a LogNormal distribution, and allowing rate variation among sites. Initial runs were conducted to ensure that the parameters of the analysis converged, and that the priors established were adequate for our dataset. The Bayes factor analysis (Suchard et al., 2001) was run in Tracer v1.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>) to determine which run showed the best likelihood. Accordingly, the tree priors that we selected were coalescent with constant population size and a random starting tree. Convergence statistics were checked with Tracer v1.4, and the consensus tree was obtained using the combined data from both independent runs using TreeAnnotator v1.7.5 (Drummond and Rambaut, 2007) with a 25 % burn-in.

To calibrate the BEAST analysis, we used two dates based on the fossil record (Goodwin, 1995). The first calibration point documents the origin of the genus *Cynomys* (1.8 – 2.5 Ma). The second calibration point documents the divergence between subgenera within *Cynomys*: white-tailed prairie dogs (*Leucocrossuromys*) and black-tailed prairie dogs (*Cynomys*) (0.75 – 1.8 Ma). Dates were modelled as lognormal distributions to account for uncertainty in the fossil-based calibration (Ho and Phillips, 2009). We used the divergence interval reported by Goodwin (1995) to establish the mean and the upper quantiles of the analysis: 2.3 ± 0.1 SD Ma [1.8 – 2.7 Ma] for the first calibration point, and 0.7 ± 0.1 SD Ma [0.57 – 0.84 Ma] for the second calibration point. We used Figtree v 1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) to visualize the gene genealogy from MrBayes and the ultrametric tree from BEAST.

2.3 Ecological niche modelling

We obtained coordinates for the presence of each species from ManIS (manisnet.org; accessed January 2014) and GBIF (www.gbif.org; accessed January 2014) databases. We also included coordinates from capture sites obtained from the literature (Roach et al., 2001; Jones et al., 2012; Sackett et al., 2012; Castellanos-Morales et al., 2014; 2015). Duplicated

points were eliminated from the database, and Mahalanobis distances were estimated to corroborate data. This distance describes the multi-dimensional space that takes into account the variability of the reference class and also accounts for shared information in correlated variables. It also measures the distances in space between mapped environmental variables and the mean ecological niche (Calenge et al., 2008; Krishnaswamy et al., 2009). Therefore, the Mahalanobis distance is very useful to detect occurrence points that deviate from the mean ecological niche and to corroborate occurrence data. Points that presented a deviation of two variances were corroborated and removed from the database when outside of the species distribution. The occurrence points used to build the ENM for each species are shown in supporting information (Supporting Information, Fig. S2).

An ecological niche model (ENM) for each species was obtained with MaxEnt (Phillips et al., 2004, 2006; Phillips and Dudík, 2008) for the Present, Last Glacial Maximum (LGM: ~ 21,000 years ago) and Last Interglacial (LIG: ~ 120,000 – 140,000 years ago) periods. For present ENMs, we first selected variables from a set of 19 bioclimatic variables. Bioclimatic layers were developed from the worldwide temperature and rainfall data within the WorldClim 1.4 dataset (Hijmans et al., 2005). These variables represent climatic trends, extremes and seasonality; and on a regional scale, they are considered limiting factors for the distribution of organisms (e.g. Waltari et al., 2007; Carnaval and Moritz, 2008; Waltari and Guralnick, 2009).

To avoid model over-fitting, we selected a subset of these layers to develop the model (Elith et al., 2011). For each species, we calculated a Spearman correlation between the values of each environmental variable from the presence records. We performed a complementarity principal component analysis (PCA), wherein the number of components that represented > 90 % of the variance associated with the data were included in the analysis. Then, the variables with high contribution to the component and non-correlated variables ($r < 0.85$)

were selected (Elith et al., 2006, 2011; Walker et al., 2009). The final models were created using different bioclimatic layers for each species, with a resolution of 30 arc-seconds: 10 bioclimatic layers for *C. ludovicianus* (Annual Mean Temperature, Isothermality, Max Temperature of Warmest Month, Temperature Annual Range, Mean Temperature of Wettest Quarter, Mean Temperature of Coldest Quarter, Annual Precipitation, Precipitation of Driest Quarter, Precipitation of Warmest Quarter and Precipitation of Coldest Quarter), and 11 bioclimatic layers for *C. mexicanus* (Annual Mean Temperature, Mean Diurnal Range, Temperature Seasonality, Max Temperature of Warmest Month, Min Temperature of Coldest Month, Mean Temperature of Warmest Quarter, Precipitation of Wettest Month, Precipitation of Driest Month, Precipitation Seasonality, Precipitation of Wettest Quarter and Precipitation of Driest Quarter).

We downloaded the corresponding past layers from general climate model (GCM) from WorldClim 1.4 dataset (Hijmans et al., 2005). The data of these layers were based on the GSM of the *Community Climate System Model (CCSM)* (Collins et al., 2006), which incorporates dynamics of atmospheric processes, including radiation, convection, condensation and evaporation. This GSM has already been used in the reconstruction of past distributional models in the region (Peterson and Nyári, 2007; Waltari et al., 2007; Waltari and Guralnick, 2009; Martínez-Meyer and Peterson, 2006; Holmgren et al., 2010; Gámez et al., 2014; Ramírez-Barahona and Eguiarte, 2014), and for species occurring in the cold deserts of North America models obtained with MIROC and CCSM have resulted qualitatively identical (Wilson and Pitts, 2012).

Prairie dogs are species endemic to North America, and according to the fossil record (Goodwin, 1995), throughout their evolutionary history their distribution has been limited to this area. Therefore, we limited our analysis to this region by cropping all bioclimatic layers

to span areas from 15° N to 61° N and -128° W to -85 ° W using the software R (R Development Core Team, 2008).

All the ENMs were generated with MaxEnt 3.3.3k (Phillips et al., 2006). We executed MaxEnt using the following settings: 20% random test, 30 replicates, replicate bootstrap type, 1,000 maximum iterations, convergence threshold of 0.00001, with extrapolation and clamping turned off, and Jack-knife analysis turned on (Supporting Information, Fig. S3 and Fig. S4). For the purposes of this study, we derived the distributional model of each species from the average model (Supporting Information, Fig. S5). We evaluated all the distributional models using the area under the receiver operating characteristic curve (AUC) scores, where values above 0.5 are better than random predictions and those above 0.85 are considered useful (Elith et al., 2006)(Supporting information, Fig. S3).

In order to create a binary map per species, predicting either potential presence of absence across North America (Waltari et al., 2007), we employed the 95 percentile value of training sample points as a threshold. This value assumes that 5 % of records used for model generation are susceptible to error.

2.4 Coalescent simulations for hypothesis testing

An approximate Bayesian computation (ABC) approach is capable of simultaneously estimating model parameters and model support. It allows estimating the relative support for different population divergence models (Chan et al., 2011). These analyses rely on summary statistics to estimate the posterior probabilities of parameters and provide a powerful approach for model selection (Beaumont et al., 2002; Richards et al., 2007; Knowles and Alvarado-Serrano, 2010). In addition to parameter estimation, the uncertainty of the parameters is modelled, thus avoiding the problems associated with uncertainty (Knowles and Alvarado-Serrano, 2010).

We used the approximate Bayesian computation (ABC) framework (Beaumont et al., 2002; Beaumont, 2010) implemented in DIYABC 2.0 (Cornuet et al., 2008, 2014) to test eight plausible scenarios regarding four possible dates of divergence for *C. mexicanus*: 1) divergence occurring 20 to 40 ka [according to divergence times proposed by Goodwin (1995) and McCullough and Chesser (1987)]; 2) divergence occurring 120 to 140 ka [according to the lower 95 % confidence interval for the dates of divergence estimated with BEAST]; 3) divergence occurring 220 – 240 ka [according to mean dates estimated with BEAST: 230 ka]; 4) divergence occurring 420 – 440 ka [according to the upper 95 % confidence interval for the dates of divergence estimated with BEAST (430 ka) and closer to the date of ~ 500 ka estimated by Harrison et al. (2003) based on cytochrome *b*]; and two demographic models for each date of divergence: a) constant population size and b) recent population expansion (Supporting Information, Table S2 and Fig. S6). We considered a generation time of 2 years for these species (Hoogland, 1996).

Cornuet et al. (2010) reported that using different types of molecular data resulted in an improvement in the quality of the estimations when using combined sets of data (i.e. microsatellite and mtDNA sequence data) in DIYABC. This was particularly true for the estimation of ancient historical events (50,000 – 500,000 generations), where microsatellite data showed higher rates of mean relative error. Higher rates of mean relative error are due to high mutation rates with allele size homoplasy. Microsatellite data, on the other side, produced better estimates of effective population sizes (Cornuet et al., 2010). Therefore, we used a partitioned data set including 10 microsatellite loci, the control region of the mtDNA, and the cytochrome *b* of the mtDNA to perform the analysis with DIYABC 2.0 (Cornuet et al., 2008, 2010, 2014). This software generates datasets with the same number of gene copies and loci as the observed data based on coalescent simulations of model parameters drawn from prior distributions. Then, it compares summary statistics estimated for each simulated

data set with those estimated from the observed data (Cornuet et al., 2008, 2014; see also Ramírez-Barahona and Eguiarte, 2014).

For this analysis, samples from Colorado and New Mexico were excluded (lacking microsatellite data), and only samples from Chihuahua, Sonora and 6 populations of *C. mexicanus* were included (N = 301). According to results reported in Castellanos-Morales et al. (2015), within *C. ludovicianus*, Sonora and Chihuahua are well differentiated for both molecular markers, while the colonies that constitute *C. mexicanus* are closely related. Individuals were grouped accordingly: Chihuahua, Sonora and *C. mexicanus*. In addition, to increase the performance of the software, we excluded sites with missing data and alignment gaps from the sequence alignment, considering 1,740 bp of the 1,997 bp previously reported (Castellanos-Morales et al., 2015).

Single summary statistic may not provide sufficient power to distinguish among the scenarios. Therefore, it is necessary to consider a combination of summary statistics to provide power for joint parameter estimation and model selection for any specific set of empirical data (Beaumont et al., 2002; Knowles and Alvarado-Serrano, 2010). Initial simulations were conducted to select the summary statistics that were more informative for each molecular marker, and to ensure that the parameters of the simulation yielded datasets similar to the empirical dataset (Bertorelle et al., 2010; Chan et al., 2011). We selected 54 summary statistics to perform the analysis (Supporting Information, Appendix S1). We generated 8 million simulated datasets for the partitioned dataset. The parameters used in each scenario are given in supplementary materials (Supporting Information, Table S2). We simulated 500 pseudo-observed datasets (PODs) under each scenario to estimate type I and type II error rates, and to assess confidence in scenario choice (Robert et al., 2011) (Supporting Information, Appendix S1). We also performed model checking, considering the summary

statistics not used during the inference steps (Cornuet et al., 2010) (Supporting Information, Appendix S1).

3. RESULTS

3.1 Gene genealogy and divergence time

The gene genealogy obtained with the partitioned dataset resolved the relationship between *C. ludovicianus* and *C. mexicanus* as monophyletic sister species (posterior probability = 0.999, $\ln(P) = -4962.21$, and a C. I. = 0.8095) (Fig. 2). The ultrametric genealogy obtained with BEAST ($\ln(P) = -4882.39 \pm 0.2$) depicts the divergence between two lineages within *C. ludovicianus* (Fig. 3): 1) the south-central clade, encompassed haplotypes from Chihuahua, New Mexico and Colorado, and 2) the southern clade, encompassed haplotypes from Chihuahua, Sonora and New Mexico. According to coalescence times, the most recent ancestor of *C. ludovicianus* and *C. mexicanus* is dated ~ 0.23 Ma (0.1 - 0.43 Ma 95 % HPD). The southern and south-central clades from *C. ludovicianus* coalesce at ~ 0.16 Ma (0.07 - 0.29 Ma 95 % HPD). The south-central clade is dated ~ 0.09 Ma (0.03 - 0.19 Ma 95 % HPD) and the southern clade of *C. ludovicianus* is dated ~ 0.07 Ma (0.03 - 0.15 Ma 95 % HPD). Finally, the haplotypes that compose *C. mexicanus* coalesce at ~ 0.07 Ma (0.03 - 0.14 Ma 95 % HPD) (Fig. 3).

3.2 Ecological niche modelling

For the ecological niche modelling (ENM) we considered 73 occurrence points for *C. ludovicianus* and 50 occurrence points for *C. mexicanus* (Supporting Information, Fig. S2). The distributional models for each species showed stability and good support (AUC: 0.959 for *C. ludovicianus* and 0.998 for *C. mexicanus*; Supporting Information, Fig. S3). The

results from ENM projections to the LGM and LIG showed distinct patterns for both species (Fig. 4; Supporting Information, Fig. S5):

3.2.1 *Cynomys ludovicianus*

The ENM projection for *C. ludovicianus* to the LGM and LIG showed a range contraction and displacement to central Mexico, overlapping the area where *C. mexicanus* currently occurs (Fig. 4; Supporting Information Fig. S5). *C. ludovicianus*' ENM projection to the LGM depicted two disjunct areas with high probability of presence (Supporting Information Fig. S5). These may represent Pleistocene refugia for this species. One area located to the southwest, in the area today occupied by the states of Chihuahua, Sonora, New Mexico and Arizona, and the other area located southeast towards the state of Texas. Contrasting with the LGM, the ENM projection for the LIG depicted a more restricted displacement of the distribution of *C. ludovicianus* to central Mexico (Fig. 4; Supporting Information Fig. S5). For *C. ludovicianus*, only 8.39 % of the ENM cells remained stable during the three periods, 12.76 % from the LIG to the LGM, and 3.34 % from the LGM to the present (Fig. 4).

3.2.2 *Cynomys mexicanus*

The ENM for *C. mexicanus* showed a spatial expansion in the distribution area from the LGM to the present (Fig. 4; Supporting Information Fig. S5). The ENM projection to the LIG failed to find suitable climatic conditions for the presence of this species in North America. Nevertheless, the ENM for *C. ludovicianus* predicts a stable area within the distribution range of *C. mexicanus* (Fig. 4). For *C. mexicanus* 48.07 % of the cells remained stable from the LGM to the Present.

3.3 Coalescent simulations for hypothesis testing

The Bayesian analysis scenario that presented the highest posterior probability [0.4475 (0.4110, 0.4840)] was scenario 7 (species divergence 220 – 240 ka followed by a recent population expansion for the two lineages that compose *C. ludovicianus* and for *C. mexicanus*), followed by scenario 6 [0.2803 (0.2427, 0.3179); divergence 120 – 140 ka followed by recent population expansion], and scenario 8 [0.1802 (0.1246, 0.2357); divergence 420 – 440 ka followed by recent population expansion; see Table 1].

Scenario 7 was correctly identified in 32.2 % of the 500 simulated pseudo-observed datasets (PODs) for the logistic approach when compared to the rest of the scenarios (Table 1). Type I error was high when evaluating the performance of scenario 7 when compared with scenarios 6 and 8 (24 % and 42.2 % of times that scenario 7 did not get the highest posterior probability, being the real scenario). Type II error was also high when comparing scenario 7 with scenarios 6 and 8 (20.8 % and 21.8 % of times that scenario 7 did get the highest posterior probability when it was not the real scenario) (Table 1).

Parameters estimated for scenarios 6, 7 and 8 showed a 100-fold difference among ancestral effective population sizes, and a 10-fold difference among current effective population sizes for *C. ludovicianus* and *C. mexicanus*. Time since population expansion was estimated ~9,000 – 11,000 years ago for these scenarios (Table 2).

4. DISCUSSION

4.1 Gene genealogy and divergence time

According to our expectations and previous reports (Harrison et al., 2003; Castellanos-Morales et al., 2015), each species is monophyletic. The same monophyletic pattern has been reported repeatedly for the species of this genus (McCullough, 1991; Harrison et al., 2003; Castellanos-Morales et al. 2014), using samples from different locations (Nebraska, Colorado, Texas and Chihuahua). A broader sample scheme for *C. ludovicianus* will be important to

attain higher resolution regarding the patterns of genetic variation and genetic structure within this species and its demographic history.

Contrary to expected, species divergence dates [\sim 230,000 years ago (0.1 – 0.43 Ma 95 % HPD)] were older than previously suggested (20,000 – 40,000 years ago) by McCullough and Chesser (1987) and Goodwin (1995), and younger than the date estimated by Harrison et al. (2003) (\sim 500,000 years ago). The date of divergence reported by Goodwin (1985) was based on the fossil record. In many cases, genetic divergence may predate the morphological change registered in the fossil record (Smith and Peterson, 2002; Ho et al., 2005). This is also observed in the discovery of many cryptic species of mammals where two or more species that were classified as a single species (similar morphologies) are genetically well differentiated (Baker and Bradley, 2006; Pfenninger and Schwenk, 2007). McCullough and Chesser (1987) estimated the date of divergence from the genetic distance between species calculated from allozyme variation. Allozymes underestimate the genetic variation that is present in populations and, therefore, may lack resolution for the estimation of dates of divergence (Hedrick, 2011).

The older date of divergence (\sim 500 ka) estimated by Harrison et al. (2003), coincide with the upper limit retrieved from our analysis. The dates estimated by Harrison et al. (2003) were based on Bayesian probability using cytochrome *b* sequences (1,140 bp) from individuals from Nebraska (*C. ludovicianus*) and Nuevo León (*C. mexicanus*), while our analysis was based on two regions of the mtDNA (1,994 bp) and included individuals from the central (Colorado) and southern range (Chihuahua, Sonora and New Mexico) of *C. ludovicianus* (Castellanos-Morales et al., 2015). Using two different regions (increasing the number of informative sites and considering different substitution models and mutation rates) will yield higher resolution in the analysis and better estimates for divergence dates (Ho et al., 2005; Rokas and Carroll, 2005; McCormack et al., 2011; Morin et al., 2015). Nevertheless,

mitochondrial DNA has the limitation of being maternally inherited, and in some instances the control region and cytochrome *b* sequences have been unable to resolve phylogenetic relationships (Awise et al., 1987; Morin et al., 2015). Therefore, increasing the amount of sequence data, that encompassed both nuclear and mitochondrial DNA, will yield better resolution in future analyses (Rokas and Carroll, 2005; Sánchez-García and Castresana, 2012; Morin et al., 2015).

Estimated dates of divergence for species and lineages of other arid-adapted taxa in North America are varied and range from the Miocene and Pliocene to the Pleistocene (Ayoub and Riechert, 2004; Jaeger et al., 2005; Riddle et al., 2008; Pyron and Burbrink, 2010; Bryson et al., 2010, 2011, 2012; Hafner and Riddle, 2011; Fernández, 2011, 2012a, 2012b; Andersen and Light, 2012; Hope et al., 2012; Streicher et al., 2012; Wilson and Pitts, 2012; Gándara and Sosa, 2014; Williford et al., 2014). For example, Hope et al. (2012) estimated dates for the most recent ancestor for the *Sorex cinereus* complex of shrews (~ 60 ka), and the southwest clade that distributes in the Great Plains (~ 48 ka) coincident with events of climatic change during the Pleistocene. Fernández (2011) estimated divergence for two lineages (Mexican Plateau and Trans Mexican Volcanic Belt) within the southern rock deer mouse (*Peromyscus difficilis*) also during the Pleistocene (~700 ka). In contrast, the estimated dates of divergence between other species endemic to the Oriental Basin and the Mexican Plateau (such as *Xerospermophilus perotensis*, *Dipodomys ornatus* and the *Perognathus flavus* species complex) are older, corresponding to the Miocene or the Pliocene, and have been linked to orogenic events such as the uplift of the Transmexican Volcanic Belt (Neiswenter and Riddle, 2010, 2011; Fernández, 2011, 2012a, 2012b).

We recovered two clades within *C. ludovicianus*. These lineages might coincide with the two previously recognized subspecies: *C. l. ludovicianus* distributed in a large part of the Great Plains region from Montana to Texas, and *C. l. arizonensis* from New Mexico, Arizona,

Mexico, and south-western Texas (Hollister, 1916). Analyses on *C. gunnisoni* have reported consistency between mtDNA clades and morphological data for subspecies *C. g. gunnisoni* and *C. g. zuniensis* (Sackett et al., 2014). Therefore, further *C. ludovicianus* analyses should consider revising the morphological and genetic concordance of the subspecies and the presence of a contact zone in the southern area of the distribution of *C. ludovicianus*.

4.2 Ecological niche modelling

ENM methods have shown certain bias for the past prediction of species distribution (Davis et al., 2014). Nevertheless, they are crucial for the identification of possible events of expansion and contraction of species ranges, and for the location of putative refugia. Therefore, data obtained from these analyses should be interpreted carefully and should be corroborated with independent data (i.e. fossil record and molecular data) (Knowles et al., 2007; Richards et al., 2007; Knowles and Alvarado-Serrano, 2010; Davis et al., 2014).

The impact of Pleistocene glacial cycles on species genetic diversity and their distribution ranges throughout western North America are varied (Jaeger et al., 2005; Douglas et al., 2006; Castoe et al., 2007; Waltari et al., 2007; Bryson et al., 2010; Neiswenter and Riddle, 2010). Occurrence of at least 11 glacial-interglacial events during the Pleistocene are associated to diversification of different taxa from the arid lands of North America (N. Gámez et al., in prep.), and signals of post-Pleistocene population expansion have been reported for many arid adapted species (Ayoub and Riechert, 2004; Duran et al., 2005; Jaeger et al., 2005; Waltari et al., 2007; Johnson, 2008; Neiswenter and Riddle, 2010; Rebernig et al., 2010; Andersen and Light, 2012; Streicher et al., 2012).

The ENM suggests shifts in the geographical range of *C. ludovicianus* as a response to climate change during the Pleistocene. During the LGM and LIG the geographical range of this species was displaced farther west into the Sonoran Desert, and farther south in Mexico

(Goodwin, 1995; Truett et al., 2006; Mead et al., 2010). According to vegetation records, oak and fir forests occupied the central and northern area of the Great Plains of North America, while pinyon-juniper-oak forests distributed in the region of the Chihuahuan Desert (Van Devender and Spaulding, 1983; Van Devender, 1990; Rebernick et al., 2010). Expansion of grassland distribution in North America started ~8,000 – 10,000 years ago (Axelrod, 1985), and it has been considered that the complete range and conditions of modern Chihuahuan Desert were reached recently. The aridification of this area has been dated to the mid Holocene (~ 4000 years ago) (Jaeger et al., 2005; Rebernick et al., 2010). Goodwin (1995) suggested that *C. ludovicianus* occupied the central and southern area of the Great Plains throughout the Pleistocene and expanded recently towards the northern area of the Great Plains. Moreover, Truett et al. (2006) suggested that black-tailed prairie dogs (*C. ludovicianus*) were less common in the Chihuahuan Desert during prehistoric times and their current widespread distribution is linked to the introduction of cattle in the late 1600's. Our data also suggests that during the Pleistocene, prairie dogs presented a distribution that could have promoted isolation and divergence in distinct refugia located in the southern portion of the current species range (Fig. 4), followed by a post-Pleistocene spatial expansion that encouraged secondary contact between the southern and south-central clades of *C. ludovicianus*. Displacement of distribution ranges during the Pleistocene into one or multiple refugia has been reported for co-distributed taxa, in some cases followed by south – north colonization patterns (Rebernick et al., 2010; Neiswenter and Riddle, 2011; Wilson and Pitts, 2012; Williford et al., 2014). During pluvial periods, the closed basin located in southern New Mexico, northern Chihuahua and Trans-Pecos Texas was filled with lakes, and deserts were displaced by mesic and riparian vegetation (Hafner and Riddle, 2011). This could have promoted a disjunct distribution of *C. ludovicianus* in two areas (east and west of Trans-Pecos Texas). The location of one refugium in northern Chihuahua, Sonora, Arizona and southern

New Mexico is also suggested by the presence of a fossil from the Wisconsin-Holocene in Chihuahua (Goodwin, 1995) and another from the Late Pleistocene in Sonora (Mead et al., 2010), as well as several fossils from New Mexico from the Late Pleistocene (Goodwin, 1995). In addition, the location of this refugium is further corroborated by the presence of high mtDNA genetic variation in the area of Chihuahua and New Mexico reported by Castellanos-Morales et al. (2014, 2015). A second refugium (retrieved by the ENM analyses) that could be located in southern Texas is corroborated by the presence of several fossils from the Late Pleistocene in this area (Goodwin, 1995). Nevertheless, analyses of genetic variation from this area are lacking, and extensive sampling will be needed to corroborate this refugium and a secondary contact between lineages of *C. ludovicianus*.

The predicted niche for both species during the LGM supports the hypothesis of the origin of *C. mexicanus* from a relict population of *C. ludovicianus*, followed by population expansion. Furthermore, the absence of sites with suitable conditions for the establishment of *C. mexicanus* in the LIG contrasts with the date of divergence between species ~ 230,000 years ago (0.1 – 0.43 Ma 95 % HPD). The ENM projection provides evidence that a similar shift at an earlier time could have led to the divergence between species. In addition, the lower confidence interval for the estimated date of divergence (100 ka) falls within the LIG and the divergence between species could have happened during this time. For mitochondrial genes, the estimated time of divergence can show an important bias towards older dates, and this bias is more important for recent splits (Sánchez-García and Castresana, 2012). Therefore, including sequences from nuclear DNA would yield more precise estimates for the date of divergence (Sánchez-García and Castresana, 2012).

The ENM of *C. ludovicianus* encompassed that of *C. mexicanus* from the LIG to the present. Our results suggest a process of allopatric speciation for the origin of *C. mexicanus* that started during the Mid to Late Pleistocene. This is in agreement with the mechanism of

allopatric speciation described by Loera et al. (2012) where a geographic barrier may cause habitat fragmentation, and the inability of species to adapt to the new conditions divides the ancestral populations, promoting isolation and further divergence (Loera et al., 2012). In this sense, our results suggest the isolation of a population in a refugium located south of the Southern Coahuila filter-barrier (Baker, 1956; Hafner et al., 2008; Andersen and Light, 2012). After the initial isolation, the distribution of this lineage remained almost constant since the LGM, reinforcing isolation and divergence, and driving the speciation process for *C. mexicanus*. Accordingly, it has been suggested that the interglacial phases of the Pleistocene promoted speciation among certain ecological groups (Hope et al., 2012), and that during the pluvial periods of the Pleistocene the area of the Southern Coahuila filter-barrier was flooded, and acted as a barrier isolating populations for many mammals (Neiswenter and Riddle, 2010; Hafner and Riddle, 2011; Andersen and Light, 2012). In addition, many arid-adapted taxa are characterized by episodes of allopatric differentiation followed by range expansion (Riddle, 1995), such as the suggested origin for *C. mexicanus*.

4.3 Coalescent simulation for hypothesis testing

The joint use of ENMs for current climatic conditions and projections to the LGM and LIG and genetic data allow parameterizing demographic models to explain species colonization processes (Knowles et al., 2007; Knowles and Alvarado-Serrano, 2010). The resulting hypotheses can then be tested through the application of Approximate Bayesian Computation (Richards et al., 2007; Cornuet et al., 2008, 2014).

Our analysis determined scenario 7 as the most probable scenario. This scenario includes events of population expansion for the population from Chihuahua for *C. ludovicianus* and for *C. mexicanus*. Our results suggest that divergence between these sister species occurred ~ 230,000 years ago (coincident with the mean date of divergence obtained with BEAST), and

is older than the divergence proposed by Goodwin (1995) and McCullough and Chesser (1987). This interval encompasses events of climate change during the Pleistocene.

The posterior probability for this scenario was lower than 0.5, with considerable type I and type II errors. These results suggest that even if scenario 7 was the most probable between the scenarios tested, the dates of divergence between scenarios 6, 7 and 8 were not different enough to attain higher confidence in scenario choice (130, 230 and 430 ka). The lack of resolution could relate to the fact that the dates of divergence proposed in these scenarios are within the confidence intervals obtained from BEAST (0.1 – 0.43 Ma 95 % HPD).

Our results suggest that the evolutionary history of prairie dogs is complex. Data from the fossil record and the demographic history of these species suggest that *C. ludovicianus* has undergone several processes of demographic contraction and expansion, ending in the most recent fragmentation of the historical range due to anthropogenic activities. Including more molecular markers and samples from the entire distribution of *C. ludovicianus* may add resolution to the history of *C. ludovicianus*. According to our results from ENMs, the distribution range of *C. mexicanus* increased ~ 50% since the Last Glacial Maximum and effective population size increased ~10-fold since species divergence.

Estimates for effective population size for scenarios 6, 7 and 8 were consistent. Accordingly, when considering peripatric speciation we should expect to find smaller effective population sizes of endemics compared to the sister species, and significant asymmetry in range size between sister species (Barraclough and Vogler, 2000; Ikeda et al., 2012; Blair et al., 2014). Our results suggest that *C. mexicanus* has smaller effective population sizes than its sister species, and significant asymmetry in range size compared to *C. ludovicianus*. The data, therefore, support the hypothesis of peripatric speciation for the origin of this endemic species of the Mexican Plateau.

5. CONCLUSIONS AND FUTURE DIRECTIONS

The joint use of ENM and statistical phylogeography provided independent evidence, which allowed testing the hypothesis of the origin of an endemic species (*C. mexicanus*) through peripatric speciation. We corroborated that *C. mexicanus* is a palaeoendemic species that originated from a peripheral population of *C. ludovicianus* isolated ~ 230,000 years ago (0.1 – 0.43 Ma 95 % HPD).

Additionally, we found strong biogeographical substructure within the Chihuahuan Desert (Hafner and Riddle, 2011), related to contraction-expansion dynamics promoted by Pleistocene climate changes, and identified the presence of two climatically stable areas in the southern area of the distribution range of *C. ludovicianus*. Isolation of these populations was followed by Pleistocene-Holocene population expansion that resulted in secondary contact between lineages for *C. ludovicianus*.

We recognize the need for a more detailed sampling within the distribution range of *C. ludovicianus* to evaluate the Pleistocene refugia hypotheses outlined above, to determine further genetic subdivision within this species, to delineate the contact zone between the mtDNA lineages that constitute this species, and to quantify the degree of isolation between the colony located in Sonora and the rest of the species distribution. Furthermore, a genomic approach will allow testing hypotheses regarding niche conservatism, ecological speciation and local adaptation between this sister species and among lineages within *C. ludovicianus*.

ACKNOWLEDGEMENTS

This manuscript constitutes a partial fulfilment of the requirements for the Ph.D. degree of G. Castellanos-Morales at the graduate program Doctorado en Ciencias Biológicas of the Universidad Nacional Autónoma de México. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT No. Becario 210544 to G. C.). Funding for this study

was provided by the operative budget of the Instituto de Ecología, UNAM for L. E. E. Our special thanks to Y. Gutiérrez Guerrero, E. Scheinvar, E. Aguirre Planter, L. Espinosa Asuar, S. Barrientos, P. Padilla, S. Ramírez-Barahona, J. Gasca-Pineda, A. Vázquez-Lobo and the Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Instituto de Ecología, UNAM for their help in performing lab work and their advice for analyses. We also thank D. Piñero and L. Leon Paniagua for their valuable comments throughout the development of this project. J. Ortega, L. C. Sackett and G. Ceballos provided some of the samples and data for the analyses. A. Moreno-Letelier, A. Vázquez-Lobo, B. R. Riddle, J. P. Jaramillo-Correa and five anonymous reviewers reviewed and help improve this manuscript. L. F. Castellanos improved artwork.

REFERENCES

- Aguirre-Liguori, J. A., Scheinvar, E. and Eguiarte, L. E. (2014) Gypsum soil restriction drives genetic differentiation in *Fouqueria shrevei* (Fouquieriaceae). *American Journal of Botany*, **101**, 730-736.
- Andersen, J. J. and Light, J (2012) Phylogeography and subspecies revision of the hispid pocket mouse, *Chaetodipus hispidus* (Rodentia: Heteromyidae). *Journal of Mammalogy*, **93**, 1195-1215.
- Ayoub, N. D. and Riechert, S. E. (2004) Molecular evidence of Pleistocene glacial cycles driving diversification of a North American desert spider, *Agelenopsis aperta*. *Molecular Ecology* **13**, 3453-3465.
- Axelrod, D. I. (1985) Rise of the grassland biome, central North America. *The Botanical Review*, **51**, 164-201.
- Baker, R. H. (1956) Mammals of Coahuila, México. *University of Kansas Publications, Museum of Natural History*, **9**, 125-335.

- Baker, R. J. and Bradley, R. D. (2006) Speciation in mammals and the genetic species concept. *Journal of Mammalogy*, **87**, 643-662.
- Barracough, T. G. and Nee, S. (2001) Phylogenetics and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 391-399.
- Barracough, T. G. and Vogler, A. P. (2000) Detecting the geographical pattern of speciation from species-level phylogenies. *The American Naturalist*, **155**, 419-434.
- Beaumont, M. (2010) Approximate Bayesian computation in evolution and ecology. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **41**, 397-406
- Beaumont, M., Zhang, W. and Balding, D. J. (2002) Approximate Bayesian computation in population genetics. *Genetics*, **162**, 2025-2035.
- Bertorelle, G., Benazzo, A and Mona, S. (2010) ABC as a flexible framework to estimate demography over space and time: some cons, many pros. *Molecular Ecology*, **19**, 2609-2625.
- Blair, C., Heckman, K. L. and Yoder, A. D. (2014) Multilocus coalescent analyses reveal demographic history and speciation patterns of mouse lemur sister species. *BMC Evolutionary Biology*, **14**, 57.
- Bryson Jr, R. W., Jaeger, J. R., Lemos-Espinal, J. A. and Lazcano, D. (2012) A multilocus perspective on the speciation history of a North American aridland toad (*Anaxyrus punctatus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **64**, 393-400.
- Bryson Jr, R. W., García-Vázquez, U. O. and Riddle, B. R. (2011) Phylogeography of Middle American gophersnakes: mixed responses to biogeographical barriers across the Mexican Transition Zone. *Journal of Biogeography*, **38**, 1570-1584.
- Bryson Jr, R. W., Nieto-Montes de Oca, A., Jaeger, J. R. and Riddle, B. R. (2010) Elucidation of cryptic diversity in a widespread nearctic treefrog reveals episodes of mitochondrial gene capture as frogs diversified across a dynamic landscape. *Evolution*, **64**, 2315-2330.

- Calenge, C., Darmon, G., Basille, M., Loison, A. and Jullien, J.-M. (2008) The factorial decomposition of the Mahalanobis distances in habitat selection studies. *Ecology*, **89**, 555-566.
- Carnaval, A. C. and Moritz C. (2008) Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, **35**, 1187-1201.
- Castellanos-Morales, G., Ortega J, Castillo-Gómez R. A., Sackett L. C. and Eguiarte L. E. (2015) Genetic variation and structure in contrasting geographic distributions: widespread versus restricted black-tailed prairie dogs. *Journal of Heredity*, **106**, 478-490.
- Castellanos-Morales, G., Gasca-Pineda, J., Ceballos, G. and Ortega, J. (2014) Genetic variation in a peripheral and declining population of black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) from Mexico. *Journal of Mammalogy*, **95**, 467-479.
- Castoe, T. A., Spencer, C. L. and Parkinson, C. L. (2007) Phylogeographic structure and historical demography of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*): A perspective on North American desert biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **42**, 193-212.
- Ceballos, G. and Wilson, D. E. (1985) *Cynomys mexicanus*. *Mammalian Species*, **248**, 1-3.
- Chan L. M., Brown J. L. and Yoder A. D. (2011) Integrating statistical genetic and geospatial methods bring new power to phylogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **59**, 523-537.
- Collins, W. D., Bitz, C. M., Blackmon, M. L., Bonan, G. B., Bretherton, C. S., Carton, J. A., Chang, P., Doney, S. C., Hack, J. J., Henderson, T. B., Kiehl, J. T., Large, W. G., McKenna, D. S., Santer, B. D. and Smith, R. D. (2006) The community climate system model version 3 (CCSM3). *Journal of Climate*, **19**, 2122-2143.
- Cornuet, J. M., Pudlo, P., Veyssier, J., Dehne-Garcia, A., Gautier, M., Leblois, R., Marin, J.M. and Estoup, A. (2014) DIY ABC v2.0: a software to make approximate Bayesian

computation inferences about population history using single nucleotide polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. *Bioinformatics*, **30**, 1187-1189.

Cornuet, J. M., Ravigne, V. and Estoup, A. (2010) Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite data with the software DIYABC (v1.0), *BMC Bioinformatics*, **11**, 401. <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/11/401>

Cornuet, J. M., Santos, F., Beaumont, M. A., Robert, C. P., Marin, J. M., Balding, D. J., Guillemaud, T. and Estoup, A. (2008) Inferring population history with *DIY ABC*: a user-friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinformatics*, **24**, 2713-2719.

Davis, W. B., McGuire, J. L. and Orcutt, J. D. (2014) Ecological niche models of mammalian glacial refugia shows consistent bias. *Ecography*, **37**, 1133-1138.

Douglas, M. E., Douglas, M. R., Schuett, G. W. and Porras, L. W. (2006) Evolution of rattlesnakes (Viperidae; *Crotalus*) in the warm deserts of North America shaped by Neogene vicariance and Quaternary climate change. *Molecular Ecology*, **15**, 3353-3374.

Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D. and Rambaut, A. (2012) Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, **29**, 1969-1973.

Drummond, A. J. and Rambaut, A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 214.

Drummond, A. J. and Rambaut, A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 8.

Duran, K. L., Lowrey, T. K., Parmenter, R. R. and Lewis, P. O. (2005) Genetic diversity in Chihuahuan desert populations of creosotebush (Zygophyllaceae: *Larrea tridentata*). *American Journal of Botany*, **92**, 722-729.

Eckert, A. J. (2011) Seeing the forest for the trees: statistical phylogeography in a changing world. *New Phytologist*, **189**, 894-897.

- Elith, J., Phillips, S. J., Hastie, T., Dudík, M., Chee, Y. E. and Yates, C. J. (2011) A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Diversity and Distributions*, **17**, 43-57.
- Elith, J., Graham, C. H., Anderson, R. P., et al. (2006) Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography*, **29**, 129-151.
- Fernández, J. A. (2012a) Phylogenetics and biogeography of the microendemic rodent *Xerospermophilus perotensis* (Perote ground squirrel) in the Oriental Basin of Mexico. *Journal of Mammalogy*, **93**, 1431-1439.
- Fernández, J. A. (2012b) Molecular systematics and biogeography of the Mexican endemic kangaroo rat, *Dipodomys phillipsii* (Rodentia: Heteromyidae). *Journal of Mammalogy*, **93**, 560-571.
- Fernández, J. A. (2011) Comparative biogeography of the arid lands of central Mexico. Ph.D. dissertation. Louisiana State University. 153 pp.
- Gámez, N., Escalante, T., Espinosa, D., Eguiarte, L. E. and Morrone, J. J. (2014) Temporal dynamics of areas of endemism under climate change: a case study of Mexican *Bursera* (Burseraceae). *Journal of Biogeography*, **41**, 871-881.
- Gándara, E. and Sosa, V. (2014) Spatio-temporal evolution of *Leucophyllum pringlei* and allies (Scrophulariaceae): a group endemic to North American xeric regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **76**, 93-101.
- Goodwin, H. T. (1995) Pliocene-Pleistocene biogeographic history of prairie dogs, genus *Cynomys* (Sciuridae). *Journal of Mammalogy*, **76**, 100-122.
- Guevara-Chumacero, L. M., López-Wilchis, R. Pedroche, F. F. and Barriga-Sosa, I. (2006) Análisis estructural del gen mitochondrial citocromo b y de la region control de *Cynomys mexicanus* y *Spermophilus spilosoma* (Rodentia: Sciuridae). *Acta Zoológica Mexicana*, **22**, 123-125.

- Hafner, D. J. and Riddle, B. O. (2011) Boundaries and barriers of North American warm deserts: an evolutionary perspective. *Palaeogeography and palaeobiogeography: biodiversity in space and time* (ed. by P. Upchurch). National Institute for Environmental Science, Cambridge, UK.
- Hafner, D. J., Hafner, M. S., Hasty, G. L., Spradling, T. A. and Demastes, J. W. (2008) Evolutionary relationships of pocket gophers (*Crateogeomys castanops* Species Group) of the Mexican Altiplano. *Journal of Mammalogy*, **89**, 190-208.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series*, **41**, 95–98.
- Harrison, R. G., Bogdanowicz, S. M., Hoffmann, R. S., Yensen, E. and Sherman, P. W. (2003) Phylogeny and evolutionary history of the ground squirrels (Rodentia: Marmotinae). *Journal of Mammalian Evolution*, **10**, 249–276.
- Hedrick, P. (2011) Genetics of populations. Jones and Bartlett Learning. Boston, Massachusetts, USA.
- Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G. and Jarvis, A. (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, **25**, 1965-1978.
- Ho, S. Y. W. and Phillips, M. J. (2009) Accounting for calibration uncertainty in phylogenetic estimation of evolutionary divergence times. *Systematic Biology*, **58**, 367-380.
- Ho, S. Y. W., Phillips, M. J., Cooper, A. and Drummond, A. (2005) Time dependency of molecular rate estimates and systematic overestimation of recent divergence times. *Molecular Biology and Evolution*, **22**, 1561-1568.
- Hoffman, R. S. and Jones, Jr., J. K. (1970) Influence of late-glacial and post-glacial events on the distribution of recent mammals on the Great Plains. *Pleistocene and recent environments*

of the Central Great Plains (edited by Dort, Jr. W. and Jones, Jr. J. K.). University of Kansas Press, Lawrence, USA.

Hollister, N. (1916) A systematic account of the prairie-dogs. *North American Fauna*, **40**, 1-37.

Holmgren, C. A., Betancourt, J. L. and Rylander, K. A. (2010) A long-term vegetation history of the Mojave-Colorado Desert ecotone at Joshua Tree National Park. *Journal of Quaternary Science*, **25**, 222-236.

Hoogland, J. (1996) *Cynomys ludovicianus*. *Mammalian Species*, **535**, 1-10.

Hope, A. G., Speer, K. A., Demboski, J. R., Talbot, S. L. and Cook, J. A. (2012) A climate for speciation: rapid spatial diversification within the *Sorex cinereus* complex of shrews. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **64**, 671-684.

Ikeda, H., Carlsen, T., Fujii, N., Crochmann, C. and Setoguchi, H. (2012) Pleistocene climatic oscillations and the speciation history of an alpine endemic and a widespread arctic-alpine plant. *New Phytologist*, **194**, 583-594.

Jaeger, J. R., Riddle, B. R. and Bradford, D. F. (2005) Cryptic Neogene vicariance and Quaternary dispersal of the red-spotted toad (*Bufo punctatus*): insights on the evolution of North American warm desert biotas. *Molecular Ecology*, **14**, 3033-3048.

Johnson, J. A. (2008) Recent range expansion and divergence among North American prairie grouse. *Journal of Heredity*, **99**, 165-173.

Jones, P. H., Biggins, D. E., Eads, D. A., Eads, S. L. and Britten, H. B. (2012) Deltamethrin flea-control preserves genetic variability of black-tailed prairie dogs during a plague outbreak. *Conservation Genetics*, **13**, 183-195.

Knowles, L. L. and Alvarado-Serrano, D. F. (2010) Exploring the population genetic consequences of the colonization process with spatio-temporally explicit models: insights

from coupled ecological, demographic and genetic models in montane grasshoppers.

Molecular Ecology, **19**, 3727-3745.

Knowles, L. L., Carstens, B. C. and Keat, M. L. (2007) Coupling genetic and ecological-niche models to examine how past population distributions contribute to divergence. *Current Biology*, **17**, 940-946.

Knowles, L. L. and Alvarado-Serrano, D. F. (2010) Exploring the population genetic consequences of the colonization process with spatio-temporally explicit models: insights from coupled ecological, demographic and genetic models in montane grasshoppers. *Molecular Ecology*, **19**, 3727-3745.

Krishnaswamy, J., Bawa, K. S., Ganeshiah, K. N. and Kiran, M. C. (2009) Quantifying and mapping biodiversity and ecosystem services: Utility of a multi-season NDVI based Mahalanobis distance surrogate. *Remote Sensing of Environment*, **113**, 857-867.

Loera, I., Sosa, V. and Ickert-Bond, S. M. (2012) Diversification in North American arid lands: niche conservatism, divergence and expansion of habitat explains speciation in the genus *Ephedra*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **65**, 437-450.

Losos, J. B. and Glor, R. E. (2003) Phylogenetic comparative methods and the geography of speciation. *Trend in Ecology and Evolution*, **18**, 220-227.

Martínez- Meyer, E. and A. T. Peterson (2006) Conservatism of ecological niche characteristics in North American plant species over the Pleistocene-to-Recent transition. *Journal of Biogeography*, **33**, 1779-1789.

Mayr, E. (1963) *Animal species and evolution*. Cambridge, MA: Harvard University Press.

McCormack, J. E., Heled, J., Delaney, K. S., Peterson, A. T. and Knowles, L. L. (2011) Calibrating divergence times on species trees versus gene trees: implications for speciation history on *Aphelocoma* jays. *Evolution*, **65**, 184-202.

- McCullough, D.A. (1991) Molecular and genetic systematics of prairie dogs (genus: *Cynomys*). Ph.D. dissertation. Texas Tech University. 76 pp.
- McCullough, D. A. and Chesser, R. K. (1987) Genetic variation among populations of the Mexican prairie dog. *Journal of Mammalogy*, **68**, 555-560.
- Mead, J. I., White R. S., Baez, A., Hollenshead, M. G., Swift, S. L. and Carpenter, M. C. (2010) Late Pleistocene (Rancholabrean) *Cynomys* (Rodentia, Sciuridae: prairie dog) from northwestern Sonora, Mexico. *Quaternary International*, **217**, 138-142.
- Morin, P. A., Archer, F. I., Foote, A. D., Vilstru, J., Allen, E. E., Wade, P., Durban, J., Parsons, K., Pitman, R., Li, L., Bouffard, P., Nielsen S. C. A., Rasmussen, M., Willerslev, E., Gilbert, M. T. P. and Harkins, T. (2015) Complete mitochondrial genome phylogeographic analysis of killer whales (*Orcinus orca*) indicates multiple species. *Genome Research*, **20**, 908-916.
- Neiswenter, S. A. and Riddle, B. R. (2011) Landscape and climatic effects on the evolutionary diversification of the *Perognathus fasciatus* species groups. *Journal of Mammalogy*, **92**, 982-993.
- Neiswenter, S. A. and Riddle, B. R. (2010) Diversification of the *Perognathus flavus* species group in emerging arid grasslands of western North America. *Journal of Mammalogy*, **91**, 348-362.
- Ochoa, A., Gasca, J., Ceballos, G. J. and Eguiarte, L. E. 2012. Spatiotemporal population genetics of the endangered Perote ground squirrel (*Xerospermophilus perotensis*) in a fragmented landscape. *Journal of Mammalogy*, **93**, 1061-1074.
- Petersons, A. T. and Nyári, A. (2007) Ecological niche conservatism and Pleistocene refugia in the thrush-like mourner, *Schiffornis* spp., in the Neotropics. *Evolution*, **62-I**, 173-183.

- Pfenninger, M. and Schwenk, K. (2007) Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 121. doi: 10.1186/1471-2148/7/121.
- Phillips, S. J. and Dudík, M. (2008) Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography*, **31**, 161-175.
- Phillips, S. J., Anderson, R. P. and Schapire, R. E. (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, **190**, 231-259.
- Phillips, S. J., Dudík, M. and Schapire, R. E. (2004) A maximum entropy approach to species distribution modeling. *Proceedings of the twenty-first international conference of Machine learning*. pp 83. ACM, New York.
- Posada, D. (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, **25**, 1253–1256.
- Pyron, R. A. and Burbrink, F. T. (2010) Hard and soft allopatry: physically and ecologically mediated modes of geographic speciation. *Journal of Biogeography*, **37**, 2005-2015.
- R Development Core Team (2008) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Ramírez-Barahona, S. and Eguiarte, L. E. (2014) Changes in the distribution of cloud forests during the last glacial predict the patterns of genetic diversity and demographic history of the tree fern *Alsophila firma* (Cyatheaceae). *Journal of Biogeography*, **41**, 2396-2407.
- Rebernik, C. A., Schneeweiss, G. M., Bardy, K. E., Schönswetter, P., Villaseñor, J. L., Obermayer, R., Stuessy, T. F. and Weiss-Schneeweiss, H. (2010) Multiple Pleistocene refugia and Holocene range expansions of an abundant southwestern American desert plant species (*Melampodium leucanthum*, Asteraceae). *Molecular Ecology*, **19**, 3421-3443.

- Richards, C. L., Carstens, B. C. and Knowles, L. L. (2007) Distribution modelling and statistical phylogeography: an integrative framework for generating and testing alternative biogeographical hypotheses. *Journal of Biogeography*, **34**, 1833-1845.
- Riddle, B. R., Dawson, M. N., Hadly, E. A., Hafner, D. J., Hickerson, M. J., Mantooth, S. J. and Yoder, A. D. (2008) The role of molecular genetics in sculpting the future of integrative biogeography. *Progress in Physical Geography*, **32**, 173-202.
- Riddle, B. R. (1995) Molecular biogeography of the pocket mice (*Perognathus* and *Chaetodipus*) and grasshopper mice (*Onychomys*): the late Cenozoic development of a North American aridland rodent guild. *Journal of Mammalogy*, **76**, 283-301.
- Roach, J. L., Stapp, P., Van Horne, B. and Antolin, M. F. (2001) Genetic structure of a metapopulation of black-tailed prairie dogs. *Journal of Mammalogy*, **82**, 946-959.
- Robert, C. P., Cornuet, J. M. Marin, J. M. and Pillai, N. S. (2011) Lack of confidence in approximate Bayesian computation model choice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **108**, 15112-15117.
- Rokas A., and Carrol S. B. (2005) More genes or more taxa? The relative contribution of gene number and taxon number to phylogenetic accuracy. *Molecular biology and Evolution*, **22**, 1337-1344.
- Ronquist F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A. and Huelsenbeck, J. P. (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and a model choice across a large model space. *Systematic Biology*, **61**, 539-542. doi: 10.1093/sysbio/sys029
- Sackett, L. C., Seglund, A., Guralnick, R. P., Mazzella, M. N., Wagner, D. M., Busch, J. D. and Martin A. P. (2014) Evidence for two subspecies of Gunnison's prairie dogs (*Cynomys gunnisoni*), and the general importance of the subspecies concept. *Biological Conservation*, **174**, 1-11.

Sackett, L. C., Cross, T. B., Jones, R. T., Johnson, W. C., Ballare, K., Ray, C., Collinge, S. K. and Martin, A. P. (2012) Connectivity of prairie dog colonies in an altered landscape: inferences from analysis of microsatellite DNA variation. *Conservation Genetics*, **13**, 407–418.

Sánchez-García, A. and Castresana, J. (2012) Impact of deep coalescence on the reliability of species tree inference from different types of DNA markers in mammals. *PLoS ONE*, **7**, e30239.

Schluter, D. (2001) Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 372-388.

Slobodchikoff, C. N., Perla, B. S. and Verdolin, J. L. (2009) *Prairie dogs: communication and community in an animal society*. Harvard University Press, Cambridge.

Smith, A. S. and Peterson, K. J. (2002) Dating the time of origin of major clades: molecular clocks and the fossil record. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, **30**, 65-88.

Streicher, J. W., Cox, C. L., Campbell, J. A., Smith, E. N. and de Sá, R. O. (2012) Rapid range expansion in the Great Plains narrow-mouthed toad (*Gastrophryne olivacea*) and a revised taxonomy for North American microhylids. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **64**, 645-653.

Suchard, M., Weiss, R. and Sinsheimer, J. (2001) Bayesian selection of continuous-time Markov chain evolutionary models. *Molecular Biology and Evolution*, **18**, 1001-1013.

Truett, J. C., Gober, D. P., Ernst, A. E., List, R., Whitlaw, H., Hayes, C. L., Scmitt, G. and Van Pelt, W. E. (2006) Prairie dogs in the Chihuahuan Desert: history, ecology, conservation. Proceedings of the 6th Symposium on the Natural Resources of the Chihuahuan Desert. Chihuahuan Desert Research Institute, Fort Davis, Texas, USA.

Van Devender, T. R. (1990) Late Quaternary vegetation and climate in the Sonoran Desert, United States and Mexico. *Fossil packrat middens, the last 40,000 years of biotic change in*

- the arid west* (ed. by J. L. Betancourt, T. R. Van Devender and P. S. Martin). University of Arizona Press, Tucson.
- Van Devender, T. R. and Spaulding W. G. (1983) Development of vegetation and climate in the southwestern United States. *Origin and evolution of deserts* (ed. by D. R. Haragan and S. G. Wells). University of New Mexico Press, Albuquerque. pp 131-156.
- Walker, S., Brower, A. L. Stephens, R. T. T. and Lee, W. G. (2009) Why bartering biodiversity fails. *Conservation Letters*, **2**, 149-157.
- Waltari, E. and Guralnick, R. P. (2009) Ecological niche modelling of montane mammals in the Great Basin, North America: examining past and present connectivity of species across basins and ranges. *Journal of Biogeography*, **36**, 148-161.
- Waltari, E., Hijmans, R. J., Peterson, A. T., Nyári, A. S., Perkin, S. L. and Guralnick, R. P. (2007) Locating Pleistocene refugia: comparing phylogeographic and ecological niche model predictions. *Plos One*, **2**, e563.
- Williford, D., DeYoung, R. W., Honeycutt, R. L., Brennan, L. A. and Hernández, F. (2014) Phylogeography of the Scaled Quail in the American Southwest. *Western Northamerican Naturalist*, **74**, 18-32.
- Wilson, J. S. and Pitts, J. P. (2012) Identifying Pleistocene refugia in North American cold deserts using phylogeographic analyses and ecological niche modelling. *Diversity and Distributions*, **18**, 1139-1152.

SUPPORTING INFORMATION

Table S1. Number of individuals per haplotype for a) *C. ludovicianus* and b) *C. mexicanus*. GenBank accession number for each haplotype KP217107 – KP217125 comprise haplotypes CL1 – CL19 and KP217126 – KP217141 comprise haplotypes CM1 – CM16 as reported in Castellanos-Morales et al. 2015.

Figure S1. Map depicting the geographic distribution and frequency of the haplotypes reported for *C. ludovicianus* per site and *C. mexicanus* per colony.

Figure S2. Occurrence points used to build the ENMs for *C. ludovicianus* (a) and *C. mexicanus* (b).

Figure S3. AUC curves obtained from the MaxEnt analysis for *C. ludovicianus* (a) and *C. mexicanus* (b).

Figure S4. Results from the Jackknife procedure from MaxEnt for *C. ludovicianus* (left column) and *C. mexicanus* (right column). Regularized training gain (top row) and test gain (bottom row).

Figure S5. Probability of presence for *C. ludovicianus* (right column) and *C. mexicanus* (left column) at present (top), LGM (middle) and LIG (bottom) obtained with MaxEnt.

Appendix S1. Supplementary methods and results for the DIYABC analyses.

Table S2. Prior distributions of model parameters in DIYABC.

Figure S6. Graphic representation of the eight scenarios simulated in DIYABC for the partitioned data. $n_1 - n_3$ effective population size (N_e) for Chihuahua, Sonora and *C. mexicanus*, respectively; t_1 , time (in generations) to the population expansion in scenarios 5 to 8; t_2 , time (in generations) to the divergence of Chihuahua and Sonora within *C. ludovicianus*; $ta_1 - ta_4$, time (in generations) to the divergence of species considering four hypotheses: 20 – 40 ka, 120 – 140ka, 220 – 240 ka and 420 – 440 ka. For the scenarios of population expansion: n_4 is the N_e for *C. mexicanus* before the population expansion, n_5 is the N_e for the population from Chihuahua before population expansion, and n_6 is the sum of N_e from Chihuahua and Sonora before the split of these populations (represent the ancestral N_e of *C. ludovicianus*).

TABLE AND FIGURE LEGENDS

Table 1.- Confidence values in model choice from approximate Bayesian computation (ABC) analysis for black-tailed prairie dogs (*Cynomys*). Model performance indicated by the type I and type II errors (rows and columns, respectively) estimated for the 8 scenarios tested in the analysis.

Table 2.- Estimated parameters (effective population size (N_e) and time since divergence in years (t)) for the 3 scenarios that showed the highest posterior distribution (scenarios 6, 7 and 8).

Figure 1.- Distribution range and sampled sites of an endemic species from the Mexican Plateau (*Cynomys mexicanus*; orange triangles), and its sister widespread species (*Cynomys ludovicianus*; green diamonds).

Figure 2.- Gene genealogy for partitioned control region and cytochrome b regions of the mtDNA for sister species *C. ludovicianus* and *C. mexicanus*. Haplotypes CL1 to CL19 correspond to the 19 haplotypes found in *C. ludovicianus* from Chihuahua (CL1 to CL12), Sonora (CL13), New Mexico (CL5, CL14 to CL16) and Colorado (CL17 to CL19). Haplotypes CM1 to CM16 correspond to the haplotypes found in *C. mexicanus* from 6 colonies within the species distribution area in the Mexican Plateau. Sequences from *C. gunnisoni*, *X. pilosoma* and *X. perotensis* obtained from GenBank were used as outgroups. Number above branch represent diversification dates and numbers below branch its posterior probability.

Figure 3.- Ultrametric genealogy depicting the dates of divergence between *Cynomys ludovicianus* and *C. mexicanus* and between lineages (South-Central Clade: SCC, and

Southern Clade: SC) estimated with BEAST v 1.7.5 using two calibration points obtained from the fossil record highlighted with a black circle each (Goodwin, 1995). Haplotypes CL1 to CL19 correspond to the 19 haplotypes found in *C. ludovicianus* from Chihuahua (CL1 to CL12), Sonora (CL13), New Mexico (CL5, CL14 to CL16) and Colorado (CL17 to CL19). Haplotypes CM1 to CM16 correspond to the haplotypes found in *C. mexicanus* from 6 colonies within the species distribution area in the Mexican Plateau. Sequences from *C. gunnisoni*, *X. pilosoma* and *X. perotensis* obtained from GenBank were used as outgroups. Number above branch represent diversification dates and numbers below branch its posterior probability.

Figure 4.- Predicted distribution of *C. ludovicianus* and *C. mexicanus* for the present day (current), the Last Glacial Maximum (LGM; ~ 21 ka) and the Last Interglacial (LIG; ~130 ka), showing stable areas (refugia) at the intersection between the three models for each species and between species.

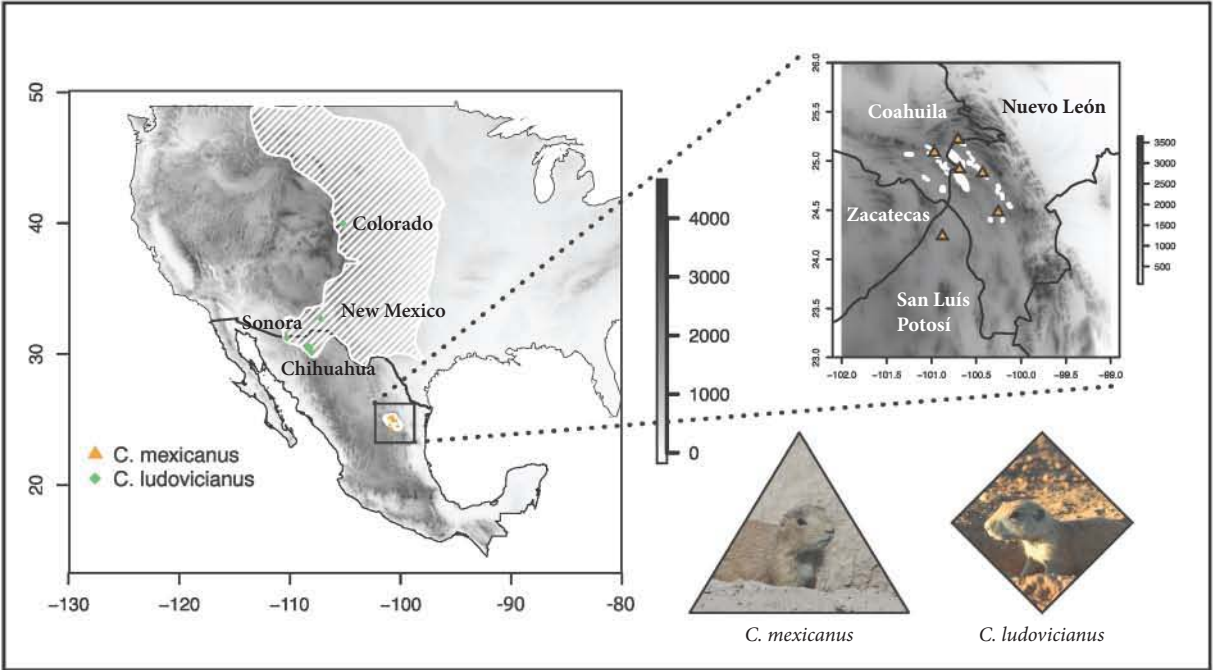
Table 1.- Confidence values in model choice from approximate Bayesian computation (ABC) analysis for black-tailed prairie dogs (*Cynomys*).

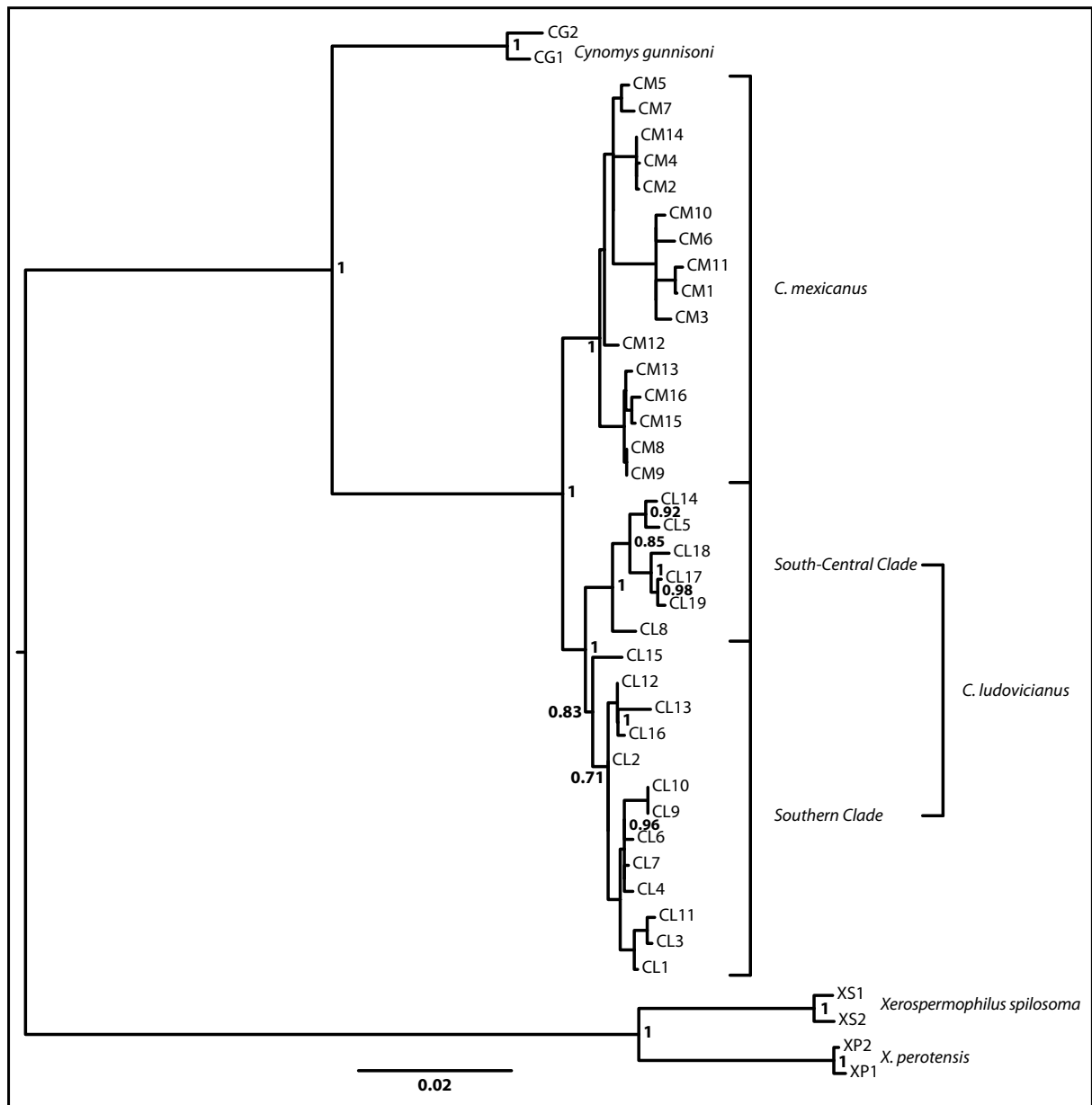
Model performance indicated by the type I and type II errors (rows and columns, respectively) estimated for the 8 scenarios tested in the analysis.

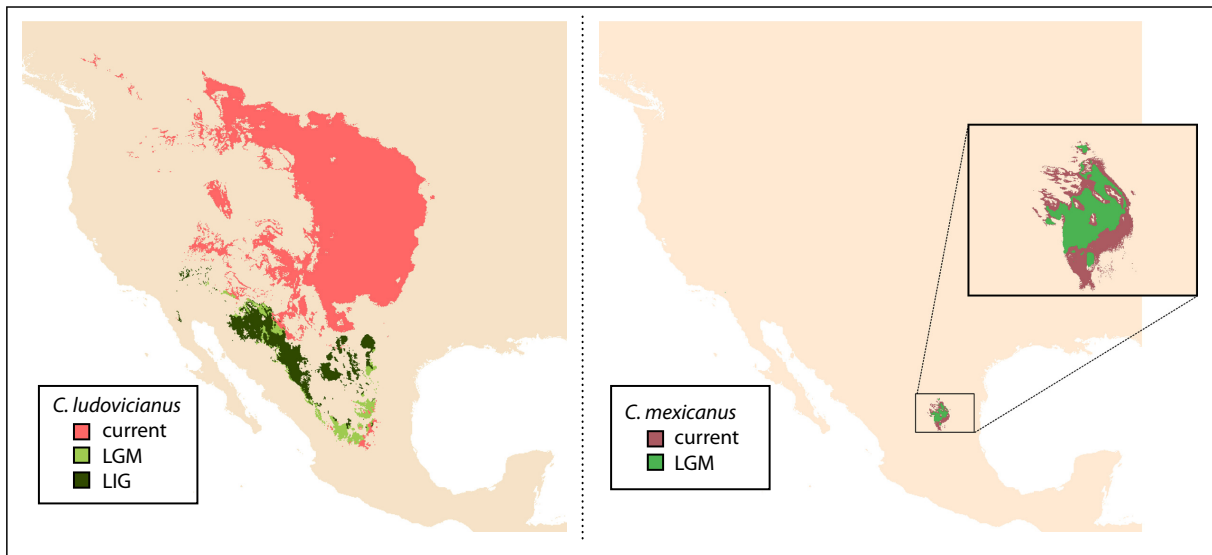
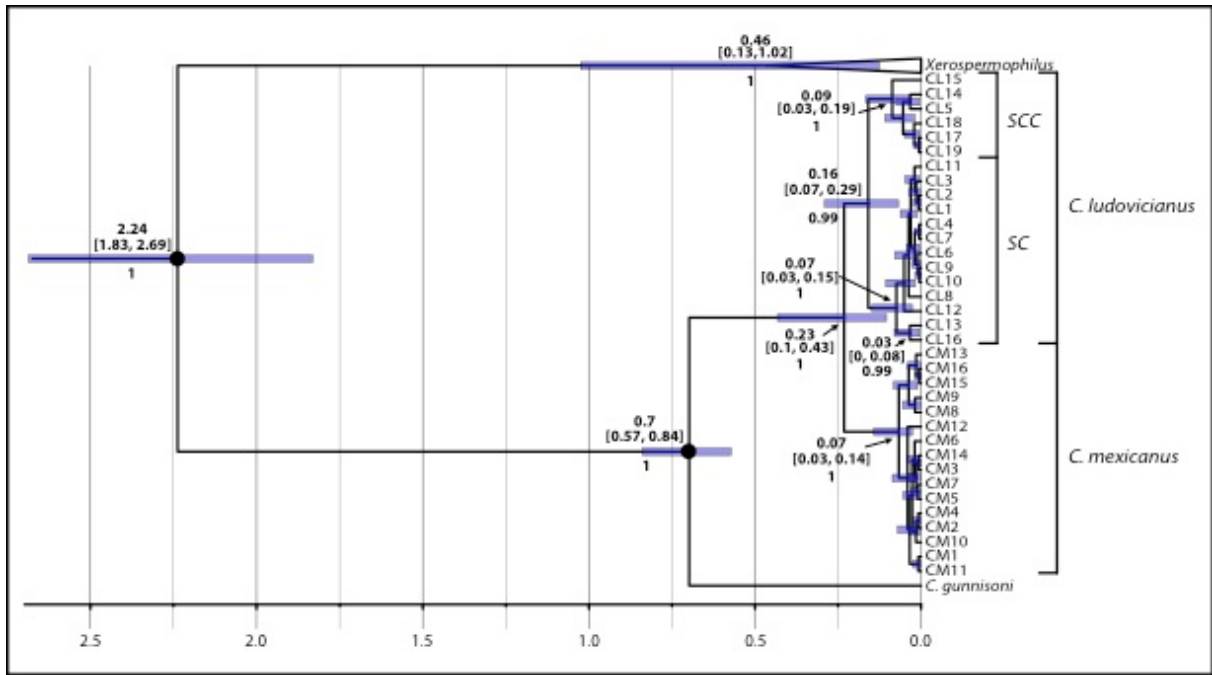
Scenario	Stable				Expanded			
	20 - 40 ka	120 - 140 ka	220 - 240 ka	420 - 440 ka	20 - 40 ka	120 - 140 ka	220 - 240 ka	420 - 440 ka
Posterior probability	0.0000	0.0109	0.0172	0.0586	0.0053	0.2803	0.4475	0.1802
Confidence intervals	(0.00, 0.00)	(0.00, 0.0532)	(0.00, 0.0592)	(0.0154, 0.1018)	(0.00, 0.0479)	(0.2427, 0.3179)	(0.4110, 0.4840)	(0.1246, 0.2357)
Model Performance %								
Stable	20 - 40 ka	87.4	11.2	1.2	0.2	0	0	0
	120 - 140 ka	9.0	65.0	21.0	5	0	0	0
	220 - 240 ka	0.6	28.6	50.6	20.2	0	0	0
	420 - 440 ka	0	3.4	27.8	68.2	0.6	0	0
Expanded	20 - 40 ka	0.0	0.0	0.0	0.0	86.8	9.0	2.0
	120 - 140 ka	0	0	0	0	7	51.6	20.8
	220 - 240 ka	0	0	0	0	1.4	24	32.2
	420 - 440 ka	0	0	0	0	0.6	5.6	21.8

Table 2.- Estimated parameters (effective population size (N_e) and time since divergence in years (t)) for the 3 scenarios that showed the highest posterior distribution (scenarios 6, 7 and 8).

Parameter	Scenario		
	6	7	8
<i>Effective Population Size (N_e)</i>			
<i>Ancestral</i>			
<i>C. mexicanus</i>	47,470	52,140	47,340
<i>C. ludovicianus</i>	5,051,000	5,443,000	4,919,000
Southern clade before expansion	54,262	57,183	54,760
<i>Current</i>			
<i>C. mexicanus</i>	508,200	540,800	511,200
<i>C. ludovicianus</i>	5,061,790	5,209,750	4,988,180
<i>Time since divergence in years</i>			
Population expansion	9,824	11,222	9,708
Species Divergence	130,020	230,000	430,000







SUPPORTING INFORMATON

Peripatric speciation of an endemic species driven by Pleistocene climate change: the case of the Mexican prairie dog (*Cynomys mexicanus*).

Gabriela Castellanos-Morales, Niza Gámez, Reyna A. Castillo-Gámez and Luis E. Eguiarte

Table S1. Number of individuals per haplotype for a) *C. ludovicianus* and b) *C. mexicanus*. GenBank accession number for each haplotype KP217107 – KP217125 comprise haplotypes CL1 – CL19 and KP217126 – KP217141 comprise haplotypes CM1 – CM16 as reported in Castellanos-Morales et al. 2015.

a) *Cynomys ludovicianus* haplotype per site.

Site	Haplotype																		
	CL1	CL2	CL3	CL4	CL5	CL6	CL7	CL8	CL9	CL10	CL11	CL12	CL13	CL14	CL15	CL16	CL17	CL18	CL19
Chi	43	2	7	19	8	34	18	1	2	8	6	1	0	0	0	0	0	0	0
Son	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	59	0	0	0	0	0	0
NM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	1	0	0	0
COL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	2	1
All	43	2	7	19	8	34	18	1	2	8	6	2	59	2	1	1	7	2	1

b) *Cynomys mexicanus* haplotype per colony

Colony	Haplotype															
	CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CM6	CM7	CM8	CM9	CM10	CM11	CM12	CM13	CM14	CM15	CM16
AT	3	4	8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EG	0	0	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ESA	0	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LA	0	0	8	0	0	0	0	8	7	0	0	0	0	0	0	0
LS	0	0	12	0	0	0	0	2	0	2	1	1	0	0	0	0
LT	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	3
All	3	4	34	1	4	1	1	10	7	2	1	1	1	1	3	3

Figure S1. Map depicting the geographic distribution and frequency of the haplotypes reported for *C. ludovicianus* per site and *C. mexicanus* per colony.

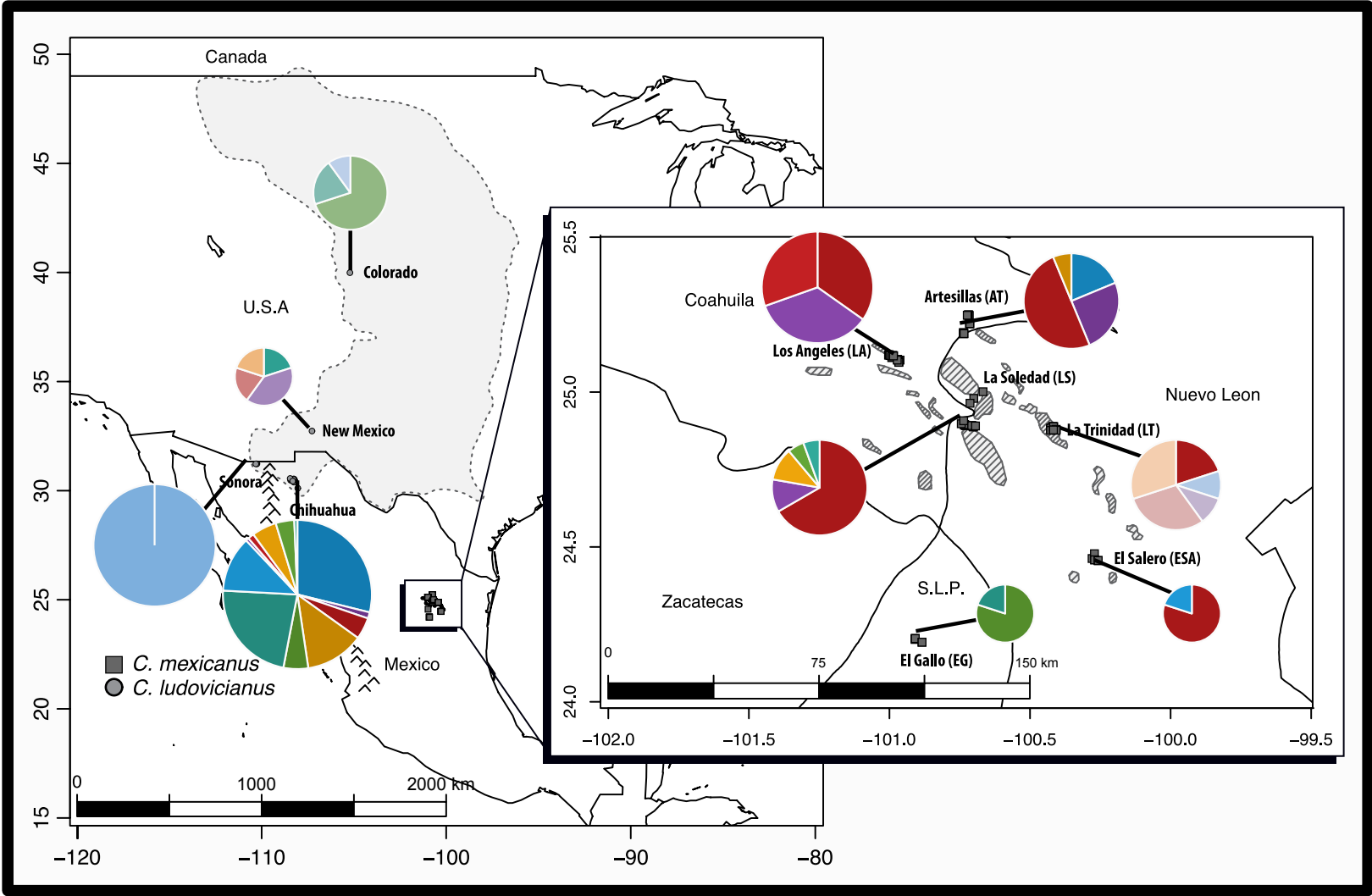
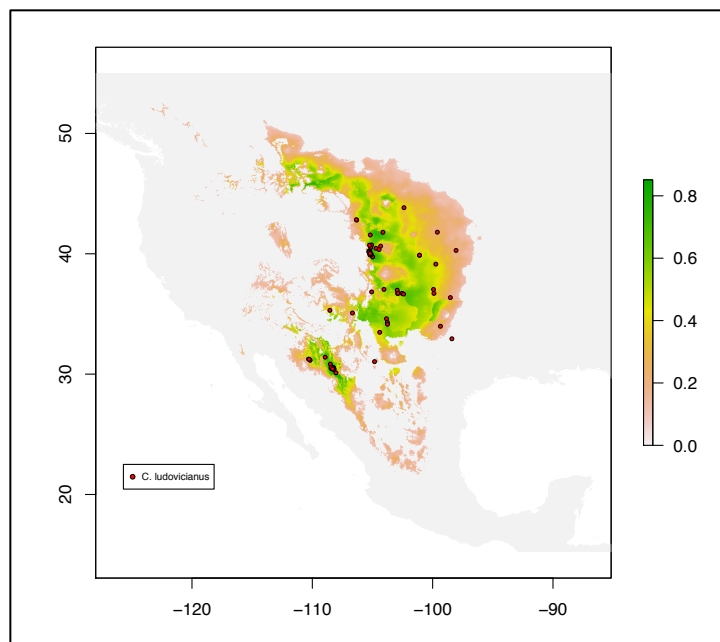


Figure S2. Occurrence points used to build the ENMs for *C. ludovicianus* (a) and *C. mexicanus* (b).

a) *C. ludovicianus*



b) *C. mexicanus*

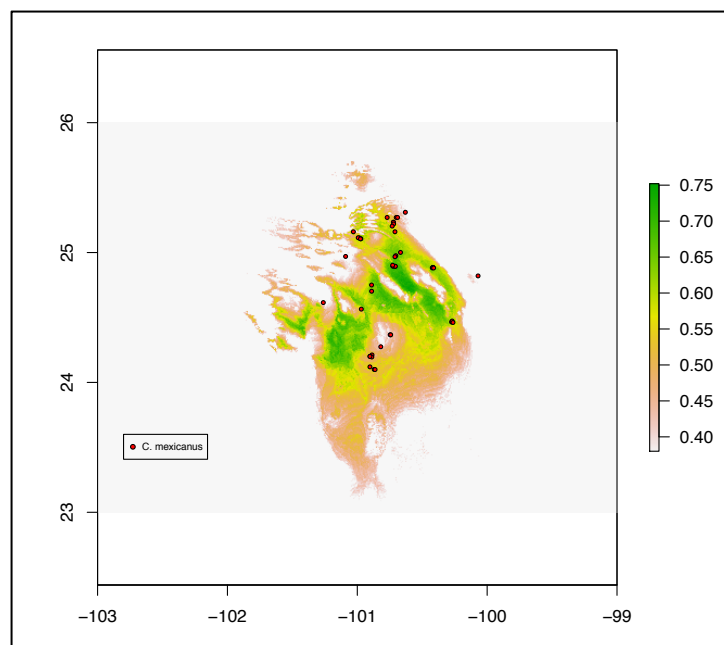
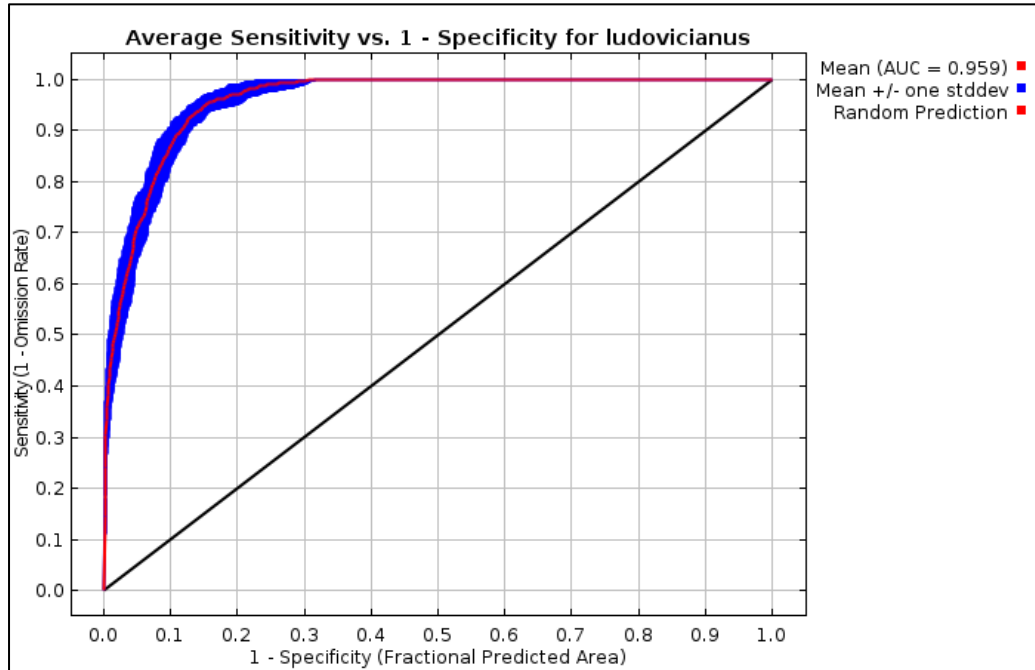


Figure S3. AUC curves obtained from the MaxEnt analysis for *C. ludovicianus* (a) and *C. mexicanus* (b).

a) *C. ludovicianus*



b) *C. mexicanus*

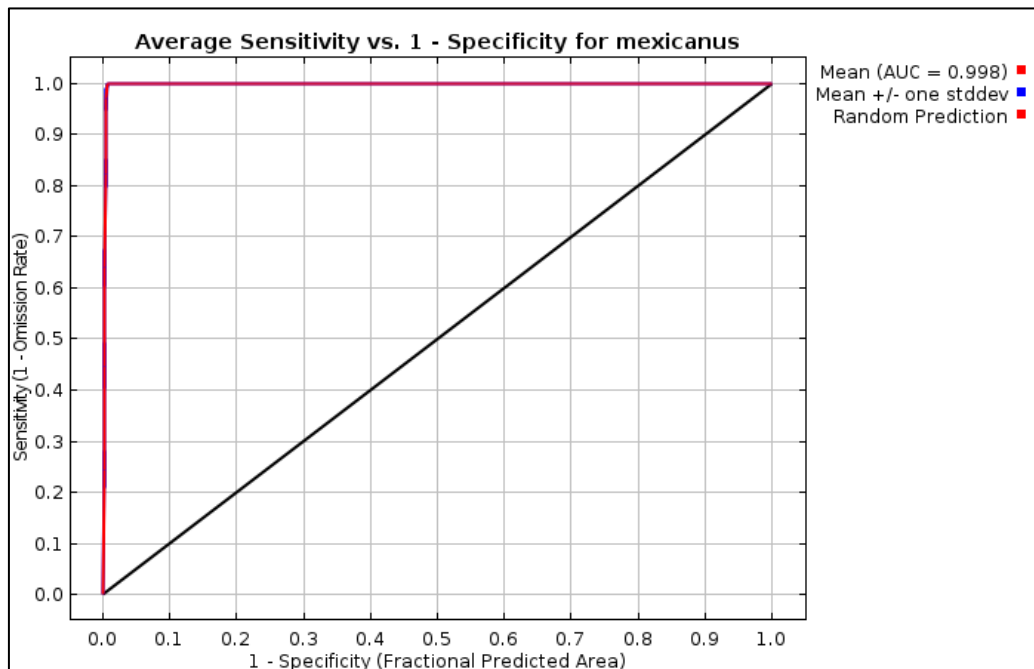


Figure S4. Results from the Jackknife procedure from MaxEnt for *C. ludovicianus* (left column) and *C. mexicanus* (right column). Regularized training gain (top row) and test gain (bottom row).

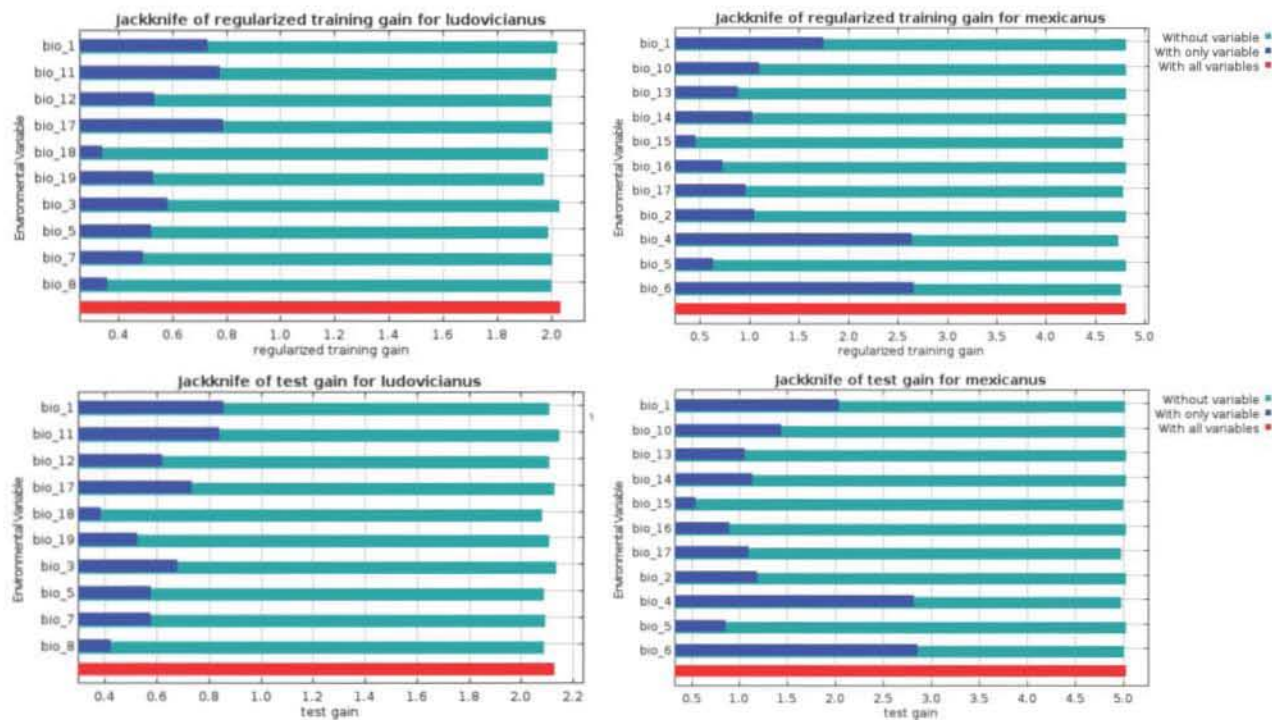
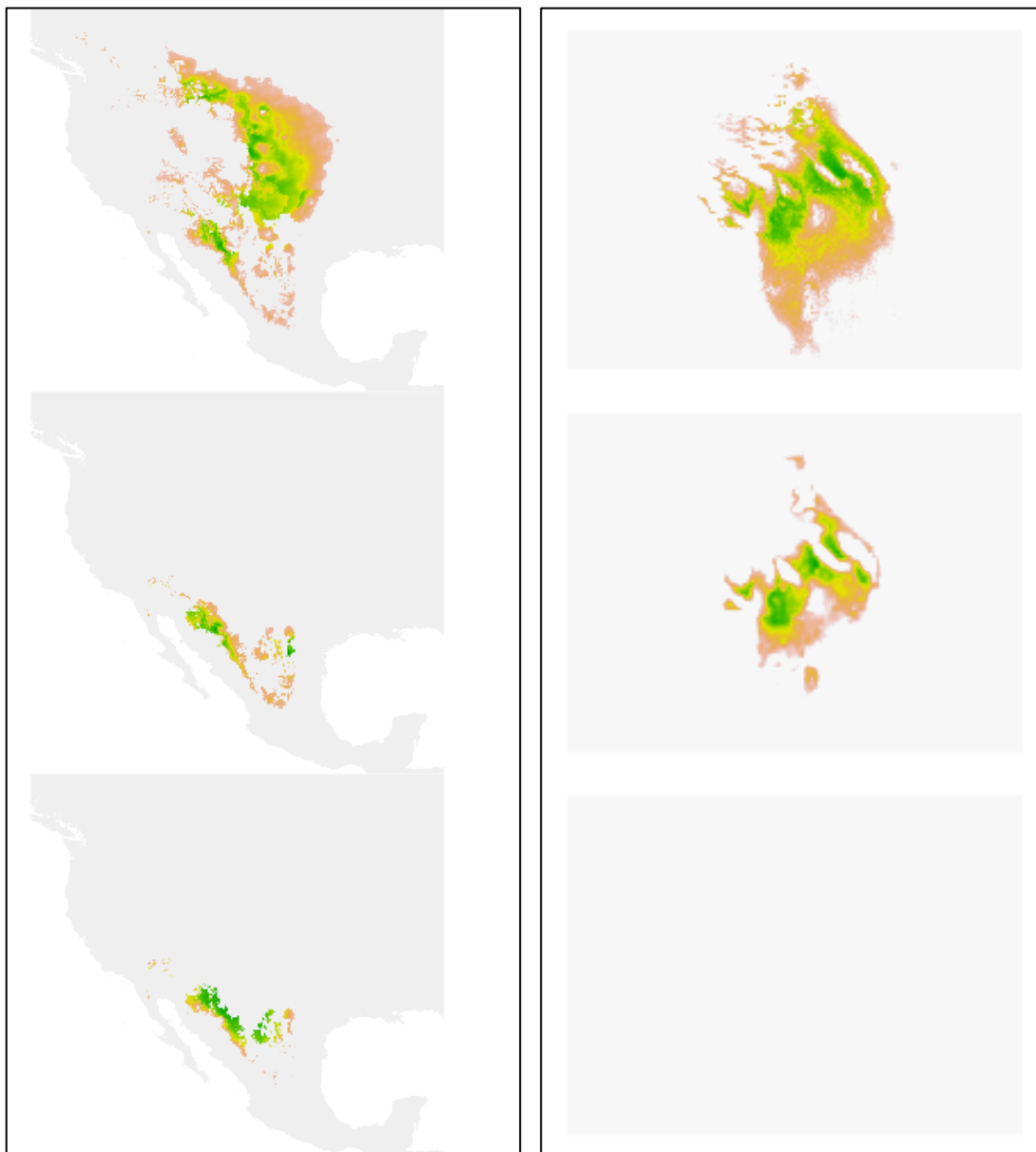


Figure S5. Probability of presence for *C. ludovicianus* (left column) and *C. mexicanus* (right column) at present (top), LGM (middle) and LIG (bottom) obtained with MaxEnt.



Appendix S1. Supplementary methods and results for the DIYABC analyses.

Supplementary methods

Initial simulations were conducted to select the summary statistics that were more informative for each molecular marker to conduct the analysis and to ensure that the parameters of the simulation yielded datasets similar to the empirical dataset (Bertorelle et al., 2010; Chan et al., 2011). A total of 54 summary statistics were calculated for the partitioned control region (one sample summary statistics: number of segregating sites, private segregating sites, mean of numbers of the rarest nucleotide at segregating sites; two sample summary statistics: mean of pairwise differences (W), F_{ST}), cytochrome b (one sample summary statistics: number of haplotypes, number of segregating sites, private segregating sites, mean number of the rarest nucleotide at segregating sites; two sample summary statistics: number of haplotypes, number of segregating sites, mean of pairwise differences (W), F_{ST}) and nuclear microsatellite loci (one sample summary statistics: mean number of alleles, mean genic diversity; two sample summary statistics: mean number of alleles, mean genic diversity, F_{ST}). One sample summary statistics estimated for the control region for each group were the number of segregating sites, private segregating sites and mean of number of the rarest nucleotide at segregating sites; the two sample summary statistics estimated were mean of pairwise differences (W) and F_{ST} . For the cytochrome b, the one sample summary statistics calculated were number of haplotypes, number of segregating sites, private segregating sites and mean of numbers of the rarest nucleotide at segregating sites; the two sample summary statistics were number of haplotypes, number of segregating sites, mean of pairwise differences (W) and F_{ST} . For ten microsatellite loci, the one sample summary statistics estimated were mean number of alleles and mean genic diversity; while the two sample summary statistics estimated were mean number of alleles, mean genic diversity and F_{ST} .

Broad priors were chosen to account for the absence of information to constrain prior for model parameters (Knowles and Alvarado-Serrano, 2010) (Table S1). The prior distributions for the time parameters were defined to encompass temporal intervals of 20 – 40 ka, 120 – 140 ka, 220 – 240 ka and 420 – 440 ka considering a generation time of two years. The mutation rates for cytochrome among taxa of mammals have shown up to 2 orders of magnitude rate variation (Nabholz et al., 2008). Therefore, we used broad intervals for the mutation rates of the control region and cytochrome b used in the simulations: 1×10^{-11} to 1×10^{-6} for the control region, and 1×10^{-13} to 1×10^{-8} for the cytochrome b. We also set broad intervals for the mutation rate of microsatellites: 1×10^{-6} to 1×10^{-4} .

Parameter estimation and model check procedure

The posterior probability of each scenario was estimated in DIYABC (Cornuet et al., 2014) by weighted polychotomous logistic regression on the 1% of simulated datasets closest to the observed after a linear discriminant analysis on summary statistics. For the best-supported scenario, the posterior probability of time and demographic parameters were estimated, after a logit transformation. This was achieved by local regression on the 1% simulations closest to the observed data. To assess the bias of the mean parameter estimates, we generated 500 simulated datasets after a logit transformation of parameters. The bias in the estimation of parameters was measured with the average relative bias, which considers the difference between the simulated point estimate and the true value, divided by the true value, averaged over the 500 simulated datasets (Cornuet et al., 2010).

We estimated type I and type II error rates among the 500 simulated datasets generated under each scenario to evaluate the ability of the ABC analysis to discriminate between scenarios. To evaluate whether the best-supported scenario could successfully reproduce the observed data, 10,000 pseudo-observed datasets were simulated from the

posterior. To avoid over-estimating the quality of the fit, model checking was performed using the summary statistics not used during the inference steps (Cornuet et al., 2010). The result from this test showed that the best-supported scenario (scenario 7) could not confidently estimate 8 summary statistics: for microsatellite data, mean Garza-Williamson's M (MGW) for Sonora; for the control region, number of haplotypes (NHA) for *C. mexicanus*, mean of pairwise differences (MPD) for Chihuahua, variance of pairwise differences for Chihuahua (VPD), and number of segregating sites among Chihuahua and *C. mexicanus* (NS2); and for the cytochrome b, MPD for Chihuahua, VPD for Chihuahua, and Tajima's D (DTA) for *C. mexicanus*. Scenario 8 could not confidently estimate 9 summary statistics: for microsatellite loci, MGW for Sonora, classification index (LIK) between Chihuahua and *C. mexicanus*; for the control region, MPD for Chihuahua and for *C. mexicanus*, and VPD for Chihuahua; and for the cytochrome b, MPD for Chihuahua, VPD for Chihuahua, and DTA for Chihuahua and for *C. mexicanus*. Finally, scenario 6 could not confidently estimate 6 summary statistics: for microsatellite loci, MGW for Sonora; for the control region, NHD for *C. mexicanus*, MPD for Chihuahua, and VPD for Chihuahua; and for the cytochrome b, MPD for Chihuahua, VPD for Chihuahua, and DTA for *C. mexicanus*.

References

- Bertorelle, G., Benazzo, A and Mona, S. (2010) ABC as a flexible framework to estimate demography over space and time: some cons, many pros. *Molecular Ecology*, **19**, 2609-2625.
- Chan L. M., Brown J. L. and Yoder A. D. (2011) Integrating statistical genetic and geospatial methods bring new power to phylogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **59**, 523-537.
- Cornuet, J. M., Pudlo, P., Veyssier, J., Dehne-Garcia, A., Gautier, M., Leblois, R., Marin, J. M. & Estoup, A. (2014) DIYABC v2.0: a software to make approximate Bayesian

computation inferences about population history using single nucleotide polymorphisms, DNA sequences and microsatellite data. *Bioinformatics*, **30**, 1187-1189.

Cornuet, J. M., Ravigne, V. and Estoup, A. (2010) Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite data with the software DIYABC (v1.0), *BMC Bioinformatics*, **11**, 401. <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/11/401>

Knowles, L. L. and Alvarado-Serrano, D. F. (2010) Exploring the population genetic consequences of the colonization process with spatio-temporally explicit models: insights from coupled ecological, demographic and genetic models in montane grasshoppers. *Molecular Ecology*, **19**, 3727-3745.

Nabholz, B., Glémin, S. and Galtier, N. (2008) Strong variation of the mitochondrial mutation rate across mammals-the longevity hypothesis. *Molecular Biology and Evolution*, **25**, 120-130.

Table S2. Prior distributions of model parameters in DIYABC.

Prior		Distribution	Min	Max	Mean	st. deviation
Effective population sizes	Chihuahua	n1 UN	1,000	10,000,000		
	Sonora	n2 UN	1,000	100,000		
	<i>C. mexicanus</i>	n3 UN	10,000	1,000,000		
	Ancestral <i>C. mexicanus</i>	n4 UN	1,000	100,000		
	Chihuahua before population expansion	n5 UN	10	10,000		
	Ancestral <i>C. ludovicianus</i>	n6 UN	100,000	10,000,000		
Time	Time since population expansion	t1 UN	10	10,000		
	Time since divergence between Chihuahua and Sonora	t2 UN	10	200,000		
	Time since divergence between species	ta1 NO	10,000	20,000	15,000	5,000
		ta2 NO	60,000	70,000	65,000	5,000
ta3 NO		110,000	120,000	115,000	5,000	
ta4 NO		210,000	220,000	215,000	5,000	

Time defined considering a generation time of 2 years. UN, uniform distribution; NO, normal distribution.

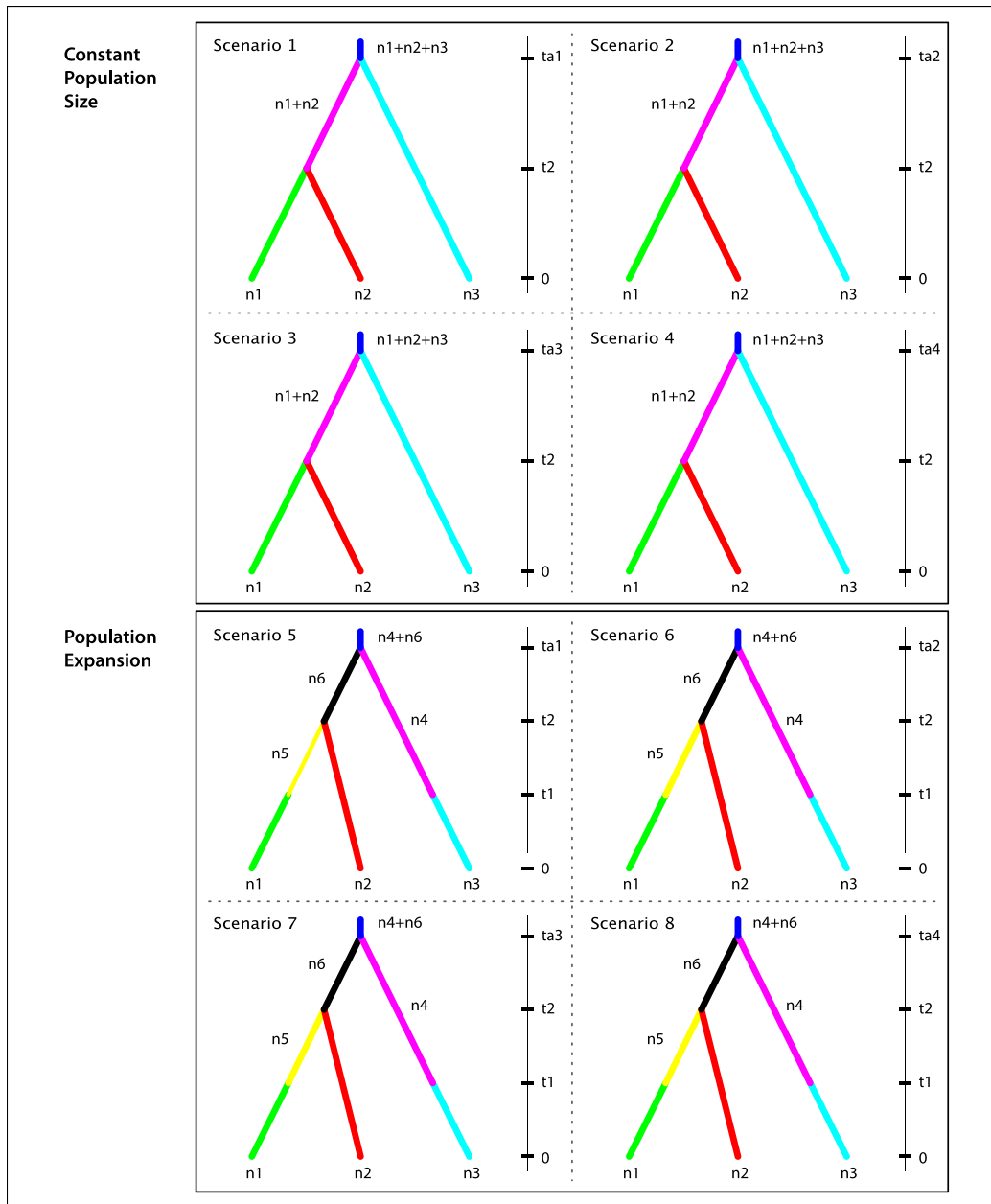


Figure S6. Graphic representation of the eight scenarios simulated in DIYABC for the partitioned data. $n_1 - n_3$ effective population size (N_e) for Chihuahua, Sonora and *C. mexicanus*, respectively; t_1 , time (in generations) to the population expansion in scenarios 5 to 8; t_2 , time (in generations) to the divergence of Chihuahua and Sonora within *C. ludovicianus*; $ta_1 - ta_4$, time (in generations) to the divergence of species considering four hypotheses: 20 – 40 ka, 120 – 140ka, 220 – 240 ka and 420 – 440 ka. For the scenarios of population expansion: n_4 is the N_e for *C. mexicanus* before the population expansion, n_5 is the N_e for the population from Chihuahua before population expansion, and n_6 is the sum of N_e from Chihuahua and Sonora before the split of these populations (represent the ancestral N_e of *C. ludovicianus*).

Capítulo 3. Conservación de *Cynomys mexicanus*: el papel de la conservación *ex situ* en la persistencia de especies en peligro de extinción.

Gabriela Castellanos-Morales, Yocelyn T. Gutiérrez-Guerrero y Luis E. Eguiarte.

Resumen

Uno de los objetivos principales de la conservación *ex situ* es realizar crianza en cautiverio con la finalidad de proveer individuos para reestablecer poblaciones silvestres. Sin embargo, las poblaciones cautivas pueden presentar problemas genéticos relacionados con un tamaño poblacional pequeño. Entre estos se encuentra la depresión por endogamia, la fijación progresiva y acumulación de mutaciones deletéreas relacionadas con la acción de la deriva génica, la pérdida de diversidad genética debida a la consanguinidad y a la deriva génica, y la adaptación genética al cautiverio. Por lo tanto, el primer paso en los programas de reintroducción debe ser evaluar los niveles de variación presentes en las poblaciones cautivas/fundadoras y las poblaciones silvestres. El objetivo del presente estudio fue evaluar la variación genética presente en una población de *Cynomys mexicanus* cautiva en el Museo del Desierto, una especie endémica de México y en peligro de extinción. Se utilizaron datos moleculares obtenidos de la región control y el citocromo *b* del ADN mitocondrial y 10 microsatélites nucleares para estimar los valores de diversidad genética de esta población y compararla con poblaciones silvestres. Los perros llaneros mexicanos de la población cautiva presentaron alta variación genética a nivel nuclear ($H_E = 0.52$) y mitocondrial ($H_d = 0.692$) en comparación con las poblaciones silvestres y coeficiente de endogamia no significativo ($F_{IS} = 0.065$). Se detectó la presencia de 3 haplotipos mitocondriales que sugieren que la población fue fundada con al menos 3 hembras reproductivas. La población es similar a la población fundadora reportada (Los Ángeles, Coahuila) que a su vez se encuentra diferenciada del resto de las colonias analizadas. Los resultados sugieren que la población del Museo del Desierto fue fundada por individuos provenientes de distintos grupos familiares de la colonia Los Ángeles, o bien de varias colonias. Sin embargo, no se lograron identificar otras poblaciones fundadoras. Es necesario ampliar el muestreo de poblaciones silvestres. Además, el tamaño censal limitado de esta población hace que para fines de reintroducción sea necesario utilizar individuos provenientes de varias poblaciones cercanamente relacionadas y/o con altos niveles de variación genética como La Trinidad y La Soledad. Finalmente, es necesario evaluar la permanencia de las poblaciones a mediano y largo plazo para incrementar el éxito de los programas de manejo y conservación.

Conservación de *Cynomys mexicanus*: el papel de la conservación *ex situ* en la persistencia de especies en peligro de extinción.

Gabriela Castellanos-Morales, Yocelyn T. Gutiérrez-Guerrero y Luis E. Eguiarte*.

Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior s/n Anexo al Jardín Botánico. Ciudad Universitaria, México Distrito Federal, 04510, México.

* Corresponding autor: fruns@unam.mx

1. Introducción

Las poblaciones cautivas de origen conocido pueden proveer material importante para el desarrollo de investigaciones genéticas y moleculares que permitan comprender la diversidad (Gipoliti y Amori 2007; Liu et al. 2014; Shan et al. 2014). En este sentido, uno de los objetivos principales de la conservación *ex situ* es realizar crianza en cautiverio para proveer individuos de especies en riesgo para reestablecer poblaciones silvestres (Montgomery et al. 1997; Mathews et al. 2005; WAZA 2005; Lascuráin et al. 2009; Pritchard et al. 2011; Shan et al. 2014). Sin embargo, el éxito de los programas de reintroducción es poco frecuente y la sobrevivencia de los individuos puede ser baja aún después de llevar a cabo medidas cuidadosas de preparación previas a la liberación (Mathews et al. 2005; Soorae 2013; Liu et al. 2014). Se ha observado que los individuos reintroducidos a partir de poblaciones criadas en cautiverio presentan mortalidad mayor que los individuos translocados desde poblaciones silvestres (Griffith et al. 1989; Wolf et al. 1996; Fischer y Lindenmayer 2000; Mathews et al. 2005; Jule et al. 2008). La falla de los programas de reintroducción a partir de poblaciones cautivas puede relacionarse con un conjunto de problemas genéticos que pueden estar presentes en estas poblaciones. Estos problemas incluyen un alto nivel de endogamia relacionado con un tamaño poblacional pequeño que pueden generar la fijación progresiva y acumulación de mutaciones deletéreas, así como procesos relacionados con la deriva génica, la pérdida de diversidad genética y la adaptación genética al cautiverio, que pueden resultar deletéreos en vida silvestre (Montgomery et al. 1997; Lascuráin et al. 2009; Lees y Wilken 2009; Robert 2009; Frankham 2010; Laikre et al. 2010; Liu et al. 2014). Por lo anterior, la variación genética es esencial para que las especies puedan responder al cambio ambiental (Briscoe et al. 1992; Frankham et al. 2004; Laikre et al. 2010). El enfoque clásico y principal del manejo genético de las poblaciones cautivas se ha centrado en mantener la variación genética y minimizar la endogamia (Briscoe et al. 1992; Rodríguez-Clark y Sánchez-Mercado 2006; Frankham 2010; Witzemberger y Hochkirch 2011; Liu et al. 2014; Soto-Calderón et al. 2015).

Por otro lado, la reintroducción de las poblaciones cautivas a la vida silvestre puede resultar en una reducción en la viabilidad y en la adecuación de las poblaciones silvestres (Laikre et al. 2010; Brandt et al. 2014). Esto se relaciona con la pérdida de variación genética, la pérdida de genes adaptativos, los cambios en la composición genética y la ruptura de la estructura poblacional (Laikre et al. 2010; Brandt et al. 2014; Liu et al. 2014; Shan et al. 2014). Por lo tanto, el primer paso para los programas de reintroducción debería ser siempre evaluar los niveles de variación presentes en las poblaciones cautivas/fundadoras y en las poblaciones silvestres (Lees y Wilken 2009; Laikre et al. 2010; Pritchard et al. 2011; Maschinski et al. 2013; Brandt et al. 2014; Liu et al. 2014; Shan et al. 2014; Soto-Calderón et al. 2015). Este enfoque permitirá maximizar la sobrevivencia al ligar el conocimiento disponible sobre poblaciones cautivas y silvestres para mejorar las prácticas de manejo (Pritchard et al. 2011; Liu et al. 2014; Shan et al. 2014; Soto-Calderón et al. 2015). A continuación se debe identificar a las poblaciones diferenciadas geográficamente que puedan garantizar los esfuerzos de conservación, tanto *in situ* como *ex situ*, en el mediano y largo plazo (Gippoliti y Amori 2007; Brandt et al. 2014; Soto-Calderón et al. 2015).

El objetivo del presente estudio fue evaluar la variación genética presente en una población *ex situ* de *C. mexicanus* localizada en el Museo del Desierto, Saltillo, Coahuila, y evaluar si ésta representa una población candidata para esfuerzos de reintroducción. Se utilizaron datos moleculares (la región control y el citocromo *b* del ADN mitocondrial y 10 loci de microsatélites nucleares) para estimar los valores de diversidad genética en la población cautiva y compararla con datos reportados para poblaciones silvestres (Castellanos-Morales et al. 2015 ver capítulo 1). Se determinó la diferenciación genética de la población cautiva respecto a las poblaciones silvestres, y se evaluó la pertinencia de utilizar esta población para propósitos de reintroducción. Además, se realizaron análisis de correlación para determinar si el tamaño de la colonia o la conectividad afectan los niveles de variación genética presentes en las colonias silvestres.

2. Materiales y métodos

2.1 *Cynomys mexicanus*

Los perros llaneros mexicanos son una especie endémica al Altiplano Mexicano que ocupa los pastizales gipsófilos localizados en los valles intermontanos de una región de 477 km² de los estados de Nuevo León, Coahuila y San Luis Potosí (Treviño-Villarreal y Grant 1998; Scott-Morales et al. 2005). Esta área es considerada como Región Terrestre Prioritaria y Área de Importancia para la Conservación de las Aves de México (Hernández-Gómez et al. 2009).

Los perros llaneros son considerados especies clave e ingenieros ecosistémicos (Slobodchikoff et al. 2009). Sin embargo, para 1998 la distribución de esta especie se había reducido en un 62% debido a los cambios en el uso de suelo, el sobrepastoreo y la sequía (Ceballos et al. 1993; Treviño-Villarreal y Grant 1998; Estrada-Castillón et al. 2009; Hernández-Gómez et al. 2012). Las poblaciones que se encontraban en Zacatecas están extintas actualmente, y en San Luis Potosí ocupan sólo el 2% del área histórica reportada para el estado (Hernández-Gómez et al. 2012). González et al. (2012) reportaron que para 2012 el área ocupada por colonias de perritos en su área de distribución era de 284.2 km², alrededor del 50% del área reportada en 1998 (Treviño-Villarreal y Grant 1998). Esta especie endémica es considerada como en peligro de extinción por la Norma Ecológica Mexicana (NOM-ECOL-2010 – SEMARNAT 2010) y la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN 2014). Además, se encuentra listada en el Apéndice I del Convenio Internacional para el Comercio de Especies en Riesgo (CITES 2013 – www.cites.org).

Los perros llaneros viven en colonias que están conformadas por grupos familiares. Estos grupos familiares están constituidos por varias hembras emparentadas, 1 o 2 machos no relacionados, y sus crías. Las hembras son filopátricas y la dispersión está dada por los machos (Ceballos y Wilson 1985). La época reproductiva inicia a finales de enero y se extiende hasta finales de abril, cuando las crías emergen de las madrigueras, aunque se ha reportado cierta variación entre poblaciones (Treviño-Villarreal 1990; Mellink y Madrigal 1993; Rioja-Paradela et al. 2008). Análisis genéticos previos han reportado que los niveles de variación genética en las poblaciones silvestres de esta especie son altos y que la estructura genética de las poblaciones está influenciada por la diferenciación entre grupos familiares dentro de cada colonia (McCullough y Chesser 1987; Castellanos-Morales et al. 2015 ver capítulo 1).

2.2 Muestreo

En febrero del 2012 se obtuvieron 18 muestras (10 hembras adultas y 8 machos adultos) de una población *ex situ* de *C. mexicanus*. Los individuos muestreados representan 80% del total de la población en cautiverio en el momento del muestreo. Esta población se localiza en el Museo del Desierto, en la ciudad de Saltillo, Coahuila, México. De acuerdo con información proporcionada por el equipo del Museo del Desierto, esta población fue establecida por cinco individuos fundadores (de edad y sexo desconocido), hace aproximadamente 10 años. La población fundadora provino de una colonia localizada en el Rancho Los Ángeles (LA; -100.98W, 25.11N), Coahuila, manejada por la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (F. Toledo 2012, *com. pers.*).

Se colocaron trampas de caja, tipo tomahawk, en una cuadrícula de 4 X 5 trampas durante tres días. Las trampas fueron cebadas con una combinación de nueces y semillas proporcionadas por el Museo del Desierto. Se colectó una muestra de tejido de 1 mm tomado de la punta de la cola de cada individuo siguiendo el método descrito por Castellanos-Morales et al. (2015, ver capítulo 1) y Gutiérrez Guerrero (2014). El tejido fue almacenado en un tubo Eppendorff de 2 mL y se mantuvo a -80° C hasta la extracción del ADN.

Se registró el sexo, la edad y el peso de cada individuo capturado. Adicionalmente, se obtuvieron datos del área de la colonia (en hectáreas) y el índice de conectividad (sumatoria de la distancia entre los bordes de colonias cercanas) de las poblaciones silvestre publicados por Treviño-Villarreal y Grant (1998).

2.3 Datos genéticos

Se realizó extracción del ADN total con el Qiagen blood and tissue kit (QIAGEN Sample & Assay Technologies, Hilden, Alemania), siguiendo el protocolo provisto por el fabricante. Se amplificó la región control y el citocromo *b* del ADN mitocondrial siguiendo las condiciones reportadas por Castellanos-Morales et al. (2015, ver capítulo 1). También se amplificaron 10 loci nucleares de microsatélite diseñados por Jones et al. (2005) para *C. ludovicianus*, siguiendo las condiciones reportadas por Castellanos-Morales et al. (2014 ver apéndice 1; 2015 ver capítulo 1) y Gutiérrez-Guerrero (2014).

Se estimaron los niveles de variación genética para ambos marcadores. Se utilizó GENODIVE (Meirmans y Van Tienderen 2004) para obtener los valores de riqueza alélica (A), la heterocigosis observada (H_O) y la heterocigosis esperada (H_E) para los loci de microsatélite. Se utilizó DnaSP v5 (Librado y Rozas 2009) para obtener el número de sitios segregantes (S), el número de haplotipos (h), la diversidad haplotípica (H_d) y la diversidad nucleotídica (π) de los marcadores mitocondriales. Se compararon los datos con los valores reportados por Castellanos-Morales et al. (2015, ver capítulo 1) para 6 poblaciones silvestres (incluyendo la población fundadora).

Para explorar la relación entre los haplotipos presentes en la población cautiva y las poblaciones silvestres, se construyó un red de haplotipos colapsada (collapsed median joining network) con Network 4.6.1.1 (Fluxus-engineering 2014) utilizando el criterio de menor costo y los parámetros provistos por el programa. En este análisis se incluyeron únicamente los sitios variables y gaps. Se utilizó la opción MP para limpiar la red y se utilizó el árbol más corto.

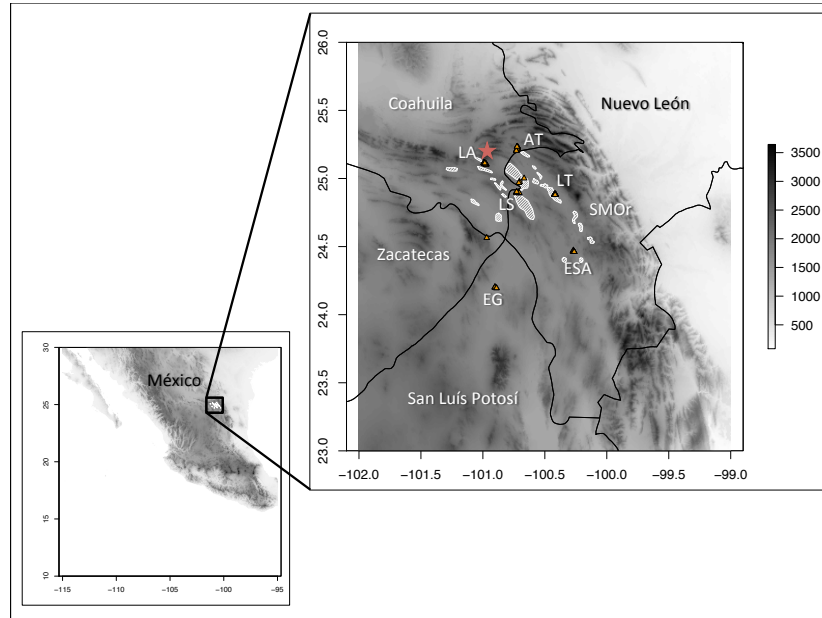


Figura 1. Distribución geográfica de *C. mexicanus* (polígono con líneas diagonales) y ubicación de las poblaciones silvestres muestreadas (triángulos naranjas). La estrella señala la población de Rancho Los Ángeles (LA), fundadora putativa del Museo del Desierto. LA: Los Ángeles; AT: Artesillas; LS: La Soledad; LT: La Trinidad; EG: El Gallo; ESA: El Salero; SMOr: Sierra Madre Oriental.

Se realizó un análisis discriminante de componentes principales (DAPC) para los loci de microsatélite y el ADN mitocondrial utilizando el paquete adegenet (Jombart 2008; Jombart y Ahmed 2011) para R v. 3.0.2 (R Core Development Team 2013). Éste es un método multivariado que resume la diferenciación genética entre grupos. Define un modelo en el que la variación genética se reparte en un componente dado por la variación contenida entre grupos y la variación dentro de los grupos, removiendo el componente de variación dentro de los grupos. Para este análisis, se retuvieron 30 componentes principales y se seleccionaron dos funciones discriminantes. Adicionalmente se realizó un análisis con Structure 2.2 (Pritchard et al. 2000), utilizando los microsatélites nucleares para determinar la poza génica a la que los individuos del Museo del Desierto eran asignados. Se implementó el modelo de admixture con frecuencias alélicas correlacionadas, sin considerar las poblaciones originales. Inicialmente, se realizó una corrida con remuestreo de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) utilizando 250000 pasos y burn-in de 50000 pasos, utilizando los datos de las poblaciones silvestres. Se realizaron 5 iteraciones para cada K (número de clusters), utilizando $K = 1 - 10$. Con esta corrida previa se revisó la convergencia de los datos. Posteriormente se realizaron dos corridas independientes con remuestreo de MCMC cada 500000 pasos y un burn-in de 100000 pasos,

utilizando 10 repeticiones para $K = 1 - 5$. Se utilizó el programa Structure Harvester (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) para determinar el valor de K a partir del valor de $\ln(P)$, seleccionando la mejor probabilidad posterior y la menor varianza entre repeticiones (Pritchard et al. 2000). Finalmente, para determinar el grupo genético al que son asignados los individuos del Museo del Desierto se realizó una corrida con los mismos parámetros, pero fijando el valor de K obtenido previamente. Alternativamente se realizó un análisis de asignación/exclusión de genotipos en el programa GENECLASS2 (Piry et al. 2004). Se utilizó el método Bayesiano de Ranala y Mountain (1997) para determinar el porcentaje de asignación de cada individuo de MD a las seis poblaciones silvestres. Este análisis tiene la ventaja de que no requiere que la población verdadera haya sido muestreada (Manel et al. 2002).

Se realizaron análisis de regresión lineal para poner a prueba la correlación entre las medidas de diversidad genética para el ADN mitocondrial (Hd y π) y los datos de microsatélites nucleares (A , H_O y H_E) reportados por Castellanos-Morales et al. (2015, ver capítulo 1), contra las medidas del área de la colonia y el índice de conectividad reportados por Treviño-Villarreal y Grant (1998) con el programa R (R Core Development Team 2013). Los datos de área de la colonia e índice de conectividad fueron transformados logarítmicamente. Además, se comparó la masa corporal de los perros llaneros cautivos y de poblaciones silvestres para poner a prueba el efecto del cautiverio sobre esta medida corporal por medio de un análisis de ANOVA realizado en R (R Core Development Team 2013). En este sentido, se esperaba que los perros llaneros de cautiverio presenten mayor masa corporal que los perros llaneros silvestres, dada la disponibilidad de alimento. Finalmente, se probó si existe una correlación entre el coeficiente de endogamia (F_{IS}) individual y la masa corporal de cada individuo adulto. Se obtuvo el coeficiente de endogamia individual con el paquete adegenet para R y se realizó una regresión lineal, también con R, contra el logaritmo del peso de los individuos adultos.

3. Resultados

3.1 Datos genéticos

Se encontró un total de 35 alelos en la población de cautiverio (2 – 6 alelos por locus). La riqueza alélica fue de 3.5 alelos por locus y, el locus C116 resultó monomórfico para el Museo del Desierto (MD). Únicamente el locus A119 presentó un alelo (115) que no fue reportado para las poblaciones silvestres (ver capítulo 1). La heterocigosis esperada ($H_E = 0.52$) fue diferente que la heterocigosis observada ($H_O = 0.486$), pero esta diferencia no fue significativa ($F_{IS} = 0.065$; $P = 0.115$).

Para el ADN mitocondrial se obtuvieron secuencias concatenadas de 1928 pb para 16 muestras. Se encontraron 3 haplotipos definidos por dos sitios segregantes (sitios 63 y 1945). El haplotipo más

abundante (A) fue encontrado en 43.75% de los individuos muestreados, el segundo haplotipo (B) se encontró en 31.25% y el tercero (C) en 25% de los individuos muestreados. La diversidad haplotípica (H_d) fue 0.692 ± 0.059 (d.s.) y la diversidad nucleotídica (π) fue de 0.0005.

En la red de haplotipos colapsada (Fig. 2), se observan 16 haplotipos distintos. Los haplotipos A y B de la población MD fueron colapsados en un solo haplotipo (CM3), el cual está presente en todas las colonias. El haplotipo C (sco1 en Fig. 2) está presente en la colonia fundadora LA (morado) y se encuentra cercanamente relacionado con la colonia ESA (naranja).

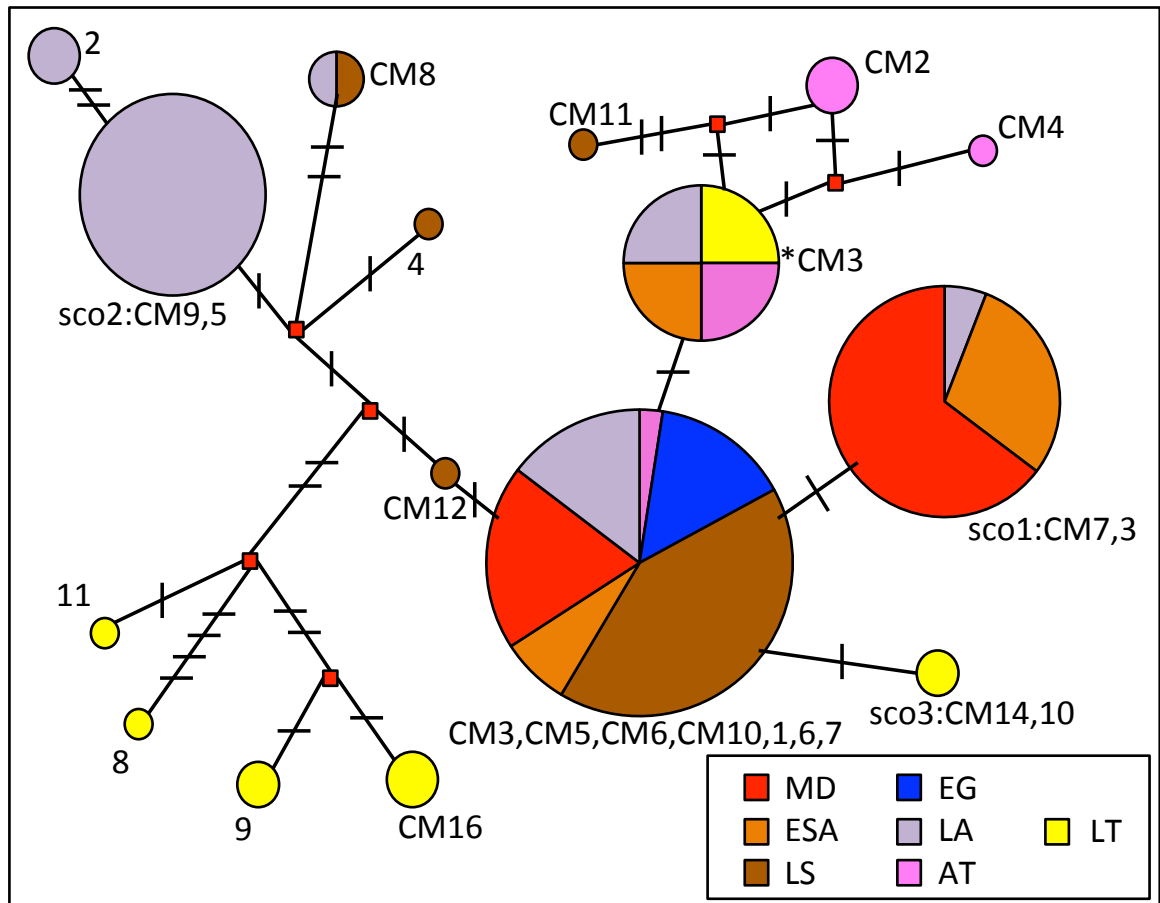


Figura 2. Red de haplotipos colapsada obtenida con el programa Network 4.6.1.1. Se incluyeron únicamente los sitios segregantes y gaps. El tamaño del pie es proporcional a la frecuencia de cada haplotipo y los colores identifican cada una de las poblaciones muestreadas: EG: azul, AT: rosa, ESA: naranja, LT: amarillo, LS: café, LA: lila y MD: rojo. La identidad de los alelos corresponde con la Tabla S2 (Material Suplementario).

El análisis discriminante de componentes principales (DAPC) para los datos de microsatélite determinó que LT y LS son las colonias más parecidas, en términos de frecuencias alélicas (Fig. 3a).

La población MD se sobrepone parcialmente a los datos de la colonia Los Ángeles (LA, la presunta población fundadora), mientras el resto de las poblaciones silvestres se encuentran bien diferenciadas de LA y MD. El mismo análisis realizado para el ADN mitocondrial separó la colonia EG (localizada en el área más sureña de la distribución de la especie en el estado de San Luis Potosí, México) del resto de las colonias (Fig. 1 y 3b).

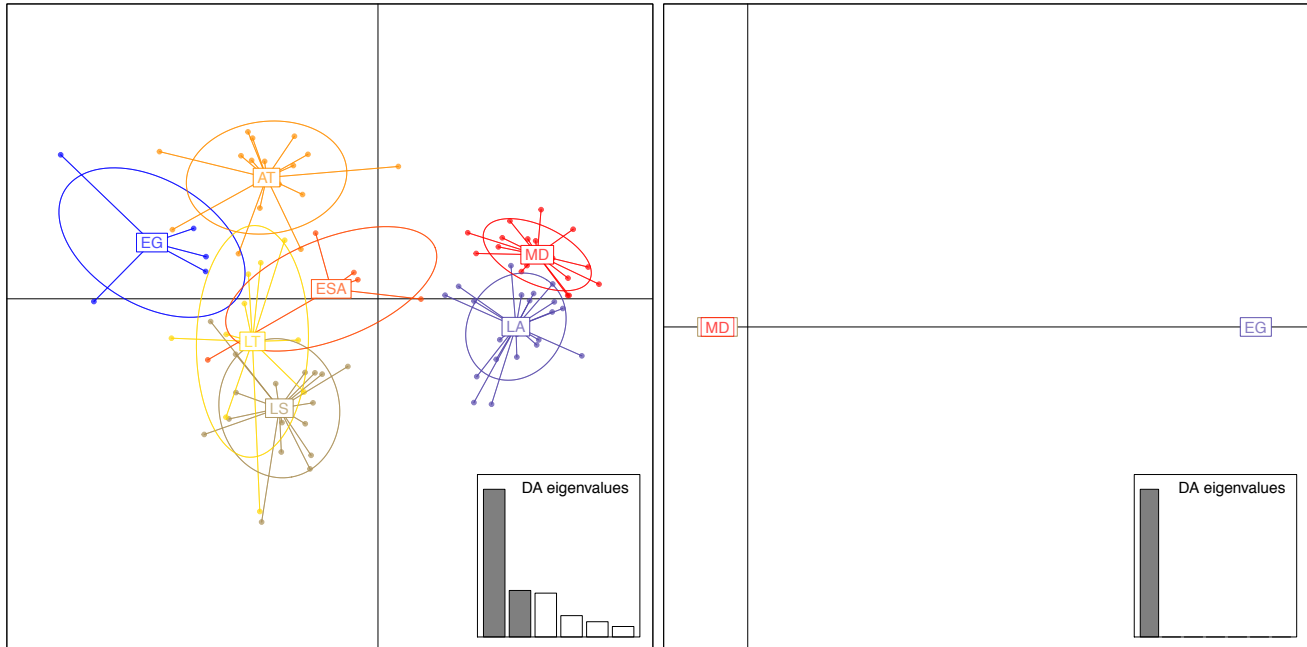


Figura 3. Análisis discriminante de componentes principales (DAPC) para a) 10 loci de microsatélite y b) mtADN, realizado para 6 poblaciones silvestres (EG: azul, AT: mandarina, ESA: naranja, LT: amarillo, LS: café y LA: púrpura) y una población en cautiverio (MD en rojo).

De acuerdo con el análisis de Structure 2.2, el mejor agrupamiento genético para las poblaciones silvestres corresponde a un valor de $K = 2$ (Fig. 4a). En este análisis se observa que todas las colonias excepto LA se agrupan dentro del mismo cluster. En el análisis posterior los individuos de la población cautiva (MD) se agruparon con los individuos de LA (Fig. 4b). Sin embargo, en el análisis de asignación/exclusión de individuos se observa que 9 de los 18 individuos muestreados en MD fueron asignados con alta probabilidad ($> 99\%$) a la supuesta población fundadora (LA). Un individuo fue asignado a ESA y los individuos restantes no fueron asignados a alguna de las poblaciones silvestres muestreadas (Fig. 5).

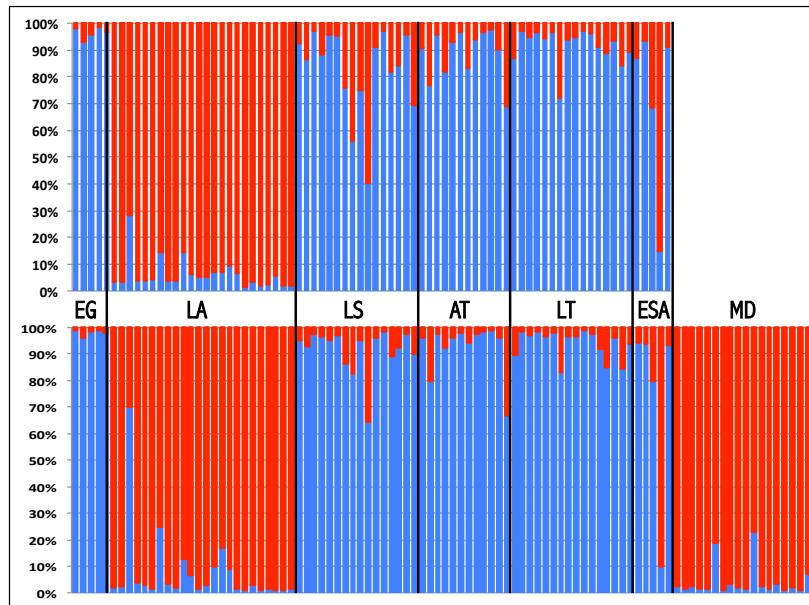


Figura 4. Histograma para $K = 2$ obtenido a partir de asignación de individuos realizado con Structure 2.2. Se incluyeron en el análisis inicial (arriba) seis poblaciones silvestres (LA, LS, AT, LT, ESA y EG) y en un análisis posterior (abajo) se agregó a la población en cautiverio (MD).

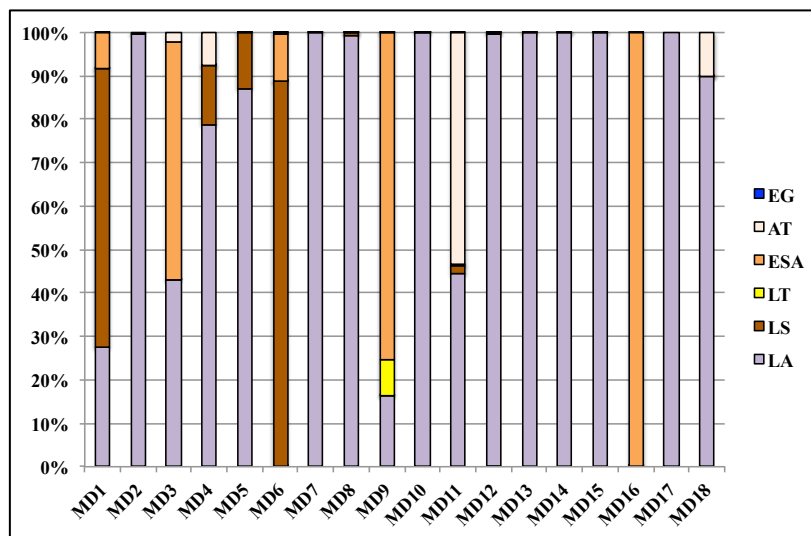


Figura 5. Histograma representando el resultado del análisis de asignación/exclusión de los individuos de MD realizado con GENECLASS2 (Piry et al. 2004). Se consideró a las seis poblaciones silvestres muestreadas, incluyendo la supuesta población fundadora (LA, morado).

Al analizar la correlación entre el área de la colonia silvestres y la conectividad de las mismas (Treviño-Villarreal y Grant 1998) contra los niveles de variación genética reportados para estos sitios (Castellanos-Morales et al. 2015, ver capítulo 1), observamos que la mayoría de las correlaciones no

fueron significativas (Material Suplementario Tabla S1). Las correlaciones que sí resultaron significativas fueron la del área de la colonia de las colonias silvestres reportados por Treviño-Villarreal y Grant (1998) con las heterocigosis observada ($P = 0.04$) y esperada ($P = 0.008$) (Fig. 6).

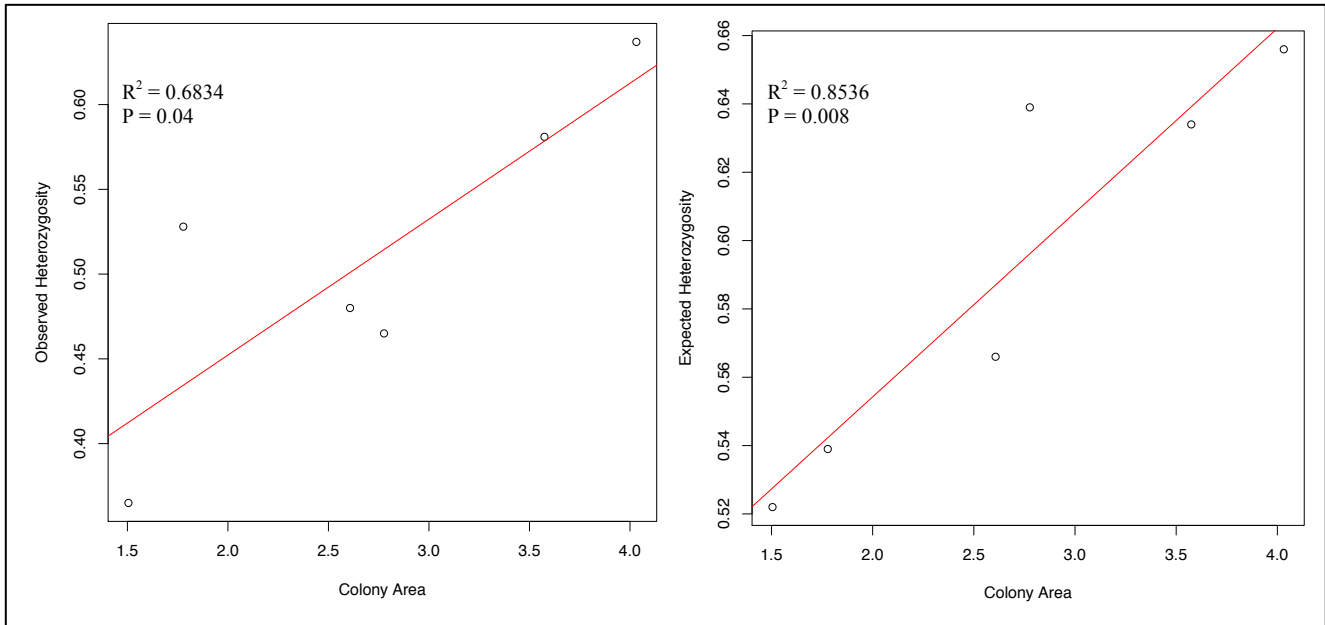


Figura 6. Regresiones lineales entre heterocigosis observada (derecha) y heterocigosis esperada (izquierda) presente en las poblaciones silvestres contra el logaritmo del área de la colonia reportada por Treviño-Villarreal y Grant (1998).

Por otra parte, la diferencia en la masa corporal entre machos y hembras adultos no fue estadísticamente distinta ($P = 0.289$). La masa corporal de los machos adultos entre las poblaciones fue marginalmente no significativa ($P = 0.053$), pero la diferencia en la masa corporal de las hembras adultas fue altamente significativa ($P = 0.000019$). Las colonias que presentaron diferencias significativas fueron EG, LA y MD (Fig. 7). Finalmente, no se encontró una correlación ($P = 0.8457$) entre la masa corporal de los individuos adultos y su coeficiente de endogamia ($F_{IS} = 0.102 - 0.568$).

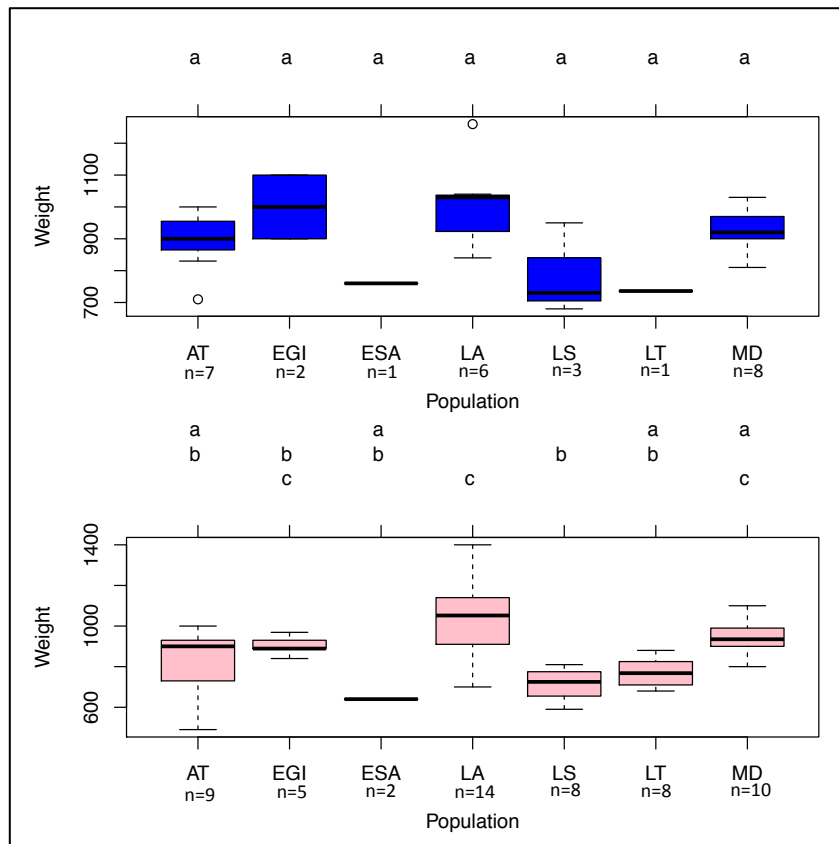


Figura 7. Gráficos de caja para los registros de masa corporal para perros llaneros machos (azul) y hembras (rosa) adultos de las poblaciones silvestres y de cautiverio. Las letras arriba de cada gráfico denotan las diferencias entre poblaciones de acuerdo a una prueba de Tukey realizada en R (paquete multcomp). La línea gruesa denota la mediana por colonia, la caja señala los cuartiles al 25% y al 75%, las barras indican los valores máximos y mínimos y, los círculos indican los outliers.

4. Discusión

Contrario a lo esperado, los niveles de variación genética de la población del Museo del Desierto (MD) fueron intermedios respecto a los reportados para las poblaciones silvestres de *C. mexicanus* para microsatélites nucleares ($A = 2.8 - 5.2$; $H_O = 0.365 - 0.637$; $H_E = 0.522 - 0.656$; Castellanos-Morales et al. 2015, ver capítulo 1) y ADN mitocondrial ($Hd = 0.4 - 0.844$; $\pi = 0.0003 - 0.0018$; Castellanos-Morales et al. 2015, capítulo 1). Niveles de variación genética similares entre poblaciones cautivas y silvestres también han sido reportadas para el panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*; Shan et al. 2014) y el gorila del oeste (*Gorilla gorilla*; Soto-Calderón et al. 2015). Estos resultados coinciden con

el reporte de que el 55% de las especies en cautiverio retienen suficiente variación genética (Lees y Wilken 2009).

El ADN mitocondrial se ha utilizado previamente para asignar las poblaciones de origen de las poblaciones en cautiverio (Soto-Calderón et al. 2015). En este sentido, para MD la presencia de 3 haplotipos distintos sugiere el uso de al menos 3 hembras fundadoras que portaban haplotipos cercanamente relacionados. La topología de la red de haplotipos colapsada es ligeramente distinta a la publicada previamente por Castellanos-Morales et al. (2015, ver capítulo 1), estas diferencias se deben particularmente a que al excluir de la alineación las secuencias de *C. mexicanus* con sitios faltantes, se consideraron sitios segregantes en la secuencias que habían sido excluidos previamente. Se obtuvo un total de 24 haplotipos para las poblaciones silvestres; entre estos se recuperaron 13 de los 16 haplotipos reportados previamente (los individuos portadores del haplotipo CM1 fueron removidos del análisis ya que presentan alto porcentaje de datos faltantes y, el haplotipo CM15 fue subdividido). Se detectaron 11 haplotipos nuevos (presentes en las colonias AT, LA, LS y LT) (Material Suplementario Tabla S2). El haplotipo A coincide con el haplotipo más común en las poblaciones silvestres: CM3 (GeneBank accession number KP217128 reportado en Castellanos-Morales et al. 2015; ver capítulo 1), mientras que el haplotipo B no había sido previamente reportado y no se encontró en las poblaciones silvestres. El haplotipo C es un haplotipo nuevo que se encontró en LA en muy baja frecuencia ($n = 1$); de acuerdo con la red de haplotipos este haplotipo está cercanamente relacionado con el haplotipo CM7 presente en ESA (GeneBank accession number KP217132 reportado en Castellanos-Morales et al. 2015; ver capítulo 1). Los datos coinciden con lo reportado previamente por Gutiérrez Guerrero (2014) para 9 microsatélites nucleares y la región control del ADN mitocondrial. Además, dos de los tres haplotipos presentes en MD también se encuentran en la población fundadora putativa (LA), lo cual coincide con la información proporcionada por el Museo del Desierto. Sin embargo, que CM3 sea el haplotipo más ampliamente distribuido en las colonias silvestres y, que el haplotipo B no se encontró en las poblaciones silvestres, sugiere que los datos no son concluyentes en términos de la asociación entre los haplotipos de la población cautiva (MD) y la posible población fundadora (LA).

Witzenberger y Hochkirch (2011) sugirieron que para retener la variación genética y reducir la endogamia, las poblaciones cautivas deben ser fundadas con varios individuos (al menos 15) provenientes de distintas poblaciones y no deben estar dominados por un número pequeño de linajes. De acuerdo con los datos provistos por el Museo del Desierto, la población cautiva fue fundada con cinco individuos, hace aproximadamente 10 años (alrededor de cinco generaciones). El bajo número de fundadores incrementaría el efecto de la deriva génica y la endogamia que se vería reflejado en bajos niveles de variación genética. La presencia de sólo tres haplotipos mitocondriales cercanamente

relacionados y un locus de microsatélite nuclear que resultó monomórfico (C116) son señales del cuello de botella por el que atravesó esta población al momento de su fundación. Sin embargo, el tiempo transcurrido desde el mismo puede no ser suficiente para detectar un efecto mayor de la deriva génica y la endogamia sobre la heterocigosis. En este sentido, para microsatélites nucleares, se espera que la pérdida de alelos sea más rápida que la pérdida de heterocigosis después de un cuello de botella (Cornuet y Luikart 1996). Además, los niveles de heterocigosis y el coeficiente de endogamia de la población cautiva dependen en gran medida de la variabilidad genética y el coeficiente de endogamia presentes en la población fundadora (Liu et al. 2014), de manera que los niveles de diversidad genética para los diez loci nucleares y el ADN mitocondrial podrían sugerir que la población MD (1) fue fundada con más de cinco individuos (Gutiérrez-Guerrero 2014); (2) que los individuos fundadores provenían de distintos grupos familiares; (3) e incluso provenían de distintas poblaciones (Gutiérrez-Guerrero 2014), lo cual incrementaría la variación en la poza génica fundadora y reduciría el efecto fundador asociado al origen de esta población; o (4) que la población haya crecido rápidamente, reduciéndose así la pérdida de variación genética (Lees y Wilken 2009).

Por otra parte, el coeficiente de endogamia ($F_{IS} = 0.065$) en MD resultó menor que el reportado en algunas poblaciones silvestres [tal como LT ($F_{IS} = 0.084$), ESA (0.272) y EG (0.301)] e incluso, que en la población fundadora ($F_{IS} = 0.121$ en LA). Lo cual sugiere que los apareamientos son aleatorios, o bien hay mecanismos conductuales que promueven la exogamia como los reportados en *C. ludovicianus* (Hoogland 1982, 1996; Foltz y Hoogland 1983; Dobson et al. 1997, 1998). Este resultado es consistente con lo reportado para poblaciones cautivas de panda gigante (Shan et al. 2014) y se ajusta a la noción de que el manejo genético de las poblaciones en cautiverio debería conducirse de manera que se minimice la endogamia y se reduzca la pérdida de diversidad genética (Witzenberger y Hochkirch 2011; Liu et al. 2014).

Los análisis de DAPC y Structure sugieren que la supuesta población fundadora, colonia LA, se encuentra diferenciada del resto de las colonias para los microsatélites nucleares y puede estar parcialmente aislada por la Sierra Madre Oriental (Fig. 1). Las colonias LS y LT están cercanamente relacionadas. Este resultado es consistente con reportes de fragmentación reciente de las colonias grandes de esta zona del área de distribución de la especie (Treviño-Villarreal y Grant 1998). Las colonias AT, EG y ESA están parcialmente diferenciadas y pudieron haber presentado distintos grados de aislamiento durante distintos periodos de tiempo (Treviño-Villarreal y Grant 1998). Esta idea es corroborada por la falta de aislamiento por distancia reportado por Castellanos-Morales et al. (2015, ver capítulo 1) y, esta información debe ser considerada al realizar planes de reintroducción o translocación entre colonias. Ignorar la diferenciación genética presente entre las poblaciones podría promover la

mezcla de distintas pozas génicas y, en el extremo, promover una disminución en la adecuación relacionada con la depresión por exogamia (Laikre et al. 2010; Brandt et al. 2014).

La población MD se sobrepone parcialmente a LA, lo cual sugiere que las frecuencias alélicas en estas poblaciones son similares (Fig. 2). Este resultado refuerza la hipótesis de que los fundadores de MD representan un subconjunto de la diversidad genética presente en la población fundadora (LA). Idea que es corroborada por el resultado del análisis de Structure (Fig. 4). Sin embargo, el análisis de asignación/exclusión (GENECLASS2; Fig. 5) sugiere que algunos individuos de MD pudieron provenir de otras colonias silvestres no muestreadas. Es importante identificar el posible origen de esos fundadores por medio de la inclusión de más poblaciones silvestres en el análisis. Además, dada la diferenciación de la colonia LA, se recomienda incluir en el análisis colonias localizadas en la parte oeste del área de distribución de la especie (colonias del sur del estado de Coahuila) para determinar si hay flujo génico en esta área de la distribución de la especie.

Durante el trabajo de campo realizado en 2011 y 2013, se visitaron cinco poblaciones adicionales a las reportadas por Castellanos-Morales et al. (2015, ver capítulo 1): dos de Coahuila [ejido La India (LI: -101.23W, 25.06N) y Gómez Farías (GF: -101.06W, 24.96N)] y tres de San Luis Potosí [El Salado y El Salado I (ES: -100.75W, 24.37N y ESI: -100.79W, 24.27N,) y Tanque de López (TL: -100.67W, 24.27N)]. En estos sitios no se detectó la presencia de perros llaneros mexicanos (ES y TL) o las densidades observadas fueron muy bajas (LI, GF y ESI). Esto resultó en que los esfuerzos de captura fueran infructuosos y sugieren que en el futuro puede haber declives importantes en las poblaciones de esta especie en peligro, así como mayor fragmentación del hábitat. Entre 1999 y 2003 se registraron cambios importantes en la vegetación en dos de tres áreas naturales protegidas de Nuevo León (La Trinidad, La Hediondilla y La Soledad) (Hernández-Gómez et al. 2012). Estos cambios se relacionan principalmente con el sobrepastoreo, la agricultura y la sequía (Hernández-Gómez et al. 2012). Por lo tanto, esta especie no sólo debe ser prioritaria para la conservación, sino que se debe evaluar los sitios potenciales para la reintroducción o translocación de individuos, considerando su permanencia a mediano y largo plazo.

Los índices de correlación sugieren que el área de las colonias silvestres es importante para la retención de variación genética. De manera que se debe fomentar la protección de las colonias grandes y frenar el cambio del uso de suelo en estas áreas. Afortunadamente, la colonia de mayor tamaño (LS), que posee alta variación genética (5 haplotipos, $H_d = 0.556$, $A = 5.2$, $H_o = 0.637$ y $H_E = 0.656$; Castellanos-Morales et al. 2015, ver capítulo 1), está ubicada en el llano de La Soledad. Esta zona es un área natural protegida y representa el sitio donde se registró menor pérdida de vegetación entre 1999

y 2003 (Hernández-Gómez et al. 2012). Por lo tanto, es imperativo continuar protegiéndola, además de mitigar la pérdida de hábitat en otras colonias con alta variación como LT.

Por otra parte, no se detectaron diferencias significativas en relación a la masa corporal de los machos adultos. En contraste, la masa corporal de las hembras adultas fue significativamente distinta entre las colonias MD, LA y EG, y el resto de las colonias muestreadas. No se encontró correlación entre el coeficiente de endogamia y la masa corporal de los individuos. Contrario a lo esperado, estos resultados sugieren que las diferencias pueden estar relacionadas con el origen de los individuos fundadores y no con el cautiverio. Es recomendable determinar si existen diferencias significativas en otras medidas morfométricas, como la longitud del cuerpo y, en caso de encontrarlas, evaluar si éstas se correlacionan con la calidad del hábitat o son resultado de la depresión por endogamia en la población cautiva.

Witzenberger y Hochkirch (2011) sugirieron que los programas de crianza en cautiverio deberían enfocarse en la conservación de poblaciones en cautiverio sanas que sean similares genéticamente y en comportamiento con sus contrapartes silvestres. Los niveles de diversidad genética encontradas en MD sugieren que esta población es sana y podría ser utilizada para reintroducción a la vida silvestre [ver posibles lineamientos de manejo para la reintroducción detallados en Gutiérrez-Guerrero (2014); también ver Shier (2006), Hale et al. (2013) y Long (2013)]. Sin embargo, es necesario promover el manejo de esta población *ex situ* para mitigar la pérdida de diversidad genética asociada a la vida en cautiverio (p.e., introducción de individuos provenientes de otras poblaciones silvestres o individuos confiscados; ver Gutiérrez-Guerrero 2014; Rodríguez-Clark y Sánchez-Mercado 2006; Lees y Wilken 2009).

El tamaño censal de la población MD es bajo para fines de reintroducción (~ 35 individuos) y no garantiza que todos los individuos usados para reintroducción provengan de esta población. Para la especie hermana, *C. ludovicianus*, se ha planteado que para incrementar la probabilidad de éxito de reintroducción es necesario contar con 60 a 100 individuos [que constituyan de 15 a 20 grupos familiares completos (Shier 2006)]. Un subconjunto de los individuos considerados para reintroducción deberían provenir de colonias que sean similares genéticamente (LA). Alternativamente, se pueden establecer nuevas poblaciones con individuos provenientes de colonias con altos niveles de variación genética [p.e., translocación de individuos provenientes de las colonias La Trinidad y La Soledad, que presentan una composición genética similar y se encuentran ubicadas en áreas naturales protegidas (Hernández-Gómez et al. 2012)]. Además, es necesario realizar estudios de conducta con los perritos llaneros mexicanos del Museo del Desierto para determinar posibles desviaciones en el comportamiento de los individuos de esta población que puedan afectar el éxito de

reintroducción (p.e., falta de respuesta a depredadores; Jule et al. 2008; Liu et al. 2014). En caso de detectar adaptación conductual al cautiverio será necesario implementar un plan de manejo que permita reacondicionar a los individuos para la vida silvestre.

Finalmente, se requiere realizar análisis de proyección de nicho para evaluar la persistencia de las poblaciones silvestres a mediano y largo plazo. Esta aproximación permitirá seleccionar sitios candidatos para la reintroducción o translocación de individuos, así como detectar poblaciones silvestres en riesgo de desaparecer por efecto del cambio climático. Una vez seleccionados los sitios potenciales para reintroducción y translocación, se deberá realizar una evaluación *in situ* de la disponibilidad y calidad del hábitat en estos sitios. Además, proponemos realizar un estudio con enfoque genómico que permita relacionar la presencia de diferenciación genética a nivel genómico asociada a adaptaciones locales en las distintas poblaciones de esta especie [p.e., adaptación a distintos concentraciones de yeso y carbonato de calcio en el suelo (Pando-Moreno et al. 2013)], con la finalidad de identificar y proteger las poblaciones poseedoras de potencial adaptativo particular. Una vez realizada la reintroducción es necesario conducir análisis de monitoreo genético para detectar señales de depresión por endogamia y determinar si es necesario realizar nuevas reintroducciones o translocaciones que mitiguen la pérdida de variación relacionado con tamaños efectivos poblacionales pequeños y permitir la permanencia de estas poblaciones en el mediano y largo plazo (Hedrick 1995; Vilà et al. 2002; Jule et al. 2008; Soorae 2013; Johnson et al. 2010; Liu et al. 2014).

Agradecimientos

Este manuscrito es presentado por G. Castellanos-Morales como un requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas en el Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. G. C. obtuvo una beca doctoral proporcionada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. Becario 210544). Este estudio fue financiado por el presupuesto operativo asignado L. E. E. del Instituto de Ecología, UNAM. Gracias a las autoridades del Museo del Desierto, Coahuila por otorgar el permiso para la toma de muestras de la población cautiva y su apoyo durante el trabajo de campo, en especial a F. Toledo y G. Martínez. Agradecimiento especial a los comisariados de los ejidos en los que se desarrollo el trabajo de campo por otorgar los permisos para llevar a cabo los muestreos y a los miembros de ProFauna y de la Secretaría del Medio Ambiente del Estado de Coahuila que nos apoyaron durante el trabajo de campo. Al Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Instituto de Ecología, UNAM, L. Espinosa Asuar, E. Aguirre Planter, S. Barrientos, M. Rosas Barrera, P. Padilla, V. Souza, J. Aguirre, E. Rivera Tellez, D. Torres Orozco y A. Moreno-Letelier.

Referencias

- Brandt JR, Brandt AL, Ammer FK, Roca AL, Serfass T. 2014. Impact of population expansion on genetic diversity and structure of river otters (*Lontra canadensis*) in central North America. *Journal of Heredity* 105:39-47.
- Briscoe DA, Malpica JM, Robertson A, Smith GJ, Frankham R, Banks RG, Baker JSF. 1992. Rapid loss of genetic variation in large captive populations of *Drosophila* flies: implications for the genetic management of captive populations. *Conservation Biology* 6: 416-425.
- Castellanos-Morales G, Gasca-Pineda J, Ceballos G, Ortega J. 2014. Genetic variation in a peripheral and declining population of black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) from Mexico. *Journal of Mammalogy* 95:467-479.
- Castellanos-Morales G, Ortega J, Castillo-Gómez R, Sackett L, Eguiarte LE. 2015. Genetic variation and structure in contrasting geographic distributions: widespread versus restricted black-tailed prairie dogs (subgenus *Cynomys*). *Journal of Heredity* 106:478-490.
- Ceballos G, Mellink E, Hanebury LR. 1993. Distribution and conservation status of prairie dogs *Cynomys mexicanus* and *Cynomys ludovicianus* in Mexico. *Biological Conservation* 63:105-112.
- Ceballos G, Wilson DE. 1985. *Cynomys mexicanus*. *Mammalian Species* 248:1-3.
- Cornuet JM, Luikart G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001-2014.
- Dobson FS, Chessler RK, Hoogland JL, Sugg DW, Foltz DW. 1997. Do black-tailed prairie dogs minimize inbreeding? *Evolution* 51:970-978.
- Dobson FS, Chessler RK, Hoogland JL, Sugg DW, Foltz DW. 1998. Breeding groups and gene dynamics in a socially structured population of prairie dogs. *Journal of Mammalogy* 79:671-680.
- Fischer J, Lindenmayer DB. 2000. An assessment of the published results of animal relocations. *Biological Conservation*. 96: 1-11.
- Fluxus-engineering. 2014. Network 4.6.1.1. [citado el 15 de febrero de 2015]. Disponible en: http://www.fluxus-engineering.com/share.net_rn.htm.
- Foltz DW y Hoogland JL. 1983. Genetic evidence of outbreeding in the black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*). *Evolution* 37:273-281.
- Frankham R. 2010. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological Conservation* 149:1919-1927.

- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2004. A primer of conservation genetics. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Gippoliti S, Amori G. 2007. Beyond threatened species and reintroduction: establishing priorities for conservation and breeding programmes for European rodents in zoos. *International Zoo Yearbook* 41: 194-202.
- González DU, Estrada E, Cantú C. 2012. Análisis de fragmentación en colonias del perrito llanero mexicano (*Cynomys mexicanus*). *Ciencia UANL* 57: 43- 49.
- Griffith B, Scott JM, Carpenter JW, Reed C. 1989. Translocation as a species conservation tool: status and strategy. *Science* 245: 477-480.
- Gutiérrez-Guerrero Y. 2014. Efecto del cautiverio sobre la diversidad genética de una población de perrito de la pradera Mexicano (*Cynomys mexicanus*). Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Hale SL, Koprowski JL, Hicks H. 2013. Review of the black-tailed prairie dog reintroduction strategies and site selection: Arizona reintroduction. Pp 310-315 en *Merging science and management in a rapidly changing world: biodiversity and management of the Madrean Archipelago III* (Gottfried et al. comps). USDA Forest Service Proceedings RMRS-P-67.
- Hedrick PW. 1995. Gene flow and genetic restoration: the Florida panther as a case study. *Conservation Biology* 9: 996-1007.
- Hernández-Gómez MA, Valdéz-Reyna J, Villarreal-Quintanilla JA, Hernández-Javalera II. 2012. Análisis multitemporal del cambio de uso de suelo y vegetación en las áreas naturales protegidas con perrito llanero Mexicano (*Cynomys mexicanus* Merriam) en el Estado de Nuevo León, México. *Agraria* 9: 63-72.
- Hoogland JL. 1982. Prairie dogs avoid extreme inbreeding. *Science* 215:1639-1641.
- Hoogland JL. 1996. *Cynomys ludovicianus*. *Mammalian Species* 535:1-10.
- Johnson WE, et al. 2010. Genetic restoration of the Florida Panther. *Science* 329: 1641-1645.
- Jombart T. 2008. Adegnet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24:1403-1405. doi: 10.1093/bioinformatics/btn129.
- Jombart T, Ahmed I. 2011. Adegnet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics* doi: 10.1093/bioinformatics/btr521.
- Jombart T, Devillard S, Balloux F. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC genetics* 11: 94.

- Jones RT, Martin AP, Mitchell AJ, Collinge SK, Ray C. 2005. Characterization of 14 polymorphic microsatellite markers for the black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*). *Molecular Ecology Notes* 5:71-73.
- Jule KR, Leaver LA, Lea SEG. 2008. The effects of captive experience on reintroduction survival in carnivores: a review and analysis. *Biological Conservation* 141: 355-363.
- Laikre L, Schwartz MK, Waples RS, Ryman N, The GeM Working Group. 2010. Compromising genetic diversity in the wild: unmonitored large-scale release of plants and animals. *Trends in Ecology and Evolution* 25:520-529.
- Lascuráin M, List R, Barraza L, Díaz Pardo E, Gual Sill F, Maunder M, Dorantes J, Luna VE. 2009. Conservación de especies *ex situ*. En *Capital natural de México*, vol. II: *Estado de conservación y tendencias de cambio*. CONABIO, México.
- Lees CM, Wilken J. 2009. Sustaining the ark: the challenges faced by zoos in maintaining viable populations. *International Zoo Yearbook* 43: 6-18.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452.
- Liu G, Shafer ABA, Zimmermann W, Hu D, Wang W, Chu H, Cao J, Zhao C. 2014. Evaluating the reintroduction Project of Przewalski's horse in China using genetic and pedigree data. *Biological Conservation* 171: 288-298.
- Long D. 2013. Restoration of black-tailed prairie dogs to Vermejo Park Ranch, New Mexico, USA. En *Global re-introduction perspective: 2013* (Soorae PS ed.). IUCN Re-introduction Specialist Group. Pp 210-214.
- Manel S, Berthier P, Luikart G. 2002. Detecting wildlife poaching: identifying the origin of individuals with Bayesian assignment tests and multilocus genotypes. *Conservation Biology* 16:650-659.
- Mathews F, Orros M, McLaren G, Gelling M, Foster R. 2005. Keeping fit on the ark: assessing the suitability of captive-bred animals for release. *Biological Conservation* 121: 569-577.
- Maschinski J, Wright SJ, Koptur S, Pinto-Torres EC. 2013. When is local de best paradigm? Breeding history influences conservation reintroduction survival and population trajectories in times of extreme climate events. *Biological Conservation* 159: 277-284.
- May SE, Medley KA, Johnson SA, Hoffman EA. 2011. Combining genetic structure and ecological niche modeling to establish units of conservation: a case study of an imperilled salamander. *Biological Conservation* 144:1441-1450.
- Meirmans PG, Van Tienderen PH. 2004. GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity for asexual organisms. *Molecular Ecology Notes* 4:792-794.

- Mellink E, Madrigal H. 1993. Ecology of the Mexican prairie dogs, *Cynomys mexicanus*, in El Manantial, northeastern Mexico. *Journal of Mammalogy* 74: 631-635.
- Montgomery ME, Ballou JD, Nurthen RK, England PR, Briscoe DA, Frankham R. 1997. Minimizing kinship in captive breeding programs. *Zoo Biology* 16: 377-389.
- Pando-Moreno M, Reyna L, Scott L, Jurado E. 2013. Caracterización del suelo en colonias de *Cynomys mexicanus* Merriam, 1892 en el noroeste de México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 4: 98-105.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A. 2004. GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* 95:536-539.
- Pritchard JK, Stephens M, Connelly D. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Pritchard DJ, Fa JE, Oldfield S, Harrop SR. 2011. Bring the captive closer to the wild: redefining the role of ex situ conservation. *Orix* 46:18-23.
- R Core Development Team. 2013. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>
- Ranala B, Mountain JL. 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 94:9197-9221.
- Rioja-Paradela TM, Scott-Morales LM, Cotera-Correa M, Estrada-Castillón E. 2008. Reproduction and behavior of the Mexican prairie dog (*Cynomys mexicanus*). *The Southwestern Naturalist*, 53: 520-523.
- Robert A. 2009. Captive breeding genetics and reintroduction success. *Biological Conservation* 142:2915-2922.
- Rodríguez-Clark KM, Sánchez-Mercado A. 2006. Population management of threatened taxa in captivity within their natural ranges: Lessons from Andean bears (*Tremarctos ornatus*) in Venezuela. *Biological Conservation* 129:134-148.
- Scott-Morales L, Estrada E, Chávez-Ramírez F, Cotera M. 2004. Continued decline in geographic distribution of the Mexican prairie dog (*Cynomys mexicanus*). *Journal of Mammalogy* 85:1095-1101.
- Shan L, Hu Y, Zhu L, Yan L, Wang C, Li D, Jin X, Zhang C, Wei F. 2014. Large-scale genetic survey provides insight into the captive management and reintroduction of Giant Pandas. *Molecular Biology and Evolution* 31: 2663-2671.
- Shier DM. 2006. Effect of family support on the success of translocated black-tailed prairie dogs. *Conservation Biology* 21: 1780-1790.

- Slobodchikoff CN, Perla BS, Verdolin JL. 2009. *Prairie dogs: communication and community in an animal society*. Cambridge [MA]: Harvard University Press.
- Soorae PS. 2013. *Global re-introduction perspective: 2013*. IUCN Re-introduction Specialist Group.
- Soto-Calderón ID, Dew JL, Bergl RA, Jensen-Seaman MI, Anthony NM. 2015. Admixture between historically isolated mitochondrial lineages in captive western gorillas: recommendations for future management. *Journal of Heredity* 2015: 310-314, doi:10.1093/jhered/esv006.
- Treviño-Villarreal J. 1990. The annual cycle of the Mexican prairie dog (*Cynomys mexicanus*). *Occasional Papers of the Museum of Natural History, University of Kansas* 79: 1273-1287.
- Treviño-Villarreal J, Grant WE. 1998. Geographic range of the endangered Mexican prairie dog (*Cynomys mexicanus*). *Journal of Mammalogy* 79:1273-1287.
- Vilà C, et al. 2002. Rescue of a severely bottlenecked Wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270: 91-97.
- WORLD ASSOCIATION OF ZOOS & AQUARIUMS, WAZA. 2005. *Building a future for wildlife. The World Zoo and Aquarium Conservation Strategy*. WAZA Executive Office, Bern Suiza.
- Witzenberger KA, Hochkirch A. 2011. Ex situ conservation genetics: a review of molecular studies on the genetic consequences of captive breeding programmes for endangered animal species. *Biodiversity Conservation* 20, 184-1861.
- Wolf CM, Griffith B, Reed C, Temple S. 1996. Avian and mammalian translocations: update and reanalysis of 1987 survey data. *Conservation Biology* 10: 1142-1154.

Material Suplementario

Tabla S1. Índices de correlación (r^2) obtenidos con R (R Development Core Team) para varias regresiones lineales y sus valores de significancia (P). Se incluyeron en el análisis únicamente las seis poblaciones silvestres. Los valores estadísticamente significativos se muestran en negritas. Área: log del área de la colonia, Conectividad: log del índice de conectividad, H_d : diversidad haplotípica, π : diversidad nucleotídica; A : riqueza alélica; H_O : heterocigosis observada; H_E : diversidad genética.

Medidas de variación genética	Área ^a		Conectividad ^a	
	r^2	P	r^2	P
H_d	0.1066	0.5276	0.5720	0.0818
π	0.00759	0.8696	0.2000	0.3739
A	0.3806	0.192	0.5280	0.1019
H_O	0.6834	0.04246	0.2521	0.3102
H_E	0.8536	0.00846	0.0004	0.9702

^a Se obtuvo el logaritmo de los datos reportados por Treviño-Villarreal y Grant (1998). El área se refiere al área que ocupa cada colonia y la conectividad es la sumatoria de las distancias entre los bordes de las colonias más cercanas.

Tabla S2. Posición de sitios segregantes en cada uno de los haplotipos reportados por Castellanos-Morales et al. (2015, ver capítulo 1), CM1 – CM16 y los haplotipos adicionales presentados en el presente capítulo (1 – 11). Se presentan al final los tres haplotipos reportados en la población del Museo del Desierto, A, B y C. Además, se presenta el número de individuos que porta cada haplotipo (n) y las colonias en las que se encuentra cada uno [colonias: Artesillas (AT), El Gallo (EG), El Salero (ESA), Los Ángeles (LA), La Soledad (LS), La Trinidad (LT) y Museo del Desierto (MD)].

Haplotipos	Sitios segregantes (pb)																								
	7	11	23	26	39	63	84	89	97	98	116	117	144	148	200	375	555	611	668	723	749	778	919	921	997
CM1	A	A	T	T	G	—	A	G	C	T	C	C	C	A	-	A	T	G	G	T	T	N	G	A	T
CM2	G	T	C	.	.	—	C	A	.	.	.	
CM3	A	C	A	.	.	.	
CM4	G	C	.	.	—	C	A	.	.	.	
CM5	G	C	A	.	.	.	
CM6	G	C	A	A	.	.	
CM7	G	C	A	.	.	.	
CM8	.	.	C	.	.	C	.	.	C	T	T	C	A	.	.	.	
CM9	G	.	.	C	T	T	G	.	.	.	C	.	.	—	.	A	.	.	.	
CM10	G	C	A	.	.	.	
CM11	G	T	—	.	A	.	.	.	
CM12	G	.	.	.	T	C	A	.	.	.	
CM13	G	.	.	T	C	T	C	A	.	.	.	
CM14	G	C	A	.	.	.	
CM15	G	G	.	T	C	T	C	.	.	—	.	A	.	.	.	
CM16	A	G	G	.	T	C	T	C	.	.	—	.	A	.	.	.	
1	G	T	C	C	C	A	.	.	
2	G	.	.	C	T	T	C	A	.	—	.	A	.	.	.	
3	G	C	A	.	.	.	
4	G	.	.	C	T	T	C	.	.	—	.	A	.	.	.	
5	.	.	.	A	.	G	A	.	C	T	.	.	
6	G	G	.	C	A	.	.	.	
7	G	G	.	C	A	.	.	.	
8	G	G	.	T	C	T	C	A	.	.	C	
9	G	G	.	T	C	T	C	.	A	—	.	A	.	.	.	

Haplotipos	Sitios segregantes (pb)																								
	7	11	23	26	39	63	84	89	97	98	116	117	144	148	200	375	555	611	668	723	749	778	919	921	997
10	G	C	.	.	—	.	A	.	.	.
11	G	G	.	T	C	T	C	A	.	C	.
MD1(A)	G	C	A	.	.	.
MD2(B)	C	C	A	.	.	.
MD3(C)	C	C	A	.	.	.

...continuación

Haplotipos	Sitios segregantes (pb)														n	colonias
	1053	1062	1180	1216	1260	1264	1265	1266	1365	1461	1521	1898	1945	1974		
CM1	C	C	T	G	T	A	T	A	C	T	T	T	A	T	0	NA
CM2	4	AT
CM3	38	AT, ESA, LA, LS, LT, MD
CM4	1	AT
CM5	.	.	C	4	EG
CM6	T	A	G	T	1	EG
CM7	C	1	ESA
CM8	6	LA, LS
CM9	7	LA
CM10	.	.	.	A	1	LS
CM11	C	.	.	11	LS
CM12	1	LS
CM13	T	N	0	NA
CM14	C	.	.	C	1	LT
CM15	C	3	NA
CM16	C	1	LT
1	1	AT
2	2	LA
3	G	.	6	LA, MD
4	2	LA, LS
5	1	LA
6	1	LS
7	.	.	.	A	1	LS
8	T	T	.	.	C	1	LT
9	C	2	LT
10	C	1	LT
11	1	LT
MD1(A)	6	AT, ESA, LA, LS, LT, MD
MD2(B)	4	MD
MD3(C)	G	.	5	LA, MD

Conclusiones Generales

1. El estudio de los patrones de diversidad genética a distintas escalas (regional a local) nos permite comprender de manera integral cómo se distribuye la variación y cuáles son las fuerzas evolutivas que la afectan. Esta información es fundamental para la propuesta de medidas de conservación de especies en peligro, como los perros llaneros de cola negra (subgénero *Cynomys*), que consideren los procesos evolutivos que las han afectado a lo largo de su historia evolutiva.
2. *Cynomys mexicanus* divergió hace ~ 100,000 a 430,000 años a partir de una población relicto de *C. ludovicianus* que quedó aislada debido a los cambios de distribución promovidos por el cambio climático del Pleistoceno. Este evento de especiación peripátrica fue seguido de una expansión poblacional en ambas especies, ocurrida durante el Pleistoceno-Holoceno (~9,000 a 11,000 años). Esta rápida expansión poblacional incrementó unas 10 veces el tamaño efectivo poblacional y mitigó la pérdida de diversidad genética relacionada con el evento fundador o cuello de botella por el que atravesó *C. mexicanus*. De manera que *C. mexicanus* presenta altos niveles de variación genética aún tratándose de una especie de distribución restringida.
3. Se detectó la presencia de sitios climáticamente estables al sur de la distribución actual de *C. ludovicianus*, que pudieron representar refugios durante los periodos de cambio climático del Pleistoceno.
4. Las colonias analizadas de *C. ludovicianus* indican que hay alta variación genética en los sitios de Chihuahua y Nuevo México y que deben ser protegidas. Sonora se encuentra aislada por la Sierra Madre Occidental y debe considerarse como una unidad de manejo independiente evitando intercambio genético con otras poblaciones.
5. La especie endémica *C. mexicanus* presenta alta variación genética. Los niveles de variación, diferenciación y estructura genética presentes en esta especie son similares a los observados a nivel local en *C. ludovicianus*.

6. Las poblaciones de *C. mexicanus* presentan alta conectividad, por lo que los planes de manejo y conservación deben enfocarse en mantener la conectividad de las colonias por medio de la mitigación de la fragmentación y pérdida del hábitat relacionados con las actividades antropogénicas (p.e., restringir cambios en el uso de suelo, promover actividades de educación ambiental que informen a los habitantes del área sobre la importancia de los perritos para la recarga de acuíferos, movimiento de nutrientes y otros servicios ecosistémicos).

7. La población cautiva del Museo del Desierto presenta alta variación y puede ser considerada como una población fuente para la reintroducción a vida silvestre. Sin embargo, es necesario promover el manejo de esta población *ex situ* para mitigar la pérdida de diversidad genética asociada a la vida en cautiverio.

8. Antes de realizar esfuerzos de reintroducción, los sitios para reintroducción de especies deben ser analizados desde el punto de vista de la disponibilidad y la calidad del hábitat, así como desde el punto de vista de su permanencia a mediano y largo plazo.

9. Una vez implementadas las actividades de manejo es necesario realizar monitoreo genético de las poblaciones de ambas especies para garantizar el mantenimiento de la variación genética. El monitoreo deberá realizarse cuando menos cada 10 años (~ 5 generaciones) o después de eventos de rápida disminución demográfica como los ocurridos recientemente en Chihuahua y Sonora.

Perspectivas

Se recomienda realizar análisis genómicos para determinar la presencia de adaptaciones locales en distintas poblaciones que se encuentran altamente diferenciadas (p.e., las colonias presentes en Sonora para *C. ludovicianus*, y la colonia Los Ángeles para *C. mexicanus*).

En el caso de *C. ludovicianus*, es necesario explorar a mayor profundidad la divergencia de la población de Sonora para proponer medidas adecuadas para su recuperación. Esto se debe realizar por medio de la inclusión de muestras de toda el área de distribución de la especie para determinar la presencia de subestructura genética entre regiones. Al incluir muestras de toda el área de distribución se podrá, además, determinar la relación entre las subespecies que conforman a *C. ludovicianus* (*C. l. ludovicianus* y *C. l. arizonensis*), así como la diferenciación entre poblaciones localizadas en los desiertos fríos (Grandes Planicies) y las poblaciones de los desiertos cálidos (Desierto Chihuahuense) de Norteamérica.

En el caso de *C. mexicanus*, es necesario ampliar el muestreo y analizar la presencia de adaptaciones locales en distintos sitios, en particular en áreas donde el ambiente aparenta ser muy distinto, como el Rancho Los Ángeles en Coahuila y cuya población se encuentra parcialmente aislada por la Sierra Madre Oriental, y el extremo sur de la distribución en el estado de San Luis Potosí. Estos análisis, apoyados por modelos de nicho ecológico, permitirán elegir sitios candidatos para la reintroducción, y posiblemente incrementar las probabilidades de éxito de las reintroducciones (como la llevada a cabo recientemente en el estado de Zacatecas).

Finalmente, dado el reciente declive poblacional de las poblaciones de Chihuahua (pérdida de >50% de las colonias entre 2009 y 2013; Pacheco et al., 2014) y Sonora (extinción de la colonia La Mesa; Amador-Alcalá et al., 2014) de *C. ludovicianus*, es necesario, además del monitoreo demográfico y de presencia de enfermedades, realizar mediciones sistemáticas de diversidad genética a largo plazo que permitan comprender sus patrones de pérdida y restablecimiento a lo largo del tiempo. Asimismo, es necesario implementar acciones similares para las poblaciones de *C. mexicanus*, que se han visto afectadas por periodos de sequía recientes.

Literatura citada

- Allendorf FW, Hohenlohe PA y Luikart G (2010) Genomics and the future of conservation genetics. *Nature Reviews* 11:697-709.
- Álvarez-Castañeda ST (2007) Systematics of the Antelope Ground squirrel (*Ammospermophilus*) from Islands adjacent to the Baja California Peninsula. *Journal of Mammalogy* 88: 1160-1169.
- Álvarez-Castañeda ST y Cortés-Calva P (2011) Genetic evaluation of the Baja California rock squirrel *Otospermophilus atricapillus* (Rodentia: Sciuridae). *Zootaxa* 138: 35-51.
- Álvarez-Castañeda ST, Lidicker Jr. WZ y Rios E (2009) Revision of the *Dipodomys merriami* complex in the Baja California Peninsula, Mexico. *Journal of Mammalogy* 90: 992-1008.
- Álvarez-Castañeda ST y Rios E (2010) A phylogenetic analysis of *Neotoma varia* (Rodentia: Cricetidae), a rediscovered, endemic, and threatened rodent from Datil Island, Sonora, Mexico. *Zootaxa* 2647: 51-60.
- Álvarez-Castañeda ST y Rios E (2011) Revision of *Chaetodipus arenarius* (Rodentia: Heteromyidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 161: 213-228.
- Álvarez Solorzano T (1983) Notas sobre algunos roedores fósiles del Pleistoceno en México. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*, México 27: 149-163.
- Animal diversity (2015) http://animaldiversity.org/accounts/Sciuridae/#physical_description. Visitado el 10 de febrero de 2015.
- Amador-Alcalá SA, Carreón-Arroyo G y Toyos-Martínez D (2014) Abundancia y densidad de perrito de la pradera cola negra (*Cynomys ludovicianus*) en la cuenca del Río San Pedro, Sonora, México. Memorias del XII Congreso Nacional de Mastozoología: celebrando 30 años de la AMMAC. Puebla de Zaragoza, México.
- Antolin MF, Savage LT y Eisen RJ (2006) Landscape features influence genetic structure of black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*). *Landscape Ecology* 21:867-875.
- Arif IA y Khan HA (2009) Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation* 32.1:9-17.
- Ávila-Flores R (2009) Black-tailed prairie dog declines in northwestern Mexico: species-habitat relationship in a changing landscape. Tesis Doctorado, Universidad de Alberta, Canadá.
- Ávila-Valle ZA, Castro-Campillo A, León-Paniagua L, Salgado-Ugald IS, Navarro-Sigüenza AG, Hernández-Baños BE y Ramírez-Pulido J (2012) Geographic variation and molecular evidence of the Blackish Deer Mouse complex (*Peromyscus flavus*, Rodentia: Muridae). *Mammalian Biology* 77: 166-177.

- Avise JC (1998) The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7: 371-379.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press.
- Avise JC (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36:3-15.
- Avise JC (2010) Perspective: conservation genetics enters the genomics era. *Conservation Genetics* 11:665-669.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA y Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Avise JC, Walker D y Johns GC (1998) Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of the Royal Society of London B* 265: 1707-1712.
- Biggs CD (2007) Establishing genetic and physiological baselines for the Black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*). Ph.D. dissertation. University of North Texas. USA.
- Carleton MD y Musser GG (2005) Order Rodentia. pp745-752 in *Mammal species of the World a taxonomic and geographic reference* (D. E. Wilson and D. M. Reeder eds.). Baltimore, Johns Hopkins University Press.
- Castañeda-Rico S, León-Paniagua L, Ruedas LA y Vázquez-Domínguez E (2011) Higher genetic diversity and extreme differentiation in the two remaining populations of *Habromys simulatus*. *Journal of Mammalogy* 92: 963-973.
- Castellanos-Morales G, Gasca-Pineda J, Ceballos G y Ortega J (2014) Genetic variation in a peripheral and declining black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) population from Mexico. *Journal of Mammalogy* 95(3):467-479.
- Castellanos-Morales G, Ortega J, Castillo-Gómez R, Sackett L, Eguiarte LE (2015) Genetic variation and structure in contrasting geographic distributions: widespread versus restricted black-tailed prairie dogs (subgenus *Cynomys*). *Journal of Heredity* 106(S1):478-490.
- Ceballos G, Mellink E y Hanebury LR (1993) Distribution and conservation status of prairie dogs *Cynomys mexicanus* and *Cynomys ludovicianus* in Mexico. *Biological Conservation* 63: 105-112.
- Ceballos G, Manzano P, Méndez-Harclerode FM, Haynie M, Walker DH y Bradley R (2010) Geographic distribution, genetic diversity, and conservation status of the Southern Flying squirrel (*Glaucomys volans*) in México. *Occasional Papers, Museum of Texas Tech University* 229: 1-15.

- Ceballos G y Oliva G (2005) *Los mamíferos silvestres de México*. Fondo de Cultura Económica y CONABIO. México D. F. México.
- Chesser RK (1983) Genetic variability within and among populations of the black-tailed prairie dog. *Evolution* 37(2):320-331.
- CITES (2010) Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. Apéndices I, II y III. (10 de septiembre 2010 de: <http://www.cites.org/esp/app/appendices>).
- Cruz Muñoz V, Arroyo-Cabrales J y Graham RW (2009) Rodents and lagomorphs (Mammalia) from Late-Pleistocene deposits at Valsequillo, Puebla, Mexico. *Current Research in the Pleistocene* 26: 147-149.
- Daley JG (1992) Population reductions and genetic variability in black-tailed prairie dogs. *Journal of Wildlife Management* 56(2):212-220.
- Dobson FS, Chesser RK, Hoogland JL, Sugg DW y Foltz DW (1997) Do black-tailed prairie dogs minimize inbreeding. *Evolution* 51(3):970-978.
- Dobson FS, Chesser RK, Hoogland JL, Sugg DW y Foltz DW (1998) Breeding groups and gene dynamics in a socially structured population of prairie dogs. *Journal of Mammalogy* 79(3):671-680.
- Dobson FS, Chesser RK, Hoogland JL, Sugg DW y Foltz DW (2004) The influence of social breeding groups on effective population size in black-tailed prairie dogs. *Journal of Mammalogy* 85(1): 58-66.
- Eckert AJ (2011) Seeing forest for the trees: statistical phylogeography in a changing world. *New Phytologist* 189: 894-897.
- Eguiarte Fruns LE (1990) *Genética de poblaciones de Astrocaryum mexicanum Liebm. en los Tuxtlas, Veracruz*. Tesis de Doctorado. Centro de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Eguiarte LE, Perez-Nasser N y Piñero D (1992) Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum*. *Heredity* 69: 217-228.
- Espindola S, Cuarón AD, Gaggiotti OE y Vázquez-Domínguez E (2014) High genetic structure of the Cozumel Harvest mice, a critically endangered island endemic: conservation implications. *Conservation Genetics* 15: 1393-1402.
- Estrada-Castillón E, Scott-Morales L, Villarreal-Quintanilla JA, Jurado-Ybarra E, Cotera-Correa M, Cantú-Ayala C y García-Perez J (2010) Clasificación de los pastizales halófilos del Noreste de

- México asociados con perrito de las praderas (*Cynomys mexicanus*): diversidad y endemismo de especies. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 81: 401-416.
- Frankham R, Ballou JD y Briscoe DA (2004) *A primer of conservation genetics*. Cambridge University Press.
- Frankham R. 2010. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological Conservation* 143: 1919-1927.
- Fernández JA (2012) Phylogenetics and biogeography of the microendemic rodent *Xerospermophilus perotensis* (Perote ground squirrel) in the Oriental Basin of Mexico. *Journal of Mammalogy* 93: 1431-1439.
- Flower WH Sir (1978) An introduction to the study of mammals living and extinct. pp. 450-452. (reprint ed.) Arno Press Inc. London.
- Foltz DW y Hoogland JL (1983) Genetic evidence of outbreeding in the black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*). *Evolution* 37(2): 273-281.
- Garrido-Garduño T y Vázquez-Domínguez E (2014) Detección de barreras al flujo genético en poblaciones de *Liomys pictus*. Memorias del XII Congreso Nacional de Mastozoología: celebrando 30 años de la AMMAC. Puebla de Zaragoza, México.
- Gasca-Pineda J, Cassaigne I, Alonso R y Eguiarte LE (2013) Effective population size, genetic variation, and their relevance for conservation: the bighorn sheep in Tiburon Island and comparisons with managed Artiodactyls. *Plos One* 10:e78120.
- González DU, Estrada E y Cantú C (2012) Análisis de fragmentación en colonias de perrito llanero mexicano (*Cynomys mexicanus*). *Ciencia UANL* 57: 43-49.
- Goodwin HT (1995) Pliocene-Pleistocene biogeographic history of prairie dogs, genus *Cynomys* (Sciuridae). *J Mammal.* 76: 100-122.
- Guevara Chumacero LM, López Wilchis R, Pedroche FF y Barriga Sosa I de los A (2006) Análisis estructural del gen mitochondrial citocromo *b* y de la región control de *Cynomys mexicanus* y *Spermophilus spilosoma* (Rodentia: Sciuridae). *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)* 22: 123-125.
- Gutiérrez-García TA y Vázquez-Domínguez E (2012) Biogeographically dynamic genetic structure bridging two continents in the monotypic Central American rodent *Ototylomys phyllotis*. *Biological Journal of the Linnean Society* 107: 593-610.
- Gutiérrez Guerrero YT (2013) Efecto del cuativerio sobre la diversidad genética de una población de perrito de la pradera mexicana (*Cynomys mexicanus*). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, México, D. F.

- Gutiérrez-Guerrero Y, Castellanos-Morales G y Eguiarte-Frums LE (2014) Efecto del cautiverio sobre la diversidad genética de una población de perrito de la pradera mexicana (*Cynomys mexicanus*). Memorias del XII Congreso Nacional de Mastozoología: celebrando 30 años de la AMMAC. Puebla de Zaragoza, México.
- Harrison RG, Bogdanowicz SM, Hoffmann RS, Yensen E y Sherman PW (2003) Phylogeny and evolutionary history of the ground squirrels (Rodentia: Marmotinae). *Journal of Mammalian Evolution* 10(3): 249-276.
- Haynie ML, Van Den Bussche RA, Hoogland JL y Gilbert DA (2003) Parentage, multiple paternity, and breeding success in Gunnison's and Utah prairie dogs. *Journal of Mammalogy* 84(4): 1244-1253.
- Helgen KM, Cole FR, Helgen LE y Wilson DE (2009) Generic revision of the Holarctic ground squirrel genus *Spermophilus*. *J. Mammal.* 90:270-305.
- Hernandez-Davila A, Vargas JA, Martínez-Mendez N, Lim BK, Engstrom MD y Ortega J. 2012. DNA barcoding and genetic diversity of phyllostomid bats from the Tucatan Peninsula with comparisons to Central America. *Mol. Ecol. Resour.* 12(4):590-597.
- Hernández-Gómez MA, Valdés-Reyna J, Villarreal-Quintanilla JA y Hernández-Javalera II (2012) Análisis multitemporal del cambio de uso de suelo y vegetación en las áreas naturales protegidas con perrito llanero mexicano (*Cynomys mexicanus* Merriam) en el Estado de Nuevo León, México. *Agraria* 9: 63-72.
- Herron MD, Castoe TA y Parkinson CL (2004) Sciurid phylogeny and the paraphyly of Holarctic ground squirrels (*Spermophilus*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 31:1015-1030.
- Herron MD, Waterman JM y Parkinson CL (2005) Phylogeny and historical biogeography of African ground squirrels: the role of climate change in the evolution of *Xerus*. *Mol. Ecol.* 14:2773-2788.
- Hickerson MJ, Carstens BC, Cavendar-Bares J, Crandall KA, Graham CH, Johnson BJ, Rissler L, Victoriano PF y Yoder AD (2010) Phylogeography's past, present and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 291-301.
- Higuchi R (1989) Rapid efficient DNA extraction for PCR from cells or blood. *Amplifications Perkin-Elmer Corporation* 2: 1-4.
- IUCN (2010) IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.3. (10 de septiembre 2010: www.iucnredlist.org).

- Jones PH y Britten HB (2010) The absence of concordant population genetic structure in the black-tailed prairie dog and the flea, *Oropsylla hirsuta*, with implications for the spread of *Yersinia pestis*. *Molecular Ecology* 19: 2038-2049.
- Jones RT, Martin AP, Mitchell AJ, Collinge SK y Ray C (2005) Characterization of 14 polymorphic microsatellite markers for the black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*). *Molecular Ecology Notes* 5: 71-73.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX y Wilson AC (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 86: 6196-6200.
- Kohn MH, Murphy WJ, Ostrander EA y Wayne RK (2006) Genomics and conservation genetics. *Trends in Ecology and Evolution* 21(22): 629-637.
- Li B, Yu D, Cheng H, Storey KB, Zhang J. 2015. The complete mitochondrial genomes of *Cynomys leucurus* and *C. ludovicianus* (Rodentia: Sciuridae). *Mitochondrial DNA*, early online: 1-2; doi: 10.3109/19401736.2015.1015010.
- List R, Pergams OR, Pacheco J, Cruzado J y Ceballos G (2010) Genetic divergence of *Microtus pennsylvanicus chihuahuensis* and conservation implications of marginal population extinctions. *Journal of Mammalogy* 91:1093-1101.
- López-González C, Correa-Ramírez MM y García-Mendoza DF (2014) Phylogeography of *Peromyscus scmidlyi*: and endemic of the Sierra Madre Occidental, México. *Journal of Mammalogy* 95: 254-268.
- Lyons LA, Lauchlin TF, Copeland NG, Jenkins NA, Womack JE y O'Brien SJ (1997) Comparative anchor tagged sequences (CATS) for integrative mapping of mammalian genomes. *Nature Genetics* 15: 47-56.
- Magle SB, Ruel EW, Antolin MF y Crooks KR (2010) Population genetic structure of black-tailed prairie dogs, a highly interactive species, in fragmented urban habitat. *Journal of Mammalogy* 91(2): 326-335.
- Martínez-Estévez L, Balvanera P, Pacheco J y Ceballos G (2013) Prairie dog decline reduces the supply of ecosystem services and leads to desertification of semiarid grasslands. *PLoS One* 8:e75229.
- McCullough DA y Chesser RK (1987) Genetic variation of the Mexican prairie dog. *Journal of Mammalogy* 68(3): 555-560.

- Mead JI, White RS, Baez A, Hollenshead MG, Swift SL y Carpenter MC (2010) Late Pleistocen (Rancholabrean) *Cynomys* (Rodentia, Sciuridae: prairie dog) from northwestern Sonora, Mexico. *Quaternary International* 217: 138-142.
- Meffe GK y Carroll CR (eds.) (1997) *Principles in Conservation Biology*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachussets.
- Mellado M, Olvera A, Quero A y Mendoza G (2005) Dietary overlap between prairie dog (*Cynomys mexicanos*) and beef cattle in a desert raneland of northern Mexico. *Journal of Arid Environments* 62: 449-458.
- Mellink E y Madrigal H (1993) Ecology of the Mexican prairie dogs, *Cynomys mexicanus*, in El Manantial, Northeastern Mexico. *Journal of Mammalogy* 74: 631-635.
- Mercer JM y Roth VL (2003) The effects of Cenozoic global change on squirrel phylogeny. *Science* 299:1568-1572.
- Miller B, Reading R, Hoogland J, Clark T, Ceballos G, List R, Forrest S, Hanebury L, Manzano P, Pacheco J y Uresk D (2000) The role of prairie dogs as keystone species: a response to Stapp. *Conservation Biology* 14: 318-321.
- Moritz C (1994) Defining “Evolutionary Significant Units” for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9(10): 373-375.
- Mussali-Galante P, Tovar-Sánchez E, Valverde M, Valencia-Cuevas L y Rojas E (2013) Evidence of population genetic effects in *Peromyscus melanorphrys* chronically exposed to mine tailings in Morelos, Mexico. *Environmental Science Pollution Resources* 20: 7666-7679.
- Nabholz B, Gñémin S y Galtier N (2008) Strong variations of mitochondrial mutation rate across mammals – the longevity hypothesis. *Molecular Biology and Evolution* 25: 120-130.
- Nigenda S, Harrigan R, Beasley J, Ruiz-Piña HA, Valenzuela D y Wayne R (2014) Variación fenotípica y expression diferencial de genes en poblaciones de tlacuache (*Didelphis virginiana*) en diferentes ambientes. Memorias del XII Congreso Nacional de Mastozoología: celebrando 30 años de la AMMAC. Puebla de Zaragoza, México.
- Ochoa A, Gasca J, Ceballos G, Eguiarte L (2012) Spatio-temporal population genetics of the endangered Perote groun squirrel (*Xerospermophilus perotensis*) in a fragmented landscape. *Journal of Mammalogy* 93(4): 1061-1074.
- Ochoa-Hein A (2008) Diversidad y estructura espacio-temporal de la ardilla terrestre del Perote (*Spermophilus perotensis*): Implicaciones para su conservación. *Tesis de Licenciatura*. Facultad de Ciencias, Univeridad Nacional Autónoma de México, México, D. F.

- Ouborg NP (2010) Integrating population genetics and conservation biology in the era of genomics. *Biology Letters* 6: 3-6.
- Ouborg NJ, Angeloni F y Vergeer P (2010a) An essay on the necessity and feasibility of conservation genomics. *Conservation Genetics* 11: 643-653.
- Ouborg NJ, Pertoldi C, Loeschcke V, Bijlsma R y Hedrick PW (2010b) Conservation genetics in transition to conservation genomics. *Trends in Genetics* 26(4): 177-187.
- Pacheco J, List R, Davidson A, Santos-Barrera G, Cruzado J, Manzano-Fisher P y Ceballos G (2014) Deterioro acelerado de un sistema de pastizal y sus implicaciones ecológicas y de conservación. Memorias del XII Congreso Nacional de Mastozoología: celebrando 30 años de la AMMAC. Puebla de Zaragoza, México.
- Pando-Moreno M, Reyna L, Scott L y Jurado E (2013) Caracterización del suelo en colonias de *Cynomys mexicanus* Merriam, 1892 en el noroeste de México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 17: 98-105.
- Piaggio AJ y Spicer GS (2001) Molecular phylogeny of the chipmunks inferred from mitochondrial cytochrome *b* and cytochrome oxidase II gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 20(3):335-350.
- Piñero D y Eguiarte LE (1988) The origin and biosystematic status of *Phaseolus coccineus* spp. *Polyanthus*: electrophoretic evidence. *Euphytica* 37: 199-203.
- Pizzimenti JJ y McClenaghan Jr, LR (1974) Reproduction, growth and development, and behavior in the Mexican prairie dog, *Cynomys mexicanus* (Merriam). *American Midland Naturalist* 92: 130-145.
- Primmer CR (2009) From conservation genetics to conservation genomics. *Annals of the New York Academy of Science* 1162: 357-368.
- Rioja-Paradela T y Scott-Morales L (2004) Algunos aspectos etológicos de *Cynomys mexicanus* (Rodentia: Sciuridae). *Revista Mexicana de Mastozoología* 8: 53-60.
- Rioja-Pardela T, Scott-Morales L, Cotera-Correa M y Estrada-Castillón E (2008) Reproduction and behavior of the Mexican prairie dog (*Cynomys mexicanus*). *The Southwestern Naturalist* 53: 520-523.
- Rios E y Álvarez-Castañeda ST (2010) Phylogeography and systematics of the San Diego pocket mouse (*Chaetodipus fallax*). *Journal of Mammalogy* 91: 293-301.
- Roach JL, P Stapp, Van Horne B y Antolin MF (2001) Genetic structure of a metapopulation of black-tailed prairie dogs. *Journal of Mammalogy* 82(4): 946-959.

- Sackett LC, Cross TB Jones RT, Johnson WC, Ballare K, Ray C, Collinge SK y Martin AP (2012) Connectivity of prairie dog colonies in an altered landscape: inferences from analysis of microsatellite DNA variation. *Conservation Genetics* 13: 407-418.
- Sackett LC, Collinge SK y Martin A (2013) Do pathogens reduce genetic diversity of their hosts? Variable effects of sylvatic plague in black-tailed prairie dogs. *Mol. Ecol.* 22: 2441-2455.
- Sackett LC, Seglund A, Guralnick RP, Mazella MN, Wagner DM, Busch JD y Martin AP (2014) Evidence for two subspecies of Gunnison's prairie dogs (*Cynomys gunnisoni*), and the general importance of the subspecies concept. *Biol. Conserv.* 174: 1-11.
- Sarukhán, J. et al. (2009) *Capital natural de México. Síntesis: conocimiento actual, evaluación y perspectivas de sustentabilidad*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- Scott-Morales L, Estrada E, Chávez-Ramírez F y Cotera M (2004) Continued decline in geographic distribution of the mexican prairie dog (*Cynomys mexicanus*). *Journal of Mammalogy* 85: 1095-1101.
- Scott-Morales LM, Gottschalk E y Mühlenberg M (2005) Decline in the endemic Mexican prairie dog *Cynomys mexicanus*: what do we know about extinction risk? *Oryx* 39(4):389-397
- Selkoe KA y Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9:615-629.
- SEMARNAT (2010) Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010, Protección ambiental – Especies 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.
- Sierra-Corona R, Davidson A, Fredrickson EL, Luna-Soria H, Suzan-Azpiri H, Ponce-Guevara E y Ceballos G (2015) Black-tailed prairie dogs, cattle, and the conservation of North America's arid grasslands. *PLoS One* 10:30118602.
- Slobodchikoff CN, Perla BS y Verdolin JL (2009) *Prairie dogs: communication and community in an animal society*. Harvard University Press.
- Soulé M (1985) What is conservation biology? A new synthetic discipline addresses the dynamics and problems of perturbed species, communities, and ecosystems. *BioScience* 35(11): 727-734.
- Steiner CC, Putnam AS, Hoeck PEA y Ryder O (2013) Conservation genomics of threatened animal species. *Annual Review of Animal Bioscience* 2013: 261-281.
- Sunnucks P (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15:199-203.
- The tree of life (2015) <http://tolweb.org/Sciuridae>. Visitado el 10 de febrero de 2015.

- Travis SE, Slobodchikoff CN y Keim P (1997) DNA fingerprinting reveals low genetic diversity in Gunnison's prairie dog (*Cynomys gunnisoni*). *Journal of Mammalogy* 78(3): 725-732.
- Treviño-Villarreal J y Grant WE (1998) Geographic range of the endangered mexican prairie dog (*Cynomys mexicanus*). *Journal of Mammalogy* 79(4): 1273-1287.
- Treviño-Villarreal J, Berl IM, Aguirre A y Grant WE (1998) Survey for sylvatic plague in the Mexican prairie dog (*Cynomys mexicanus*). *The Southwestern Naturalist* 43: 147-154.
- Trudeau KM, Britten HB y Restani M (2004) Sylvatic plague reduces genetic variability in black-tailed prairie dogs. *Journal of Wildlife Diseases* 40(2): 205-21.
- Truett JC, Gober DP, Ernst AE, List R, Whitlaw H, Haynes CL, Schmitt G y Van Pelt WE (2006) Prairie dogs in the Chihuahuan Desert: history, ecology, conservation. En *Proceedings of the 6th symposium on the natural resources of the Chihuahuan Desert*. Chihuahuan Desert Research Institute, Fort Davis, Texas, USA.
- Trujano-Álvarez AL y Álvarez-Castañeda ST (2007) Taxonomic revision of *Thomomys bottae* in the Baja California Sur lowlands. *Journal of Mammalogy* 88: 343-350.
- Trujano-Álvarez AL y Álvarez-Castañeda ST (2013) Phylogenetic structure among pocket gopher populations, genus *Thomomys* (Rodentia: Geomyidae), on the Baja California Peninsula. *Zoological Journal of the Linnean Society* 168: 873-891.
- Valdés-Alarcón M (2003) Las ardillas de México. *Biodiversitas* 51: 1-7.
- Vallejo RM y González-Cózatl FX (2011) Phylogenetic affinities and species limits within the genus *Megadontomys* (Rodentia: Cricetidae) based on mitochondrial sequence data. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 50: 67-75.
- Vargas V, Valenzulela-Galván D y Alcalá RE (2012) Is genetic structure of the southern pygmy mouse *Baiomys musculus* (Cricetidae) related to human-induced spatial landscape heterogeneity in a tropical dry forest? *Genetica* 140: 287-295.
- Vázquez-Domínguez E, Ceballos G y Piñero D (2002) Exploring the relation between genetic structure and habitat heterogeneity in the rodent *Liomys pictus* from Chamela, Jalisco. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)* 86: 17-28.
- Vázquez-Domínguez E, Piñero D y Ceballos G (1999) Linking heterozygosity, demography, and fitness of tropical populations of *Liomys pictus*. *Journal of Mammalogy* 80: 810-822.
- Vázquez-Domínguez E y Vega R (2006) ¿Dónde estamos y hacia dónde vamos en el conocimiento genético de los mamíferos mexicanos? *New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin* 32: 67-73.

- Vega R, Vázquez-Domínguez E, Mejía-Puente A y Cuarón A (2007) Unexpected high levels of genetic variability and the population structure of an island endemic rodent (*Oryzomys couesi cozumelae*). *Biological Conservation* 137: 210-222.
- Wang IJ (2011) Choosing appropriate genetic markers and analytical methods for testing landscape genetic hypotheses. *Molecular Ecology* 20:2480-2482.
- Yeaton RI y Flores-Flores JL (2006) Patterns of occurrence and abundance in colony complexes of the Mexican prairie dog (*Cynomys mexicanus*) in productive and unproductive grasslands. *Acta Zoológica Mexican (n.s.)* 22: 107-130.

Apéndice 1. Genetic variation in a peripheral and declining population of black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) from Mexico.

Castellanos-Morales Gabriela, Gasca-Pineda Jaime, Ceballos Gerardo y Ortega Jorge.

Journal of Mammalogy. 95(3): 467-479.

Resumen

En Norteamérica, la fragmentación del hábitat inducida por el hombre ha provocado una reducción considerable de las poblaciones de perros llaneros de cola negra (*Cynomys ludovicianus*). Aunque el área ocupada por las colonias de perros llaneros en Chihuahua, al noroeste de México, también se ha reducido recientemente, esta población ha sido menos afectada por la perturbación humana. Se analizaron secuencias del citocromo *b* (*Cyt-b*) y 10 microsatélites nucleares en 13 colonias para poner a prueba si 1) la población de perros llaneros de cola negra de Janos posee niveles de variación genética relativamente altos y baja estructura genética debido a su gran tamaño, ausencia de peste y estatus de protección; o 2) si la disminución poblacional reciente y los efectos periféricos han resultado en la presencia de baja variación y alta estructura genética. Los análisis sugieren que la variación genética mitocondrial es moderada con relación a otros sciúridos y que la variación genética nuclear no es significativamente distinta en relación a otras poblaciones de perros llaneros. Además, de acuerdo con la organización social de los perros llaneros de cola negra, la estructura genética entre poblaciones locales fue significativa y la variación hacia el interior de las colonias fue mayor que entre las colonias para ambos marcadores. Con relación a la filopatría de las hembras y la dispersión sesgada hacia los machos, la F_{ST} fue mayor para el ADN mitocondrial que para el ADN nuclear. Finalmente, para los marcadores nucleares se encontró una correlación negativa entre la diferenciación genética y el área de la colonia y el tamaño poblacional, lo que sugiere un incremento en el efecto de la deriva génica en las colonias más pequeñas y menos densas como resultado de la fragmentación del hábitat reciente. En conclusión, la estructura social y el patrón de dispersión ha mantenido la variación genética de los perros llaneros de cola negra de Janos a pesar de considerarse una población periférica y en declive.

Genetic variation in a peripheral and declining population of black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) from Mexico

GABRIELA CASTELLANOS-MORALES,* JAIME GASCA-PINEDA, GERARDO CEBALLOS, AND JORGE ORTEGA

Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior s/n Anexo al Jardín Botánico. Ciudad Universitaria, México Distrito Federal, 04510, México (GC-M, JG-P, GC)

Posgrado en Ciencias Químico-biológicas, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n Col. Sto. Tomas, México Distrito Federal, 11340, México (JO)

* Correspondent: aleirbag_99@yahoo.com

Across North America, anthropogenically induced habitat fragmentation has led to a severe decline in populations of black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*). Although the area occupied by black-tailed prairie dogs in Chihuahua, northwestern Mexico, also has recently declined, this site remains comparatively unaffected by human disturbance. Cytochrome-*b* sequences and 10 nuclear microsatellite loci were analyzed across 13 colonies to test if due to large size, absence of plague, and protected status, the black-tailed prairie dogs from Janos possess relatively high levels of genetic variation and low genetic structure; or if recent population decline and peripheral effects result in relatively low genetic variation and high genetic structure. Analysis suggests moderate mitochondrial genetic variation relative to other sciurids, and not significantly different nuclear genetic variation relative to other populations of prairie dogs. Furthermore, in accordance to black-tailed prairie dog social organization, genetic structure among local populations was significant, and within-colony variation was higher than among-colony variation for both markers. F_{ST} was higher for mitochondrial than for nuclear DNA related to female philopatry and male-biased gene flow. Finally, a negative correlation between genetic differentiation as a function of colony area and population size found for nuclear microsatellite loci suggests an increased effect of genetic drift in smaller and less-dense colonies because of recent habitat fragmentation. In conclusion, despite being a peripheral and declining population, Janos black-tailed prairie dogs retained genetic variation that has been maintained by their social structure and dispersal pattern.

Key words: black-tailed prairie dog, *Cynomys ludovicianus*, cytochrome *b*, habitat fragmentation, microsatellite, peripheral population, population genetics—empirical

© 2014 American Society of Mammalogists

DOI: 10.1644/12-MAMM-A-099

Population decline has been directly linked to the effects of habitat fragmentation on genetic viability (Frankham et al. 2002). It has been suggested that the isolation of populations reduces genetic variation via the decrease of effective population size and the disruption of gene flow, which may in turn, promote genetic drift and inbreeding (e.g., Barrat et al. 1999; Goodman et al. 2001; Grativol et al. 2001; Williams et al. 2003; Martínez-Cruz et al. 2004; Hulová and Sedláček 2008). As a consequence, this decreases fitness and intensifies the risk of extinction (Saunders et al. 1991; Frankham et al. 2002; DiBattista 2008). Nevertheless, the effects of habitat fragmentation may depend on a number of other factors, including population bottleneck intensity, duration, time since occurrence, and population dynamics (such as metapopulation structure). Furthermore, the dispersal ability of any given species may prevent isolation, thus circumventing both genetic

drift and inbreeding (Antolin et al. 2001; Schwartz et al. 2005; Purrenhage et al. 2009).

To assess the genetic viability of populations threatened by habitat fragmentation, measurements of genetic variation, differentiation, and structure are very important. These measurements provide valuable information for the design of conservation strategies, which aim to restore population connectivity, prevent further loss of genetic variation, and reduce the risk of extinction (Frankham et al. 2002). Populations of black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) have long been subjected to habitat fragmentation. This is particularly evident in the United States where eradication



campaigns were implemented during the early 1900s (Hoogland 1996). In combination with subsequent outbreaks of plague (*Yersinia pestis*), the geographic range of black-tailed prairie dogs was reduced by as much as approximately 98% (Hoogland 1996; Trudeau et al. 2004; Slobodchikoff et al. 2009). Until recently, the black-tailed prairie dog population of the short-grass prairies of Janos, Chihuahua, Mexico, was considered the largest remaining black-tailed prairie dog population in North America (Ceballos et al. 2010). Following drought, cattle overgrazing, agriculture, poisoning, and scrubland expansion, this peripheral population also has suffered a serious decline, reducing its geographic range by approximately 73% (Ceballos et al. 1993, 2010; Ávila-Flores 2009). The rapid fragmentation and ongoing reduction of this population has raised serious concerns stimulating interest both in the conservation of this species and the preservation of the grasslands it inhabits. Given that this population has been subject to extensive anthropogenic disturbance, and prairie dog disappearance has been linked to concomitant losses of biodiversity from grassland ecosystems, this population is considered threatened (Mexico—SEMARNAT 2002) and the grassland it occupies has been designated a Mexican Biosphere Reserve (Dinerstein et al. 2000; Miller et al. 2000; Lomolino and Smith 2001; SEMARNAT 2009).

Black-tailed prairie dog colonies from Janos, Chihuahua, are located at the southernmost part of the species distribution and, therefore, constitute a peripheral population. Peripheral populations are genetically and morphologically divergent from core populations (Gaines et al. 1997) and, thus, differentiation may be crucial in response to, and adaptation to, environmental change (Lesica and Allendorf 1995). This is of potential significance to conservation strategies, and some field investigations have addressed the genetic variability among them without reaching consensus whether peripheral populations possess more or less genetic variation than core populations (Bouzat and Johnson 2004; Garner et al. 2004; Arnaud-Haond et al. 2006; Eckert et al. 2008; Kark et al. 2008; List et al. 2010; Rogell et al. 2010). Previous black-tailed prairie dog population genetics and landscape genetic studies have focused on colonies within the core area of the species distribution (Colorado, Montana, New Mexico, and South Dakota) overlooking genetic conservation value of peripheral black-tailed prairie dog populations (Chesser 1983; Foltz and Hoogland 1983; Daley 1992; Dobson et al. 1997, 1998, 2004; Roach et al. 2001; Trudeau et al. 2004; Jones and Britten 2010; Magle et al. 2010; Sackett et al. 2012). According to these studies, significant genetic structure in black-tailed prairie dog populations is related to complex social organization (presence of family groups within colonies—Chesser 1983; Dobson et al. 1997, 1998, 2004), female philopatry (Chesser 1991a, 1991b), connectivity between colonies (male-biased dispersal), time since colonization, and presence of plague (*Y. pestis*—Roach et al. 2001; Trudeau et al. 2004; Antolin et al. 2006).

The Janos black-tailed prairie dog population represents an important refuge for the conservation of this species because of its large area, absence of plague, extreme southern distribution,

and protected status (Ceballos et al. 2005). However, genetic variation at this site is unknown. To further assess the value of the Janos population as a refuge for species persistence in the long term, it is important to assess its genetic variation. The purpose of this study was to measure the genetic variability and structure of a black-tailed prairie dog population located at the southernmost edge of its geographical range. There are 2 contrasting hypotheses regarding genetic variation and genetic structure of the population: due to large size, absence of plague, protected status, and the fact that genetic variation is maintained by social structure and dispersal patterns, we expect that the black-tailed prairie dogs from Janos will possess a relatively high level of genetic variation and genetic structure will be affected only by social organization and dispersal patterns; in contrast, recent population decline and peripheral effects (small effective population size and isolation) could result in relatively low genetic variation and an increase in genetic structure.

To test these predictions we used 2 molecular markers targeting maternally inherited mitochondrial DNA (mtDNA) and biparentally inherited nuclear DNA, which distinguish between female and male dynamics (Wilson et al. 1985; Gaines et al. 1997; Frankham et al. 2002; Arbogast et al. 2005; Hedrick 2005). Furthermore, black-tailed prairie dogs have complex social organization where each colony is subdivided into family groups called coterries, gene flow is male biased, and females are philopatric (Hoogland 1996; Slobodchikoff et al. 2009), so we expect to find significant genetic structure for both molecular markers, significantly more within- than among-colony variation because of the effect of social organization on genetic structure, and a higher F_{ST} -value for maternally inherited DNA than for biparentally inherited DNA because of female philopatry. Finally, considering that habitat fragmentation promotes genetic differentiation in smaller and less-dense colonies (Frankham et al. 2002), we expect to find a negative correlation between genetic differentiation, colony area, and population size.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection.—Black-tailed prairie dogs from 13 colonies located at Janos and Nuevo Casas Grandes counties in northwestern Chihuahua, Mexico, were captured, following guidelines of the American Society of Mammalogists (Sikes et al. 2011) and the Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT; permit SGPA/DGVS/04142/07), between May and July 2007 (Fig. 1). Sampling colonies were selected according to their area (Pacheco et al. 2009) taking 4 arbitrarily defined categories considering their order of magnitude in hectares: < 9.9 ha, 10–99.9 ha, 100–999.9 ha, and > 1,000 ha (Table 1; Fig. 1). As stated above, black-tailed prairie dogs are highly social mammals. Social aggregation has been reported to increase within-colony genetic variation and generate genetic structure within each colony, whereas female relatedness may bias inbreeding estimation (Chesser 1983, 1991a, 1991b; Sugg et al. 1996; Dobson et al. 1997, 1998,

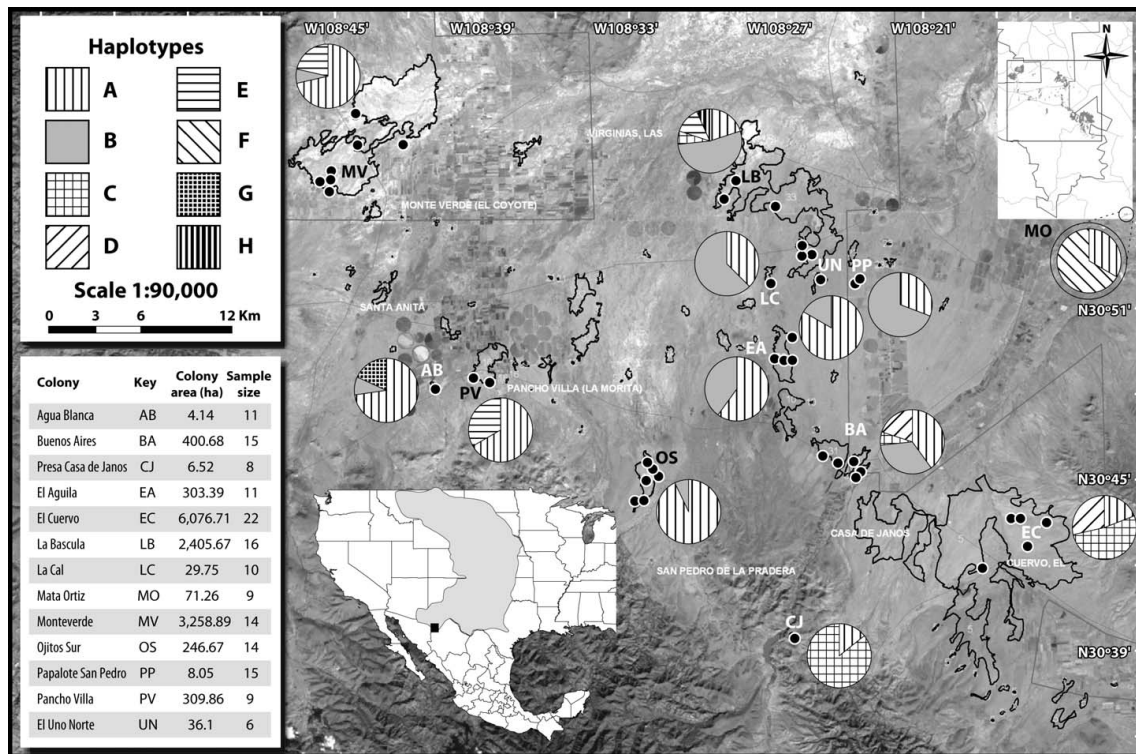


FIG. 1.—Spatial location of the sampled colonies within the Janos, Chihuahua, Mexico, black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) population. The black square within the species distribution from southern Canada to northern Mexico (shaded gray within map of United States and Mexico) represents the location of the Janos population in the southernmost area of the species distribution. Colony borders are depicted by black lines and dots represent the capture sites on the 13 colonies sampled. Information on colony name (colony and key), colony area, and sample size are given in the table in the lower left corner. Pie graphs represent the 8 haplotypes (A–H) present and their frequency in each colony.

2004). Therefore, when performing studies that aim to assess the genetic relation between colonies within a certain area, sampling design has to consider the bias introduced by social organization. Family groups within a colony can be fixed for different alleles due to female philopatry. Hence, sampling individuals from different family groups within a colony will provide a better representation of the genetic variation present at the colony level. To sample individuals from different family groups within each colony, traps were set in plots that were placed at least 150 m apart consistent with the reported black-tailed prairie dog coterie home-range area (Hoogland 1996). Each plot consisted of a 4 × 4 grid with 25-m separation between each trap, and between 1 and 7 plots were set in each colony according to its area. Between 0.5 and 1 ml of blood was collected from the femoral artery of 1–3 black-tailed prairie dogs per plot. In total, 160 (93 females and 67 males) black-tailed prairie dog blood samples were collected. Blood was transferred into a 1.5-ml Eppendorff tube containing 20 µl of 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid and sealed with a scrub-cap (Higuchi 1989). All samples were subsequently stored at –20°C until required for further processing. DNA was

extracted using the Bio-Rad Blood Kit (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California) according to the manufacturer's instructions. DNA integrity and quality were assessed through electrophoresis in 1% agarose gels using a 100–base pair (bp) ladder and stained with ethidium bromide.

Polymerase chain reaction for mtDNA cytochrome b.—Mitochondrial DNA cytochrome-*b* (*Cytb*) sequences were obtained using the primers L14724 (5'-TGAAAAA-YCATCGTTGT-3') and H15915 (5'-TCTTCATTTY-WGGTTTACAAGAC-3'—Harrison et al. 2003). In order to enhance amplification quality, 4 internal primers were designed using the program FastPCR (Kalendar et al. 2011—Forward-1, 5'-CATGAAACATTGGAGTTGTCC-3'; Forward-2, 5'-TTGCAGCCCTAGTCATAGTCCACC-3'; Reverse-1, 5'-GATATTTGACCTCAAGGGAGG-3'; and Reverse-2, 5'-TTTGTGGGGATAGATCGTAGG-3'). Polymerase chain reaction amplifications were performed in a 25-µl reaction volume using 10 ng/µl of target DNA, 1× buffer, 3 mM of MgCl₂, 0.15 mM of deoxynucleoside triphosphates, 0.4 µM of each primer (Invitrogen, Carlsbad, California), and 2 U/µl of *Taq* DNA polymerase (Promega, Fitchburg, Wisconsin). We

TABLE 1.—Colony name, relative density, population size, genetic diversity, and genetic structure for mitochondrial cytochrome-*b* (*Cytb*) sequences and nuclear microsatellite loci for black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) from 13 colonies from Janos, Chihuahua, Mexico. *Cytb* mitochondrial DNA (mtDNA): n = sample size; h = haplotype number; Hd = haplotypic diversity, and π = nucleotide diversity. Microsatellite nuclear markers: n = sample size; A = allelic richness with rarefaction; H_E = expected heterozygosity; H_O = observed heterozygosity, and F_{IS} = inbreeding coefficient. The colony that showed the highest mitochondrial and nuclear genetic variation was EC, and the colonies that had the smallest values of genetic variation were UN for nuclear microsatellites and OS for mtDNA.

Colony name	Relative density (individuals/ha) ^a	Population size (area[individuals/ha]) ^b	<i>Cytb</i>					Microsatellites					
			n	h	Hd	π	F_{ST}^c	n	A	H_O (SD)	H_E (SD)	F_{IS}	G''_{ST}^c
AB	39	159.9	11	3	0.472	0.0005	0.091	11	2.4	0.309 (0.16)	0.448 (0.15)	0.321 ^d	0.216
CJ	8.6	55.9	7	2	0.285	0.0003	0.401	8	2.2	0.375 (0.17)	0.499 (0.10)	0.262 ^d	0.232
PP	16.4	132.8	14	2	0.439	0.0004	0.172	15	2.6	0.547 (0.15)	0.574 (0.07)	0.049	0.103
LC	8.6	256.3	8	2	0.535	0.0005	0.101	10	2.4	0.380 (0.27)	0.527 (0.05)	0.291 ^d	0.258
UN	5.6	203.2	6	2	0.333	0.0003	0.041	6	1.6	0.233 (0.29)	0.276 (0.25)	0.167	0.395
MO	2.6	185.4	9	2	0.5	0.0013	0.329	9	2.4	0.433 (0.20)	0.510 (0.13)	0.158	0.098
OS	1.35	333	14	2	0.143	0.0001	0.103	14	2.3	0.436 (0.17)	0.528 (0.09)	0.181 ^d	0.096
EA	8.8	2,682.1	11	2	0.545	0.0005	0.046	11	2.8	0.509 (0.13)	0.606 (0.07)	0.167 ^d	0.032
PV	6.7	2,082.5	9	2	0.5	0.0009	0.031	9	2.4	0.500 (0.26)	0.556 (0.11)	0.107	0.185
BA	3	1,202.1	15	4	0.733	0.0032	0.029	15	2.6	0.447 (0.20)	0.572 (0.12)	0.225 ^d	0.108
LB	9.07	21,819.7	17	5	0.639	0.001	0.147	16	2.5	0.475 (0.20)	0.543 (0.07)	0.128	0.07
MV	8.7	28,319.8	14	3	0.473	0.0007	0.023	14	2.6	0.464 (0.16)	0.565 (0.07)	0.197 ^d	0.083
EC	3.5	21,146.9	22	3	0.654	0.0038	0.214	22	3.0	0.514 (0.14)	0.618 (0.09)	0.172 ^d	0.005
All	8.5	111,533.6	157	8	0.704 (0.03)	0.0016 (0.001)	0.236	160	3.4 (0.8)	0.449 (0.11)	0.525 (0.11)	0.18 ^d	0.272 (0.06)

^a Relative density data provided by C. Sánchez-Giraldo (Sánchez-Giraldo 2012) and R. Ávila-Flores (Ávila-Flores 2009).

^b Colony area according to Pacheco et al. (2009).

^c Colony genetic differentiation estimated through pairwise F_{ST} for *Cytb* sequences, and G''_{ST} for nuclear microsatellite loci comparing each colony to the rest of the sample.

^d Significant departures from Hardy–Weinberg equilibrium ($P < 0.05$).

used an Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, California) with the following program: 3 min at 94°C, then 35 cycles of 30 s at 96°C, 60 s at 52°C, and 120 s at 72°C followed by 240 s at 72°C and a final step of 4°C.

The presence, size, and quality of polymerase chain reaction products were confirmed by 1% agarose gel electrophoresis. All polymerase chain reaction products were sequenced at the UWHTSeq FinchLab, Washington University (www.htseq.org).

Polymerase chain reaction for microsatellites.—Ten nuclear microsatellite loci specifically designed for *C. ludovicianus* (A2, A8, A101, A104, A119, C116, D1, D2, D115, and D120—Jones et al. 2005) were polymerase chain reaction amplified in a 20- μ l reaction volume using 10 ng/ μ l of target DNA, 1 \times buffer, 0.4 mM of deoxynucleoside triphosphates, 0.8 μ M of forward primer labeled with HEX fluorescence (Invitrogen), 0.8 μ M of reverse primer (Invitrogen), 2–3.75 mM of MgCl₂, and 2 U/ μ l of *Taq* DNA polymerase (Promega). We used an Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) with the following program: 94°C for 180 s, followed by 35 cycles at 94°C for 60 s, annealing temperature as reported by Jones et al. (2005) for each primer for 30 s, and 72°C for 30 s, followed by 240 s at 72°C, and a final step of 4°C. All polymerase chain reactions included a negative control to detect possible contamination. Polymerase chain reaction products were confirmed by electrophoresis in 1.5% agarose gels. The products were dried (SpeedVac Jouan REC10.10.-RCT0; Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts) and genotyped in an ABI Prism 3100 sequencer (Applied Biosystems).

Data analyses for mtDNA.—Sequences were assembled using the program *consed* 6.0 (Ewing et al. 1998; Gordon et al. 1998), which displays the quality of each base on the sequence and checked by eye and aligned using *BioEdit* version 7.1.3 (Hall 1999). We performed a BLAST in GenBank to corroborate that obtained sequences corresponded to the black-tailed prairie dog *Cytb* region. A genealogy for the mitochondrial sequences was constructed to depict relationships among haplotypes; we used the maximum-likelihood method with the approximate likelihood ratio test and bootstrap support values implemented in *PhyML* (Guindon and Gascuel 2003), including *Cynomys gunnisoni* as outgroup (AF157930—Harrison et al. 2003). Two *Cytb* sequences of *C. ludovicianus* (AF157892 and AF157890) and 3 *Cytb* sequences of *C. mexicanus* (AF157841, AF157842, and AF157847—Harrison et al. 2003) downloaded from GenBank also were included to build the genealogy. *jModelTest* 0.1.1 (Posada 2008) was used to estimate the substitution model before using *PhyML*. All analyses were performed excluding sites with missing data. To further explore the relationships between haplotypes, a minimum spanning network at 95% confidence level was constructed using *TCS* 2.1 (Clement et al. 2000).

We estimated DNA sequence genetic variation (segregating sites [*S*], haplotype diversity [*Hd*], and nucleotide diversity [π])

with the program *DnaSP* version 5 (Librado and Rozas 2009). To assess mitochondrial genetic structure and genetic differentiation, analysis of molecular variance (AMOVA) and pairwise *F_{ST}* were estimated with the program *Arlequin* version 3.0 (Weir and Cockerham 1984; Excoffier et al. 1992, 2005). Isolation by distance was tested through a Mantel test using 9,999 permutations with the program *R* (R Development Core Team 2009) *ade4* library (Dray and Dufour 2007), using the multiple regressions and the linear geographic distances between colonies. Geographic distances were obtained using the mean capture site coordinate per colony with the Geographic Distance Matrix Generator version 1.2.3 (Ersts 2011).

To test for the effect of habitat fragmentation and genetic drift on population differentiation, pairwise *F_{ST}*-values between each individual colony and the rest of the population were estimated using *DnaSP* version 5 (Librado and Rozas 2009). A linear regression was performed between *F_{ST}*-values and ecological data (\log_{10} of colony area and \log_{10} of population size) obtained from the literature (Ávila-Flores 2009; Pacheco et al. 2009; Sánchez-Giraldo 2012), using *R* (R Development Core Team 2009). Population size was estimated through reported values of relative density (individuals/ha—Ávila-Flores 2009; Sánchez-Giraldo 2012) multiplied by colony area estimated by Pacheco et al. (2009).

Data analyses for microsatellites.—Allele frequencies were determined by direct calculation. Traditional genetic variation estimates (expected heterozygosity [*H_E*] and observed heterozygosity [*H_O*]) were obtained with programs *GENEPOP* version 4.0 (Raymond and Rousset 1995) and *Arlequin* version 3.0 (Excoffier et al. 2005). We also estimated allelic richness with correction for sample size through rarefaction using the software *HP-Rare* 1.0 (Kalinowski 2004, 2005). We performed an exact test for Hardy–Weinberg equilibrium per locus using Markov chain Monte Carlo with 10,000 dememorizations, 20 batches, and 5,000 iterations per batch, and estimated deviations from Hardy–Weinberg equilibrium for each colony through *F_{IS}* (Weir and Cockerham 1984), as well as linkage disequilibrium (LD) using the EM algorithm present in the program *GENEPOP* version 4.0 (Raymond and Rousset 1995). To control for artifacts associated with the presence of null alleles, the Brookfield method (Brookfield 1996) as implemented in the software *MICRO-CHECKER* 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004) was used. Moreover, estimates of *F_{ST}* confidence intervals considering and without considering null alleles were estimated and compared using the program *FreeNA* (Chapuis and Estoup 2007).

Genetic structure was examined using AMOVA in *Arlequin* version 3.0 (Excoffier et al. 1992, 2005), with 1,000 repetitions and confidence intervals based on 20,000 repetitions. In addition, Meirmans and Hedrick (2011) reported a dependency on the amount of within-population variation and the maximum value of any genetic structure and genetic differentiation estimate (*G_{ST}*, *F_{ST}*, *R_{ST}*, θ , and ϕ_{ST}), so Hedrick's standardized *G_{ST}* (*G^{''}_{ST}*—Meirmans and Hedrick

2011) also was estimated with the program GENODIVE 2.0b21 (Meirmans and Van Tienderen 2004), applying the default values and 999 iterations to obtain significance values. This genetic structure measure is corrected by the maximum heterozygosity (H_{MAX}), therefore providing an unbiased estimate. The software *Structure* 2.2 (Pritchard et al. 2000) was used as an alternative approach to explore genetic structure. The program employs a model-based Bayesian analysis that allows groups to be clustered without regard to their original sampling site. We performed and analyzed previous *Structure* 2.2 runs in order to determine the quantity of burn-in chains and Markov chain Monte Carlo simulations that maximize the results' posterior likelihood. These tests determined that 250,000 burn-in chains and 500,000 Markov chain Monte Carlo simulations with 30 repetitions for each K (number of clusters), where $K = 15$, were adequate to maximize posterior distributions. We considered the admixed populations and correlated allelic frequency models, because colonies share common ancestry and there is gene flow between them. Finally, to determine the optimal number of clusters (K) the ΔK test proposed by Evanno et al. (2005) as estimated with *Structure* HARVESTER (Earl and von Holdt 2011) was implemented.

Genetic differentiation between colonies was estimated through pairwise R_{ST} (Weir and Cockerham 1984; Holsinger and Weir 2009) obtained with the program Arlequin version 3.0 (Excoffier et al. 2005) using the default values provided by the program and 100 iterations to obtain significance values. Additionally, between-colony pairwise G''_{ST} -values (Meirmans and Hedrick 2011) were estimated using the program GENODIVE 2.0b21 (Meirmans and Van Tienderen 2004), applying the default values provided by the program and 999 iterations to obtain significance values.

Isolation by distance was tested through a Mantel test with 2,000 permutations in the program FSTAT version 2.9.3 (Goudet 2001), using the multiple regressions and the linear geographic distances between colonies.

To test for the effect of habitat fragmentation and genetic drift on population structure, pairwise G''_{ST} -values between each individual colony and the rest of the population were obtained using GENODIVE 2.0b21 (Meirmans and Van Tienderen 2004). A linear regression was performed between these G''_{ST} -values and ecological data (\log_{10} of colony area and \log_{10} of population size) obtained from the literature and estimated as stated above, using the R (R Development Core Team 2009) ade4 library (Dray and Dufour 2007).

RESULTS

Mitochondrial DNA.—The DNA for 1,140 bp of the mitochondrial *Cytb* region of 157 samples was sequenced. BLAST analysis on GenBank corroborated that the sequences obtained matched black-tailed prairie dog (*C. ludovicianus*) and *C. mexicanus*; subgenus *Cynomys* *Cytb* sequences. In terms of sequence composition, 1,124 were invariable sites, 13 were segregating sites, and 3 sites were excluded because of missing

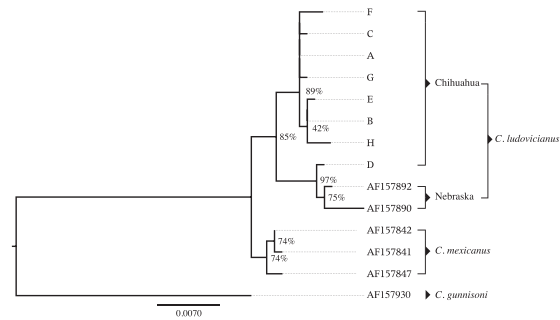


FIG. 2.—Maximum-likelihood genealogy from Janos, Chihuahua, Mexico, black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) cytochrome-*b* (*Cytb*) haplotypes (A–H) with bootstrap branch support values. Values near nodes are bootstrap values greater than 40%. Other sequences used were from Harrison et al. (2003) and obtained from GenBank.

data. Moreover, of the 13 mutations found, 9 were synonymous substitutions and 4 (sites 695, 700, 895, and 905) were replacement substitutions. However, 5 sites were potentially parsimony informative. Eight distinct haplotypes (A–H) were found and sequences were deposited in GenBank with accession numbers JQ885584, JQ885585, JQ885586, JQ885587, JQ885588, JQ885589, JQ885590, and JQ885591 (Supporting Information S1, DOI: 10.1644/12-MAMM-A-099.S1).

Regarding the phylogenetic relationship between haplotypes, the genealogy obtained through maximum likelihood (Fig. 2) depicted that haplotype D is more related to the haplotypes of *C. ludovicianus* from Nebraska (Harrison et al. 2003) than to the rest of the haplotypes found in the population. The other 7 haplotypes constitute a monophyletic group. Branch bootstrap values gave good support to the external nodes, but there was not good resolution on the phylogenetic relationship between haplotypes A, B, C, E, F, G, and H, which were closely related. Haplotypes from *C. ludovicianus* and *C. mexicanus* formed 2 well-differentiated monophyletic groups in the genealogy. The haplotype network, in agreement with the maximum-likelihood genealogy, depicted 1 group of closely related haplotypes. Haplotype D was the most divergent (Supporting Information S2, DOI: 10.1644/12-MAMM-A-099.S2).

Haplotypes A and B were the most common, found in 46.5% and 24.8% of the individuals throughout the colonies. In addition, 3 haplotypes (C, D, and E) represented 12.1%, 5.7%, and 5.1% of the amplified samples. The rest of the haplotypes (F–H) accounted for 5.7% of the samples and were found in only 1 colony each (F: MO, $n = 4$; G: AB, $n = 2$; and H: LB, $n = 1$). Furthermore, none of the colonies was fixed for only 1 haplotype (Table 1; Fig. 1). Haplotype diversity for the 13 sampling colonies was 0.704 (Table 1). Mean nucleotide diversity was 0.00162 ($SD = 0.001$).

Genetic structure analysis points toward significant overall mitochondrial genetic structure ($F_{ST} = 0.271$, $P < 0.0001$;

TABLE 2.—Components of an analysis of molecular variance (AMOVA—Excoffier et al. 1992) of mitochondrial DNA cytochrome-*b* sequences (mtDNA AMOVA; F_{ST}) and nuclear microsatellite loci (microsatellite AMOVA; ϕ_{ST}) from 13 colonies of black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) from Janos, Chihuahua, Mexico. Significant values of genetic structure (F_{ST} and ϕ_{ST}) and significant inbreeding coefficients (ϕ_{IS} , R_{IS} , ϕ_{IT} , and R_{IT}) values were found within the population.

Source of variation	% variation	F coefficients	
mtDNA AMOVA			
Among colonies	27.1	F_{ST}	0.271
Within colonies	72.8		
Microsatellite AMOVA			
Among colonies	10.3	ϕ_{ST}	0.103
Within colonies	16.1	ϕ_{IS}	0.180
Between individuals within colonies	73.6	ϕ_{IT}	0.264

Table 2). The AMOVA revealed that there was more within-colony (72.8%) than among-colony (27.1%) variation.

Analysis of genetic differentiation (pairwise F_{ST} [Supporting Information S3, DOI: 10.1644/12-MAMM-A-099.S3]) showed that 3 colonies were highly differentiated (significant pairwise F_{ST} for all comparisons; CJ, MO, and EC), 4 colonies had intermediate differentiation ($> 50\%$ pairwise F_{ST} comparisons were significant), and 6 colonies presented low values of genetic differentiation ($\leq 50\%$ pairwise F_{ST} comparisons were significant). Minimum estimated distances between colonies ranged from 1.4 to 30.8 km and isolation by distance was nonsignificant ($P = 0.137$). Furthermore, *Cytb* genetic differentiation was not related to colony area or population size ($R^2_{11} = 0.087$, $P = 0.328$, and $R^2_{11} = 0.136$, $P = 0.215$, respectively).

Microsatellites.—All 10 analyzed loci were polymorphic (2–4 alleles per locus), rendering a total of 34 alleles. Furthermore, all loci were polymorphic for all black-tailed prairie dog colonies, except UN, which was monomorphic for 4 of the loci. Tests for artifacts associated with microsatellite loci did not detect the presence of null alleles or linkage disequilibrium (data not shown). Nevertheless, 3 of 10 loci deviated from Hardy–Weinberg equilibrium (A101, A104, and C116), and 8 of the 13 sampled colonies showed heterozygote deficiency (Table 1).

In terms of genetic variation, allelic richness (A) estimated through rarefaction resulted in 1.6–3.0 mean alleles per colony, and no private alleles were found. Mean genetic diversity (H_E) was 0.525 ($SD = 0.11$), with values ranging from 0.276 ($SD = 0.25$) to 0.618 ($SD = 0.09$).

Nuclear genetic structure ($F_{ST} = 0.103$, $P < 0.0001$; $G''_{ST} = 0.272 \pm 0.06 SE$, $P = 0.001$) and fixation index ($F_{IS} = 0.18$ and $F_{IT} = 0.264$; $P < 0.0001$) values were significant (Table 2), with the highest percentage of variation distributed between individuals within colonies (73.6). Once correcting for the no-admixture prior because of the presence of 2 mitochondrial lineages in the population and setting parameters as described in methods, the test of Evanno et al. (2005) indicated the presence of 2 clusters ($K = 2$ [Supporting Information S4, DOI:

10.1644/12-MAMM-A-099.S4]). From the total number of individuals 56.9% were assigned within 95% confidence to either cluster. This result suggests high admixture within the population. Within the assigned individuals, most samples from colonies CJ, LC, and UN were assigned to cluster 1 (100% from CJ and LC, and 83.3% from UN), whereas cluster 2 was composed of individuals from all remaining colonies. When examining genetic structure within each cluster, cluster 1 presented low genetic structure ($F_{ST} = 0.038$), and cluster 2 showed a value closer to that estimated for the entire sample ($F_{ST} = 0.117$).

Finally, genetic differentiation was significant for most pairwise comparisons (Supporting Information S5, DOI: 10.1644/12-MAMM-A-099.S5) and isolation by distance, estimated through a Mantel test, was nonsignificant ($r = -0.189$, $P = 0.095$). Genetic differentiation (G''_{ST}) was significant and negatively correlated to colony area ($R^2_{11} = 0.333$, $P = 0.023$; Fig. 3A) and population size ($R^2_{11} = 0.360$, $P = 0.03$; Fig. 3B).

DISCUSSION

The black-tailed prairie dog population from Janos possesses certain characteristics (large size, absence of plague, protected status, and peripheral and declining population) that allowed the proposition of 2 distinct predictions regarding its genetic variation and genetic structure. We expected to find that the black-tailed prairie dogs from Janos possess a relatively high level of genetic variation and low genetic structure because of the large size of the population, the absence of plague, and protected status. Nevertheless, there are other factors about this population such as recent population decline and peripheral effects (small effective population size and isolation) that could result in relatively low genetic variation and an increase in genetic structure.

Our results show that despite the fact that the black-tailed prairie dog population of Janos is peripheral, its genetic diversity is comparable to that reported for other parts of the range, and this population may serve, not only because of its ecological importance (Ceballos et al. 2005) but because of its genetic variation, as a refuge for the species in the long term. As expected, there was significant genetic structure for both molecular markers, significantly more within- than among-colony variation for both markers in accordance with black-tailed prairie dog social organization, and higher F_{ST} -value for maternally inherited DNA than for biparentally inherited DNA related to female philopatry and male-biased gene flow. Finally, colony area and population size had a significant negative correlation to genetic differentiation for nuclear microsatellite loci, but not for *Cytb*. These results point toward an increased effect of genetic drift in smaller and less-dense colonies because of recent habitat fragmentation only on nuclear markers, whereas genetic differentiation for maternally inherited DNA can be related to female philopatry.

The genealogic relationship between *Cytb* haplotypes implies that the black-tailed prairie dogs of Janos represent a population where admixture or introgression, or both, or

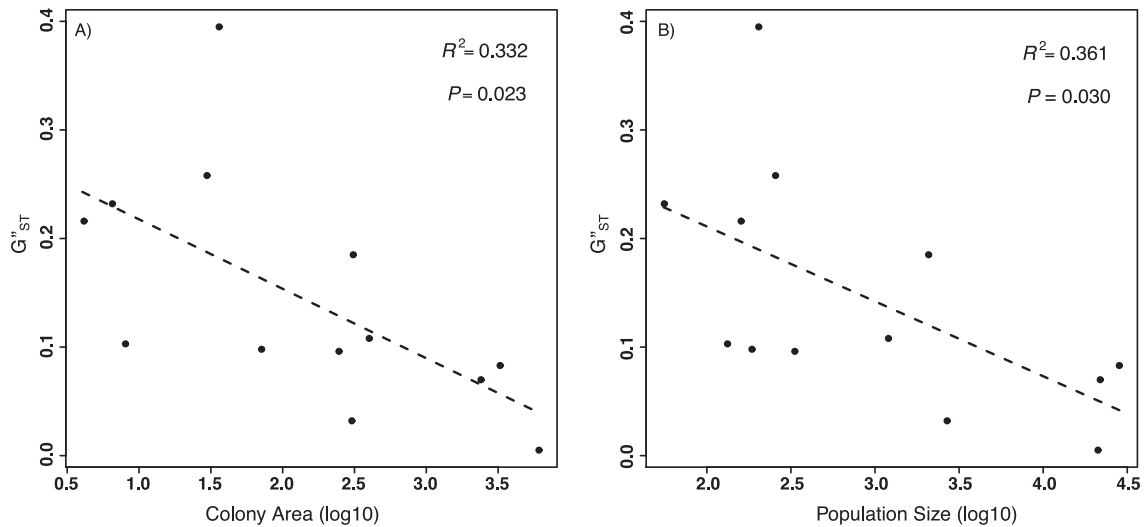


FIG. 3.—Linear regression for black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) microsatellite genetic differentiation (pairwise G''_{ST} —Meirmans and Hedrick 2011). A) Colony area (\log_{10}) and B) population size (\log_{10}). Significance (R^2 and P -value) for each regression is depicted on the upper right corner of each graph. Both regressions were negative and significant.

incomplete lineage sorting between 2 mitochondrial lineages has occurred. Studies addressing the phylogeographic history of black-tailed prairie dog populations throughout their geographic range are, nevertheless, absent. Therefore, data from Sciuridae phylogeographic studies, conducted on a larger geographical scale where a great genetic subdivision could be observed (Hewitt 2001), were used for comparison (Table 3). Nucleotide diversity was lower in Janos than reported for other species, but the presence of 8 haplotypes and 2 lineages in a small area of the species distribution suggests a moderate amount of variation. Variation at this locus relates to maternal inheritance of mtDNA and female philopatry that contribute to large effective female population sizes, which is reflected in high genetic variation (Chesser and Baker 1996).

Nuclear genetic diversity (H_E) was neither significantly lower when compared with other black-tailed prairie dog populations throughout their range or with other prairie dog species (*C. parvidens* and *C. gunnisoni* [Table 3; Haynie et al. 2003]). These results imply that the genetic diversity is within the range reported for other colonies and other members of the genera. This contrasts with the concept that peripheral populations possess less genetic variability than populations located at the center of the distribution (Eckert et al. 2008).

Relative to the nonsignificant F_{IS} -values reported for colonies in Colorado, the values from Janos were significant and similar to those found in Montana. Previous studies have reported that the presence of coterries increases genetic structure and F_{IS} -values (Chesser 1983, 1991a, 1991b; Dobson et al. 1997, 1998, 2004). In addition, significant F_{IS} -values have been associated with the Wahlund effect and population bottlenecks (Chesser 1983; Sugg et al. 1996). Despite the fact

that trapping was planned to reduce this type of sampling bias, the Wahlund effect cannot be completely discarded. To distinguish between significant F_{IS} -values related to habitat fragmentation and artifacts associated to the Wahlund effect, sampling family groups within colonies should be considered in further research.

Higher global F_{ST} -values for *Cytb* than for microsatellite DNA markers (0.233 and 0.103) are consistent with female philopatry and male-biased gene flow (Hoogland 1996). The presence of male-biased gene flow is further corroborated by high admixture between the clusters obtained with *Structure* (Pritchard et al. 2000) and the lack of private alleles for nuclear loci. Nevertheless, significant pairwise genetic differentiation between colonies contrasts with this idea and, together with a major portion of the genetic variation within colonies, may relate to differential allele fixation within each family group (Dobson et al. 2004).

Consistent with previous findings (Chesser 1983; Hulová and Sedláček 2008), the Mantel test was nonsignificant, suggesting no isolation by distance for both types of molecular markers. Similarly, lack of isolation by distance in prairie dogs and other sciurids has been linked to the effect of genetic drift, founder events, and mutation.

Lomolino and Smith (2001) stated that colony area is the main factor affecting extinction risk in plague-free black-tailed prairie dog populations and in Janos nuclear microsatellite genetic structure had a negative correlation with population size and colony area. Contrasting results for each molecular marker support the concept of genetic differentiation in microsatellites because of habitat fragmentation, and a stronger effect of genetic drift in smaller and less-dense populations

TABLE 3.—Population genetic studies performed on different species belonging to the family Sciuridae, including *Cynomys ludovicianus*. A) Data for cytochrome-*b* (*Cytb*), including sample size (*n*), number of localities, haplotype number (*h*), nucleotide diversity (π), and haplotype diversity (*Hd*). B) Data for microsatellites, including sample size (*n*), number of microsatellite loci, allelic richness (*A*), genetic diversity (expected heterozygosity [H_E]), Student's *t*-test *P*-value, inbreeding coefficient (F_{IS}), and genetic structure (F_{ST}).

Reference	Species	Study site	<i>n</i>	No. localities	<i>h</i>	π (SD)	<i>Hd</i> (SD)	No. loci	<i>A</i> (SD) (alleles per locus)	H_E (SD)	Student's <i>t</i> -test <i>P</i> -value	F_{IS}	F_{ST}
A) <i>Cytb</i>													
Bell et al. 2010	<i>Xerospermophilus tereticaudus</i>	Mojave and Sonora deserts	38	14	16	0.00789 (0.0011) ^a	—						
	<i>X. mohavensis</i>	Mojave Desert	46	11	8	0.00171 (0.00026) ^a	—						
Cook et al. 2010	<i>Spermophilus parryi</i>	Kodiak and Aleutian archipelagos and Kavalga Island	75	12	18	0.0072 (0.00026) ^a	—						
Grill et al. 2009	<i>Sciurus vulgaris</i>	Europe	83	5	21	0.00672 (0.00114)	0.736 (0.049)						
Moncrief et al. 2010	<i>Sciurus niger</i>	Eastern North America	102	18	22	0–0.007	—						
Current analysis	<i>C. ludovicianus</i>	Chihuahua, Mexico	152	1	8	0.0016 (0.001)	0.704 (0.03)						
B) Microsatellite													
Haynie et al. 2003	<i>C. gunnisoni</i>	Arizona	378					7	4.29 (1.7) (2–6)	0.49 (0.26)	0.435	—	—
Haynie et al. 2003	<i>C. parvidens</i>	Utah	145					7	3 (1) (2–4)	0.33 (0.3) (1996)	0.215	—	—
			225							0.34 (0.3) (1997)	0.195	—	—
Roach et al. 2001	<i>C. ludovicianus</i>	Colorado (Pawnee National Park)	129					7	3.9 (0.61) ^b (4–13)	0.602 (0.09) ^b	0.069	0.02	0.12
Jones and Britten 2010	<i>C. ludovicianus</i>	Montana	112					14	3.4 (1.16) (2–6)	0.54 (0.2)	0.971	0.17	0.12–0.19
Magle et al. 2010	<i>C. ludovicianus</i>	Colorado (urban)	101					10	3.1 (0.63) ^b (2.4–3.9)	0.524 (0.1) ^b	0.69	0.007	0.24
Sackett et al. 2012	<i>C. ludovicianus</i>	Colorado (urban)	510					11	9.3 (6–14)	0.663	—	—	0.109
Current analysis	<i>C. ludovicianus</i>	Chihuahua, Mexico	160					10	3.4 (0.8) (2–4)	0.53 (0.11)	—	0.18	0.10

^a Nucleotide diversity values estimated through popset obtained from GenBank using DnaSP version 5.0 (Librado and Rozas 2009) when information was not available.

^b Mean and standard deviation estimated from reported data when information was not available.

(Frankham et al. 2002), whereas female philopatry had a stronger effect on mtDNA.

Black-tailed prairie dogs from Janos possess a good amount of genetic variation despite being a peripheral and declining population. Although recent habitat fragmentation has affected genetic differentiation between colonies, social organization and its strong influence on genetic structure has preserved the genetic variation within colonies. To further assess the importance of this population and determine if this peripheral population is genetically divergent from core populations we need to go from local to regional scales. Fundamental information for understanding the evolutionary and ecological relationships between locations throughout the species distribution is needed to advance further black-tailed prairie dog conservation.

RESUMEN

En Norte América, la fragmentación del hábitat inducida por el hombre ha provocado una reducción considerable de las poblaciones de perros llaneros de cola negra (*Cynomys ludovicianus*). Aunque el área ocupada por las colonias de perros llaneros en Chihuahua, al noroeste de México, también se ha reducido recientemente, esta población ha sido menos afectada por la perturbación humana. Se analizaron secuencias del citocromo *b* (*Cytb*) y 10 microsatélites nucleares en 13 colonias para poner a prueba si la población de perros llaneros de cola negra de Janos posee niveles de variación genética relativamente altos y baja estructura genética debido a su gran tamaño, ausencia de peste y estatus de protección; o si la disminución poblacional reciente y los efectos periféricos han resultado en la presencia de baja variación y alta estructura genética. Los análisis sugieren que la variación genética mitocondrial es moderada con relación a otros sciúridos y que la variación genética nuclear no es significativamente distinta en relación a otras poblaciones de perros llaneros. Además, de acuerdo con la organización social de los perros llaneros de cola negra, la estructura genética entre poblaciones locales fue significativa y la variación hacia el interior de las colonias fue mayor que entre las colonias para ambos marcadores. Con relación a la filopatría de las hembras y la dispersión sesgada hacia los machos, la F_{ST} fue mayor para el ADN mitocondrial que para el ADN nuclear. Finalmente, para los marcadores nucleares se encontró una correlación negativa entre la diferenciación genética y el área de la colonia y el tamaño poblacional, lo que sugiere un incremento en el efecto de la deriva génica en las colonias más pequeñas y menos densas como resultado de la fragmentación del hábitat reciente. En conclusión, la estructura social y el patrón de dispersión ha mantenido la variación genética de los perros llaneros de cola negra de Janos a pesar de considerarse una población periférica y en declive.

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to the Posgrado en Ciencias Biológicas of the Universidad Nacional Autónoma de México. Special thanks to R. List,

R. Ávila, A. de Villa, A. Montiel, and field volunteers. Estación Biológica de la Pradera provided materials, support, and manpower for fieldwork. D. Piñero and L. Eguiarte from the Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, provided laboratory resources for DNA extraction, molecular amplification, and analysis. L. Jardón, A. Moreno-Letelier, E. Scheinvar, and A. Vázquez-Lobo provided advice for laboratory work and data analysis. C. Sánchez-Giraldo and R. Ávila-Flores provided relative density estimates for Janos' colonies. R. List, L. Eguiarte, C. A. Rooks, and S. Ramirez-Barahona reviewed and improved an early draft. We are thankful to F. S. Dobson and an anonymous reviewer for their comments and improvements on an earlier version of this manuscript. L. F. Castellanos improved the artwork. We are thankful to the people from Janos and Casas Grandes, Chihuahua, and to PRONATURA A. C., The Nature Conservancy, and Rancho El Uno who gave permission to work on their land. Funding was provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (grant 10927), Instituto Politécnico Nacional (projects SIP 20082950 and SIP 20090474), Kaplan Foundation (project ECO-IE 267), and R. Ávila.

SUPPORTING INFORMATION

SUPPORTING INFORMATION S1.—Sequence name, GenBank accession number, sample size (n), and segregating sites (base pairs) for the 8 cytochrome-*b* (*Cytb*) haplotypes found in black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) from Janos, Chihuahua, Mexico. There were 13 segregating sites, of which 9 were synonymous changes (sites 126, 198, 216, 486, 501, 648, 699, 912, and 1047) and 4 were amino acid replacement changes (sites 695, 700, 895, and 905). Haplotype D presented the highest number of differences (9) with respect to the most common nucleotide in the other haplotypes.

Found at DOI: 10.1644/12-MAMM-A-099.S1

SUPPORTING INFORMATION S2.—Haplotype network overlaid on sampled black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) colonies from Janos, Chihuahua, Mexico. On top is an unweighted pair-group method using arithmetic means (UPGMA) phenogram depicting genetic differentiation estimated through Nei's genetic distance. The size of each pie graph represents the frequency of each haplotype (letters A–H); texture corresponds to each cluster of the UPGMA phenogram.

Found at DOI: 10.1644/12-MAMM-A-099.S2

SUPPORTING INFORMATION S3.—Genetic differentiation for 13 black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) colonies from Janos, Chihuahua, Mexico, obtained through pairwise F_{ST} -values for cytochrome-*b* (*Cytb*) sequences.

Found at DOI: 10.1644/12-MAMM-A-099.S3

SUPPORTING INFORMATION S4.—Bayesian clustering analysis of black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) from Janos, Chihuahua, Mexico, as detected by *Structure* 2.2. Individuals from 13 colonies grouped in 2 genetic clusters ($K = 2$). White represents cluster 1, and dark gray represents cluster 2. Fifty percent of individuals show admixture, and most individuals of colonies CJ, LC, and UN were assigned to cluster 1.

Found at DOI: 10.1644/12-MAMM-A-099.S4

SUPPORTING INFORMATION S5.—Genetic differentiation for 13 black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) colonies from Janos, Chihuahua, Mexico, obtained through 10 nuclear microsatellite loci. Below diagonal are pairwise R_{ST} estimates (* nonsignificant values; $P > 0.05$); above diagonal are Hedrick's standardized G_{ST} (G'_{ST}). High genetic differentiation between colonies was found, and the highest significant values were present in colonies CJ, LC, and UN.

Found at DOI: 10.1644/12-MAMM-A-099.S5

LITERATURE CITED

- ANTOLIN, M. F., L. T. SAVAGE, AND R. J. EISEN. 2006. Landscape features influence genetics structure of black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*). *Landscape Ecology* 21:867–875.
- ANTOLIN, M. F., B. VAN HORNE, M. D. BERGER, JR., A. K. HOLLOWAY, J. L. ROACH, AND R. D. WEEKS, JR. 2001. Effective population size and genetic structure of a Piute ground squirrel (*Spermophilus mollis*) population. *Canadian Journal of Zoology* 79:26–34.
- ARBOGAST, B. S., R. A. BROWNE, P. D. WEIGL, AND G. J. KENAGY. 2005. Conservation genetics of endangered flying squirrels (*Glaucomys*) from the Appalachian Mountains of eastern North America. *Animal Conservation* 8:123–133.
- ARNAUD-HAOND, S., ET AL. 2006. Genetic structure at range edge: low diversity and high inbreeding in Southeast Asian mangrove (*Avicennia marina*) populations. *Molecular Ecology* 15:3515–3525.
- ÁVILA-FLORES, R. 2009. Black-tailed prairie dog declines in northwestern Mexico: species-habitat relationship in a changing landscape. Ph.D. dissertation, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.
- BARRAT, E. M., J. GURNELL, G. MALARKY, R. DEAVILLE, AND M. W. BRUFORD. 1999. Genetic structure of fragmented populations of red squirrel (*Sciurus vulgaris*) in the UK. *Molecular Ecology* 8:S55–S63.
- BELL, K. C., D. J. HAFNER, P. LETNER, AND M. D. MATOCCO. 2010. Phylogeography of the ground squirrel subgenus *Xerospermophilus* and assembly of the Mojave Desert biota. *Journal of Biogeography* 37:363–378.
- BOUZAT, J. L., AND K. JOHNSON. 2004. Genetic structure among closely spaced leks in a peripheral population of lesser-prairie chickens. *Molecular Ecology* 13:499–505.
- BROOKFIELD, J. F. Y. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* 5:453–455.
- CEBALLOS, G., ET AL. 2010. Rapid decline of a grassland system and its ecological and conservation implications. *PLoS ONE* 5:e8562.
- CEBALLOS, G., R. LIST, J. PACHECO, P. MANZANO-FISHER, G. SANTOS, AND M. ROYO. 2005. Prairie dogs, cattle and crops: diversity and conservation of the grassland–shrubland habitat mosaic in northwestern Chihuahua. Pp. 425–438 in *Biodiversity, ecosystems and conservation in northern Mexico* (J. Cartron, G. Ceballos, and R. Gelger, eds.). Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- CEBALLOS, G., E. MELLINK, AND L. R. HANEBURY. 1993. Distribution and conservation status of prairie dogs *Cynomys mexicanus* and *Cynomys ludovicianus* in Mexico. *Biological Conservation* 63:105–112.
- CHAPUIS, M. P., AND A. ESTOUP. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24:621–631.
- CHESSER, R. K. 1983. Genetic variability within and among populations of the black-tailed prairie dog. *Evolution* 37:320–331.
- CHESSER, R. K. 1991a. Gene diversity and female philopatry. *Genetics* 127:437–447.
- CHESSER, R. K. 1991b. Influence of gene flow and breeding tactics on gene diversity within populations. *Genetics* 129:573–583.
- CHESSER, R. K., AND R. J. BAKER. 1996. Effective sizes and dynamics of uniparentally and diparentally inherited genes. *Genetics* 144:1225–1235.
- CLEMENT, M., D. POSADA, AND K. A. CRANDALL. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9:1657–1659.
- COOK, J. A., A. A. EDDINGSAAS, J. L. LOXTERMAN, S. EBBERT, AND S. O. MACDONALD. 2010. Insular arctic ground squirrels (*Spermophilus parryi*) of the North Pacific: indigenous or exotic? *Journal of Mammalogy* 91:1401–1412.
- DALEY, J. G. 1992. Population reductions and genetic variability in black-tailed prairie dogs. *Journal of Wildlife Management* 56:212–220.
- DiBATTISTA, J. 2008. Patterns of genetic variation in anthropogenically impacted populations. *Conservation Genetics* 9:141–156.
- DINERSTEIN, E., ET AL. 2000. *Ecoregional-based conservation in the Chihuahuan Desert: a biological assessment and biodiversity vision*. World Wildlife Fund, Washington, D.C.
- DOBSON, F. S., R. K. CHESSER, J. L. HOOGLAND, D. W. SUGG, AND D. W. FOLTZ. 1997. Do black-tailed prairie dogs minimize inbreeding? *Evolution* 51:970–978.
- DOBSON, F. S., R. K. CHESSER, J. L. HOOGLAND, D. W. SUGG, AND D. W. FOLTZ. 1998. Breeding groups and gene dynamics in a socially structured population of prairie dogs. *Journal of Mammalogy* 79:671–680.
- DOBSON, F. S., R. K. CHESSER, J. L. HOOGLAND, D. W. SUGG, AND D. W. FOLTZ. 2004. The influence of social breeding groups on effective population size in black-tailed prairie dogs. *Journal of Mammalogy* 85:58–66.
- DRAY, S., AND A. B. DUFOUR. 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software* 22:1–20.
- EARL, D. A., AND B. M. VON HOLDT. 2011. *Structure HARVESTER*: a website and program for visualizing *Structure* output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4:359–361.
- ECKERT, C. G., K. E. SAMIS, AND C. LOUGHEED. 2008. Genetic variation across species' geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology* 17:1170–1188.
- ERSTS, P. J. 2011. *Geographic Distance Matrix Generator* (version 1.2.3). Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation. http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg. Accessed 13 May 2008.
- EVANNO, G., S. REGNAUT, AND J. GOUDET. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software *Structure*: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611–2620.
- EWING, B., L. HILLIER, M. WENDL, AND P. GREEN. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. I. Accuracy assessment. *Genome Resources* 8:175–185.
- EXCOFFIER, L., G. LAVAL, AND S. SCHNEIDER. 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47–50.
- EXCOFFIER, L., P. SMOUSE, AND J. M. QUATTRO. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479–491.
- FOLTZ, D. W., AND J. L. HOOGLAND. 1983. Genetic evidence of outbreeding in the black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*). *Evolution* 37:273–281.
- FRANKHAM, R., J. D. BALLOU, AND D. A. BRISCOE. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- GAINES, M. S., J. E. DIFFENDORFER, R. H. TAMARIN, AND T. S. WHITAM. 1997. The effects of habitat fragmentation on the genetic structure of small mammal populations. *Journal of Heredity* 88:294–304.
- GARNER, T. W. J., P. B. PEARMAN, AND S. ANGELONE. 2004. Genetic diversity across a vertebrate species' range: a test of the central–peripheral hypothesis. *Molecular Ecology* 13:1047–1053.
- GOODMAN, S. J., ET AL. 2001. Bottlenecks, drift and differentiation: the population structure and demographic history of sika deer (*Cervus*

- nippon*) in the Japanese archipelago. *Molecular Ecology* 10:1357–1370.
- GORDON, D., C. ABAJIAN, AND P. GREEN. 1998. *Consed*: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research* 8:195–202.
- GOUDET, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Accessed 1 June 2010.
- GRATIVOL, A. D., J. D. BALLOU, AND R. C. FLEISCHER. 2001. Microsatellite variation within and among recently fragmented populations of the golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*). *Conservation Genetics* 2:1–9.
- GRILL, A., ET AL. 2009. Molecular phylogeography of European *Sciurus vulgaris*: refuge within refugia? *Molecular Ecology* 18:2687–2699.
- GUINDON, S., AND O. GASCUEL. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52:696–704.
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series* 41:95–98.
- HARRISON, R. G., S. M. BOGDANOWICZ, R. S. HOFFMANN, E. YENSEN, AND P. W. SHERMAN. 2003. Phylogeny and evolutionary history of the ground squirrels (Rodentia: Marmotinae). *Journal of Mammalian Evolution* 10:249–276.
- HAYNIE, M. L., R. A. VAN DEN BUSSCHE, J. L. HOOGLAND, AND D. A. GILBERT. 2003. Parentage, multiple paternity, and breeding success in Gunnison's and Utah prairie dogs. *Journal of Mammalogy* 84:1244–1253.
- HEDRICK, P. W. 2005. *Population genetics*. Jones and Bartlett Publishers, Burlington, Massachusetts.
- HEWITT, G. M. 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography— or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 10:537–549.
- HIGUCHI, R. 1989. Rapid efficient DNA extraction for PCR from cells or blood. *Amplifications* Perkin-Elmer Corporation 2:1–4.
- HOLSINGER, K. E., AND B. S. WEIR. 2009. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . *Nature Reviews Genetics* 10:639–550.
- HOOGLAND, J. L. 1996. *Cynomys ludovicianus*. *Mammalian Species* 535:1–10.
- HULOVÁ, S., AND F. SEDLÁČEK. 2008. Population genetic structure of the European ground squirrel in the Czech Republic. *Conservation Genetics* 9:615–625.
- JONES, P. H., AND H. B. BRITTEN. 2010. The absence of concordant population genetic structure in the black-tailed prairie dog and the flea, *Oropsylla hirsuta*, with implications for the spread of *Yersinia pestis*. *Molecular Ecology* 19:2038–2049.
- JONES, R. T., A. P. MARTIN, A. J. MITCHELL, S. K. COLLINGE, AND C. RAY. 2005. Characterization of 14 polymorphic microsatellite markers for the black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*). *Molecular Ecology Notes* 5:71–73.
- KALENDAR, R., D. LEE, AND A. H. SCHULMAN. 2011. Java web tools for PCR, *in silico* PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics* 98:137–144.
- KALINOWSKI, S. T. 2004. Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. *Conservation Genetics* 5:539–543.
- KALINOWSKI, S. T. 2005. HP-Rare 1.0: a computer program for performing rarefaction measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes* 5:187–189.
- KARK, S., ET AL. 2008. How does genetic diversity change towards the range periphery? An empirical and theoretical test. *Evolutionary Ecology Research* 10:391–414.
- LESICA, P., AND F. W. ALLENDORF. 1995. When are peripheral populations valuable for conservation? *Conservation Biology* 9:753–760.
- LIBRADO, P., AND J. ROZAS. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452.
- LIST, R., O. PERGMANS, J. PACHECO, J. CRUZADO, AND G. CEBALLOS. 2010. Genetic divergence on the Chihuahuan meadow vole (*Microtus pennsylvanicus chihuahuensis*) and conservation implications of marginal population extinctions. *Journal of Mammalogy* 91:1093–1101.
- LOMOLINO, M. V., AND G. A. SMITH. 2001. Dynamic biogeography of prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) towns near the edge of their range. *Journal of Mammalogy* 82:937–945.
- MAGLE, S. B., E. W. RUELL, M. F. ANTOLIN, AND K. R. CROOKS. 2010. Population genetic structure of black-tailed prairie dogs, a highly interactive species in fragmented urban habitat. *Journal of Mammalogy* 91:326–335.
- MARTÍNEZ-CRUZ, B., J. A. GODOY, AND J. J. NEGRO. 2004. Population genetics after fragmentation: the case of the endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*). *Molecular Ecology* 13:2243–2255.
- MEIRMANS, P. G., AND P. W. HEDRICK. 2011. Assessing population structure: F_{ST} and related measures. *Molecular Ecology Resources* 11:5–18.
- MEIRMANS, P. G., AND P. H. VAN TIENDEREN. 2004. GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity for asexual organisms. *Molecular Ecology Notes* 4:792–794.
- MILLER, B., ET AL. 2000. The role of prairie dogs as a keystone species: response to Stapp. *Conservation Biology* 14:318–321.
- MONCRIEF, N. D., J. B. LACK, AND R. A. VAN DEN BUSSCHE. 2010. Eastern fox squirrel (*Sciurus niger*) lacks phylogeographic structure: recent range expansion and phenotypic differentiation. *Journal of Mammalogy* 91:1112–1123.
- PACHECO J., ET AL. 2009. Decline in geographic distribution of the black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) in Mexico. P. 143 in 10th International Mammalogical Congress abstracts (E. Nevo, M. Mares, C. Johnson, G. Marroig, and P. A. Marquet, eds.). Mendoza, Argentina.
- POSADA, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25:1253–1256.
- PRITCHARD, J. K., M. STEPHENS, AND P. DONNELLY. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.
- PURRENHAGE, J. L., P. H. NIEWIAROWSKI, AND F. B. G. MOORE. 2009. Population structure of spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*) in a fragmented landscape. *Molecular Ecology* 18:235–247.
- RAYMOND, M., AND F. ROUSSET. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248–249.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2009. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.R-project.org>. Accessed 15 November 2011.
- ROACH, J. L., P. STAPP, B. VAN HORNE, AND M. F. ANTOLIN. 2001. Genetic structure of a metapopulation of black-tailed prairie dogs. *Journal of Mammalogy* 82:946–959.
- ROGELL, B., H. THÖRNGREN, S. PALM, A. LAURILA, AND J. HÖGLUND. 2010. Genetic structure in peripheral populations of the natterjack toad, *Bufo calamita*, as revealed by AFLP. *Conservation Genetics* 11:173–181.
- SACKETT, L. C., ET AL. 2012. Connectivity of prairie dog colonies in an altered landscape: inferences from analysis of microsatellite DNA variation. *Conservation Genetics* 13:407–418.

- SÁNCHEZ-GIRALDO, C. 2012. Determinación de los efectos potenciales de la sequía, peste bubónica y reintroducción de hurones de patas negras (*Mustela nigripes*) en una población de perros llaneros (*Cynomys ludovicianus*) mediante el uso de un análisis de viabilidad poblacional. M.S. thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Distrito Federal, México.
- SAUNDERS, D. A., R. J. HOBBS, AND C. R. MARGULES. 1991. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conservation Biology* 5:18–32.
- SCHWARTZ, M. K., K. RALLS, D. F. WILLIAMS, B. L. CYPHER, K. L. PILGRIM, AND R. C. FLEISCHER. 2005. Gene flow among San Joaquin kit fox populations in a severely changed ecosystem. *Conservation Genetics* 6:25–37.
- SEMARNAT. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental—especies 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.
- SEMARNAT. 2009. Decreto por el que se declara como área natural protegida, con el carácter de reserva de la biosfera, la zona conocida como Janos, localizada en el Municipio de Janos, en el Estado de Chihuahua. *Diario Oficial de la Federación* Diciembre 8:9–18.
- SIKES, R. S., W. L. GANNON, AND THE ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY OF MAMMALOGISTS. 2011. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy* 92:235–253.
- SLOBODCHIKOFF, C. N., B. S. PERLA, AND J. L. VERDOLIN. 2009. *Prairie dogs: communication and community in an animal society*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- SUGG, D. W., R. K. CHESSEY, F. S. DOBSON, AND J. L. HOOGLAND. 1996. Population genetics meets behavioral ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 11:338–342.
- TRUDEAU, K. M., H. B. BRITTON, AND M. RESTANI. 2004. Sylvatic plague reduces genetic variability in black-tailed prairie dogs. *Journal of Wildlife Diseases* 40:205–211.
- VAN OOSTERHOUT, C., W. F. HUTCHINSON, D. P. M. WILLS, AND P. SHIPLEY. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535–538.
- WEIR, B. S., AND C. C. COCKERHAM. 1984. Estimating F -statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358–1370.
- WILLIAMS, B. L., J. D. BROWN, AND K. N. PAIGE. 2003. Landscape scale genetic effects of habitat fragmentation on a high gene flow species: *Speyeria idalia* (Nymphalidae). *Molecular Ecology* 12:11–20.
- WILSON, A. C., ET AL. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society* 26:375–400.

Submitted 9 April 2012. Accepted 23 January 2014.

Associate Editor was Burton K. Lim.

1 **SUPPORTING INFORMATION**

2

3 **SUPPORTING INFORMATION S1.-** Sequence name, GeneBank accession number, sample size (N) and segregating sites (bp) for the eight *Cyt-b*
 4 haplotypes found in black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) from Janos, Chihuahua. There were 13 segregating sites of which nine were
 5 synonymous changes (sites 126, 198, 216, 486, 501, 648, 699, 912 and 1047) and four were amino acid replacement changes (sites 695, 700, 895 and 905).
 6 Haplotype D presented the highest number of differences (9) with respect to the most common nucleotide in the other haplotypes

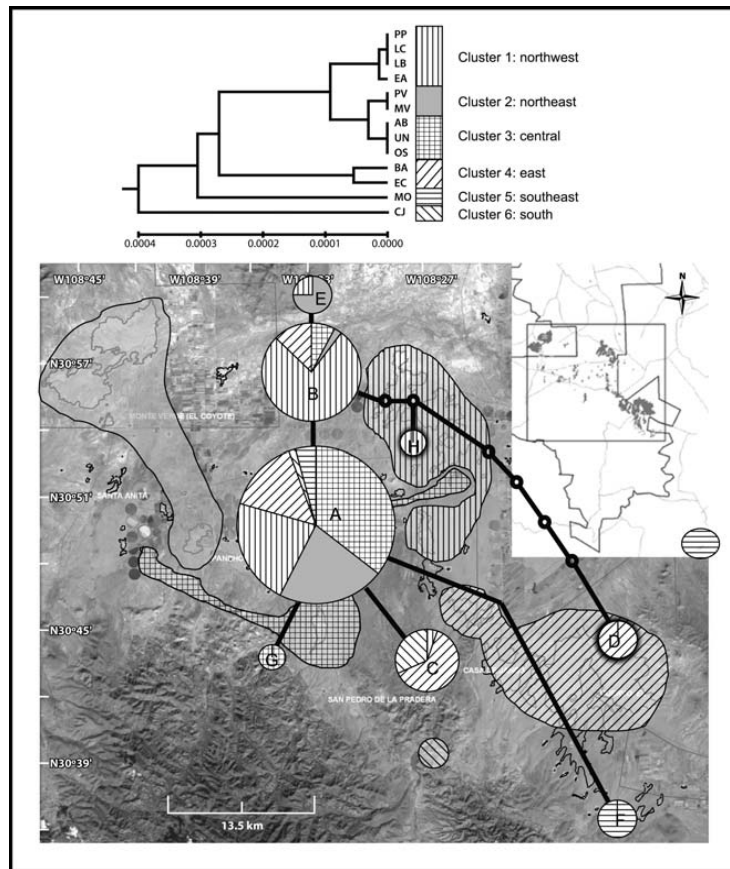
7

Haplotype	GeneBank Accession number	N	Segregating sites (bp)												
			126	198	216	486	501	648	695	699	700	895	905	912	1047
A	JQ885584	72	T	C	T	A	T	C	T	C	T	C	C	T	C
B	JQ885585	35	•	•	•	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•
C	JQ885586	19	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•
D	JQ885587	9	C	T	C	•	•	•	C	T	C	•	T	C	T
E	JQ885588	8	C	•	•	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•
F	JQ885589	6	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•
G	JQ885590	2	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•
H	JQ885591	1	•	•	•	G	•	•	C	T	C	•	•	•	•

8

9

10 **SUPPORTING INFORMATION S2.-** Haplotype network overlaid on sampled black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) colonies from Janos,
11 Chihuahua. On top is a UPGMA phenogram depicting genetic differentiation estimated through Nei's genetic distance. The size of each pie graph
12 represents the frequency of each haplotype (letters A to H), texture corresponds to each cluster of the UPGMA phenogram
13



14

15

16

SUPPORTING INFORMATION S3.- Genetic differentiation for 13 black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) colonies from Janos, Chihuahua

17

obtained through pairwise F_{ST} values for *Cyt-b* sequences

18

	AB	BA	CJ	EA	EC	LB	LC	MO	MV	OS	PP	PV	UN
AB													
BA	0.102												
CJ	0.631*	0.234*											
EA	0.182	0.074	0.665*										
EC	0.198*	0.029	0.124*	0.230*									
LB	0.345*	0.188*	0.575*	0.063	0.287*								
LC	0.335*	0.069	0.718*	0	0.235*	0							
MO	0.463*	0.215*	0.734*	0.532*	0.256*	0.527*	0.599*						
MV	0.084	0.068	0.554*	0.026	0.205*	0.167*	0.114*	0.426*					
OS	0.029	0.129	0.793*	0.276*	0.222*	0.415*	0.499*	0.603*	0.109				
PP	0.449*	0.146*	0.753*	0.055	0.311*	0	0	0.644*	0.229*	0.574*			
PV	0.151	0.036	0.556*	0.063	0.172*	0.130*	0.117	0.438*	0	0.226*	0.231*		
UN	0	0.022	0.699*	0.049	0.141*	0.241*	0.242*	0.486*	0	0	0.379*	0.046	

19

* $p < 0.05$

20

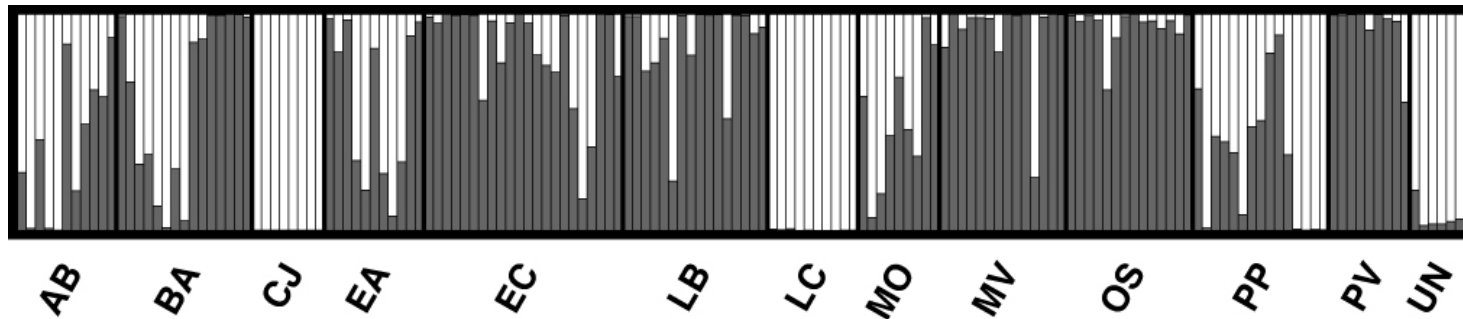
21 **SUPPORTING INFORMATION S4.-** Genetic differentiation for 13 black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) colonies from Janos, Chihuahua
22 obtained through ten nuclear microsatellite loci. Below diagonal are pairwise R_{ST} estimates (* non-significant values; $p > 0.05$); above diagonal are
23 Hedrick's standardized G_{ST} (G'_{ST}). High genetic differentiation between colonies was found, and the highest significant values were present in CJ, LC
24 and UN
25

Colony	AB	BA	CJ	EA	EC	LB	LC	MO	MV	OS	PP	PV	UN
AB	-	0.229	0.346	0.213	0.179	0.233	0.374	0.301	0.283	0.357	0.366	0.394	0.561
BA	0.165	-	0.283	0.042	0.064	0.214	0.284	0.200	0.201	0.218	0.198	0.277	0.546
CJ	0.206	0.273	-	0.237	0.303	0.379	0.049	0.277	0.378	0.408	0.196	0.514	0.402
EA	0.087	0.072*	0.214	-	0.014	0.144	0.246	0.132	0.125	0.159	0.130	0.203	0.434
EC	0.088	0.062	0.237	0.021*	-	0.014	0.301	0.135	0.049	0.061	0.137	0.144	0.418
LB	0.108	0.149	0.28	0.068	0*	-	0.389	0.171	0.052	0.037	0.212	0.229	0.395
LC	0.232	0.358	0.089*	0.255	0.268	0.28	-	0.396	0.411	0.455	0.157	0.442	0.501
MO	0.093	0.149	0.217	0.035*	0.075	0.092	0.278	-	0.156	0.151	0.178	0.239	0.303
MV	0.165	0.185	0.362	0.09	0.039*	0.031*	0.357	0.131	-	0.074	0.246	0.084	0.480
OS	0.218	0.151	0.359	0.105	0.021*	0.033*	0.361	0.152	0.047	-	0.127	0.229	0.455
PP	0.153	0.14	0.162	0.059	0.073	0.109	0.22	0.042*	0.139	0.079	-	0.244	0.456
PV	0.241	0.25	0.443	0.136	0.134	0.186	0.458	0.132	0.094	0.145	0.142	-	0.620
UN	0.239	0.363	0.231	0.284	0.254	0.236	0.214	0.199	0.365	0.364	0.244	0.47	-

26

27

28 **SUPPORTING INFORMATION S5.-** Bayesian clustering analysis of black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) from Janos, Chihuahua as
29 detected by Structure 2.2. Individuals from 13 colonies grouped in two genetic clusters ($K = 2$). White represents Cluster 1, and dark grey Cluster 2. Fifty
30 percent of individuals show admixture, and most individuals of colonies CJ, LC and UN were assigned to Cluster 1
31



32
33
34
35

Apéndice 2. Correspondencia geográfica de los principales linajes de ardillas (Sciuridae): revisión filogenética de las ardillas del mundo.

Introducción

Las ardillas se clasifican dentro del orden Rodentia y constituyen la familia Sciuridae. La familia Sciuridae es una de las familias de mamíferos más diversa y ha sido estudiada de manera muy amplia y desde diversos puntos de vista, incluyendo aspectos ecológicos, conductuales, morfológicos y de biología reproductiva (Harrison et al. 2003; Mercer y Roth 2003; Steppan et al. 2004). Presentan una gran diversidad de sistemas sociales (desde solitarios hasta altamente sociales) y habitan una gran diversidad de hábitats (bosques cerrados a desiertos) (Mercer y Roth 2003; Steppan et al. 2004). Esta familia está conformada por 278 especies contenidas en 50 géneros y en 2 subfamilias que contienen a las ardillas voladoras (Pteromyinae) y las ardillas terrestres y las ardillas arborícolas (Sciurinae) (Mercer y Roth 2003; Steppan et al. 2004; Roth y Mercer 2008). De acuerdo con Steppan et al. (2004) se reconocen 10 tribus dentro de la familia que se describen en el cuadro A.2.1.

Cuadro A.2.1. Tribus que conforman a la familia *Sciuridae*, distribución geográfica y número de especies por tribu (Steppan et al. 2004).

Tribu	Nombre común	Distribución	Número de Especies
1) Callosciurini	ardillas arborícolas	Reino biogeográfico Oriental	57
2) Funambulini	ardillas rayadas Asiáticas, predominantemente arborícolas y semiarborícolas	Reinos biogeográficos Oriental y Etiope	26
3) Marmotini	marmotas, perros de las praderas, ardillas terrestres, ardillas listadas	Holárticas	87
4) Microsciurini	ardillas arborícolas enanas	Neotropicales	5
5) Protoxerini	ardillas arborícolas y de arbustos africanas	África	10
6) Ratufini	ardillas arborícolas gigantes	Sudeste de Asia	4
7) Sciurillini	ardilla arborícola pigmea	Amazonia	1
8) Sciurini	ardillas arborícolas	Gran diversidad en el Neotrópico pero algunos grupos son Holárticos	29
9) Tamiasciurini	ardilla roja y ardillas de las rocas	Holárticas	5
10) Xerini	ardillas terrestres Afro-Asiáticas	África y Asia	6

Las ardillas son roedores diurnos morfológicamente primitivos que divergieron temprano (Mercer y Roth 2003). Los roedores presentan cuatro incisivos grandes para roer que crecen durante toda su vida, carecen de caninos y presentan un hueco o diastema entre los incisivos y los premolares. Además, presentan ocho dientes adicionales ubicados en cuatro hileras localizadas dos en la mandíbula y dos en la maxila y están constituidas por un premolar pequeño y deciduo y tres molares enraizados. La fórmula dental de las ardillas es: $1/1, 0/0, 1 - 2/1, 3/3 = 20 - 22$. Las características morfológicas que distinguen a los sciúridos de otros roedores son la estructura del cráneo y la posición del canal infraorbital en relación al sistema dental. La placa zigomática del sistema zigomasetérico se encuentra adherida al rostro del cráneo; a esta disposición se le ha denominado sistema zigomasetérico sciuromorfo o sciuromorfa (Carleton y Musser 2005). En las ardillas, el cráneo tiene una construcción ligera con proceso post-orbital largo, la apertura infra-orbital es pequeña y el paladar es amplio (Flower 1978).

Típicamente, las ardillas poseen colas esponjosas del mismo largo que el cuerpo, el pelaje es suave y las orejas puntiagudas. Sin embargo, algunas especies poseen un pelaje áspero y espinoso, y otras especies presentan pelos largos que se extienden desde las punta de las orejas. La mayoría de las ardillas presentan bolsas en los cachetes llamadas abazones que utilizan para almacenar alimento (sus cachetes se agrandan para contener más alimento durante cada evento de alimentación). Las ardillas pueden variar en tamaño desde muy pequeñas (*Myosciurus pumilio* de 10 gramos) hasta muy grandes (*Marmota marmota* de 3 a 8 kilogramos). También se presenta variación en la coloración del pelo que incluye negro, blanco, rojo y café. Las ardillas tienen extremidades traseras con cinco dígitos mientras que las extremidades delanteras presentan cuatro dígitos. Además, presentan garras en todas las falanges terminales excepto el pulgar. Las ardillas terrestres tienden a tener extremidades delanteras grandes y amplias, con el dígito medio más largo. Sus extremidades son cortas y fuertes, ya que son utilizados para cavar y su cola es corta. Las ardillas arborícolas tienen extremidades largas y musculosas, orejas largas y colas largas y esponjosas. Además, sus miembros traseros presentan articulaciones dobles, con cuatro dedos y un pulgar vestigial que les permite trepar a los árboles rápidamente. Las ardillas voladoras se caracterizan por su membranas para planear. Esta membrana está constituida por un patagio cubierto de pelo que se une a los antebrazos por un cartílago stiliforme en la muñeca y se extiende al talón en las extremidades posteriores. Las ardillas voladoras presentan las

extremidades más largas dentro del grupo en función del tamaño del cuerpo (The tree of life 2015; Animal diversity 2015).

Las primeras ocurrencias fósiles en cada continente sugieren que las ardillas se originaron en el Hemisferio norte y se diseminaron rápidamente. El primer fósil (*Douglassciurus jeffersoni*) hallado en el oeste de Norteamérica data del Eoceno tardío, hace aproximadamente 36 millones de años (mda) (Mercer y Roth 2003; Roth y Mercer 2008). Esta especie carecía del arreglo de músculos masticatorios típico de las ardillas modernas (sciuromorfa), sin embargo, comparte varias características del esqueleto de las ardillas arbóreas del Nuevo Mundo como *Sciurus*. Los fósiles Sciuriformes más tempranos en Europa datan del Oligoceno temprano, y en África, el fósil más antiguo es del Mioceno. En Sudamérica no hay evidencia de la presencia de ardillas hasta hace aproximadamente 3.1 mda, momento en que se estableciera el puente terrestre panameño que conecta Norte y Sudamérica (Mercer y Roth 2003). Además, con base en el registro fósil se ha propuesto que las ardillas voladoras (subfamilia *Pteromyinae*) tuvieron un origen independiente de las ardillas arborícolas y terrestres (subfamilia *Sciurinae*), con lo que se ha justificado la división actual de la familia en estas dos subfamilias (Mercer y Roth 2003).

De acuerdo con el análisis filogenético realizado por Mercer y Roth (2003), la divergencia de los 5 clados principales tuvo lugar en el Eoceno (54 a 38 mda) y Oligoceno temprano (38 a 23 mda), y estudios previos sugieren que el cambio global ha dirigido la diversificación a gran escala dentro de esta familia de mamíferos (Mercer y Roth 2003). Sin embargo, sus relaciones filogenéticas aún no son bien comprendidas (Steppan et al. 2004) y hasta el momento diversos estudios moleculares han intentado desentrañarlas sin llegar a un consenso claro respecto a la relación entre tribus (Herron et al. 2004; Mercer y Roth 2003; Steppan et al. 2004) y la relación entre géneros y especies dentro de las tribus (Fernández 2012; Harrison et al. 2003, 2005; Helgen et al. 2009; Piaggio y Spicer 2001).

Los Sciuridos se distribuyen en todos los continentes, exceptuando la Antártica y Australia y el estudio de su diversificación a escalas taxonómicas finas puede proveer inferencias acerca de la tectónica de placas, el nivel del mar y el clima de cada región (Mercer y Roth 2003). Asimismo, el amplia distribución del grupo y la consistencia geográfica de los clados que lo constituyen pueden ser un indicador importante de las relaciones biogeográficas entre los continentes y de la historia evolutiva de componentes clave de la diversidad de mamíferos. Roth y Mercer (2008) estimaron las tasas de especiación para las tribus de ardillas arborícolas. Estos

autores reportan que la tasa de acumulación de especies en la familia Sciuridae es relativamente baja en comparación con otros grupos de roedores y con otras familias como Bovidae y Cricetidae, y relacionan este hallazgo con la presencia de una dieta generalista en ardillas. Sin embargo, al analizar la tasa de especiación en las tribus que componen a Sciuridae, ésta es más alta, particularmente para los grupos que se distribuyen en el Neotrópico, y la tasa de especiación en las ardillas Sciurini de Sudamérica es especialmente alta. Estos autores proponen que los grupos de más rápida diversificación son relativamente jóvenes.

En México se distribuyen 7 géneros y 35 especies de sciúridos pertenecientes a las subfamilias *Pteromyinae* (*Glaucomys volans*) y *Sciurinae*. Dentro de *Sciurinae*, las tribus distribuidas en México son: *Marmotini*, *Tamiasciurini* y *Sciurini*. De las 35 especies reportadas, 21 son de hábitos terrestres y 14 son arborícolas. La mayoría de las especies son de distribución amplia, aunque en México se han reportado 13 especies endémicas (el 37% de las ardillas distribuidas en México). Algunas especies endémicas son de origen reciente y se ha propuesto que su divergencia ocurrió a partir de poblaciones relictuales que se separaron de las especies más cercanas por los cambios ocurridos durante la última glaciación como *Xerospermophilus perotensis*, *Callospermophilus madrensis*, *Cynomys mexicanus* y *Tamiasciurus mearnsi* (Valdés Alarcón 2003). La alta diversidad de especies endémicas de ardillas en México y su origen relativamente reciente sugiere que el cambio climático del Pleistoceno pudo promover la rápida diversificación de algunos géneros de ardillas.

De acuerdo con la Norma Ecológica Mexicana (NOM-ECOL-059-2010), el 55.7% de los roedores mexicanos (131 especies) se encuentran enlistados en alguna categoría de riesgo. De estos, 15 especies pertenecen a la familia Sciuridae y 10 de éstas son endémicas. Por categoría de riesgo, observamos que 7 especies de ardilla están sujetas a protección especial, 8 especies están amenazadas y una especie se encuentra en peligro de extinción (*Cynomys mexicanus*) (SEMARNAT 2010). Al comparar este listado con la lista roja de la IUCN, sólo dos especies de sciúridos mexicanos, ambos endémicos, se encuentran enlistados como en peligro de extinción: *Cynomys mexicanus* y *Xerospermophilus perotensis* (IUCN 2015).

El objetivo de este meta-análisis es determinar las relaciones evolutivas de Sciuridos por medio de análisis filogenéticos y determinar la correspondencia geográfica de los clados que componen a esta familia. Este análisis constituye una primera aproximación para más adelante estimar las tasas de especiación de las ardillas terrestres distribuidas en Norteamérica y

determinar si hubo un proceso de rápida diferenciación relacionada con los cambios climáticos del Pleistoceno. Se utilizaron secuencias de citocromo *b* obtenidos del GeneBank y se construyeron árboles filogenéticos de Parsimonia y Máxima Verosimilitud. Finalmente, se indicaron las áreas de distribución (América, Europa, Asia, Eurasia y África) de cada especie en la filogenia.

Método

Se revisaron artículos publicados en los que se aborde la filogenia de la familia Sciuridae dentro del orden Rodentia. Se realizó una búsqueda de secuencias de nucleótidos en el GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) usando como palabras clave “Sciuridae + nombre del gen”. La búsqueda se enfocó principalmente al citocromo *b* (*cit-b*), la región control y la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI), ya que son los marcadores reportados con mayor frecuencia para mamíferos. Además, se buscaron secuencias de distintos genes nucleares ampliamente utilizados en estudios filogenéticos como: RAG I y II, IRBP y GHR (Adkins et al. 2001; Meyer y Zardoya 2003; Wadell y Shelley 2003; Baker et al. 2004; Stepan et al. 2004, 2007; Lecompte et al. 2008; Numone et al. 2007; Fernández 2012; por nombrar algunos). Las secuencias fueron descargadas en formato fasta y alineadas con el programa Clustal W (Thompson et al. 1994). Se evaluó la representación de cada género dentro de los listados y se utilizó el marcador con mejor representación para realizar los análisis filogenéticos. Se determinó que el marcador con mayor número de especies representadas es el citocromo *b*, marcador molecular ampliamente utilizado para realizar reconstrucción filogenética de mamíferos. Se descargaron 1130 secuencias, que fueron revisadas. Se eliminaron aquellas secuencias repetidas y, utilizando el programa Geneious 6.1 (Biomatters 2013), se eligieron las secuencias más divergentes dentro de cada especie cuando se encontraron más de 3 secuencias distintas.

La aproximación filogenética se llevo a cabo utilizando los métodos de Parsimonia y Máxima verosimilitud. Se utilizó el programa PAUP 4.0 (Swofford 1999) para construir un árbol de Parsimonia. Se realizó una búsqueda heurística con 100 replicas utilizando los parámetros proporcionados por default y tratando a los gaps como “missing data”. Para determinar la confianza de los patrones de ramificación del árbol se realizó un análisis de bootstrap con búsqueda heurística utilizando 100 iteraciones al azar. Finalmente se construyó un árbol de consenso estricto a partir de 100 árboles.

Por otra parte, con el programa jModelTest (Posada 2008) se determinó el modelo de sustitución que mejor ajusta a los datos. El modelo de sustitución que se ajusta a los datos de citocromo *b* fue GTR+I+ Γ (“General Time Reversible”, Tavaré 1986). Incorporando este modelo de sustitución, se obtuvo un árbol de Máxima Verosimilitud con el programa PhyML 3.0 (Guidon et al. 2010) utilizando un árbol inicial BioNJ, un patrón de búsqueda NNI y obteniendo el valor de soporte de las ramas (SH-like) por medio del “Approximate likelihood ratio test”.

Como grupo externo para ambos análisis, se incorporaron las 10 especies utilizadas por Herron et al. (2004) (*Allactaga elater*, *Anomalurus sp.*, *Aplodontia rufa*, *Castor fiber*, *Cavia porcellus*, *Eliomys quercinus*, *Glis glis*, *Graphirus murinus*, *Idirus macrotis* y *Pedetes sudaster*).

Se obtuvo información referente al área de distribución de cada una de las especies dentro de la familia (Wilson y Reeder 1993) y en el árbol filogenético se señaló aquellas especies distribuidas en Norte-América, Sudamérica, Asia, África y Eurasia utilizando el programa FigTree v. 1.2.2. (Rambaut 2009; <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) con la finalidad de observar la concordancia geográfica de los clados.

Resultados

Se utilizaron un total de 347 secuencias del gen del citocromo *b* del ADN mitocondrial obtenidas del GenBank (anexo A.2.1) con longitudes de 967 a 1140 pares de bases que abarcan 27 géneros, 131 especies y 6 tribus (anexo A.2.2), además de las 10 especies reportadas por Herron et al. (2004) como grupo externo. Se analizaron 961 sitios y, al excluir las secuencias de los grupos externos, se observó que 352 de los sitios fueron monomórficos y 609 fueron variables. Entre los sitios variables 92 fueron singletons y 517 fueron sitios informativos de la parsimonia (229 con dos variantes, 113 con 3 variantes y 175 con 4 variantes). Además, al realizar el análisis por codones, se observaron 241 mutaciones en 151 sitios segregantes, 210 de los cambios resultaron sinónimos y 31 fueron cambios de reemplazo.

El árbol de parsimonia (Fig. A.2.1) arrojó seis clados principales que representan a las tribus Marmotini, Callosciurini, Tamiasciurini, Sciurini, Pteromyinae y Xerini. Siendo Xerini el clado basal que se asocia con los grupos externos. Las tribus Tamiasciurini y Sciurini están estrechamente relacionadas dentro de un clado, mientras que Pteromynae y Marmotini conforman otro clado. Dentro de cada una de las tribus la mayoría de los géneros resultaron monofiléticos con excepción de *Glaucmys sabrinus* y *Petaurista philippensis* (Pteromynae), *Marmota bobak*,

Xerospermophilus spilosoma, *Ictidomys mexicanus*, *Urocitellus townsendi*, *U. richardsonii*, *U. parryii*, *Spermophilus erythrogenys*, *Tamias umbrinus* y *T. minimus* (Marmotini) y *Tamiops mccllellandi* (Callosciurini).

Por otra parte, el análisis de máxima verosimilitud (Fig. A.2.2) también arrojó seis clados principales, con valores de soporte cercanos a 1, que representan a las tribus: Marmotini, Callosciurini, Tamiasciurini, Sciurini, Pteromyinae y Xerini. En este caso la tribu Marmotini queda como el grupo basal. Algunas secuencias no fueron asignadas al clado correspondiente al género que pertenece: 1) Una secuencia de *Ictidomys tridecemlineatus* quedó inserta en el clado conformado por *Spermophilus musicus* y *S. pygmaeus*; 2) Una secuencia de *Callospermophilus madrensis* quedó inserta en el clado conformado por *Xerospermophilus perotensis* y *X. spilosoma*; 3) *Marmota bobak* quedó como rama basal del clado en el que se encuentran la mayoría de los géneros que conforman a la tribu Marmotini. Además, una secuencia de *Xerus inauris* fue asignada a una tribu completamente distinta quedando dentro del clado de *Tamiasciurus hudsonicus*. Sin embargo, el soporte de las ramas de estas relaciones fue muy bajo. La mayoría de las relaciones entre especies fueron monofiléticas exceptuando a *Spermophilus citellus*, *S. erythrogenys*, *Ictidomys tridecemlineatus* e *I. mexicanus*, *Xerospermophilus mohavensis* y *X. spilosoma*, *Otospermophilus variegatus*, *O. beecheyi*, *Tamias umbrinus*, *T. minimus* y *T. townsendii* (Marmotini), *Dremomys pernyi*, *Tamiops swinhoei* y *T. maritimus* (Callosciurini), *Glaucomys sabrinus* y *Petaurista philippensis* (Pteromyinae).

En cuanto a la consistencia geográfica de los clados (Figs. A.2.1 y A.2.2; anexo A.2.2), observamos que dentro de la tribu Marmotini la mayoría de los géneros se distribuyen en Norteamérica, salvo *Marmota*, *Spermophilus*, *Urocitellus* y *Tamias* que tienen representantes con distribución en Asia y Europa. Dentro del género *Marmota*, 6 especies se distribuyen en Norteamérica, 5 en Asia, una en Eurasia y una en Europa, la mayoría de especies con distribución en Asia se agrupan salvo por *M. mezbieri* y *M. caudata*. Además *M. bobak* con distribución en Eurasia queda inserta en el clado principal de las especies que se distribuyen en Asia. Las especies de *Marmota* que se distribuyen en Norteamérica conforman 3 clados distintos: 1) *M. vancouverensis*, *M. caligata*, *M. olympus* y *M. flaviventris*, 2) *M. broweri* y 3) *M. monax*. La ubicación filogenética de *M. marmota* con distribución en Europa es incierta, siendo en el caso de la máxima verosimilitud (Fig. A.2.2) basal a los clados de *M. broweri* y *M. caudata* con distribución en Norteamérica y Asia respectivamente y en el caso de la parsimonia (Fig. A.2.1)

queda como especie hermana de *M. monax* con distribución en Norteamérica. Por otra parte, el género *Spermophilus* tiene sus representantes en Asia y Europa distribuidos en distintos clados que podrían sugerir varios eventos de dispersión entre estas áreas geográficas (Figs. A.2.1 y A.2.2). Sólo una especie del género *Urocitellus* se distribuye en Asia (*U. undulatus*) y el resto en Norteamérica, sugiriendo un posible evento de colonización desde Norteamérica a Asia. Finalmente, dentro del género *Tamias* observamos que únicamente *T. sibiricus* se distribuye fuera de Norteamérica, en Eurasia, y conforma un linaje bien diferenciado del resto de las ardillas de este género.

Dentro de la familia Pteromyinae, la mayoría de las especies se distribuyen en Asia, salvo las dos especies del género *Glaucomyys* que se distribuyen en Norteamérica y las dos especies del género *Pteromys* que se encuentran en Eurasia. Esto sugiere un evento de colonización desde Asia a Norteamérica por el ancestro de *Glaucomyys* y la posible diferenciación de *P. volans* en Asia.

En cuanto a la tribu Xerini, los representantes del género *Xerus* son endémicos de África aunque el género hermano *Spermophilopsis* se distribuye en Asia. Dentro de la tribu Sciurini las especies del género *Sciurus* se distribuyen en Asia, Sudamérica y Norteamérica, y la topología del clado señala una posible dispersión de Asia a Norteamérica y desde Norteamérica hacia Sudamérica. Finalmente, la especie representante de la tribu Tamiasciurus se distribuye en Norteamérica y los géneros que conforman la tribu Callosciurini se encuentran únicamente en Asia.

Discusión

Se observó alta riqueza de especies de Sciuridos en el hemisferio norte, y varias tribus con eventos de diversificación en Norteamérica. Sin embargo, observamos que existe un sesgo importante en el muestreo que favorece a las especies que habitan el hemisferio norte. En este sentido no se han reportado secuencias completas de citocromo *b* de las especies que conforman las tribus Funambulini, Protoxerini y Xerini que se distribuyen principalmente en África. Además, de las secuencias descargadas para las especies representantes de la tribu Sciurini, se encontraron secuencias de las especies norteamericanas y asiáticas, y una par de las especies sudamericanas. Éste representa un sesgo en el muestreo importante ya que la totalidad de la

diversidad de ardillas que se encuentra en Sudamérica está conformada por especies pertenecientes a la tribu Sciurini.

Los clados más cercanos a la raíz están conformados por especies que se distribuyen principalmente en Asia, lo cual podría sugerir que el origen de los Sciuridos se encuentra en este continente y es consistente con datos previos que sugieren que esta familia surgió en el hemisferio norte (Mercer y Roth 2003). Sin embargo, existe controversia respecto al origen asiático o norteamericano, ya que el fósil más antiguo que se ha relacionado con la familia es *Douglasciurus jeffersoni* que se encontró en California y data del Eoceno medio (aprox. 36 millones de años) (Mercer y Roth 2003).

En cuanto a la relación entre las tribus, Herron et al. (2004) mencionan que en estudios previos basados en caracteres morfológicos se ha relacionado cercanamente a la tribu Marmotini con la tribu Sciurini, mientras que en el estudio molecular realizado por Mercer y Roth (2003) con varios genes nucleares y mitocondriales esta relación no es consistente. Estos autores encontraron una relación cercana entre Marmotini, Xerini y Protoxerini, mientras Sciurini se relaciona cercanamente con Tamiasciurini. Herron et al. (2004) en su análisis de parsimonia, realizado con secuencias de citocromo *b*, determinaron que Callosciurini es el clado basal de la familia y Sciurini se encuentra cercanamente relacionado con Tamiasciurini. En nuestro análisis de parsimonia la tribu Marmotini está más cercanamente relacionada con las ardillas voladoras (Pteromyinae) y, de acuerdo con lo reportado por Mercer y Roth (2003) y Herron et al. (2004), Sciurini se relaciona cercanamente con Tamiasciurini, mientras que en el análisis de máxima verosimilitud la tribu Marmotini se ubica como rama basal de la familia Sciuridae y la relación entre Sciurini y Tamiasciurini se mantiene. Herron et al. (2004) atribuyen las discrepancias en los resultados al sesgo en el muestreo taxonómico que limita las conclusiones con respecto a las relaciones más profundas entre los sciúridos. Es necesario enriquecer las bases de datos con secuencias completas de citocromo *b* para todas las especies de sciúridos, o al menos un representante por género y complementarlo con secuencias de genes nucleares.

En cuanto a las relaciones parafiléticas entre especies hermanas, diversos autores han abordado el problema en especies particulares. Fernández (2012) en un análisis de la relación filogenética y la biogeografía de *Xerospemophilus pilosoma* y *X. perotensis* concluyó que los datos sugieren que *X. perotensis* es en realidad una población aislada de *X. pilosoma* y que este hecho no necesariamente garantiza el mantener el nivel de especie para la ardilla endémica del

Perote. Sin embargo, un evento de especiación reciente (especiación incipiente) también puede resultar en esta conformación parafilética. Es necesario analizar secuencias provenientes de toda el área de distribución de *X. spilosoma* para determinar la posible presencia de clados o linajes bien diferenciados en ésta y su relación con *X. perotensis*.

Por otra parte, Piaggio y Spicer (2001) analizaron las relaciones entre las diversas especies de *Tamias* y sugieren que los clados hallados dentro del género representan 5 grupos de especies: 1) *Tamias amoenus*, 2) *T. townsendii*, 3) *T. quadrivittatus*, 4) *T. minimus* y 5) *T. merriami*. Además, discuten que estos grupos presentan correspondencia geográfica clara y que la diversificación del género se puede explicar por eventos de especiación alopátrica impulsada por exclusión competitiva. Herron et al. (2005) analizaron las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Xerus* y apoyan que la divergencia de las 4 especies que lo conforman se relaciona con un corredor árido presente desde el Cuerno de África hasta el cabo de Buena Esperanza.

Por otra parte, de acuerdo con lo mencionado por Mercer y Roth (2003), existe concordancia geográfica entre las especies representantes de cada género. Estos autores logran relacionar los eventos de diversificación con eventos geológicos particulares en cada área geográfica y proponen una única colonización de Sudamérica coincidente con el establecimiento del Istmo de Panamá, así como dos eventos de colonización hacia África por poblaciones provenientes de Eurasia. Sin embargo, el muestreo de especies presentado por los autores es limitado ya que utilizan uno o dos representantes de cada género. El análisis más fino, utilizando secuencias de varias de las especies representantes de cada género, señala la presencia de patrones de diversificación y dispersión complejos hacia el interior de cada tribu. Esta información nos permite formular hipótesis relacionadas con diversas colonizaciones desde Asia a Norteamérica. Sin embargo aún falta llenar huecos de información que permitan realizar análisis más robustos para establecer predicciones relacionadas con el origen geográfico de cada una de las tribus y los posibles eventos de dispersión. Asimismo, realizar análisis que combinen datos morfológicos, moleculares y de registro fósil permitirán explorar de manera más adecuada las relaciones filogenéticas dentro de la familia, particularmente a nivel de géneros y especies hermanas (ver Ronquist et al. 2012). Un estudio con estas características permitiría determinar las fechas de divergencia entre especies hermanas de manera más exacta y asociarlas con eventos geológicos y climatológicos específicos. Además, este enfoque permitiría estimar las tasas de

evolución molecular, y probar hipótesis relacionadas con la heterogeneidad de las tasas de especiación dentro y entre tribus y posibles eventos de radiación como el sugerido por Piaggio y Spicer (2001) para las ardillas del género *Tamias*.

Conclusiones

- Las relaciones filogenéticas de las tribus que conforman la familia Sciuridae son complejas, de manera que no se ha llegado a un consenso claro al respecto. Con la finalidad de dilucidar estas relaciones es necesario tener una mejor representación de las especies que conforman cada género. En particular, se requiere una mejor representación de las especies que habitan el hemisferio sur.
- Para resolver las relaciones parafiléticas entre especies hermanas es necesario realizar estudios filogeográficos que consideren un muestreo amplio de cada especie en toda su área de distribución.
- Existe concordancia geográfica en los clados que conforma a esta familia y su análisis a nivel fino permitirá plantear hipótesis relacionadas con centros de origen, eventos de dispersión y eventos de diversificación y relacionarlos con eventos geológicos y climatológicos que pudieron ser importantes en la conformación de las biotas de distintas áreas geográficas.

Referencias

- Adkins RM, Gelke EL, Rowe D, Honeycutt RL. 2001. Molecular phylogeny and divergence time estimates for major rodent groups: evidence from multiple genes. *Molecular Biology and Evolution* 18:777-791.
- Baker ML, Wares JP, Harrison GA, Miller RD. 2004. Relationships among the Families and Orders of marsupials and the major mammalian lineages based on recombination activating gene-1. *Journal of Mammalian Evolution* 11:1-16.
- Biomatters 2013. Geneious 6.1 disponible en <http://www.geneious.com/>.
- Fernández JA. 2012. Phylogenetics and biogeography of the microendemic rodent *Xerospermophilus perotensis* (Perote ground squirrel) in the Oriental Basin of Mexico. *Journal of Mammalogy* 93:1431-1439. DOI: 10.1644/11-MAMM-A-409.1.

- Guidon S, Dufayard JM, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59(3):307-321.
- Herron MD, Castoe TA, Parkinson CL. 2004. Sciurid phylogeny and the paraphyly of Holarctic ground squirrels (*Spermophilus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31:1015-1030.
- Herron MD, Waterman JM, Parkinson CL. 2005. Phylogeny and historical biogeography of African ground squirrels: the role of climate change in the evolution of *Xerus*. *Molecular Ecology* 14:2773-2788.
- Harrison RG, Bogdanowicz SM, Hoffmann RS, Yensen E, Sherman PW. 2003. Phylogeny and Evolutionary History of the Ground Squirrels (Rodentia: Marmotinae). *Journal of Mammalian Evolution* 10(3):249-273.
- Lecompte E, Aplin K, Denys C, Catzeflis F, Chades M, Chevret P. 2008. Phylogeny and biogeography of African Murinae based on mitochondrial and nuclear gene sequences, with new tribal classification of the subfamily. *BMC Evolutionary Biology* 8:199.
- Mercer JM, Roth VL. 2003. The effects of Cenozoic global change on squirrel phylogeny. *Science* 299:1568-1572.
- Meyer A, Zardoya R. 2003. Recent advances in the (molecular) phylogeny of vertebrates. *Annual Reviews in Ecology, Evolution and Systematics* 34:311-338.
- Numone M, Yasuda SP, Sato JJ, Vogel P, Suzuki H. 2007. Phylogenetic relationships and divergence times among dormice (Rodentia, Gliridae) based on three nuclear genes. *Zoologica Scripta* 36:537-546.
- Piaggio AJ, Spicer GS. 2001. Molecular phylogeny of the chipmunks inferred from mitochondrial cytochrome *b* and cytochrome oxidase II gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20(3):335-350.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25(7):1253-1256.
- Rambaut A. 2009. FigTree v1.3.1 2006-2009. Available with the program package at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Ronquist F, Klopfstein S, Vilhelmsen L, Schulmeister S, Murray DL, Rasnitsyn AP. 2012. A Total-evidence approach to dating with fossils. applied to the early radiation of the Hymenoptera. *Systematic Biology* 61(6):973-999.

- Roth JM, Mercer VL. 2008. Differing rates of macroevolutionary diversification in arboreal squirrels. *Current Science* 97:857-861.
- Steppan SJ, Storz BL, Hoffmann RS. 2004. Nuclear DNA phylogeny of the squirrels (Mammalia: Rodentia) and the evolution of arboreality from c-myc and RAG1. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30:703-719.
- Steppan SJ, Ramirez O, Banbury J, Huchon D, Pacheco V, Walker LI, Spotorno AE. 2007. A molecular reappraisal of the systematics of the leaf-eared mice *Phyllotis* and their relatives. En Kelt DA, Lessa EP, Salazar-Bravo J, Patton JL (eds.). 2007. *The quintessential naturalist: honoring the life and legacy of Oliver P. Pearson*. University of California Publications in Zoology 134:1-981.
- Swofford DL. 1999. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer, Sunderland, MA.
- Tavaré S. 1986. Some probabilistical and statistical problems in the analysis of DNA sequences. En: Miura (ed.) Some mathematical questions in biology/DNA sequence analysis. American Mathematical Society, Providence, RI pp 57-86.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Resources* 22(22):4673-4680.
- Wadell PJ, Shelley S. 2003. Evaluating placental inter-ordinal phylogenies with novel sequences including RAG1, γ -fibrinogen, ND6, y mt-tRNA, plus MCMC-driven nucleotide, amino acid, and codón models. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28:197-224.
- Wilson DE, Reeder DAM. 1993. *Mammal species of the World: taxonomic and geographic reference*. Segunda edición. Smithsonian Institution Press, Washington D. C., 1206 pp.

FIGURAS

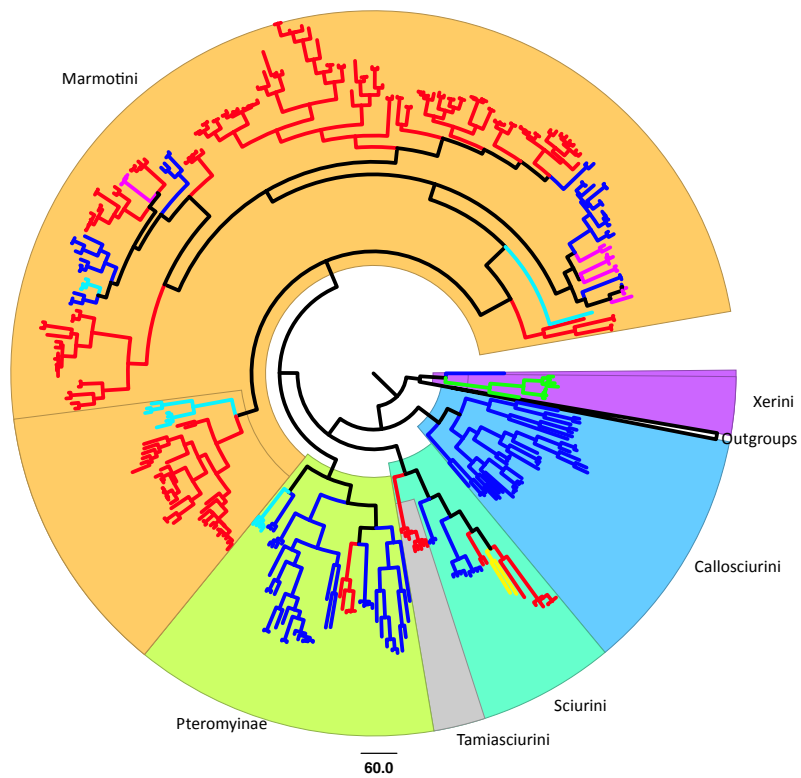


Figura A.2.1 Árbol consenso estricto obtenido con Parsimonia a partir de 347 secuencias de citocromo *b*. Los colores de las ramas representan el área de distribución donde: Rojo=Norteamérica; Verde=África; Azul=Asia; Amarillo=Sudamérica; Rosa= Europa; Aqua = Eurasia.

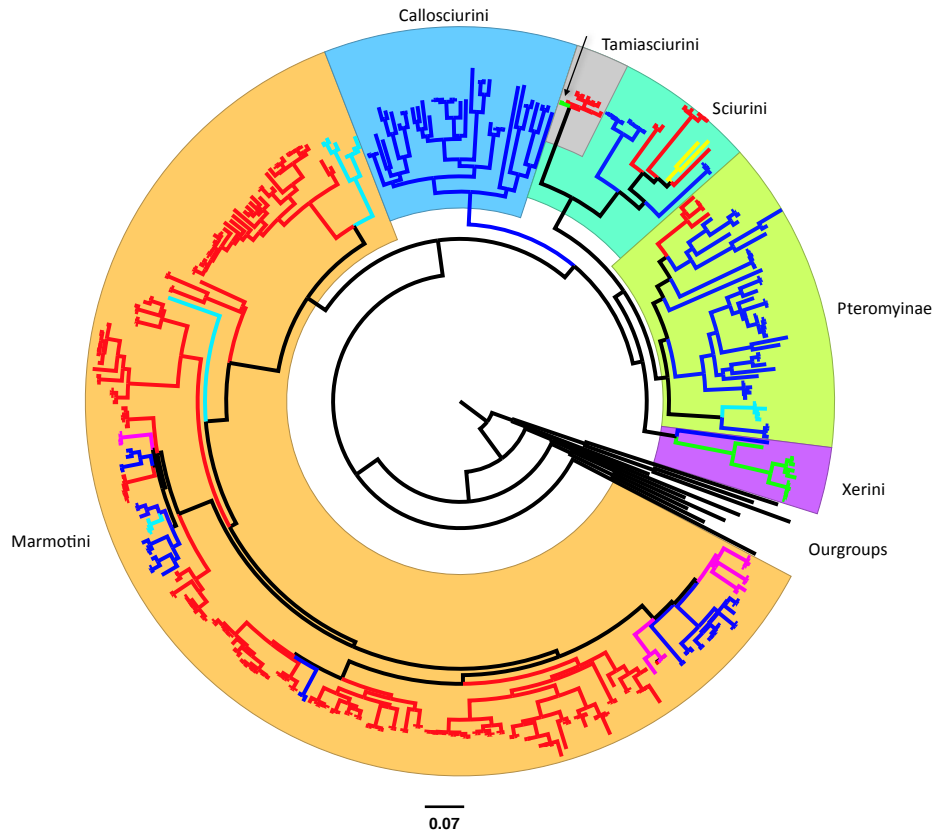


Figura A.2.2 Árbol Máxima Verosimilitud estimado a partir de 347 secuencias de citocromo *b*. Los colores de las ramas representan el área de distribución donde: Rojo=Norteamérica; Verde=África; Azul=Asia; Amarillo=Sudamérica; Rosa= Europa; Aqua = Eurasia.

Anexo A.2.1. Secuencias del gen del citocromo *b* del ADN mitocondrial utilizadas en el análisis.

Especie/subespecie	Número de acceso de GenBank
<i>Ammospermophilus harrisii</i>	AF157926
<i>Belomys pearsonii</i>	AB126245
<i>Callosciurus caniceps</i>	AB043875
<i>Callosciurus erythraeus</i>	HQ698359, HQ698360
<i>Callosciurus finlaysonii</i>	AB043878
<i>Callosciurus prevostii</i>	AB043880, AB043879
<i>Callosciurus nigrovittatus</i>	AB043882
<i>Callospermophilus lateralis trepidus</i>	AF157887, AF157950
<i>Callospermophilus madrensis</i>	AF157947, AF157946
<i>Callospermophilus saturatus</i>	AF157917, AF157916
<i>Cynomys gunnisoni</i>	AF157930, AF157923
<i>Cynomys leucurus</i>	AF157879, AF157838
<i>Cynomys ludovicianus NE</i>	AF157892, AF157890
<i>Cynomys ludovicianus CHI</i>	JQ885590
<i>Cynomys ludovicianus SON</i>	KP217119
<i>Cynomys mexicanus NL</i>	AF157847, AF157841, AF157842
<i>Cynomys mexicanus SLP</i>	KP217130
<i>Cynomys parvidens</i>	AF157929, AF157922
<i>Dremomys gularis</i>	EF539339, EF539337, EF539338
<i>Dremomys lokriah</i>	EF539335
<i>Dremomys pernyi owstoni</i>	HQ698361, HQ698363, HQ698362
<i>Dremomys pernyi</i>	EF539336
<i>Dremomys pyrrhomerus</i>	EF539342
<i>Dremomys rufigenis</i>	EF539341, EF539340
<i>Eoglaucomyms fimbriatus</i>	DQ093186, AB126247, AB126248, AB126246
<i>Eutamias dorsalis</i>	AF157924
<i>Glaucomyms sabrinus</i>	AF030392, AF030390, AF030391
<i>Glaucomyms sabrinus griseifrons</i>	AF359210
<i>Glaucomyms volans</i>	AF157921
<i>Hylopetes alboniger</i>	DQ093187
<i>Hylopetes lepidus</i>	AB126250, DQ093188, AB126251
<i>Hylopetes nigripes</i>	DQ093190
<i>Hylopetes phayrei</i>	AB126252
<i>Hylopetes spadiceus</i>	DQ093189
<i>Ictidomyms mexicanus mexicanus</i>	AF157848
<i>Ictidomyms mexicanus parvidens</i>	JX047304, AF157853, AF157852
<i>Ictidomyms tridecemlineatus</i>	JX047305, JX047306
<i>Ictidomyms tridecemlineatus arenicola</i>	AF157877
<i>Marmota baibacina</i>	AF100714
<i>Marmota baibacina kastchenkoi</i>	AF143914
<i>Marmota baibacina centralis</i>	AF143915
<i>Marmota bobak</i>	AF100712, AF100721
<i>Marmota bobak bobak</i>	AF143916, AF143917
<i>Marmota broweri</i>	JN024621, JN024599, JN024587, JN024583, JN024614
<i>Marmota caligata</i>	FJ438940, FJ438938, FJ438939, AF100718

Especie/subespecie	Número de acceso de GenBank
<i>Marmota camtschatica</i>	AF143921
<i>Marmota camtschatica</i>	AF143922
<i>Marmota camtschatica doppelmayri</i>	AF143922
<i>Marmota camtschatica</i>	AF100715
<i>Marmota caudata aurea</i>	AF143924
<i>Marmota caudata caudata</i>	AF143923
<i>Marmota flaviventris obscura</i>	AF143927
<i>Marmota flaviventris luteola</i>	AF143926
<i>Marmota himalayana robusta</i>	AF143928
<i>Marmota himalayana</i>	GQ329721, GQ329722
<i>Marmota marmota marmota</i>	AF143929, AF143930
<i>Marmota marmota</i>	AF100711
<i>Marmota menzbieri zachidovi</i>	AF143931
<i>Marmota menzbieri</i>	AF100713
<i>Marmota monax</i>	AF157953, AF100719
<i>Marmota monax monax</i>	AF143934
<i>Marmota monax ochracea</i>	AF143932
<i>Marmota olympus</i>	JF313271, JF313272
<i>Marmota sibirica sibirica</i>	AF143937
<i>Marmota vancouverensis</i>	AF143939, AF100717
<i>Notocitellus adocetus</i>	AF157844, AF157843
<i>Notocitellus annulatus</i>	AF157851, AF157849
<i>Otospermophilus atricapillus</i>	JF925311, JF925312, JF925313, AF157945, AF157944
<i>Otospermophilus beecheyi beecheyi</i>	JF925303
<i>Otospermophilus beecheyi fisheri</i>	JF925304, JF925289
<i>Otospermophilus beecheyi douglasii</i>	JF925288
<i>Otospermophilus beecheyi sierrae</i>	JF925293
<i>Otospermophilus variegatus utah</i>	AF157878, AF157860
<i>Otospermophilus variegatus</i>	AF157854
<i>Petaurista elegans</i>	AB510036, AB092610
<i>Petaurista philippensis</i>	AB510037, AB510038, AB510039, AB510040, DQ072107
<i>Petaurista philippensis grandis</i>	AB092611
<i>Petaurista yunanensis</i>	DQ072110
<i>Petaurista hainana</i>	DQ072108
<i>Petaurista xanthotis</i>	DQ072111
<i>Petaurista albiventer</i>	DQ072109
<i>Petaurista alborufus lena</i>	AB092615
<i>Petaurista alborufus castaneus</i>	AB092613, AB092614
<i>Petaurista leucogenys</i>	AB433257, AB433265, AB433234, AB433230
<i>Petaurista petaurista melanotus</i>	AB092609, AB092608
<i>Petaurista petaurista albiventer</i>	AB092612
<i>Poliocitellus franklinii</i>	AF157893, AF157894
<i>Petinomys setosus</i>	AB030260
<i>Pteromys momonga</i>	AB097682, AB164676, AB164675
<i>Pteromys volans</i>	AB164669, AB164650, EU919153, AB164673
<i>Sciurus aberti</i>	U10183, U10181, U10178, U10182, U10179
<i>Sciurus aestuans</i>	AJ389530
<i>Sciurus anomalus</i>	AB292676, AB292677, AB292675
<i>Sciurus carolinensis</i>	FJ200744

Especie/subespecie	Número de acceso de GenBank
<i>Sciurus lis</i>	AB192922, AB192899, AB192906, AB192913
<i>Sciurus niger</i>	U10180, FJ200745
<i>Sciurus stramineus</i>	AB292678
<i>Sciurus vulgaris</i>	JQ395053, JQ395046, AB292680, AB292681
<i>Spermophilopsis leptodactylus</i>	AF157865
<i>Spermophilus alashanicus</i>	AF157868
<i>Spermophilus citellus</i>	FJ715460, FJ715450
<i>Spermophilus dauricus</i>	AF157899, AF157871
<i>Spermophilus erythrogegnys</i>	AF157875, AF157857, AF157855, AF157874, AF157863
<i>Spermophilus fulvus</i>	AF157913, AF157908
<i>Spermophilus major</i>	AF157905, AF157903
<i>Spermophilus musicus</i>	AF157904
<i>Spermophilus pallidicauda</i>	AF157869
<i>Spermophilus pygmaeus</i>	AF157907, AF157910
<i>Spermophilus relictus</i>	AF157867, AF157861, AF157876
<i>Spermophilus suslicus</i>	AF157897, AF157895, AF157898
<i>Spermophilus xanthoprimum</i>	AF157909, AF157902
<i>Sundasciurus mindanensis</i>	AB444722
<i>Tamias amoenus</i>	AF147632, AF147630, AF147631
<i>Tamias bulleri</i>	AF147634
<i>Tamias canipes</i>	AF147635
<i>Tamias cinericollis</i>	AF147636
<i>Tamias durangae</i>	AF147642
<i>Tamias merriami</i>	AF147644
<i>Tamias minimus</i>	AF147650, AF147646, AF147649
<i>Tamias obscurus</i>	AF147652
<i>Tamias panamintinus</i>	AF147656
<i>Tamias quadrimaculatus</i>	AF147657
<i>Tamias quadrivittatus</i>	AF147660, AF147658
<i>Tamias ruficaudus</i>	AF147661
<i>Tamias rufus</i>	AF147662, AF147663
<i>Tamias senex</i>	AF147665
<i>Tamias sibiricus</i>	HQ214036, FJ655241, EU754789, EU754787, EU754800, EU050999, EU754777
<i>Tamias siskiyou</i>	AF147668
<i>Tamias striatus</i>	AY292715
<i>Tamias townsendii</i>	AF147674, AF147675
<i>Tamias ochrogenys</i>	AF147654
<i>Tamias palmeri</i>	AF147655
<i>Tamias sonomae</i>	JN042531, JN042529, JN042530, AF147669
<i>Tamias umbrinus</i>	JN042425, JN042421, JN042399, JN042406
<i>Tamiasciurus hudsonicus</i>	FJ200740, FJ200708, FJ200731, FJ200729, FJ200713, FJ200697, FJ200689, FJ200668
<i>Tamiops maritimus</i>	HQ698382, HQ698381, HQ698367, HQ698372
<i>Tamiops mcclllandii</i>	HQ698391, HQ698389, HQ698390, EF539333
<i>Tamiops rodolphii</i>	HQ698400, HQ698399, HQ698395, HQ698393
	HQ698409, HQ698407, HQ698405, HQ698403, HQ698408, HQ698404, EF539334
<i>Tamiops swinhoei</i>	EF539334
<i>Uroditellus armatus</i>	AF157901, AF157850

Especie/subespecie	Número de acceso de GenBank
<i>Urocitellus beldingi creber</i>	AF157881, AF157951
<i>Urocitellus brunneus brunneus</i>	AF157952, AF157884
<i>Urocitellus brunneus endemicus</i>	AF157883, AF157886
<i>Urocitellus columbianus</i>	JF314509
<i>Urocitellus columbianus columbianus</i>	AF157939, AF157882
<i>Urocitellus columbianus ruficaudus</i>	AF157943, AF157942
<i>Urocitellus elegans elegans</i>	AF157891, AF157839
<i>Urocitellus parryii</i>	GU220854, GU220842, JF314461, JF314455, JF314469, JF314445, JF314486
<i>Urocitellus parryii kennicotti</i>	AY427984
<i>Urocitellus parryii plesius</i>	AY428008
<i>Urocitellus richardsonii</i>	AF157915, AF157914, JF314507
<i>Urocitellus townsendi idahoensis</i>	AF157949, AF157880
<i>Urocitellus townsendi mollis</i>	AF157938, AF157920
<i>Urocitellus townsendi nancyae</i>	AF157933, AF157932
<i>Urocitellus townsendi townsendi</i>	AF157935, AF157934
<i>Urocitellus townsendi vigilis</i>	AF157889, AF157888
<i>Urocitellus undulatus</i>	AF157912, AF157906
<i>Urocitellus washingtoni</i>	AF157937, AF157936
<i>Xerospermophilus mohavensis</i>	FJ965318, JX047298, FJ965315
<i>Xerospermophilus perotensis</i>	AF157840, JX047303, JX047301, JX047302, AF157948
<i>Xerospermophilus spilosoma</i>	JX047300, AF157845, AF157846, JX047299
<i>Xerospermophilus spilosoma marginatus</i>	AF157911, AF157885
<i>Xerospermophilus tereticaudus</i>	JX047297, FJ965319, AF157941
<i>Xerus inauris</i>	DQ010391, DQ010382, DQ010385, DQ010358
<i>Xerus princeps</i>	DQ010397, DQ010393, DQ010398, DQ010396
<i>Xerus rutilus</i>	AY452690
Grupos Externos:	
<i>Idiurus macrotis</i>	AJ389525
<i>Graphiurus murinus</i>	AJ225115
<i>Glis glis</i>	AJ225031
<i>Eliomys quercinus</i>	GQ453669
<i>Anomalurus sp.</i>	AJ389526
<i>Pedetes surdaster</i>	AJ389527
<i>Aplodontia rufa</i>	AJ389528
<i>Castor fiber</i>	AJ389529
<i>Allactaga elater</i>	AJ389534
<i>Cavia porcellus</i>	NC_000884

Anexo A.2.2. Distribución geográfica por género dentro de cada tribu que conforma la familia Sciuridae.

Tribu	Género	Especie	Distribución	
Callosciurini	<i>Callosciurus</i>	<i>caniceps</i>	Tailandia, península de Mianmar y Malasia	
		<i>erythraeus</i>	Sudeste Asia y China	
		<i>finlaysonii</i>	Centro Indochina y Mianmar	
		<i>nigrovittatus</i>	Sur de Malasia, Sumatra y Java	
	<i>Dremomys</i>	<i>prevostii</i>	Sur de Tailandia hasta Malasia	
		<i>gularis</i>	Vietnam y China	
		<i>lokriah</i>	Sur de Asia y China	
		<i>pernyi</i>	Asia (China, India, Mianmar, Veitnam, Taiwan)	
		<i>pyrrhomerus</i>	Endémica de China	
		<i>rufigenis</i>	Sudeste Asia y China	
		<i>Tamiops</i>	<i>maritimus</i>	Laos, Vietnam, sur y este de China
	<i>mcclellandii</i>		Sur de Asia	
	<i>rodolphii</i>		Sur de Vietnam, Laos, Camboya y este de Tailandia	
	<i>swinhoei</i>		Sureste de China y Tailandia	
	Marmotini	<i>Ammospermophilus</i>	<i>harrisii</i>	Norteamérica (Arizona y NM)
		<i>Callospermophilus</i>	<i>lateralis</i>	Oeste de Norteamérica
<i>madrensis</i>			Sudoeste de Chihuahua; endémica de México	
<i>saturatus</i>			Colombia Británica y Washington	
<i>Cynomys</i>		<i>gunnisoni</i>	Norteamérica	
		<i>leucurus</i>	Norteamérica (Utah, Colorado, Wyoming y Montana)	
		<i>ludovicianus</i>	Norteamérica (Canada a México)	
		<i>mexicanus</i>	Endémica de México	
		<i>parvidens</i>	Utah	
<i>Ictidomys</i>		<i>mexicanus</i>	NM, TX, Coah, NL y Tamaulipas	
		<i>tridecimlineatus</i>	Región central de Norteamérica	
<i>Marmota</i>		<i>baibacina</i>	Rusia y China	
		<i>bobak</i>	Europa y Asia	
		<i>broweri</i>	Norte de Alaska	
		<i>caligata</i>	Norteamérica (Oeste Canada y Alaska)	
		<i>camtschatica</i>	Tundra del este de Siberia	
		<i>caudata</i>	Asia	
		<i>flaviventris</i>	Oeste de Norteamérica	
		<i>himalayana</i>	Noroeste y sur de Asia	
		<i>marmota</i>	Centro y sur de Europa	
		<i>menzibieri</i>	Oeste de Tian Shan	
		<i>monax</i>	USA y Canada	
		<i>olympus</i>	Península Olímpica en el estado de Washinton	
		<i>sibirica</i>	Rusia, Mongolia y China	
<i>vancouverensis</i>		Vancouver		
<i>Notocitellus</i>		<i>adocetus</i>	Jalisco, Michoacan, Edo de Mex y Guerrero; endémica de México	
		<i>annulatus</i>	Nayarit y norte de Guerrero; endémica de México	
<i>Otospermophilus</i>		<i>atricarpillus</i>	Península de Baja California; endémica de México	
	<i>beechyi</i>	Oeste USA		
	<i>variegatus</i>	Sur USA hasta centro México		

Tribu	Género	Especie	Distribución
	<i>Poliocitellus</i>	<i>franklinii</i>	USA y Canada
	<i>Spermophilus</i>	<i>alashanicus</i>	Mongolia y China
		<i>citellus</i>	Centro y sudeste de Europa
		<i>dauricus</i>	Rusia, E Mongolia y NE China
		<i>erythrogenys</i>	China y Kazakhstan
		<i>fulvus</i>	Rusia y Kazakhstan
		<i>major</i>	Rusia y N Kazakhstan
		<i>musicus</i>	Endémica al Caucaso
		<i>pallicaudata</i>	China y Mongolia
		<i>pygmaeus</i>	Ucrania, Rusia y Kazakhstan
		<i>relictus</i>	Oeste y Centro de Tien Shan
		<i>suslicus</i>	Endémica al este de Europa
		<i>xanthoprymnus</i>	Anatolia, Armenia e Iran
	<i>Tamias</i>	<i>amoenus</i>	Desde Alberta hasta California
		<i>bulleri</i>	Durango, Zacatecas y Norte de Jalisco; endémica de México
		<i>canipes</i>	NM y TX
		<i>cinericolis</i>	Arizona y NM
		<i>dorsalis</i>	Sudoeste USA y Norte de México
		<i>durangae</i>	Chihuahua, Coahuila y Durango; endémica de México
		<i>merriami</i>	Sudoeste USA y BCN
		<i>minimus</i>	Rocky Mountains y Grandes Planicies; centro y oeste de Canada
		<i>obscurus</i>	Sudoeste USA y México
		<i>ochrogenys</i>	Costa Noroeste de California
		<i>palmeri</i>	Nevada
		<i>panamintinus</i>	Sudeste California y sudoeste Nevada
		<i>quadrifasciatus</i>	Sierra Nevada, California
		<i>quadrivittatus</i>	Colorado, Utah, NM y Arizona
		<i>ruficaudus</i>	Washington, Idaho y Montana
		<i>rufus</i>	Colorado, Utah y Arizona
		<i>senex</i>	Oeste USA (desde Oregon hasta Cali)
		<i>sibiricus</i>	Norte de Europa, Siberia, Mongolia y China
		<i>siskiyou</i>	Noroeste USA
		<i>sonomae</i>	Noroeste California
		<i>striatus</i>	Desde Ontario hasta Louisiana
		<i>townsendii</i>	Costa Pacífico de Norteamérica
		<i>umbrinus</i>	Montana, Wyoming, Colorado, Arizona y California
	<i>Urocitellus</i>	<i>armatus</i>	Montana, Utah, Idaho y Wyoming
		<i>beldingi</i>	Oeste USA
		<i>brunneus</i>	Endémica del oeste de Idaho
		<i>columbianus</i>	Montañas Rocosas (Canada y USA)
		<i>elegans</i>	Centro USA
		<i>parryi</i>	Centro y oeste de Canada y Alaska
		<i>richardsonii</i>	Centro Canada y centro-norte USA
		<i>townsendii</i>	Restringida a Washington
		<i>undulatus</i>	Rusia, Mongolia y China
		<i>washingtoni</i>	Washington y Oregon
	<i>Xerospermophilus</i>	<i>mohavensis</i>	Desierto del Mohave

Tribu	Género	Especie	Distribución	
Pteromyinae	<i>Belomys</i>	<i>perotensis</i>	Veracruz y Puebla; endémica de México	
		<i>spilosoma</i>	Sudoeste USA y Norte de México	
		<i>tereticaudis</i>	Desierto de Sonora	
		<i>pearsonii</i>	Asia	
		<i>Eoglaucmys</i>	<i>fimbriatus</i>	Afganistan, norte India y norte Pakistan
			<i>sabrinus</i>	Norteamérica
		<i>Glaucmys</i>	<i>volans</i>	Norteamérica
			<i>Hylopetes</i>	<i>alboniger</i>
		<i>lepidus</i>		Borneo y Java
		<i>nigripes</i>		Endémica de Filipinas
	<i>phayrei</i>	Asia		
	<i>Petaurista</i>	<i>spadiceus</i>	Asia (Tailandia Malasia, Sumatra y Borneo)	
		<i>albiventer</i>	Asia	
		<i>alborufus</i>	Asia	
		<i>castaneus</i>	Asia	
		<i>elegans</i>	Asia	
		<i>hainana</i>	Asia	
		<i>leucogenys</i>	Asia	
		<i>melanotus</i>	Asia	
		<i>petaurista</i>	Asia	
<i>philippensis</i>		Asia		
<i>Petinomys</i>	<i>setosus</i>	Mianmar, Tailandia, Malasia, Borneo		
	<i>Pteromys</i>	<i>momonga</i>	Endémica de Japón	
		<i>volans</i>	Rusia, Europa y Asia	
	Sciurini	<i>Sciurus</i>	<i>aberti</i>	Norteamérica (desde Wyoming hasta Durango)
			<i>aestuans</i>	Sur América (Brasil, Guyanas, Suriname, Venezuela y Colombia)
<i>anomalus</i>			Sudeste Europa al Sudoeste de Asia	
<i>carolinensis</i>			Este USA	
<i>lis</i>			Endémica de Japón	
<i>niger</i>			Sur y noreste de México, este y centro USA y centro-sur de Canada	
<i>stramineus</i>			Oeste de Perú y Ecuador	
<i>vulgaris</i>			Paleártica: Europa, Siberia, Mongolia y China; Japón	
Tamiasciurini	<i>Tamiasciurus</i>	<i>hudsonicus</i>	Alaska, Canada y USA	
Xerini	<i>Spermophilopsis</i>	<i>leptodactylus</i>	Centro de Asia	
		<i>inauris</i>	Namibia y Bostwana	
		<i>princeps</i>	Namibia y Angola	
		<i>rutilus</i>	Este de África	

Material suplementario. Revisión del avance en el conocimiento de la genética de poblaciones de roedores en México.

Para determinar el avance en el conocimiento de la genética de poblaciones de roedores en México, se realizó una búsqueda en “*Web of Science*” (<http://apps.webofknowledge.com>). Se utilizaron como palabras clave “*population genetics*” y “*Mexico*”, refinando la búsqueda por país (México) y se obtuvieron 1,033 resultados. Se revisaron los resultados, seleccionando únicamente aquellos estudios realizados con mamíferos, excluyendo los realizados con humanos y con animales domésticos, obteniendo 68 registros de publicaciones de genética de poblaciones de mamíferos silvestres en México desde 1995 hasta el 26 de enero de 2015.

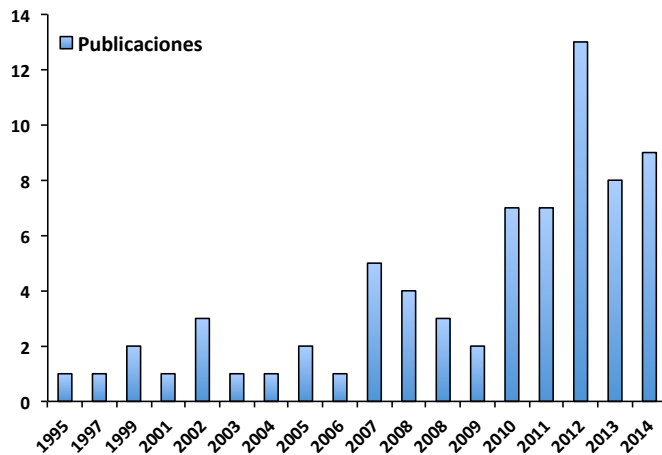


Figura 1. Número de publicaciones de genética de poblaciones de mamíferos de México producidas por año entre 1995 y enero 2015.

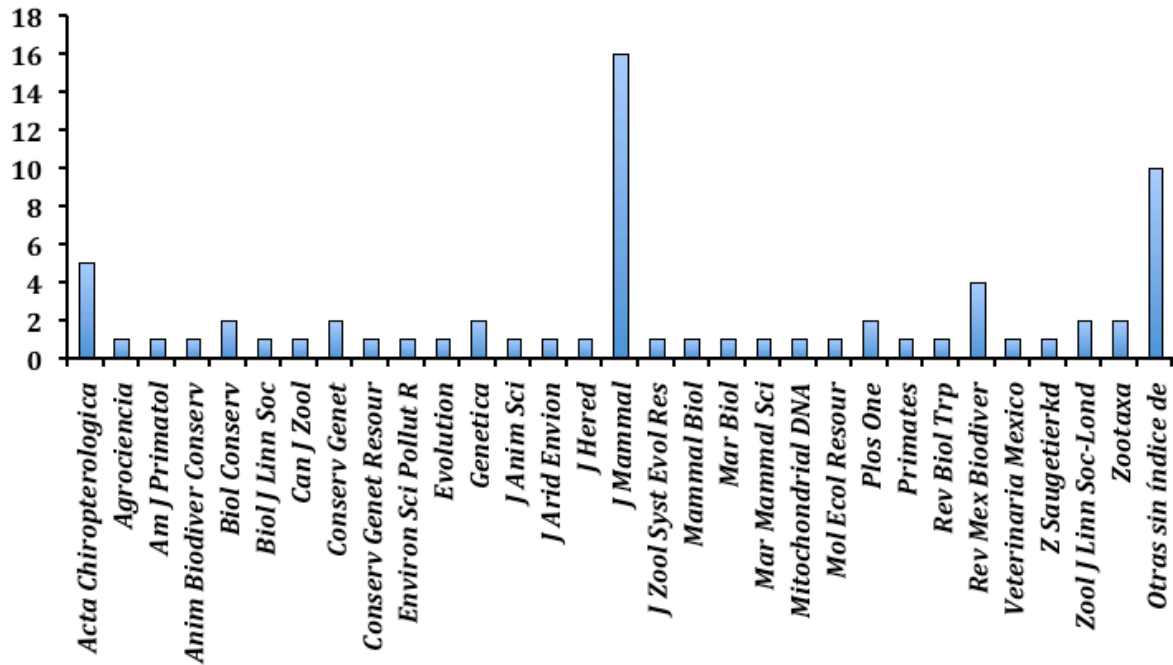


Figura 2. Número de registros por revista en que han aparecido publicaciones relacionadas con genética de poblaciones de mamíferos de México.

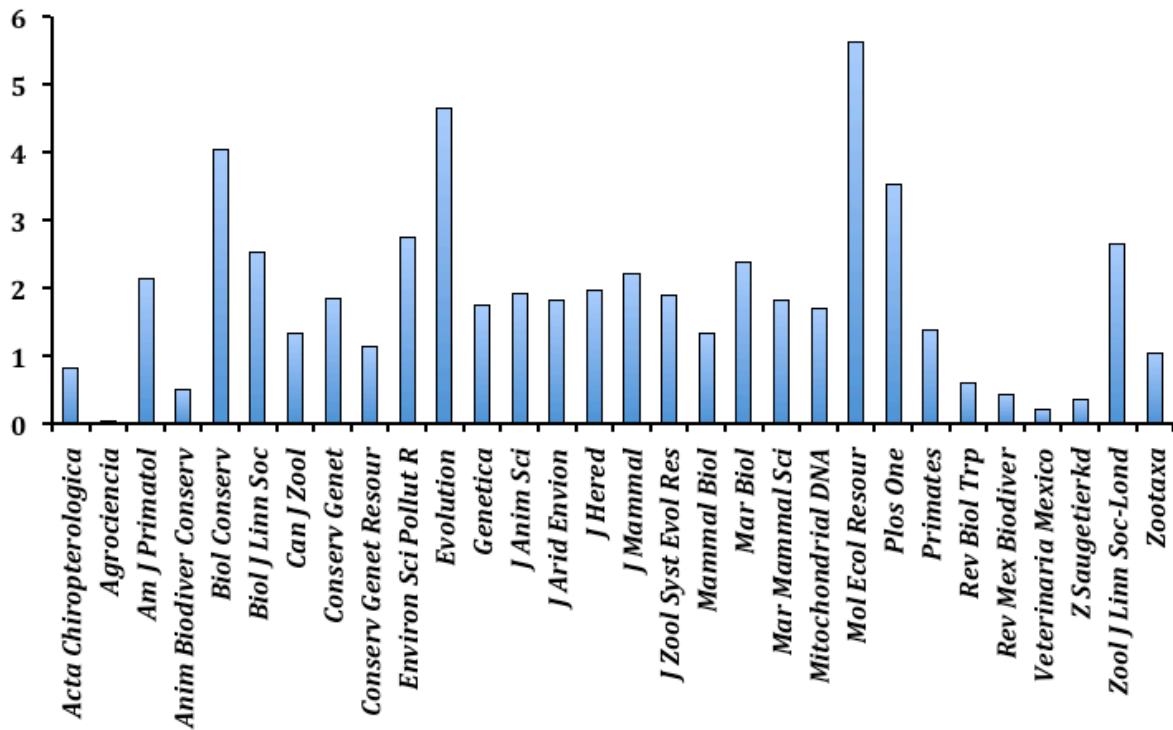


Figura 3. Índice de impacto por revista en que han aparecido publicaciones relacionadas con genética de poblaciones de mamíferos de México.

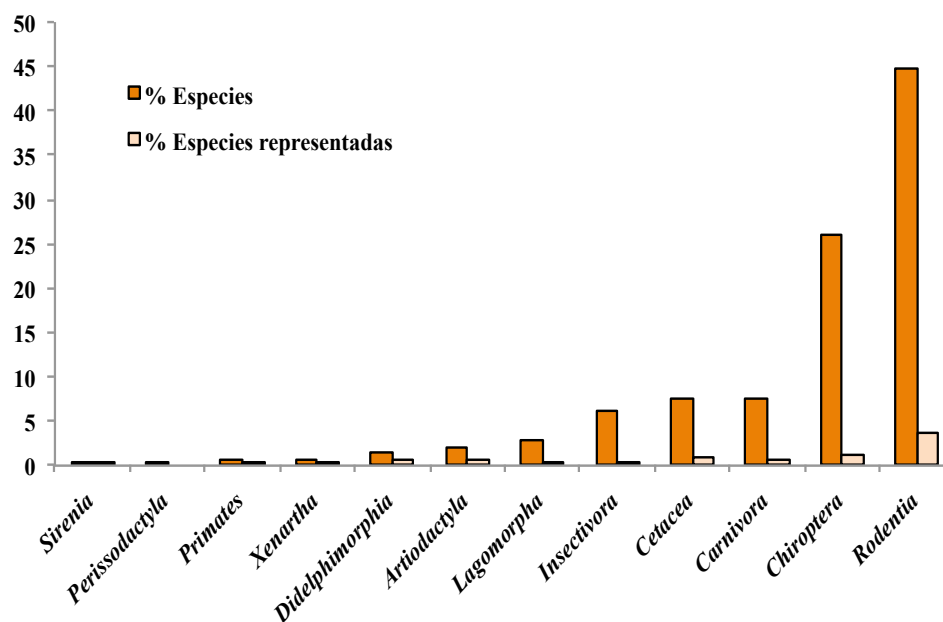


Figura 4. Porcentaje de especies de mamíferos mexicanos con las que se han realizado estudios de genética de poblaciones (% especies representadas), en relación al porcentaje que representa el número total de especies dentro de cada orden respecto a la diversidad total de mamíferos de México (% especies).

Tabla 1. Desglose de artículos de genética publicados sobre especies de mamíferos de México, por Orden incluyendo número de géneros y especies, así como el tema que abordan.

Orden	Total	Géneros	Especies	Temas					
				Variación y estructura genética	Tamaño efectivo	Filogeografía	Filogenética	Dispersión y flujo génico	Otros
Artiodactyla	6	3	3	4	1	0	0	0	0
Carnivora	4	4	4	3	0	1	0	0	0
Cetacea	6	4	5	6	0	0	0	0	0
Chiroptera	11	6	6	0	1	3	1	2	0
Xenartha	2	1	1	1	0	0	0	1	0
Didelphimorphia	3	2	3	2	0	0	0	0	1
Lagomorpha	6	3	2	3	0	1	1	0	1
Primates	3	1	2	3	0	0	0	0	1
Rodentia	24	18	20	9	0	6	4	0	5
Sirenia	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Insectivora	2	1	1	0	0	0	0	0	2
Total	68	44	48	32	2	11	6	3	10

Tabla 2. Relación de los estudios de genética de poblaciones de roedores realizados en México entre 1995 y 2015.

Familia	Género	Especie	Distribución	Región	Referencia	Marcadores	Tema	Conservación
Cricetidae	Baiomys	<i>B. musculus</i>	Amplia	Morelos	Vargas et al. 2012	ISSR	Genética del paisaje	SI
Cricetidae	Habromys	<i>H. simulatus</i>	Endémica	Hidalgo y Oaxaca	Castañeda-Rico et al. 2011	10 microsatélites nucleares	Variación y diferenciación genética	SI
Cricetidae	Megadontomys	<i>sp.</i>	Endémica	Hidalgo, Veracruz, Oaxaca y Guerrero	Vallejo y González-Cózatl 2011	Cit- <i>b</i>	Filogenética	SI
Cricetidae	Microtus	<i>M. pennsylvanicus</i>	Amplia	Noroeste de Chihuahua	List et al. 2010	Cit- <i>b</i>	Divergencia genética	SI
Cricetidae	Neotoma	<i>N. varia</i>	Endémica	Península de Baja California	Álvarez-Castañeda y Rios 2010	Cit- <i>b</i>	Filogenética	SI
Cricetidae	Oryzomys	<i>O. couesi cozumelae</i>	Endémica	Isla Cozumel	Vega et al. 2007	5 microsatélites nucleares	Variación y estructura genética	SI
Cricetidae	Otodylomys	<i>O. phyllotis</i>	Amplia	Istmo de Tehuantepec a Costa Rica	Gutiérrez-García y Vázquez-Domínguez 2012	Cit- <i>b</i>	Filogeografía	NO
Cricetidae	Peromyscus	<i>P. furvus</i>	Endémica	Veracruz, Puebla, Oaxaca, Hidalgo y San Luis Potosí	Ávila-Valle et al. 2012	ND3-ND4	variación geográfica	NO
Cricetidae	Peromyscus	<i>P. melanophrys</i>	Endémica	Morelos	Mussali-Galante et al. 2013	8 microsatélites nucleares	Efectos genéticos de contaminación	NO
Cricetidae	Peromyscus	<i>P. schmidlyi</i>	Endémica	Sierra Madre Occidental	López-González et al. 2014	Cit- <i>b</i> y D-loop	Filogeografía	NO
Cricetidae	Reithrodontomys	<i>R. spectabilis</i>	Endémica	Isla Cozumel	Espindola et al. 2014	10 microsatélites nucleares	Estructura genética	SI
Geomyidae	Thomomys	<i>sp.</i>	Amplia	Península de Baja California	Trujano-Álvarez y Álvarez-Castañeda 2013	Cit- <i>b</i>	filogenética	NO
Geomyidae	Thomomys	<i>T. bottae</i>	Amplia	Península de Baja California	Trujano-Álvarez y Álvarez-Castañeda 2007	No dice en el abstract	Revisión taxonómica	NO
Heteromyidae	Chaetodipus	<i>C. arenarius</i>	Endémica	Península de Baja California	Álvarez-Castañeda y Rios 2011	Cit- <i>b</i> y COIII	Revisión taxonómica	NO
Heteromyidae	Chaetodipus	<i>C. fallax</i>	Amplia	Península de Baja California	Rios y Álvarez-Castañeda 2010	Cit- <i>b</i>	Filogeografía y sistemática	NO
Heteromyidae	Dipodomys	<i>D. merriami</i>	Amplia	Península de Baja California	Álvarez-Castañeda et al. 2009	Cit- <i>b</i> y COIII	Estructura genética y heterogeneidad de hábitat	NO
Heteromyidae	Liomys	<i>L. pictus</i>	Amplia	Jalisco	Vázquez-Domínguez et al. 2002	Aloenzimas	Estructura genética y heterogeneidad de hábitat	NO
Heteromyidae	Liomys	<i>L. pictus</i>	Amplia	Jalisco	Vázquez-Domínguez et al. 1999	Aloenzimas	Heterocigosis y demografía	NO
Sciuridae	Ammospermophilus	<i>sp.</i>	Endémica	Península de Baja California	Álvarez-Castañeda 2007	Cit- <i>b</i>	Sistemática	NO

Familia	Género	Especie	Distribución	Región	Referencia	Marcadores	Tema	Conservación
Sciuridae	Cynomys	<i>C. ludovicianus</i>	Amplia	Norte de Chihuahua	Castellanos-Morales et al. 2014	Cit- <i>b</i> y 10 microsatélites nucleares	Variación y estructura genética	SI
Sciuridae	Glaucomys	<i>G. volans</i>	Amplia	Centro de México	Ceballos et al. 2010	Región Control	Distribución geográfica y diversidad genética	SI
Sciuridae	Otospermophilus	<i>O. atricapillus</i>	Endémica	Península de Baja California	Álvarez-Castañeda y Cortés-Calva 2011	Cit- <i>b</i>	Filogeografía	NO
Sciuridae	Xerospermophilus	<i>X. perotensis</i>	Endémica	Veracruz, Puebla y Tlaxcala	Fernández 2012	Cit- <i>b</i> , 12S ribosomal (mtDNA) y GSR, IRBP (nucleares)	filogenética	SI
Sciuridae	Xerospermophilus	<i>X. perotensis</i>	Endémica	Veracruz, Puebla y Tlaxcala	Ochoa et al. 2012	Región control y 5 microsatélites nucleares	Genética de poblaciones espacio-temporal	SI